

УДК 616-008.939.6-092.9-07:616.153.963, 915-02:577.152.1]092.9

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ СТИМУЛЯЦИИ И ИНГИБИРОВАНИЯ ФУНКЦИИ МАКРОФАГОВ НА РАЗВИТИЕ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ У КРЫС

П.О. Кузнецов¹, А.Ф. Сафина¹, Я.Ш. Шварц¹, Д.Д. Цырендоржиев²,
А.А. Зубахин², М.И. Душкин¹

¹Научно-исследовательский институт терапии Сибирского отделения РАМН,
630003, Новосибирск, ул. Владимирский спуск 2а, факс:(3832) 495426,

²Государственное учреждение Научный центр экспериментальной и клинической
медицины Сибирского отделения РАМН, 630060, Новосибирск, ул. Академика
Тимакова 2, ГУ НЦЭКМ СО РАМН, факс (3832) 335692

Изучено влияние стимуляторов системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ) зимозана и продигозана и ингибитора функции СМФ гадолиния хлористого на развитие гиперхолестеринемии, активность лизосомной и цитоплазматической холестеролэстераз (ХЭаз), ацил-СоА-холестерол-ацилтрансферазы (АХАТ) в печени, трансформацию холестерина (ХС) в желчные кислоты и на его эстерификацию и накопление в перитонеальных макрофагах у крыс, получавших с диетой 3% ХС и 0,5% холевую кислоту. Предварительное введение зимозана или продигозана приводило к увеличению клиренса коллоидного угля из крови, количества фагоцитирующих клеток в печени и колониестимулирующей активности сыворотки крови и сопровождалось снижением уровня общего ХС (на 34 и 37%), липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и очень низкой плотности (ЛПОНП) в крови по сравнению с контролем (введение физиологического раствора) на третьи и седьмые сутки после назначения ХС диеты. Введение хлористого гадолиния, который ингибировал клиренс коллоидного угля и снижал количество фагоцитирующих клеток в печени на 3-е и 7-е сутки, напротив, приводило к увеличению содержания общего ХС (на 42 и 37%), эфиров ХС (ЭХС) и ХС ЛПНП в крови. На 7-е сутки после назначения диеты и введения зимозана и продигозана наблюдалось достоверное увеличение активности лизосомной ХЭазы и рост скорости включения [¹⁴С]ХС в желчные кислоты желчи, в то время как активность АХАТ и цитоплазматической ХЭазы печени не изменялась. Введение хлористого гадолиния, напротив, приводило к снижению активности лизосомной ХЭазы в печени и скорости включения меченного ХС в желчные кислоты желчи крыс. ХС диета вызывала увеличение содержания ЭХС и скорости включения [¹⁴С]олеата в ЭХС в перитонеальных макрофагах. Предварительная стимуляция СМФ зимозаном и продигозаном значительно снижала накопление и скорость образования ЭХС в макрофагах. Полученные результаты свидетельствуют, что стимуляция функций СМФ в условиях гиперхолестеринемии у крыс приводит к активации катаболизма ЛПП и трансформации ХС в желчные кислоты в печени, снижению уровня ХС в крови и торможению накопления ЭХС в тканевых макрофагах.

Ключевые слова: макрофаги, холестериновый обмен, атеросклероз

ВВЕДЕНИЕ Клетки системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ) играют важную роль в поддержании холестеринового гомеостаза. Накопление холестерина в тканевых макрофагах ассоциируется с экспрессией скэвенджер - и других специфических рецепторов к модифицированным липопротеинам низкой плотности (ЛНП), что приводит к их трансформации в пенные клетки при развитии атеросклероза сосудов [1, 2]. Вместе с тем, в печени купферовские

клетки имеют на своей поверхности рецепторы к ЛНП, активность которых в 5 раз выше по сравнению с гепатоцитами [3]. Активность гидролиза эфиров холестерина (ЭХС) ЛНП в купферовских клетках по сравнению с гепатоцитами также значительно увеличена, и на долю этих клеток приходится около 33% от общего катаболизма ЛНП в печени человека [4].

Ранее было показано, что предварительное введение кроликам стимуляторов СМФ (таких как БЦЖ) приводит к повышению макрофагальной деградации ЛНП в интерстициальной воспалительной жидкости и препятствует развитию холестерин-индуцированного атеросклероза [5]. В исследованиях, проведенных в нашей лаборатории, было обнаружено, что двукратное введение крысам карбоксилированного глюкона значительно повышает выведение из крови и захват клетками печени модифицированных ЛНП [6]. Данные, недавно опубликованные американскими исследователями, свидетельствуют, что защитным антиатерогенным действием обладает стимулятор СМФ макрофагальный колониестимулирующий фактор (М-КСФ), введение которого кроликам и приматам оказывало гипохолестеринемическое действие и сопровождалось уменьшением содержания холестерина (ХС) и пенистых клеток в зонах атеросклеротического поражения сосудов [7, 8]. Эти результаты исследований, взятые в совокупности, позволяют предполагать важное участие СМФ в регуляции холестеринного обмена, однако механизмы действия стимуляторов и ингибиторов макрофагальных функций в условиях развития гиперхолестеринемии остаются мало исследованными.

