

Никифоров Н.Г.^{1,2,3}, Makeev В.Ю.⁴, Елизова Н.В.^{1,3}, Орехов А.Н.^{1,3}

Активируемость моноцитов человека при атеросклерозе

¹ — «Научно-исследовательский институт атеросклероза», «Инновационный центр Сколково», 143025, Сколково, Московская область, Россия, ул. Новая, д. 100

² — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15 а

³ — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

⁴ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова», 119991, Москва, ул. Губкина, д. 3

Моноциты были выделены из крови пациентов, относящихся к трем группам: лица с нормальной толщиной интима-медиа-слоя (ТИМС) сонных артерий, пациенты с увеличенной ТИМС и пациенты с атеросклеротическими бляшками. Степень активации макрофагов определялась концентрацией в культуральной среде цитокина ФНО- α и хемокина CCL18 соответственно. При сравнении средних значений концентраций ФНО- α и CCL18 для пациентов всех групп были выявлены индивидуальные различия. Эти индивидуальные различия были обнаружены как в пределах каждой из групп, так и во всей выборке. Обнаружена обратная связь между внутриклеточным уровнем холестерина и способностью моноцитов к активации. Чтобы выявить причину этой связи, моноциты культивировали с атерогенными модифицированными липопротеидами низкой плотности, вызывающими накопление холестерина в культивируемых клетках. Накопление внутриклеточного холестерина не оказывало влияния ни на секрецию цитокинов, ни на экспрессию соответствующих генов. Следовательно, индивидуальные различия в активируемости моноцитов не определяются накоплением внутриклеточного холестерина, вызванного атерогенными липопротеидами. Полученные данные можно объяснить индивидуальными особенностями иммунного ответа у различных пациентов.

Ключевые слова: атеросклероз; макрофаги; моноциты; активация; воспаление; липопротеиды; липиды; индивидуальный профиль

Nikiforov N.G.^{1,2,3}, Makeev V.J.⁴, Elizova N.V.^{1,3}, Orekhov A.N.^{1,3}

Ability of human monocytes to activate in atherosclerosis

¹ — Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Centre, 143025, Skolkovo, Moscow Region, Russia, Novaya street, 100

² — Federal State Institute «Russian Production Complex of Cardiology Research» of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, 121552, Moscow, 3th Cherepkovskaya street, 15-a

³ — Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia 125315, Moscow, Baltiyskaya street, 8

⁴ — Vavilov Institute of General Genetics, Moscow, Russia, 119991, Moscow, Gubkina street, 3

Monocytes were isolated from blood of patients belonging to three groups: those with normal intima-media thickness (IMT) of carotid arteries, patients with increased IMT and patients with atherosclerotic plaques. The degree of activation of the macrophages was determined by the concentration of the cytokine TNF- α and chemokine CCL18 in the culture medium. When comparing the average values of the concentrations of TNF- α and CCL18 for patients in all groups dramatic individual differences were revealed. These individual differences were found within each group and in the pool. An inverse relationship between intracellular cholesterol levels and the ability of monocytes to activate was found. To clarify the cause of this relationship, monocytes were cultured with atherogenic modified low-density lipoprotein, causing accumulation of cholesterol in cultured cells. The accumulation of intracellular cholesterol had no effect neither on the secretion of cytokines nor on the expression of their genes. Therefore, individual differences in the activation capacity of monocytes is not determined by the accumulation of intracellular cholesterol caused by atherogenic lipoproteins. The data obtained can be explained by the individual characteristics of the immune response in different patients.

Key words: atherosclerosis; macrophage; monocyte; activation; inflammation; lipoproteins; lipids; individual profile

Моноциты и макрофаги являются важными клеточными элементами врожденного иммунитета, участвующими в атерогенезе [1, 2]. Несмотря на то, что в развитии атеросклероза участвует много типов клеток, моноциты-макрофаги играют ключевую роль [2—4]. Инфильтрация моноцитов в сосудистую стенку является ранним этапом атерогенеза. При этом моноциты прикрепляются к клеткам эндотелия, мигрируют в субэндотелиальное пространство (интиму) и дифференцируются в макрофаги [4, 5].

