

УДК 577.214.43

ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА АПОЛИПОПРОТЕИНА А-I В МАКРОФАГАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ЗАХВАТЕ ИМИ ОКИСЛЕННЫХ ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ

© 2021 Е.В. Некрасова¹, Е.Е. Ларионова¹, К. Данько², Д.О. Кузьмина²,
В.С. Шавва¹, И.В. Кудрявцев¹, С.В. Орлов^{1,2*}

¹ Институт экспериментальной медицины, 197376 Санкт-Петербург, Россия;
электронная почта: serge@iem.sp.ru

² Санкт-Петербургский государственный университет, 199034 Санкт-Петербург, Россия;
электронная почта: s.orlov@spbu.ru

Поступила в редакцию 01.07.2021

После доработки 18.07.2021

Принята к публикации 23.07.2021

Аполипопротеин А-I (АроА-I) является ключевым компонентом системы обратного транспорта холестерина человека. В предыдущих исследованиях мы показали экспрессию гена *apoA-I* в моноцитах и макрофагах человека на уровне мРНК и белка. В отличие от гепатоцитов и энтероцитов, где регуляция экспрессии гена *apoA-I* изучена достаточно подробно, данных о регуляции экспрессии *apoA-I* в макрофагах крайне мало. Ничего не известно о динамике экспрессии гена *apoA-I* в макрофагах при захвате модифицированных липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) – одним из ключевых процессов на ранних стадиях атерогенеза, приводящего к образованию пенных клеток. В данной работе мы показываем сложный характер динамики экспрессии гена *apoA-I* в макрофагах человека при захвате окисленных ЛПНП (оксЛПНП). В первые 24 ч инкубации макрофагов с оксЛПНП наблюдается индукция экспрессии гена *apoA-I* на уровне мРНК и белка, тогда как через 48 ч экспрессия *apoA-I* оказывается подавленной. Оба эффекта зависят от взаимодействия оксЛПНП с рецептором TLR4 и не связаны непосредственно с захватом оксЛПНП макрофагами. Подавление экспрессии *apoA-I* после инкубации с оксЛПНП в течение 48 ч зависит от активации MAP-киназных каскадов ERK1/2 и JNK, а также фактора транскрипции NF-κB.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: атеросклероз, оксЛПНП, макрофаги, TNP-1, пенные клетки, рецептор TLR4, регуляция экспрессии генов, ген *apoA-I*.

DOI: 10.31857/S0320972521100031

ВВЕДЕНИЕ

Атеросклероз представляет собой хроническое системное заболевание артерий эластического и мышечно-эластического типа, возникающее вследствие нарушения липидного и белкового обмена и сопровождающееся отложением холестерина и некоторых фракций липопротеинов

в интиме сосудов [1]. Аполипопротеин А-I (АроА-I) является ключевым компонентом системы обратного транспорта холестерина человека. Этот белок, будучи главным компонентом липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), способствует выходу холестерина из тканей, поступлению его в печень для последующего окисления и выведения из организма [2]. Помимо участия в обратном транспорте холестерина, АроА-I функционирует в качестве кофактора лецитин-холестеринацилтрансферазы [3], проявляет антиоксидантные свойства [4], а также способен ограничивать воспалительные реакции. В частности, показана способность АроА-I блокировать активацию макрофагов Т-лимфоцитами и ограничивать продукцию TNFα и интерлейкина 1β (IL-1β) [5–6]. АроА-I угнетает также другой провоспалительный фактор – С-реактивный белок [7]. С другой стороны, АроА-I является негативным показателем острой фазы воспалительного отве-

Принятые сокращения: АроА-I – аполипопротеин А-I; ЛПВП – липопротеины высокой плотности; ЛПНП – липопротеины низкой плотности; оксЛПНП – окисленные липопротеины низкой плотности; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; BSA – бычий сывороточный альбумин; FCS – эмбриональная телячья сыворотка; LPS – липополисахарид; PBS – фосфатно-солевой буфер; PMA – форбол-12-миристан-13-ацетат (используется в моделях канцерогенеза как активатор дифференцирования и/или апоптоза); TBARS – соединения, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой; TNP-1 – клеточная линия острой моноцитарной лейкемии человека; TNFα – фактор некроза опухоли α.

* Адресат для корреспонденции.

та – при развитии воспаления экспрессия гена *apoA-I* в печени и тонком кишечнике резко снижается, а циркулирующий в плазме крови белок ApoA-I вытесняется из ЛПВП сывороточным амилоидом и разрушается сывороточными протеазами [5]. К настоящему времени также установлено, что главным транспортером холестерина к местам синтеза стероидных гормонов в стероидогенные ткани и органы млекопитающих (включая человека) являются ЛПВП, а белок, контролирующий этот процесс – ApoA-I [8].

Основными местами синтеза ApoA-I у человека являются печень и тонкий кишечник [9]. В предыдущих исследованиях мы показали экспрессию гена *apoA-I* в моноцитах и макрофагах человека на уровне мРНК и белка, однако вопрос о функциях ApoA-I в этих клетках остаётся открытым [10–12]. Установлено, что эндогенный ApoA-I макрофагов обладает противовоспалительной активностью – блокирование синтеза ApoA-I методом РНК-интерференции приводило к усилению синтеза и секреции TNF α , повышению уровня экспрессии рецептора липополисахарида (LPS) TLR4 и усилению воспалительного ответа макрофагов на LPS [10]. Кроме того, в отличие от гепатоцитов, где секреция ApoA-I приводит к формированию ЛПВП плазмы крови, в макрофагах секретруемый ApoA-I остаётся связанным с внешней поверхностью цитоплазматической мембраны (поверхностный ApoA-I макрофагов). Это связывание в значительной степени обусловлено взаимодействием ApoA-I с кассетным транспортером ABCA1. Более того, уровень ABCA1 в макрофагах сильно коррелирует с уровнем поверхностного ApoA-I, и блокирование синтеза ApoA-I приводит к снижению уровня ABCA1 [10]. Существенный интерес представляют литературные данные об антиатерогенной роли экспрессии гена *apoA-I* человека после его переноса в макрофаги мыши с помощью вирусных векторов. В экспериментах на нокаутных по гену *apoA-I* (*apoA-I*^{-/-}) мышам было показано, что доставка в макрофаги вектора экспрессии гена *apoA-I* человека уменьшает развитие жировых полосок на стенках артерий и увеличивает обратный транспорт холестерина из макрофагов в печень [13]. Доставка *apoA-I*^{-/-} мышам клеток костного мозга, дефицитных по гену *apoE* (*apoE*^{-/-}) и инфицированных ретровирусным вектором экспрессии гена *apoA-I* человека, приводила к значительному уменьшению площади атеросклеротических поражений аорты [14–15]. Аналогичные данные получены при доставке лентивирусных векторов экспрессии *apoA-I* человека в макрофаги мышей [16].

Таким образом, имеющиеся в литературе данные указывают на важную антиатерогенную роль обнаруженной нами экспрессии гена *apoA-I* в макрофагах.

Ген *apoA-I* имеет три промотора. Структура классического промотора содержит TATA-box, находящийся в положении –39 п.н. от начала транскрипции. Собственно промотор располагается в положении от –41 до +1 по отношению к месту начала транскрипции [17, 18]. Проксимальный альтернативный промотор имеет точку начала транскрипции в положении –153 п.н., а дистальный альтернативный промотор – в положении –353 п.н. по отношению к точке начала транскрипции с классического промотора *apoA-I* [19]. Гепатоцитарный энхансер контролирует экспрессию гена *apoA-I* в печени. Он имеет координаты (–222; –110) [17] и включает в себя три сайта: А (–214; –192), В (–169; –146) и С (–134; –119) [18]. В гепатоцитах сайты А и С связывают репрессоры активности гена *apoA-I* LXR α , LXR β [20], ARP1 [21], PPAR γ [22] и активаторы экспрессии гена *apoA-I* HNF4 α [23], RXR α [24], PPAR α [25]. HNF3 β (FOXA2) [26] и FOXO1 [27, 28] связываются с сайтом В.

В отличие от гепатоцитов и энтероцитов, где регуляция экспрессии гена *apoA-I* изучена достаточно подробно, данных о регуляции экспрессии *apoA-I* в макрофагах крайне мало. В макрофагах активен только классический промотор гена *apoA-I* [10]. Ранее мы показали, что TNF α и условия гипоксии вызывают индукцию транскрипции гена *apoA-I* в макрофагах как на уровне РНК, так и на уровне белка [10–12]. Интересно, что по сравнению с гепатоцитами в макрофагах наблюдался «зеркальный» характер регуляции – позитивный в гепатоцитах регулятор транскрипции *apoA-I*, PPAR α , в макрофагах действует как репрессор, тогда как другие ядерные рецепторы (LXR α и LXR β), угнетающие транскрипцию гена *apoA-I* в гепатоцитах, в макрофагах активируют экспрессию *apoA-I* [11].

Повышенная концентрация липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и связанного с ними холестерина в плазме крови является одним из основных факторов риска развития ишемической болезни сердца – клинического проявления атеросклероза [29]. Попадая в интиму артерий, ЛПНП задерживаются там благодаря взаимодействию с отрицательно заряженными компонентами внеклеточного матрикса (гепарансульфатами) и подвергаются окислению под действием свободных радикалов, ферментов миелопероксидаз и липоксигеназ, что приводит к образованию окисленных форм ЛПНП (оксЛПНП) [30]. Появление в интиме оксЛПНП

активирует эндотелий [31], что ведёт к усилению миграции в интиму моноцитов, где они дифференцируются в макрофаги и активно захватывают оксЛПНП с помощью скевенджер-рецепторов, таких как SR-A, CD36, SR-B1, LOX1 и др. Неконтролируемый захват оксЛПНП макрофагами приводит к накоплению в клетках липидных вакуолей (расширений эндоплазматического ретикулума (ЭПР)), содержащих эфиры холестерина, и превращению макрофагов в пенистые клетки – основной клеточный элемент атеросклеротических бляшек [32, 33]. Помимо захвата макрофагами, оксЛПНП обладают и сигнальными функциями. В литературе имеются противоречивые данные о способности оксЛПНП запускать сигнальные каскады в моноцитах и макрофагах. Ряд исследователей утверждает, что оксЛПНП взаимодействуют с комплексом рецепторов CD36–TLR2–TLR4 [34], или CD36–TLR6–TLR4 [35], или TLR4–DC–SIGN [36], и это взаимодействие приводит к запуску воспалительного ответа в макрофагах и к усилению захвата макрофагами оксЛПНП. С другой стороны, существуют данные, согласно которым провоспалительная активность оксЛПНП объясняется примесями эндотоксина, тогда как свободные от эндотоксина оксЛПНП, наоборот, угнетают синтез провоспалительных цитокинов макрофагами [37, 38].

