

УДК 571.27

©Коллектив авторов

СОДЕРЖАНИЕ АНТИТЕЛ К МОДИФИЦИРОВАННЫМ ЛИПОПРОТЕИНАМ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ И ИХ КОМПЛЕКСОВ В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ПРОЯВЛЕНИЯМИ АТЕРОСКЛЕРОЗА

И.В. Белик^{1}, А.А. Иванцова¹, З.Э. Мамедова¹, А.Д. Денисенко^{1,2}*

¹Институт экспериментальной медицины,

197376, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова д.12;

тел.: +7(812)234-6868; факс: +7(812)2349489; эл. почта: ivanbelik2014@yandex.ru

²Санкт-Петербургский государственный университет,

199034, Санкт-Петербург, Университетская набережная, д. 7/9

Исследовали 79 пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС), 25 – с доклиническим атеросклерозом и 59 практически здоровых лиц. У всех пациентов были определены ключевые липидные показатели. Уровни антител (АТ) классов IgG и IgM к ЛПНП, модифицированным малоновым диальдегидом (МДА), уксусным ангидридом и гипохлоритом, определяли методом иммуноферментного анализа. Специфичность АТ проверяли методом конкурентного иммуноферментного анализа. Циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) выделяли методом осаждения в полиэтиленгликоле с последующим определением в них содержания холестерина энзиматическим методом. В сыворотке крови обследованных лиц были обнаружены АТ к ЛПНП, модифицированным гипохлоритом (гипохлорит-ЛПНП), которые перекрестно не взаимодействовали с модифицированными МДА (МДА-ЛПНП) и ацетилированными ЛПНП (ацет-ЛПНП). По сравнению со здоровыми лицами и пациентами с доклиническим атеросклерозом у больных ИБС был повышен уровень холестерина ЦИК (ХС-ЦИК) ($p < 0,0001$) и снижен ($p = 0,006$) уровень АТ (IgM) к гипохлорит-ЛПНП. Обнаружена корреляция между уровнями АТ (IgG) к гипохлорит-ЛПНП и уровнями АТ к МДА- и ацет-ЛПНП. Также наблюдалась корреляция между содержанием АТ (IgM) к МДА- и ацет-ЛПНП и концентрацией холестерина ЦИК (ХС-ЦИК). Связи между уровнями АТ и липидными показателями не выявлено.

Ключевые слова: атеросклероз, модифицированные липопротеины низкой плотности, антитела к модифицированным липопротеинам низкой плотности, холестерин циркулирующих иммунных комплексов

DOI 10.18097/PBMC20166204471

ВВЕДЕНИЕ

Изучение роли иммунных факторов в патогенезе атеросклероза по-прежнему остается актуальной проблемой. Аутоиммунная теория развития атеросклероза, выдвинутая Климовым и соавт. [1], основывается на формировании аутоантигенности липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), подвергшихся различным химическим модификациям. Согласно данной теории, развитие иммунного ответа на модифицированные ЛПНП является одним из важнейших событий в патогенезе атеросклероза.

Известны различные варианты модификации ЛПНП, включающие в себя перекисное окисление, гликирование, дезаилирование и др. Значительный интерес представляют продукты взаимодействия ЛПНП с миелопероксидазой [2-4], ключевым ферментом врожденного иммунитета, содержащимся в нейтрофилах и моноцитах. Модификация ЛПНП гипохлоритом – продуктом миелопероксидазной реакции – приводит к повышенному захвату таких ЛПНП макрофагами [5]. Гипохлорированные ЛПНП (гипохлорит-ЛПНП) индуцируют апоптоз Т-клеток [6], активируют гранулоциты и их адгезию на эндотелии [7]; кроме того, такие ЛПНП найдены в атеросклеротических поражениях [8] и являются иммуногенными [9].

В ряде работ показана связь антител (АТ) к модифицированным ЛПНП с развитием атеросклеротических поражений и ишемической болезни сердца [10, 11]. В тоже время другие авторы показывают обратную связь между этими показателями [12, 13].

