

ОБЗОР

УДК 615.356.973.4.07

© Коллектив авторов

МЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ И ФОСФОЛИПИДЫ КАК ЭФФЕКТОРЫ ОБРАТНОГО ТРАНСПОРТА ХОЛЕСТЕРИНА

Т.И. Торховская^{1,2}, О.М. Ипатова¹, Н.В. Медведева¹, Т.С. Захарова^{1,2}, Э.М. Халилов²

¹ГУ НИИ Биомедицинской химии РАМН, 119121, Москва, Погодинская ул., 10;
факс (495) 245-08-57; эл. почта: torti@mail.ru

²ГУ НИИ физико-химической медицины Росздрава.

В обзоре рассмотрен мембранный аспект процесса выведения из клеточных мембран холестерина – как первого этапа его т.н. “обратного” транспорта в печень, осуществляемого липопротеинами высокой плотности (ЛВП) плазмы крови. В дополнение к прежним представлениям, рассматривающим его как часть цепи процессов трансформации липопротеинов, осуществляемых с участием белков плазмы – апопротеинов и белков-переносчиков – в последние годы, в связи с развитием протеомики, появилось немало данных, указывающих на активное участие в этом процессе и донора холестерина – плазматической мембраны клеток и встроенных в нее специфических белков. Это, в первую очередь, АТР-связывающий кассетный транспортер (ABC-A1) и мембранный рецептор SR-BI. Приведены данные, свидетельствующие о нарушениях обратного транспорта холестерина в случаях нарушений генов этих белков, примером чего является болезнь Танжера или генетические манипуляции с экспериментальными животными. Хотя точный механизм процессов с участием этих мембранных белков неизвестен, предполагают, что ABC-A1, взаимодействуя со свободным апопротеином A1 плазмы, способствует образованию комплекса апоA1 с выходящими при этом из мембраны фосфолипидами. Далее этот комплекс осуществляет выход мембранного холестерина, одновременно достраиваясь до частицы ЛВП. Для ряда клеток показана также корреляция выхода холестерина к ЛВП с уровнем экспрессии SR-BI, обратимо связывающего ЛВП, что может быть обусловлено влиянием этого рецепторного белка на молекулярную организацию фосфолипидов и холестерина в мембране, облегчающим выход холестерина. Рассмотрены данные о свойствах ABC-A1 и SR-BI, о предполагаемых механизмах действия, об их месте в цепи процессов обратного транспорта холестерина и сопряженности их функционирования с фосфолипидным матриксом биомембраны.

Ключевые слова: белок ABC-A1, рецептор SR-BI, липопротеины высокой плотности, обратный транспорт холестерина, мембраны, фосфолипиды, атеросклероз.

ВВЕДЕНИЕ. Многообразие и сложность процессов, связанных с липопротеинами плазмы крови, обусловлены их функцией в холестериновом гомеостазе. Важное место в нем занимает, в частности, последовательная цепь реакций, началом которой является перенос холестерина из биомембран к липопротеинам высокой плотности (ЛВП), с последующей доставкой в печень. Эту цепь реакций принято называть “обратным транспортом холестерина” (ОТХ) (Reverse Cholesterol Transport) – в противоположность его транспорту из печени к периферическим клеткам. Это понятие ввел более 30 лет назад Glomset, открывший фермент лецитин-холестерин-ацилтрансферазу (ЛХАТ) и предсказавший его функцию как одного из звеньев обратного транспорта холестерина [1].

Описанию процессов ОТХ, интерес к которому обусловлен во многом его защитной ролью в атерогенезе, посвящено немало статей и обзоров [2-5]. Представления об этом сложном процессе развивались и углублялись в течение последних десятилетий. Если вначале он рассматривался только как захват холестерина частицами ЛВП, его этерификация через ЛХАТ и поступление в печень, то в 80-90-ые годы, с выявлением гетерогенности и трансформации ЛВП, их связи с метаболизмом апоВ-содержащих липопротеинов, функционированием липид-переносящих неапопротеиновых белков плазмы, сформировались более детальные представления о последовательности процессов ОТХ. Было показано, что преимущественными акцепторами холестерина из мембран периферических клеток являются наиболее плотные и мелкие частицы ЛВП, подфракция ЛВП₃. По мере захвата новых молекул холестерина и их этерификации они увеличиваются в размере, постепенно трансформируясь в подфракцию ЛВП₂, меньшей плотности, где холестерин, в виде эфиров, локализуется в ядре частицы. При этом часть эфиров холестерина переходит к менее плотным фракциям, в основном липопротеинам очень низкой плотности (ЛОНП), с участием белка переносчика эфиров холестерина (Cholesterol Ester Transport Protein - CETP) [6]. В свою очередь, из ЛОНП к ЛВП транспортируется (с участием фосфолипид-транспортного белка, ФЛТБ) избыток их фосфолипидной поверхности, высвобождающийся в результате липолиза триглицеридного ядра. Это также способствует постепенному формированию ЛВП₂, поступающих затем в печень с участием рецепторов, проявляющих сродство к апопротеинам В и Е [7], и рецепторов SR-B1 [8].

Отмечается, что каждый этап ОТХ протекает с непосредственным участием фосфолипидов. Выявленная еще в 70-ые годы способность ЛВП “захватывать” холестерин из клеток, сорбируя его в поверхностный фосфолипидный монослой, с участием апопротеина А1 поверхности ЛВП [2, 4], была подтверждена многочисленными исследованиями [9, 10]. Недавно Куjiраока с соавт. [11] наблюдали при внутривенном введении человеку дискоидальных комплексов фосфатидилхолина с апопротеином А1 повышение активности ОТХ, уровня пре-β-ЛВП, концентрации CETP и активности ФЛТБ (при снижении общего содержания ФЛТБ в плазме). Авторы делают вывод, что ОТХ может стимулироваться путем продукции пре-β-ЛВП, а также этерификации и переноса холестерина на липопротеины других классов.

