

УДК 616.13-004.6-616.155.33-576.8.094.7

# Цитофлуориметрическое изучение мембранных рафтов на субпопуляциях моноцитов человека при атеросклерозе

М. А. Челомбитко<sup>1,2\*</sup>, В. С. Шишкина<sup>1,2</sup>, О. П. Ильинская<sup>1</sup>, А. И. Каминный<sup>2</sup>, Т. О. Павлунина<sup>2</sup>, Н. Н. Самовилова<sup>2</sup>, Е. В. Грачева<sup>2</sup>, Э. М. Тарарак<sup>2</sup>, Н. В. Проказова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

<sup>2</sup>Российский кардиологический научно-производственный комплекс Министерства здравоохранения РФ, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

\*E-mail: atma69@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.05.2014

**РЕФЕРАТ** Моноциты периферической крови больных атеросклерозом преактивированы и обладают некоторыми чертами тканевых макрофагов. Их адгезия к эндотелию в 1.5 раза выше, чем у моноцитов здоровых субъектов, и они экспрессируют ряд рецепторов и антигенов, характерных для тканевых макрофагов. В дополнение к этому ранее мы показали, что в моноцитах крови больных атеросклерозом, так же как и при *in vitro*-дифференцировке моноцитов в макрофаги, значительно активируется биосинтез ганглиозидов, главная функция которых – формирование мембранных рафтов. В настоящей работе мы исследовали экспрессию мембранных рафтов на различных субпопуляциях моноцитов в норме и при атеросклерозе. Моноциты больных атеросклерозом, как показано методом проточной цитометрии, отличались от моноцитов здоровых субъектов двукратным увеличением процентного содержания промежуточной субпопуляции (CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup>) и повышением экспрессии фракталкинового рецептора CX3CR1 на промежуточной и неклассической субпопуляциях (CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup> и CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup>) (в 2.3 и 1.8 раза соответственно). Это свидетельствует о преактивированном состоянии моноцитов больных. В то же время экспрессия маркера мембранных рафтов была одинаковой на субпопуляциях моноцитов обеих исследованных групп. Однако изучение *in vitro* дифференцировки моноцитов в макрофаги показало, что уже на первые сутки культивирования экспрессия мембранных рафтов повышалась в 2 раза и к 7-му дню возрастала в 3 раза в сравнении со свежевыделенными моноцитами. Таким образом, можно предположить, что при атеросклерозе моноциты накапливают ганглиозиды, которые используются для формирования мембранных рафтов при макрофагальной дифференцировке моноцитов после их миграции в интиму артерий.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** атеросклероз, макрофаги, мембранные рафты, проточная цитометрия, субпопуляции моноцитов.

## ВВЕДЕНИЕ

Моноциты – клетки иммунной системы, играющие ключевую роль в формировании врожденного и приобретенного иммунитета. Моноциты крови человека морфологически и функционально гетерогенны, и на основании дифференциальной экспрессии CD14 (компонент рецепторного комплекса, распознающего бактериальные липополисахариды) и CD16 (FcγRIII – низкоаффинный рецептор к Fc-фрагменту IgG) можно выделить несколько субпопуляций [1, 2]. Недавно Комитет по номенклатуре Международного союза иммунологов и ВОЗ приняли официальную номенклатуру, согласно которой предложено разде-

лять моноциты на три субпопуляции: классическую (CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup>), промежуточную (CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup>) и неклассическую (CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup>) (процентное содержание субпопуляций: 83-85, 4-5 и 7-11% соответственно) [3, 4].

В клинических и экспериментальных исследованиях показано существенное увеличение количества моноцитов промежуточной и неклассической субпопуляций при инфекционных, аутоиммунных и воспалительных заболеваниях, что может свидетельствовать о провоспалительном характере их активности [5]. Кроме того, моноциты этих популяций являются главными продуцентами провоспа-

лительных цитокинов – фактора некроза опухолей (TNF) и интерлейкина-12 (IL-12) [6]. В патогенезе атеросклероза моноциты играют критическую роль, так как после привлечения в обогащенные липидами и липопротеинами области интимы артерий они под влиянием макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF), продуцируемого активированным эндотелием, дифференцируются в макрофаги. Последние поглощают окисленные липопротеины и другие липиды и образуют насыщенные липидами пенистые клетки – главные клетки атеросклеротических бляшек [7]. Отмечено также, что при атеросклерозе значительно повышается относительное содержание моноцитов минорных субпопуляций [8, 9]. Установлено, что в периферической крови больных атеросклерозом моноциты преактивированы и обладают некоторыми чертами макрофагов. Их адгезия к эндотелию в 1.5 раза выше, чем моноцитов здоровых субъектов, и они экспрессируют ряд рецепторов (Fcγ-рецептор типа I и II, ICAM) и повышенный уровень МНС II, что характерно для тканевых макрофагов [10–12]. В дополнение к этому мы ранее показали, что в циркулирующих моноцитах больных атеросклерозом биосинтез и содержание ганглиозидов значительно выше, чем в моноцитах здоровых субъектов, так же как и при *in vitro*-дифференцировке моноцитов в макрофаги [13, 14].

Ганглиозиды – гликофинголипиды, содержащие сиаловые кислоты, играют активную роль в образовании, стабилизации, динамике и биологических функциях мембранных рафтов. Благодаря присутствию в их молекуле амидной связи и массивного углеводного фрагмента они с помощью большого количества водородных связей образуют в клеточных мембранах конгломераты с холестерином, сфингомиелином и рецепторными белками, так называемые мембранные микродомены (рафты), которые могут легко перемещаться в плоскости фосфолипидного слоя мембраны [15]. Таким образом, ганглиозиды в составе рафтов участвуют в процессах рецепции, адгезии, клеточной подвижности, апоптоза. Их качественный и количественный состав резко изменяется при дифференцировке и трансформации клеток.

Известно, что при активации лимфоцитов многие рецепторы транспортируются в рафты, где приобретают активную конформацию и образуют комплексы с корецепторами и другими вспомогательными белками. Рецепторные фосфатидилинозит-заякоренные белки, как и миристоилированные и пальмитоилированные белки, являются постоянными составляющими этих мембранных структур, обогащенных сфинголипидами и холестерином. Кроме того, в рафты индуктивно привлекаются трансмембранные белки,

формируя таким образом фокусы рецепции и адгезии [16].

