

Исследование противовоспалительного эффекта липопропротеидов высокой плотности*

Орехов А.Н.^{1,2}, Мухамедова Н.М.¹, Свиридов Д.Д.¹, Карагодин В.П.¹, Мельниченко А.А.^{1,2}, Мясоедова В.А.¹, Орехова В.А.¹, Собенин И.А.²

¹ — Институт атеросклероза: Россия, 143025, Москва, Инновационный центр Сколково, ул. Новая, д.100

² — ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН, 125315, Россия, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Противовоспалительное действие липопропротеидов высокой плотности (ЛПВП) на эндотелиальные клетки изучено достаточно полно, подобные эффекты на моноцитах изучены в меньшей степени. Моноциты человека выделяли из цельной крови с последующей оценкой активации/экспрессии CD11b и клеточной адгезии в условиях сдвига потока. ЛПВП вызывали зависимое от дозы снижение активации CD11b, индуцированной активатором протеинкиназы C форбол-12-миристат-13-ацетатом (РМА) или антагонистами, зависимиыми от рецептора. Было обнаружено, что составляющей частью ЛПВП, ответственной за противовоспалительное действие на активацию CD11b, является аполипопротеин А-I (apoA-I). Циклодекстрин, но не комплекс циклодекстрин/холестерин, также подавлял индуцированную РМА активацию CD11b, вовлекая отток холестерина как основной механизм. В дальнейшем это было подтверждено данными о том, что содержание холестерина в липидных рафтах уменьшается после добавления акцепторов холестерина. Блокирование ABCA1 антителами к ABCA1 устраняло эффект apoA-I. Кроме того, моноциты, полученные от больных с болезнью Танжера, четко подтвердили необходимость ABCA1 в ингибировании CD11b, опосредованном apoA-I. Противовоспалительные эффекты apoA-I были обнаружены также на функциональных моделях, включающих адгезию клеток к монослой эндотелиальных клеток, распластывание моноцитов в условиях сдвига потока и трансмиграцию. Таким образом, ЛПВП и apoA-I проявляют противовоспалительный эффект на моноцитах человека, подавляя активацию CD11b. ApoA-I действует через ABCA1, в то время как ЛПВП могут действовать через несколько рецепторов.

Ключевые слова: атеросклероз, противовоспалительный эффект, липопропротеиды высокой плотности, моноциты, аполипопротеин А-I

Введение

Уровень липопропротеидов высокой плотности (ЛПВП) в плазме крови обратно коррелирует с сердечно-сосудистой заболеваемостью и смертностью [1, 2]. Наиболее полно изученной функцией ЛПВП является обратный транспорт холестерина. Другие кардиопротективные функции включают антиоксидантные свойства и способность повышать биодоступность оксида азота (NO) [3, 4]. Совсем недавно сообщалось о противовоспалительном действии ЛПВП, в частности, в эндотелии [5, 6].

Критическим событием в формировании атеросклеротических бляшек является привлечение моноцитов в интиму, где они дифференцируются в макрофаги и захватывают модифицированные липопропротеиды низкой плотности (ЛПНП) через сквенджер-рецептор с последующим образованием пенных клеток [7]. Вовлечение моноцитов включает экспрессию молекул адгезии как эндотелием, так и моноцитами. В многоступенчатом каскаде адгезии имеет место первоначальное прикрепление моноцита к эндотелию через селектины, экспрессируемые на эндотелиальных клетках. Затем происходит устойчивая адгезия посредством молекул адгезии сосудистых клеток — VCAM-1 и внутриклеточных молекул адгезии — ICAM-1, взаимодействующих с молекулами адгезии моноцитов, такими, как CD11b/CD18 (Mac-1, CR3) [8–10]. Сообщалось о подавлении индуцированной фактором некроза опухоли (ФНО) экспрессии VCAM-1, ICAM-1 и E-селектина в эндотелиальных клетках, предварительно ин-

кубированных с ЛПВП [11, 12]. Кроме того, описано подавление продукции активных форм кислорода, инфильтрации нейтрофилов и моноцитарного хемоаттрактантного белка — MCP-1 [13, 14]. Было показано, что вызванное ЛПВП ингибирование экспрессии E-селектина на человеческих эндотелиальных клетках опосредовано липополисахаридами [11], что предлагает участие сквенджер-рецептора класса B-1 (SR-B1) и рецептора S1P3, активирующих эндотелиальную синтазу окиси азота (eNOS), производящую NO [3, 15, 16]. Однако эффекты *in vivo* являются сложными и могут быть опосредованы восстановленными ЛПВП (vЛПВП) или обезлипиженным apoA-I [13, 14]. В противоположность этому, результаты исследования, полученные *in vitro* при использовании эндотелиальных клеток, продемонстрировали противовоспалительные эффекты ЛПВП при активации нейтрофилов, с одним важным исключением [17], когда было показано, что за противовоспалительные эффекты отвечает apoA-I [18–21].

Примечательно, что ЛПВП также ингибируют взаимодействие лейкоцитов и эндотелиальных клеток, индуцированное окисленными ЛПНП (oxЛПНП), без индукции экспрессии эндотелиальных молекул адгезии и без ослабления адгезии лейкоцитов путем блокирования эндотелиальных молекул адгезии [22].

Целью данной работы является дальнейшее уточнение механизмов подавления активности моноцитов липопропротеидами высокой плотности.

* Работа была поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации.

Материалы и методы

Выделение моноцитов. Покоящиеся моноциты человека были выделены центрифугированием в градиенте плотности как описано ранее [23].

Акцепторы холестерина. ЛПВП были выделены из плазмы с помощью последовательных процедур ультрацентрифугирования (плотность от 1,085 до 1,21 г/мл), после чего измеряли содержание белка. Восстановленные ЛПВП (вЛПВП) [24, 25] и липосомы фосфатидилхолина были приготовлены как описано ранее [26]; все добавки ЛПВП осуществляли в концентрации 50 мкг/мл, если не указано иное. АпоА-I был выделен из плазмы крови человека как описано ранее [27] и использовался в концентрации 40 мкг/мл. Бета-циклодекстрин и циклодекстрин, насыщенный холестерином, были приготовлены как описано ранее [28]. Пептид L37pA был синтезирован как описано [29].

Блокировка рецепторов. Рецепторы моноцитов были заблокированы с помощью специфических блокирующих антител в течение 4 ч при 4°C. Антимышьиные IgM (Sigma) использовали в качестве контроля.