Настоящая работа посвящена изучению влияния стимуляторов СМФ зимозана и продигозана и селективного блокатора СМФ хлористого гадолиния на содержание липидов в липопротеинах крови, активность ключевых ферментов метаболизма ЭХС в печени и выведения холестерина в составе желчных кислот у крыс, содержащихся на холестериновой диете. Поскольку известно, что развитие гиперхолестеринемии у крыс приводит к накоплению ЭХС в перитонеальных макрофагах [9], эти клетки были использованы нами как модель для изучения действия стимуляторов СМФ на накопление и образование ЭХС в тканевых макрофагах.

МЕТОДИКА Исследования проведены на крысах-самцах Wistar массой 200-230 г. Животные были разделены на пять групп (по 18 крыс в группе). Животных 1-й, контрольной, группы содержали на стандартной диете, крысы 2,3,4 и 5 групп получали с диетой 3% холестерин (ХС) и 0,5% холевую кислоту в течение 7 суток для моделирования гиперхолестеринемии [9]. За 2 ч до назначения ХС диеты животным 3-й и 4-й группы внутривенно вводили стимуляторы СМФ зимозан ("Serva", Германия) и липополисахарид *Serratia marcescens* (продигозан) ("Мосхимфармпрепарат") в дозах 100 и 0,3 мг на кг массы тела животных соответственно. Животным 5-й группы за 2 ч до назначения диеты внутривенно вводили ингибитор СМФ хлористый гадолиний ("Aldrich", Бельгия) в дозе 7,5 мг на кг массы тела. Контрольным крысам (1-я группа) вводили равный объем (0,5 мл) изотонического раствора. Все операции на животных и их декапитацию проводили под эфирным наркозом. На 7 сутки после начала эксперимента животных декапитировали, печень отмывали от крови перфузией и гомогенизировали в растворе 0,25 М сахарозы, 20 мМ трис-НСl буфере (рН 7,4) и 1 мМ ЭДТА. Микросомальную и цитозольную фракцию печени получали методом дифференциального центрифугирования гомогената (105000g, 60 мин).

Поглотительную активность клеток СМФ *in vivo* оценивали по способности очищения крови от частиц коллоидного угля ("Gunter Wagner", Германия) по общепринятому методу Venescaff и др. [10]. На гистологических срезах печени, окрашенных по Романовскому-Гимзе, под световым микроскопом, с использованием регулярной тестовой сетки, определяли количество фагоцитарно активных клеток Купфера [11]. Колониестимулирующую активность (КСА) сыворотки крови оценивали по ее способности стимулировать рост гранулоцито-

МАКРОФАГИ И ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИЯ

макрофагальных (КОЕ-ГМ) предшественников в культуре клеток нормального сингенного костного мозга при добавлении 0,15 мл сыворотки к 10^5 клеток костного мозга мышей линии Balb/c [12].

Выделение фракций липопротеинов очень низкой плотности (ЛОНП), низкой (ЛНП) и высокой (ЛВП) плотности из плазмы крови крыс проводили путем последовательного ультрацентрифугирования в градиенте плотности КВг [13]. КВг удаляли диализом против 0,5 мМ фосфатного буфера pH 7,4, содержащего 150 мМ NaCl.

40 животным (по 8 животных в каждой группе) отдельно за 16 ч до окончания эксперимента (7 суток) внутрибрюшинно вводили $[1-^{14}\text{C}]\text{ХС}$ ("Amersham", Англия) в дозе 500 мкКи/кг массы тела в составе 1 мл липофундина-20 (Финляндия), через 16 ч под нембуталовым наркозом канюлировали желчный проток и в течение 30 мин собирали желчь. Свободный ХС (СХС) и желчные кислоты (ЖК) экстрагировали из желчи [14] и после удаления растворителя под током азота определяли радиоактивность в сцинтилляторе на основе толуола [15].