Ничего не известно о регуляции гена *apoA-I* в макрофагах при захвате оксЛПНП – одном из ключевых процессов на ранних стадиях атерогенеза, приводящих к образованию пенистых клеток. В данной работе мы показываем сложный характер динамики экспрессии гена *apoA-I* в макрофагах человека при захвате окисленных ЛПНП. В первые 24 ч инкубации макрофагов ТНР-1 (клеточная линия острой моноцитарной лейкемии человека) с оксЛПНП наблюдается индукция экспрессии гена *apoA-I* на уровне мРНК и белка, тогда как через 48 ч экспрессия *apoA-I* оказывается подавленной. Оба эффекта зависят от взаимодействия оксЛПНП с рецептором TLR4 и не связаны непосредственно с захватом оксЛПНП макрофагами. Подавление экспрессии *apoA-I* после инкубации с оксЛПНП в течение 48 ч зависит от активации MAP-киназных каскадов ERK1/2 и JNK, но не p38, а также фактора транскрипции NF-κB.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры и макрофаги, дифференцированные из моноцитов периферической крови человека. Клеточная линия острой моноцитарной лейкемии человека ТНР-1 получена из кол-

лекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН. Клетки культивировали в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С в среде RPMI-1640 («Биолот», Россия), содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки (FCS, «HyClone Laboratories», США). Дифференцировку моноцитов ТНР-1 в макрофаги индуцировали, добавляя в культуральную среду форбол-12-миристан-13-ацетат (РМА) до концентрации 50 нг/мл (81 нМ) на 24 ч. Затем клетки отмывали от РМА, меняли среду на свежую RPMI-1640, содержащую 10% FCS, и продолжали дифференцировку в течение 48 ч. Таким образом, общее время дифференцировки макрофагов ТНР-1 составляло трое суток для экспериментов по инкубации с оксЛПНП в течение 24 ч и четверо суток – для экспериментов по инкубации с оксЛПНП в течение 48 ч.

Консервированную донорскую кровь непригодную для переливания закупали на станции переливания крови в охлаждённом виде (Санкт-Петербург, Россия). Доноры подписывали информированное добровольное согласие. Для получения первичных макрофагов производили выделение мононуклеаров из крови человека с помощью центрифугирования в градиенте плотности фиколла, как описано ранее [39]. Для этого в пробирки (50 мл) наливали 15 мл раствора фиколла плотностью 1,077 («Биолот»), сверху наслаивали 35 мл крови и центрифугировали (30 мин, 2000 об./мин., 18 °С), используя центрифугу Z400K («Hermle Labortechnik», Германия). Далее на границе фаз отбирали слой, содержащий мононуклеарные клетки, и дважды отмывали раствором Хенкса. Осадок ресуспендировали в культуральной среде RPMI-1640, содержащей 10% FCS, разливали по лункам планшетов (по 100 тыс. клеток в лунку 96-луночного планшета) и инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в течение 2 ч для адгезии моноцитов. Далее проводили отмывку моноцитов от не прикрепившихся к субстрату клеток (лимфоциты) в растворе Хенкса, к отмывым моноцитам добавляли свежую культуральную среду RPMI-1640, содержащую 10% FCS, и проводили дифференцировку моноцитов в макрофаги при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в течение 5 (в экспериментах по инкубации с оксЛПНП в течение 24 ч) или 6 (в экспериментах по инкубации с оксЛПНП в течение 48 ч) суток.

Антитела, ингибиторы. Для детекции поверхностного белка ApoA-I использовали мышинные моноклональные антитела против ApoA-I человека («Bio-Rad», США) и вторичные кроличьи антитела F(ab')₂ против IgG мыши, меченые флуорофором Alexa 647 («Abcam», Великобритания). Блокирование рецептора TLR4 прово-

дили с помощью козых поликлональных анти-тел против TLR4 человека («R&D Systems», США). В работе использованы ингибиторы основных MAP-киназных каскадов и NF-κB («Biomol», Германия): U0126, ингибитор MEK1/2; SB203580, ингибитор киназ p38; SP600125, ингибитор киназ JNK; QNZ, ингибитор фактора транскрипции NF-κB и TO901317, синтетический агонист ядерных рецепторов LXRα и LXRβ.

Выделение, окисление и флуоресцентное мечение ЛПНП. Человеческие ЛПНП выделяли из плазмы, полученной из консервированной донорской крови. Для исключения возможной контаминации клеток экзогенным человеческим AroA-I в работе также использовали ЛПНП, выделенные из сыворотки крови крупного рогатого скота. Выделение проводили с помощью последовательного препаративного ультрацентрифугирования, как описано ранее [40]. Использовали ультрацентрифугу Beckman Coulter Optima LE80K («Beckman Coulter», США). К человеческой плазме либо к сыворотке крови крупного рогатого скота («Биолот») добавлялся NaBr до плотности 1,019. Плазму либо сыворотку центрифугировали 18 ч при температуре 12 °С в роторе 50.3 Ti при 40 000 об./мин, после чего верхнюю фазу, состоящую из липопротеинов очень низкой плотности, удаляли. Плотность доводили до 1,064 добавлением NaBr. Образец центрифугировали 22 ч при тех же условиях, после чего верхнюю фазу, состоящую из ЛПНП, изолировали. Полученные ЛПНП диализовали против фосфатно-солевого буфера (PBS, pH 7,6) 24 ч при 4 °С. Концентрацию белка измеряли по методу Лоури [40]. Окисление ЛПНП проводили, как описано в работе Jialal и Chait [41]. К раствору ЛПНП в PBS добавляли раствор CuSO₄ до конечной концентрации 5 мкМ и инкубировали в условиях доступа кислорода воздуха при 37 °С в течение 18 ч. Далее последовательно проводили два диализа против PBS по 24 ч при 4 °С. При втором диализе для удаления остаточных следов ионов меди к PBS добавляли хелатирующий агент ЭДТА до концентрации 0,5 мМ. Степень окисления ЛПНП определяли методом измерения концентраций соединений, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (TBARS) [42]. Образцы (100 мкл, концентрация белка 2–4 мг/мл) инкубировали с 0,5 мл 20%-ной уксусной кислоты, pH 3,5 и 0,5 мл 0,78%-ного водного раствора тиобарбитуровой кислоты. После нагревания при 95 °С в течение 45 мин образцы центрифугировали (4000 об./мин, 5 мин («Eppendorf», США)). Поглощение полученного красного пигмента надосадочной жид-

кости измеряли при длине волны 532 нм. Калибровочную кривую строили с использованием малональдегида бис(диметил ацетала) в качестве источника малонового альдегида, как описано в работе Esterbauer и Cheeseman [43]. Для использованных в работе препаратов оксЛПНП значения TBARS находились в диапазоне 30–45 нмоль/мг белка (TBARS для нативных ЛПНП составлял 7–15 нмоль/мг белка). Флуоресцентное мечение ЛПНП проводили до окисления с помощью тетрафторфенилового эфира фотостабильного гидрофильного красителя Alexa 488 («Thermo Fisher Scientific», США) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя.

Для исключения эффектов возможной бактериальной контаминации использованных препаратов оксЛПНП во всех экспериментах с оксЛПНП к клеткам добавляли полимиксин В («Sigma», США) – агент, связывающий и инактивирующий бактериальный LPS.

Контроль формирования пенистых клеток. Макрофаги THP-1 трижды промывали PBS, фиксировали в растворе 4%-ного формальдегида на PBS в течение 10 мин, промывали 60%-ным изопропанолом, окрашивали 10 мин в 3%-ном растворе Oil Red O («Sigma»), приготовленном на 60%-ном изопропанол. После отмывки 60%-ным изопропанолом клетки дополнительно окрашивали гематоксилином в течение 2 мин. Далее клетки трижды отмывали в PBS и оценивали число липидных вакуолей в клетках на микроскопе Zeiss Axiovert 40CFL («Zeiss», Германия).

Выделение РНК, обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени. Тотальную РНК из культивируемых клеток выделяли с использованием реагента RNA STAT-60 («Tel-Test», США) в соответствии с инструкциями изготовителя. Остатки геномной ДНК удаляли обработкой ДНКазой I, свободной от РНКаз («Roche Applied Science», Швейцария) в течение 30 мин при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением ЭДТА до конечной концентрации 2 мМ с последующей инактивацией ДНКазы I прогреванием при 70 °С в течение 15 мин. Концентрацию и чистоту РНК определяли с помощью планшетного спектрофотометра Synergy 2 («BioTek», США). Отношение поглощения при длинах волн 260 и 280 нм было выше 2, и отношение поглощения при 260 и 230 нм было выше 1,7. Отсутствие деградации РНК проверяли электрофорезом в 1%-ном агарозном геле по сохранению целостности рибосомных РНК. Для проведения реакции обратной транскрипции брали равное количество РНК для всех точек. Реакцию обратной транскрипции (с 1 мкг

тотальной РНК) проводили с использованием праймеров oligo-dT и специфических 3'-праймеров к генам *apoA-I*, *ABCA1* и *GRP78*. Для проведения реакции использовались реактивы компании «Promega», США.

ПЦР в реальном времени (qRT-PCR) проводили по технологии Taqman или по интеркаляции SYBR Green с использованием амплификатора CFX-96 («Bio-Rad»). Компоненты реакционной смеси были приобретены у компании «Синтол», Россия. Праймеры и флуоресцентные пробы для *apoA-I*, *ABCA1* и референсных генов, кодирующих белки RPLP0, циклофилин А и β-актин, были описаны ранее [44, 10, 22, 28]. Для детекции мРНК гена *GRP78* использовали следующие праймеры и зонд: прямой праймер – 5'-GTTCTTGCCGTTCAAGGTG-3'; обратный праймер – 5'-TTTCCCAAATAAGCCTCA-GC-3'; зонд – 5'-Cy5.5-TGCTCCTGAAGAAATTTCTGCCATGG-RTQ2-3'. Подбор праймеров и зонда проводили с помощью программы Primer3 (<https://primer3.org/>). Относительные уровни мРНК гена *apoA-I* оценивали путём детекции референсных генов в той же реакции (multiplex PCR). Нормализацию результатов проводили по геометрическому среднему из трёх референсных генов, как описано ранее [45]. Число циклов PCR для каждого гена, при котором уровень флуоресценции превышал в 10 раз значения стандартного отклонения флукутаций в фоновой флуоресценции, определяли с помощью CFX-96 RealTime PCR System («Bio-Rad»). Относительные значения уровня мРНК *apoA-I* (в процентах относительно контрольного образца) определяли по формуле:

$$2^{(Ct(\text{control}) - Ct(\text{опыт}))} * 100.$$

Вестерн-блоттинг. Клетки лизировали в буфере RIPA-50 (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM Na₂EDTA, 0,1% SDS, 0,01% NaN₃, 1 mM PMSF, pH 7,4). Белки разделяли диск-электрофорезом в 12%-ном денатурирующем полиакриламидном геле, переносили с помощью электроблоттинга на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C с размером пор 0,45 мкм («Amersham», Великобритания). После переноса мембрану блокировали в 5%-ном обезжиренном молоке, приготовленном на PBS с добавлением 0,02% (v/v) Tween 20 в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее мембрану инкубировали с мышиными моноклональными антителами против ApoA-I человека в течение 12 ч при 4 °С, трижды отмывали в PBS с добавлением 0,02% (v/v) Tween 20, инкубировали со вторичными антителами против иммуноглобули-

нов мыши, конъюгированными с пероксидазой хрена, в течение 1 ч при комнатной температуре. Иммунореактивные полосы выявляли с помощью усиленной хемолуминесценции (ECL) на Chemidoc XRS+ System («Bio-Rad»). Оцифровку полученных изображений проводили с помощью денситометрии в программе ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>).