Проточная цитометрия. Моноциты стимулировали и инкубировали с антителами к CD11b, меченными флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) в течение 15 мин при 37°C, если не указано иное. Клетки фиксировали и экспрессию CD11b измеряли с помощью проточной цитометрии. Образцы контролировали с помощью изотипного отрицательного контроля. Результаты выражали как процент нестимулированного контроля (100%) или РМА (100%, только для Танжера). Для количественного определения липидных рафтов моноциты инкубировали в течение 15 мин при 37°C, центрифугировали и инкубировали с FITC-меченым токсином холеры В (СТ-В) в течение 1 ч при комнатной температуре, затем рафты измеряли с помощью проточной цитометрии.

Окрашивание липидных рафтов. Рафты были окрашены с использованием комплекта для мечения липидных рафтов Vybrant в соответствии с инструкциями производителя. Моноциты помещали в флуоресцентную среду и рассматривали на флуоресцентном микроскопе. Интенсивность окрашивания определяли количественно с использованием Image Pro программного обеспечения.

Исследование перфузии. Исследование перфузии проводилось с использованием параллельных проточных камер как описано ранее [30]. Престимулированные моноциты подвергались перфузии через эндотелиальные клетки коронарной артерии человека (HCAECs) при сдвиге скорости 150 с^{-1} ($1,1 \text{ дин/см}^2$) в течение 5 мин с периодом вымывания 5 мин. Адгезия моноцитов анализировалась в автономном режиме.

Определение распластывания/адгезии моноцитов. Исследование перфузии проводили в микрокапиллярной стеклянной трубке, покрытой тромбоцитами при температуре 37°C [31]. Преактивированные моноциты перфузировали через тромбоцитарный монослой в течение 5 мин, затем вымывали в течение 5 мин. Моноцит-тромбоцит взаимодействие было визуализировано в соответствии с «исследованием перфузии».

Определение статической адгезии. Адгезию моноцитов к иммобилизованному фибриногену проводили в течение 15 мин при 37°C как описано ранее [31].

Определение миграции. Определение миграции проводилось с использованием $8,0 \text{ ммоль/л}$ Transwells [32]. Обработанные моноциты сажали в верхнюю камеру и позволяли им мигрировать в течение 30 мин при 37°C в нижнюю камеру, содержащую 50 нг/мл MCP-1. Мигрировавшие моноциты были зафиксированы и определены как количество мигрировавших клеток.

Содержание филаментов актина. Моноциты окрашивали на содержание F-актина 488-фаллоидином и определяли количественно с помощью проточной цитометрии или проводили докрасшивание DAPI и исследовали с помощью конфокальной микроскопии.

Статистический анализ. Значения представлены как среднее \pm SEM или процент от контроля \pm SEM. Все результаты были проанализированы на статистическую значимость с использованием одновариантного теста ANOVA с последующим тестом Бонферрони, за исключением исследования перфузии, которая была проанализирована с использованием двухвариантного теста ANOVA с последующим тестом Бонферрони. Значимыми были приняты изменения при $P < 0,05$.

Результаты

ЛПВП подавляют РМА-индуцированную активацию CD11b. Активация моноцитарного интегрина CD11b, индуцированная РМА, которая была дозозависимой, ингибировалась ЛПВП (от 2 до 50 мкг/мл; рис. 1А). Хотя концентрации ЛПВП, используемые в настоящем исследовании, были ниже уровня в плазме крови, они приближаются к насыщающей концентрации, описанной в экспериментах по оттоку холестерина, обычно используемой другими [33]. Снижение активированного CD11b сопровождалось уменьшением общего количества CD11b (РМА против ЛПВП (50 мкг/мл) + РМА: $19 \pm 1,84$ по сравнению с $9,7 \pm 1,89 \text{ U}$; $n=4$, $P < 0,001$). Чтобы оценить, насколько ответ на ЛПВП зависел от неоднородности моноцитов, были выделены CD16+ и CD16- моноциты и сравнялся их ответ. Не было обнаружено никакой разницы между двумя подфракциями в ответ на ЛПВП.

АпоА-I снижает активацию CD11b. Восстановленные ЛПВП и апоА-I ингибировали CD11b активацию до сопоставимой с ЛПВП степени (рис. 1В). В отличие от них, ни BSA, ни липосомы из фосфатидилхолина не оказывали какого-либо воздействия (рис. 1А и 1В). ЛПВП и апоА-I значительно снижали активацию CD11b, активированную как липополисахаридом (ЛПС), так и fMLP.

ЛПВП предотвращают и изменяют активацию моноцитов. Предварительная инкубация моноцитов с ЛПВП с последующей стимуляцией либо с РМА (рис. 1С) или ЛПС (ЛПС против предотвращения; $152 \pm 1,8$ против $101 \pm 4,5$, $n=5$, $P < 0,01$) привела к значительному сокращению экспрессии CD11b (рис. 1С). Кроме того, стимуляция моноцитов РМА с последующей 15-минутной инкубацией с ЛПВП также значительно снижала экспрессию CD11b (рис. 1С), то же наблюдалось с ЛПС (ЛПС против обратной реакции; $152 \pm 1,8$ против $92,8 \pm 5,7$, $n=5$, $P < 0,01$). Моноциты, преинкубированные с ЛПВП или апоА-I, отмытые, а затем стимулированные РМА (или fMLP, данные не представлены), также продемонстрировали предотвращение активации моноцитов (рис. 1D).

Регуляция экспрессии CD11b и оттока холестерина. Циклодекстрин значительно ослаблял РМА-индуцированную активацию CD11b (рис. 2А). Холестерин-насыщенный циклодекстрин (Ch-CD) не влиял на РМА-индуцированную активацию CD11b (рис. 2А).

Изменения количества липидных рафтов. Обработка моноцитов апоА-I, ЛПВП и CD, но не липосомами или BSA, значительно снижала количество липидных рафтов плазмалеммы (рис. 2В). Инкубация с апоА-I резко изменяла количество мембранных рафтов (контроль по сравнению с апоА-I; $66,9 \pm 11,3$ относительных единиц флуоресценции [ОЕФ] в сравнении с $37,3 \pm 4,6$ ОЕФ, $n=5$, $P<0,05$; представлено визуально на рис. 2С), что свидетельствует о быстром оттоке рафтов из плазматической мембраны.

Участие SR-B1. Блокировка SR-B1 притупляла эффект ЛПВП на активацию CD11b, хотя и незначительно ($P=0,18$; рис. 3А). Блокада SR-B1 не влияла на подавление активации CD11b, индуцированной апоА-I (рис. 3А). Контрольные антитела не имели эффекта.