Активность лизосомной кислой и цитоплазматической нейтральной холестеролэстераз (ХЭаз) определяли соответственно в гомогенате и цитозольной фракции печени, используя в качестве субстрата $\text{ХС}[1-^{14}\text{C}]\text{олеат}$ ("Amersham"), включенный в состав фосфатидилхолиновых липосом [16], в 0,2 М ацетатном буфере (pH 5,0) для определения активности кислой ХЭазы и 0,2 М фосфатном буфере (pH 8,0) - для нейтральной ХЭазы при 37° С и 60 мин инкубации. Реакцию останавливали добавлением смеси бензол: хлороформ: метанол (5:1:1), содержащей 0,1 мМ олеиновую кислоту. Экстракцию освобожденной меченной олеиновой кислоты проводили после добавления раствора 0,3 М NaOH. После центрифугирования образцы водной фазы раствора переносили в сцинтилляционные вials, и радиоактивность олеата подсчитывали в сцинтилляторе на диоксановой основе [15] в жидкостном сцинтилляционном счетчике "Mark III" ("Tracor Analytic", США). Активность ХЭаз выражали в пмолях освобожденного олеата в мин на 1 мг белка.

Определение активности ацил-СоА-холестерол-О-ацилтрансферазы (АХАТ) осуществляли в микросомальной фракции печени (80-110 мкг белка микросом), используя в качестве субстрата $[1-^{14}\text{C}]\text{олеил-СоА}$ ("Amersham"), с радиоактивностью 400000 имп/мин в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 0,01% β -меркаптоэтанол, при 37° С и инкубации в течение 15 мин [17]. Реакцию останавливали добавлением смеси хлороформ: метанол (2:1), содержащей в качестве внутреннего стандарта холестерололеат, и осуществляли экстракцию липидов общепринятым методом Folch и соавторов [18]. ЭХС разделяли методом тонкослойной хроматографии на пластинах Силуфол (15X15 см) в системе растворителей гексан: этиловый эфир: уксусная кислота (180: 20: 2). Радиоактивность полученных ЭХС подсчитывали в сцинтилляторе на основе толуола [15], активность АХАТ выражали в пмолях включенного в ЭХС олеата/мин на 1 мг микросомального белка.

Макрофаги получали из перитонеальной полости крыс после внутрибрюшинного введения 20 мл раствора Дульбекко без кальция и магния с последующим центрифугированием клеток из перитонеальных смывов (800g, 10 мин) [9]. По 2 мл суспензии, содержащей 4×10^6 клеток, вносили в пластиковые чашки диаметром 35 мм, и клетки инкубировали 2 ч в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональную сыворотку телят, 2 мМ глутатиона и 100 Ед/мл гентамицина, в атмосфере 5% CO_2 и 95% воздуха. Монослой макрофагов отмывали средой RPMI-1640 от неприлипших к пластику лейкоцитов и использовали для анализа скорости эстерификации ХС и содержания ХС в макрофагах. Скорость эстерификации ХС в макрофагах оценивали по включению $[1-^{14}\text{C}]\text{олеата}$ в ЭХС после 4 ч инкубации клеток в среде RPMI-1640, содержащей 0,2 ммоль меченного олеата и 0,2% бычий сывороточный альбумин [19]. Экстракцию липидов из макрофагов проводили смесью гексан: изопропанол (3: 2)

и ЭХС получали описанным выше методом тонкослойной хроматографии. После подсчета радиоактивности ЭХС, скорость эстерификации ХС выражали в нмоль эстерифицированного олеата/4 ч на 1 мг клеточного белка. Определение концентрации общего ХС и СХС в макрофагах осуществляли в липидных экстрактах энзиматическим методом, адаптированным для клеточных культур [20], с помощью набора реактивов фирмы "Boehringer Mannheim" (Германия).

Определение концентрации общего ХС, СХС и триглицеридов в липопротеинах крови осуществляли энзиматическим методом с помощью стандартных наборов реактивов фирмы "Биолаб" (Финляндия).

Содержание белка во всех биологических образцах определяли общепринятым методом Лоури.

