

Механизмы оттока холестерина из макрофагов — роль белка переноса фосфолипидов

Карагодин В.П.^{1,2}, Мухамедова М.Н.¹, Орехов А.Н.^{1,2}

¹ — Научно-исследовательский институт атеросклероза, Инновационный центр Сколково, Россия, Москва, 143025, ул. Новая, д. 100, e-mail: office@inat.ru

² — ФГБНУ Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Россия, Москва, 125315, ул. Балтийская, д. 8, e-mail: office@inat.ru niopp@mail.ru.

Изучалось взаимодействие нагруженных холестерином макрофагов человека с белком переноса фосфолипидов (PLTP). PLTP не стимулировал отток липидов (фосфолипидов и холестерина) в присутствии альбумина, очищенного аполипопротеина А-1 и фосфолипидных везикул. PLTP восстанавливал отток липидов при мягкой трипсинизации липопротеидов высокой плотности (ЛВП), предположительно, за счет генерации активных аполипопротеинов. Стимулированный PLTP отток липидов отсутствовал в макрофагах, взятых у больных болезнью Танжера, при индукции оттока нагрузкой макрофагов холестерином и ингибировании брэфелдином А, что указывает на селективность эффекта для аполипопротеин-опосредованного пути оттока липидов. Эффект PLTP, стимулирующий отток липидов, не связан с генерацией пре- β -частиц ЛВП в растворе, но нуждается во взаимодействии с макрофагами. Это взаимодействие увеличивает отток холестерина, осуществляемый минорными частицами ЛВП со значениями электрофоретической подвижности между характерными для α -ЛВП и пре- β -ЛВП. Полученные результаты свидетельствуют о том, что PLTP способствует связыванию ЛВП с клеточной поверхностью и ремоделированию ЛВП с тем, чтобы повысить возможности частиц ЛВП вызывать отток холестерина и фосфолипидов по аполипопротеин-опосредованному пути.

Ключевые слова: аполипопротеины; атеросклероз; белок переноса фосфолипидов; липопротеиды высокой плотности; отток холестерина; отток фосфолипидов

Введение

Отток холестерина из макрофагов является главным механизмом антиатерогенного действия липопротеидов высокой плотности (ЛВП). Известно несколько путей оттока холестерина из макрофагов: отток к липид-обедненным пре- β 1-ЛВП или свободному (безлипидному) апоА-1, опосредованный мембранным транспортером ABCA1; отток к α -ЛВП, опосредованный мембранным транспортером ABCG1; отток к α -ЛВП другими путями, включая скевенджер-рецептор класса В1 и пассивную диффузию [1—3]. Фосфолипиды ЛВП забирают холестерин, который десорбируется с плазматической мембраны; это пассивный процесс, облегчаемый связыванием ЛВП со скевенджер-рецептором В1 [4, 5].

Аполипопротеины ЛВП удаляют как холестерин, так и фосфолипиды из клеток активным, Гольджи-зависимым путем, индуцированным нагрузкой клеток холестерином [6–8]. Этот процесс нарушается в клетках пациентов с болезнью Танжера [9—11], что приводит к дефициту ЛВП, накоплению стеринов в тканевых макрофагах и увеличению тяжести сердечно-сосудистых заболеваний [12, 13].

Аполипопротеин-опосредованный путь удаления холестерина специфичен для аполипопротеинов, которые содержат мало липидов или вообще их не содержат [1, 2]. Такие аполипопротеины могут быть генерированы в естественных условиях путем синтеза и регенерированы путем диссоциации с поверхности зрелых частиц ЛВП [14]. Минорная фракция плазменного апоА-1 (основного аполипопротеина ЛВП) связана с очень малым количеством липидов [3, 15]. Таким образом, факторы, которые увеличивают регенерацию аполипопротеинов с низким содержанием липидов из зрелых частиц ЛВП, могут оказывать значительное воздействие на мобилизацию избыточного холестерина из тканей.

Таким фактором, в частности, может быть белок переноса фосфолипидов (PLTP). Плазменный PLTP переносит фосфолипиды липопротеидов между частицами ЛВП и опосредует преобразование ЛВП в более крупные и более мелкие частицы *in vitro* [16—21]. Это преобразование генерирует частицы с низким содержанием липидов, которые являются активным акцептором клеточного холестерина [19]. Аденовирус-опосредованная оверэкспрессия PLTP в печени мышей заметно снижает ЛВП в крови в связи с повышением удаления липидов ЛВП в печени [22, 23]. Однако экспрессия PLTP человека в тканях апоА-1 трансгенных мышей увеличивала плазменные уровни фосфолипидов и холестерина ЛВП [24], а снижение экспрессии генов PLTP у мышей дикого типа заметно снижало уровень ЛВП [25]. Хотя эти эффекты могут быть связаны с изменениями переноса липидов между липопротеидами, изменение оттока из ткани фосфолипидов и холестерина в ЛВП также может играть существенную роль. Такая возможность была подтверждена исследованием, показавшим, что активность PLTP была существенным положительным предиктором способности плазмы крови человека осуществлять отток холестерина из культивируемых клеток [26]. Одним из механизмов, объясняющим такое повышение оттока липидов, является то, что апоА-1 с низким содержанием липидов, генерируемый из ЛВП плазмы под воздействием PLTP, мобилизует отток липидов из клеток.

Другие данные свидетельствуют о том, что локально продуцируемый PLTP может модулировать липидный обмен в периферических тканях. PLTP экспрессируется повсеместно во всех тканях человека и мыши; в легких и органах стероидогенеза имеет место самая высокая экспрессия [27, 28]. PLTP существенно экспрессируется в эпителиальных клетках альвеолярного типа II и индуцируется

гипоксией и эмфиземой [29], что позволяет предположить, что этот белок играет важную роль в поверхностном переносе липидов. Экспрессия PLTP человека в периферических тканях трансгенных мышей может изменять метаболизм липопротеидов [24, 30, 31] даже если экспрессия в печени и трансферная активность в плазме не изменяются, что означает, что PLTP периферических тканей оказывает серьезное влияние на метаболизм липопротеидов.

В настоящей работе мы использовали культивируемые макрофаги человека для изучения возможности того, что PLTP непосредственно взаимодействует с периферическими клетками и способствует удалению некоторых клеточных липидов.

Материалы и методы

2.1. ЛВП, апо А-I и фосфолипидные везикулы

Фракция частиц ЛВП с плотностью 1,125–1,21 г/мл (далее обозначаемая как ЛВП) была получена стандартным последовательным ультрацентрифугированием пулированной свежей плазмы крови человека. Аро В и аро Е были удалены колоночной хроматографией на гепарин-агарозе [32]. Апо А-I был извлечен из ЛВП как описано ранее [33]. ЛВП и аро А-I йодировали с использованием монохлорида йода по Vilheimer и др. [34]. Трипсинолизированные ЛВП (трЛВП) были получены обработкой ЛВП трипсином в течение 15 мин при 37°C при соотношении ЛВП : трипсин 40:1, а затем обработанные частицы были выделены с помощью колоночной хроматографии. Как описано детально в другой работе [35], эта процедура разрушает примерно 20% от общего белка ЛВП, не нарушая липидного состава фракции. Почти все оставшиеся после обработки белки, связанные с трЛВП частицами, были интактными аполипопротеинами [35]. Фосфолипидные везикулы были получены ультразвуковой обработкой фосфатидилхолина как описано ранее [36].

2.2. Рекombинантный PLTP

Рекombинантный PLTP выделяли хроматографией на колонке смолы Ni-NTA из безсывороточной кондиционированной культуральной среды, собранной при культивировании ВНК-570 клеток, которые были трансфицированы PLTP человека His тегом кДНК с использованием метотрексата как селективирующего агента [17]. Выделенная фракция PLTP была исследована на активность по переносу фосфолипидов в 1:100 разбавленных 10 мкл-аликвотах [36], а на чистоту — с помощью SDS полиакриламидного гель-электрофореза (PAGE) по Laemmli [37].