Участие ABCA1. Противовоспалительные эффекты апоА-I, но не ЛПВП (рис. 3В) были отменены в присутствии ABCA1, блокированного антителами NDF4C2. Контрольные антитела не имели эффекта. Роль интернализации ABCA1 была выявлена при использовании антител NDF6F1 [34], которые не затрагивают ABCA1-зависимый отток холестерина, но предотвращает интернализацию ABCA1 и его деградацию. NDF6F1 не влияли на ингибирующее действие апоА-I на РМА-индуцированную экспрессию CD11b (рис. 3С).

Адгезия моноцитов к эндотелиальным клеткам при сдвиге потока. По сравнению с нестимулированными моноцитами, РМА значительно повышал адгезию моноцитов к эндотелиальным клеткам. Инкубация моноцитов с РМА и ЛПВП или апоА-I приводила к значительному снижению адгезии моноцитов (рис. 4А и 4D). Важность взаимодействия между апоА-I и ABCA1 была также изучена при сдвиге потока. В присутствии антител к ABCA1 значительное снижение адгезии, индуцированной апоА-I, не проявлялось (рис. 4Е). NDF4C2 или контрольные антитела не влияли на адгезию (данные не представлены).

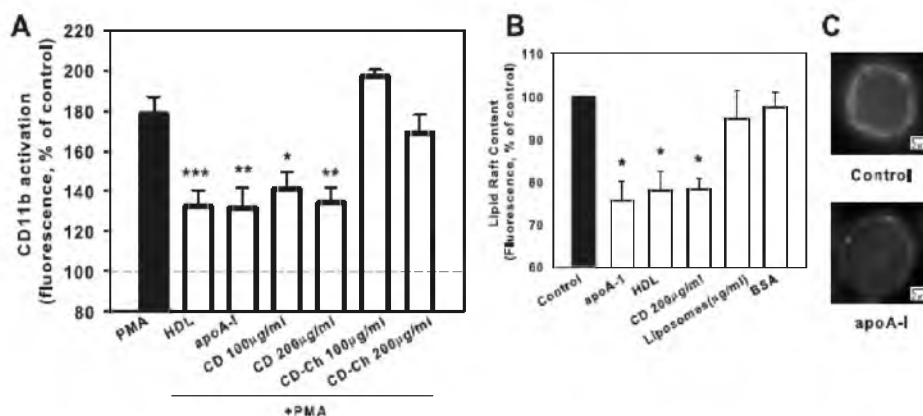


Рис. 2. Отток холестерина:

А – моноциты инкубировали с РМА (1 мкмоль/л) ± циклодекстрин или циклодекстрин, насыщенный холестерином (100–200 мкг/мл) в течение 15 мин и определяли активацию CD11b. * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$. CD = циклодекстрин, CD-CH = циклодекстрин, насыщенный холестерином; В – моноциты инкубировали с апоА-I (40 мкг/мл), ЛПВП (50 мкг/мл), CD (200 мкг/мл), липосомами (50 мкг/мл) и BSA (50 мкг/мл) в течение 15 мин, липидные рафты окрашивали СТ-В и клетки анализировали с помощью проточной цитометрии; С – конфокальная микроскопия моноцитов, окрашенных СТ-В без (вверху) и с обработкой апоА-I (40 мкг/мл) в течение 15 мин (бар = 2 мкм).

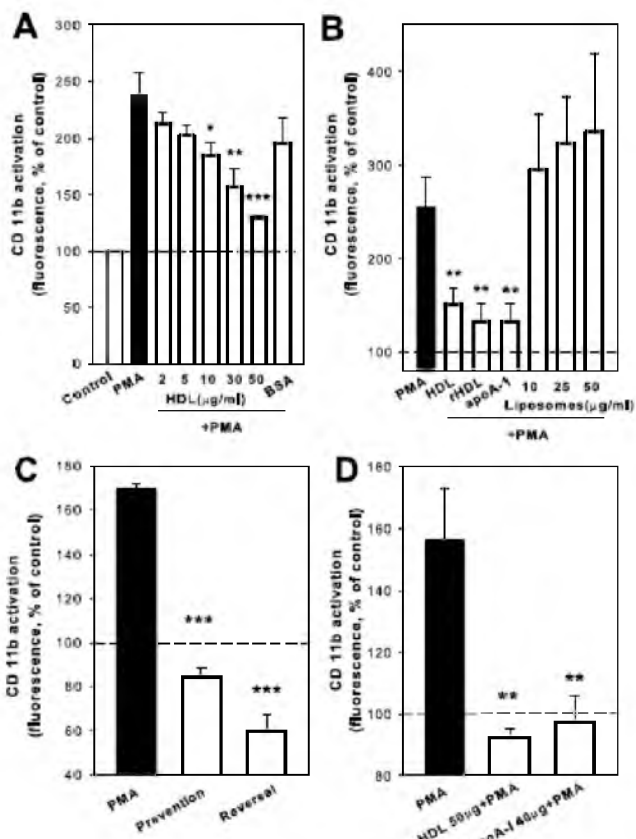


Рис. 3. Активация CD11b: Моноциты стимулировали: А – РМА (1 мкмоль/л) ± ЛПВП (2–50 мкг/мл) или BSA (50 мкг/мл); В – РМА ± ЛПВП (50 мкг/мл), ЛПВП (40 мкг/мл), апоА-I (40 мкг/мл) или липосомами РОРС (10–50 мкг/мл); С – моноциты либо предварительно инкубировали с ЛПВП (50 мкг/мл; 30 мин) перед добавлением РМА (1 мкмоль/л; 15 мин «предотвращение») или предварительно инкубировали с РМА (15 мин) перед добавлением ЛПВП (30 мин «регрессия») и сравнивали с контролем (только РМА, окончательно 15 мин); Д – моноциты были предварительно инкубированы с ЛПВП (50 мкг/мл) или апоА-I (40 мкг/мл) в течение 30 мин до удаления с помощью центрифугирования, моноцитов промывали PBS. Моноциты затем стимулировали либо РМА (15 мин) и уровень CD11b оценивали с помощью проточной цитометрии. Результаты выражали в процентах от активации по сравнению с контролем (нестимулированные моноциты). * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$