Классически активированные макрофаги (субпопуляция M1) могут быть получены путем стимуляции моноцитов липополисахаридом (ЛПС), а также воспалительным цитокином интерфероном- γ (ИФН- γ) или фактором некроза опухоли- α (ФНО- α). Их противовоспалительными коллегами являются альтернативно активированные макрофаги (субпопуляция M2). Фенотип M2 индуцируется интерлейкином (ИЛ)-4 и ИЛ-13, также M2 макрофаги экспрессируют рецептор маннозы (MR / CD206), ложный рецептор ИЛ-1R II и ИЛ-1. Маркерами M1 активации являются ИЛ-1 β , ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-12, ИЛ-23, хемокины CXCL9, CXCL10, CXCL11 [3, 6].

Оценивалась восприимчивость моноцитов, циркулирующих в крови здоровых лиц и пациентов с бессимптомным атеросклерозом сонных артерий, к M1 и M2 активации. Удивительно, но мы обнаружили резкие индивидуальные различия в степени активации моноцитов у различных пациентов, причем вне зависимости от наличия или отсутствия атеросклероза. Мы считаем, что полученные результаты очень важны, т.к. выявленные различия можно объяснить индивидуальными особенностями иммунного ответа у различных пациентов. Мы бы хотели представить результаты для широкого обсуждения.

Методика

Проведено кросс-секционное клиническое исследование, в котором приняли участие здоровые лица, условно здоровые люди с предрасположенностью к атеросклерозу, а также лица с доклиническим атеросклерозом. Участники исследования не имели клинических проявлений заболеваний атеросклеротического генеза (ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда в анамнезе, инсульт в анамнезе), не принимали кардиотропные и липидснижающие лекарственные средства, а также не имели сопутствующих хронических заболеваний, способных повлиять на результаты исследования (сахарный диабет, онкопатология, диффузные заболевания соединительной ткани, бронхиальная астма, эндокринные заболевания). Количественная диагностика преатеросклеротических и атеросклеротических состояний осуществлялась с помощью ультразвукового сканирования бассейна сонных артерий в режиме высокого разре-

шения с последующим измерением толщины интимо-медиального слоя (ТИМС) общих сонных артерий с использованием специализированного программного пакета M' Ath (ИМТ, Франция). Для оценки степени развития бессимптомного атеросклероза использовались имеющиеся данные о вариабельности ТИМС у условно здоровых лиц в российской популяции. Принадлежность к первой и второй квартилям распределения ТИМС при отсутствии возвышающихся поражений в любом из визуализируемых отделов бассейна сонных артерий расценивалась как норма (здоровые лица). Принадлежность к четвертой квартили распределения ТИМС при отсутствии возвышающихся поражений в любом из визуализируемых отделов бассейна сонных артерий расценивалась как предрасположенность к атеросклерозу. Принадлежность к третьей и четвертой квартилям распределения ТИМС при наличии возвышающихся поражений (более 10% просвета артерии) хотя бы в одном из визуализируемых отделов бассейна сонных артерий расценивалась как доклинический (бессимптомный) атеросклероз.

Для определения индивидуального профиля активации клеток, моноциты выделяли из цельной венозной крови с использованием магнитной сепарации CD14+ клеток (Miltenyi Biotec), которая обеспечивала высокую чистоту популяции клеток. Моноциты культивировали в стерильных 24-луночных планшетах в количестве 10^6 клеток на лунку с использованием бессывороточной среды X-Vivo (Lonza). Клетки культивировали при 37°C и 5% CO $_2$ в CO $_2$ -инкубаторе.

Функциональный анализ активации моноцитов заключался в измерении концентраций цитокинов, секретруемых клетками в стандартизированных условиях в ответ на провоспалительную стимуляцию ИФН- γ в концентрации 100 нг/мл или противовоспалительную стимуляцию 10 нг/мл ИЛ-4. Секреция ФНО- α рассматривалась как маркер провоспалительной активации моноцитов, а секреция CCL18 — как маркер противовоспалительной активации. Концентрации ФНО- α и CCL18 в культуральной среде измерялись твердофазным иммуно-ферментным анализом через 1 и 6 дней после стимуляции моноцитов соответственно.