Проточная цитофлуориметрия. Клетки фиксировали в 4%-ном формальдегиде в течение 10 мин при 22 °С, отмывали 3 раза PBS, содержащим 0,1 М глицина, и инкубировали 40 мин при 22 °С в блокирующем буфере (PBS, содержащий 1% BSA, 3% FCS, неспецифические человеческие IgG (1 мкг/мл) и 0,02% (v/v) Tween 20). Клетки инкубировали с мышиными моноклональными антителами против человеческого ApoA-I (разведение 1/250) в PBS, содержащем 1% BSA и 0,02% (v/v) Tween 20, в течение 2 ч при 22 °С, отмывали 3 раза PBS и инкубировали со вторичными кроличьими антителами F(ab')₂ против IgG мыши, мечеными флуорофором Alexa 647 (разведение 1/1000) в PBS, содержащем 1% BSA и 0,02% (v/v) Tween 20, в течение 1 ч при 22 °С. Затем клетки отмывали 3 раза в PBS и фиксировали в PBS, содержащем 1% формальдегид, для проточной цитофлуориметрии. Клетки, обработанные вторичными антителами, но не инкубированные с антителами против ApoA-I, использовали в качестве контроля специфичности иммунной окраски (изотип-контроль). Проточная цитофлуориметрия и клеточный сортинг были проведены, используя Epics Altra flow cytometer («Beckman Coulter») и программу FCSalyzer (<https://sourceforge.net/projects/fcsalyzer/>).

Статистическая обработка. Результаты представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Статистический анализ различий между сравниваемыми группами выполняли с использованием *t*-критерия Стьюдента (непарный *t*-тест). Множественные сравнения проводили с помощью критерия Даннета. Различия считались статистически значимыми при *p* < 0,05. Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Инкубация макрофагов с оксЛПНП стимулирует экспрессию гена *apoA-I* через 24 ч и подавляет через 48 и 72 ч. Центральным процессом при образовании атеросклеротической бляшки является усиленный захват макрофагами модифи-

цированных ЛПНП, сопровождающийся образованием так называемых пенистых клеток [1, 32, 33]. Представлялось интересным исследовать изменение динамики экспрессии гена *apoA-I* при формировании пенистых клеток. Образование пенистых клеток в результате захвата оксЛПНП макрофагами ТНР-1 контролировали окраской клеток липидофильным красителем Oil Red O и гематоксилином (рис. 1). Инкубация макрофагов с оксЛПНП (50 мкг/мл) в течение 24 и 48 ч приводила к последовательному накоплению в цитоплазме липидных вакуолей, характерных для пенистых клеток. Вместе с тем использованные концентрации оксЛПНП и сроки инкубации не приводили к окончательному заполнению цитоплазмы макрофагов липидными вакуолями и к некротическому распаду, характерному для поздних стадий формирования пенистых клеток (рис. 1).

оксЛПНП являются источником окисленных форм холестерина, природных лигандов ядерных рецепторов LXR. В предыдущих исследованиях мы показали, что активация рецепторов LXR в моноцитах и макрофагах сопровождается усилением экспрессии гена *apoA-I*. Учитывая вышесказанное, ожидалось, что захват макрофагами оксЛПНП будет сопровождаться активацией экспрессии *apoA-I* за счёт накопления в клетке лигандов LXR. Для проверки данного предположения макрофаги линии ТНР-1 (рис. 2, а) или первичные макрофаги, дифференцированные из моноцитов периферической крови человека (рис. 2, б), инкубировали с оксЛПНП (50 мкг/мл) в течение 24, 48 и 96 ч. Для сравнения клетки в течение тех же сроков инкубировали с синтетическим агонистом рецепторов LXR. Методом qRT-PCR установлено, что хотя через 24 ч инкубации с оксЛПНП наблюдается индукция экспрессии гена *apoA-I*

сравнимая с индукцией, вызванной лигандами LXR, уже через 48 ч инкубации с оксЛПНП происходит подавление синтеза мРНК *apoA-I*. Через 96 ч инкубации репрессорный эффект усиливается. При этом действие агониста LXR прогрессивно нарастает в течение всего времени инкубации.

Препараты оксЛПНП, полученные из плазмы крови человека, могут содержать примеси экзогенного *apoA-I* человека. Учитывая относительно низкий уровень синтеза *apoA-I* в макрофагах, примеси экзогенного *apoA-I* могут серьёзно исказить результаты анализа уровня белка *apoA-I* при инкубации макрофагов с оксЛПНП. Для предотвращения подобной контаминации можно использовать препараты ЛПНП, выделенные из сыворотки крупного рогатого скота [10]. С другой стороны, нельзя исключить видоспецифическое действие оксЛПНП на макрофаги. Для проверки возможных видоспецифических эффектов оксЛПНП были поставлены параллельные эксперименты по инкубации макрофагов ТНР-1 и макрофагов, дифференцированных из моноцитов периферической крови человека, с человеческими оксЛПНП и оксЛПНП крупного рогатого скота (рис. 2, а и б). Существенных отличий в действии оксЛПНП человека и оксЛПНП крупного рогатого скота на уровень мРНК *apoA-I* не выявлено на всех сроках инкубации. Дальнейшие эксперименты проводили с оксЛПНП крупного рогатого скота. На рис. 2, в представлены данные экспериментов по изучению дозозависимости эффектов оксЛПНП на уровень мРНК *apoA-I*. Установлено, что стимулирующее действие оксЛПНП начинается с концентрации 15 мкг/мл, а угнетающее — с 25 мкг/мл с последующим дозозависимым нарастанием обоих эффектов. Стимуляция экспрессии ге-

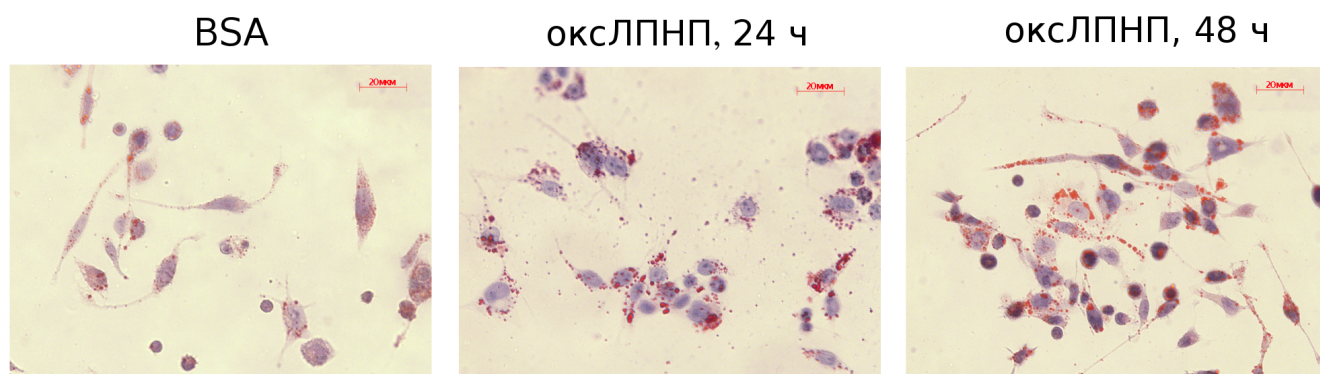


Рис. 1. Формирование пенистых клеток при инкубации макрофагов ТНР-1 с оксЛПНП в течение 24 и 48 ч. После инкубации с оксЛПНП человека (50 мкг/мл) макрофаги ТНР-1 окрашивали Oil Red O и гематоксилином, как описано в «Материалах и Методах», и выявляли липидные вакуоли световой микроскопией (окрашены красным). BSA — контрольные клетки, инкубированные с бычьим сывороточным альбумином (50 мкг/мл)