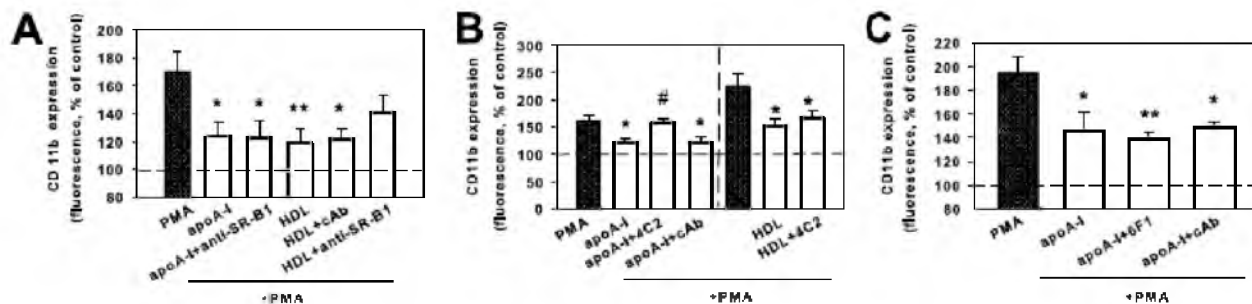


Рис. 3. Исследования с блокировкой:

А – моноциты инкубировали с антителами, блокирующими SR-B1 (4 ч), затем были обработаны PMA (1 мкмоль/л) ± апоА-I (40 мкг/мл) или ЛПВП (50 мкг/мл) в течение 15 мин. * P<0,05, ** P<0,01 n=4; анти-SR-B1 = блокирование анти-SR-B1; cAb = контрольные антитела; В, С – моноциты инкубировали с NDF4C2 анти-ABCA1 антителами. * P<0,05; ** P<0,01 c.f. PMA; # P<0,05 c.f. apoA-I/PMA

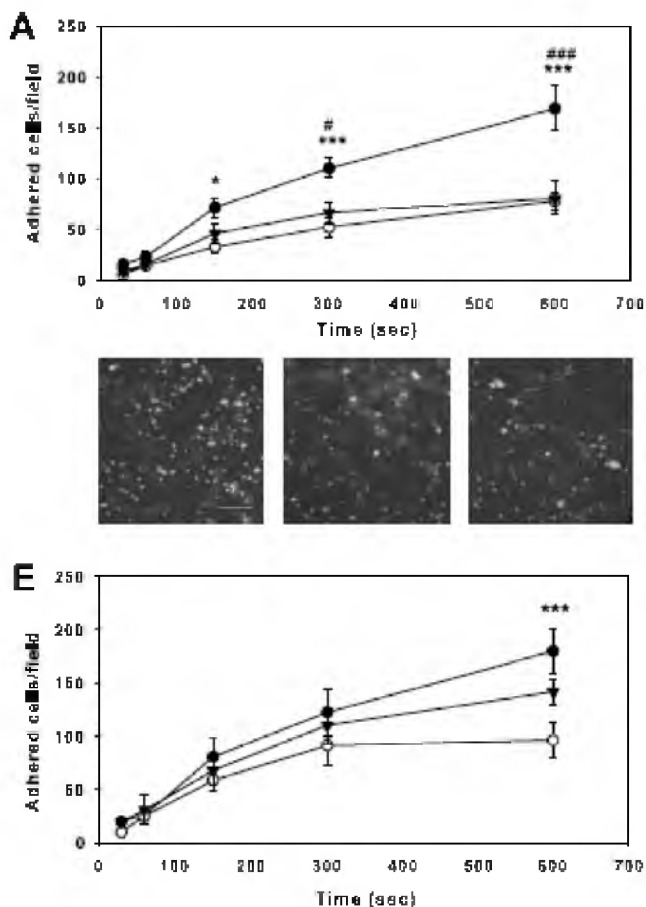


Рис. 4. Адгезия моноцитов сцепления при сдвиге потока: Моноциты были предварительно обработаны PMA (1 мкмоль/л) или PMA + ЛПВП (50 мкг/мл) или PMA + апоА-I (40 мкг/мл) в течение 15 мин до перфузии поверх эндотелия:

А – число прикрепившихся моноцитов подсчитывали и наносили на график как среднее число клеток на поле ± SEM. * P<0,05; *** P<0,001 PMA против ЛПВП/PMA, # P<0,05; *** P<0,001 PMA против apoA-I/PMA; В, D – фазово-контрастные фотографии моноцитов, прикрепленных к конфлюентному монослою эндотелия после 5 мин в сдвиге потоков; В – PMA; С – ЛПВП + PMA и апоА-I + PMA; D – увеличение X200, Бар=56 мкм; Е – моноциты были предварительно обработаны в течение 4 ч ± ABCA1 блокировкой антителами NDF4C2. Разблокированные моноциты обрабатывали PMA (1 мкмоль/л) или PMA + апоА-I (40 мкг/мл), ABCA1 блокированные моноциты обрабатывали PMA + апоА-I в течение 15 мин при 37°C и перфузировали поверх эндотелия. Результаты были проанализированы и выражались, как в (А). *** P<0,001 PMA против apoA-I/PMA

Распластывание и адгезия моноцитов на тромбоцитах при сдвиге потока. Чтобы изучить влияние ЛПВП на распастывание моноцитов при сдвиге потока, моноциты, стимулированные PMA, перфузировали над тромбоцитарным монослоем в течение 5 мин (t=0 с), с последующим 5-минутным периодом отмывания (t=300 с, с ЛПВП или без). До отмывания не было разницы между двумя группами в распастывании клеток. Промывка стимулированных моноцитов ЛПВП-содержащим буфером приводила к значительному снижению в распастывания по сравнению с промывкой одним буфером (рис. 5А). Значительное снижение адгезии моноцитов к тромбоцитам наблюдалось и после промывки с ЛПВП по сравнению с одним буфером.

Трансмиграция моноцитов. MCP-1 способствовал существенному миграционному ответу моноцитов, который был заметно снижен, когда моноциты предварительно инкубировали с ЛПВП или апоА-I (рис. 5В).

Содержание F-актина в моноцитах. Стимуляция моноцитов PMA приводила к увеличению уровня F-актина, который был значительно снижен при инкубации с ЛПВП и PMA (рис. 5С). Это наблюдение было подтверждено проточной цитометрией (P<0,01; рис. 5D).

L37pA ингибирует активацию моноцитов подобно apoA-I. Миметический пептид L37pA [29] (10 и 20 мкг/мл) значительно уменьшал стимулированную PMA экспрессию CD11b на моноцитах, а также стимулированную PMA адгезию моноцитов на покрытом фибриногеном покровном стекле в статических условиях.