Полученные результаты подвергали статистической обработке, используя t критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ Холестериновая диета, дополненная хеновой кислотой, вызывала развитие гиперхолестеринемии у крыс с повышением уровня общего ХС в плазме крови на 3 и 7 сутки (рис., кривая 2) в 2,4 и 2,9 раза соответственно по сравнению с контрольными величинами (рис., кривая 1). Предварительное введение зимозана (рис., кривая 3) приводило к достоверному снижению концентрации ХС в крови у крыс, получавших в течение трех (на 35%) и семи (на 34%) суток холестериную диету. Введение продигозана оказывало сходный с зимозаном эффект на развитие индуцированной ХС диетой гиперхолестеринемии, снижая уровень ХС на 39 и 37% на третьи и седьмые сутки после начала эксперимента (рис. кривая 4). При введении животным хлористого гадолиния, напротив, наблюдалось достоверное увеличение уровня общего ХС в крови на 42 и 34% на третьи и седьмые сутки содержания крыс на ХС рационе (рис., кривая 5). Оценка влияния препаратов на функции СМФ показала, что зимозан и продигозан на 7 сутки после введения в 2,7 и 1,8 раза снижают время полувыведения коллоидного угля и в 1,9 и 1,6 раз соответственно повышают количество фагоцитирующих клеток в печени, в то время как гадолиний хлористый оказывает противоположный эффект на эти показатели (табл. 1). В то же время введение зимозана и продигозана приводило к достоверному увеличению колониестимулирующей активности сыворотки крови как на 3, так и на 7 сутки приблизительно в два раза по сравнению с контрольными значениями. Эти полученные нами данные согласуются с данными литературы о способности стимуляторов функций СМФ оказывать гипохолестеринемическое действие [2, 5].

Как показано в табл. 2, развитие гиперхолестеринемии на седьмые сутки кормления животных холестериновой диетой сопровождалось существенным повышением содержания ХС прежде всего во фракциях ЛОНП (в 7,6 раза) и ЛНП (в 3,8 раза), а также двукратным ростом этого показателя в ЛВП. Наши исследования липопротеинного состава крови крыс после предварительного введения зимозана и продигозана показали, что эти стимуляторы СМФ препятствуют росту уровня ХС в ЛОНП и ЛНП, не оказывая существенного влияния на уровень ХС в ЛВП. Так, под влиянием зимозана и продигозана уровень ХС в ЛОНП и ЛНП оказался сниженным приблизительно в два раза по сравнению с показателями у ХС-кормленных животных. Введение хлористого гадолиния оказывало индуцирующий эффект на рост содержания ХС в ЛОНП (увеличение на 72%) и ЛНП (увеличение на 79%) у животных, получающих ХС рацион, при отсутствии достоверных изменений уровня ХС в ЛВП (табл. 2). Данные исследования липидного и белкового состава липопротеинов, представленные в табл. 3, демонстрируют, что введение зимозана, продигозана и хлористого гадолиния в значительной мере модифицировало процентный состав ХС и ЭХС в ЛОНП и ЛНП крыс, получавших ХС рацион. Если под влиянием ХС диеты в ЛОНП и ЛНП наблюдался значительный рост процентного содержания СХС и особенно ЭХС, то после введения стимуляторов СМФ зимозана и продигозана процентное содержание ЭХС и СХС снижалось приблизительно в 2

МАКРОФАГИ И ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИЯ

Таблица 1. Время полувыведения коллоидного угля из кровотока, число фагоцитирующих клеток Купфера и колониестимулирующая активность (КСА) сыворотки крови у крыс, содержащихся на ХС диете, после введения зимозана, продигиозана или хлорида гадолиния ($\bar{X} \pm m$)

Воздействие	Сутки после введения	Время полувыведения коллоидного угля из крови (мин)	Число фагоцитирующих клеток Купфера на мкм^2	КСА сыворотки крови (количество колоний)
Контроль	3	$11,4 \pm 1,5$	389 ± 32	134 ± 14
	7	$10,6 \pm 1,1$	$396 \pm 30,2$	126 ± 15
Зимозан	3	$9,0 \pm 1,3$	$411 \pm 32,1$	$264 \pm 32^*$
	7	$3,86 \pm 0,28^{**}$	$769 \pm 27,5^*$	$232 \pm 24^*$
Продигиозан	3	$7,4 \pm 0,9^*$	$504 \pm 21,2^*$	$276 \pm 36^*$
	7	$6,1 \pm 0,73^*$	$622 \pm 19,9^*$	$221 \pm 23^*$
Гадолиний хлорид	3	$16,3 \pm 1,22^{**}$	$207 \pm 54,6^*$	102 ± 12
	7	$12,7 \pm 0,61^*$	$321 \pm 62,3$	113 ± 14

Примечание: Значимость различий с контролем: $^*P < 0,05$; $^{**}P < 0,01$.

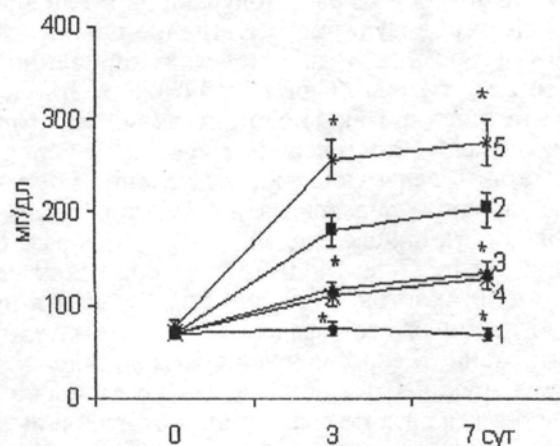


Рисунок.

