

ВЛИЯНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА НА ОБРАЗОВАНИЕ ПЕНИСТЫХ КЛЕТОК МАКРОФАГОВ ПРИ ИНДУЦИРОВАННОМ ЗИМОЗАНОМ ВОСПАЛЕНИИ У МЫШЕЙ

© О. М. Долганова,^{1,*} М. И. Рудина,¹ М. В. Храпова,² М. И. Душкин²

¹ Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины СО РАМН
и ² Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины СО РАМН, Новосибирск;
* электронный адрес: Kh_Olgam@mail.ru

Ранее было показано, что в период разрешения перитонита, индуцированного зимозаном (24 ч), около 40 % макрофагов трансформируется в пенистые клетки (МПК), и агонисты рецепторов активируемые пролифераторами пероксисом- α , - γ (PPAR- α , - γ) препятствуют их образованию *in vivo* (Душкин и др., 2007). В настоящей работе исследовали влияние холестеринсодержащих липосом (ХСЛ) на изменение динамики перитонита, индуцированного зимозаном. Исследовали накопление холестерина, изменение продукции цитокинов, активности PPAR- γ и оттока холестерина в МПК у мышей C57Bl/6. Обнаружено, что введение ХСЛ на фоне индуцированного зимозаном перитонита по сравнению с введением только зимозана или только ХСЛ вызывает значительное увеличение инфильтрации нейтрофилов, мононуклеарных клеток и образования МПК, содержащих в основном свободный холестерин и его эфиры, приводит к повышению периода разрешения воспаления и периода разрешения МПК. Если зимозан индуцировал включение [$1\text{-}^{14}\text{C}$]олеата преимущественно в клеточные триглицериды, то введение ХСЛ при индуцированном зимозаном воспалении приводило к утилизации пула [$1\text{-}^{14}\text{C}$]олеата в основном в эфиры холестерина (максимально на 2-е сут), а также снижение скорости оттока флуоресцентного NBD-холестерина из клеток в течение всего периода воспаления. Введение зимозана ингибирует отток холестерина в 1-е и 2-е сут, который восстанавливается через 3 сут и возрастает на 5-е сут. В то же время ХСЛ стимулируют продукцию TNF- α и TGF- β 1, но угнетают продукцию IL-10 и ДНК-связывающую активность PPAR- γ в макрофагах, полученных на ранних и поздних стадиях индуцированного зимозаном перитонита. Таким образом, накопление холестерина в «воспалительных» макрофагах и индукция образования МПК пролонгируют воспалительный процесс, вызывая изменение баланса продукции про- и противовоспалительных цитокинов, подавление активности PPAR- γ и оттока холестерина.

Ключевые слова: пенистые клетки макрофагов, воспаление, холестерин, цитокины, PPAR- γ .

Принятые сокращения: МПК — пенистые клетки макрофагов, ПР — период разрешения, ТГ — триглицериды, ХСЛ — холестеринсодержащие липосомы, 3-C12-NBD-X — 3-dodecanoyl-nitrobenzoxadiazole-холестерин, IL-10 — интерлейкин 10, PPAR- γ — рецептор активируемый пролифераторами пероксисом- γ , TNF- α — фактор некроза опухоли- α , TGF- β 1 — трансформирующий фактор роста β 1.

Важным маркером воспаления является аккумуляция липидных включений в макрофагах, которая происходит в результате драматического «перепрограммирования» липидного обмена (см. обзор: Душкин, 2012). Фагоцитоз различных патогенов ассоциируется с образованием липидных включений органелл, окруженных однослойной фосфолипидной мембраной, что приводит к формированию уникального фенотипа макрофага — пенистой клетки макрофага (МПК) (Melo et al., 2006; Peyron et al., 2008; D'Avila et al., 2012; Nicolaou et al., 2012). На перевиваемых линиях макрофагов показано, что сигналом трансформации макрофагов в пенистые клетки является взаимодействие лигандов с toll-подобными рецепторами (TLR) 2—5 и 9 (Kazemi et al., 2005; Feingold et al., 2012; Nicolaou et al., 2012). Липидные включения в активированных макрофагах содержат главным образом триглицериды (ТГ) (Feingold et al., 2012). Вместе с тем эти включения не являются пассивными резервуарами ТГ, а выполняют функцию синтеза и резерва активных медиаторов

воспаления, участвуя в регуляции липидного обмена, процессах транспорта и сигналинга (Rouzer et al., 2006; Melo, Dvorak, 2012).

Массивное образование липидных включений в макрофагах наблюдается также при неинфекционных воспалительных заболеваниях, таких как атеросклероз. МПК в атеросклеротических бляшках артерий рассматривается как маркер, позволяющий связать биохимические и морфологические проявления этого заболевания. Известно, что МПК, полученные из атеросклеротических бляшек, содержат главным образом эфиры холестерина и свободный холестерин, что может оказывать существенное влияние на их клеточные функции (Lemaire-Ewing et al., 2012). Общепринято, что окисленные липопротеины выступают триггерами превращения макрофагов в пенистые клетки. В то же время установлено, что сам по себе холестерин может оказывать прямое провоспалительное влияние, модулируя функции макрофагов.

Показано, что обработка клеток холестерином приводит к аккумуляции рецептора к трансформирующему фактору роста- β (RTGF- β) в липидных рафтах (кавеолах) и нарушению RTGF- β -сигналинга, стимулируемого противовоспалительным медиатором TGF- β (Chen et al., 2008). Рост экспрессии воспалительных медиаторов и инфильтрация атеросклеротических сосудов нейтрофилами наблюдаются при нарушении оттока холестерина из клеток, вызванном дефицитом АТФ-связывающего кассетного транспортера А1 (ABCA1) в макрофагах (Yvan-Charvet et al., 2008). Напротив, повышение скорости оттока холестерина из макрофагов через ABCA1 подавляет транспорт TLR в богатые холестерином рафты, снижая чувствительность макрофагов к стимулам (Zhu et al., 2010).

Несмотря на прогресс исследований в этой области, влияние холестерина на системное вовлечение МПК в воспалительный процесс остается неизученным. Динамичной моделью инициации, разрешения и завершения острого воспаления является индуцированный зимозаном перитонит, главными участниками которого выступают нейтрофилы и моноциты (макрофаги) (Cash et al., 2009; Kolaczowska et al., 2010). Для количественной оценки периода завершения воспалительного процесса часто используют показатель, названный периодом разрешения (ПР) воспаления, — время между точкой максимальной аккумуляции нейтрофилов и точкой, когда их количество снижается до 50 % (Bannenberg et al., 2005). Этот показатель отражает в основном скорость миграции нейтрофилов, их апоптоз и поглощение макрофагами, что считается ключевым событием завершения воспаления. Однако этот показатель практически не отражает морфофункциональных изменений популяции макрофагов, в частности образование МПК при завершении воспаления. На модели перитонита, индуцированного зимозаном, ранее было показано, что доля МПК в перитонеальном экссудате через 18–24 ч после его инициации может составлять около 40 % от всей популяции макрофагов (Душкин и др., 2007). Участие МПК в завершении воспаления не изучено. Неясным также остается вопрос о возможном значении времени их полужизни в прогнозировании течения воспалительного процесса.

Задача настоящего исследования заключалась в изучении влияния холестеринсодержащих липосом (ХСЛ) на взаимосвязь между образованием МПК и изменением динамики индуцированного зимозаном перитонита у мышей C57Bl/6. Для решения поставленной задачи перитонеальные макрофаги выделяли в различные периоды воспаления, исследовали их липидный состав, скорость синтеза липидов и оттока холестерина из клеток, ДНК-связывающую активность рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом- γ (PPAR- γ), продукцию про- и противовоспалительных цитокинов, используя в качестве сравнения макрофаги, полученные только при введении зимозана или ХСЛ.