Моноциты больного болезнью Танжера. Для облегчения сравнения между членами семьи R1068H больных болезнью Танжера, результаты выражались в процентах от экспрессии CD11b после активации с PMA. Моноциты, выделенные из крови здоровых родственников, обработанные PMA и апоА-I или ЛПВП, продемонстрировали такое же снижение, как и в предыдущих анализах (рис. 6А). Моноциты гетерозигот имели сниженную способность реагировать на апоА-I, однако при этом наблюдалось еще и снижение активации CD11b. Моноциты, взятые у пациента с болезнью Танжера, не реагировали на воздействие апоА-I. ЛПВП снижали активацию CD11b как в моноцитах гетерозигот и моноцитах больного болезнью Танжера, хотя не было выявлено ген-дозозависимый ответа на апоА-I (рис. 6А). Сходные результаты были получены при оценке способности как апоА-I, так и ЛПВП снижать адгезию моноцитов к фибриногену (рис. 6В).

Обсуждение

Активация моноцитов является ключевым событием в воспалении и атеросклерозе, имеющем место в сосудистой стенке. В данном исследовании мы показали, что ЛПВП и апоА-I могут предотвратить, а также вызвать процесс, обратный активации моноцитов человека под воздействием апоА-I, оказывающего свое действие через ABCA1. Основным результатом данной статьи является то, что ЛПВП дозозависимо снижают экспрессию CD11b на первичных моноцитах человека, стимулированных PMA. Этот эффект был также обнаружен при использовании рецептор-опосредованных активаторов, таких, как ЛПС и fMLP [23, 35, 36]. Как ЛПВП, так и обезлипиженный апоА-I ингибируют PMA-индуцированную активацию CD11b, однако фосфолипидные липосомы или альбумин таким эффектом не обладали. Это соответствует результатам предыдущих исследований, в которых было показано, что апоА-I ингибирует распластывание моноцитов в ответ на колониестимулирующий фактор M (CSF) [21]. Интересно, что механизм, посредством которого ЛПВП и апоА-I подавляют активацию моноцитов, как представляется, отличается от противовоспалительного действия этих молекул на эндотелиальные клетки, относительно которого предполагается, что оно опосредовано ЛПВП-стимуляцией продукции NO [11, 16, 37]. Отток холестерина, как представляется — это необходимое условие для проявления эффектов апоА-I и ЛПВП, поскольку циклодекстрин эффективно имитирует ЛПВП и апоА-I в ингибировании активации CD11b на моноцитах. Хотя циклодекстрин удаляет холестерин неспецифически [38], он удаляет его из того же пула плазматической мембраны, что и апоА-I, о чем свидетельствует повышение оттока на циклодекстрин после оверэкспрессии ABCA1 [39]. Нагрузка циклодекстрина холестерином, которая преобразует циклодекстрин в донор холестерина, делает его неактивным, тем самым подтверждая, что для проявления активности необходим отток холестерина. Примечательно, что удаление циклодекстрина и холестерина, как было показано, препятствует распластыванию моноцитов, когда они инкубируются с M-CSF [21] и приводит к быстрому втягиванию выступов мембраны макрофагов [40]. Далее мы показали, что короткая инкубация с апоА-I, ЛПВП и CD, но не с липосомами или BSA, приводит к истощению холестерина рафтов. Вполне возможно, что последние не влияют на процесс так сильно, как первая группа акцепторов холестерина. Несмотря на это, вышеупомянутые результаты показывают, что быстрый отток липидов клеточных мембран, по-видимому, является ключевым механизмом, влияющим на воспалительные реакции моноцитов/макрофагов.

Чтобы изучить конкретные механизмы, связанные с эффектами ЛПВП на активацию моноцитов и отток холестерина, мы исследовали участие двух рецепторов ЛПВП — SR-B1 и ABCA1. SR-B1, наряду с ABCG1, как было показано, способствуют оттоку холестерина на ЛПВП, в то время как обезлипиженный апоА-I удаляет холестерин исключительно через ABCA1-зависимый путь [41]. Блокировка SR-B1 приводит к снижению, но не устранению противовоспалительного действия ЛПВП, однако это не затрагивает апоА-I. Блокировка ABCA1 полностью устраняет ингибирующее действие апоА-I, но не влияет на ЛПВП. Таким образом, апоА-I/ABCA1 взаимодействие,

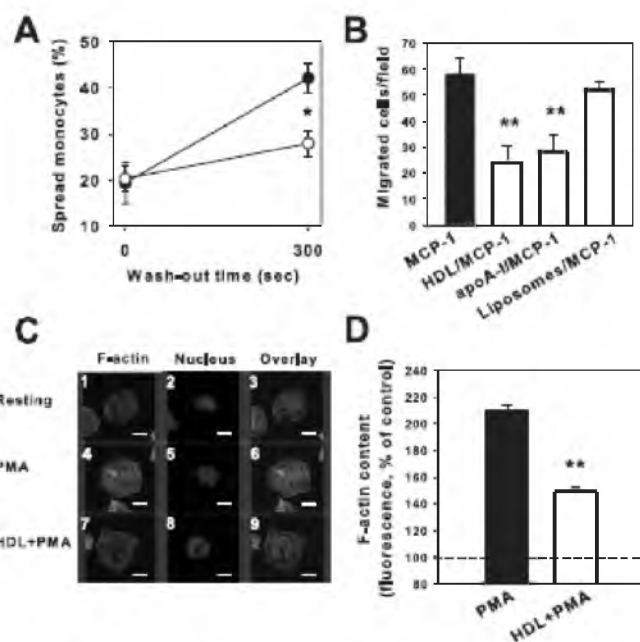


Рис. 5. Фенотип моноцитов:

А — моноциты были предварительно стимулированы PMA (15 мин) и подвергались перфузии поверх монослоя тромбоцитов в течение 5 мин (0 с) после 5 мин (300 с) промывания с буфером (белые кружки) или ЛПВП (50 мкг/мл) (черные кружки); В — трансмиграция моноцитов. Моноциты (\pm обработка) были посажены в верхнюю камеру Transwell и мигрировали к MCP-1 (50 нг/мл). Мигрирующие моноциты определяли количественно с использованием фазовой микроскопии (X40). * $P < 0,05$; С — конфокальная микроскопия нестимулированных или обработанных PMA (1 мкмоль/л) \pm ЛПВП (50 мкг/мл). F-актин окрашивали Alexa Fluor 488 фаллоидином (зеленый) и ядерным красителем DAPI (синий). Бар=6,8 мкм; D — содержание F-актина измеряли с использованием фаллоидина. Моноциты обрабатывали PMA (1 мкмоль/л) \pm ЛПВП (50 мкг/мл); ** $P < 0,01$