Выделение ЛНП осуществлялось путем ультрацентрифугирования сыворотки крови и получения фракции плотностью от 1,019 до 1,065 г/мл.

Содержание внутриклеточного холестерина измеряли путем экстракции липидов из клеток в смеси гексана и изопропанола (отношение объемов 3:2), после чего концентрацию холестерина в экстракте измеряли ферментативно с использованием наборов Fluid test CHOL (Analyticon).

Статистический анализ результатов проводили с использованием программы IBM SPSS Statistics 20.0 (IBM).

Результаты и обсуждение

Моноциты были выделены из крови пациентов, относящихся к трем группам: люди с нормальной ТИМС, пациенты с увеличенной ТИМС и пациенты с атеросклеротическими бляшками. Степень активации М1 и М2 макрофагов определялась концентрацией в культуральной среде ФНО- α и ССЛ18 соответственно.

При сравнении средних значений концентраций ФНО- α и ССЛ18 для пациентов всех групп мы столкнулись разительными индивидуальными различиями. Эти индивидуальные различия были обнаружены как в пределах каждой из групп, так и во всей выборке. График Q-Q для всей выборки показывает, что индивидуальная восприимчивость моноцитов к активации варьирует, особенно для ССЛ18 (рис. 1). Если данные для ФНО- α имеют характер нормального распределения с относительно небольшим количеством выпадающих точек, соответствующих высоким значениям секреции ФНО- α , то распределение концентраций ССЛ18 можно считать нормальным в гораздо меньшей степени. Распределения внутри каждой из групп соответствуют распределению во всей выборке (данные не представлены).

Моноциты в раннем атеросклеротическом поражении могут мигрировать обратно в кровоток, возможно, выполняя функции обратного транспорта липидов [7]. Мы наряду с другими исследователями обнаружили в крови клетки, содержащие липиды [8—10]. У больных атеросклерозом было обнаружено две субпопуляции белых кровяных клеток. Первая популяция клеток содержала нормальное количество липидов, характерное для здоровых испытуемых, в то время как вторая популяция содержала в 4—8 раз больше внутриклеточных липидов [10]. Мы попытались найти взаимосвязь между количеством внутриклеточного холестерина в моноцитах и их способностью к активации.

Наблюдалась обратная связь между внутриклеточным уровнем холестерина и способностью моноцитов к активации, однако, коэффициенты корреляции не достигли статистической значимости (таблица).

Для того, чтобы выявить причину взаимосвязи между уровнем внутриклеточного холестерина моноцитов и их способностью к активации, были проведены эксперименты на первичной культуре моноцитов, культивируемых с атерогенными модифицированными липопротеидами низкой плотности (ЛНП). Как правило, ЛНП, выделенные из крови больных с документированным атеросклерозом, вызывают накопление холестерина в культивируемых клетках, в то время как ЛНП от здоровых доноров не влияют на уровень внутриклеточного холестерина [11—14]. Несмотря на то, что модифицированные ЛНП вызывали накопление холестерина в культивируемых моноцитах, они не оказывали влияния ни на секрецию цитокинов, ни на экспрессию соответствующих генов (рис. 2).

Таким образом, индивидуальные различия активированности моноцитов не определяются накоплением внутриклеточного холестерина, вызванного атерогенными модифицированными ЛНП. Поиск причин этих различий имеет огромное значение, поскольку таким образом можно выявить факторы, определяющие иммунный статус пациента.

Развитие данного направления исследования имеет практическую перспективу. Используемый в данной работе клеточный тест для оценки активированности моноцитов может стать основой для разработки и создания диагностического метода определения индивидуальной реакции врожденного иммунитета. Разумеется, эта клеточная модель может быть использована для широкого изучения ответа клеточного иммунитета на различные стимулы.