Материал и методика

Модель перитонита. Все экспериментальные процедуры с животными проводили в соответствии с международными правилами работы с животными (European Communities Council Directive (86/609/ЕЕС)). Использовали 6-недельных мышей-самцов линии C57Bl/6, содержащихся на стандартной лабораторной диете со

свободным доступом к воде и пище в виварии Института цитологии и генетики СО РАН. Все мыши были разделены на четыре группы: 1-й подопытной внутрибрюшинно вводили сначала зимозан А (Sigma-Aldrich, США) в дозе 200 мг на 1 кг массы в 0.5 мл фосфатного буфера, содержащего 0.9 % NaCl (PBS), и через 20 мин — ХСЛ из расчета 2 мг холестерина на 20 г массы мыши; 2-й группе вводили только зимозан А в той же дозе; 3-й — только ХСЛ в той же дозе; контрольным мышам вводили внутрибрюшинно 0.5 мл PBS. ХСЛ получали ультразвуковой обработкой суспензии холестерина и фосфатидилхолина (Sigma-Aldrich, США; 1 : 1) в растворе PBS во льду при мощности 60 Вт. Через различные промежутки времени (0–5 сут) животных декапитуировали и после внутрибрюшинного введения раствора Хенкса получали перитонеальный лаваж, который использовали для исследований. Перитонеальные клетки (нейтрофилы и мононуклеары) подсчитывали в гемоцитометре после окраски 0.01%-ным кристаллическим фиолетом в 3%-ной уксусной кислоте (Kolaczowska et al., 2010). Определяли динамику содержания нейтрофилов и мононуклеарных клеток в лаваже и рассчитывали период разрешения (ПР) острого воспаления по формуле $ПР = T_{50} - T_{max}$, где T_{max} — время максимального накопления нейтрофилов, а T_{50} — время, когда количество нейтрофилов снижается на 50 % (Bannenberg et al., 2005).

Культивирование макрофагов. Монослой макрофагов получали при культивировании перитонеальных клеток в течение 4 ч в среде RPMI 1640, содержащей 5 % эмбриональной сыворотки и 100 Ед/мл гентамицина, в атмосфере 5 % CO₂ и 100 % влажности в 6- и 12-луночных планшетах Linbro (ICN Biomedicals, Inc., США) при 37 °С.

Для окраски и подсчета пенистых клеток монослой трехкратно промывали стерильным PBS, фиксировали 4%-ным параформальдегидом в течение 10 мин при 4 °С, дважды промывали PBS и затем инкубировали 30 мин в темноте с масляным красным О (Sigma-Aldrich, США; 0.3 мг/мл в 60%-ном изопропанол). После трехкратной отмывки в PBS клетки исследовали под инвертирующим микроскопом при увеличении объектива 40 \times , используя инвертируемый микроскоп Axiovert 40 CFL (Zeiss, Германия). При подсчете МПК за пенистую клетку принимали клетку, содержащую 10 или более позитивных по жировому красному включений (Nicolaou et al., 2012). Подсчет МПК и не окрашенных жировым красным клеток осуществляли в 5 лунках в каждом эксперименте, среднюю величину рассчитывали по 3 независимым экспериментам. Результаты выражали в долях (%) МПК от общего количества мононуклеарных клеток в перитонеальном экссудате, принятого за 100 %. Рассчитывали ПР МПК по формуле $ПР_{МПК} = T_{50МПК} - T_{maxМПК}$, где $T_{maxМПК}$ — время максимального формирования МПК, а $T_{50МПК}$ — время, когда количество МПК снижается на 50 %.

Для определения включения [¹⁻¹⁴C]олеата в клеточные липиды и определения их концентрации в эфирах холестерина и ТГ в среду культивирования клеток RPMI 1640, содержащую 0.2 % БСА, свободный от жирных кислот, добавляли 5 мкл этанола, содержащего 5 мкКи [¹⁻¹⁴C]олеата в конечной концентрации 0.2 мМ и инкубировали 4 ч. Затем клетки 3 раза промывали в PBS, содержащем 0.2 % БСА. Липиды экстрагировали смесью гексана с изопропанолом (3 : 2). Разделение ТГ и эфиров холестерина осуществляли методом тонкослойной хроматографии на пластинах Силуфол

(Душкин и др., 1992), радиоактивность считали в толуольном сцинтиляторе в жидкостном сцинтиляционном счетчике Марк-3 (Tracor Analytical, США). Аликвоты липидного экстракта использовали для определения свободного и общего холестерина флуориметрическим методом, используя стандартные наборы (Amplex Rad Cholesterol Assay; Invitrogen, США). Концентрация клеточных

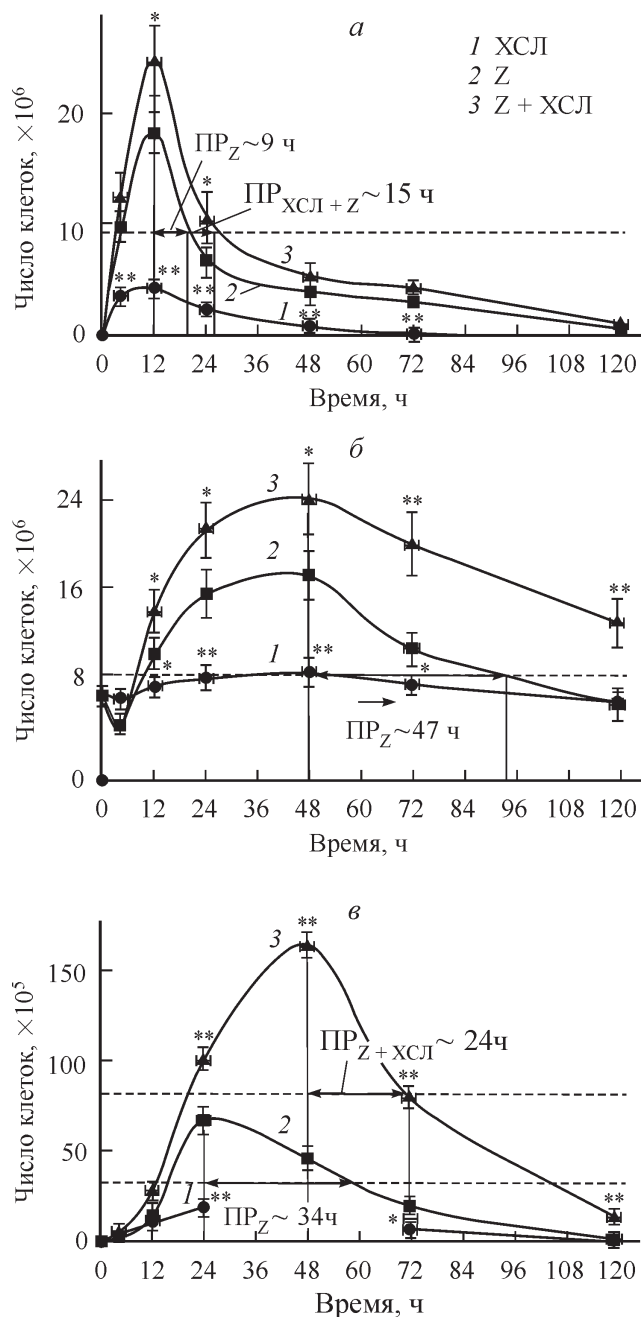


Рис. 1. Динамика содержания нейтрофилов (а), мононуклеарных клеток (б) и пенстых клеток макрофагов (в) в перитонеальном экссудате мышей, полученных после введения зимозана (Z), холестеринсоджащих липосом (ХСЛ) или ХСЛ при индуцированном зимозаном воспалении (Z + ХСЛ).

Даны средние значения и их ошибки, $n = 6$. Вертикальные отрезки — время максимальной аккумуляции клеток (T_{max}); пересечение горизонтальной линии с вертикальной — время снижения количества клеток на 50 % (T_{50}); ПР — период разрешения. Достоверность различия с контролем показана одной ($P < 0.05$) или двумя ($P < 0.01$) звездочками между группами (Z + ХСЛ) и (Z).

ТГ определяли с помощью колориметрического метода, используя стандартные наборы (Serum triglyceride determination kit; Sigma-Aldrich, США). Фиксированные на пластике остатки клеток растворяли в 200 мкл 0.1%-ного додецилсульфата натрия в 0.1 М NaOH в течение 30 мин и определяли содержание клеточного белка методом Лоури.