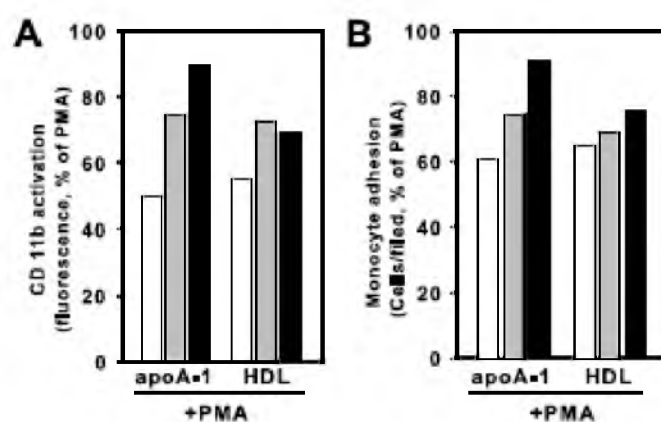


Рис. 6. Моноциты больного болезнью Танжера:

А — моноциты стимулировали PMA \pm апоА-I (40 мкг/мл) или ЛПВП (50 мкг/мл). Активацию CD11b количественно оценивали с помощью проточной цитометрии; В — изолированные моноциты обрабатывали PMA \pm апоА-I (40 мкг/мл) или ЛПВП (50 мкг/мл) и сажали на покровные стекла, покрытые фибриногеном. Прикрепленные моноциты подсчитывали на пяти случайных полях с помощью фазовой микроскопии (X40). Белый столбик — здоровые, серый столбик — гетеро-, черный столбик — Танжер

вероятно, является основным путем, опосредующим эти эффекты. Что касается других путей, таких, как SR-B1 и ABCG1, то они также вносят вклад в эффекты ЛПВП.

Для изучения функциональных последствий снижения активации моноцитов под воздействием ЛПВП был использован анализ адгезии в потоке сдвига. В присутствии ЛПВП или апоА-I РМА-стимулированная адгезия моноцитов к эндотелию была значительно ослаблена. Кроме того, блокирование моноцитов АВСА1 вызывает реверсию апоА-I-индуцированного снижения адгезии, в соответствии с результатами анализа активации CD11b, и подтверждает участие АВСА1.

Хотя ранее уже было показано, что ЛПВП могут подавлять распластывание моноцитов [21], наша работа — это первое исследование, описывающее этот эффект в физиологических условиях сдвига потока. Ингибирование каскада клеточной адгезии под воздействием ЛПВП было исследовано путем изучения эффектов ЛПВП и апоА-I на миграцию моноцитов к MCP-1. Как ЛПВП, так и апоА-I существенно подавляли миграцию моноцитов к MCP-1, и эти результаты согласуются с наблюдениями Navab et al. [42]. Поскольку изменения цитоскелета являются необходимым условием, чтобы вызвать распластывание и миграцию клеток, которые, как было показано, связаны с увеличением содержания F-актина [43], был количественно оценен общий F-актин и показано его уменьшение в присутствии ЛПВП. Эти данные согласуются с уменьшением в распластывания, полученные Diederich et al. [21].

Ингибирующий эффект ЛПВП на моноцитах может приводить как к профилактике, так и к регрессии. Это, в частности, имеет важные последствия для болезненных состояний, таких, как острый коронарный синдром, где процесс воспаления уже произошел. В своей работе мы ясно продемонстрировали, что предстимулированные моноциты могут быть защищены от активации ЛПВП. Это может объяснить также результаты предыдущих исследований, продемонстрировавших, что ЛПВП/апоА-I могут уменьшить активацию эндотелия и нейтрофилов, скапливающихся в интима-медии в воспалительной модели *in vivo* до 9 ч после стимуляции воспаления [14]. Наши данные также согласуются с исследованиями на животных, в которых в краткосрочное повышение ЛПВП было атеропротективным [44].

Недавнее прекращение клинических испытаний ингибирования CETP (белка-переносчика эфиров холестерина) предполагает, что для повышения уровня ЛПВП нужны различные стратегии [45]. Разработка имитаторов апоА-I может обеспечить эффективную альтернативу. Ранее было показано, что L37pA эффективно стимулирует отток холестерина и стабилизирует АВСА1 через те же механизмы, что и апоА-I [29, 46, 47]. В наших исследованиях L37pA имитировал противовоспалительное действие апоА-I на моноцитах, что указывает на потенциал этого пептида для терапии при воспалительных заболеваниях.

Наконец, мы исследовали противовоспалительную роль ЛПВП и апоА-I при болезни Танжера на гетерозиготном больном и здоровых членах семьи R1068H [48]. У больных болезнью Танжера имеются дисфункции АВСА1, из-за которых белок не в состоянии обеспечивать отток холестерина на апоА-I [49]. Ответ моноцитов здоровых членов семьи был похож на ответы практически здоровых лиц; моноциты гетерозиготного больного отвечали

на ЛПВП и апоА-I в меньшей степени по сравнению с моноцитами здоровых членов семьи. Напротив, апоА-I не уменьшал активацию CD11b моноцитов пациента с болезнью Танжера, хотя ЛПВП продолжали ее ингибировать. Аналогичные эффекты наблюдались при исследовании адгезии к фибриногену моноцитов пациента, больного болезнью Танжера. Эти данные согласуются с нашей гипотезой о том, что апоА-I действует через АВСА1, чтобы ингибировать активацию моноцитов, тогда как ЛПВП дополнительно подключаются через АВСА1-независимый путь.

Таким образом, в данном исследовании впервые подробно изучен механизм, посредством которого ЛПВП и апоА-I регулируют адгезию моноцитов, их распластывание и активацию интегрин. Тот факт, что апоА-I сравним по силе эффектов с ЛПВП в подавлении элементов воспаления, позволяет лучше представить себе новые стратегии в терапии, такие, например, как апоА-I-имитирующие пептиды в лечении и предотвращении атеросклероза [50]. Данные о том, что ЛПВП могут влиять на воспалительный статус моноцитов у пациентов с болезнью Танжера, указывают на возможность применения терапевтических стратегий с использованием ЛПВП. Они могут быть использованы для пациентов, которые подвергаются риску сердечно-сосудистых заболеваний. Способность ЛПВП предотвращать и вызывать регрессию активации моноцитов может также иметь значительный интерес для разработки терапии различных воспалительных заболеваний.