2.3. Клеточные культуры

Макрофаги человека от нормолипидемических доноров и пациента с болезнью Танжера [10] были выращены в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ростовая среда) и посажены для изучения оттока липидов и экспериментов с определением количества холестерина в 16 мм и 35 мм ячейки, соответственно. Для экспериментов с оттоком холестерина клетки метили путем добавления 0,5 мкCi/мл [³H]холестерина к ростовой среде в течение примерно 72 часов как описано ранее

[10]. Клетки затем были нагружены в течение 48 ч немеченым холестерином в концентрации 30 мкг/мл в DMEM, содержащей 2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА). Для измерения оттока холестерина из клеток, не нагруженных холестерином, немеченый холестерин не добавлялся в среду без сыворотки. Для измерения оттока холестерина из обедненных холестерином клеток макрофаги инкубировали в течение 48 ч с 10% липопротеид-дефицитной сывороткой, содержащей [³H]холестерин. Чтобы уравнивать метку в клеточных пулах, перед каждым экспериментом клетки инкубировали еще 18–24 ч в DMEM с 1 мг/мл БСА. Для экспериментов с оттоком фосфолипидов к этой уравновешенной среде были добавлены 20 мкCi/мл [³H]холина хлорида, чтобы радиоактивно пометить клеточные фосфолипиды [10]. Кроме того, в некоторых экспериментах клетки предварительно инкубировали с PLTP, добавленным к уравновешенной среде. После удаления уравновешенной среды клетки промывали трижды PBS-БСА перед инкубацией для измерения оттока.

2.4. Отток холестерина и фосфолипидов

Эффект PLTP на липидный отток из макрофагов человека оценивали по методу, описанному ранее [10, 38]. Вкратце, радиоактивно меченные и нагруженные холестерином клетки инкубировали при 37°C с различными средами для оттока за указанные периоды времени и среду забирали и центрифугировали для удаления клеточного мусора. Для клеток, меченых [³H]холестерином, отток холестерина измеряли путем оценки радиоактивности среды. Для экспериментов с клетками, содержащими меченые фосфолипиды, среду экстрагировали методом Folch [39] и липиды разделяли тонкослойной хроматографией (ТСХ) с использованием силикагелевых пластин, разогнанных в гексане, диэтиловом эфире и уксусной кислоте (120:40:1,5, об./об./об.). Радиоактивность холестерина, эфиров холестерина и общего пятна фосфолипидов были оценены на жидкостном сцинтилляционном счетчике. Промытый слой клеток был экстрагирован смесью гексан : изопропанол (3:2 по об./об.) [32], и липидные экстракты подвергали ТСХ для количественного определения радиоактивности и массы липидов.

2.5. Этерификация холестерина и определение массы эфиров

Для оценки скорости относительной этерификации холестерина клетки инкубировали в течение 1 ч с DMEM, содержащей 9 мкМ [¹⁴C]олеата, связанного с 3 мкМ БСА, включение из [¹⁴C]олеата в эфиры холестерина измерялось как описано [10, 35, 38]. Масса эфиров холестерина измерялась ферментативным методом как описано ранее [32].

2.6. Связывание ЛВП и апо-А-I с клетками

Для измерения прямых эффектов PLTP на связывание ЛВП клетки инкубировали в течение 6 ч при 37°C с 125I-ЛВП с PLTP или без него, и клеточная радиоактивность измерялась после промывки клеток два раза ледяным PBS-БСА и два раза PBS, затем клетки растворялись в NaOH. В некоторых случаях промытые макрофаги (распухшие в 60 мм чашках) собирали путем соскабливания в ледяной буфер, содержащий ингибиторы протеаз. После низкоскоростного центрифугирования клетки растворяли

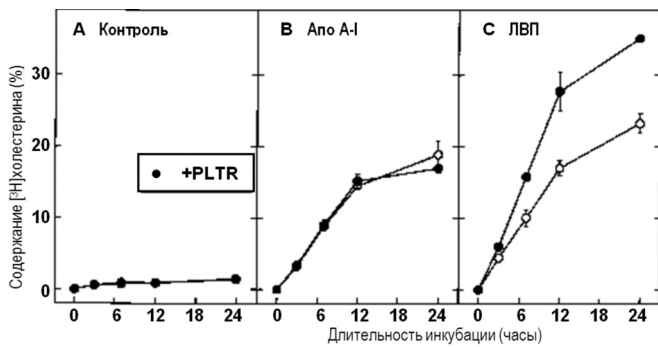


Рис. 1. (А, В, С) — временная зависимость эффектов PLTP на отток холестерина из нагруженных холестерином макрофагов.
 1. Макрофаги, меченые в течение 72 ч $[^3\text{H}]$ холестерином и нагруженные в течение 48 ч 30 мкг/мл холестерином, с последующим уравновешиванием в течение 24 ч, инкубировали с 2 мкг/мл PLTP, добавленным к среде, содержащей либо 1 мкг/мл БСА (А), либо БСА плюс 10 мкг/мл апо-А-1 (В) или БСА плюс 50 мкг/мл ЛВП. В указанной временной точке собирали среду, центрифугировали и определяли ^3H радиоактивность; клеточные липиды экстрагировали и разделяли тонкослойной хроматографией, чтобы определить количественно радиоактивность свободного и этерифицированного холестерина.
 2. Отток холестерина была рассчитан как появление $[^3\text{H}]$ холестерина в среде в процентах от общего (клетки + среда) $[^3\text{H}]$ холестерина.
 3. Каждое значение представляет среднее \pm S.D. для трех лунок.

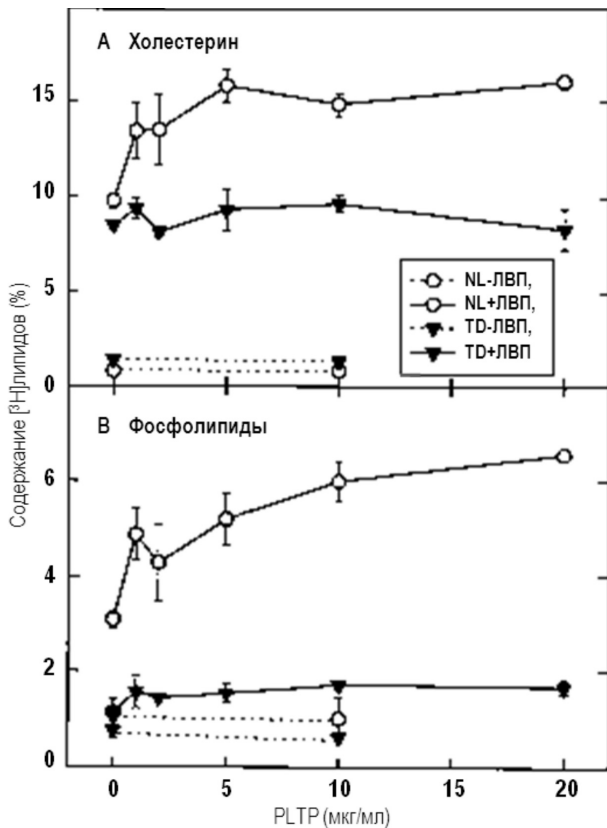


Рис. 2. (А, В) — эффект PLTP на отток холестерина (А) и фосфолипидов (В) из нормальных макрофагов (NL) и макрофагов больного болезнью Танжера (TD).
 1. Меченые $[^3\text{H}]$ холестерином и нагруженные холестерином клетки инкубировали с $[^3\text{H}]$ холином в течение 24 ч, чтобы пометить клеточные фосфолипиды, затем инкубировали в течение 6 ч со средой, содержащей БСА (без ЛВП) или БСА плюс 50 мкг/мл ЛВП (+ЛВП), а также указанные концентрации PLTP. Среда и клеточные липиды были выделены с помощью тонкослойной хроматографии и подвергнуты сцинтилляционному счету.
 2. Отток холестерина и фосфолипидов выражали в процентах от общей радиоактивности для каждого липида (среда + клетки).
 3. Каждое значение представляет среднее \pm S.D. для трех лунок.

в SDS-PAGE буфере и аликвоты анализировали на содержание белка [40]. Равные количества белка из солилизованных клеток были разделены на 15% SDS-PAGE, и клеточно-связанные йодированные аполипопротеины были идентифицированы автордиографией. В экспериментах с предварительной инкубацией с PLTP макрофаги инкубировали с PLTP или без него, промывали и инкубировали 1 час при 37°C с 5 мкг/мл 125I-ЛВП с 200 мкг/мл немеченых ЛВП или с 1 мкг/мл 125I-апо-А-1 с 100 мкг/мл немеченых апо-А-1. Белок из каждой лунки был разделен на аликвоты для определения количества белка и для гамма-счета. Высокоаффинное связывание ЛВП или апо-А-1 представляло разницу между величинами связанной с клетками радиоактивности в присутствии и отсутствии избыточных немеченых ЛВП или апо А-1.