Определение оттока холестерина из макрофагов осуществляли флуоресцентным методом (Zhang et al., 2011), используя холестерин, флуоресцентно-меченный с помощью 3-С12-NBD (NBD-X) (Cayman Chemical Inc., США). Для этого клеточный монослой культивировали в течение 18 ч в среде RPMI 1640, содержащей 0.2 % БСА, в присутствии NBD-X (2 мг/мл) при 37 °С, 5 % CO₂ и 100 % влажности. Затем клетки трижды промывали в PBS и инкубировали 6 ч в среде RPMI 1640, содержащей 0.3 мМ 8Br-цАМФ (Sigma-Aldrich, США) и 2 % мышиной сыворотки. Флуоресценцию NBD-X определяли в среде инкубации и клеточных лизатах (в 1%-ной хлорной кислоте) при длинах волн возбуждения и испускания 485 и 535 нм соответственно, используя мультимодульный спектрофотометр (PerkinElmer, Waltham, США). Отток холестерина выражали отношением флуоресценции в среде инкубации к общей величине флуоресценции (в среде и в клетке) в %.

Определение продукции цитокинов. Макрофаги, полученные в различные сроки после развития перитонита, культивировали в бессывороточной питательной среде RPMI 1640 при 37 °С, 5 % CO₂ и 100 % влажности в течение 18 ч, затем собирали супернатант и хранили при -70 °С. В супернатанте определяли уровень TNF- α , IL-10 и TGF- β 1 с использованием наборов реагентов для твердофазного иммуноферментного анализа ProCon (R&D Systems Inc., США) в соответствии с прилагаемой инструкцией фирмы-производителя.

Определение ДНК-связывающей активности PPAR- γ . Макрофаги, полученные в разные сроки после развития перитонита, лизировали в растворе, содержащем 10 мМ Hepes, pH 7.9, 1.5 мМ MgCl₂, 0.5 % Nonidet P-40, 1 мг/мл лейпептина и 1 мМ фенилметилсульфонилфлуорида, центрифугировали при 5000 g 5 мин при 4 °С для получения ядерной фракции. Ядра ресуспендировали в лизирующем буфере, обрабатывали ультразвуком в течение 15 с и оставляли во льду на 5 мин. После центрифугирования при 4 °С (12 000 g, 5 мин) отбирали супернатант (ядерный экстракт). В ядерном экстракте определяли концентрацию белка методом Бредфорд и ДНК-связывающую активность PPAR- γ , используя Transcription Factor Assay Kit (Cayman Chemical Inc., США), методом, основанным на иммуноферментной детекции (при длине волны 450 нм) PPAR, связанных с иммобилизованными на пластике олигонуклеотидами (response element).

При статистической обработке данных использовали пакет программ Statistika 6.0.

Результаты

Для выяснения роли холестерина в модификации воспалительного процесса исследовали динамику содержания нейтрофилов и мононуклеарных клеток в перитонеальном экссудате мышей после введения ХСЛ на фоне индуцированного зимозаном воспаления. В физиологических условиях (0 ч) перитонеальный лаваж содержал лишь единичные нейтрофилы (рис. 1, а). Введение ХСЛ

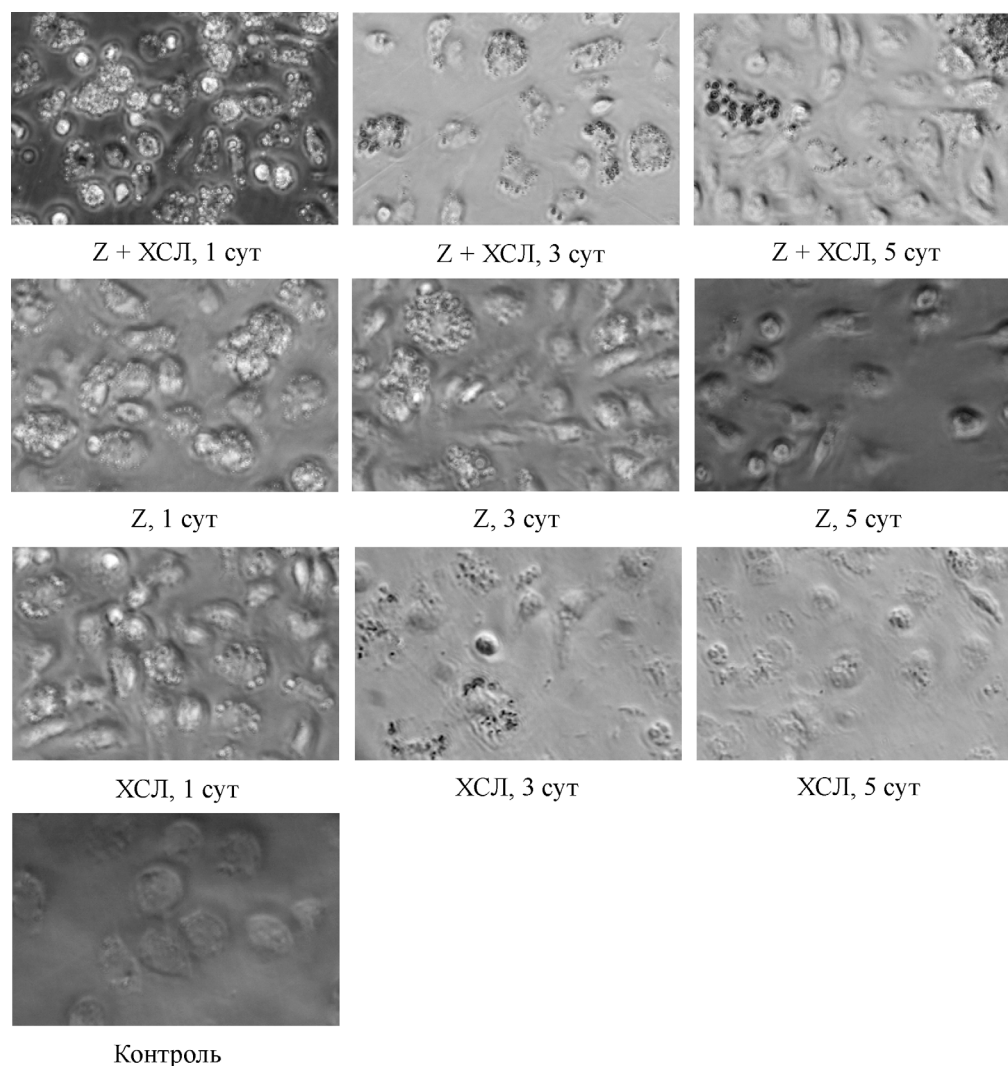


Рис. 2. Накопление липидных включений в перитонеальных макрофагах мышей (*ex vivo*), полученных после введения зимозана (Z), холестеринсодержащих липосом (ХСЛ) или ХСЛ при индуцированном зимозаном воспалении (Z + ХСЛ) в различные сроки. Фазово-контрастная микроскопия, окраска жировым красным. Об. 40×.

вызывало незначительное увеличение содержания нейтрофилов и мононуклеарных клеток в перитонеальной лаваже на протяжении всего периода воспаления. Введение зимозана приводило к инфильтрации нейтрофилов в брюшную полость, количество которых достигало максимума через 12 ч. В более отдаленные сроки воспаления наблюдали постепенное снижение количества нейтрофилов, которое через 120 ч приближалось к физиологическому уровню. В отличие от нейтрофилов содержание мононуклеарных клеток в течение 12 ч после введения зимозана не изменялось, но значительно возрастало в более поздние сроки (через 24 и 48 ч) и через 120 ч опускалось до исходного уровня (рис. 1, б). В группе с введением ХСЛ животным с индуцированным зимозаном перитонитом выявлено значительное увеличение инфильтрации нейтрофилов (12—120 ч) (рис. 1, а) и мононуклеаров (24—120 ч) (рис. 1, б) по сравнению с введением только зимозана или только ХСЛ.