Список литературы

1. Castelli W.P., Garrison R.J., Wilson P.W. et al. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study // JAMA. — 1986. — Vol. 256. — P. 2835–2838.
2. Gordon T., Castelli W.P., Hjortland M.C. et al. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study // Am. J. Med. — 1977. — Vol. 62. — P. 707–714.
3. Nofer J.R., van der Giet M., Tolle M. et al. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3 // J. Clin. Invest. — 2004. — Vol. 113. — P. 569–581.
4. Watson A.D., Berliner J.A., Hama S.Y. et al. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein // J. Clin. Invest. — 1995. — Vol. 96. — P. 2882–2891.
5. Barter P.J., Nicholls S., Rye K.A. et al. Antiinflammatory properties of HDL // Circ. Res. — 2004. — Vol. 95. — P. 764–772.
6. Libby P. Inflammation in atherosclerosis // Nature. — 2002. — Vol. 420. — P. 868–874.
7. Rahaman S.O., Lennon D.J., Febbraio M. et al. A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation // Cell. Metab. — 2006. — Vol. 4. — P. 211–221.
8. Diamond M.S., Staunton D.E., de Fougerolles A.R. et al. ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18) // J. Cell. Biol. — 1990. — Vol. 111. — P. 3129–3139.
9. Diamond M.S., Staunton D.E., Marlin S.D., Springer T.A. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation // Cell. — 1991. — Vol. 65. — P. 961–971.
10. Springer T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm // Cell. — 1994. — Vol. 76. — P. 301–314.
11. Nofer J.R., Geigenmuller S., Gopfert C. et al. High density lipoprotein-associated lysosphingolipids reduce E-selectin expression in human endothelial cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2003. — Vol. 310. — P. 98–103.
12. Cockerill G.W., Rye K.A., Gamble J.R. et al. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 1995. — Vol. 15. — P. 1987–1994.