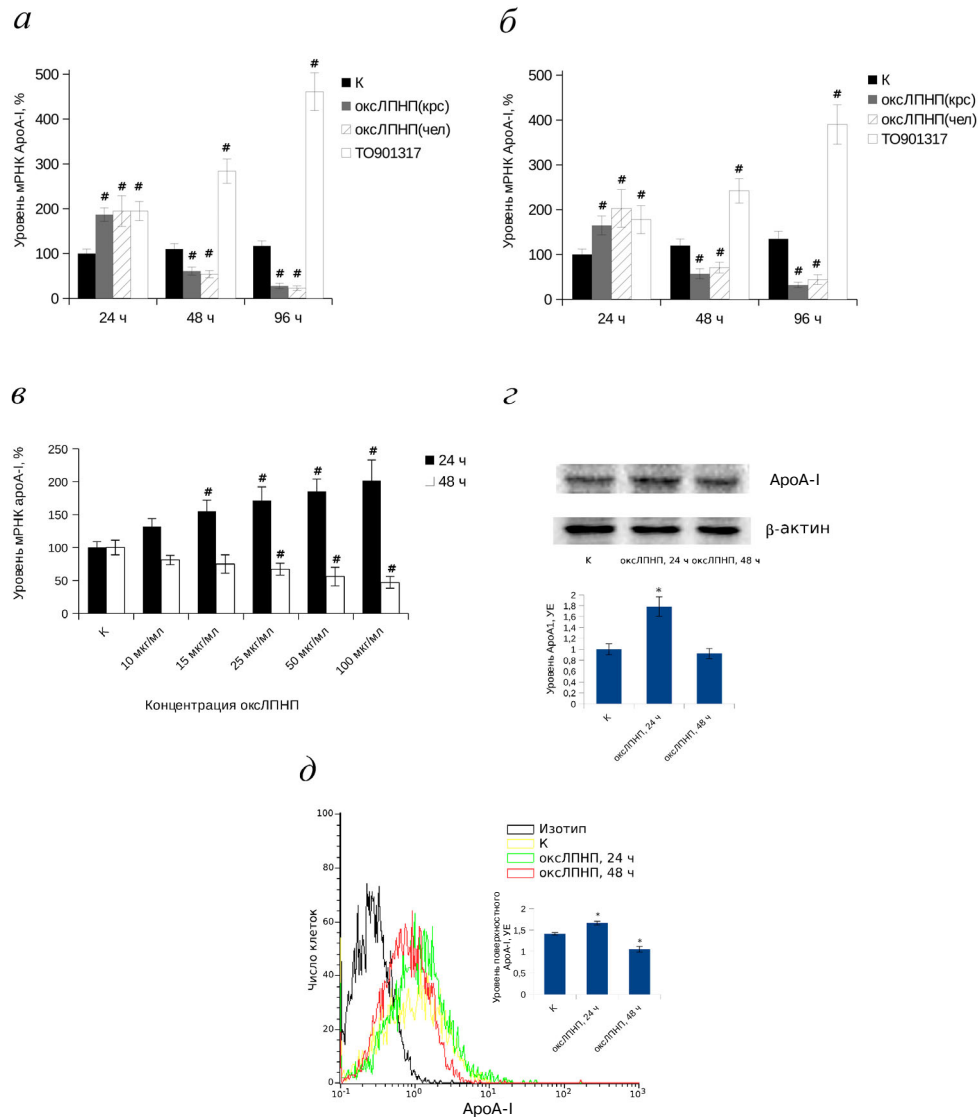


Рис. 2. Зависимость уровня экспрессии *aroA-1* в макрофагах ТНР-1 (*а, в–д*) или в первичных макрофагах, дифференцированных из моноцитов периферической крови человека (*б*), от времени инкубации макрофагов с оксЛПНП (50 мкг/мл): *а, в–д* – клетки ТНР-1 дифференцировали индукцией РМА как описано в разделе «Материалы и Методы», далее добавляли оксЛПНП, выделенные из плазмы крови человека (оксЛПНП(чел)), либо оксЛПНП, выделенные из сыворотки крови крупного рогатого скота (оксЛПНП(крс)), до концентрации 50 мкг/мл, либо агонист LXR (ТО901317) (5 мкМ) и инкубировали указанное время; *б* – моноциты, выделенные из периферической крови здоровых доноров, дифференцировали 4 дня, далее добавляли оксЛПНП, выделенные из плазмы крови человека (оксЛПНП(чел)), либо оксЛПНП, выделенные из сыворотки крови крупного рогатого скота (оксЛПНП(крс)), до концентрации 50 мкг/мл, либо агонист LXR (ТО901317) (5 мкМ) и инкубировали указанное время. *в* – Зависимость действия оксЛПНП на уровень мРНК AroA-1 при инкубации в течение 24 и 48 ч от концентрации оксЛПНП. *а–в* – Из клеток выделяли РНК и проводили определение уровня мРНК AroA-1 методом qRT-PCR. Выравнивание образцов проводили по трём референсным генам (*циклофилин А*, *β-актин* и *rplp0*). Представлены результаты среднего значения из трёх независимых экспериментов, планки погрешности соответствуют стандартной ошибке среднего. Статистическая достоверность различий опытных групп с контрольными проверялась с использованием *t*-критерия Стьюдента, # соответствуют $p < 0,05$. *г* – Анализ уровня клеточного AroA-1 в макрофагах ТНР-1 после инкубации с оксЛПНП (50 мкг/мл) в течение 24 или 48 ч методом Вестерн-блота. Диаграмма содержит данные, полученные в ходе оцифровки трёх иммуноблотов с помощью денситометрии. Значения по оси Y соответствуют относительному уровню белка AroA-1 (1 условная единица (YE) в необработанных клетках). Проведена нормализация значений по уровню β-актина. *д* – Результаты проточной цитофлуориметрии. К макрофагам ТНР-1 добавляли оксЛПНП до концентрации 50 мкг/мл и инкубировали 24 или 48 ч. Клетки фиксировали и обрабатывали антителами против AroA-1 человека. В качестве вторичных антител использовали антимишьяные антитела (Fab')₂, меченые Alexa 647. Изотип-контроль представлен клетками, обработанными только вторичными флуоресцентно мечеными антителами. В контрольные образцы, не содержащие оксЛПНП, добавляли BSA в концентрации 50 мкг/мл. На диаграмме представлены средние значения (X-mean) интенсивности флуоресценции, планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего. Достоверность различий проверяли с использованием *t*-критерия Стьюдента, * соответствует $p < 0,05$

на *aroA-I* через 24 ч после инкубации макрофагов ТНР-1 с оксЛПНП сопровождается также повышением в клетках уровня белка АроА-I (рис. 2, з). Интересно, что через 48 ч инкубации с оксЛПНП, в отличие от мРНК АроА-I, чье количество падает относительно контрольного, уровень клеточного АроА-I возвращается к значению, характерному для нестимулированных клеток (рис. 2, з). В предыдущих исследованиях, посвященных выяснению функций АроА-I в макрофагах, было установлено, что существенную роль играет не столько общее содержание АроА-I в клетках, сколько уровень поверхностного АроА-I, связанного с наружной поверхностью плазматической мембраны [10]. В связи с этим представлялось интересным оценить влияние оксЛПНП на поверхностный АроА-I. Результаты представлены на рис. 2, д. Установлено, что после инкубации макрофагов ТНР-1 с оксЛПНП в течение 24 ч наблюдается повышение уровня поверхностного АроА-I. Через 48 ч инкубации уровень поверхностного АроА-I падает ниже значений, характерных для нестимулированных клеток. Полученные результаты указывают на то, что, хотя на ранних стадиях образования пенистых клеток оксЛПНП действительно стимулируют экспрессию *aroA-I*, возможно, через накопление в клетках лигандов LXR, уже на вторые сутки после начала эксперимента происходит обращение эффекта.

Подавление экспрессии гена *aroA-I* при длительной инкубации макрофагов с оксЛПНП не связано с развитием стресса ЭПР или накоплением в клетках липидов. Подавление экспрессии гена *aroA-I* может быть обусловлено тремя механизмами. Во-первых, формирование пенистых клеток может быть сопряжено с развитием стресса эндоплазматического ретикулума [46, 47] и приводить к репрессии генов секреторных белков, содержащих сигнальные пептиды и транслирующихся в просвет ЭПР. Развитие стресса ЭПР в макрофагах после инкубации в течение 48 ч с оксЛПНП оценивали, измеряя уровень экспрессии гена *GRP78* – одного из шаперонов ЭПР, чья экспрессия резко возрастает при стрессе ЭПР. В качестве положительного контроля стресса ЭПР использовали стимуляцию макрофагов ТНР-1 туникамицином – веществом, блокирующим N-гликозилирование белков в ЭПР, что приводит к стрессу (рис. 3, а). Установлено, что в наших условиях эксперимента стресс ЭПР не развивался, так как инкубация макрофагов с оксЛПНП не приводила к индукции экспрессии *GRP78*.

Во-вторых, на экспрессию гена *aroA-I* может влиять накопление в клетках продуктов ме-

таболизма оксЛПНП, часть из которых могут выполнять функции лигандов ядерных рецепторов, способных связываться с 5'-регуляторной областью гена *aroA-I* и регулировать его экспрессию, таких как PPAR α , PPAR γ , LXR α , LXR β . Если гипотезу о роли LXR в оксЛПНП-опосредованном подавлении синтеза АроА-I можно отвергнуть на основании данных, представленных на рис. 2, то вопрос об участии других ядерных рецепторов остается открытым. В-третьих, оксЛПНП могут выполнять сигнальные функции. В литературе имеются данные о способности оксЛПНП взаимодействовать с рецептором TLR4, что приводит к активации в клетке ряда воспалительных сигнальных каскадов [48]. Кроме того, интернализация оксЛПНП такими сквенджер-рецепторами, как CD36 и LOX1, также сопровождается инициацией ряда сигнальных каскадов в макрофагах [49, 50]. Для проверки участия второго механизма в подавлении синтеза АроА-I при продолжительной инкубации оксЛПНП с макрофагами мы провели сортировку макрофагов ТНР-1 методом точной цитофлуорометрии после 48 ч инкубации с флуоресцентно мечеными оксЛПНП. В данных условиях эксперимента только ~65% макрофагов приобретают фенотип пенистых клеток (рис. 3, б). Из макрофагов ЛПНП+ и ЛПНП– выделяли РНК, и методом qRT-PCR оценивали уровень мРНК гена *aroA-I* в сравнении с клетками, не инкубированными с оксЛПНП (рис. 3, в). Контроль эффективности сортировки проводили, оценивая уровень экспрессии гена *ABCA1* (рис. 3, з), для которого известна положительная связь уровня транскрипции с захватом оксЛПНП [51]. Установлено, что уровень мРНК *ABCA1* в клетках ЛПНП– не отличался от контрольного уровня. Вместе с тем в клетках ЛПНП+, в соответствии с литературными данными, наблюдалась существенная индукция синтеза мРНК *ABCA1*. Полученные результаты подтверждают эффективность выбранного методического подхода. В тех же условиях эксперимента уровень мРНК АроА-I был одинаков в клетках ЛПНП– и ЛПНП+ и составлял ~50% от контрольного уровня. Следовательно, подавление экспрессии гена *aroA-I* при длительной инкубации оксЛПНП с макрофагами не связано с накоплением в макрофагах липидных компонентов. Полученные результаты поддерживают сигнальный механизм подавления экспрессии гена *aroA-I* при продолжительной инкубации макрофагов с оксЛПНП.