В настоящей работе с целью выяснения механизма преактивации моноцитов при атеросклерозе с помощью метода проточной цитометрии мы провели сравнительное изучение экспрессии мембранных рафтов на различных субпопуляциях моноцитов из крови больных атеросклерозом и у здоровых субъектов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Объект исследования

В настоящей работе использовали образцы периферической крови, полученные в клинике ФГБУ «РКНПК» Минздрава России от больных с ангиографически подтвержденным атеросклерозом коронарных артерий ( $n = 25$ ) и клинически здоровых доноров ( $n = 15$ ). Во всех случаях получено информированное согласие больных. Средний возраст здоровых субъектов составил  $25 \pm 3$  года, средний возраст больных –  $55 \pm 8$  лет. Поскольку атеросклероз характерен практически для всех лиц пожилого возраста, то в контрольную группу (здоровых субъектов) вошли заведомо более молодые люди.

### Выделение и цитофлуориметрический анализ мононуклеарных лейкоцитов периферической крови человека

Мононуклеарные лейкоциты из периферической крови выделяли традиционным методом в градиенте плотности Ficoll-Paque™ PLUS (1.077 г/л) (Amersham Biosciences, США). Для этого венозную кровь, собранную в пробирки с 6% раствором EDTA (0.5 мл раствора EDTA на 10 мл крови), центрифугировали при 400 *g* в течение 30 мин. К осадку на дне пробирки, содержащему форменные элементы крови, добавляли фосфатно-солевой буфер (ФСБ) до исходного объема и тщательно ресуспендировали. Полученную суспензию аккуратно наслаивали на Ficoll-Paque™ PLUS в соотношении 2.5 : 1 и центрифугировали при 400 *g* в течение 30 мин. Интерфазное кольцо, содержащее мононуклеарные клетки крови, собирали и дважды отмывали в ФСБ.

Экспрессию поверхностных маркеров мононуклеарных лейкоцитов анализировали с помощью тройного иммунофлуоресцентного окрашивания. Мембранные рафты выявляли с помощью В-субъединицы холерного токсина, конъюгированной с Alexa Fluor® 488 (Vybrant® Lipid Raft Labeling Kit, Molecular Probes, Inc.). Поверхностные рецепторы выявляли специфическими флуоресцентно мечеными мышиными моноклональными антителами: CD14-PC5 (Beckman Coulter Inc.), CD16-PE (Beckman Coulter Inc.), CD16-FITC (Beckman Coulter

Inc.), CCR5-PE (eBioscience Inc.), CX3CR1-PE (R&D Systems) и TLR-4-PE (eBioscience). К полученному после отмывки осадку добавляли ФСБ (pH 7.2), содержащий 1% бычий сывороточный альбумин (BSA), из расчета 100 мкл раствора на пробу. Клетки ресуспендировали и переносили по 100 мкл суспензии в микропробирки объемом 2 мл. Пробы, содержащие В-субъединицу холерного токсина (СТВ), конъюгированную с Alexa Fluor 488, инкубировали в течение 10 мин; остальные пробы инкубировали в течение 30 мин в темноте при +4°C. Далее в каждую пробу добавляли по 300 мкл 1% формалина, суспензию анализировали методом проточной цитофлуориметрии. В качестве изотипического контроля применяли мышиные иммуноглобулины IgG-изотипа, меченные красителями, аналогичными метке используемых моноклональных антител.

Цитофлуориметрические исследования проводили на проточном лазерном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием единых настроек прибора для всех образцов. Для анализа и визуализации данных цитофлуориметрии применяли программное обеспечение Summit V3.1 Built 844 (Cytomation Inc., США). Область моноцитов выделяли по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния. Общую популяцию моноцитов выделяли по CD14 в комбинации с SSC. Моноциты были разделены по уровню экспрессии рецепторов CD14 и CD16 на три субпопуляции: CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup>, CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup> и CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup>. Отдельно для каждой субпопуляции оценивали уровень экспрессии рецепторов CCR2, TLR4 и CX3CR1 по средней интенсивности флуоресценции (СИФ).

#### **Культивирование и иммуноцитохимический анализ мононуклеарных клеток здоровых субъектов**

Часть выделенных мононуклеарных клеток здоровых субъектов высевали на дно или стекла в чашки Петри (ø 60 мм) в концентрации 2–2.5 млн/мл в ростовой среде X-VIVO-10 (Lonza Biosciences, США), содержащей 2 мМ L-глутамин, 0.01% фунгизона, 1% смеси пенициллин/стрептомицин (реактивы производства Sigma) и 10 нг/мл M-CSF (Biosource) [13].

Динамику изменений коэкспрессии мембранных рафтов и различных маркеров моноцитов (CD14, CD16) и маркера дифференцировки моноцитов в макрофаги (CD206) анализировали на разных сроках культивирования (1-, 4- и 7-е сутки) с помощью тройного иммунофлуоресцентного окрашивания с использованием специфических флуоресцентно меченных мышиных моноклональных антител: CD14-PC5, CD16-PE, CD206-PE (все Beckman Coulter, США). Рафты выявляли с помощью В-субъединицы холер-

ного токсина, конъюгированной с Alexa Fluor 488. Для этого клетки открепляли от пластиковой подложки резиновым скрабером и центрифугировали при 400 g в течение 10 мин. Далее клетки окрашивали по описанной выше методике и анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson).

Динамику изменений коэкспрессии мембранных рафтов с различными маркерами моноцитов и макрофагов на разных сроках культивирования (4-, 7- и 12-е сутки культивирования) анализировали с помощью двойного иммунофлуоресцентного окрашивания. Для этого клетки, высаженные на стекла, окрашивали с помощью В-субъединицы холерного токсина, конъюгированной с Alexa Fluor 488, и антител, конъюгированных с фикоэритрином (PE) (для выявления CD14-, CD16-, CD206-положительных клеток), и инкубировали в течение 30 мин при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. После этого клетки трижды отмывали в теплой среде и фиксировали 10% формалином в течение 10 мин. Затем препараты заключали в глицерин-желатин и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM 5000B (фильтры BP 450-490, LP 515 и BP 515-560, LP 590), оснащенного цифровой фотокамерой DC 420 и системой для анализа изображения. В качестве изотипического контроля использовали IgG, конъюгированные с R-PE, того же подкласса, что и специфические антитела.