Одним из популярных показателей, характеризующих изменение времени разрешения воспалительного процесса, является расчет ПР (Bannenberg et al., 2005). ПР традиционно используют как один из наиболее надежных

и простых общих показателей исследования продолжительности воспалительного процесса при изучении влияния ряда соединений (Schwab et al., 2007; Chiang et al., 2008). Как показано на рис. 1, а, максимальное увеличение количества нейтрофилов при введении зимозана происходит через 12 ч (до $18.2 \cdot 10^6$ клеток). Снижение их количества на 50 % (до $9.1 \cdot 10^6$ клеток) наблюдалось через 21 ч. ПР для зимозанового воспаления составил 9 ч. ХСЛ на фоне воспаления, вызванного зимозаном, вызывали значительное повышение ПР (до 15 ч; рис. 1, а), что указывает на способность холестерина вызывать инфильтрацию нейтрофилов при воспалении, удлинняя период его завершения.

Важным маркером воспаления является формирование МПК. Для изучения динамики превращения макрофагов в пенистые клетки полученные в различные периоды перитонита клетки инкубировали 4 ч, промывали для освобождения от нейтрофилов, фиксировали и окрашивали жировым красным (Nicolaou et al., 2012). Репрезентативные фотографии фазово-контрастной микроскопии, представленные на рис. 2, демонстрируют динамику содержания МПК в культуре перитонеальных макрофагов в

Динамика содержания липидов и скорости образования триглицеридов (ТГ) и эфиров холестерина (ЭХС) в перитонеальных макрофагах мышей, полученных после введения зимозана (Z), холестеринсодержащих липосом (ХСЛ) или ХСЛ при зимозан-индуцированном воспалении (Z+ХСЛ)

| Агент и время после его введения, ч | Содержание липидов, мкг/мг клеточного белка | | | Включение [^{14}C]олеата в ЭХС и ТГ, % от контроля | |
|-------------------------------------|---|----------------------------|----------------------------|---|--------------------------|
| | свободный холестерин | ЭХС | ТГ | ЭХС | ТГ |
| Контроль, 0 | 9.4 ± 0.7 | 0.8 ± 0.09 | 11.1 ± 1.4 | 100 ± 12 | 100 ± 14 |
| Z: | | | | | |
| 24 | 13.8 ± 1.5 ^a | 12.8 ± 2.1 ^b | 68.0 ± 9.6 ^b | 479 ± 57 ^b | 1057 ± 125 ^b |
| 48 | 14.1 ± 1.2 ^b | 13.9 ± 3.2 ^b | 59.6 ± 7.5 ^b | 312 ± 44 ^b | 968 ± 106 ^b |
| 72 | 10.6 ± 1.4 | 10.1 ± 1.6 ^b | 29.1 ± 3.8 ^b | 141 ± 24 ^a | 618 ± 86 ^b |
| 120 | 9.6 ± 0.9 | 1.64 ± 0.2 ^a | 12.4 ± 2.9 | 86 ± 9 | 149 ± 16 ^a |
| Z + ХСЛ: | | | | | |
| 24 | 19.8 ± 2.2 ^{b, в} | 50.1 ± 8.4 ^{b, г} | 38.2 ± 5.9 ^{b, в} | 854 ± 96 ^{b, г} | 421 ± 69 ^{b, г} |
| 48 | 18.8 ± 2.4 ^{b, в} | 34.1 ± 5.5 ^{b, г} | 31.64 ± 4.2 | 1275 ± 158 ^{b, г} | 561 ± 67 ^{b, г} |
| 72 | 17.9 ± 2.1 ^{b, г} | 18.5 ± 2.7 ^{b, г} | 20.8 ± 2.7 ^{b, в} | 525 ± 68 ^{b, г} | 516 ± 64 |
| 120 | 13.2 ± 1.5 ^{b, г} | 11.6 ± 3.8 ^{b, г} | 17.9 ± 2.1 ^{b, в} | 296 ± 37 ^{b, г} | 382 ± 34 ^{b, г} |
| ХСЛ: | | | | | |
| 24 | 11.8 ± 0.9 ^a | 37.9 ± 5.2 ^b | 20.7 ± 3.6 ^b | 895 ± 116 ^b | 222 ± 34 ^b |
| 72 | 10.8 ± 1.2 | 16.4 ± 2.5 ^b | 14.1 ± 1.7 | 312 ± 43 ^b | 148 ± 29 |
| 120 | 8.8 ± 0.9 | 0.9 ± 0.1 | 9.1 ± 1.5 | 93 ± 11 | 112 ± 16 |

Примечание. Различия с контролем достоверны при ^a $P < 0.05$ или ^b $P < 0.001$; различия между вариантами (Z + ХСЛ) и (Z) достоверны при ^a $P < 0.05$ или ^в $P < 0.001$; n = 6.

трех изученных группах животных. В 1-е сут происходит интенсивное образование МПК, наиболее выраженное в группе с введением ХСЛ на фоне зимозанового воспаления. На 3-и сут доля МПК от общей популяции макрофагов уменьшается в большей степени в группах с введением только зимозана или только ХСЛ, чем при введении ХСЛ на фоне зимозанового перитонита, а на 5-е сут отсутствует. В то же время в группе с введением ХСЛ при индуцированном зимозаном воспалении на 5-е сут в макрофагальной популяции присутствует значительное количество МПК. Подсчет показал, что при введении зимозана максимальное увеличение количества МПК (до $67 \cdot 10^5$ клеток) происходит в 1-е сут, снижение на 50 % до ($33.5 \cdot 10^5$ клеток) — через 58 ч, следовательно, ПР МПК составляет 34 ч ($T_{50\text{МПК}} - T_{\text{максМПК}} = 58 - 24$) (рис. 1, в). В группе с введением ХСЛ индуцированным зимозаном животным происходят значительное увеличение МПК в 1-е сут ($163.4 \cdot 10^5$) по сравнению с группой введения только зимозана и смещение $T_{\text{максМПК}}$ с 24 до 48 ч, а $T_{50\text{МПК}}$ — с 58 до 72 ч (рис. 1, в). Полученные результаты показывают, что холестерин, пролонгируя время полужизни МПК, вызывает задержку завершения спонтанного индуцированного зимозаном воспаления.

Общепринятыми маркерами ПК являются повышенная скорость образования и рост внутриклеточного содержания нейтральных липидов. Обнаружено, что введение ХСЛ на фоне зимозанового перитонита вызывает изменения липидного состава и скорости включения [^{14}C]олеата в эфиры холестерина и ТГ в макрофагах, полученных из перитонеального экссудата (см. таблицу). Если в макрофагах, полученных через 24 и 48 ч после введения зимозана, соотношение эфиров холестерина и ТГ составляло приблизительно 1 : 5, то при комбиниро-

ванном действии зимозана и ХСЛ оно сдвигалось в пользу эфиров холестерина, приближаясь к 0.8. Анализ скорости включения [^{14}C]олеата в эфиры холестерина и ТГ показал, что если зимозан стимулирует преимущественно синтез ТГ (с максимумом через 24 ч), то в комбинации с ХСЛ происходит более значительное увеличение синтеза эфиров холестерина в макрофагах (с максимумом через 48 ч). Введение ХСЛ на фоне зимозанового воспаления сопровождалось также значительным повышением клеточного уровня свободного холестерина, который проявлялся почти на всех изученных сроках в отличие от случаев введения только зимозана или только ХСЛ.