Роль рецептора TLR4 в регуляции экспрессии гена *aroA-I* в макрофагах при инкубации с оксЛПНП. Наиболее вероятным кандидатом на

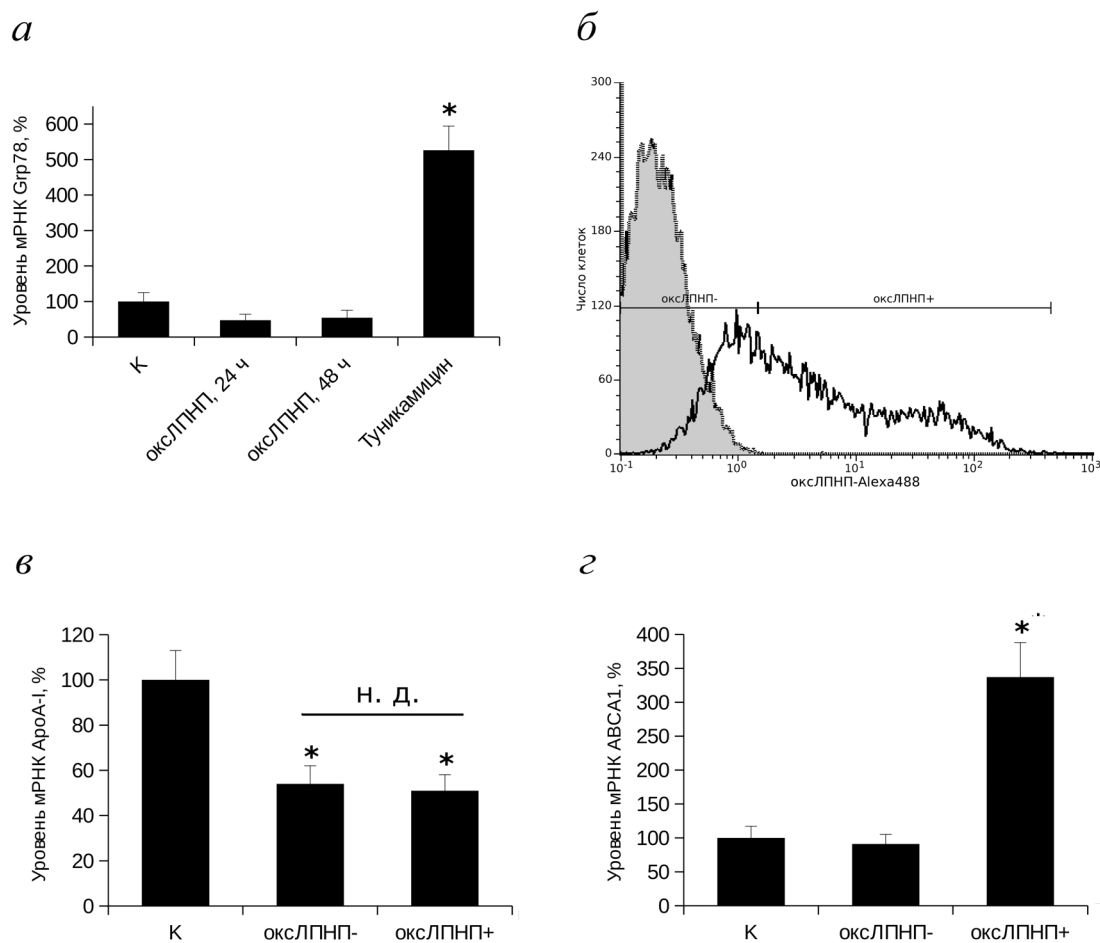


Рис. 3. Влияние захвата макрофагами оксЛПНП на уровень экспрессии гена *aroA-I*: *а* – инкубация макрофагов ТНР-1 с оксЛПНП не приводит к стрессу ЭПР. Клетки ТНР-1 дифференцировали индукцией РМА как описано в разделе «Материалы и Методы», далее добавляли оксЛПНП до концентрации 50 мкг/мл и инкубировали в течение 24 или 48 ч либо добавляли туникамицин (1 мкг/мл) с последующей инкубацией 24 ч. К контрольным образцам добавляли BSA до концентрации 50 мкг/мл. Из клеток выделяли РНК и проводили определение уровня мРНК *Grp78* методом qRT-PCR. *б–г* – Зависимость экспрессии генов *aroA-I* и *ABCA1* от захвата макрофагами ТНР-1 оксЛПНП. Клетки ТНР-1 дифференцировали индукцией РМА как описано в разделе «Материалы и Методы», далее добавляли флуоресцентно меченные (Alexa 488) оксЛПНП до концентрации 50 мкг/мл и инкубировали в течение 48 ч. *б* – Анализ захвата макрофагами ТНР-1 меченых оксЛПНП с последующей сортировкой методом проточной цитофлуорометрии. Точечной линией с серой заливкой показано распределение флуоресценции клеток, инкубированных с BSA (отрицательный контроль), черной сплошной линией – распределение флуоресценции клеток после инкубации с оксЛПНП–Alexa 488. Показаны гейты (оксЛПНП– и оксЛПНП+), использованные при сортировке клеток по уровню захвата меченых оксЛПНП. Из отсортированных клеток выделяли РНК и проводили анализ экспрессии генов *aroA-I* (*в*) и *ABCA1* (*г*) методом qRT-PCR. оксЛПНП– соответствует РНК, выделенной из клеток, не поглотивших значительные количества оксЛПНП (гейт оксЛПНП–), оксЛПНП+ соответствует РНК, выделенной из нагруженных оксЛПНП макрофагов (гейт оксЛПНП+). Выравнивание образцов проводили по трём референсным генам (*циклофилин А*, β -актин и *gplp0*). Представлены результаты среднего значения из трёх независимых экспериментов, планки погрешности соответствуют стандартной ошибке среднего. Статистическая достоверность различий между необработанными клетками (К) и макрофагами, инкубированными с оксЛПНП, проверялась с использованием *t*-критерия Стьюдента, * соответствуют $p < 0,05$; н.д. – отсутствие статистически достоверных различий между макрофагами, захватившими (оксЛПНП+) и не захватившими (оксЛПНП–) значительные количества оксЛПНП

роль сигнального рецептора оксЛПНП является белок TLR4, чей основной лиганд – LPS. При этом взаимодействие оксЛПНП с этим рецептором также приводит к активации соответствующих провоспалительных сигнальных каскадов. Для проверки возможной роли TLR4 в регуляции экспрессии гена *aroA-I* под действи-

ем ЛПНП использовали блокирующие антитела к рецептору TLR4. Результаты представлены на рис. 4. При инкубации в течение 24 ч блокирование рецептора TLR4 приводило к инвертированию стимулирующего эффекта оксЛПНП (рис. 4, *а*). Исследование роли рецептора TLR4 в подавлении активности гена *aroA-I* при инку-

бации макрофагов с оксЛПНП в течение 48 ч показало, что предварительная инкубация макрофагов с блокирующими антителами к рецептору TLR4 приводила к полной отмене эффекта оксЛПНП, но не к отмене эффекта лиганда LXR (рис. 4, б). Таким образом, полученные результаты позволяют утверждать, что как стимулирующий (инкубация 24 ч), так и подавляющий (инкубация 48 ч) эффекты оксЛПНП на уровень мРНК *ApoA-I* в макрофагах обусловлены взаимодействием оксЛПНП с рецептором TLR4 и активацией соответствующих сигнальных каскадов.

Роль сигнальных каскадов MAP-киназ и фактора транскрипции NF-κB в TLR4-опосредованной регуляции гена *apoA-I*. Известно, что активация TLR4 запускает в макрофагах ряд сигнальных каскадов: основные MAP-киназные каскады (p38, ERK1/2, JNK1/2/3) и каскад, ведущий к индукции провоспалительного фактора транскрипции NF-κB [52]. Изучение роли провоспалительных каскадов проводили на 48-часовой модели макрофагов THP-1, инкубированных с оксЛПНП, для того чтобы исключить возможную интерференцию с дополнительными сигнальными цепочками, действующими независимо от рецептора TLR4. Для проверки возможной роли этих каскадов в подавлении гена *apoA-I* при инкубации макрофагов с оксЛПНП в течение 48 ч были использованы ингибиторы соответствующих сигнальных путей. На рис. 5 представлены результаты соответствующих экспериментов. Установлено, что

блокирование сигнальных каскадов NF-κB, JNK и ERK1/2 приводит к угнетению экспрессии гена *apoA-I* в макрофагах THP-1, что свидетельствует о важности соответствующих сигнальных путей в регуляции активности данного гена. На этом фоне инкубация макрофагов с оксЛПНП не приводила к дальнейшему снижению уровня мРНК *ApoA-I* в клетках. Следовательно, оксЛПНП-зависимое угнетение синтеза *ApoA-I* в макрофагах реализуется с участием MAP-киназных каскадов ERK1/2 и JNK (но не p38), а также фактора транскрипции NF-κB (в противном случае, если бы оксЛПНП действовали независимо от данных сигнальных цепочек, подавляющие действия ингибиторов и оксЛПНП на уровень мРНК *ApoA-I* суммировались бы, что противоречит результатам эксперимента). Таким образом, можно утверждать, что за подавление экспрессии гена *apoA-I* при 48-часовой инкубации с оксЛПНП отвечает TLR4-зависимая активация NF-κB, JNK и ERK1/2, но не p38.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вопросы о функциях эндогенного *ApoA-I* в макрофагах, детали регуляции экспрессии этого гена, возможное участие эндогенного *ApoA-I* в процессах атерогенеза до сих пор во многом остаются открытыми. Показанная нами ранее противовоспалительная активность *ApoA-I* в макрофагах, его способность стабилизировать кас-

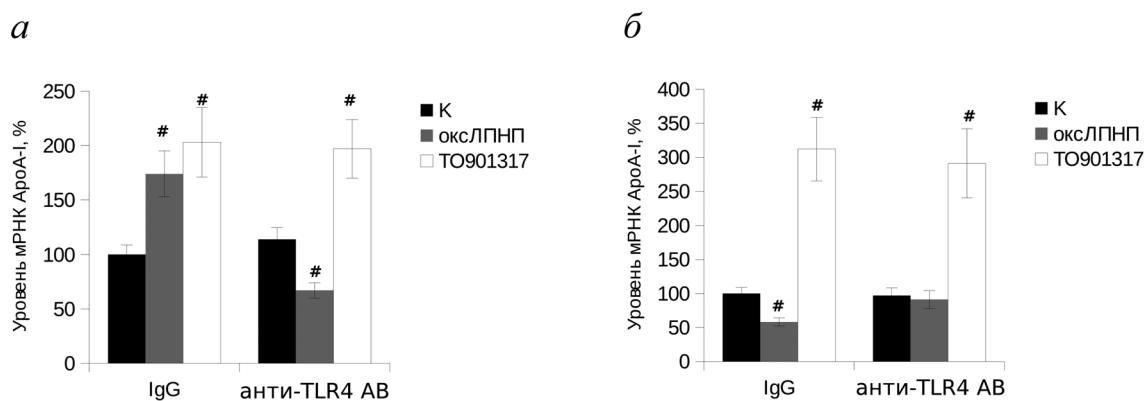


Рис. 4. Роль рецептора TLR4 в регуляции экспрессии гена *apoA-I* при инкубации макрофагов человека с оксЛПНП в течение 24 (а) и 48 (б) часов. Клетки THP-1 дифференцировали индукцией PMA как описано в разделе «Материалы и Методы», далее добавляли блокирующие антитела против TLR4 человека (анти-TLR4 AB) в концентрации 5 мкг/мл. В контрольные образцы добавляли неспецифические IgG человека в той же концентрации. Через 15 мин инкубации с антителами к клеткам добавляли оксЛПНП до концентрации 50 мкг/мл либо агонист LXR TO901317 (5 мкМ) и инкубировали в течение 24 или 48 ч. В контрольные точки вносили BSA (50 мкг/мл). Из клеток выделяли РНК и проводили определение уровня мРНК *ApoA-I* методом qRT-PCR. Выравнивание образцов проводили по трём референсным генам (*циклофилин А*, β -*актин* и *rplp0*). Представлены результаты среднего значения из трёх независимых экспериментов, планки погрешности соответствуют стандартной ошибке среднего. Статистическая достоверность различий обработанных оксЛПНП или TO901317 макрофагов с контрольными необработанными клетками проверялась по критерию Даннета, # соответствуют $p < 0,05$