В сыворотке крови человека и в атеросклеротических бляшках показано присутствие циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) модифицированных ЛПНП с АТ к этим липопротеинам [14]. Между повышенным содержанием этих комплексов в крови и наличием атеросклероза была обнаружена взаимосвязь [15].

Изучение участия антилипидных антител и их комплексов в атерогенезе представляется важным для формирования подходов к лечению, профилактике и, возможно, диагностике атеросклероза.

МЕТОДИКА

Пациенты

Обследовали 163 человека в возрасте от 27 до 67 лет, давших информированное согласие на участие в данном исследовании. Первую группу составили здоровые лица (59 человек). Во вторую группу вошли 25 человек с доклиническим

* - адресат для переписки

атеросклерозом (наличие атеросклеротических бляшек в сонной и бедренной артериях установлено с помощью УЗИ). Третья группа – 79 пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС). У всех обследуемых были определены уровни ключевых липидных показателей (общий холестерин, ЛПНП, липопротеины высокой плотности, триглицериды), уровни АТ к модифицированным ЛПНП и концентрация холестерина ЦИК (ХС-ЦИК).

Определение уровня АТ

Как было показано ранее, формирование эпитопов, распознаваемых АТ к модифицированным ЛПНП, возможно при аналогичной модификации белков другой природы [16]. В качестве модельного белка использовали человеческий сывороточный альбумин (ЧСА).

Уровень антител определялся методом иммуноферментного анализа (ИФА) по схеме, представленной ранее [16]. В качестве твёрдой фазы использовали 96-луночные планшеты для микротитрования (Thermo Fisher Scientific, “Nunc”, США) высокой сорбционной ёмкости. Антигены – человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), модифицированный малоновым диальдегидом (МДА), уксусным ангидридом и гипохлоритом, инкубировали на планшете в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), pH 7,4 (в концентрации 10 мкг/мл). Нативный альбумин использовали в качестве контроля. Плазму последовательно разводили (1:50) в блокирующем буфере с казеином. В качестве вторых антител использовали мышиные антитела против IgG или IgM человека, меченые пероксидазой хрена (“Полигност”, Санкт-Петербург, Россия) в разведении 1:200. В качестве субстрата использовали раствор тетраметилбензидина в цитратном буфере. Реакцию останавливали двухмолярным раствором (2 М) раствором серной кислоты и измеряли оптическую плотность при 450 нм на автоматическом ридере ELx-800 (“BioTek”, США). Уровень АТ выражали в относительных единицах (разница значений ОП, полученных для модифицированного и нативного белка).

Конкурентный ИФА

На планшете инкубировали в качестве антигенов: нативный ЧСА, модифицированный МДА (МДА-ЧСА), ацетилированный (ацет-ЧСА), и гипохлоритовый (гипохлорит-ЧСА) ЧСА, в концентрации 10 мкг/мл. Лунки промывали и блокировали, как описано выше. Человеческие сыворотки в соответствующем разведении (1:50) преинкубировали 1 ч в присутствии различных концентраций тестируемых антигенов (0–500 мкг/мл), после чего вносили в лунки. Последующие стадии проводили так же, как описано выше.

Модификации белков

Гипохлоритирование ЧСА. Модификацию ЧСА гипохлоритом осуществляли по методике, описанной ранее [5,17, 18]. К раствору ЧСА (1 мг/мл) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ, pH=7,4) добавляли

0,2 М раствор гипохлорита натрия в ФСБ, из расчёта 100 молекул гипохлорита на частицу ЧСА. Смесь инкубировали 2 ч при температуре +4°C.

Модификация ЧСА малоновым диальдегидом. МДА готовили непосредственно перед использованием по описанному методу [19]. Готовый раствор МДА добавляли к раствору ЧСА (1 мг/мл в ФСБ) и инкубировали 1 ч при комнатной температуре при встряхивании.

Ацетилирование ЧСА. Уксусный ангидрид (3 мкл/мг белка) добавляли к раствору ЧСА (1 мг/мл) в ФСБ и инкубировали 1 ч при комнатной температуре при встряхивании; pH реакционной среды поддерживали в пределах 7-8 с помощью 1 М раствора гидроксида натрия. Во всех перечисленных случаях реакции останавливали диализом против ФСБ.