2.7. Распределение Apo-I и $[^3\text{H}]$ холестерина среди ЛВП-частиц

Чтобы оценить эффекты PLTP на распределение апо-А-1 среди ЛВП частиц среду, содержащую ЛВП или трЛВП с PLTP, инкубировали при 37°C в бесклеточных лунках; аликвоты среды подвергали электрофорезу в 0,5–0,7% агарозном геле (без альбумина) как описано [41], и белки переносили на нитроцеллюлозу и исследовали с козьей антисывороткой к апо-А-1 (разведение 1:5000). Взаимодействующие с антителами полосы были визуализированы хемилюминесценцией (ECL, Amersham). Для оценки эффектов PLTP на распределение клеточного холестерина среди ЛВП-частиц холестерин-нагруженные макрофаги были предварительно мечены 50 мкCi/мл $[^3\text{H}]$ холестерин, среда, содержащая ЛВП и трЛВП, подвергалась агарозному геле-электрофорезу и распределение $[^3\text{H}]$ холестерина между частицами ЛВП измерялось на высушенных гелях фосфор-изображением с использованием Packard Cyclone Phosphor system.

Результаты

Чтобы изучить возможность того, что PLTP повышает отток холестерина из клеток, мы оценили эффекты рекомбинантного PLTP на отток холестерина из нагруженных холестерином макрофагов в присутствии различных акцепторов липидов. При инкубации клеток в среде, содержащей один альбумин (рис. 1А), очень мало меченого холестерина освобождалось из клеток за 24 ч инкубации, и добавление 2 мкг/мл PLTP не влияло на отток холестерина. Очищенный апо-А-1 стимулировал отток холестерина из клеток зависимо от времени с насыщением после 12 ч; добавление PLTP не влияло на эффект (рис. 1В). ЛВП также стимулировали отток холестерина из клеток, но в этом случае добавление PLTP увеличивало отток холестерина во всех временных точках измерения (рис. 1С). Эти результаты показывают, что PLTP повышает способность частиц ЛВП, но не очищенного от липидов апо-А-1, обеспечивать отток холестерина из клеток.

Фосфолипиды ЛВП и аполипопротеины удаляют клеточные липиды различными способами, те и другие вносят вклад в ЛВП-опосредованный отток холестерина [1]. Аполипопротеин-опосредованная компонента липидного оттока неактивна в макрофагах больных болезнью Танжера (БТ), тогда как фосфолипид-опосредованный отток холестерина проходит нормально [8, 10, 11]. Кроме того, удаление клеточных фосфолипидов ЛВП частицами опо-

средовано в основном аполипопротеинами ЛВП [8, 11]. Чтобы определить, какой из этих процессов оттока липидов усиливается под влиянием PLTP, мы сравнили эффекты PLTP на отток холестерина и фосфолипидов из нормальных макрофагов и макрофагов больного болезнью Танжера (БТ).

Инкубация с одним PLTP в течение 6 ч не влияла на отток как [³H]холестерина, так и [³H]фосфолипидов из нагруженных холестерином нормальных и БТ макрофагов (рис. 2, А, Б). Добавление ЛВП в среду увеличивало отток холестерина и фосфолипидов из нормальных клеток, но имело меньшее влияние на отток холестерина (рис. 2А) и почти не влияло на отток фосфолипидов из БТ-макрофагов (рис. 2Б), в соответствии с отсутствием аполипопротеин-опосредованной компоненты липидного оттока в БТ-клетках. Добавление PLTP в среду с ЛВП вызывало зависимое от дозы насыщающее увеличение оттока как холестерина, так и фосфолипидов из нормальных клеток, но не имело значимого влияния на отток этих липидов из БТ-клеток. Эти результаты показывают, что PLTP увеличивает отток холестерина и фосфолипидов, вызванный аполипопротеинами ЛВП, но не фосфолипидами ЛВП.

Один из возможных механизмов, объясняющих эти данные, заключается в том, что PLTP изменяет частицу ЛВП таким образом, чтобы сделать более доступными для удаления клеточных липидов большее количество аполипопротеинов. Предыдущие исследования показали, что краткосрочная (15 мин) обработка ЛВП трипсином почти полностью блокирует аполипопротеиновую компоненту ЛВП-опосредованного оттока холестерина [8, 10, 35, 42]. Хотя более 80% аполипопротеинов ЛВП остаются интактными после такой мягкой обработки трипсином, они, по-видимому, не способны удалять клеточные липиды [35].

Мы проверили, способен ли PLTP восстановить активность трЛВП, возможно, путем большей доступности аполипопротеинов для взаимодействия с клетками. Добавление PLTP к среде, содержащей возрастающие концентрации ЛВП, увеличивало отток как холестерина, так и фосфолипидов, с наибольшим увеличением при низких концентрациях ЛВП (рис. 3). Трипсинизированные ЛВП были менее эффективными, чем нативные ЛВП, в осуществлении оттока холестерина и фосфолипидов при равных концентрациях. PLTP увеличивал способность трЛВП осуществлять отток холестерина и фосфолипидов до уровня, сопоставимого с наблюдаемым для ЛВП. На БТ-макрофагах, однако PLTP не имел значимого эффекта на трЛВП-опосредованный отток холестерина и фосфолипидов. Эти результаты согласуются с концепцией, согласно которой PLTP восстанавливает способность трЛВП осуществлять отток липидов по аполипопротеин-опосредованному пути.

Обработка трипсином ЛВП практически лишает частицы способности освобождать клетки от избыточного холестерина, подвергаемого этерификации ацил-КоА-холестеринацилтрансферазой (АКАТ) [8, 35, 42]. Мы проверили, может ли PLTP восстановить эту активность у трЛВП. В условиях, когда ЛВП ингибируют этерификацию холестерина на 60–70%, трЛВП обладали лишь небольшим ингибирующим эффектом (рис. 4), видимо, потому, что приток и отток холестерина были сбалансированы. Добавление увеличивающихся концентраций PLTP

в среду с трЛВП заметно снижало этерификацию холестерина в зависимости от дозы насыщающим образом, что параллельно увеличивало отток холестерина. Таким образом, PLTP восстанавливал способность трЛВП освобождать клетки от доступного для АКАТ холестерина. Интересно, что добавление одного только PLTP также имело небольшой низкоаффинный эффект на этерификацию холестерина, несмотря на отсутствие эффекта на отток холестерина, из чего можно предположить, что взаимодействие одного PLTP с клетками в некоторой степени изменяет распределение холестерина.

Мы сравнили эффекты PLTP на способность очищенного от липидов апо-А-I, фосфолипидных везикул и трЛВП осуществлять отток холестерина и фосфолипидов и освобождать клетки от эфиров холестерина. Все эти акцепторы липидов стимулировали отток [³H]холестерина и [³H]фосфолипидов из нормальных макрофагов (табл. 1). Хотя PLTP заметно стимулировал опосредованный трЛВП отток, он не обладал эффектом или имел небольшой ингибирующий эффект при добавлении в среду, не содержащую акцепторы апо-А-I или фосфолипидные везикулы. После 24 ч инкубации как апо-А-I, так и фосфолипидные везикулы значительно освобождали клетки от эфиров холестерина, в то время как трЛВП не обладали таким эффектом (табл. 1). Как и в случае этерификации холесте-

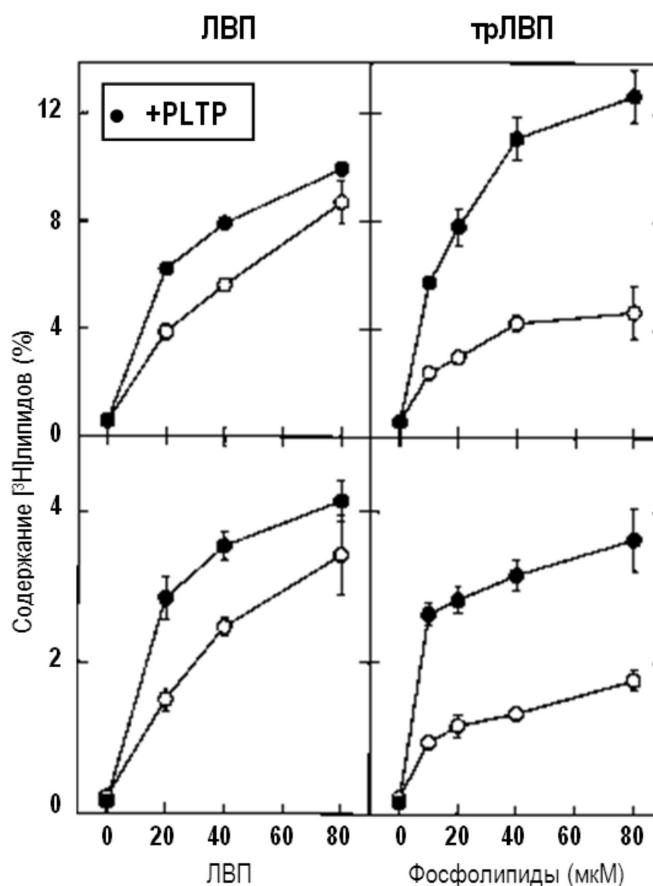


Рис. 3. Стимулирующее действие PLTP на отток клеточного холестерина и фосфолипидов, опосредованный ЛВП и трЛВП.