Влияние предварительного введения зимозана, продигиозана и хлористого гадолиния на содержание общего холестерина в плазме крови крыс, получавших в течение недели холестериную диету. 1 - животные, содержащиеся на стандартной диете; 2 - 3% ХС диета; 3 - введение зимозана + ХС диета; 4 - введение продигиозана + ХС диета; 5 - введение хлористого гадолиния + ХС диета. По оси абсцисс - время в сутках после введения препарата. По оси ординат - концентрация ХС в плазме крови в мг/дл. Звездочкой обозначены достоверные отличия от значений, полученных в группе гиперхолестеринемических крыс - $P < 0,05$ (количество животных в каждой группе - 8).

и 1,5 раза соответственно. При этом в ЛОНП отмечалось достоверное увеличение концентрации белка. Хлористый гадолиний, напротив, увеличивал относительное содержание ЭХС в ЛНП и ЛОНП и снижал процентное содержание белка в этих фракциях липопротеинов

Детальные исследования роли непаренхиматозных клеток печени крыс в липопротеинном обмене, выполненные ранее Van Berkel и соавторами, показали, что купферовские клетки, имеющие высокую плотность апоВ/Е-рецепторов, способны в течение часа гидролизовать меченные ЭХС ЛОНП и ЛНП, транспортировать в гепатоциты освобожденный ХС, который уже через 6 часов трансформируется в желчные кислоты и выводится из организма [3]. В наших исследованиях было обнаружено, что как стимуляция, так и ингибирование функций СМФ может существенным образом модулировать метаболизм ЭХС

(табл.4) и процессы трансформации ХС в желчные кислоты (табл.5) в условиях развития у крыс гиперхолестеринемии. ХС диета вызвала значительное повышение активности АХАТ в микросомальной фракции, не оказывая влияния на активность лизосомной кислой ХЭазы в гомогенате и нейтральной цитоплазматической ХЭазы в цитозольной фракции печени (табл. 4). Введение зимозана и продигиозана увеличивало активность кислой ХЭазы в 1,8 и 1,6 раза соответственно. При этом продигиозан вызывал также достоверное увеличение активности нейтральной ХЭазы на 35%. В то же время оба стимулятора СМФ не оказывали существенного влияния на активность АХАТ. Введение хлористого гадолиния приводило к снижению активности кислой ХЭазы, не вызывая достоверных изменений активности нейтральной ХЭазы и АХАТ в печени. Как показано в табл. 5, введение как зимозана, так и продигиозана оказывало стимулирующий эффект на включение [14 C]ХС в желчные кислоты, величина которого повышалась приблизительно в 1,5 раза по сравнению с контрольными животными, получавших ХС диету. При этом, если величина отношения концентраций желчные кислоты/СХС в желчи у гиперхолестеринемических крыс составляла 5,9, то при введении зимозана и продигиозана она повышалась до 8,2,

Таблица 2. Влияние зимозана, продигиозана и хлористого гадолиния на содержание общего ХС в липопротеинах плазмы крови крыс, кормленных ХС в течение 7 суток ($\bar{X} \pm m$)

Группа животных	Содержание общего ХС, мг/дл		
	ЛОНП	ЛНП	ЛВП
1. Контроль	7,35 \pm 0,6	12,2 \pm 1,1	51,5 \pm 4,2
2. ХС диета	56,1 \pm 6,4*	46,2 \pm 4,1*	102,8 \pm 12,3*
3. Зимозан + ХС диета	29,3 \pm 3,1**	18,2 \pm 1,5**	90,4 \pm 9,2
4. Продигиозан + ХС диета	24,2 \pm 2,4**	17,4 \pm 1,8**	92,2 \pm 9,5
5. Хлористый гадолиний + ХС диета	96,5 \pm 9,9**	82,6 \pm 9,5**	96,3 \pm 9,4

Примечание: *-Достоверные отличия между величинами 1 и 2 групп, $P < 0,05$; **-достоверные отличия по отношению к группе 2 (ХС диета), $P < 0,05$.