Определение концентрации белка

Концентрацию белка определяли с помощью бицинхинового реактива по методике [20].

Определение холестерина циркулирующих иммунных комплексов

К 0,7 мл сыворотки на холоду добавляли 0,7 мл ФСБ, содержащего 5% полиэтиленгликоля (ПЭГ, м.в. = 6000), перемешивали и инкубировали пробы на холоду (+4°C) в течение 30 мин. Затем центрифугировали при охлаждении (+4°C) 20 мин при 5000 об/мин (режим центрифугирования: Relative Centrifugal Force (RCF) or G-force = 2830), после чего супернатант отсасывали. Осадок промывали охлаждённым 5% раствором ПЭГ в ФСБ 2-3 раза по 1 мл, каждый раз аналогичным образом центрифугировали и отбрасывали супернатант. Промытый осадок растворяли в 0,1 мл физиологического раствора, после чего определяли содержание холестерина в образцах с помощью энзиматического колориметрического набора для определения холестерина (“Randox laboratories LTD”, Великобритания) по рекомендованному производителем протоколу.

Статистический анализ

Математическую обработку данных проводили с использованием пакета статистического анализа данных Statistica 6. Показатели имели непараметрическое распределение, поэтому для проведения корреляционного анализа использовался ранговый коэффициент Спирмана. Для парных сравнений использовали критерий Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В первой части работы образцы сывороток крови были проанализированы на наличие АТ к гипохлорит-модифицированным ЛПНП. У большинства пациентов обнаружен значительный титр АТ классов IgG и IgM к гипохлорит-ЛПНП. Специфичность АТ к гипохлорит-ЛПНП проверяли методом конкурентного ИФА, используя в качестве конкурентов нативный ЧСА, МДА-ЧСА, ацет-ЧСА

и гипохлорит-ЧСА. Взаимодействие этих АТ сыворотки с гипохлорит-ЧСА тормозил только собственный антиген (то есть гипохлорит-ЧСА), но не нативный, ацетилированный или МДА-ЧСА. Эта картина наблюдалась как для антител класса IgG, так и IgM (рис. 1).

Связывание антител к МДА-ЧСА и ацет-ЧСА со своими антигенами ингибировалось присутствием ацетилированного и МДА-модифицированного ЧСА, соответственно, как и было показано ранее [16].

Во второй части работы оценивали уровень содержания АТ классов IgG и IgM к модифицированным МДА, ацетилированным и гипохлоритированным ЛПНП.

В группе пациентов с ИБС уровень АТ класса IgM к ЛПНП, модифицированным гипохлоритом, был значительно ниже по сравнению со здоровыми лицами ($p=0,006$) и пациентами с доклиническим атеросклерозом ($p=0,01$) (рис. 2В). Снижение уровней АТ к фрагментам аполипопротеина В-100, нативным и модифицированным МДА, у больных ИБС

было также обнаружено в исследованиях [21, 22]. В отличие от вышеупомянутых работ, в нашем исследовании уровень АТ обоих классов к МДА-ЛПНП и ацет-ЛПНП существенно не отличался во всех группах обследованных.

Корреляционный анализ не выявил взаимосвязи между уровнями АТ и показателями липидного обмена (данные не представлены). Выделение из общей группы больных ИБС, перенёсших инфаркт миокарда, не изменило наблюдаемую картину. Однако, были найдены корреляции между уровнями АТ к различным модификациям ЛПНП (табл. 1).

Кроме того, у всех пациентов измеряли концентрацию ХС-ЦИК в сыворотке крови; она была повышена у больных ИБС ($p<0,0001$) (рис. 3), что согласуется с ранее полученными данными [23-25].

Слабая положительная корреляция ($r=0,2$; $p<0,05$) была выявлена между содержанием АТ (класса IgM) к МДА- и ацет-ЛПНП и концентрацией ЦИК (табл. 2).