В последние годы понимание механизма переноса холестерина из биомембран к ЛВП значительно расширилось в связи с возможностью изучения клеточных, в том числе мембранных белков с помощью новых, протеомных подходов. Выявлены ранее неизвестные мембранные белки, связанные с регуляцией метаболизма липопротеинов, а также со способностью клетки отдавать мембранный холестерин. Если ранее, говоря о процессе выхода холестерина из клетки, обсуждали лишь свойства его акцептора – частиц ЛВП, с входящими в их состав фосфолипидами и белками, то теперь становится ясной и роль донора холестерина – клеточной мембраны. Оказывается, что даже при эффективном акцепторе возможны генетические особенности, ограничивающие отток холестерина из мембраны, и это может стать причиной ряда проатерогенных нарушений. Это касается в основном мембранных белков SR-B1 и ABC-A1 [2, 8, 12-14].

1. Функционирование клеточного рецептора к ЛВП – SR-B1.

Скорость оттока холестерина из клеток к ЛВП сопряжена с уровнем экспрессии рецепторного белка, называемого “скэвенджер-рецептор, класс В1” (SR-B1) [8, 12, 13]. Этот белок был выделен из гепатоцитов и описан Acton с соавт. [8]. Сначала была выявлена его способность избирательно извлекать из ЛВП₂ эфиры холестерина в печени и стероидогенных тканях. Позже этот рецептор был обнаружен в макрофагах, и появились данные о его способности стимулировать также и отток свободного холестерина из клеток. Было показано, что SR-B1 локализуется в кавеолах плазматических мембран, с которыми непосредственно и

связано его функционирование. Когда SR-B1 печени взаимодействует с богатыми эфирами холестерина частицами ЛВП₂, он способствует селективному захвату из них этерифицированного холестерина с обратимым его включением в кавеолы. Из них молекулы эфиров холестерина необратимо интернализуются для внутриклеточного метаболизма. Когда же SR-B1 связывает бедные холестерином ЛВП, то стимулируется другой процесс - переход избыточного свободного холестерина из кавеоларных областей мембран в частицу ЛВП [15]. Считают также, что SR-B1 может стимулировать отток холестерина и по другому механизму, независимому от ЛВП - путем изменения состава мембранных доменов и/или изменения организации плазматической мембраны, в том числе кавеол. При этом общее направление движения холестерина может определяться градиентом концентраций [16].

В отличие от других скэвенджер-рецепторов, интернализующихся после связывания с лигандом, SR-B1 связывает ЛВП обратимо. В клетках печени он инициирует селективный захват эфиров холестерина из ЛВП₂. Отсутствие его - у мышей с “выключенным” геном SR-B1 (“нокаутных” - knock-out – по SR-B1) - приводит к 80%-ной потере селективности [18]. Показано, что сверхэкспрессия SR-B1 в СНО-клетках повышает поток холестерина в обоих направлениях. В других клеточных линиях наблюдалась четкая корреляция между оттоком холестерина к ЛВП (или к сыворотке) и уровнем экспрессии SR-B1 [12].

Исходя из данных о связывании SR-B1 не только с ЛВП, но и с другими липопротеинами, а также о его способности связываться с анионными фосфолипидами, предположили, что важную роль в обеспечении связывания играют фосфолипиды поверхности липопротеиновой частицы [17].

Особенно существенной регуляция функционирования SR-B1, включающего как выход холестерина, так и поступление его этерифицированной формы в клетку, оказывается в клетках печени [19], где на разных этапах имеет место движение холестерина в обоих направлениях. Можно предположить, что повышение выхода холестерина приводит к усилению его потока и в противоположном направлении, внутрь клетки. По всей вероятности, здесь играет роль состав акцептирующей среды (сыворотки), так как было показано, что добавление к сыворотке фосфолипидов увеличивает сродство ЛВП к SR-B1, тем самым стимулируя предпочтительный выход холестерина из клеток [20]. При этом фосфолипиды заметно повышали выход холестерина из клеток с высоким уровнем экспрессии SR-B1, но не оказывали влияния на клетки с низкой его экспрессией. Выход холестерина к фосфолипидным везикулам из пальмитоил-олеоил-фосфатидилхолина также коррелировал с уровнем SR-B1, что указывает на возможность взаимодействия с этим рецептором не только липопротеинового белка, но и фосфолипидов. В то же время, в этих экспериментах отток холестерина от бесклеточного искусственного донора не стимулировался при обогащении сыворотки фосфолипидами. Это показывает, что в стимуляции процесса акцепции холестерина фосфолипидами из клеток активную роль играет SR-B1.

Выход холестерина коррелировал с концентрацией фосфолипидов в ЛВП, и поэтому из двух подфракций ЛВП лучшими акцепторами оказывались ЛВП₂, в силу большего содержания в них фосфолипидов (хотя из-за преобладания ЛВП₃ их суммарный вклад в выведение клеточного холестерина оказывается выше).

В серии работ лаборатории Rothblat [16, 21, 22] было убедительно показано, что активность выхода холестерина из клеток определяется также и составом фосфолипидов ЛВП. Так, при обогащении их фосфатидилхолином существенно повышался выход холестерина из мембран клеток, особенно при высокой экспрессии SR-B1. Обогащение же ЛВП сфингомиелином влияло только на транспорт холестерина в противоположном направлении - в клетку, заметно снижая его, что также сдвигало баланс в сторону увеличения суммарного выхода клеточного холестерина.