Было исследовано содержание холестерина в моноцитах, выделенных из крови испытуемых, разделенных на 3 группы в зависимости от выраженности атеросклероза в сонной артерии. Во время посева клеток в культуру добавляли ИФН- γ или ИЛ-4 в культуральную среду. Концентрацию ФНО- α в культуральной среде определяли через 24 часа после добавления в среду ИФН- γ , а ССЛ18 — через 6 дней после добавления ИЛ-4. Коэффициенты корреляции между содержанием внутриклеточного холестерина в моноцитах и их способностью к активации определяли по Пирсону. Значения P приведены в скобках.

Таблица

Коэффициенты корреляции между содержанием внутриклеточного холестерина в моноцитах и их способностью к активации

| Группа пациентов | ФНО- α , базальная секреция | ФНО- α , стимулированная секреция | ФНО- α , стимулированная/ базальная секреция | ССЛ18, стимулированная секреция |
|------------------|------------------------------------|--|---|---------------------------------|
| 1 (n = 38) | 0,061 (0,718) | 0,125 (0,455) | 0,145 (0,385) | 0,046 (0,785) |
| 2 (n = 34) | 0,236 (0,179) | 0,057 (0,748) | 0,148 (0,404) | 0,058 (0,746) |
| 3 (n = 29) | 0,173 (0,369) | 0,035 (0,858) | 0,158 (0,412) | 0,179 (0,353) |
| Всего (n = 101) | 0,064 (0,528) | 0,052 (0,609) | 0,105 (0,295) | 0,019 (0,849) |

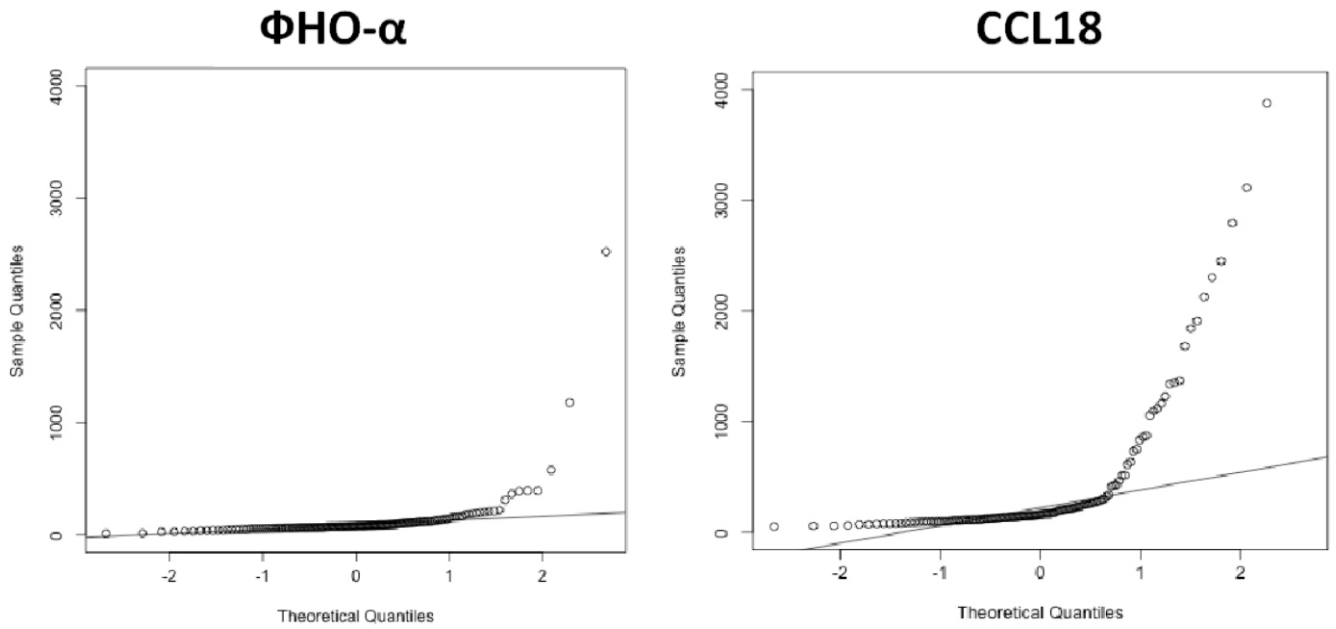


Рис. 1. График Q-Q для активируемости моноцитов.