#### **Статистический анализ**

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программ Excel, Statistica 7.0. Для оценки статистической значимости межгрупповых различий использовали двусторонний U-критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия при  $P < 0.05$ . Данные представлены в виде среднего арифметического значения и его стандартного отклонения ( $M \pm SD$ ).

#### **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

##### **Цитофлуориметрический анализ субпопуляций моноцитов больных и здоровых субъектов**

Моноциты и их субпопуляции идентифицировали методом проточной цитофлуориметрии по параметрам прямого и бокового светорассеяния и по уровню экспрессии поверхностных маркеров CD14 и CD16. Стратегия гейтирования, использованная для идентификации субпопуляций классических (CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup>), промежуточных (CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup>) и неклассических (CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup>) субпопуляций моноцитов, представлена на рис. 1А-В. Полученные цитофлуорограммы и процентное соотношение

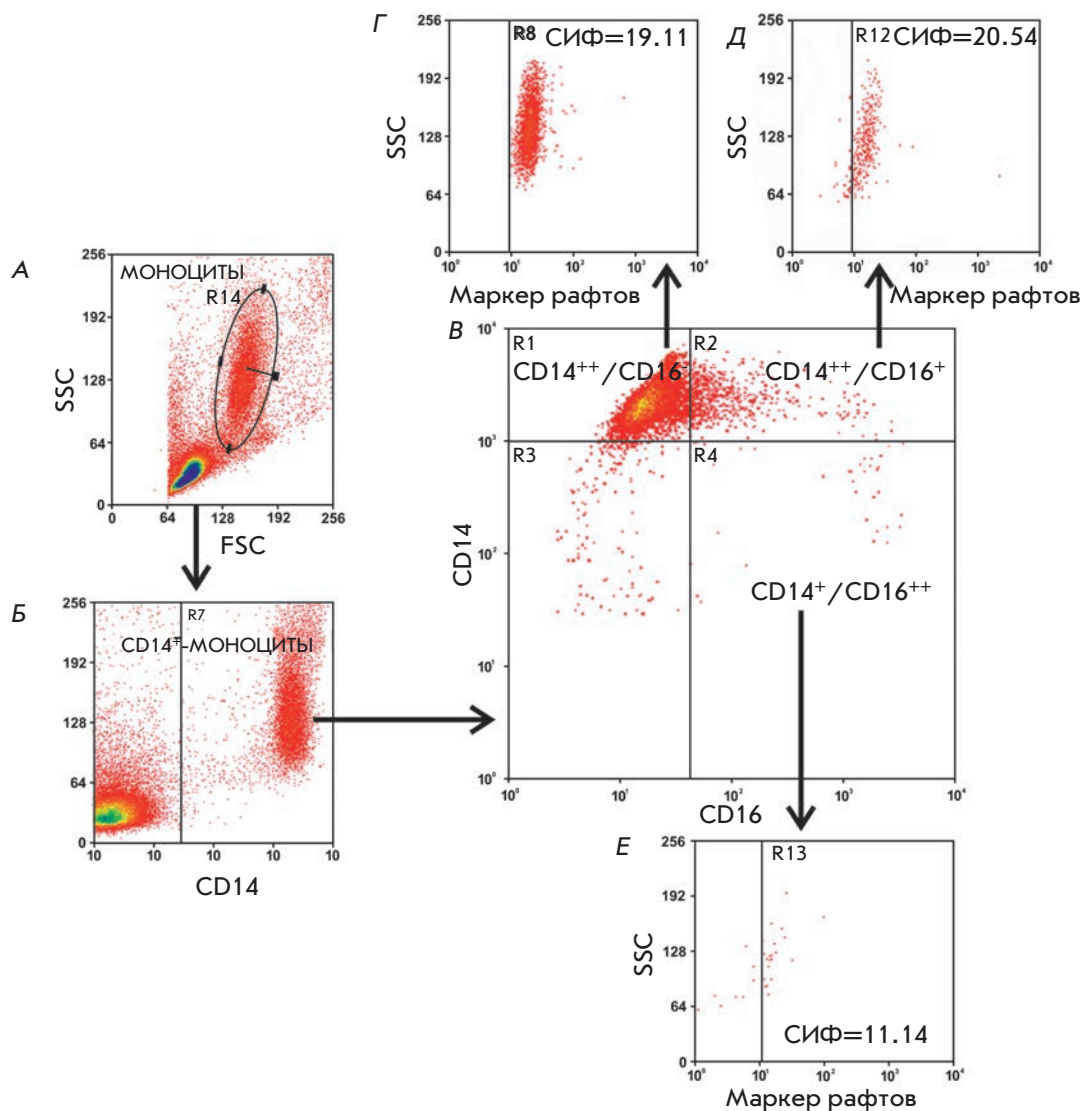


Рис. 1. Многоэтапное гейтирование при анализе субпопуляций моноцитов. А – выделение области моноцитов по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния; Б – гейтирование общей популяции по CD14-положительным событиям; В – идентификация субпопуляций моноцитов по уровню экспрессии поверхностных маркеров CD14 и CD16; Г–Е – гейтирование при анализе экспрессии различных рецепторов и мембранных рафтов на субпопуляциях моноцитов по параметрам SSC и положительным событиям (на примере маркера рафтов GM1)

субпопуляций соответствуют опубликованным данным [3, 4].