1. Макрофаги были мечены [³H]холестерином и [³H]холином и нагружены холестерином как описано для рис. 2. Затем клетки инкубировали в течение 6 ч с указанной концентрацией ЛВП и трЛВП с PLTP (10 мкг/мл). Измерялся отток [³H]холестерина (верхние рисунки) и [³H]фосфолипидов (нижние рисунки).

2. Каждое значение представляет среднее ± S.D. для трех лунок.

Влияние PLTP на отток клеточных липидов и содержание эфиров холестерина в присутствии различных акцепторов липидов

Акцептор	Отток холестерина (% от общего [³ H]холестерина)		Отток фосфолипидов (% от общих [³ H]фосфолипидов)		Содержание эфиров холестерина (мкг/мг клеточного белка)	
	Контроль	+ PLTP	Контроль	+ PLTP	Контроль	+PLTP
—	0,53 ± 0,06	0,47 ± 0,04	1,00 ± 0,13	1,04 ± 0,10	14,7 ± 0,9	12,8 ± 0,3*
Апо-А-I	3,42 ± 0,16	3,28 ± 0,06	4,83 ± 0,17	4,00 ± 0,05*	6,6 ± 0,5	6,5 ± 0,6
ФЛВ	2,43 ± 0,09	2,75 ± 0,03	1,94 ± 0,15	1,95 ± 0,08	10,7 ± 0,6	10,6 ± 0,7
трЛВП	4,03 ± ,31	9,31 ± 0,08*	2,20 ± 0,14	6,27 ± 0,26*	14,5 ± 1,5	8,2 ± 1,4*

Примечания.

1. Для оценки оттока липидов нагруженные холестерином и радиоактивно меченые нормальные макрофаги инкубировали в течение 6 ч без (контроль) или с 10 мкг/мл PLTP как описано для рис. 2.
2. Для оценки количества эфиров холестерина нагруженные холестерином макрофаги инкубировали в течение 24 ч с 5 мкг/мл PLTP; содержание клеточных эфиров холестерина было измерено (в виде эквивалента свободного холестерина) как описано в разделе «Материалы и методы».
3. Инкубационная среда содержала либо только БСА (—) или БСА плюс апо-А-I (5 мкг/мл), фосфатидилхолиновые везикулы (ФЛВ, 40 мкМ) или трЛВП (40 мкМ фосфолипидов).
4. Каждое значение является средним ± S.D. трех (отток) или четырех (количество) повторов.
5. Значимый эффект PLTP (P<0,05) отмечен звездочками.

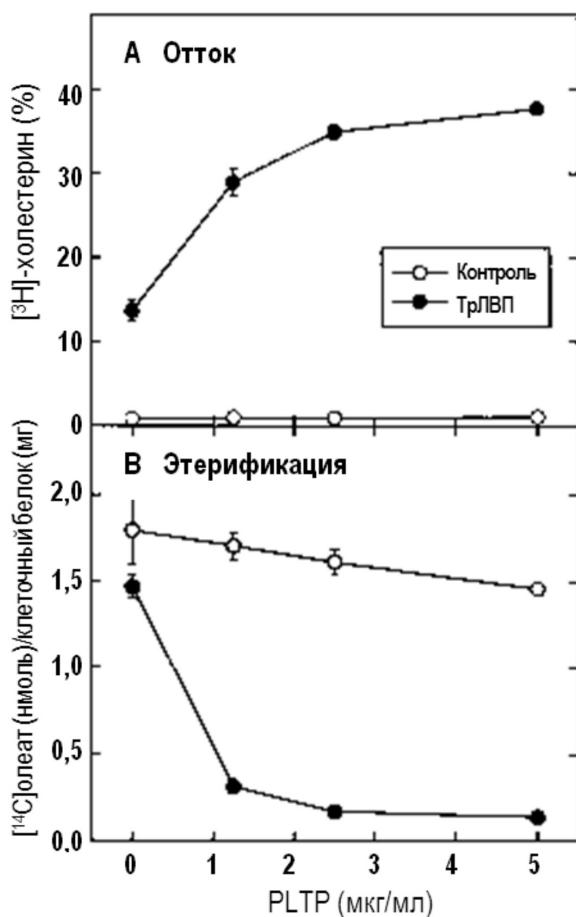


Рис. 4. (А, В) — действие PLTP на трЛВП-опосредованное уменьшение клеточного холестерина, доступного для этерификации.

1. Нагруженные холестерином и меченые [³H]-холестерином макрофаги инкубировали с БСА (контроль) или с БСА плюс трЛВП (40 мкМ фосфолипидов) и указанными концентрациями PLTP. После 24 часов среда была собрана для измерения оттока [³H]холестерина (А), и клетки импульсно-инкубировали 1 ч со средой, содержащей [¹⁴C]олеат для измерения включения олеата в клеточные эфиры холестерина (В) как описано в разделе «Материалы и методы».
2. Каждое значение представляет собой среднее ± S.D. трех повторов трех отдельных экспериментов.

на, добавление только одного PLTP вызывало небольшое, но значимое снижение содержания эфиров холестерина в клетках. PLTP не вызывал никакого дальнейшего снижения содержания эфиров холестерина при добавлении в среду, содержащую либо апо-А-I, либо фосфолипидные везикулы, но снижал содержание эфиров холестерина на 45% в присутствии трЛВП. Таким образом, PLTP не стимулировал отток липидов или удаление холестерина, опосредованное либо очищенным от липидов апо-А-I, либо безбелковыми фосфолипидами, что предполагает наличие обоих компонентов в акцепторных частицах.

Мы проверили, являются ли сыворотка и нагрузка макрофагов холестерином, которые индуцируют аполин-протеин-опосредованный путь удаления холестерина [8, 42], необходимыми для стимулирующего эффекта PLTP на этот процесс. Когда макрофаги предварительно инкубировали с липопротеид-дефицитной сывороткой, чтобы вызвать отток холестерина, PLTP не способствовал повышению трЛВП-опосредованного оттока холестерина (табл. 2). Когда липопротеид-дефицитная сыворотка обогащалась холестерином, PLTP имел умеренный стимулирующий эффект на отток холестерина. Прединкубация клеток в течение нескольких дней с безсывороточной средой приводила к небольшому росту способности PLTP стимулировать трЛВП-опосредованный отток холестерина, и этот эффект еще более увеличивался при добавлении холестерина. Таким образом, способность у PLTP повышать трЛВП-опосредованный отток холестерина наблюдалась в отсутствие сыворотки и при нагрузке клеток холестерином, что предоставляет дополнительные доказательства того, что этот эффект реализуется через аполин-протеин-опосредованный путь удаления липидов.

Для получения дополнительного подтверждения селективного эффекта PLTP мы изучали способность брэфелдина А ингибировать отток холестерина и фосфолипидов, стимулированный PLTP. Показано, что этот агент, разрушающий аппарат Гольджи, препятствует аполин-протеин-опосредованному пути удаления липидов без воздействия на отток холестерина, которому способствуют фосфолипиды [6, 7, 11]. Инкубация нагруженных холестерином макрофагов с брэфелдином А частично ингиби-

**Влияние прединкубации на стимулирующее действие PLTP
на трЛВП-опосредованный отток холестерина из макрофагов**

Преинкубация	PLTP	Отток [³ H]холестерина (% от общего)	% увеличения	Значение P
Липопротеид-дефицитная сыворотка	—	4,83 ± 0,38	8	0,21
	+	5,19 ± 0,44		
Липопротеид-дефицитная сыворотка + холестерин	—	4,81 ± 0,39	26	0,008
	+	6,07 ± 0,71		
Бессывороточная среда	—	3,58 ± 0,25	22	0,013
	+	4,37 ± 0,37		
Бессывороточная среда + холестерин	—	4,46 ± 0,33	62	0,0005
	+	7,24 ± 0,78		

Примечания.

- Макрофаги были мечены [³H]холестерином, как описано в разделе «Материалы и методы».
- Клетки инкубировали в течение 48 ч с 10% липопротеид-дефицитной сывороткой с холестерином (30 мкг/мл) или без него или в бессывороточной среде, содержащей 1 мг/мл БСА с добавлением или без добавления 30 мкг/мл холестерина. После уравнивания в течение ночи в среде без сыворотки клетки инкубировали 6 ч в бессывороточной среде с БСА, содержащей трHDL (40 мкМ фосфолипидов) с добавлением или без добавления PLTP (5 мкг/мл), затем измеряли отток [³H]холестерина.
- Каждое значение представлено средним ± S.D. 6 лунок в двух экспериментах.