По мнению Yancey с соавт. [22], влияние SR-B1 на выход холестерина состоит не в присоединении ЛВП, а, главным образом, в изменении молекулярной упаковки фосфолипидов и холестерина, облегчающей выход последнего из мембраны. Механизм же общей активации выхода фосфатидилхолином объясняют тем, что обогащенные им ЛВП становятся лучшими акцепторами для уже покинувшего мембрану холестерина [16]. Таким образом, вопрос снова сводится к диффузии через растворитель, обсуждавшейся в ранних работах, когда еще ничего не было известно об участии мембранных белков [1, 3]. В то же время с помощью флуоресцентно-меченого холестерина было показано, что десорбция холестерина через водную фазу неэффективна вследствие большой энергии активации этого процесса [16, 22]. Поэтому, на наш взгляд, даже в случае “подготовленности” мембранного холестерина к выходу из мембраны при каких-то (обусловленных белком SR-B1) благоприятных структурных изменениях, вряд ли можно ожидать существенного самостоятельного его отрыва от поверхности мембраны без непосредственного контакта с частицей-акцептором.

Недавно была показана и другая способность SR-B1 - осуществлять перенос фосфолипидов между липопroteинами. У мышей с выключенным ФЛТБ SR-B1 оказался способным удалять фосфолипиды и холестерин из ЛОНП, частично компенсируя таким образом отсутствие ФЛТБ. При этом интенсивность всех реакций с участием SR-B1 заметно снижалась в случае диеты с преобладанием насыщенных жирных кислот, что указывает на существенное значение для функционирования этого белка жидкости фосфолипидных областей мембраны [20].

2. АТФ-связывающий кассетный транспортер (“ABC-белок”) и выход из клетки фосфолипидов и холестерина.

В последние годы при рассмотрении вопросов, связанных с выходом холестерина из клетки, большое внимание уделяется интегральным белкам плазматической мембраны, так называемым ABC-белкам (АТФ-связывающие кассетные белки, АТФ Binding Cassette proteins). С помощью этих белков-транспортеров, класса флппаз, клетка “избавляется” от целого ряда соединений – липидов, стероидов, попадающих в нее лекарств и др. [2, 23, 24].

Из 48 белков этого класса один - ABC-A1 - имеет непосредственное отношение к выведению мембранного холестерина [2, 14, 25]. Как и все ABC-белки, он интегральный, содержит две области, из 6 трансмембранных доменов каждая, и два нуклеотид-связывающих домена, выступающих в цитоплазму (рис. 1).

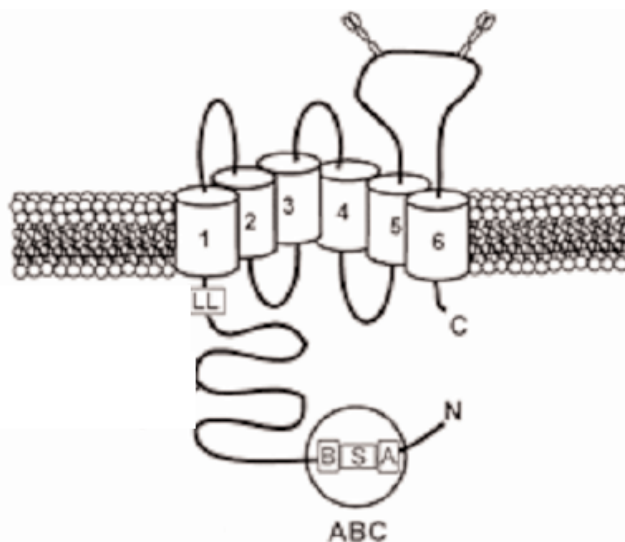


Рисунок 1.

Схема общего структурного элемента АТФ-связывающих кассетных белков (ABC-белков) клеточной мембраны. 1-6 – трансмембранные домены. LL – домен, богатый D-лейцином. ABC - нуклеотид-связывающий домен (“кассета”). А, В – пептиды “Walker A” и “Walker B” соответственно.

S – “сигнатурный” домен (по [24] с изменениями).

Нуклеотид-связывающие домены (“кассеты”), в свою очередь, содержат два постоянных пептида (характерных для эукариотических клеток на всех видах эволюционной лестницы), называемые Walker A и Walker B, и один уникальный фрагмент, “сигнатурный”, характерный для отдельных семейств ABC [24, 25].

Белок ABC-A1 был сначала обнаружен при исследовании мутантных видов кур с отсутствием ЛВП, а затем у людей с болезнью Танжера - наследственным заболеванием, также характеризующимся отсутствием ЛВП [2, 26]. Было показано, что фибробласты, выделенные из таких мутантных видов, не отдают холестерин при инкубации с ЛВП *in vitro* [24] – в условиях, когда обычно происходит отток мембранного холестерина из клеток [4, 5, 9]. При этом заболевании в фибробластах и в плазме нарушен также транспорт фосфолипидов к апопротеину A1 [26]. Оказалось, что выявленные нарушения вызваны отсутствием гена, кодирующего белок ABC-A1. В дальнейших многочисленных исследованиях было показано, что клетки тканей мышей с поврежденным или отсутствующим геном белка ABC-A1 не способны отдавать мембранный холестерин. У таких животных наблюдалось накопление холестерина в тканях, а в плазме крови был выраженный дефицит ЛВП. У мышей, трансгенных по ABC-A1, наблюдалась противоположная тенденция – возрастание ЛВП и выхода холестерина из клеток [14].