На рис. 1Г-Е приведены результаты цитофлуориметрического анализа мембранных рафтов на субпопуляциях моноцитов с помощью моноклональных антител к CD14 и CD16 и В-субъединицы холерного токсина, выявляющей мембранные рафты. Для обнаружения рафтов на мембранах целых клеток мы применили широко используемый метод, основанный на очень высоком сродстве ( $10^{-12}$  М) В-субъединицы холерного токсина к ганглиозиду GM1. Метод заключается в их взаимодействии на клеточной мембране, хотя содержание этого ганглиозида по сравнению с другими ганглиозидами в плазматической мембране клеток крови мало [17]. Таким образом, использование GM1 в качестве маркера рафтов связано не столько с его важностью для структуры рафтов,

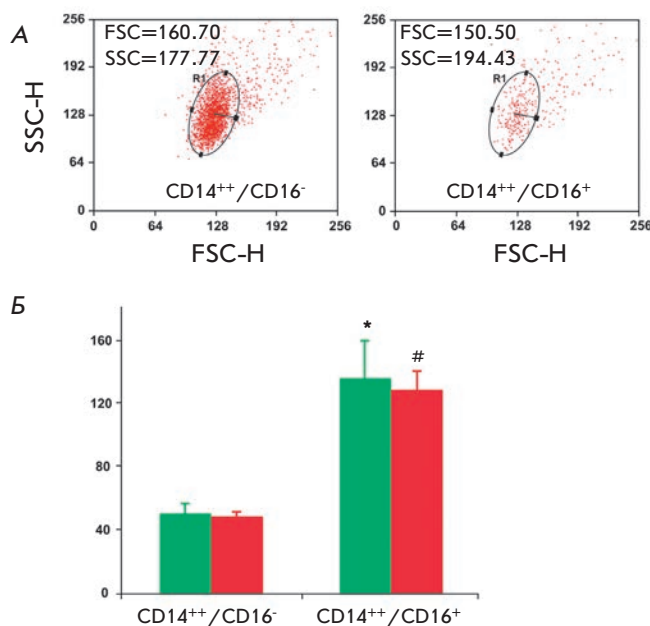
сколько с доступностью как реагента [18]. Анализ результатов, проведенный с помощью программного обеспечения Summit V3.1 Built 844, показал, что все субпопуляции моноцитов экспрессировали GM1 – маркер мембранных рафтов (рис. 1Г-Е).

Отметим, что наши данные отчасти противоречат результатам, полученным ранее Moreno-Altamirano и соавт. [19], которые на основании экспрессии рафтов разделили моноциты здоровых лиц на две популяции – CD14<sup>+</sup>/GM1<sup>+</sup> (95.5% с низкой экспрессией рафтов) и CD14<sup>+</sup>/GM1<sup>++</sup> (2.5% с высокой экспрессией рафтов). При анализе рафтов они, как и мы, использовали флуоресцентно меченную В-субъединицу холерного токсина. Мы наблюдали иную картину (рис. 1Г-Е): классическая и промежуточная субпопуляции моноцитов обладали одинаковой экспрессией рафтов, низкая экспрессия была характерна только

для неклассической субпопуляции. Такое противоречие может определяться использованием Moreno-Altamirano и соавт. иной стратегии гейтирования. Действительно, как показывают данные *рис. 2А,Б*, по характеристикам гранулярности (SSC) и размера (FSC), которые отличались от показателей моноцитов внутри гейта, нами были выявлены так называемые внегейтовые классическая (CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup>) и промежуточная (CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup>) субпопуляции моноцитов. При этом последняя субпопуляция обладала более высокой экспрессией маркера рафтов, чем классическая. Наиболее вероятно, что, в отличие от нас, Moreno-Altamirano и соавт. [19], скорее всего, учитывали клетки внегейтовых популяций. Моноциты внегейтовых популяций в равных количествах наблюдались нами как у больных, так и у здоровых субъектов (*рис. 2Б*). Свойства и функции этой популяции нуждаются в дальнейшем изучении.

На *рис. 3А,Б* представлены типичные цитофлуорограммы субпопуляций моноцитов здорового человека и больного атеросклерозом. Данные *рис. 3В* показывают, что у больных атеросклерозом значительно повышено процентное содержание моноцитов промежуточной субпопуляции ( $20.7 \pm 7.0\%$ ) и снижено содержание моноцитов классической субпопуляции ( $68.6 \pm 7.9\%$ ) по сравнению со здоровыми субъектами ( $12.8 \pm 3.4$  и  $74.8 \pm 7.6\%$  соответственно). Таким образом, при атеросклерозе, по-видимому, происходит перераспределение субпопуляций моноцитов – увеличивается доля моноцитов с промежуточным фенотипом (CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup>) за счет снижения доли главной субпопуляции классических моноцитов (CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup>). Содержание моноцитов неклассической субпопуляции у больных и здоровых было одинаковым.

Полученные данные согласуются с результатами ряда исследований, посвященных изучению субпопуляций моноцитов при атеросклерозе. Так, установлено, что высокий уровень моноцитов промежуточной субпопуляции (CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup>) связан с повышением индекса массы тела и увеличением толщины комплекса интима-медиа. Клинические данные свидетельствуют о более высоком содержании моноцитов CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup> и суммарной популяции CD16<sup>+</sup>-моноцитов у пациентов с ишемической болезнью по сравнению со здоровыми субъектами. Увеличение количества моноцитов CD16<sup>+</sup>-субпопуляций было связано с преобладанием нестабильных бляшек в коронарных артериях и неблагоприятным прогнозом при ишемической болезни сердца [3, 6, 20]. Следует также подчеркнуть, что до недавнего времени во многих клинических исследованиях CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup> и CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup>-субпопуляции моноцитов анализировали вместе, так как не был принят стандартный протокол гейтирования при анализе цитофлуори-



**Рис. 2.** Субпопуляции клеток крови здорового субъекта, располагающиеся вне гейта моноцитов. А – характеристика субпопуляций CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup> и CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup>-клеток по гранулярности (SSC) и размерам (FSC); Б – сводные данные по интенсивности флуоресценции маркера рафтов (GM1) на CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup> и CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup>-клетках у 15 здоровых субъектов (зеленые столбики) и 25 больных атеросклерозом (красные столбики). Значения представлены в виде  $M \pm SD$ . \*# $P < 0.5$

метрических данных для выделения субпопуляций моноцитов. Это не позволяло сделать однозначный вывод о роли отдельных CD16<sup>+</sup>-субпопуляций в патогенезе атеросклероза. Как видно из данных *рис. 3В*, значимых различий в процентном содержании моноцитов неклассической субпопуляции у здоровых субъектов и у больных атеросклерозом не выявлено.

### Экспрессия рецепторов цитокинов на субпопуляциях моноцитов

Хемокины и их рецепторы выполняют функцию специфического привлечения различных субпопуляций моноцитов в область воспаления [21]. Известно, что популяции моноцитов различаются по экспрессии хемокиновых рецепторов [22]. Например, классическая субпопуляция CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup> характеризуется высоким уровнем CCR2 – рецептора хемоаттрактантного белка-1 моноцитов (MCP-1), умеренной экспрессией CX3CR1 – рецептора фракталкина и низким уровнем CCR5 – рецептора воспалительных цитокинов CCL3, CCL4, CCL8, CCL3.