Таблица 3

Эффект брефелдина А на индуцируемый PLTP отток липидов из нагруженных холестерином макрофагов

Брефелдин А	Отток холестерина (% от общих [³ H]липидов)			Отток фосфолипидов (% от общих [³ H]липидов)		
	трЛВП	трЛВП + PLTP	Индуцированный PLTP	трЛВП	трЛВП + PLTP	Индуцированный PLTP
—	5,83 ± 0,48	12,98 ± 0,37	7,15 ± 0,37	1,30 ± 0,68	4,13 ± 0,27	2,83 ± 0,27
+	5,00 ± 0,22	8,02 ± 0,35	3,02 ± 0,35 (-58%)	0,48 ± 0,09	1,56 ± 0,27	1,08 ± 0,27 (-62%)

Примечания.

- Нагруженные холестерином макрофаги были мечены [³H]холестерином и [³H]холином, как описано к рис. 2.
- За 1 ч до инкубации для изучения оттока клетки инкубировали с DMEM / BSA, содержащей растворитель (этанол, 0,1%) или растворитель плюс 4 мкМ брефелдина А. Затем клетки инкубировали в течение 6 ч с DMEM / BSA / этанолом, содержащей трЛВП (40 мкМ фосфолипидов) с добавлением или без добавления PLTP (10 мкг/мл) или брефелдина А, затем измерялся отток [³H]холестерина и [³H]фосфолипидов.
- Каждое значение является средним ± S.D. трех лунок, представляющих два эксперимента, имеющие аналогичные результаты.
- Для PLTP-индуцированных значений среднее значение для трЛВП был вычтен из значения для трЛВП + PLTP.
- Числа в скобках указывают процент снижения PLTP-индуцированного оттока липидов в присутствии брефелдина А.

рвала отток [³H]холестерина и [³H]фосфолипидов как в присутствии, так и в отсутствие PLTP (табл. 3). Однако инкубация с брефелдином А ингибирует приблизительно на 60% PLTP-индуцированный отток холестерина и фосфолипидов. Брефелдин А не имел значимого эффекта на трЛВП-опосредованный отток липидов из БТ-макрофагов в присутствии PLTP или без него, что свидетельствует о том, что фосфолипид-опосредованная компонента липидного оттока не затрагивается этим агентом. Таким образом, по-видимому, PLTP повышает отток липидов по пути, который, по крайней мере, частично зависит от функционирования аппарата Гольджи.

Поскольку PLTP ремоделирует частицы ЛВП и при этом процессе генерируются обедненные липидами аполипротеины [16-21], мы провели эксперименты, чтобы определить, является ли ремоделирование ЛВП в растворе ответственным за увеличение оттока липидов. При инкубации в течение 2 ч при 37°C в отсутствие клеток добавление PLTP к среде, содержащей ЛВП, имело небольшой

эффект на распределение апо-А-I между α- и преβ-частицами, изолированными с помощью агарозного гель-электрофореза. Когда инкубация без клеток была продлена до 6 ч или дольше, PLTP заметно увеличивал генерацию преβ-апо-А-I. Мы инкубировали ЛВП с PLTP в отсутствие клеток до 12 ч при 37°C, а затем добавили эту среду к клеткам и измеряли отток холестерина в течение 2 ч инкубации. Предварительная обработка ЛВП взаимодействием PLTP не имела большего стимулирующего действия на последующий отток холестерина, чем когда PLTP был добавлен только в течение 2 ч инкубации, несмотря на генерацию существенно большего количества преβ-апо-А-I.

Кроме того, предварительная обработка ЛВП взаимодействием с PLTP при 0°C в условиях, когда перенос белка был неактивным, дала те же результаты, что и при предварительной обработке при 37°C. Мы также обнаружили, что предварительная обработка трЛВП взаимодействием с PLTP до 6 ч в отсутствие клеток не имеет никакого дальнейшего стимулирующего действия на отток хо-

лестерина. Эти результаты позволяют предположить, что незначительного ремоделирования ЛВП при воздействии PLTP достаточно для получения максимального увеличения оттока холестерина, либо, что для стимулирующего действия PLTP необходимо наличие клеток.

Для дальнейшего изучения возможности того, что PLTP увеличивает отток холестерина путем генерации в растворе более подходящих акцепторов клеточного холестерина, мы измерили отток [³H]холестерина на обработанные PLTP и на контрольные ЛВП в течение 2 мин инкубации с нагруженными холестерином макрофагами. Такие краткосрочные инкубации могут выявлять обезлипенные аполипопротеины, которые являются предпочтительными иницирующими акцепторами клеточного холестерина [3, 19, 43, 44], а также имеют преимущество минимизации вклада фактора PLTP-клеточного взаимодействия. ЛВП частицы (50 мкг/мл), обработанные PLTP (10 мкг/мл) в течение 22 ч при 37°C (условия, которые генерируют значительное количество преβ-ЛВП), были не более эффективными, чем необработанные частицы ЛВП в осуществлении оттока холестерина в течение 2 мин инкубации с клетками (1469 ± 120 против 1487 ± 166 cpm [³H]холестерина на лунку, n = 4). Таким образом, в условиях эксперимента преβ-частицы ЛВП, генерируемые PLTP в растворе, не являются лучшим ини-

цирующим акцептором клеточного холестерина по сравнению с основной частью α-мигрирующих ЛВП-частиц. Эти результаты подразумевают причастность клеточного взаимодействия к стимулирующему эффекту PLTP на ЛВП-опосредованный отток холестерина.

Для получения прямого доказательства потребности клеток в эффектах PLTP мы предварительно инкубировали нормальные и БТ-макрофаги в течение 4 ч в среде, содержащей PLTP, и затем измеряли уровень оттока холестерина в течение последующих 2 ч инкубации в отсутствие PLTP. Предварительная инкубация клеток с PLTP не влияла значимо на последующий отток холестерина в отсутствие акцепторов или в присутствии апо-А-I (рис. 5). Однако в присутствии ЛВП или трЛВП предварительная инкубация клеток с PLTP значительно увеличивала отток холестерина из нормальных клеток, но не из БТ-клеток. Концентрационная зависимость для эффектов PLTP на ЛВП-опосредованный отток холестерина имела криволинейный характер с насыщающими участками связывания на клеточной поверхности. Эти результаты показывают, что стимулирующий эффект PLTP на ЛВП-опосредованный отток холестерина осуществляется в результате взаимодействия PLTP с местами связывания клеточной поверхности.

Еще одним доказательством участия клеточных взаимодействий в изучаемых эффектах стали результаты исследования, показавшего, что добавление PLTP непосредственно к среде, содержащей ¹²⁵I-ЛВП, заметно увеличивало связывание ЛВП с клетками. Это имело место как для нормальных, так и для БТ-макрофагов, что указывает на то, что увеличение связывания само по себе не отвечает за увеличение оттока холестерина. Электрофоретический анализ клеток с помощью SDS-PAGE показал, что PLTP увеличивает связывание с клетками апо-А-I и апо-А-II в равной степени, то есть PLTP содействует взаимодействию частиц ЛВП, содержащих оба указанных аполипопротеина, а не только фракцию, обогащенную апо-А-I. Предварительная инкубация клеток с PLTP также увеличивала последующее связывание ЛВП. Высокоаффинное связывание ¹²⁵I-ЛВП (при 5 мкг/мл) после 1 ч инкубации в отсутствие PLTP увеличивалось с 60 ± 3 до 104 ± 2 нг/мг белка (mean ± S.D., n = 3), когда PLTP был добавлен в среду во время 24 часов прединкубации. В отличие от предварительной инкубации клеток с PLTP, не было значимого эффекта на ¹²⁵I-апо-АI связывание с клетками. Эти данные свидетельствуют, что прямое взаимодействие PLTP с клетками способствует последующему связыванию ЛВП.