Результаты этих работ изменили представление о формировании ЛВП. Если раньше считалось, что они образуются только внутри клетки (в основном в печени и в некоторой степени в кишечнике), то открытие белка ABC-A1 позволило предположить возможность внеклеточного формирования ЛВП, в плазме крови, заключающегося в липидации (т.е. в снабжении липидами – фосфолипидами и холестерином) свободного апоA1, и, таким образом, “достраивании” его до готовой частицы ЛВП. Это подтверждается почти полным отсутствием как фосфолипидов, так и ЛВП в плазме у кур с мутацией ABC-A1 белка в области N-конца молекулы. Введенный меченый апоA1 быстро исчезал из циркуляции, что объясняют более быстрым катаболизмом свободного, не липидированного апопротеина по сравнению с входящим в состав ЛВП. Было высказано предположение, что ABC-A1 инициирует первый этап обратного транспорта холестерина - выход из клетки фосфолипидов и холестерина к апоA1 – свободному или содержащему небольшое количество фосфолипидов (“мало липидированному”, *lipid poor*) [2]. При этом наиболее существенными отмечают следующие этапы (рис. 2) [27]:

- 1) специфическое взаимодействие – по еще не выясненному механизму - внеклеточного свободного (или “мало липидированного”) апоA1 с мембранным ABC-A1;
- 2) выход фосфолипидов из клеточной мембраны, образование ими комплекса с апоA1;
- 3) выход мембранного холестерина из клетки и присоединение к этому комплексу;
- 4) продвижение внутриклеточных липидов к цитоплазматической мембране.

Предполагают, что в этих процессах могут участвовать другие мембранные белки-партнеры. Взаимодействие апоA1 с ними или с ABC-A1 через цепь сигнальных процессов стимулирует переход фосфолипидов, возможно, с холестерином, из внутриклеточных мембран, а также гидролиз его эфиров. Предполагают существование и другого механизма: мембранные везикулы, содержащие ABC-A1, транспортируются к внутриклеточным липидным отложениям или внутриклеточным мембранам, ABC-A1 “засасывает” липиды в просвет везикулы, после чего везикулы транспортируют свой “груз” обратно к плазматической мембране [2, 27]. Большое внимание уделяется в последние годы внутриклеточной регуляции и контролю этих реакций, которые осуществляются путем передачи сигнальных процессов в клетке (signaling), регулируемых на транскрипционном и посттрансляционном уровнях [28]. Например, на макрофагах мыши показана стимуляция выхода холестерина сAMP, с участием механизмов, связанных с протеинкиназой C [28].

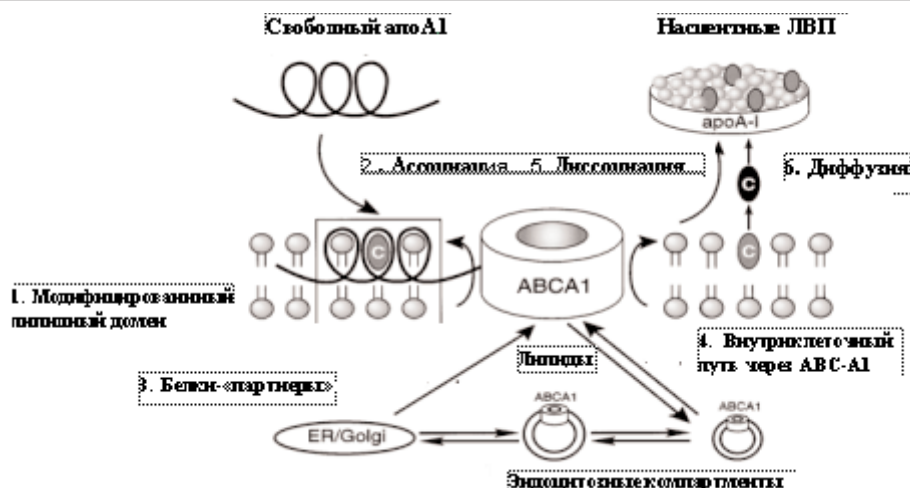


Рисунок 2.

Модель механизмов транспорта ФЛ с помощью ABCA1 (по [27] с изменениями).

Предполагается несколько процессов, очередность которых пока не ясна (и может не соответствовать представленной на рисунке). 1 - Модифицированный липидный домен, соседний с ABCA1, создается транслокацией липидного субстрата через мембранный бислой, осуществляемой ABCA1. 2 - "Мало липидированный" (или свободный) апоА1 ассоциирует или непосредственно с ABCA1, или /и с соседним с ним модифицированным мембранным доменом. 3 - Липиды и потенциальные "вспомогательные" ("партнерные") белки транспортируются к плазматической мембране. 4 - поверхностный ABCA1 реагирует по пути внутриклеточного эндоцитоза. 5 - Связанный с липидом апопротеин диссоциирует от плазматической мембраны, с одновременным эффлаксом холестерина и фосфолипидов. 6 - выход дополнительного холестерина к насыщенным (вновь образованным) ЛВП происходит через водную диффузию (*ER* - эндоплазматический ретикулум, *C* - холестерин).

Окончательная структура ABCA1 и характер её возможных конформационных изменений полностью еще не определены, но считают, что этот белок действует по принципу Р-гликопротеиновых транспортеров. Предполагают, что два соседних трансмембранных домена располагаются в мембране так, что формируют большую водную полость, закрытую для цитозоля, но открывающуюся через поры на клеточной поверхности и в мембранной липидной фазе [29] (рис. 3).

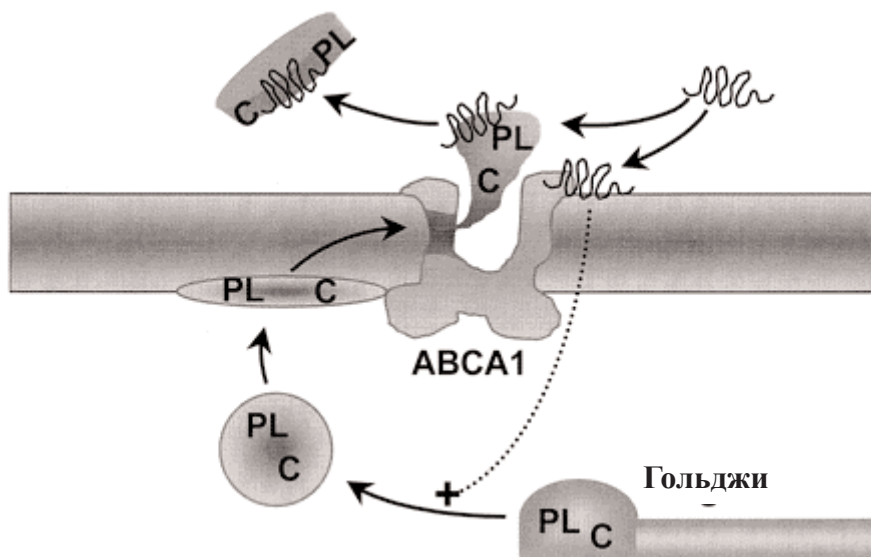


Рисунок 3.