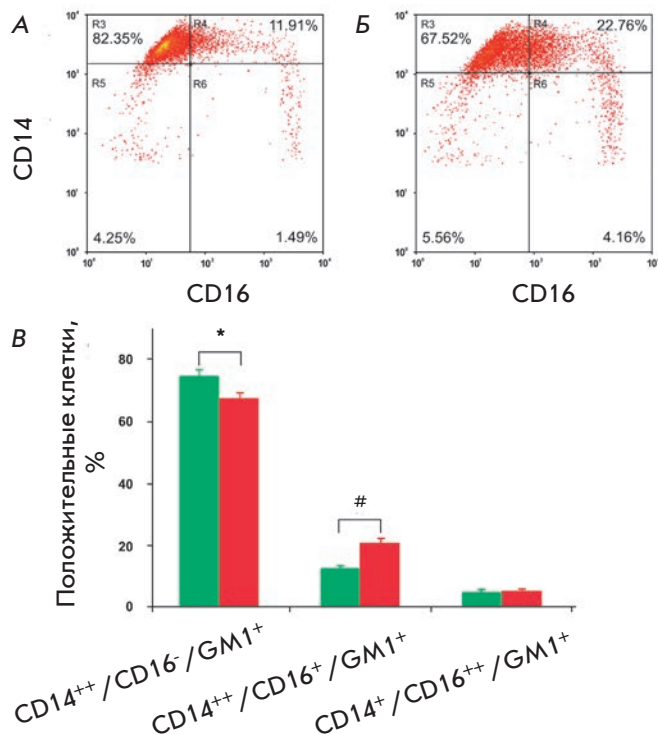


Рис. 3. Субпопуляции моноцитов здоровых субъектов и больных атеросклерозом. Типичные цитофлуорограммы субпопуляций моноцитов здорового субъекта (А) и больного атеросклерозом (Б); В – сводные данные по процентному соотношению субпопуляций моноцитов у 15 здоровых субъектов (зеленые столбики) и 25 больных атеросклерозом (красные столбики). Значения представлены в виде  $M \pm SD$ . \* $P < 0.05$

CD16<sup>+</sup>-субпопуляции негативны по CCR2, экспрессируют высокий уровень CX3CR1- и CCR5-рецепторов. Также установлено, что эти два рецептора играют заметную роль в формировании атеросклеротических поражений, так как их лиганды найдены в атеросклеротических бляшках и экспрессируются эндотелиальными клетками после их активации цитокинами [23, 24]. В связи с этим методом проточной цитофлуориметрии с тройным окрашиванием моноклональными антителами мы изучили экспрессию CCR5, CX3CR1 и общего для всех моноцитов рецептора LPS (TLR-4) на моноцитах здоровых субъектов и больных атеросклерозом. Не выявлено значимых различий в экспрессии CCR5 и TLR-4 между всеми субпопуляциями моноцитами больных атеросклерозом и здоровых субъектов (данные не приведены).

Экспрессия CX3CR1 (рецептора фракталкина) на промежуточной и неклассической субпопуляциях была выше, чем на классических моноцитах, что согласуется с представлениями о его локализации на CD16<sup>+</sup>-моноцитах [23]. При этом у больных обе

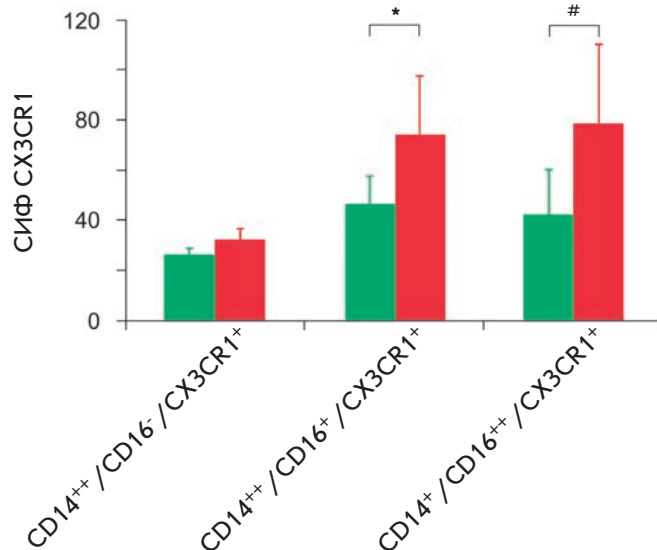


Рис. 4. Экспрессия рецептора фракталкина (CX3CR1) на различных субпопуляциях моноцитов у 15 здоровых субъектов и 25 больных атеросклерозом. Различия статистически значимы для CD16<sup>+</sup>-клеток здоровых субъектов (зеленые столбики) и больных атеросклерозом (красные столбики). Значения представлены в виде  $M \pm SD$ .  $P < 0.05$

CD16<sup>+</sup>-субпопуляции моноцитов имели в 2 раза более высокую интенсивность флуоресценции CX3CR1, чем моноциты здоровых субъектов (рис. 4).

Показана однозначная роль CX3CR1/CX3CL1 в формировании атеросклеротических поражений сосудов человека и при экспериментальном атеросклерозе у мышей [24]. Таким образом, полученные нами данные подтверждают результаты предыдущих исследований.

#### Экспрессия липидных рафтов на субпопуляциях моноцитов

Ранее мы установили, что в моноцитах крови больных атеросклерозом значительно активируется биосинтез ганглиозидов, главная функция которых – формирование липидных рафтов [15]. На этом основании мы предположили, что преактивация циркулирующих моноцитов при атеросклерозе сопровождается повышением количества липидных рафтов, необходимых для функционирования мембранных белков.