Таблица 3. Влияние зимозана, продигиозана и хлористого гадолиния на процентное отношение липидов и белка в липопротеинах плазмы крови крыс, кормленных ХС в течение 7 суток ($\bar{X} \pm m$)

Группа животных	ЛОНП				ЛНП			
	СХС	ЭХС	ТГ	Белок	СХС	ЭХС	ТГ	Белок
1. Контроль	3,5 \pm 0,4	0,94 \pm 0,1	85,1 \pm 7,2	11 \pm 0,7	13,7 \pm 0,8	29,7 \pm 1,7	20 \pm 1,4	36,6 \pm 4
2. ХС диета	9,1 \pm 0,7*	45 \pm 4*	30,0 \pm 3,6*	15,9 \pm 2	17,1 \pm 1,6	51,3 \pm 4,2*	2,3 \pm 0,2*	29,3 \pm 3
3. Зимозан + ХС диета	6,4 \pm 0,7**	27,1 \pm 2**	49 \pm 8**	17,5 \pm 2**	14,4 \pm 1,2	35,5 \pm 2,6**	16,9 \pm 2**	33,2 \pm 3
4. Продигиозан + ХС диета	6,0 \pm 0,7**	25,2 \pm 1,8**	54,3 \pm 6**	18,3 \pm 2	15,1 \pm 1,0	32,3 \pm 2,2**	17,7 \pm 0,9	35 \pm 4
5. Гадолиний хлористый + ХС диета	9,9 \pm 0,8	59,8 \pm 4,5**	20,2 \pm 2	10,1 \pm 1**	18,5 \pm 1,5	66,4 \pm 6,3**	1,4 \pm 0,2	13,7 \pm 2

Примечание.: *-Достоверные отличия между величинами 1 и 2 групп, $P < 0,05$; **-достоверные отличия по отношению к группе 2 (ХС диета), $P < 0,05$. В каждой группе было по 8 крыс.

что свидетельствует об увеличении скорости желчегенеза в печени. Напротив, при действии хлористого гадолиния включение ХС в желчные кислоты снижалось до 67% от контрольного уровня и величина отношения желчные кислоты/СХС снижалась до 4.

Как известно, накопление ЭХС в перитонеальных макрофагах при развитии гиперхолестеринемии, в определенной мере, может отражать процесс образования

МАКРОФАГИ И ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИЯ

Таблица 4. Влияние зимозана, продигозана и гадолиния хлористого на активность лизосомной кислоты и цитоплазматической щелочной холестеролэстераз и АХАТ в печени крыс, содержащихся на ХС диете ($\bar{X} \pm m$).

Группа животных	Кислая ХЭаза	Нейтральная ХЭаза	АХАТ
	пмоль олеата/мин/мг белка		
1. Контроль	196 \pm 21	16 \pm 1,5	17,8 \pm 1,64
2. ХС диета	172 \pm 16	13,5 \pm 1,4	55,9 \pm 5,4*
3. Зимозан + ХС диета	307 \pm 31**	17,5 \pm 1,8	61,4 \pm 6,2
4. Продигозан + ХС диета	278 \pm 29**	18,2 \pm 1,8**	46,3 \pm 4,5
5. Гадолиний хлористый + ХС диета	117 \pm 11	12,3 \pm 1,3	52,4 \pm 5,5

Примечание. *-Достоверные отличия между 1 и 2 группами ($P < 0,001$); ** - Достоверные отличия в сравнении со 2-й группой ($P < 0,01$).

Таблица 5. Влияние зимозана, продигозана и гадолиния хлористого на включение [14 C]-ХС в желчные кислоты и ХС желчи крыс, содержащихся на ХС диете ($\bar{X} \pm m$).

Группа животных (n = 8)	Удельная радиоактивность в желчи, расп/мин на 10 мкл желчи	
	14 [C]-ХС	14 [C]-ЖК
1. Контроль	625,4 \pm 54,5	6128 \pm 543
2. ХС диета	843,6 \pm 67,4*	4960 \pm 436*
3. Зимозан + ХС диета	896,5 \pm 79,3	7345 \pm 659**
4. Продигозан + ХС диета	917,7 \pm 86,4	7546 \pm 698**
5. Гадолиний хлористый + ХС диета	839,6 \pm 84,4	3334 \pm 313**

Примечание. *-Достоверные различия между значениями 1-й и 2-й группы. ** -Достоверные различия в сравнении со 2-й группой

пенистых клеток [9]. В соответствии с этими представлениями, развитие гиперхолестеринемии у крыс на 7 сутки сопровождалось значительным (в 2,5 раза) повышением скорости эстерификации ХС и повышением уровня ЭХС и СХС в перитонеальных макрофагах (табл.6). Стимуляция СМФ зимозаном и продигозаном приводила к снижению скорости эстерификации ХС на 35 и 40% и 2-кратному снижению концентрации ЭХС в клетках. При этом содержание СХС в макрофагах возвращалось к уровню, наблюдаемому у нормолипидемических животных. При воздействии хлористого гадолиния на 7-е сутки наблюдалось резкое снижение популяции макрофагов в перитонеальной полости крыс. Поэтому, исследовать влияние этого препарата на обмен ХС в перитонеальных макрофагах не представлялось возможным.