Модель секреторного пути выхода фосфолипидов и холестерина из клетки с участием ABCA1 транспортера (по [29] с изменениями) (*PL* - фосфолипиды, *C* - холестерин).

Поскольку такая камера не открыта для цитозоля, Р-гликопротеин, как полагают, действует как “флоппаза”, транслоцируя липиды в водную область камеры с внутренней стороны плазматической мембраны. Относительно большой размер пор (2-3 нм) обеспечивает возможность одновременной транслокации для множества молекул. Этим объясняют возникновение диффузных структур, выступающих из мембраны и взаимодействующих с апопротеином [29].

По аналогичному принципу работают и мембранные белки-транспортёры множественной лекарственной устойчивости (*multidrug resistance* – MDR), входящие в семейство ABC-транспортёров и обладающие специфичностью к целому ряду соединений [30]. Для одного из них, Р-гликопротеина MDR3 (он же – ABC-B4), транспортирующего фосфатидилхолин в каналикулярные мембраны желчного пузыря, показано образование выступающих из мембраны везикул, и, по аналогии, предполагают возможность такого же механизма и для ABC-A1 [29].

ABC-A1 транспортирует для секреции только особые пулы клеточного холестерина. Показано, что взаимодействие апопротеина с нагруженными холестерином клетками стимулирует транслокацию внутриклеточного свободного холестерина к участкам плазматической мембраны, содержащим ABC-A1. Oram с соавт. предполагает [29], что взаимодействие ABC-A1 с апопротеином может стимулировать сигнал, в ответ на который индуцируется везикулярный транспортный путь для транслокации внутриклеточного холестерина и фосфолипидов от Гольджи к ABC-A1. Существенной является также модификация структуры плазматической мембраны, оптимальная для выхода фосфолипидов и холестерина, что может обеспечиваться партнерными белками [27].

Исследования регуляции гена, кодирующего ABC-A1, показали, что этот транспортный белок является ключевым регулятором оттока холестерина из клетки. Его даже называют “привратником” (gatekeeper) для выхода холестерина из фосфолипидной мембраны [26, 29].

Оказалось, что ген ABC-A1 чувствителен к ряду интерферонов, *цис*-ретиноевой кислоте (субстрату для других транспортёров, например, ABC-A2), а также к агонистам ядерных рецепторов [24, 25]. При активации рецепторов LXR и RXR (ретиноид X-рецептор) индуцируется и ген ABC-A1, хотя механизм активации неизвестен. По мнению Dean с соавт. [24], это объясняется наличием в генах этих белков участков с одинаковой нуклеотидной последовательностью. Предполагают наличие в гене ABC-A1 элемента, дающего тот же ответ на внешние воздействия, что и ген LXR. Выяснение этого участка гена представляет значительный интерес для медицины. Недавно охарактеризован гомолог ABC-A1 белка – ABC-A7, также взаимодействующий с апопротеином A1 и способствующий выходу фосфолипидов из клеток в культуре. Однако на выход холестерина он влияет в меньшей степени, чем ABC-A1. Для макрофагов и клеток почек мышей показана внутриклеточная локализация ABC-A7 [31, 32].

3. Взаимоотношения мембранных белков и системы липопротеинов плазмы крови в процессе обратного транспорта холестерина.

На основании приведенных данных об участии мембранных белков в определенных реакциях ОТХ, в последние годы была существенно дополнена известная схема этого процесса, медируемого, не только системой ЛВП и липид-переносящими белками плазмы крови, как считалось ранее, но и мембранными белками. Суммарно, схема участия SR-B1 и ABC-A1 в ОТХ из периферической клетки в гепатоцит – представленная различными авторами [2-6, 13-16, 33], приведена на рисунке 4.

Как видно из схемы, первый этап ОТХ – захват холестерина с поверхности мембран клеток частицами ЛВП – может осуществляться двумя путями (не считая простой диффузии):

1) Удаление холестерина с участием локализованного в мембранах кавеол SR-B1 (рис. 4, А). В этом случае ЛВП с захваченным холестерином проходят обычные упомянутые выше этапы трансформации [2-4], с последующим захватом

ЭФФЕКТОРЫ ОБРАТНОГО ТРАНСПОРТА ХОЛЕСТЕРИНА

гепатоцитами эфиров холестерина из ЛВП₂. В этой заключительной стадии ОТХ также участвует SR-B1, но уже в мембране гепатоцитов. Обедненные эфирами холестерина (и поэтому снова уменьшенные до ЛВП₃) частицы ЛВП вновь поступают в циркуляцию и способны снова принять участие в процессах ОТХ. Помимо печени, ЛВП с захваченным мембранным холестерином способны также связываться с другими стероидогенными тканями, мембраны клеток которых содержат SR-B1 [8].

2) Удаление холестерина с участием мембранного транспортера, белка ABC-A1 (рис. 4, Б). Считают, что при этом из мембраны сначала выходят фосфолипиды, образуя диски пре-β-ЛВП, которые затем удаляют холестерин [2, 14, 33]. Последний в составе ЛВП подвергается тем же превращениям, что и при первом пути, поступая на конечном этапе в печень в виде эфиров – с последующим гидролизом и выведением в составе желчи.