Ранее было показано, что многие антигены и рецепторы моноцитов, такие, как CD14, CD32, CD64, CD11/CD18, главный комплекс гистосовместимости класса II (МНС II) являются постоянными составляющими мембранных рафтов [25, 26]. При активации моноцитов в плазматическую мембрану транс-

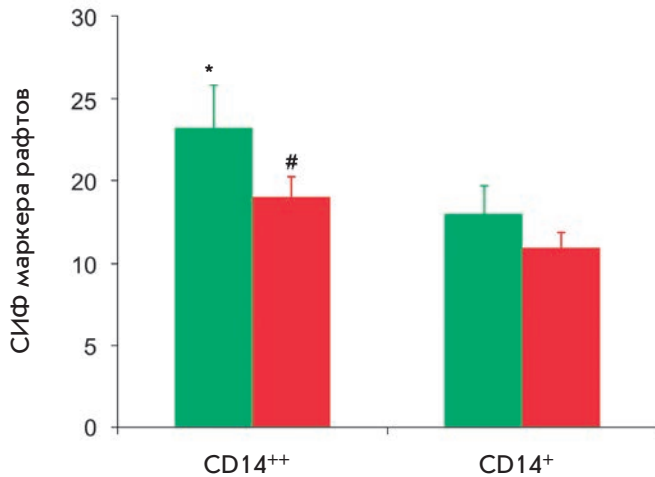


Рис. 5. Сводные данные по средней интенсивности флуоресценции (СИФ) для маркера рафтов (GM1) на субпопуляциях моноцитов 15 здоровых доноров (зеленые столбики) и 25 больных атеросклерозом (красные столбики). Значения представлены в виде  $M \pm SD$ . \* $P < 0.05$

портируются дополнительные белковые молекулы. Например, в определенных условиях CD16 мобилизуется из цитозольных депо в мембранные рафты [27]. Для активации и функционирования моноцитов необходима интеграция отдельных рафтов в большие платформы с привлечением дополнительных белковых компонентов [28, 29]. Разрушение рафтов обработкой клеток нистатином или метилциклодекстрином (реагентами, связывающими холестерин), наоборот, приводит к утрате ассоциации рецепторов в липидных платформах и, как следствие, к нарушению проведения сигналов и клеточных ответов на специфичные лиганды [10].

Как можно видеть из данных, приведенных на рис. 3B, процентное соотношение между субпопуляциями моноцитов, экспрессирующих GM1<sup>+</sup>-рафты (CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup>/GM1<sup>+</sup>, CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup>/GM1<sup>+</sup> и CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup>/GM1<sup>+</sup>), у здоровых субъектов и у больных атеросклерозом не различалось, однако при атеросклерозе происходило перераспределение моноцитов между субпопуляциями CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup>, CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup> и CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup> (см. выше).

Анализ флуоресценции после тройного окрашивания антителами к CD14, CD16 и В-субъединицей холерного токсина показал, что СИФ рафтов на моноцитах с высокой экспрессией CD14 была выше, чем на моноцитах с низкой экспрессией CD14 как у больных, так и у здоровых субъектов (в 1.4 и 1.27 раза соответственно) (рис. 5). На основании полученных данных можно сделать вывод о неочевидности существования прямой связи между накоплением гангли-

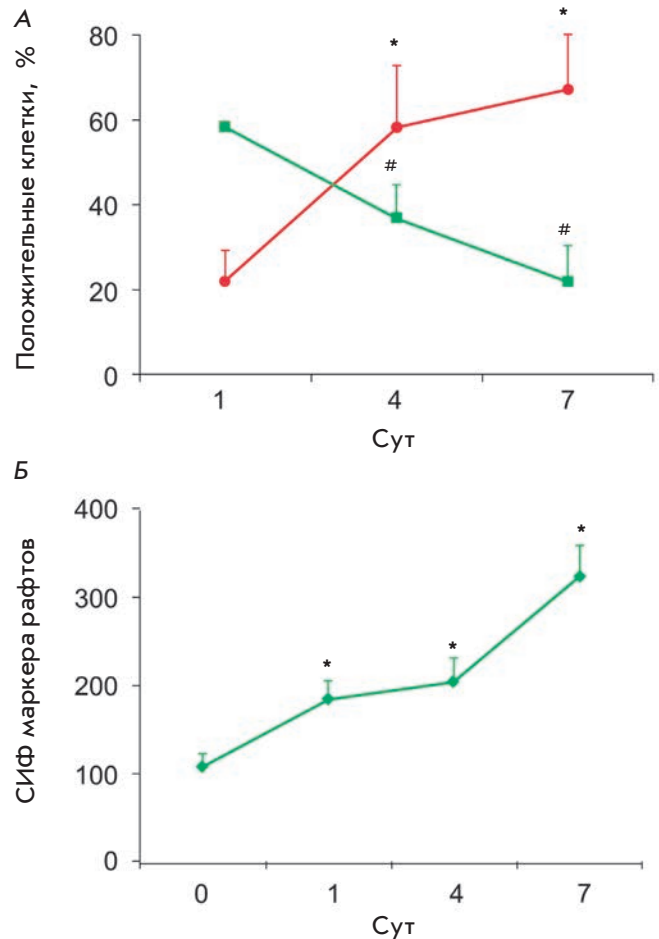


Рис. 6. Цитофлуориметрическое изучение процесса *in vitro*-дифференцировки моноцитов здоровых субъектов в культуре. А – изменение доли CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>- (■) и CD14<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>-клеток (●) в процессе дифференцировки ( $n = 3$ ). \* $\#$ Различия статистически значимы между 1- и 4-ми, 1- и 7-ми сутками; Б – изменение экспрессии маркера рафтов на CD14<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>-клетках в процессе дифференцировки ( $n = 3$ ). \*Различия статистически значимы между нулевой точкой и 1-, 4- и 7-ми сутками. Значения представлены в виде  $M \pm SD$ . \* $P < 0.05$

озидов в моноцитах при атеросклерозе и увеличением количества рафтов в мембранах этих клеток. Мы предположили, что этот пул ганглиозидов может реализоваться в виде липидных рафтов в результате дифференцировки преактивированных моноцитов в интиму артерий при атерогенезе.

#### Цитофлуориметрический анализ мембранных рафтов культивируемых моноцитов/макрофагов здоровых субъектов

Ранее мы наблюдали значительное повышение синтеза ганглиозидов при *in vitro*-дифференцировке

моноцитов человека в макрофаги [14]. Нами также было установлено, что уровень мРНК GM3-синтазы (ключевой фермент синтеза ганглиозидов) был значительно выше в культивируемых моноцитах/макрофагах, чем в свежевыделенных моноцитах, и в интима атеросклеротической бляшки в сравнении с интимой непораженных участков аорты человека [30]. Необходимо отметить, что в интима атеросклеротических артерий макрофаги являются главными клетками, в то время как в нормальной интима их практически нет.