Таблица 6. Влияние зимозана и продигозана на скорость эстерификации и содержание ХС в перитонеальных макрофагах крыс, содержащихся на ХС диете ($\bar{X} \pm m$)

Группа животных	Включение [14 C]олеата в ЭХС, нмоль/мг белка/4 ч	Содержание ХС в мкг/мг белка	
		СХС	ЭХС
1. Контроль	1,12 \pm 0,1	18,6 \pm 1,9	2,9 \pm 0,7
2. ХС диета	2,68 \pm 0,3	26,2 \pm 2,1	24,4 \pm 2,6
$P_{1,2}$	< 0,001	< 0,05	< 0,001
3. Зимозан + ХС диета	1,74 \pm 0,2	21,1 \pm 2,1	12,2 \pm 1,3
$P_{2,3}$	< 0,05	> 0,05	< 0,01
4. Продигозан + ХС диета	1,59 \pm 1,4	22,3 \pm 2,4	13,7 \pm 1,4
$P_{2,4}$	< 0,05	> 0,05	< 0,01

Детальные механизмы гипохолестеринемического эффекта стимуляторов СМФ остаются малоизученными. Наши ранние исследования на культивируемых *in vitro* макрофагах не обнаружили существенного прямого влияния стимуляторов СМФ полисахаридной природы на холестеринный обмен в клетках [6, 21]. В то же время, в литературе имеются сообщения об антиатерогенном и

гипохолестеринемическом действии введения рекомбинантного М-КСФ, которое проявлялось как у ХС-кормленных кроликов, так и у кроликов с дефектом гена рецептора к апо В/Е [7, 8]. Эти публикации указывают на возможное участие некоторых цитокинов, секретируемых при активации макрофагов, в регуляции обмена ХС. Полученные в настоящей работе данные об одновременном повышении КСА и снижении уровня ХС в крови при действии зимозана и продигиозана находятся в соответствии с этими представлениями. В то же время, недавно были опубликованы результаты исследований, полученных на дефектных по апо Е мышам, у которых "нокаут" гена М-КСФ приводил к повышению чувствительности мышей к бактериальным инфекциям, но одновременно создавал резистентность к развитию ХС-индуцированного атеросклероза [22]. Эти противоречивые, на первый взгляд, результаты можно объяснить значительным снижением популяции тканевых макрофагов, являющихся главными предшественниками атеросклеротических пенных клеток, в условиях отсутствия М-КСФ. Вероятно, подобного рода "антиатерогенный" эффект наблюдался нами в данном исследовании при действии хлористого гадолиния, который снижал популяцию перитонеальных макрофагов, в результате чего, несмотря на развитие гиперхолестеринемии, у крыс не удавалось обнаружить макрофаги с повышенным содержанием ЭХС.

Таким образом, полученные данные, в целом, свидетельствуют о превентивном влиянии стимуляторов СМФ на развитие нарушений ХС обмена, механизм которого может быть представлен следующей схемой: стимуляторы СМФ полисахаридной природы → продукция М-КСФ в макрофагах → увеличение количества и активация купферовских клеток в печени → увеличение макрофагальной деградации ЭХС ЛНП и ЛОНП → увеличение транспорта ХС и его трансформации в желчные кислоты в гепатоцитах → снижение уровня ЛНП и ЛОНП в крови → снижение синтеза и накопления ЭХС в тканевых макрофагах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Krieger M. (1997) Curr. Opin. Lipid., **8**, 275-280
2. Schwartz C.J., Valente A.I. (1995) In: Proc. Xth Int. Simp. Atherosclerosis (Woodford F.P., Davignon J., Sniderman A., eds.), Amsterdam, New York, Oxford, Shannon, Tokyo: Elsevier, pp. 571-576
3. Van Berkel T.J.C., Kuipers F., Vonk R., Bakkereu H.F. (1991) In: Cells of hepatic sinusoid (Eds. Wisse E., Knook D.L., Decker R.), **3**, 483-488.
4. Van Berkel T.J.C., Vaandrager M., Kruyt J.K., Koster J.N. (1990) Biochem. Biophys. Acta, **617**, 446-457.
5. Gaton E., Wolman M. (1984) Adv. Exp. Med. Biol., **160**, 15-36.
6. Dushkin M.I., Safina A.F., Vereschagin E.I., Schwartz Y. Sh. (1996) Cell Biochem. Function, **14**, 209-217.
7. Schaub R.G., Donnelly L.H., Parker T.S., Clinton S.K., Garnick M.B. (1995) In: Proc. Xth Int. Simp. Atherosclerosis (Woodford F.P., Davignon J., Sniderman A., eds.), Amsterdam, New York, Oxford, Shannon, Tokyo: Elsevier, pp. 537-544.
8. Scherman M.L., Stein E.A., Isaacsohn J., Lees R.S., Garnick M.B. (1995), In: Proc. Xth Int. Simp. Atherosclerosis (Woodford F.P., Davignon J., Sniderman A., eds.), Amsterdam, New York, Oxford, Shannon, Tokyo: Elsevier, 598-606.
9. Musanti R., Chiari A., Ghisselli G. (1991) Arterioscler. Thromb., **11**, 1111-1119.
10. Benaceraff B., Biozzi G., Halpern B. (1957) In: Physiopathology of RES, Springfield: C.C. Thomas Publ., pp. 52-79.
11. Аветандилов Г.Г. (1973) Морфометрия в патологии. Медицина, Москва.
12. Зубахин А.А., Кутина С.Н., Маянский Д.Н. (1992) Бюлл. эксперим. биол. и мед., **118**, 22-24.