Для выяснения механизмов формирования МПК исследовали скорость оттока холестерина из клеток флуоресцентным методом с использованием флуоресцентного аналога холестерина 3-С12-NBD-X, который воспроизводит ABCA1-опосредованный транспорт холестерина из клеток на акцепторы сыворотки липопротеины высокой плотности (Zhang et al., 2011). С этой целью макрофаги сначала инкубировали с 3-С12-NBD-X в бессывороточной среде для их обогащения флуоресцентным холестерином, затем в среде, содержащей активатор ABCA1 8Br-цАМФ и 2 % мышшиной сыворотки в качестве акцептора холестерина. Данные рис. 3 показывают, что интенсивность флуоресценции в среде инкубации контрольных макрофагов составляла около 12 % от общей интенсивности (в клетках и в среде). Через 24 ч после введения зимозана отток холестерина из клеток резко снижается (приблизительно в 6 раз), на 2-е и 3-и сут происходит постепенный возврат этого показателя к исходному уровню. Интересно, что у макрофагов, полученных на 5-е сут после инициации воспаления зимозаном, отток NBD-X из клеток увеличивался по сравнению с контролем (16.2

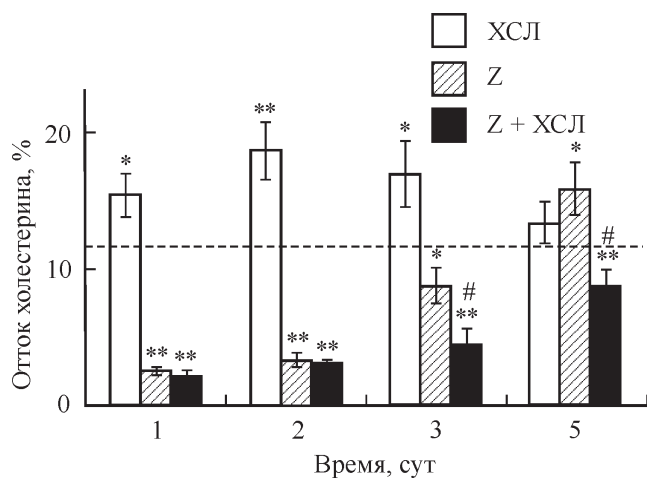


Рис. 3. Динамика оттока флуоресцентномеченного холестерина из перитонеальных макрофагов мышей (ex vivo), полученных после введения зимозана (Z), холестеринсодержащих липосом (XСЛ) или XСЛ при индуцированном зимозаном воспалении (Z + XСЛ).

Даны средние значения и их ошибка, % от суммарного содержания в среде и клетках (n = 6). Горизонтальная штриховая линия — значение для контрольных макрофагов (после введения PBS). Достоверность различия с контролем показана одной (P < 0.05) или двумя (P < 0.01) звездочками, с группой введения Z — решеткой (P < 0.001).

против 11.94 %). Введение только XСЛ, напротив, привело к увеличению выхода флуоресцентного холестерина из макрофагов во временном интервале 24—72 ч по сравнению с контролем (17—20 против 11.94 %), а через 120 ч этот показатель возвращался к исходному уровню.

Анализ интенсивности флуоресценции в среде инкубации и клеточном монослое в группе с введением XСЛ на фоне зимозанового перитонита показал, что в 1-е и на 2-е сут средние значения оттока флуоресцентного холестерина из клеток не отличаются от показателей для группы животных, которым вводили только зимозан. Однако в более поздние сроки (3-и и 5-е сут) при влиянии XСЛ на воспалительный процесс выход холестерина из клеток не достигал контрольных значений и средние величины этого показателя были почти в 2 раза ниже, чем в группе введения только зимозана (рис. 3).

Модулирующий эффект холестерина на развитие воспаления может быть напрямую связан с изменением продукции про- и противовоспалительных цитокинов макрофагами. Поэтому далее исследовали динамику продукции про- (TNF-α) и противовоспалительных (IL-10 и TGF-β1) цитокинов в макрофагах (рис. 4). В группе введения XСЛ только в 1-е сут отмечали двукратное повышение концентрации IL-10 и тенденцию к повышению TGF-β1 в среде инкубации макрофагов по сравнению с контролем (рис. 4, б, в). Различия продукции TNF-α как в ранние, так и в поздние сроки после действия XСЛ были незначительны (рис. 4, а). Зимозан повышал уровень продукции TNF-α и IL-10 в 1—3-и сут по сравнению с контролем, и продукция этих цитокинов на 5-е сут была ниже контрольного уровня (рис. 4, а, б). Маркером завершения острого воспаления является повышение уровня TGF-β1, что и подтверждается в экспериментах. В 1-е сут после введения зимозана продукция TGF-β1 была выше, чем в контроле, приблизительно в 1.5 раза, на 2-е и 3-и сут — в 2.4 и 2.13 раза соответственно, а на 5-е сут уровень TGF-β1 возвращался к контрольным значениям (рис. 4, в).

Обнаружено, что введение XСЛ на фоне зимозанового воспаления значительно модифицирует продукцию цитокинов в макрофагах. В 1, 2 и 3-и сут уровни IL-10

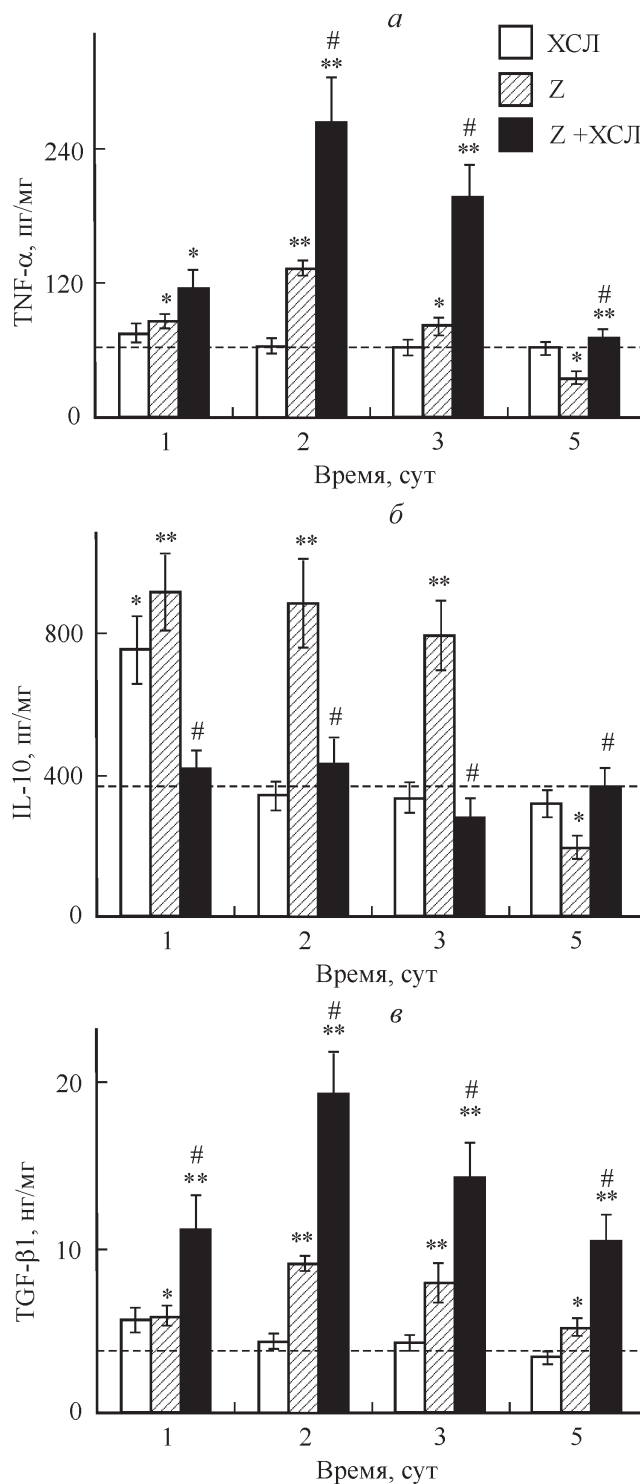


Рис. 4. Динамика продукции TNF-α (а), IL-10 (б) и TGF-β1 (в) перитонеальными макрофагами мышей (ex vivo), полученными после введения зимозана (Z), холестеринсодержащих липосом (XСЛ) или XСЛ при индуцированном зимозаном воспалении (Z + XСЛ).

Даны средние значения (на 1 мг белка) и их ошибка (n = 6). Горизонтальная штриховая линия — контрольные значения цитокинов. Достоверность различия с контролем показана одной (P < 0.05) или двумя (P < 0.01) звездочками, с группой введения Z решеткой (P < 0.01).

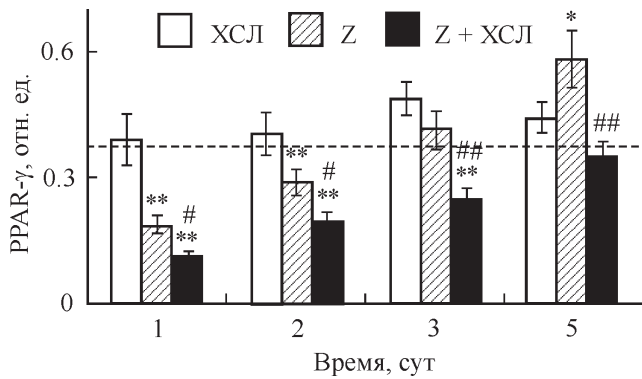


Рис. 5. Динамика изменения ДНК-связывающей активности PPAR- γ в перитонеальных макрофагах мышей (*ex vivo*), полученных после введения зимозана (Z), холестеринсодержащих липосом (ХСЛ) или ХСЛ при индуцированном зимозаном воспалении (Z + ХСЛ).