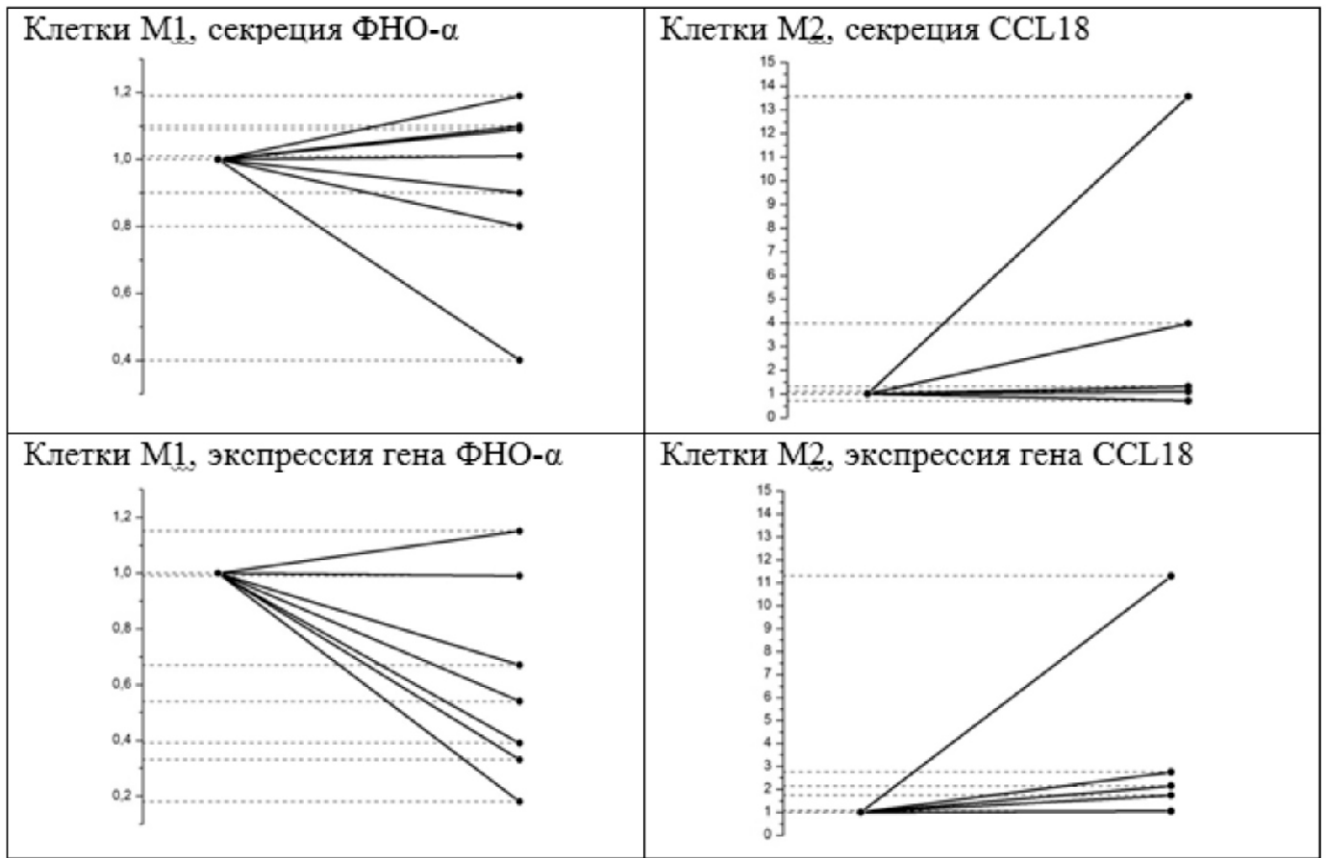


Рис. 2. Инкубация моноцитов с атерогенными модифицированными ЛНП.