МАКРОФАГИ И ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИЯ

13. В.Н. Орехович (ред) (1977) Современные методы в биохимии, Наука, Москва, с. 248-253.
14. Ayaki Y. (1977), J. Biochem. (Tokyo) **22**, 1507-1524.
15. Остерман Л.А. (1983) Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами, Наука, Москва.
16. Brecher P., Pyun H.Y., Chobanian A.V. (1977) J. Lipid Res., **18**, 154-163.
17. Bell F.P. (1985) Lipids, **20**, 75-80.
18. Folch J., Lees M., Sloane Stanley H. (1957) J. Biol. Chem., **226**, 497-509.
19. Brown M.S., Ho Y.K., Goldstein J.L. (1980) J. Biol. Chem., **255**, 9344-9352.
20. Gamble W., Vaughan M., Kruth H.S., Avigan J. (1978) J. Lipid Res., **19**, 1068-1070.
21. Душкин М.И., Корнюш Е.А., Поляков Л.М., Дмитриенко Г.И., Юнонина Г.А., Крылова И.Н. (1992) Биохимия, **57**, 1181-1191.
22. Smith J.D., Trogan E., Gingaux C., Tian J., Miyata M. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **92**, 8264-8268.

Поступила 27.01.00.

EFFECTS OF STIMULATION AND INHIBITION OF THE MONONUCLEAR PHAGOCYTE SYSTEM FUNCTION ON HYPERCHOLESTEROLEMIA DEVELOPMENT IN RATS

P.O. Kuznetsov¹, A.F. Safina¹, Y.Sh. Schwartz¹, D.D. Tsyrendorjiev², A.A. Zubakhin², M.I. Dushkin¹

¹Institute of Internal Medicine, Siberian Division of the Russian Academy of Medical Sciences, Vladimirovski st. 2a, Novosibirsk 630003, Russia; fax 3832 495426;

²Scientific Center of Clinical and Experimental Medicine, Siberian Division of the Russian Academy of Medical Sciences, Acad. Timakov st. 2, Novosibirsk 630060, Russia

In this study we investigated the effects of zymosan and prodigiozan, the macrophage stimulators, and GdCl₃, a macrophage inhibitor, on blood lipoprotein composition, activities of liver cholesteryl ester (CE) metabolising enzymes, incorporation of [¹⁴C]cholesterol (C) into bile acids and accumulation and synthesis of CE in peritoneal macrophages (PM) of rats fed with C-enriched diet for 7 days. The increase of number of phagocyte cells quantity in liver and blood colony-stimulating activity in rats pretreated with intravenous injection of zymosan and prodigiozan was accompanied by reduced C content in blood low density and very low density lipoproteins (LDL and VLDL), increase of liver lysosomal CE hydrolase activity (without change of acyl-CoA:C acyltransferase and cytoplasmatic CE hydrolase activities) and incorporation of labeled C into bile acids and decrease of CE formation and accumulation in PM in rats with hypercholesterolemia. In contrast, reduction of phagocyte population in liver caused by intravenous injection of GdCl₃ was accompanied by enhancement of C and CE level in blood LDL and VLDL and decrease of lysosomal CE hydrolase activity and incorporation of C into bile acids in liver of C-feeding rats. The data obtained suggest that the stimulation of mononuclear phagocyte system may lead to a decrease of plasma C via activation of LDL and VLDL catabolism and induction of bile acid synthesis in liver.

Key words: macrophages, cholesterol metabolism, atherosclerosis