Наконец, мы рассмотрели, может ли ремоделирование ЛВП под воздействием PLTP в присутствии клеток объяснить увеличение оттока холестерина. Для этих исследований мы подвергали аликвоты среды электрофорезу в агарозном геле и измеряли распределение [³H]холестерина между частицами ЛВП. Когда PLTP был добавлен к среде, содержащей ЛВП, в течение 6 ч инкубации с клетками, наблюдалось некоторое увеличение [³H]холестерина, освобожденного из клеток, связанного с основными α-мигрирующими частицами ЛВП, но наибольшее относительное увеличение происходило в частицах, мигрирующих между α- и преβ-частицами (рис. 6, стрелка). Через 6 ч инкубации с одними только трЛВП большая часть [³H]холестерина, высвобождаемого из клеток, была свя-

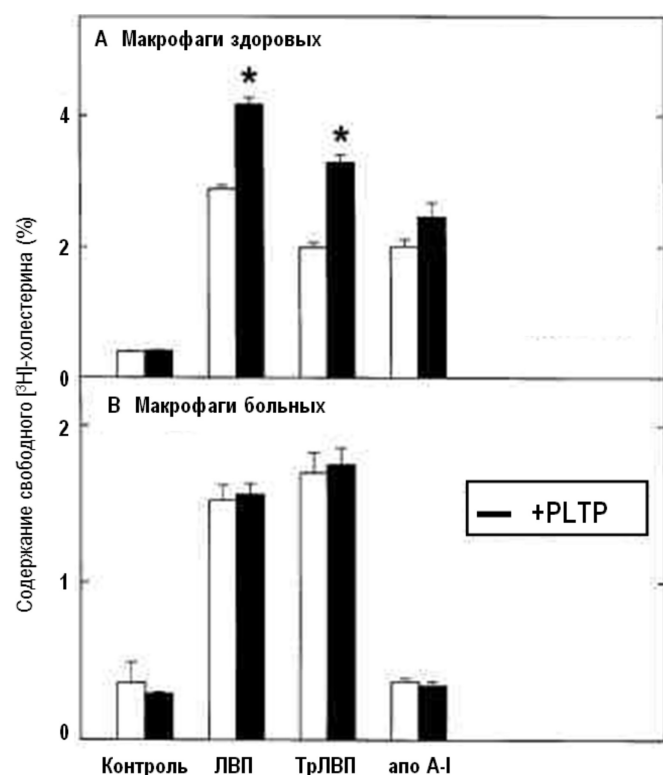


Рис. 5. (А, В) — влияние инкубации с PLTP нормальных (А) и БТ-макрофагов (В) на отток холестерина.

1. Меченые [³H]холестерином и нагруженные холестерином макрофаги инкубировали с БСА в среде, не содержащей PLTP (белые столбики) или содержащей 10 мкг/мл PLTP (черные столбики). Через 4 ч инкубации при 37°C среду удаляли и промытые клетки инкубировали в среде, содержащей БСА (контроль) или БСА плюс ЛВП (40 мкМ фосфолипидов), трЛВП (40 мкМ фосфолипидов) или апо-А-I (5 мкг/мл). Через 2 ч при 37°C был измерен отток [³H]холестерина.

2. Каждое значение представлено средним ± S.D. трех повторов.

3. Значимые эффекты (p < 0,002) PLTP в присутствии различных акцепторов указаны звездочками.

зана с полосой, которая мигрировала между α - и пре β -частицами (рис. 6А). Когда PLTP был добавлен в среду с трЛВП, появилась дополнительная полоса [^3H]-меченого холестерина, которая имела пре β -подвижность (стрелка). Мы также обнаружили, что предварительная инкубация клеток с PLTP увеличивала ассоциацию [^3H]холестерина с частицами ЛВП и трЛВП с более низким электроотрицательным зарядом в течение последующих 2 ч инкубации без PLTP (рис. 8В, стрелки), хотя изменения были более умеренные, чем те, которые наблюдались при инкубировании липопротеидов и PLTP одновременно. Эти результаты указывают на то, что холестерин, высвобождаемый из клеток в ответ на воздействие PLTP, селективно связывается с минорными частицами ЛВП, обладающими электроотрицательным зарядом более низким, чем у α -мигрирующих ЛВП.

Обсуждение

ЛВП содействуют оттоку холестерина из нагруженных холестерином клеток (макрофагов), используя различные механизмы [1, 2, 8]. В нашей работе приведены доказательства того, что PLTP избирательно усиливает аполипопротеиновую компоненту ЛВП-опосредованного оттока липидов. Рекombинантный PLTP увеличивает способность ЛВП осуществлять отток как холестерина, так и фосфолипидов из нагруженных холестерином макрофагов. При этом PLTP не влиял на ЛВП-опосредованный отток липидов из БТ-макрофагов, клеток с неактивным аполипопротеин-опосредованным оттоком липидов. Самым поразительным было стимулирующее действие PLTP в присутствии трЛВП, частиц, которые, как было показано, теряли большую часть своей аполипопротеин-опосредованной активности по удалению липидов [8, 10, 35, 42]. Мягкая трипсинизация затрагивает только 15–20% аполипопротеинов ЛВП, но именно они, по всей видимости, отвечают за активные пути удаления липидов, которые дефектны в БТ-клетках [8, 10]. Наши данные позволяют предположить, что PLTP восстанавливает способность трЛВП удалять клеточные липиды по этому пути.

Существует несколько других линий доказательств, поддерживающих предположение о том, что PLTP избирательно усиливает аполипопротеин-опосредованную компоненту оттока липидов. Во-первых, PLTP может восстановить способность трЛВП освобождать макрофаги от избыточного холестерина, способного этерифицироваться под воздействием ацил-коэнзим А-холестеринтрансферазы — процесса, который во многом зависит от активного аполипопротеин-опосредованного пути удаления липидов [7, 8, 10, 35, 38, 42]. Во-вторых, стимулирующее действие PLTP было вызвано удалением сыворотки и нагрузки макрофагов холестерином, то есть созданием условий, которые избирательно повышают скорость аполипопротеин-опосредованного оттока липидов [8, 42]. В-третьих, PLTP-стимулированный отток холестерина и фосфолипидов снижался при воздействии на клетки брэфелдина А, агента, который разрушает комплекс Гольджи и тем самым подавляет аполипопротеин-опосредованный отток липидов, но не влияет на отток холестерина, вызванный фосфолипидами [6, 7, 11]. Взятые вместе, эти данные указывают на то, что PLTP увеличивает способ-

ность ЛВП удалять холестерин и фосфолипиды благодаря индуцированному холестерином, чувствительному к брэфелдину А процессу, который характерен для оттока липидов, стимулированного очищенными от липидов аполипопротеинами.

По-видимому, PLTP стимулирует аполипопротеиновую компоненту ЛВП-опосредованного оттока липидов путем создания более пригодного субстрата для этого процесса, а не путем непосредственно повышения активности клеточного пути. Аполипопротеин-опосредованный отток липидов специфичен для обмениваемых аполипопротеинов, которые содержат мало липидов или не содержат их вовсе [1–3, 8, 10, 11]. В экспериментах на культуре клеток обезлипиженный апо А-I может быть получен из ЛВП частиц благодаря диссоциации с поверхности частицы [1, 2, 35]. Мягкая трипсинизация этих частиц, вероятно, разрушает наиболее легко диссоциируемые пулы апо-А-I [35], осуществляя, таким образом, селективное ингибирование аполипопротеиновой компоненты ЛВП-опосредованного оттока липидов [8, 10, 35]. PLTP не стимулирует липидный отток в присутствии очищенного апо-А-I, что указывает на то, что он не эффективен, когда обезлипиженные аполипопротеины уже доступны. Таким образом, вполне вероятно, что PLTP улучшает способность ЛВП и трЛВП удалить клеточные липиды либо увеличением доли недиссоциируемых аполипопротеинов, либо непосредственно, генерируя обезлипиженные аполипопротеины.

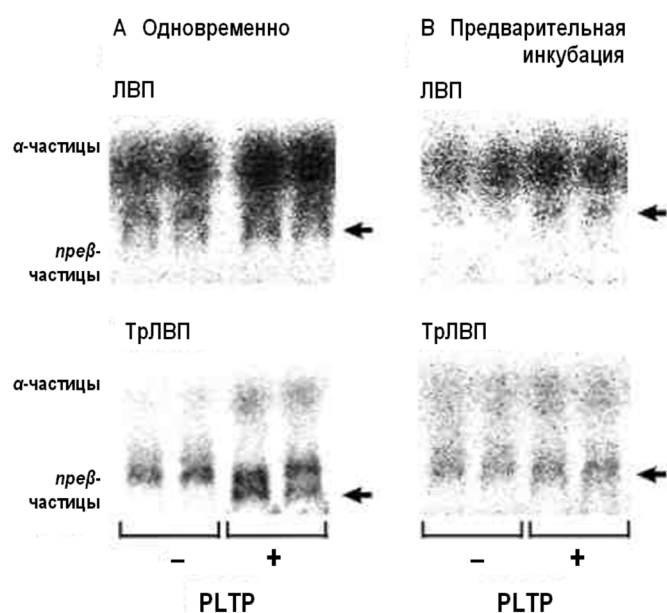


Рис. 6. (А, В) — влияние PLTP на распределение клеточного [^3H]холестерина между ЛВП-частицами.