сетный транспортёр ABCA1 [10], а также ряд данных по влиянию экспрессии экзогенного гена *apoA-I* человека в макрофагах мыши на развитие атеросклеротических повреждений [13–16] позволяют уверенно говорить об антиатерогенном действии ApoA-I в макрофагах. В настоящей работе впервые изучена динамика экспрессии гена *apoA-I* в макрофагах человека в процессе захвата ими оксЛПНП – процессе, приводящем к формированию пенистых клеток. Накопление липидов и, в частности, холестерина в макрофагах приводит к активации генов белков, участвующих в обратном транспорте холестерина, таких как кассетные транспортёры ABCA1 и ABCG1. Ключевую роль в этом процессе играют ядерные рецепторы PPAR γ и LXR, чьи агонисты накапливаются в клетке при поглощении оксЛПНП [51]. Гены *ABCA1* и *ABCG1* являются прямыми мишенями факторов транскрипции LXR (регуляторные районы *ABCA1* и *ABCG1* содержат сайты связывания LXR), а ген *LXR β* активируется рецептором PPAR γ [51]. Регуляторная область гена *apoA-I* человека также содержит сайт связывания для ядерных рецепторов LXR (сайт С в составе гепатоцитарного энхансера) [20]. Более того, в гепатоцитах факторы транскрипции LXR взаимодействуют с этим сайтом и подавляют активность гена *apoA-I* [20, 32]. Ранее мы показали, что в макрофагах LXR сохраняют способность взаимодействовать с сайтом С гепатоцитарного энхансера гена *apoA-I*, но в отличие от гепатоцитов в макрофагах LXR являются активаторами экспрессии гена *apoA-I* [11]. Таким образом, можно было ожидать, что захват макрофагами оксЛПНП будет сопровождаться не только индукцией экспрессии генов кассетных транспортёров ABCA1 и ABCG1, но и активацией гена *apoA-I* по сходному, LXR-зависимому механизму. Проведённая в рамках этой статьи проверка данного предположения выявила гораздо более сложные механизмы изменения активности гена *apoA-I* при захвате макрофагами оксЛПНП. Хотя инкубация макрофагов с оксЛПНП в течение 24 ч действительно приводила к усилению экспрессии гена *apoA-I* как на уровне мРНК, так и на уровне белка, данный процесс не зависел от накопления в клетках лигандов для ядерных рецепторов LXR. Вывод о независимости усиления экспрессии *apoA-I* от накопления в клетках лигандов ядерных рецепторов LXR поддерживается результатами эксперимента, представленными на рис. 4, а – блокирование рецептора TLR4 приводит к инверсии действия оксЛПНП на ген *apoA-I*. В макрофагах LXR являются активаторами гена *apoA-I* (см. эффект агониста LXR TO901317, рис. 2,

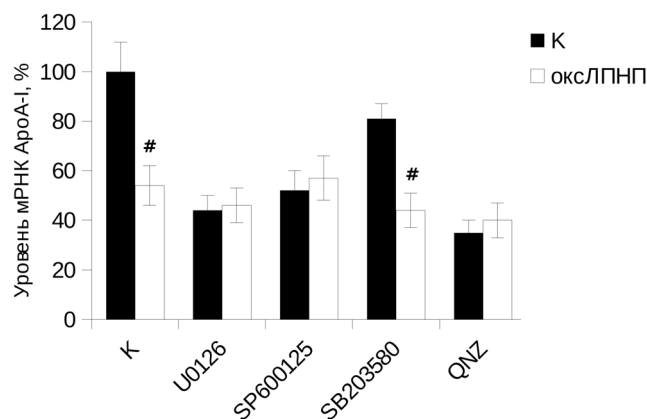


Рис. 5. Роль сигнальных каскадов рецептора TLR4 в подавлении экспрессии гена *apoA-I* в макрофагах при инкубации с оксЛПНП в течение 48 ч: клетки THP-1 дифференцировали индукцией PMA как описано в разделе «Материалы и Методы», далее добавляли ингибитор p38-MAPK SB203580 (25 мкМ), ингибитор JNK1/2/3 SP600125 (10 мкМ), ингибитор MEK1/2 U0126 (10 мкМ) и ингибитор NF- κ B QNZ (10 нМ). Инкубацию проводили в течение 1 ч. Далее добавляли оксЛПНП (50 мкг/мл) или BSA (50 мкг/мл, контроль) и инкубировали в течение 48 ч. Анализ экспрессии *apoA-I* проводили методом qRT-PCR. Выравнивание образцов проводили по трём референсным генам (*циклофилин А*, *β -актин* и *rplp0*). Представлены результаты среднего значения из трёх независимых экспериментов, планки погрешности соответствуют стандартной ошибке среднего. Статистическую достоверность различий между инкубированными и неинкубированными с оксЛПНП макрофагами проверяли по критерию Даннета, # соответствуют $p < 0,05$

а и б), следовательно, если бы усиление экспрессии после 24-часовой инкубации с оксЛПНП было действительно вызвано накоплением в клетке лигандов LXR, то можно было бы ожидать, что блокирование TLR4 либо вообще не окажет влияния на действие оксЛПНП, либо приведёт к ослаблению стимулирующего действия. В реальности блокирование рецептора TLR4 приводило к инвертированию эффекта оксЛПНП на уровень мРНК ApoA-I – в таких условиях наблюдалось подавление экспрессии гена *apoA-I* уже через 24 ч после инкубации макрофагов с оксЛПНП. Полученные результаты можно объяснить разнонаправленным характером воздействия оксЛПНП на активность гена *apoA-I*. Наряду со стимулирующим действием через рецептор TLR4, индуцируются дополнительные сигнальные пути, негативно регулирующие ген *apoA-I*. Эффект от активации рецептора TLR4 оказывается более выраженным, поэтому негативная регуляция выявляется только при блокировании TLR4. Сигнальные цепочки, которые лежат в основе этой негативной регуляции, остаются неизвестными, для их выявления требуется проведение до-

полнительных исследований. В литературе имеются противоречивые данные о способности оксЛПНП инициировать сигнальные каскады через взаимодействие с рецептором TLR4 (см. раздел «Введение»). В частности, в ряде работ утверждается, что регистрируемая активация сигнальных путей обусловлена примесями эндотоксина в препаратах оксЛПНП, который, связываясь с TLR4, ответственен за наблюдаемые эффекты [37, 38]. Для исключения возможной активации рецептора TLR4 примесным эндотоксином в наших экспериментах ко всем экспериментальным точкам добавляли полимиксин В – вещество, связывающее и инактивирующее эндотоксин. Таким образом, совокупность представленных данных позволяет сделать вывод, что усиление синтеза АроА-I в макрофагах человека в результате 24-часовой инкубации макрофагов с оксЛПНП обусловлено инициацией в клетках сигнальных каскадов при взаимодействии оксЛПНП с TLR4.

Изучение долговременных эффектов оксЛПНП на активность гена *aroA-I* также привело к неожиданным результатам. В отличие от лиганда LXR, стимулирующее действие которого на активность гена *aroA-I* только усиливалось с течением времени, оксЛПНП, начиная с 48 ч инкубации, прогрессивно подавляли активность данного гена. Возможным объяснением подобной инверсии могло бы быть развитие в макрофагах стресса ЭПР, описанное ранее при захвате макрофагами оксЛПНП [46, 47]. Тем не менее в наших экспериментах стресс ЭПР зафиксирован не был. Причинами подобных расхождений, возможно, являются недостаточные сроки инкубации и концентрации оксЛПНП. Косвенным подтверждением данного предположения является низкий уровень апоптоза (менее 10%) среди макрофагов, культивировавшихся в присутствии оксЛПНП, что свидетельствует о начальных стадиях формирования пенных клеток, достигнутых в наших экспериментах, при которых стресс ЭПР ещё не развивается (данные не приведены).

Подавляющее действие оксЛПНП при длительных сроках инкубации на активность гена *aroA-I* нельзя также объяснить накоплением в клетках липидов и их производных. Эксперименты по сортировке макрофагов после инкубации с флуоресцентно мечеными оксЛПНП показали, что в отличие от гена *ABCA1*, чья индукция наблюдалась исключительно в клетках, захвативших значительные количества оксЛПНП, экспрессия гена *aroA-I* оказалась одинаково снижена как в липид-нагруженных, так и в липид-ненагруженных макрофагах. Полученные

результаты однозначно свидетельствуют в пользу сигнального механизма действия оксЛПНП. Эксперименты по блокировке рецептора TLR4 окончательно подтвердили данное предположение. В этих условиях подавляющее действие оксЛПНП не проявлялось. Следовательно, за подавление активности гена *aroA-I* при длительной инкубации макрофагов с оксЛПНП ответственны сигнальные каскады, инициируемые на рецепторе TLR4. Интересным фактом в данном случае является то, что стимуляция одного и того же рецептора одним и тем же лигандом в зависимости от сроков инкубации оказывает диаметрально противоположное действие на экспрессию гена-мишени. Подобный эффект при активации рецептора TLR4 на экспрессию генов в макрофагах уже описывали ранее. Экспрессия генов, например *Cttnb1*, *Maff*, *Zfp3611*, *Dnaja4*, *MOUSE UPF04* и *Slbp*, при связывании с LPS рецептора TLR4 возрастала в первые 2–4 ч, но далее подавлялась в течение 8 ч [53]. Ингибиторный анализ позволил выявить важную роль MAP-киназных каскадов ERK1/2 и JNK, а также фактора транскрипции NF-κB в подавлении гена *aroA-I* при длительной инкубации макрофагов с оксЛПНП. Ранее было показано, что данные MAP-киназные каскады участвуют в активации гена *aroA-I* в макрофагах человека под действием TNFα [11], а также в условиях гипоксии [12], причём в этом процессе важную роль играют факторы транскрипции LXR. В случае репрессорного действия оксЛПНП участие LXR представляется маловероятным, возможно, в данном процессе задействованы такие факторы транскрипции, как FOXO1–3, взаимодействующие с сайтом В гепатоцитарного энхансера гена *aroA-I* [27, 28]. Интересно, что эффекты ингибиторов MAP-киназ и NF-κB на уровень активности гена *aroA-I* в макрофагах человека зависят, по-видимому, от степени дифференцировки макрофагов. В моноцитах блокирование любого из трёх основных MAP-киназных каскадов, а также блокирование фактора транскрипции NF-κB приводит к повышению уровня мРНК АроА-I [11]. По мере дифференцировки стимулирующие эффекты ингибиторов ослабевают и меняются на противоположные [11, 12]. Учитывая индивидуальность скорости дифференцировки моноцитов в макрофаги в каждом эксперименте, общее нарастание уровня мРНК АроА-I в макрофагах по мере дифференцировки [10], а также разделение в ходе дифференцировки макрофагов на АроА-I-бедные и АроА-I-богатые [10, 11], сравнивать между собой данные по влиянию ингибиторов на базовый уровень мРНК АроА-I, полученные в раз-