Во время посева клеток в культуру добавляли ИФН- γ или ИЛ-4 в культуральную среду. Концентрацию ФНО- α в культуральной среде определяли через 24 часа после добавления в среду ИФН- γ , а ССЛ18 — через 6 дней после добавления ИЛ-4. Атерогенные модифицированные ЛНП были выделены из крови пациентов с документированным атеросклерозом. Нативные ЛНП были выделены из крови здоровых доноров. Нативные ЛНП не вызывали накопления внутриклеточного холестерина в культивируемых моноцитах, в то время как атерогенные ЛНП вызывали 1,7-2,0 кратное увеличение содержания внутриклеточного холестерина. Нативные, либо модифицированные ЛНП добавлялись в культуру моноцитов непосредственно после их выделения. Для оценки эффекта модифицированных ЛНП в каждом эксперименте каждый параметр в случае добавления нативных ЛНП был принят за 1,0. Графики отражают данные отдельных экспериментов, проведенных на моноцитах, выделенных из крови различных испытуемых.

Работа проведена при финансовой поддержке Российской Федерации в лице Министерства образования и науки России (проект RFMEF161614X0021).

Список литературы

1. Ажунова ТА, Николаев СМ, Буряева ЛБ, Дашев ДБ, Банзаракшеева СА. Гиполипидемия, антиоксидантное и антикоагулянтное действие соединения камфора-25. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2009; 2: 16-9.
2. Libby P, Ridker PM, Hansson GK; Leducq Transatlantic Network on Atherothrombosis. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol.* 2009; Dec 1;54 (23): 2129-38.
3. Гервазиева ВБ, Самоіликов ПВ, Сверановскаиа ВВ. IgE-аутоантитела у больных с атопическим дерматитом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2009; 1: 19-22.
4. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; Sep; 32(9): 2045-51.
5. Федоров ВН, Пынегова НВ. Влияние ecdysterone-80 на посредника гормонального баланса и липидного обмена у крыс с хронической сердечной недостаточностью. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2009; 2:14-6.
6. De Paoli F, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. Macrophage phenotypes and their modulation in atherosclerosis. *Circ J.* 2014; 78(8): 1775-81.
7. Gerrity RG. The role of the monocyte in atherogenesis: II. Migration of foam cells from atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 1981; 103(2): 191-200.
8. Gaudreault N, Kumar N, Posada JM, Stephens KB, Reyes de Mochel NS, Eberle D, Olivas VR, Kim RY, Harms MJ, Johnson S, Messina LM, Rapp JH, Raffai RL. ApoE suppresses atherosclerosis by reducing lipid accumulation in circulating monocytes and the expression of inflam-

matory molecules on monocytes and vascular endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; Feb;32(2): 264-72.

9. Querfeld U, Wendtland J, von Hodenberg E, Mehls O. Lipid levels in monocytes of patients with moderate hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis.* 1992; Jun; 94(2-3): 129-34.

10. Tertov VV, Kalenich OS, Orekhov AN. Lipid-laden white blood cells in the circulation of patients with coronary heart disease. *Experimental and Molecular Pathology.* 1992; 57(1): 22-8.

11. Orekhov AN, Bobryshev YV, Sobenin IA, Melnicenko AA, Chistiakov DA. Modified low density lipoprotein and lipoprotein-containing circulating immune complexes as diagnostic and prognostic biomarkers of atherosclerosis and type 1 diabetes macrovascular disease. *International Journal of Molecular Sciences.* 2014; 15(7): 12807-41.

12. Orekhov AN, Tertov VV, Mukhin DN. Desialylated low density lipoprotein — naturally occurring modified lipoprotein with atherogenic potency. *Atherosclerosis.* 1991; 86(2): 153-61.

13. Tertov VV, Bittolo-Bon G, Sobenin IA, Cazzolato G, Orekhov AN, Avogaro P. Naturally occurring modified low density lipoproteins are similar if not identical: more electro-negative and desialylated lipoprotein subfractions. *Experimental and Molecular Pathology.* 1995; 62(3): 166-72.