Даны средние значения (на 1 мг белка) и их ошибка ($n = 6$). Горизонтальная штриховая линия — контрольное значение ДНК-связывающей активности PPAR- γ . Достоверность различия с контролем показана одной ($P < 0.05$) или двумя ($P < 0.01$) звездочками, с группой введения Z — одной ($P < 0.05$) или двумя ($P < 0.01$) решетками.

снижаются на 52, 54 и 64,8 % соответственно по сравнению с группой введения только зимозана (рис. 4, б). Напротив, уровень TNF- α (рис. 4, а) проявляет сначала (в 1-е сут) лишь тенденцию к росту, а на 2-е и 3-и сут возрастает приблизительно на 46 и 57 % соответственно по сравнению с группой введения только зимозана. Вместе с тем введение ХСЛ при индуцированном зимозаном перитоните увеличивает продукцию макрофагами TGF- β 1 на протяжении 5 сут почти в 2 раза по сравнению с группой введения только зимозана (рис. 4, в). Обобщая полученные данные, можно заключить, что повышение уровня холестерина в активированных макрофагах смещает баланс продукции цитокинов в пользу провоспалительных (рост TNF- α и снижение IL-10) и одновременно стимулирует продукцию профиброзного медиатора TGF- β 1.

В последние годы сложились представления о том, что ядерный фактор PPAR- γ , активность которого угнетается при действии ряда воспалительных факторов, осуществляет интеграционную регуляцию липидного обмена и иммунных функций макрофагов (Hu et al., 2010; Душкин, 2012). Исследование ДНК-связывающей активности PPAR- γ в макрофагах при введении зимозана (рис. 5) показало, что в 1-е и 2-и сут активность этого транскрипционного фактора достоверно снижается на 60,6 и 33 % соответственно по сравнению с контролем, возвращаясь к исходному контрольному уровню на 3-и сут. Интересно, что на 5-е сут после введения зимозана средняя величина ДНК-связывающей активности PPAR- γ популяции макрофагов оказалась выше на 38 % по сравнению с контрольной. Исследования показали, что средние величины ДНК-связывающей активности PPAR- γ в макрофагах подопытной группы в 1-е и 2-и сут ниже, чем в группе введения только зимозана ($P < 0.05$). Достоверность различий между этими двумя группами еще более усиливалась ($P < 0.001$) на 3-и и 5-е сут — ДНК-связывающая активность PPAR- γ снижалась приблизительно на 42 и 40 % (рис. 5). Вместе с тем при действии только ХСЛ существенных различий этого показателя по сравнению с контрольными значениями не было. Можно отметить только тенденцию к уменьшению

ДНК-связывающей активности PPAR- γ в макрофагах по сравнению с контрольной группой в 1-е и 2-и сут, поскольку различия недостоверны (рис. 5).

Обсуждение

В нашей работе проведено исследование влияния холестерина на течение воспаления, индуцированного агонистом TLR2 зимозаном (полимер α -D-манана и β -D-глюкана *Saccharomyces cerevisiae*), в частности изучено изменение липидного состава, цитокиновой продукции и активности PPAR- γ в макрофагах. В соответствии с данными ряда других исследований (Bannenberg et al., 2005; Chiang et al., 2008; Cash et al., 2009) в наших экспериментах воспаление, вызванное зимозаном, сопровождалось инфильтрацией нейтрофилов с максимумом через 12 ч, а мононуклеарных клеток через 24—48 ч (рис. 1, а, б). Считается, что с момента снижения количества нейтрофилов в экссудате начинается период разрешения воспаления. Для его оценки часто используется ПР, который отражает фундаментальную парадигму того, что апоптоз нейтрофилов и их последующий захват макрофагами являются ведущим механизмом завершения воспаления (Schwab et al., 2007). Однако роль макрофагов в организации завершения воспаления не ограничивается фагоцитозом апоптотических нейтрофилов, а представляет собой динамичный процесс смены популяций фагоцитов, которые поляризуются в различные фенотипы в зависимости от окружающих стимулов и выполняют разнообразные функции, иногда противоположные (Schif-Zuck et al., 2011). В частности, это относится к формированию МПК, которые на ранних стадиях могут выступать эффекторами воспаления, а в более отдаленный период способствовать его завершению (Душкин, 2012).

Для описания динамики формирования и элиминации МПК мы ввели ПР_{МПК}, который соответствует периоду полужизни этих клеток (рис. 1, в). При введении зимозана время максимального формирования МПК (T_{\max}) соответствует 24 ч, с которого, вероятно, начинается вторая волна воспалительного процесса. Можно предположить, что значительное снижение количества МПК на 3-и сут, их исчезновение на 5-е сут после введения стимула вызваны апоптозом МПК, который, по-видимому, является условием для спонтанного завершения воспаления. В поддержку этого предположения можно привести результаты исследования, согласно которым максимальный рост числа апоптотических макрофагов (около 20 % от популяции) происходит в терминальной стадии воспаления на 3-и сут после его инициации зимозаном (Kolaczowska et al., 2010).

Как показано в наших экспериментах, используемые концентрации холестерина модифицируют динамику зимозанового перитонита, вызывая рост аккумуляции нейтрофилов и значительно увеличивая ПР (рис. 1, а). Вместе с тем результаты настоящего исследования демонстрируют, что ХСЛ, стимулируя образование МПК, смещают T_{\max} МПК с 24 до 48 ч по сравнению с группой введения только зимозана (рис. 1, в), значительно увеличивая время завершения воспаления, которое приобретает хронический характер и характеризуется более значительной инфильтрацией мононуклеарных клеток. Интересно, что введение животным только ХСЛ также приводит к увеличению количества нейтрофилов с максимумом через 12 ч, а также мононуклеаров и МПК в более поздний период.

Однако средние величины этих показателей значительно ниже, чем в двух других подопытных группах, и уже на 3-и сут они становятся близки к контрольным.

Макрофаги трех изученных групп мышей значительно различаются по своему липидному составу (см. таблицу). Не сюрпризом явилось то обстоятельство, что ХСЛ на фоне воспаления снижают содержание ТГ и повышают содержание свободного холестерина и его эфиров, одновременно вызывая перераспределение утилизации пула меченого олеата в пользу эфиров холестерина. Подобное увеличение скорости включения олеата в эфиры холестерина и снижение его включения в ТГ наблюдались нами ранее при инкубации «воспалительных» макрофагов с модифицированными липопротеинами низкой плотности *in vitro* (Душкин и др., 1992).

Вызывает интерес тот факт, что формирование МПК происходит в условиях значительного подавления оттока холестерина, которое в группе введения зимозана проявляется только на ранних стадиях воспаления, а после комбинированного введения ХСЛ и зимозана регистрируется как на ранних, так и на его поздних сроках (рис. 3). Обратимое во времени подавление оттока холестерина в макрофагах при действии агониста TRL2 зимозана *in vivo*, вероятно, является следствием снижения функции транспортеров холестерина, на что указывают данные, полученные при культивировании первичных моноцитов, мышинных макрофагов линии J774 (Nicolau et al., 2012) и RAW264.7 (Malik et al., 2011), согласно которым зимозан и другие агонисты TLR подавляют отток холестерина путем репрессии ABCA1 и способствуют формированию МПК. В свою очередь репрессия ABCA1 и ABCG1 может быть обусловлена снижением активности гормональных рецепторов II типа, в частности PPAR- γ (Hu et al., 2010).