ных экспериментах, довольно затруднительно. Тем не менее данное обстоятельство не является препятствием для применения ингибиторного анализа с целью выяснения роли сигнальных каскадов в действиях каких-либо внешних стимулов на уровень активности гена *apoA-I* в макрофагах человека. Ещё одним потенциальным подводным камнем при интерпретации результатов ингибиторного анализа может быть неспецифическая активность использованных ингибиторов. Так, например, имеются данные о способности использованного нами ингибитора киназ семейства p38, SB203580, угнетать в высоких концентрациях также киназы JNK [54]. Хотя наши результаты свидетельствуют об отсутствии подобного перекрестного действия (в противном случае обработка клеток SB203580 приводила бы к такому же эффекту, как и применение специфического ингибитора киназ JNK SP600125, что не соответствует полученным результатам), нельзя исключить влияния использованных в работе ингибиторов на какие-то другие сигнальные пути в клетках. Исходя из вышесказанного, представленные в настоящей работе данные о роли MAP-киназных каскадов в оксЛПНП-опосредованном подавлении экспрессии гена *apoA-I* в макрофагах человека следует рассматривать как предварительные, окончательные доказательства требуют проведения дополнительных экспериментов, например, с использованием РНК-интерференции.

Регуляторные районы гена *apoA-I* человека не содержат сайт связывания для фактора транскрипции NF-κB. Тем не менее данный фактор транскрипции принимает участие в LPS- и TNFα-опосредованном подавлении экспрессии гена *apoA-I* в гепатоцитах [55, 43], а также в индукции экспрессии *apoA-I* в макрофагах под действием TNFα [11] и в условиях гипоксии [12]. Эффекты NF-κB обусловлены его взаимодей-

ствием с позитивным регулятором экспрессии гена *apoA-I* в печени — ядерным рецептором PPARα. Такое взаимодействие приводит к взаимному ингибированию обоих факторов транскрипции (механизм транс-репрессии) [55]. Интересно, что в макрофагах человека PPARα также регулирует экспрессию *apoA-I*, но в отличие от гепатоцитов действует в качестве репрессора транскрипции [11]. Возможно, что механизмы действия NF-κB на уровень экспрессии *apoA-I* в макрофагах и гепатоцитах сходны, данный вопрос требует проведения дополнительных исследований.

Суммируя, в настоящей работе впервые показаны изменения экспрессии гена *apoA-I* в макрофагах человека при начальных этапах формирования пенистых клеток. Выявлена сложная, имеющая разнонаправленный характер динамика экспрессии, в частности, показано, что исходная индукция синтеза ApoA-I в течение первых суток через 48 ч сменяется подавлением экспрессии гена *apoA-I*. При этом как стимуляция, так и подавление экспрессии *apoA-I* не связаны с накоплением в макрофагах липидов, а обусловлены взаимодействием оксЛПНП с рецептором TLR4.

Финансирование. Данная работа была поддержана Российским научным фондом (грант № 17-15-01326).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическими стандартами институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и её последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wolf, D., and Ley, K. (2019) Immunity and Inflammation in Atherosclerosis, *Circ. Res.*, **124**, 315-327, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313591.
2. Zannis, V. I., Chroni, A., and Krieger, M (2006) Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL, *J. Mol. Med.*, **84**, 276-294, doi: 10.1007/s00109-005-0030-4.
3. Никифорова А. А., Хейфец Г. М., Алкснис Е. Г., Парфенова Н. С., Климов А. Н. (1988) Акцепция холестерина из мембран эритроцитов подфракцией ЛПВП2, роль лецитин-холестерин-ацилтрансферазы в этом процессе, *Биохимия*, **53**, 1334-1338.
4. Shah, P. K., Kaul, S., Nilsson, J., and Cercek, B. (2001) Exploiting the vascular protective effects of high-density lipoprotein and its apolipoproteins: an idea whose time for testing is coming, *Circulation*, **104**, 2376-2383, doi: 10.1161/hc4401.098467.
5. Нука, Н., Дэйер, Дж. М., Моду, С., Коно, Т., Эдвардс, С. К. 3rd, et al. (2001) Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes, *Blood*, **97**, 2381-2389, doi: 10.1182/blood.v97.8.2381.
6. Burger, D., and Dayer, J. M. (2002) High-density lipoprotein-associated apolipoprotein A-I: the missing link between infection and chronic inflammation? *Autoimmun Rev.*, **1**, 111-117, doi: 10.1016/s1568-9972(01)00018-0.

7. Wadham, C., Albanese, N., Roberts, J., Wang, L., Bagley, C. J., et al. (2004) High-density lipoproteins neutralize C-reactive protein proinflammatory activity, *Circulation*, **109**, 2116-2122, doi: 10.1161/01.CIR.0000127419.45975.26.
8. Connelly, M. A., and Williams, D. L. (2004) SR-BI and HDL cholesteryl ester metabolism, *Endocr. Res.*, **30**, 697-703, doi: 10.1081/erc-200043979.
9. Walsh, A., Ito, Y., and Breslow, J. L. (1989) High levels of human apolipoprotein A-I in transgenic mice result in increased plasma levels of small high density lipoprotein (HDL) particles comparable to human HDL3, *J. Biol. Chem.*, **264**, 6488-6494.
10. Mogilenko, D. A., Orlov, S. V., Trulioff, A. S., Ivanov, A. V., Nagumanov, V. K., et al. (2012) Endogenous apolipoprotein A-I stabilizes ATP-binding cassette transporter A1 and modulates Toll-like receptor 4 signaling in human macrophages, *FASEB J.*, **26**, 2019-2030, doi: 10.1096/fj.11-193946.
11. Shavva, V. S., Mogilenko, D. A., Nekrasova, E. V., Trulioff, A. S., Kudriavtsev, I. V., et al. (2018) Tumor necrosis factor alpha stimulates endogenous apolipoprotein A-I expression and secretion by human monocytes and macrophages: role of MAP-kinases, NF- κ B, and nuclear receptors PPAR α and LXRs, *Mol. Cell. Biochem.*, **448**, 211-223, doi: 10.1007/s11010-018-3327-7.
12. Bogomolova, A. M., Shavva, V. S., Nikitin, A. A., Nekrasova, E. V., Dizhe, E. B., et al. (2019) Hypoxia as a factor involved in the regulation of the apoA-1, ABCA1, and complement C3 gene expression in human macrophages, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 529-539, doi: 10.1134/S0006297919050079.
13. Major, A. S., Dove, D. E., Ishiguro, H., Su, Y. R., Brown, A. M., et al. (2001) Increased cholesterol efflux in apolipoprotein AI (ApoAI)-producing macrophages as a mechanism for reduced atherosclerosis in ApoAI(-/-) mice, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **21**, 1790-1795, doi: 10.1161/hq1101.097798.
14. Ishiguro, H., Yoshida, H., Major, A. S., Zhu, T., Babaev, V. R., et al. (2001) Retrovirus-mediated expression of apolipoprotein A-I in the macrophage protects against atherosclerosis *in vivo*, *J. Biol. Chem.*, **276**, 36742-36748, doi: 10.1074/jbc.M106027200.
15. Su, Y. R., Ishiguro, H., Major, A. S., Dove, D. E., Zhang, W., et al. (2003) Macrophage apolipoprotein A-I expression protects against atherosclerosis in ApoE-deficient mice and up-regulates ABC transporters, *Mol. Ther.*, **8**, 576-583, doi: 10.1016/s1525-0016(03)00214-4.
16. Su, Y. R., Blakemore, J. L., Zhang, Y., Linton, M. F., and Fazio, S. (2008) Lentiviral transduction of apoAI into hematopoietic progenitor cells and macrophages: applications to cell therapy of atherosclerosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **28**, 1439-1446, doi: 10.1161/ATVBAHA.107.160093.
17. Higuchi, K., Law, S. W., Hoeg, J. M., Schumacher, U. K., Meglin, N., and Brewer, H. B. Jr. (1988) Tissue-specific expression of apolipoprotein A-I (ApoA-I) is regulated by the 5'-flanking region of the human *ApoA-I* gene, *J. Biol. Chem.*, **263**, 18530-18536.
18. Widom, R. L., Ladas, J. A., Kouidou, S., and Karathanasis, S. K. (1991) Synergistic interactions between transcription factors control expression of the apolipoprotein AI gene in liver cells, *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 677-687, doi: 10.1128/mcb.11.2.677.
19. Mogilenko, D. A., Shavva, V. S., Dizhe, E. B., and Orlov, S. V. (2019) Characterization of distal and proximal alternative promoters of the human *ApoA-I* gene, *Mol. Biol. (Mosk.)*, **53**, 485-496, doi: 10.1134/S0026898419030121.
20. Huuskonen, J., Vishnu, M., Chau, P., Fielding, P. E., and Fielding, C. J. (2006) Liver X receptor inhibits the synthesis and secretion of apolipoprotein A1 by human liver-derived cells, *Biochemistry*, **45**, 15068-15074, doi: 10.1021/bi061378y.
21. Ge, R., Rhee, M., Malik, S., and Karathanasis, S. K. (1994) Transcriptional repression of apolipoprotein AI gene expression by orphan receptor ARP-1, *J. Biol. Chem.*, **269**, 13185-13192.
22. Shavva, V. S., Mogilenko, D. A., Bogomolova, A. M., Nikitin, A. A., Dizhe, E. B., et al. (2016) PPAR γ represses apolipoprotein A-I gene but impedes TNF α -mediated ApoA-I downregulation in HepG2 cells, *J. Cell. Biochem.*, **117**, 2010-2022, doi: 10.1002/jcb.25498.
23. Chan, J., Nakabayashi, H., and Wong, N. C. (1993) HNF4 increases activity of the rat ApoA1 gene, *Nucleic Acids Res.*, **21**, 1205-1211, doi: 10.1093/nar/21.5.1205.
24. Rottman, J. N., Widom, R. L., Nadal-Ginard, B., Mahdavi, V., and Karathanasis, S. K. (1991) A retinoic acid-responsive element in the apolipoprotein AI gene distinguishes between two different retinoic acid response pathways, *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 3814-3820, doi: 10.1128/mcb.11.7.3814.
25. Martin, C., Duez, H., Blanquart, C., Berezowski, V., Poulain, P., et al. (2001) Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPAR α and induces HDL apoA-I, *J. Clin. Invest.*, **107**, 1423-1432, doi: 10.1172/JCI10852.
26. Harnish, D. C., Malik, S., Kilbourne, E., Costa, R., and Karathanasis, S. K. (1996) Control of apolipoprotein AI gene expression through synergistic interactions between hepatocyte nuclear factors 3 and 4, *J. Biol. Chem.*, **271**, 13621-13628, doi: 10.1074/jbc.271.23.13621.
27. Shavva, V. S., Bogomolova, A. M., Nikitin, A. A., Dizhe, E. B., Oleinikova, G. N., et al. (2017) FOXO1 and LXR α downregulate the apolipoprotein A-I gene expression during hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HepG2 cells, *Cell Stress Chaperones*, **22**, 123-134, doi: 10.1007/s12192-016-0749-6.
28. Shavva, V. S., Bogomolova, A. M., Nikitin, A. A., Dizhe, E. B., Tanyanskiy, D. A., et al. (2017) Insulin-mediated downregulation of apolipoprotein A-I gene in human hepatoma cell line HepG2: the role of interaction between FOXO1 and LXR β transcription factors, *J. Cell. Biochem.*, **118**, 382-396, doi: 10.1002/jcb.25651.
29. Libby, P., and Theroux, P. (2005) Pathophysiology of coronary artery disease, *Circulation*, **111**, 3481-3488, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.537878.
30. Parthasarathy, S., Raghavamenon, A., Garelnabi, M. O., and Santanam, N. (2010) Oxidized low density lipoprotein, *Methods Mol. Biol.*, **610**, 403-417, doi: 10.1007/978-1-60327-029-8_24.
31. Feng, Y., Cai, Z. R., Tang, Y., Hu, G., Lu, J., et al. (2014) TLR4/NF- κ B signaling pathway-mediated and oxLDL-induced up-regulation of LOX-1, MCP-1, and VCAM-1 expressions in human umbilical vein endothelial cells, *Genet. Mol. Res.*, **13**, 680-695, doi: 10.4238/2014.
32. Yu, X.-H., Fu, Y.-C., Zhang, D.-W., Yin, K., and Tang, C.-K. (2013) Foam cells in atherosclerosis, *Clin.*