В настоящей работе с помощью цитофлуориметрического анализа культивируемых моноцитов здоровых субъектов показано снижение доли CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>-клеток и увеличение доли CD14<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>-клеток (рис. 6А), что свидетельствует о дифференцировке моноцитов в макрофаги [30]. Методом тройного окрашивания антителами к CD14, CD206 (маркер макрофагальной дифференцировки) и флуоресцентно меченной В-субъединицей холерного токсина выявлено двукратное увеличение СИФ рафтов уже через 24 ч и трехкратное – на 7-е сутки культивирования по сравнению со свежевыделенными моноцитами (рис. 6Б).

Данные настоящей работы в совокупности с полученными нами ранее результатами [13, 14, 30] указывают на вероятную связь активации биосинтеза и, как следствие, повышения уровня ганглиозидов и более высокой экспрессии липидных рафтов в культивируемых макрофагах в сравнении со свежевыделенными моноцитами. Все большее количество данных подтверждает, что при воспалительных патологиях, сопровождающихся повышенной продукцией цитокинов, таких, как TNF-α, M-CSF или IL-6, моноциты преактивированы уже в кровотоке до их миграции в очаги воспаления [10-12]. В связи с этим представляется вполне вероятным, что установленное нами ранее накопление ганглиозидов активированными моноцитами больных атеросклерозом [13] необходимо для образования мембранных рафтов после инфильтрации моноцитов в интиму сосудистой стенки с их последующей дифференцировкой в макрофаги.

В предыдущих работах методами иммуноцитохимии с использованием специфических антител к основному ганглиозиду моноцитов/макрофагов мы установили, что в интима атеросклеротических поражений человека присутствует большое количество клеток с высокой экспрессией этого ганглиозида. Изучение фенотипа этих клеток показало, что большинство из них – макрофаги [31, 32].

Изучение экспрессии маркеров дифференцировки и липидных рафтов двойным окрашиванием моноцитов/макрофагов показало, что значительная

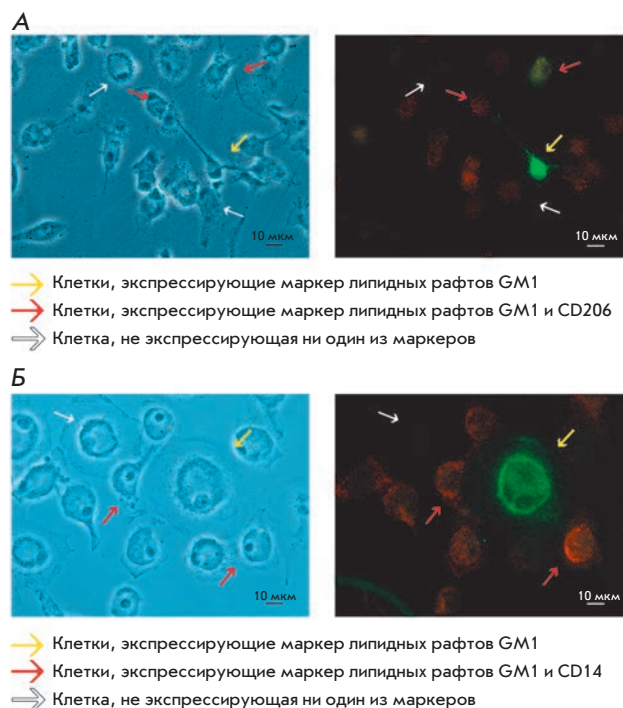


Рис. 7. Двойное иммуноцитохимическое окрашивание культивируемых моноцитов/макрофагов здорового субъекта. Двойное окрашивание с помощью В-субъединицы холерного токсина, выявляющей ганглиозид GM1, и моноклональных антител, распознающих маркер дифференцировки CD206 (А) или маркер моноцитов/макрофагов CD14 (Б). Левое изображение получено фазово-контрастной микроскопией тех же клеток. Масштабный отрезок 10 мкм

часть CD14<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>-клеток окрашивается на рафты (рис. 7А,Б). На всех сроках культивирования присутствовало небольшое количество клеток различной морфологии с высокой экспрессией маркера рафтов. Среди этих клеток встречались клетки как экспрессирующие, так и неэкспрессирующие маркеры макрофагов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цитофлуориметрическое изучение с использованием единой стратегии гейтирования субпопуляций моноцитов показало, что в периферической крови как больных атеросклерозом, так и здоровых субъектов можно выявить три субпопуляции моноцитов (классическую, промежуточную и неклассическую). У больных атеросклерозом наблюдалось увеличение доли промежуточной (CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup>) и снижение доли классической (CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup>) субпопуляций моноцитов в сравнении со здоровыми субъектами. Моноциты промежуточной субпопуляции у них ха-



рактиковались более высокой экспрессией рецептора фракталкина CX3CR1, чем у здоровых субъектов. Моноциты больных и здоровых субъектов не различались по экспрессии мембранных рафтов. Однако CD14<sup>++</sup>-моноциты отличались от CD14<sup>+</sup>-моноцитов более высокой экспрессией рафтов. Кроме того, в обеих исследованных группах выявлены так называемые внегетовые классическая (CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup>) и промежуточная (CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup>) субпопуляции моноцитов, при этом последняя субпопуляция обладала более высокой экспрессией маркера рафтов. В процессе культивирования моноцитов/макрофагов в присутствии M-CSF происходила их активация с дальнейшей дифференцировкой, сопровождающейся трехкратным увеличением экспрессии мембранных рафтов. В совокупности с нашими предыдущими данными можно заключить, что накопление ганглиозидов – незаменимых компонентов

рафтов – в преактивированных моноцитах больных атеросклерозом не приводило к повышению экспрессии мембранных рафтов. Однако полученные в настоящей работе данные позволяют предположить, что при дифференцировке моноцитов в макрофаги накопленный пул ганглиозидов реализуется в макрофагах в виде рафтов, необходимых для активации адгезии и фагоцитоза. ●