1. Меченые [^3H]холестерином и нагруженные холестерином макрофаги инкубировали в течение 6 ч со средой, содержащей ЛВП (40 мкМ фосфолипидов) или трЛВП (40 мкМ фосфолипидов) минус или плюс 5 мкг/мл PLTP (А, одновременно) или предварительно инкубировали в течение 20 ч без или с PLTP, а затем инкубировали в течение 2 ч с ЛВП или трЛВП в отсутствие PLTP (В, предварительная обработка). Аликвоты среды из парных лунок подвергали электрофорезу в агарозном геле; распределение [^3H]холестерина выявлялось фосфор-изображением.

2. Положение α и пре β частиц было определено по окрашиванию белка параллельных полос, содержащих ЛВП и очищенный апо-А-I соответственно.

Сообщалось, что взаимодействие плазмы с PLTP приводит к образованию большего числа преβ1-апо-А-I, являющихся предпочтительных акцептором клеточного холестерина [3, 43, 44], а также увеличивает способность плазмы содействовать оттоку клеточного холестерина [19]. Мы обнаружили, однако, что взаимодействие ЛВП с PLTP до инкубации с клетками, которое производит больше преβ-ЛВП частиц, не улучшает способности ЛВП содействовать оттоку клеточного холестерина. Различие в условиях эксперимента может объяснить, почему наши данные находятся в противоречии с предыдущими исследованиями. В качестве источников преβ-ЛВП и клеточного холестерина мы использовали изолированные ЛВП и лишенные сыворотки нагруженные холестерином макрофаги, тогда как другие исследователи использовали цельную плазму и инкубировали макрофаги в присутствии сыворотки. В наших условиях частицы ЛВП, содержащие генерируемые PLTP преβ-апо-А-I, не были лучшим акцептором клеточного холестерина, чем ЛВП, которым не хватало преβ-апо-А-I. Таким образом, стимулирующий эффект PLTP на ЛВП-опосредованный отток холестерина не сопровождается генерацией преβ-апо-А-I частиц в растворе.

Одним из объяснений этих результатов может быть то, что для стимулирующего эффекта на ЛВП-опосредованный отток липидов необходимо взаимодействие PLTP с клетками. Это предположение подтверждается результатами, показывающими, что предварительная инкубация клеток с PLTP усиливает ЛВП-опосредованный отток холестерина при последующей инкубации в присутствии в отсутствие PLTP. Стимулирующий эффект PLTP демонстрирует аналогичную насыщенность независимо от того, инкубируются клетки последовательно или одновременно с PLTP и ЛВП. PLTP также увеличил связывание ЛВП с клетками, и этот эффект наблюдался при предварительной инкубации PLTP с клетками и последующей инкубацией с мечеными ЛВП. Таким образом, PLTP, взаимодействующий с клетками, а не с ЛВП частицами в растворе, оказался ответственным как за увеличение ЛВП-опосредованного оттока холестерина, так и за повышение связывания ЛВП.

Несколько возможных механизмов могут объяснить участие PLTP во взаимодействии с клетками, в стимулировании оттока холестерина и связывании с ЛВП. Во-первых, PLTP может нарушать липидные домены плазматической мембраны, чтобы повысить связывание ЛВП и сделать липиды более доступными для удаления частицами ЛВП. Мы установили, что длительная инкубация клеток с PLTP умеренно ингибирует этерификацию холестерина даже в том случае, когда она явно не способствовала оттоку холестерина, что позволяет предположить, что взаимодействие PLTP с плазматической мембраной вызывает определенное перераспределение клеточного холестерина. Этот механизм представляется маловероятным, однако, поскольку инкубация с PLTP не влияет на отток холестерина и фосфолипидов, стимулированный либо обезлипиженным апо-А-I, либо фосфолипидными везикулами, это является указанием на специфичность частиц ЛВП, содержащих как аполипопротеины, так и липиды. В качестве второго механизма может использоваться взаимодействие PLTP с клетками, которое способствует последующему связыванию частиц ЛВП с поверх-

ностью клетки и облегчает прямой перенос липидов плазматической мембраны на частицы ЛВП. Это взаимодействие, тем не менее, нуждается в специфичной активации аполипопротеиновой компоненты ЛВП-опосредованного оттока липидов, так как PLTP увеличивает связывание ЛВП с БТ-клетками, несмотря на отсутствие возможности для повышения оттока липидов.

Объяснение некоторых из полученных результатов заключается в том, что PLTP взаимодействует с клетками и способствует последующему связыванию ЛВП и ремоделированию на клеточной поверхности. Это ремоделирование может генерировать обедненные липидами аполипопротеины, которые имеют прямой доступ к сайтам связывания или к рецепторам, участвующим в оттоке клеточных липидов по пути активного транспорта. Поскольку этот путь неактивен в БТ-клетках, PLTP не в состоянии стимулировать отток липидов из этих клеток, несмотря на повышение связывания ЛВП и ремоделирование. Эта модель подтверждается результатами, демонстрирующими, что холестерин, выходящий из клеток в ответ на инкубацию с PLTP, избирательно ассоциируется с ЛВП частицами, имеющими электрофоретическую мобильность с величиной, промежуточной по отношению к α и преβ частицам. Эти частицы могут представлять собой обедненные липидами аполипопротеины, генерируемые из ЛВП, которые насытились клеточными липидами, как это было описано ранее [45]. Связывание с поверхностью клетки и ремоделирование ЛВП могло бы быть эффективным механизмом мобилизации избытка холестерина из клеток и регенерации насцентных частиц из зрелых ЛВП.

Расшифровка молекулярных механизмов обратного транспорта ХС из макрофагов будет, без сомнения, способствовать разработке новых лекарственных средств для борьбы с атеросклерозом. Наши данные позволяют считать, что белок-переносчик PLTP играет важную роль в транспортировке липидов из клеток, тормозя тем самым атерогенез.

Список литературы

1. Oram J.F., Yokoyama S. Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids // *J. Lipid. Res.* — 1996. — Vol. 37. — P. 2473—2491.
2. Yokoyama S. Apolipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1998. — Vol. 1392. — P. 1—15.
3. Fielding C.J., Fielding P.E. Molecular physiology of reverse cholesterol transport // *J. Lipid. Res.* — 1995. — Vol. 36. — P. 211—228.
4. Ji Y., Jian B., Wang N. et al. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux // *J. Biol. Chem.* — 1997. — Vol. 272. — P. 20982—20985.
5. Jian B., de la Llera-Moya M., Ji Y. et al. Scavenger receptor class B type I as a mediator of cellular cholesterol efflux to lipoproteins and phospholipid acceptors // *J. Biol. Chem.* — 1998. — Vol. 273. — P. 5599—5606.
6. Mendez A.J. Monensin and brefeldin A inhibit high density lipoprotein-mediated cholesterol efflux from cholesterol-enriched cells. Implications for intracellular cholesterol transport // *J. Biol. Chem.* — 1995. — Vol. 270. — P. 5891—5900.
7. Mendez A.J., Uint L. Apolipoprotein-mediated cellular cholesterol and phospholipid efflux depend on a functional Golgi apparatus // *J. Lipid. Res.* — 1996. — Vol. 37. — P. 2510—2524.
8. Mendez A.J. Cholesterol efflux mediated by apolipoproteins is an active cellular process distinct from efflux mediated by passive diffusion // *J. Lipid. Res.* — 1997. — Vol. 38. — P. 1807—1821.
9. Walter M., Gerdes U., Seedorf U., Assmann G. The high density lipoprotein- and apolipoprotein A-I-induced mobilization of cellular cholesterol is impaired in fibroblasts from Tangier disease subjects

// Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1994. — Vol. 205. — P. 850–856.

10. Francis G.A., Knopp R.H., Oram J.F. Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier Disease // *J. Clin. Invest.* — 1995. — Vol. 96. — P. 78–87.

11. Remaley A.T., Schumacher U.K., Stonik J.A. et al. Decreased reverse cholesterol transport from Tangier disease fibroblasts. Acceptor specificity and effect of brefeldin on lipid efflux // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 1997. — Vol. 17. — P. 1813–1821.

12. Assmann G.A., von Eckardstein A., Brewer H.B. // *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease* / C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds.). — New York: McGraw-Hill, 1995. — P. 2053–2072.

13. Serfaty-Lacrosniere C., Civeira F., Lanzberg A. et al. Homozygous Tangier disease and cardiovascular disease // *Atherosclerosis.* — 1994. — Vol. 107. — P. 85–98.

14. Clay M.A., Newnham H.H., Forte T.M., Barter P.I. Cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase activity promote shedding of apo A-I from HDL and subsequent formation of discoidal HDL // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1992. — Vol. 1124. — P. 52–58.

15. Asztalos B.F., Roheim P.S. Presence and formation of 'free apolipoprotein A-I-like' particles in human plasma // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 1995. — Vol. 15. — P. 1419–1423.