Ранее было показано, что в начальном периоде индуцируемого зимозаном воспаления экспрессия белка PPAR- γ резко падает, затем происходит ее восстановление и повышение в период его завершения (Душкин и др., 2009). В соответствии с этими представлениями, в наших опытах скорость оттока холестерина в группе введения зимозана изменяется вместе с изменением ДНК-связывающей активности PPAR- γ в макрофагах (рис. 3, 5). Вместе с тем аккумуляция свободного холестерина и его эфиров в активированных макрофагах опытной группы сопровождается усилением продукции TNF- α и снижением продукции IL-10 (рис. 4, а, б), что может быть причиной дополнительной репрессии оттока холестерина. Указание на то, что TNF- α и IL-10 оказывают противоположные эффекты в отношении оттока холестерина, показано в исследованиях на культивируемых макрофагах костного мозга (Han et al., 2009). Авторы обнаружили, что стимуляция оттока холестерина IL-10 происходит путем активации PPAR- γ , который в свою очередь стимулирует экспрессию ABCA1 (Han et al., 2009). Анализ данных литературы и результаты настоящей работы приводят к выводу о том, что драматическое образование МПК, вызванное действием ХСЛ на фоне индуцированного зимозаном воспаления, снижение скорости оттока холестерина, повышение внутриклеточного содержания свободного холестерина и его эфиров могут быть следствием сниженной продукции IL-10 (рис. 4, б) и ДНК-связывающей активности PPAR- γ (рис. 5) в макрофагах. Вместе с тем в макрофагах при введении только ХСЛ, напротив, отток холестерина повышался. Вероятно, это является следствием регуляторной реакции макрофа-

гов на повышение внутриклеточного уровня холестерина в физиологических условиях (Wang et al., 2007), при которых продукция цитокинов и активность PPAR- γ существенно не изменяются (рис. 4, 5).

Полученные в настоящей работе данные о повышении секреции TGF- β 1 в макрофагах в группе с введением ХСЛ на фоне зимозанового перитонита согласуются с ранее показанным стимулирующим влиянием холестерина на продукцию TGF- β 1 в среде культивирования макрофагов мышей, содержащихся на холестериновой диете (Шварц и др., 2009). Вместе с тем хорошо известно, что фагоцитоз апоптотических клеток макрофагами при воспалении является инициатором повышения продукции противовоспалительных цитокинов, таких как TGF- β 1 (Fadok et al., 1998). Как показано, избыточное содержание свободного холестерина в макрофагах вызывает стресс эндоплазматического ретикулума, что приводит к апоптозу (Tabas, 2010). Однако при этом фагоцитоз нагруженных холестерином апоптотических макрофагов в отличие от апоптотических клеток, например полученных при обработке ультрафиолетовым светом, приводит к экспрессии TNF- γ и IL-1 β , но не TGF- β 1 в фагоцитах (Li et al., 2006). Известно также, что провоспалительное действие холестерина на молекулярном уровне включает в себя индукцию разнообразных сигнальных каскадов, ассоциированных с липидными рафтами (Fessler, Parks, 2011), активацию NF- κ B-опосредованных путей экспрессии цитокинов (Yin et al., 2012), нарушение противовоспалительных сигнальных путей TGF- β 1 (Chen et al., 2008), а также реорганизацию клеточного цитоскелета (Ефремова и др., 2012).

Таким образом, полученные данные демонстрируют значение внутриклеточного холестерина в изменении функциональной активности МПК и динамики острого воспаления. Становится очевидным, что если образование пенистых клеток при активации макрофагов различными патогенами протекает как часть программы воспаления и заканчивается при инактивации возбудителя, то аккумуляция холестерина в макрофагах на фоне действия агонистов TLR вносит существенный вклад в развитие хронических инфекций и атеросклероза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-00552-а).

Список литературы

- Душкин М. И. 2012. Макрофаг/пенистая клетка как атрибут воспаления: механизмы образования и функциональная роль. Биохимия. 77 (4) : 419—432. (Dushkin M. I. 2012. Macrophage/foam cell is an attribute of inflammation: mechanisms of formation and functional role. Biochemistry (Moscow). 77 (4) : 327—338.)
- Душкин М. И., Корнюш Е. Н., Поляков Л. М., Дмитриенко Г. И., Юнонина Г. А., Крылова И. Н. 1992. Биосинтез липидов и метаболизм нативных и ацетилированных липопротеинов низкой плотности в макрофагах, стимулированных зимозаном *in vivo* и *in vitro*. Биохимия. 57 (8) : 1181—1191. (Dushkin M. I., Kornius E. A., Poliakov L. M., Dmitrienko G. I., Yunonina G. A., Krylova I. N. 1992. Lipid biosynthesis and metabolism of native and acetylated low density lipoproteins in macrophages stimulated by zymosan *in vivo* and *in vitro*. Biochemistry (Moscow). 57 (8) : 1181—1191.)
- Душкин М. И., Хоценко О. М., Посохова Е. Н., Шварц Я. Ш. 2007. Агонисты PPAR- α и - γ и RXR ингибируют образование