13. Nicholls S.J., Dusting G.J., Cutri B. et al. Reconstituted high-density lipoproteins inhibit the acute pro-oxidant and proinflammatory vascular changes induced by a periarterial collar in normocholesterolemic rabbits // *Circulation*. — 2005. — Vol. 111. — P. 1543–1550.
14. Puranik R., Bao S., Nobecourt E. et al. Low dose apolipoprotein A-I rescues carotid arteries from inflammation in vivo // *Atherosclerosis*. — 2008. — Vol. 196. — P. 240–247.
15. Yuhanna I.S., Zhu Y., Cox B.E. et al. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase // *Nat. Med.* — 2001. — Vol. 7. — P. 853–857.
16. Kimura T., Tomura H., Mogi C. et al. Sphingosine 1-phosphate receptors mediate stimulatory and inhibitory signalings for expression of adhesion molecules in endothelial cells // *Cell. Signal.* — 2006. — Vol. 18. — P. 841–850.
17. Moudry R., Spycher M.O., Doran J.E. Reconstituted high density lipoprotein modulates adherence of polymorphonuclear leukocytes to human endothelial cells // *Shock*. — 1997. — Vol. 7. — P. 175–181.
18. Kopprasch S., Pietzsch J., Graessler J. The protective effects of HDL and its constituents against neutrophil respiratory burst activation by hypochlorite-oxidized LDL // *Mol. Cell. Biochem.* — 2004. — Vol. 258. — P. 121–127.
19. Blackburn W.D., Jr., Dohlman J.G., Venkatachalapathi Y.V. et al. Apolipoprotein A-I decreases neutrophil degranulation and superoxide production // *J. Lipid. Res.* — 1991. — Vol. 32. — P. 1911–1918.
20. Liao X.L., Lou B., Ma J., Wu M.P. Neutrophils activation can be diminished by apolipoprotein A-I // *Life. Sci.* — 2005. — Vol. 77. — P. 325–335.
21. Diederich W., Orso E., Drobnik W., Schmitz G. Apolipoprotein AI and HDL(3) inhibit spreading of primary human monocytes through a mechanism that involves cholesterol depletion and regulation of CDC42 // *Atherosclerosis*. — 2001. — Vol. 159. — P. 313–324.
22. Maier J.A., Barengi L., Pagani F. et al. The protective role of high-density lipoprotein on oxidized-low-density lipoprotein-induced U937/endothelial cell interactions // *Eur. J. Biochem.* — 1994. — Vol. 221. — P. 35–41.
23. Woollard K.J., Phillips D.C., Griffiths H.R. Direct modulatory effect of C-reactive protein on primary human monocyte adhesion to human endothelial cells // *Clin. Exp. Immunol.* — 2002. — Vol. 130. — P. 256–262.
24. Matz C.E., Jonas A. Micellar complexes of human apolipoprotein A-I with phosphatidylcholines and cholesterol prepared from cholate-lipid dispersions // *J. Biol. Chem.* — 1982. — Vol. 257. — P. 4535–4540.
25. Jonas A., Kezdy K.E., Wald J.H. Defined apolipoprotein A-I conformations in reconstituted high density lipoprotein discs // *J. Biol. Chem.* — 1989. — Vol. 264. — P. 4818–4824.
26. Sviridov D., Fidge N. Efflux of intracellular versus plasma membrane cholesterol in HepG2 cells: different availability and regulation by apolipoprotein A-I // *J. Lipid. Res.* — 1995. — Vol. 36. — P. 1887–1896.
27. Morrison J.R., Fidge N.H., Grego B. Studies on the formation, separation, and characterization of cyanogen bromide fragments of human AI apolipoprotein // *Anal. Biochem.* — 1990. — Vol. 186. — P. 145–152.
28. Christian A.E., Haynes M.P., Phillips M.C., Rothblat G.H. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content // *J. Lipid. Res.* — 1997. — Vol. 38. — P. 2264–2272.
29. Remaley A.T., Thomas F., Stonik J.A. et al. Synthetic amphipathic helical peptides promote lipid efflux from cells by an ABCA1-dependent and an ABCA1-independent pathway // *J. Lipid. Res.* — 2003. — Vol. 44. — P. 828–836.
30. Lawrence M.B., McIntire L.V., Eskin S.G. Effect of flow on polymorphonuclear leukocyte/endothelial cell adhesion // *Blood*. — 1987. — Vol. 70. — P. 1284–1290.
31. Woollard K.J., Kling D., Kulkarni S. et al. Raised plasma soluble P-selectin in peripheral arterial occlusive disease enhances leukocyte adhesion // *Circ. Res.* — 2006. — Vol. 98. — P. 149–156.
32. Leavesley D.I., Schwartz M.A., Rosenfeld M., Cheres D.A. Integrin beta 1-and beta 3-mediated endothelial cell migration is triggered through distinct signaling mechanisms // *J. Cell. Biol.* — 1993. — Vol. 121. — P. 163–170.
33. Sviridov D., Fidge N., Beaumier-Gallon G., Fielding C. Apo-lipoprotein A-I stimulates the transport of intracellular cholesterol to cell-surface cholesterol-rich domains (caveolae) // *Biochem. J.* — 2001. — Vol. 358. — P. 79–86.
34. Mukhamedova N., Fu Y., Bukrinsky M., Remaley A.T., Sviridov D. The role of different regions of ATP-binding cassette transporter A1 in cholesterol efflux // *Biochemistry*. — 2007. — Vol. 46. — P. 9388–9398.
35. Lynn W.A., Raetz C.R., Qureshi N., Golenbock D.T. Lipopolysaccharide-induced stimulation of CD11b/CD18 expression on neutrophils. Evidence of specific receptor-based response and inhibition by lipid A-based antagonists // *J. Immunol.* — 1991. — Vol. 147. — P. 3072–3079.
36. Badolato R., Sozzani S., Malacarne F. et al. Monocytes from Wiskott–Aldrich patients display reduced chemotaxis and lack of cell polarization in response to monocyte chemoattractant protein-1 and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine // *J. Immunol.* — 1998. — Vol. 161. — P. 1026–1033.
37. Wadham C., Albanese N., Roberts J. et al. High-density lipoproteins neutralize C-reactive protein proinflammatory activity // *Circulation*. — 2004. — Vol. 109. — P. 2116–2122.
38. Kilsdonk E.P., Yancey P.G., Stoudt G.W. et al. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins // *J. Biol. Chem.* — 1995. — Vol. 270. — P. 17250–17256.
39. Nagao K., Takahashi K., Hanada K. et al. Enhanced apoA-I-dependent cholesterol efflux by ABCA1 from sphingomyelin-deficient Chinese hamster ovary cells // *J. Biol. Chem.* — 2007. — Vol. 282. — P. 14868–14874.
40. Gaus K., Kritharides L., Schmitz G. et al. Apolipoprotein A-I interaction with plasma membrane lipid rafts controls cholesterol export from macrophages // *FASEB. J.* — 2004. — Vol. 18. — P. 574–576.
41. Duong M., Collins H.L., Jin W. et al. Relative contributions of ABCA1 and SR-BI to cholesterol efflux to serum from fibroblasts and macrophages // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2006. — Vol. 26. — P. 541–547.
42. Navab M., Imes S.S., Hama S.Y. et al. Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein // *J. Clin. Invest.* — 1991. — Vol. 88. — P. 2039–2046.
43. Capo C., Meconi S., Sanguedolce M.V. et al. Effect of cytotoxic necrotizing factor-1 on actin cytoskeleton in human monocytes: role in the regulation of integrin-dependent phagocytosis // *J. Immunol.* — 1998. — Vol. 161. — P. 4301–4308.
44. Palazon C.P., Alfon J., Gaffney P. et al. Effects of reducing LDL and increasing HDL with gemfibrozil in experimental coronary lesion development and thrombotic risk // *Atherosclerosis*. — 1998. — Vol. 136. — P. 333–345.
45. Kastelein J.J., van Leuven S.I., Burgess L. et al. Effect of torcetrapib on carotid atherosclerosis in familial hypercholesterolemia // *N. Engl. J. Med.* — 2007. — Vol. 356. — P. 1620–1630.
46. Arakawa R., Hayashi M., Remaley A.T. et al. Phosphorylation and stabilization of ATP binding cassette transporter A1 by synthetic amphiphilic helical peptides // *J. Biol. Chem.* — 2004. — Vol. 279. — P. 6217–6220.
47. Tang C., Vaughan A.M., Anantharamaiah G.M., Oram J.F. Janus kinase 2 modulates the lipid-removing but not protein-stabilizing interactions of amphipathic helices with ABCA1 // *J. Lipid. Res.* — 2006. — Vol. 47. — P. 107–114.
48. Slatter T.L., Williams M.J., Frikke-Schmidt R. et al. Promoter haplotype of a new ABCA1 mutant influences expression of familial hypoalphalipoproteinemia // *Atherosclerosis*. — 2006. — Vol. 187. — P. 393–400.
49. 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.
50. Sethi A.A., Amar M., Shamburek R.D., Remaley A.T. Apolipoprotein AI mimetic peptides: possible new agents for the treatment of atherosclerosis // *Curr. Opin. Investig. Drugs*. — 2007. — Vol. 8. — P. 201–212.

Orekhov A.N.^{1,2}, Mukhamedova N.M.¹, Sviridiov D.D.¹, Karagodin V.P.¹, Melnichenko A.A.^{1,2},
Myasoedova V.A.¹, Orekhova V.A.¹, Sobenin I.A.²

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

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

Whereas the anti-inflammatory effects of high-density lipoprotein (HDL) on endothelial cells are well described, such effects on monocytes are less studied. Human monocytes were isolated from whole blood followed by assessment of CD11b activation/expression and cell adhesion under shear-flow. HDL caused a dose-dependent reduction in the activation of CD11b induced by PMA or receptor-dependent agonists. The constituent of HDL responsible for the antiinflammatory effects on CD11b activation was found to be apolipoprotein A-I (apoA-I). Cyclodextrin, but not cyclodextrin/cholesterol complex, also inhibited PMA-induced CD11b activation implicating cholesterol efflux as the main mechanism. This was further confirmed with the demonstration that cholesterol content of lipid rafts diminished after treatment with the cholesterol acceptors. Blocking ABCA1 with an anti-ABCA1 antibody abolished the effect of apoA-I. Furthermore, monocytes derived from a Tangier disease patient definitively confirmed the requirement of ABCA1 in apoA-I-mediated CD11b inhibition. The antiinflammatory effects of apoA-I were also observed in functional models including cell adhesion to an endothelial cell monolayer, monocytic spreading under shear flow, and transmigration. HDL and apoA-I exhibit an antiinflammatory effect on human monocytes by inhibiting activation of CD11b. ApoA-I acts through ABCA1, whereas HDL may act through several receptors.

Key words: atherosclerosis, antiinflammatory effect, high-density lipoproteins, apolipoprotein A-I