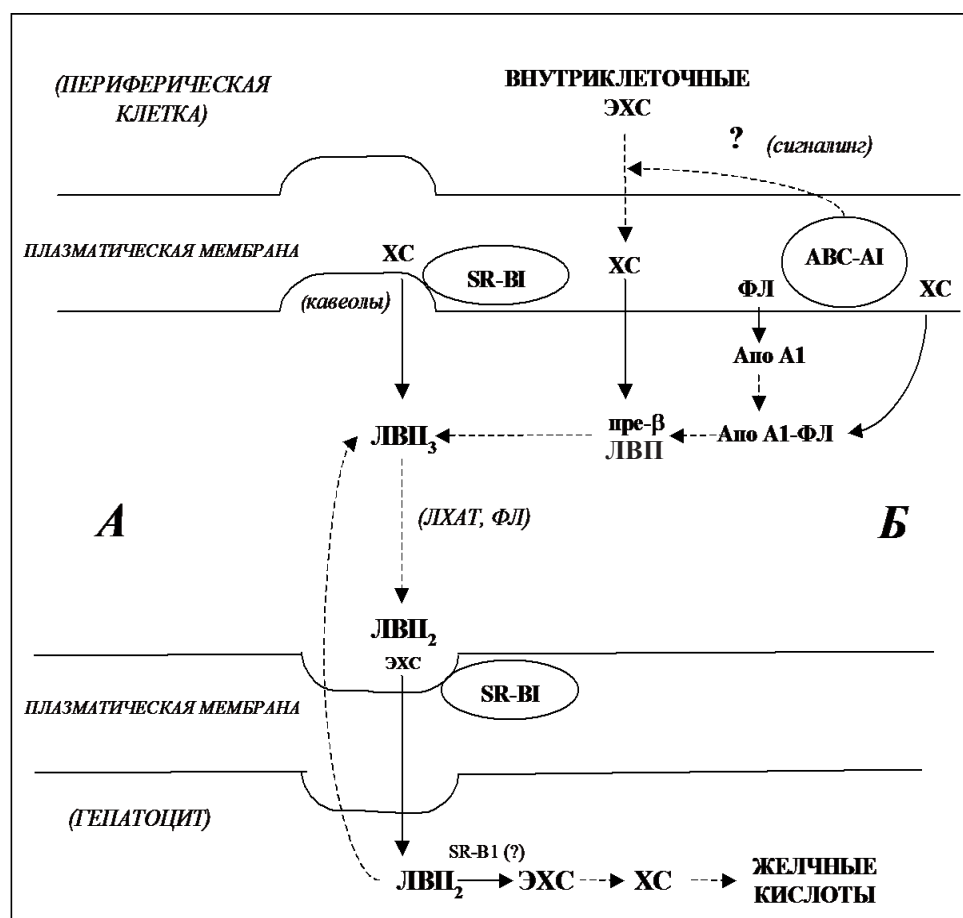


Рисунок 4.

Схема обратного транспорта холестерина с участием ABC-A1 и SR-B1 по [2-6, 13-16, 33]. Слева (А) – 1-ый путь: холестерин удаляется с мембран с участием рецепторов SR-B1 к ЛВП₃, где он этерифицируется с помощью ЛХАТ. ЛВП₃, увеличиваясь в размере за счет холестерина и ФЛ, переходят в ЛВП₂ и поступают в печень, откуда, отдав с помощью SR-B1 эфиры холестерина, возвращаются в циркуляцию. Справа (Б) – II-ой путь: свободный апоА1, взаимодействуя с мембранным ABC-A1 транспортером, забирает мембранные ФЛ и формирует дискоидальные пре-β-ЛВП, которые принимают мембранный холестерин. После его этерификации с помощью ЛХАТ частицы становятся сферическими ЛВП₃, которые далее трансформируются в ЛВП₂ и поступают в печень, как и в первом случае. Предполагают возможность выхода внутриклеточных эфиров холестерина к мембране с участием сигнала от мембранного комплекса ABC-A1 с апопротеином А1, индуцирующего этерификацию. В печени эфиры холестерина гидролизуются, и холестерин переходит в желчные кислоты. (Сокращения: ХС – холестерин, ЭХС – эфиры холестерина, ФЛ – фосфолипиды. Обозначения: сплошные стрелки – транспорт, пунктирные – превращения в результате реакций).

Следует отметить, что все названные процессы выхода мембранного холестерина происходят в основной жидко-кристаллической области мембранного бислоя клетки, где молекулы холестерина располагаются, главным образом, между молекулами фосфатидилхолина. В то же время, в последние годы показана латеральная гетерогенность плазматической мембраны – присутствие в ее наружном слое относительно плотных, устойчивых к действию детергентов липидных доменов (“рафтов”), формирующихся из наиболее “жестких” липидов, главным образом, холестерина, сфингомиелина, церамидов и насыщенных фосфолипидов [34]. То есть, определенная часть мембранного холестерина локализована в “рафтах”. Показано, что единственным путем выхода липидов (в том числе и холестерина) из рафтов может быть так называемый мембранный “шеддинг” (англ. shedding), т.е. “выпячивание” областей наружного слоя мембраны, образование небольшой везикулы и последующий ее полный отрыв [35]. Липиды рафтов могут выходить в среду с участием особого мембранного белка – кавеолина-1, и поэтому преимущественным местом выхода холестерина по такому механизму являются именно кавеолярные рафты или кавеолы [36].

Основные же пути выхода холестерина, как считают, не связаны с рафтами и представляют собой или осуществляемый белком ABC-A1 выход холестерина к пре-β-ЛВП, или его диффузию к ЛВП - с участием рецептора SR-B1 или по градиенту концентраций, как, например, отток холестерина из макрофагов. Считают, что в этом процессе может играть косвенную роль кавеолы, способствуя латеральной диффузии холестерина из рафтов в другие области мембраны [36].