14. Tertov VV, Sobenin IA, Tonevitsky AG, Orekhov AN, Smirnov VN. Isolation of atherogenic modified (desialylated) low density lipoprotein from blood of atherosclerotic patients: separation from native lipoprotein by affinity chromatography. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1990; 167(3): 1122-7.

Поступила 24.02.15

References

1. Azhunova TA, Nikolaev SM, Buraeva LB, Dashiev DB, Banzaraksheeva SA. Hypolipidemic, anti-oxidant and anticoagulant action of camphor-25 compound. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2009; 2: 16-9. PubMed PMID: 19537335. (in Russian)
2. Libby P, Ridker PM, Hansson GK; Leducq Transatlantic Network on Atherothrombosis. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol.* 2009; 1;54(23): 2129-38.
3. Gervazieva VB, Samoіlikov PV, Sveranovskaia VV. IgE-autoantibodies in patients with atopic dermatitis. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2009;(1):19-22. PubMed PMID: 19382619. (in Russian)
4. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; Sep;32(9):2045-51.
5. Fedorov VN, Pynegovna NV. Influence of ecdysterone-80 on the hormonal-mediator balance and lipid metabolism in rats with chronic cardiac failure. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2009 ; 2:14-6. PubMed PMID: 19537334. (in Russian)
6. De Paoli F, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. Macrophage phenotypes and their modulation in atherosclerosis. *Circ J.* 2014; 78(8): 1775-81.
7. Gerrity RG. The role of the monocyte in atherogenesis: II. Migration of foam cells from atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 1981; 103(2): 191-200.
8. Gaudreault N, Kumar N, Posada JM, Stephens KB, Reyes de Mochel NS, Eberle D, Olivas VR, Kim RY, Harms MJ, Johnson S, Messina LM, Rapp JH, Raffai RL. ApoE suppresses atherosclerosis by reducing lipid accumula-

tion in circulating monocytes and the expression of inflammatory molecules on monocytes and vascular endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32(2): 264-72.

9. Querfeld U, Wendtland J, von Hodenberg E, Mehls O. Lipid levels in monocytes of patients with moderate hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis.* 1992; 94(2-3): 129-34.

10. Tertov VV, Kalenich OS, Orekhov AN. Lipid-laden white blood cells in the circulation of patients with coronary heart disease. *Experimental and Molecular Pathology.* 1992; 57(1): 22-8.

11. Orekhov AN, Bobryshev YV, Sobenin IA, Melnicenko AA, Chistiakov DA. Modified low density lipoprotein and lipoprotein-containing circulating immune complexes as diagnostic and prognostic biomarkers of atherosclerosis and type 1 diabetes macrovascular disease. *International Journal of Molecular Sciences.* 2014; 21; 15(7): 12807-41.

12. Orekhov AN, Tertov VV, Mukhin DN. Desialylated low density lipoprotein — naturally occurring modified li-

poprotein with atherogenic potency. *Atherosclerosis.* 1991; 86(2): 153-61.

13. Tertov VV, Bittolo-Bon G, Sobenin IA, Cazzolato G, Orekhov AN, Avogaro P. Naturally occurring modified low density lipoproteins are similar if not identical: more electronegative and desialylated lipoprotein subfractions. *Experimental and Molecular Pathology.* 1995; 62(3): 166-72.

14. Tertov VV, Sobenin IA, Tonevitsky AG, Orekhov AN, Smirnov VN. Isolation of atherogenic modified (desialylated) low density lipoprotein from blood of atherosclerotic patients: separation from native lipoprotein by affinity chromatography. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1990; 167(3): 1122-7.

Received 24.02.15

Сведения об авторах:

Макеев Всеволод Юрьевич, доктор ф.-м.н., зав. лаб. системной биологии и вычислительной генетики

Елизова Наталья Владимировна, аспирант Федерального государственного бюджетного учреждения «НИИ общей патологии и патофизиологии»

Орехов Александр Николаевич, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. ангиопатологии ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»