- макрофаг/пенистых клеток при воспалении у мышей. Бюл. эксперим. биол. и мед. 144 (5) : 713—716. (Dushkin M. I., Khoshchenko O. M., Posokhova E. N., Schwarts Y. Sh. 2007. Agonists of PPAR-alpha, PPAR-gamma, and RXR inhibit the formation of foam cells from macrophages in mice with inflammation. Bull. Exp. Biol. Med. 144 (5) : 713—716.)
- Душкин М. И., Хоценко О. М., Часовских М. И., Пивоварова Е. Н. 2009. Содержание белка PPAR, LXR и RXR и ДНК-связывающая активность PPAR в динамике воспаления у мышей. Бюл. эксперим. биол. и мед. 147 (3) : 345—348. (Dushkin M. I., Khoshchenko O. M., Chasovsky M. I., Pivovarova E. N. 2009. The content of PPAR, LXR, and RXR and the PPAR DNA-binding activity in macrophages over the course of inflammation in mice. Bull. Exper. Biol. Med. 147 (3) : 345—348.)
- Ефремова Т. Н., Чубинский-Надеждин В. И., Хайтлина С. Ю., Морачевская Е. А. 2012. Сборка актиновых филаментов в трансформированных клетках при действии мембранных модификаторов, связывающих холестерин. Цитология. 54 (6) : 508—514. (Efremova T. N., Chubinskij-Nadezhdin V. I., Khaïtlina S. Ju., Morachevskaya E. A. 2012. Assembly of actin filaments induced by sequestration of membrane cholesterol in transformed cells. Cell Tissue Biol. 6 : 341—347.)
- Шварц Я. Ш., Хоценко О. М., Душкин М. И., Фефанова Н. А. 2009. Действие холестерина и агонистов ядерных гормональных рецепторов на продукцию трансформирующего фактора роста-бета в макрофагах. Бюл. эксперим. биол. мед. 148 (9) : 294—297. (Schwartz Y. Sh., Khoshchenko O. M., Dushkin M. I., Feofanova N. A. 2009. Effects of cholesterol and nuclear hormone receptor agonists on the production of transforming growth factor-beta in macrophages. Bull. Exp. Biol. Med. 148 (3) : 406—409.)
- Bannenberg G. L., Chiang N., Ariel A., Arita M., Tjonahen E., Gotlinger K. H., Hong S., Serhan C. N. 2005. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. J. Immunol. 174 : 4345—4355.
- Cash J. L., White G. E., Greaves D. R. 2009. Chapter 17. Zymosan-induced peritonitis as a simple experimental system for the study of inflammation. Methods Enzymol. 461 : 379—396.
- Chen C. L., Huang S. S., Huang J. S. 2008. Cholesterol modulates cellular TGF-beta binding to TGF-beta receptor. J. Cell. Physiol. 215 : 223—233.
- Chiang N., Schwab J. M., Fredman G., Kasuga K., Gelman S., Serhan C. N. 2008. Anastetics impact the resolution of inflammation. PLoS ONE. 3 : e1879.
- D'Avila H., Toledo D. A., Melo R. C. 2012. Lipid bodies: inflammatory organelles implicated in host-Trypanosoma cruzi interplay during innate immune responses. Mediators Inflamm. 2012 : e478601.
- Fadok V. A., Bratton D. L., Konowal A., Freed P. W., Westcott J. Y., Henson P. M. 1998. Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGFbeta, PGE2, and PAF. J. Clin. Invest. 101 : 890—898.
- Feingold K. R., Shigenaga J. K., Kazemi M. R., McDonald C. M., Patzek S. M., Cross A. S., Mozer A., Grunfeld C. 2012. Mechanism of triglyceride accumulation in activated macrophages. J. Leukoc. Biol. 92 : 829—839.
- Fessler M. B., Parks J. S. 2011. Intracellular lipid flux and membrane microdomains as organizing principles in inflammatory cell signaling. J. Immunol. 187 : 1529—1535.
- Han X., Kitamoto S., Lian Q., Boisvert W. A. 2009. Interleukin-10 facilitates both cholesterol uptake and efflux in macrophages. J. Biol. Chem. 284 : 32 950—32 958.
- Hu Q., Zhang X. J., Liu C. X., Wang X. P., Zhang Y. 2010. PPARgamma1-induced caveolin-1 enhances cholesterol efflux and attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. J. Vasc. Res. 47 : 69—79.
- Kazemi M. R., McDonald C. M., Shigenaga J. K., Grunfeld C., Feingold K. R. 2005. Adipocyte fatty acid-binding protein expression and lipid accumulation are increased during activation of murine macrophages by toll-like receptor agonists. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 25 : 1220—1224.
- Kolaczowska E., Koziol A., Plytycz B., Arnold B. 2010. Inflammatory macrophages, and not only neutrophils, die by apoptosis during peritonitis. Immunobiology. 215 : 492—504.
- Lemaire-Ewing S., Lagrost L., Neel D. 2012. Lipid rafts: a signaling platform linking lipoprotein metabolism to atherogenesis. Atherosclerosis. 221 : 303—310.
- Li Y., Gerbord-Giannone M. S., Seitz H., Cui D., Thorp E., Tall A. R., Matsushima G. K., Tabas I. 2006. Cholesterol-induced apoptotic macrophages elicit an inflammatory response in phagocytes, which in partially attenuated by the Mer receptor. J. Biol. Chem. 281 : 6707—6717.
- Malik P., Berisha S. Z., Santore J., Agatista-Boyle C., Brubaker G., Smith J. D. 2011. Zymosan-mediated inflammation impairs *in vivo* reverse cholesterol transport. J. Lipid Res. 52 : 951—957.
- Melo R. C., Dvorak A. M. 2012. Lipid body-phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: host defense or pathogen survival strategy? PLoS Pathog. 8 : e1002729.
- Melo R. C., Fabrino D. L., Dias F. F., Parreira G. G. 2006. Lipid bodies: structural markers of inflammatory macrophages in innate immunity. Inflamm. Res. 55 : 342—348.
- Nicolaou G., Goodall A. H., Erridge C. 2012. Diverse bacteria promote macrophage foam cell formation via Toll-like receptor-dependent lipid body biosynthesis. J. Atheroscler. Thromb. 19 : 137—148.
- Peyron P., Vaubourgeix J., Poquet Y., Levillain F., Botanch C., Bardou F., Daffé M., Emile J. F., Marchou B., Cardona P. J., de Chastellier C., Altare F. 2008. Foamy macrophages from tuberculob patients granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. PLoS Pathog. 4 : e1000204.
- Rouzer C. A., Tranguch S., Wang H., Zhang H., Dey S. K., Marnett L. J. 2006. Zymosan-induced glycerylprostaglandin and prostaglandin synthesis in resident peritoneal macrophages: roles of cyclo-oxygenase-1 and -2. Biochem. J. 399 : 91—99.
- Schif-Zuck S., Gross N., Assi S., Rostoker R., Serhan C. N., Ariel A. 2011. Saturated-efferocytosis generates pro-resolving CD11b low macrophages: modulation by resolvins and glucocorticoids. Eur. J. Immunol. 41 : 366—379.
- Schwab J. M., Chiang N., Arita M., Serhan C. N. 2007. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. Nature. 447 : 869—874.
- Tabas I. 2010. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. Nat. Rev. Immunol. 10 : 36—46.
- Wang X., Collins H. L., Ranalletta M., Fuki I. V., Billheimer J. T., Rothblat G. H. 2007. Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-B1, promote macrophage reverse cholesterol transport *in vivo*. J. Clin. Invest. 117 : 2216—2224.
- Yin K., Chen W. J., Zhou Z. G., Zhao G. J., Lv Y. C., Ouyang X. P., Yu X. H., Fu Y., Jiang Z. S., Tang C. K. 2012. Apolipoprotein A-I inhibits CD40 proinflammatory signaling via ATP-binding cassette transporter A1-mediated modulation of lipid raft in macrophages. J. Atheroscler. Thromb. 19 : 823—836.
- Yvan-Charvet L., Welch C., Pagler T. A., Ranalletta M., Lamkanfi M., Han S., Ishibashi M., Li R., Wang N., Tall A. R. 2008. Increased inflammatory gene expression in ABC transporter-deficient macrophages: free cholesterol accumulation, increased signaling via toll-like receptors, and neutrophil infiltration of atherosclerotic lesions. Circulation. 118 : 1837—1847.
- Zhang J., Cai S., Peterson B. R., Kris-Etherton P. M., Heuvel J. P. 2011. Development of a cell-based, high-throughput screening assay for cholesterol efflux using a fluorescent mimic of cholesterol. Assay Drug Develop. Technol. 9 : 136—146.
- Zhu X., Owen J. S., Wilson M. D., Li H., Griffiths G. L., Thomas M. J., Hiltbold E. M., Fessler M. B., Parks J. S. 2010. Macrophage ABCA1 reduces MyD88-dependent Toll-like receptor trafficking to lipid rafts by reduction of lipid raft cholesterol. J. Lipid Res. 51 : 3196—3206.

INFLUENCE OF CHOLESTEROL ON MACROPHAGE FOAM CELLS FORMATION
AT ZYMOSAN-INDUCED INFLAMMATION OF MICE*O. M. Dolganova*^{1,*} *M. I. Rudina*¹ *M. V. Chrapova*² *M. I. Dushkin*²¹ Institute of Internal and Preventive Medicine SB RAMS and² State Research Institute of Physiology and Fundamental Medicine RAMS, Novosibirsk;

* e-mail: Kh_Olgam@mail.ru

It has been shown recently that significant number (to 40 % from total population) of macrophage foam cells (MFC) is formed during early time (24 h) of zymosan-induced peritonitis resolution and agonists of peroxisome proliferation activated receptors- α , - γ (PPAR- α , - γ) exert anti-inflammatory action, protecting their formation (Dushkin et al., 2007). The work is devoted to investigate of the influence of cholesterol-containing liposomes (CHL) on dynamic of zymosan-induced peritonitis in C57B1/6 mice. The accumulation of cholesterol, the change of cytokine production, PPAR- γ activity and cholesterol efflux in macrophages of C57B1/6 mice has been investigated. The infiltration of neutrophils, amounts of mononuclear cells and MFC formation were significantly increased in peritoneal cavity of zymosan-induced mice that led to an expansion of the period of inflammatory resolution and of the period of MFC resolution. If macrophages obtained after zymosan injection mainly accumulated triglycerides (TG) and at high speed incorporated [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oleate into TG, the injection of CHL after zymosan-induced inflammation led to dramatic promotion of MFC containing primarily free cholesterol and cholesterols and to an aggravation of [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oleate incorporation into cholesterol esters in macrophages (mainly for 2 days). It has been shown that CHL against a background of inflammation promoted reduction of fluorescent NBD-cholesterol efflux from macrophages throughout the studied period (5 days) whereas zymosan inhibited cholesterol efflux at the early stages of inflammation (1 and 2 days), then, on 3rd day, the cholesterol efflux was recovered and increased on day 5. At the same time CHL stimulated the production of TNF α and TGF β and inhibited the production of IL-10 and DNA-binding activity of PPAR- γ macrophages obtained at early as well as late stages of zymosan-induced peritonitis (compared with injection of zymosan only). Thus, accumulation of cholesterol in inflammatory macrophages and promotion of MFC formation prolog timely resolution of acute inflammation inducing alteration of pro- and anti-inflammatory cytokine balance and evoking the repression of macrophage DNA-binding activity of PPAR- γ and cholesterol efflux.

Key words: macrophage foam cells, inflammation, cholesterol, cytokines, PPAR- γ .