- Chim. Acta*, **424**, 245-252, doi: 10.1016/j.cca.2013.06.006.
33. Chistiakov, D. A., Melnichenko, A. A., Myasoedova, V. A., Grechko, A. V., and Orekhov, A. N. (2017) Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis, *J. Mol. Med. (Berl.)*, **95**, 1153-1165, doi: 10.1007/s00109-017-1575-8.
 34. Chávez-Sánchez, L., Garza-Reyes, M. G., Espinosa-Luna, J. E., Chávez-Rueda, K., Legorreta-Haquet, M. V., and Blanco-Favela, F. (2014) The role of TLR2, TLR4 and CD36 in macrophage activation and foam cell formation in response to oxLDL in humans, *Hum. Immunol.*, **75**, 322-329, doi: 10.1016/j.humimm.2014.01.012.
 35. Stewart, C. R., Stuart, L. M., Wilkinson, K., van Gils, J. M., Deng, J., et al. (2010) CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer, *Nat. Immunol.*, **11**, 155-161, doi: 10.1038/ni.1836.
 36. Yang, K., Liu, X., Liu, Y., Wang, X., Cao, L., et al. (2017) DC-SIGN and Toll-like receptor 4 mediate oxidized low-density lipoprotein-induced inflammatory responses in macrophages, *Sci. Rep.*, **3296**, 1-11, doi: 10.1038/s41598-017-03740-7.
 37. Kannan, Y., Sundaram, K., Narasimhulu, C. A., Parthasarathy, S., and Wewers, M. D. (2012) Oxidatively modified low density lipoprotein (LDL) inhibits TLR2 and TLR4 cytokine responses in human monocytes but not in macrophages, *J. Biol. Chem.*, **287**, 23479-23488, doi: 10.1074/jbc.M111.320960.
 38. Bzowska, M., Nogiec, A., Skrzeczyńska-Moncznik, J., Mickowska, B., Guzik, K., and Pryjma, J. (2012) Oxidized LDLs inhibit TLR-induced IL-10 production by monocytes: a new aspect of pathogen-accelerated atherosclerosis, *Inflammation*, **35**, 1567-1584, doi: 10.1007/s10753-012-9472-3.
 39. Bennett, S., and Breit, S. N. (1994) Variables in the isolation and culture of human monocytes that are of particular relevance to studies of HIV, *J. Leukoc. Biol.*, **56**, 236-240, doi: 10.1002/jlb.56.3.236.
 40. Khan, B. V., Parthasarathy, S. S., Alexander, R. W., and Medford, R. M. (1995) Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells, *J. Clin. Invest.*, **95**, 1262-1270, doi: 10.1172/JCI117776.
 41. Jialal, I., and Chait, A. (1989) Differences in the metabolism of oxidatively modified low density lipoprotein and acetylated low density lipoprotein by human endothelial cells: inhibition of cholesterol esterification by oxidatively modified low density lipoprotein, *J. Lipid Res.*, **30**, 1561-1568.
 42. Scoccia, A. E., Molinuevo, M. S., McCarthy, A. D., and Cortizo, A. M. (2001) A simple method to assess the oxidative susceptibility of low density lipoproteins, *BMC Clin. Pathol.*, **1**, 1, doi: 10.1186/1472-6890-1-1.
 43. Esterbauer, H., and Cheeseman, K. H. (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal, *Methods Enzymol.*, **186**, 407-421, doi: 10.1016/0076-6879(90)86134-h.
 44. Mogilenko, D. A., Dizhe, E. B., Shavva, V. S., Lapikov, I. A., Orlov, S. V., and Perevozchikov, A. P. (2009) Role of the nuclear receptors HNF4 α , PPAR α , and LXRs in the TNF α -mediated inhibition of human apolipoprotein A-I gene expression in HepG2 cells, *Biochemistry*, **48**, 11950-11960, doi: 10.1021/bi9015742.
 45. Mogilenko, D. A., Kudriavtsev, I. V., Shavva, V. S., Dizhe, E. B., Vilenskaya, E. G., et al. (2013) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha positively regulates complement C3 expression but inhibits tumor necrosis factor α -mediated activation of C3 gene in mammalian hepatic derived cells, *J. Biol. Chem.*, **288**, 1726-1738, doi: 10.1074/jbc.M112.437525.
 46. Yao, S., Miao, C., Tian, H., Sang, H., Yang, N., et al. (2014) Endoplasmic reticulum stress promotes macrophage-derived foam cell formation by up-regulating cluster of differentiation 36 (CD36) expression, *J. Biol. Chem.*, **289**, 4032-4042, doi: 10.1074/jbc.M113.524512.
 47. Sanda, G. M., Deleanu, M., Toma, L., Stancu, C. S., Simionescu, M., and Sima, A. V. (2017) Oxidized LDL-exposed human macrophages display increased MMP-9 expression and secretion mediated by endoplasmic reticulum stress, *J. Cell. Biochem.*, **118**, 661-669, doi: 10.1002/jcb.25637.
 48. Bae, Y. S., Lee, J. H., Choi, S. H., Kim, S., Almazan, F., et al. (2009) Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized low-density lipoprotein: toll-like receptor 4- and spleen tyrosine kinase-dependent activation of NADPH oxidase 2, *Circ. Res.*, **104**, 210-218, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.181040.
 49. Park, Y. M. (2014) CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis, *Exp. Mol. Med.*, **46**, e99, doi: 10.1038/emmm.2014.38.
 50. Yang, H. Y., Bian, Y. F., Zhang, H. P., Gao, F., Xiao, C. S., et al. (2015) LOX-1 is implicated in oxidized low-density lipoprotein-induced oxidative stress of macrophages in atherosclerosis, *Mol. Med. Rep.*, **12**, 5335-5341, doi: 10.3892/mmr.2015.4066.
 51. Chawla, A., Boisvert, W. A., Lee, C. H., Laffitte, B. A., Barak, Y., et al. (2001) A PPAR γ -LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis, *Mol. Cell*, **7**, 161-171, doi: 10.1016/s1097-2765(01)00164-2.
 52. Hopkins, P. N. (2013) Molecular biology of atherosclerosis, *Physiol. Rev.*, **93**, 1317-1542, doi: 10.1152/physrev.00004.2012.
 53. Eichelbaum, K., and Krijgsveld, J. (2014) Rapid temporal dynamics of transcription, protein synthesis, and secretion during macrophage activation, *Mol. Cell. Proteomics*, **13**, 792-810, doi: 10.1074/mcp.M113.030916.
 54. Clerck, A., and Sugden, P. H. (1998) The p38-MAPK inhibitor, SB203580, inhibits cardiac stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases (SAPKs/JNKs), *FEBS Lett.*, **426**, 93-96, doi: 10.1016/s0014-5793(98)00324-x.
 55. Morishima, A., Ohkubo, N., Maeda, N., Miki, T., and Mitsuda, N. (2003) NF κ B regulates plasma apolipoprotein A-I and high density lipoprotein cholesterol through inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor alpha, *J. Biol. Chem.*, **278**, 38188-38193, doi: 10.1074/jbc.M306336200.

**REGULATION OF THE APOLIPOPROTEIN A-I GENE EXPRESSION
IN HUMAN MACROPHAGES BY OXIDATED LOW DENSITY LIPOPROTEIN**

**E. V. Nekrasova¹, E. E. Larionova¹, K. Danko², D. O. Kuzmina²,
V. S. Shavva¹, I. V. Kudriavtsev¹, and S. V. Orlov^{1,2*}**

¹ *Institute of Experimental Medicine, 197376 St. Petersburg, Russia; E-mail: serge@iem.sp.ru*

² *St. Petersburg State University, 199034 St. Petersburg, Russia; E-mail: s.orlov@spbu.ru*

Apolipoprotein A-I (ApoA-I) is a key component of reverse cholesterol transport in humans. In the previous studies, we demonstrated expression of the *apoA-I* gene in human monocytes and macrophages; however, little is known on the regulation of the *apoA-I* expression in macrophages during the uptake of modified low-density lipoprotein (LDL), which is one of the key processes in the early stages of atherogenesis leading to formation of foam cells. Here, we demonstrate a complex nature of the *apoA-I* regulation in human macrophages during the uptake of oxidized LDL (oxLDL). Incubation of macrophages with oxLDL induced expression of the *apoA-I* gene within the first 24 h, but suppressed it after 48 h. Both effects depended on the interaction of oxLDL with the TLR4 receptor, rather than on the oxLDL uptake by the macrophages. The oxLDL-mediated downregulation of the *apoA-I* gene depended on the ERK1/2 and JNK cascades, as well as on the NF- κ B cascade.

Keywords: atherosclerosis, oxLDL, macrophages, THP-1, foam cells, TLR4 receptor, *apoA-I* gene