Следует, однако, отметить, что окончательно молекулярные механизмы процессов, происходящих на поверхности мембраны и приводящих к выходу из нее холестерина на внешний акцептор – будь то готовая частица ЛВП, или апопротеин-фосфолипидный комплекс - еще не до конца ясны. Возможно косвенное участие в нем ряда факторов, для которых показана корреляционная зависимость с концентрацией ЛВП, например, активности параоксоназы [37] или минорного, но функционально существенного сигнального фосфолипида фосфатидилинозита [38]. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что фосфолипидные области как поверхности ЛВП, так и плазматической мембраны существенны для протекания процессов ОТХ.

4. Роль фосфолипидных доменов поверхности ЛВП и биомембран в обеспечении процессов ОТХ.

Изучая связывание с гепатоцитами ЛВП и их компонентов – фосфолипидов, апопротеинов и их искусственных смесей, Rifici и Eder [39] показали максимальное связывание для апоA1-фосфолипидных комплексов. Показано также ослабление взаимодействия при модификации апо-A1 или при использовании в качестве акцептора липосом, состоящих только из фосфолипидов. Эти данные позволили предположить, что для взаимодействия ЛВП с гепатоцитами с участием SR-B1 важна область фосфолипид-апопротеинового контакта на поверхности липопротеиновой частицы.

Фосфолипиды ЛВП являются той микросредой, куда входит и где этерифицируется мембранный холестерин – то есть, осуществляются первые два этапа обратного транспорта холестерина. А фосфолипиды мембран клеток либо влияют на выход из них холестерина к фосфолипид-содержащему акцептору - ЛВП (в случае транспорта с участием SR-B1), либо - в случае участия ABC-A1 – сами, выйдя из мембраны, могут становиться холестериновыми акцепторами. Недавно показано, что обработка плазмы везикулами синтетического фосфатидилхолина генерирует образование частиц, подобных пре-β-ЛВП, которые взаимодействуют с ABC-A1 активнее, чем плазменные ЛВП₃ [40]. Авторы наблюдали повышенную способность такой плазмы к выведению фосфолипидов и холестерина из макрофагов. Этот эффект фосфолипида резко падал при удалении из плазмы апоA1-содержащих липопротеинов, а также не проявлялся с плазмой лиц с болезнью Танжера. По всей вероятности, обогащение плазмы

фосфатидилхолином ведет к перераспределению апоА-1 из ЛВП к пре-β-ЛВП, повышая индуцированный АВС-А1 выход клеточных липидов. Эти результаты разъясняют на современном уровне давно показанный факт антиатерогенного влияния вводимых фосфолипидов [41, 42].

На заключительном этапе обратного транспорта холестерина, предшествующем его катаболизму в печени, фосфолипиды также играют существенную роль, обуславливая взаимодействие ЛВП с мембраной гепатоцита. Кроме этого, в уже захваченных гепатоцитами ЛВП₂ жидкость фосфолипидов поверхностного слоя может влиять на выход эфиров холестерина из ядра липопротеиновой частицы. Повторная циркуляция фосфолипидов в составе ЛВП, отдавших в печени эфиры холестерина и возвратившихся в циркуляцию (снова в виде ЛВП₃), обеспечивает условия для захвата новых порций мембранного холестерина, поддерживая таким образом работу цикла “холестеринового насоса”. Существенная роль фосфолипидов в стимулированном как SR-B1, так и АВС-А1 выходе мембранного холестерина заслуживает особого внимания в свете практического применения липосомальных и других лекарственных препаратов, содержащих фосфолипиды [43].

ЛИТЕРАТУРА.

1. Glomset J. (1968) J. Lipid. Res., **9**, 155-167.
2. Attie A.D., Kastelein J.P., Hayden M.R. (2001) J. Lipid Res., **42**, 1717-1726.
3. Phillips M., Johnson W., Rothblat G. (1987) Biochim. Biophys. Acta, **906**, 223-276.
4. Johnson W., Mahlberg F., Rothblat G., Phillips M. (1991) Biochim. Biophys. Acta, **1085**, 273-298.
5. Fielding C., Fielding P.J. (1995) J. Lipid Res., **36**, 211-228.
6. Yamashita S., Sakai N., Hirano K., Ishogami M., Maruyama T., Nakajima N., Matsuzawa Y. (2001) Front.Biosci., **6**, D366-387.
7. Brown M., Goldstein J. (1986) Science, **232**, 34-47.
8. Acton S., Kozarsky K., Rigotti A. (1999) Mol. Med. Today, **5**, 518-524.
9. Barter P. (2003) Atheroscler. Suppl., **3**, 39-47.
10. Clay M., Pyle D., Rye K., Barter P. (2000) J. Biol. Chem., **275**, 9019-9025.
11. Kujiraoka T., Nanjee M., Oka T., Ito M., Nagano M., Cooke C.J., Takahashi S. (2003) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., **23**, 1653-1659.
12. Ji Y., Jian B., Wang N., Sun Y., Moya M.L., Philips M.C., Rothblat G.H., Swaney J.B., Tall A.R. (1997) J. Biol. Chem., **272**, 20982-20985.
13. Климов А.Н., Нукульчева Н.Г. (1999) Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. С-П., “Питер”.
14. Wang N., Silver D.L., Thiele C., Tall A.R. (2001) J.Biol.Chem., **276**, 23742-23747.
15. Fidge N.H. (1999) J. Lipid Res., **40**, 187-201.
16. Rothblat G.H., de la Llera-Moya M., Atger V., Kellner-Weibel G., Williams D.L., Phillips M.C. (1999) J. Lipid Res., **40**, 781-796.
17. Jian B., de la Llera-Moya M., Ji Y., Wang N., Phillips M.C. Swaney J.B., Tall A.R., Rothblat G.H. (1998) J. Biol. Chem., **273**, 5599-5606.
18. Brodeur M.R., Luangrath V., Bourret G., Falstraalt L., Brissette L. (2005) J. Lipid Res., **46**, 687-696.
19. Wei C., Penumetcha M., Santanam N., Liu Y.G., Garelnabi M., Parthasarathy S. (2005) Biochim. Biophys. Acta, **1723**, 124-127.
20. Kawano K., Qin S.-C., Vieu C. Collet X., Jiang X.C. (2002) Biochim. Biophys. Acta, **1583**, 133-140.
21. Yancey P.G., de la Llera-Moya M., Swarnakare S., Monzo P., Klein S.M., Connelly M.A., Johnson W.J., Williams D.L., Rothblat G.H. (2000) J. Biol. Chem., **275**, 36596-36604.
22. Yancey P.G., Rodriguez W., Kilsdonk E., Stoudt G.M., Johnson W.J., Phillips M., Rothblat G.H. (1996) J. Biol. Chem., **271**, 16026-16034.