16. Tu A.Y., Nishida H.I., Nishida T. High density lipoprotein conversion mediated by human plasma phospholipid transfer protein // *J. Biol. Chem.* — 1993. — Vol. 268. — P. 23098–23105.

17. Albers J.J., Wolfbauer G., Cheung M.C. et al. Functional expression of human and mouse plasma phospholipid transfer protein: effect of recombinant and plasma PLTP on HDL subspecies // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1995. — Vol. 1258. — P. 27–34.

18. Lusa S., Jauhiainen M., Metso J. et al. The mechanism of human plasma phospholipid transfer protein-induced enlargement of high-density lipoprotein particles: evidence for particle fusion // *Biochem. J.* — 1996. — Vol. 313. — P. 275–282.

19. von Eckardstein A., Jauhiainen M., Huang Y. et al. Phospholipid transfer protein mediated conversion of high density lipoproteins generates pre beta 1-HDL // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1996. — Vol. 1301. — P. 255–262.

20. Pussinen P.J., Jauhiainen M., Ehnholm C. ApoA-II/apoA-I molar ratio in the HDL particle influences phospholipid transfer protein-mediated HDL interconversion // *J. Lipid. Res.* — 1997. — Vol. 38. — P. 12–21.

21. Marques-Vidal P., Jauhiainen M., Metso J., Ehnholm C. Transformation of high density lipoprotein 2 particles by hepatic lipase and phospholipid transfer protein // *Atherosclerosis.* — 1997. — Vol. 133. — P. 87–95.

22. Foger B., Santamarina-Fojo S., Shamburek R.D. et al. Plasma phospholipid transfer protein. Adenovirus-mediated overexpression in mice leads to decreased plasma high density lipoprotein (HDL) and enhanced hepatic uptake of phospholipids and cholesteryl esters from HDL // *J. Biol. Chem.* — 1997. — Vol. 272. — P. 27393–27400.

23. Ehnholm S., van Dijk K.W., van 't Hof B. et al. Adenovirus mediated overexpression of human phospholipid transfer protein alters plasma HDL levels in mice // *J. Lipid. Res.* — 1998. — Vol. 39. — P. 1248–1253.

24. Jiang X., Francone O.L., Bruce C. et al. Increased prebeta-high density lipoprotein, apolipoprotein AI, and phospholipid in mice expressing the human phospholipid transfer protein and human apolipoprotein AI transgenes // *J. Clin. Invest.* — 1996. — Vol. 98. — P. 2373–2380.

25. Jiang X.C., Bruce C., Mar J. et al. Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels // *J. Clin. Invest.* — 1999. — Vol. 103. — P. 907–914.

26. Syvanne M., Castro G., Dengremont C. et al. Cholesterol efflux from Fu5AH hepatoma cells induced by plasma of subjects with or without coronary artery disease and non-insulin-dependent diabetes: importance of LpA-I:A-II particles and phospholipid transfer protein // *Atherosclerosis.* — 1996. — Vol. 127. — P. 245–253.

27. Day J.R., Albers J.J., Lofton-Day C.E. et al. Complete cDNA encoding human phospholipid transfer protein from human endothelial cells // *J. Biol. Chem.* — 1994. — Vol. 269. — P. 9388–9391.

28. Jiang X.C., Bruce C. Regulation of murine plasma phospholipid transfer protein activity and mRNA levels by lipopolysaccharide and high cholesterol diet // *J. Biol. Chem.* — 1995. — Vol. 270. — P. 17133–17138.

29. Jiang X.C., D'Armiento J., Mallampalli R.K. et al. Expression of plasma phospholipid transfer protein mRNA in normal and emphysematous lungs and regulation by hypoxia // *J. Biol. Chem.* — 1998. — Vol. 273. — P. 15714–15718.

30. Albers J.J., Tu A.Y., Paigen B. et al. Transgenic mice expressing human phospholipid transfer protein have increased HDL/non-HDL cholesterol ratio // *Int. J. Clin. Lab. Res.* — 1996. — Vol. 26. — P. 262–267.

31. Tu A.Y., Paigen B., Wolfbauer G. et al. Introduction of the human PLTP transgene suppresses the atherogenic diet-induced increase in plasma phospholipid transfer activity in C57BL/6 mice // *Int. J. Clin. Lab. Res.* — 1999. — Vol. 29. — P. 14–21.

32. Oram J.F. Receptor-mediated transport of cholesterol between cultured cells and high-density lipoproteins // *Meth. Enzymol.* — 1986. — Vol. 129. — P. 645–659.

33. Mendez A.J., Oram J.F., Bierman E.L. Protein kinase C as a mediator of high density lipoprotein receptor-dependent efflux of intracellular cholesterol // *J. Biol. Chem.* — 1991. — Vol. 266. — P. 10104–10111.

34. Bilheimer D.W., Eisenberg S., Levy R.I. The metabolism of very low density lipoprotein proteins. I. Preliminary in vitro and in vivo observations // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1972. — Vol. 260. — P. 212–221.

35. Mendez A.J., Oram J.F. Limited proteolysis of high density lipoprotein abolishes its interaction with cell-surface binding sites that promote cholesterol efflux // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1997. — Vol. 1346. — P. 285–299.

36. Cheung M.C., Wolfbauer G., Albers J.J. Plasma phospholipid mass transfer rate: relationship to plasma phospholipid and cholesteryl ester transfer activities and lipid parameters // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1996. — Vol. 1303. — P. 103–110.

37. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* — 1970. — Vol. 227. — P. 680–685.

38. Mendez A.J., Anantharamaiah G.M., Segrest J.P., Oram J.F. Synthetic amphipathic helical peptides that mimic apolipoprotein A-I in clearing cellular cholesterol // *J. Clin. Invest.* — 1994. — Vol. 94. — P. 1698–1705.

39. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues // *J. Biol. Chem.* — 1957. — Vol. 226. — P. 497–509.

40. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265–275.

41. O'Kane M.J., Wisdom G.B., McEneny J. et al. Pre-beta high-density lipoprotein determined by immunoblotting with chemiluminescent detection // *Clin. Chem.* — 1992. — Vol. 38. — P. 2273–2277.

42. Oram J.F., Mendez A.J., Slotte J.P., Johnson T.F. High density lipoprotein apolipoproteins mediate removal of sterol from intracellular pools but not from plasma membranes of cholesterol-loaded fibroblasts // *Arterioscler. Thromb.* — 1991. — Vol. 11. — P. 403–414.

43. Castro G.R., Fielding C.J. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein // *Biochemistry.* — 1988. — Vol. 27. — P. 25–29.

44. von Eckardstein A., Huang Y., Wu S. et al. Reverse cholesterol transport in plasma of patients with different forms of familial HDL deficiency // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 1995. — Vol. 15. — P. 691–703.

45. Hara H., Yokoyama S. Interaction of free apolipoproteins with macrophages. Formation of high density lipoprotein-like lipoproteins and reduction of cellular cholesterol // *J. Biol. Chem.* — 1991. — Vol. 266. — P. 3080–3086.

Росынуна 14.03.2015

The mechanisms of cholesterol efflux from macrophages — the role of phospholipid transfer protein

Karagodin V.P.^{1,2}, Muhamedova M.N.¹, Orekhov A.N.^{1,2}

¹ — Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Center, Moscow, 143025, Novaya Str., 100, Russia

² — FSBSI Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya Str. 8, Moscow, 125315, Russia

We studied the interaction of cholesterol-loaded macrophages with human phospholipid transfer protein (PLTP). PLTP did not stimulate efflux of lipids (phospholipids and cholesterol) in the presence of albumin, purified apolipoprotein A-I and phospholipid vesicles. PLTP restored lipids efflux as a result of mild trypsinization of high density lipoproteins (HDL), presumably due to the generation of active apolipoproteins. Stimulated by PLTP lipids efflux was absent in macrophages obtained from Tangier disease patients (during efflux induction by macrophage cholesterol loading and inhibition by Brefeldin A), which indicates the selectivity of effect for the apolipoprotein-mediated lipid efflux. The effect of PLTP on the lipids flow stimulation was not associated with the generation of pre β HDL particles in the solution, but needed interaction with macrophages. This interaction increases cholesterol efflux carried out by minor HDL vesicles having the values of electrophoretic mobility between the characteristics of α -HDL and HDL-pre β . These results indicate that PLTP promotes HDL binding to the cell surface and remodeling of HDL in order to improve the capacity of HDL particles for induction cholesterol and phospholipids efflux by apolipoprotein-mediated pathway.

Key words: *apolipoproteins; atherosclerosis; phospholipid transfer protein; high-density lipoproteins; cholesterol efflux; phospholipids efflux*