*Авторы благодарят проф. Ю.А. Романова (Российский кардиологический научно-производственный комплекс Министерства здравоохранения РФ) за помощь в проведении цитофлуориметрического анализа.*

*Работа поддержана РФФИ (гранты № 10-04-00888а и 12-04-31639).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zawada A.M., Rogacev K.S., Rotter B., Winter P., Marell R.R., Fliser D., Heine G.H. // *Blood*. 2011. V. 118. № 12. P. 50–61.
- Ancuta P., Liu K.Y., Misra V., Wacleche V.S., Gosselin A., Zhou X., Gabuzda D. // *BMC Genomics*. 2009. V. 10. P. 403–422.
- Ziegler-Heitbrock L., Hofer T.P. // *Front. Immunol.* 2013. V. 4. P. 1–5.
- Hristov M., Schmitz S., Nauwelaers F., Weber C. // *J. Immunol. Methods*. 2012. V. 38. № 1. P. 9–13.
- Merino A., Buendia P., Martin-Malo A., Aljama P., Ramirez R., Carracedo J. // *J. Immunol.* 2011. V. 186. № 3. P. 1809–1815.
- Wong K.L., Yeap W.H., Tai J.J., Ong S.M., Dang T.M., Wong S.C. // *Immunol. Res.* 2012. V. 53. № 1–3. P. 41–57.
- Tabas I., Williams K.J., Borén J. // *Circulation*. 2007. V. 116. № 16. P. 1832–1844.
- Zawada A.M., Rogacev K.S., Schirmer S.H., Sester M., Böhm M., Fliser D., Heine G.H. // *Immunobiology*. 2012. V. 217. № 12. P. 1273–1284.
- Gleissner C.A., Leitinger N., Ley K. // *Hypertension*. 2007. V. 50. № 2. P. 276–283.
- Murphy A.J., Woollard K.J., Hoang A., Mukhamedova N., Stirzaker R. A., McCormick S.P., Remaley A.T., Sviridov D., Chin-Dusting J. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008. V. 28. № 11. P. 2071–2077.
- Ziegler-Heitbrock H.W.L., Fingerle G., Ströbel M., Schraut W., Stelter F., Schütt C., Passlick B., Pforte A. // *Eur. J. Immunol.* 1993. V. 23. № 9. P. 2053–2058.
- Luu N.T., Madden J., Calder P.C., Grimble R.F., Shearman C.P., Chan T., Tull S.P., Dastur N., Rainger G.E., Nash G.B. // *Atherosclerosis*. 2007. V. 193. № 2. P. 259–268.
- Грачева Е.В., Самовилова Н.Н., Голованова Н.К., Андреева Е.Р., Андрианова И.В., Тарарак Э.М., Проказова Н.В. // *Биохимия*. 2007. Т. 72. № 3. С. 948–954.
- Грачева Е.В., Самовилова Н.Н., Голованова Н.К., Пиксина Г.Ф., Шишкина В.С., Проказова Н.В. // *Биомед. химия*. 2013. Т. 59. № 4. С. 459–468.
- Schmitz G., Orsó E. // *Curr. Opin. Lipidol.* 2002. V. 13. № 5. P. 513–521.
- Sonnino S., Mauri L., Chigorno V., Prinetti A. // *Glycobiology*. 2007. V. 17. № 1. P. 1R–13R.
- Hollenberg M., Fishman P.H., Bennet V., Cuatrecasas P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1974. V. 71. № 10. P. 4224–4228.
- Parton R.G., Richards A.A. // *Traffic*. 2003. V. 4. № 11. P. 724–738.
- Moreno-Altamirano M.M.B., Aguilar-Carmona I., Sánchez-García F.J. // *Immunology*. 2007. V. 120. № 4. P. 536–543.
- Hristov M., Weber C. // *Thromb. Haemost.* 2011. V. 106. № 5. P. 757–762.
- Weber C., Belge K.U., von Hundelshausen P., Draude G., Steppich B., Mack M., Frankenberger M., Weber K.S., Ziegler-Heitbrock H.W. // *J. Leukoc. Biol.* 2000. V. 67. № 5. P. 699–704.
- Pandzić Jaksic V., Gizdic B., Miletic Z., Ostovic K.T., Jaksic O. // *Coll. Antropol.* 2010. V. 34. № 1. P. 319–325.
- Ancuta P., Rao R., Moses A., Mehle A., Shaw S.K., Luscinskas F.W., Gabuzda D. // *J. Exp. Med.* 2003. V. 197. № 12. P. 1701–1707.
- Koenen R.R., Weber C. // *EMBO Mol. Med.* 2011. V. 3. № 12. P. 713–725.
- Zilber M.T., Setterblad N., Vasselon T., Doliger C., Charron D., Mooney N., Gelin C. // *Blood*. 2005. V. 106. № 9. P. 3074–3081.
- Pfeiffer A., Boettcher A., Orso E., Kapinsky M., Nagy P., Bodnar A., Spreitzer I., Liebisch G., Drobnik W., Gempel K., et al. // *Eur. J. Immunol.* 2001. V. 31. № 11. P. 3153–3164.
- Cuschieri J., Sakr S., Bulger E., Knoll M., Arbabi S., Maier R.V. // *Shock*. 2009. V. 32. № 6. P. 572–577.
- Triantafilou M., Triantafilou K. // *J. Endotoxin Res.* 2003. V. 9. № 5. P. 331–335.
- Triantafilou M., Morath S., Mackie A., Hartung T., Triantafilou K. // *J. Cell Sci.* 2004. V. 117. № 17. P. 4007–4014.
- Gracheva E.V., Samovilova N.N., Golovanova N.K., Kashirina S.V., Shevelev A., Rybalkin I., Gurskaya T., Vlasik T.N., Andreeva E.R., Prokazova N.V. // *Mol. Cell Biochem.* 2009. V. 330. № 1–2. P. 121–129.
- Bobryshev Y.V., Lord R.S., Golovanova N.K., Gracheva E.V., Zvezdina N.D., Sadovskaya V.L., Prokazova N.V. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1997. V. 1361. № 3. P. 287–294.
- Bobryshev Y.V., Lord R.S., Golovanova N.K., Gracheva E.V., Zvezdina N.D., Prokazova N.V. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2001. V. 1535. № 2. P. 87–99.