23. Borst P., Elferink R.O. (2002) *Annu. Rev. Biochem.*, **71**, 537–592.
24. Dean M., Hamon Y., Chimini G. (2001) *J. Lipid Res.*, **42**, 1007–1017.
25. Schmitz G., Langmann T., Heimerl S. (2001) *J. Lipid Res.*, **42**, 1513–1520.
26. von Eckardstein A., Chirazi A., Schuler-Luttman S., Kastelein J.J., Geisel J., Real J.T. (1998) *J. Lipid Res.*, **39**, 987–998.
27. Santamarina-Foyo S., Remaley A.T., Neufeld E.B., Brewer H.B. (2001) *J. Lipid Res.*, **42**, 1339–1345.
28. Kiss R.S., Maric J., Marcel J.L. (2005) *J. Lipid Res.*, **46**, 1877–1887.
29. Oram J.F., Lawn R.M. (2001) *J. Lipid Res.*, **42**, 1173–1179.
30. Smit J.J., Schinkel A.H., Mol C.A., Majoer D., Mooi W.J., Jongsma A.P., Lincke C.R., Borst P. (1994) *Lab. Invest.*, **71**, 638–649.
31. Hayashi M., Abe-Dohmae S., Okazaki M., Ueda K., Yokoyama S. (2005) *J. Lipid Res.*, **46**, 1703–1711.
32. Linsel-Nitschke P., Jehle A.W., Shan J., Cao G., Bacic D., Lan D., Wang N., Tall A.R. (2005) *J. Lipid Res.*, **46**, 86–92.
33. Srivastava N. (2002) *Mol. Cell Biochem.*, **237**, 155–164.
34. Pike L.J. (2003) *J. Lipid Res.*, **44**, 655–667.
35. Black P. (1980) *Adv. Cancer Res.*, **32**, 75–199.
36. Gargalovic P., Dory L. (2003) *J. Lipid Res.*, **44**, 11–21.
37. Rozek L.S., Hatsukami T.S., Richter R.J., Ranchalis J., Nakayama H., McKinstry L.A., Gortner D.A., Boyko E., Schellenberg G.D., Furlong C.E., Jarvik G.P. (2005) *J. Lipid Res.*, **46**, 1888–1895.
38. Burgess J.W., Neville T.A., Rouillard P., Harder Z., Beanlands D.S., Sparks D.L. (2005) *J. Lipid Res.*, **46**, 350–355.
39. Rifci V., Eder H. (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 13814–13819.
40. Hajj Hassan H., Blain S., Boucher B., Denis M., Krimbou L., Genest J. (2005) *J. Lipid Res.*, **46**, 1457–1465.
41. Gundermann K.-J. (1993) The essential phospholipids as a membrane therapeutic. “JotA”. Szczecin.
42. Лопухин Ю.М., Маркин С.С., Бородин Е.А. Благосклонов А.С. (1984) Материалы симпозиума “Гиперлиппротеинемия как фактор риска и терапия эссенциальными фосфолипидами (EPL)”. Москва, с. 41–46.
43. Ипатова О.М. (2005) Фосфолипиды: механизм действия и применение в клинике. Изд. ГУ НИИ биомедицинской химии. Москва.

Поступила: 28. 10. 2005.

MEMBRANE PROTEINS AND PHOSPHOLIPIDS AS EFFECTORS OF REVERSE CHOLESTEROL TRANSPORT.

T.I. Torkhovskaya^{1,2}, O.M. Ipatova¹, N.V. Medvedeva¹, T.S.Zakharova^{1,2}, E.M. Khalilov²

¹Institute of Biomedical Chemistry, Pogodinskaya ul., 10, Moscow, Russia 119121; fax: (495) 245-08-57; e-mail: torti@mail.ru

²Institute of Physiko-Chemical Medicine.

The review highlights the membrane aspect of cholesterol efflux from cell membranes to high density lipoproteins (HDL), an initial stage of reverse cholesterol transport to liver. Special attention is paid to ABC-A1 transporter and membrane SR-B1 receptor, their properties, putative mechanisms of action and their role in reverse cholesterol transport. Interaction of ABC-A1 with plasma free apoA1 is suggested to facilitate the efflux of membrane phospholipids and formation of their complex with apoA1. Then this complex accepts the membrane cholesterol, with lipidation till the full HDL particle is formed. For a number of cells the correlation of cholesterol efflux into HDL with SR-B1 expression was shown. The reversible binding of receptor SR-B1 with HDL is supposed to influence molecular organization of membrane lipids, that promotes the efflux of cholesterol molecules out of the membrane.

Key words: ABC-A1, SR-B1, high density lipoproteins, reverse cholesterol transport, membranes, phospholipids, atherosclerosis.