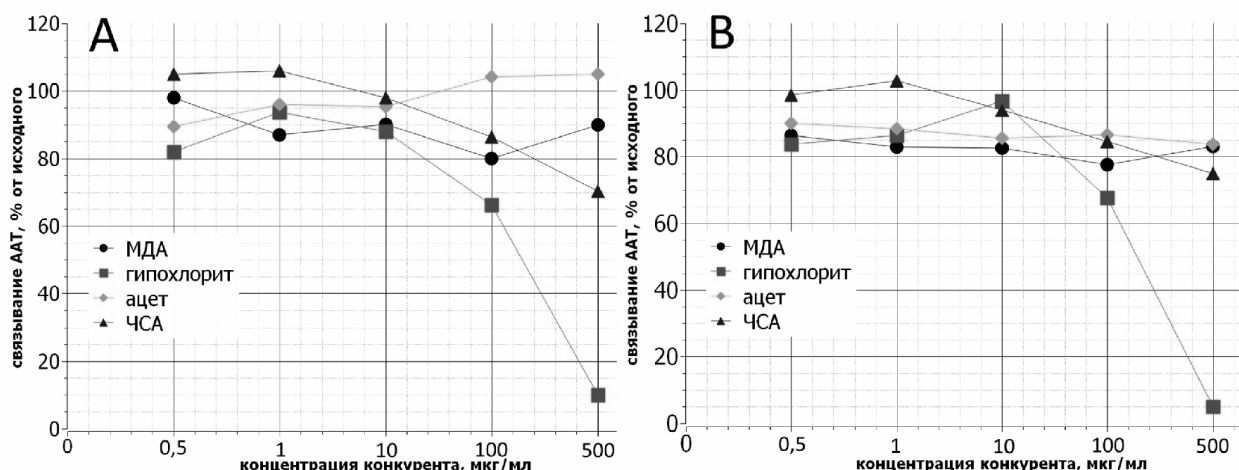


Рисунок 1. Связывание человеческих АТ IgG (А) и IgM (В) с гипохлорит-ЧСА в присутствии возрастающих концентраций конкурентов: МДА-ЧСА, ацет-ЧСА, гипохлорит-ЧСА и нативный ЧСА.

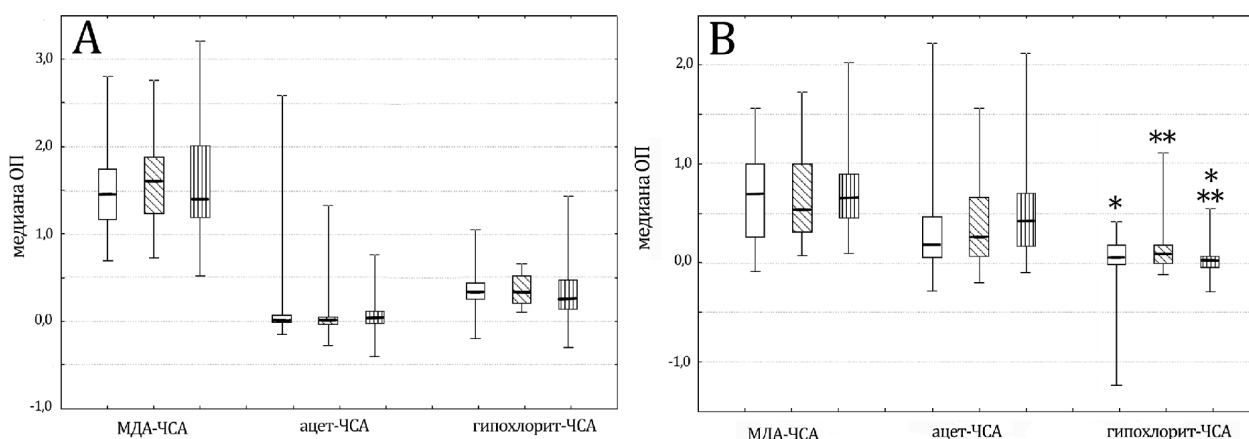


Рисунок 2. Содержание АТ классов IgG (А) и IgM (В) в крови различных групп пациентов. Содержание АТ в относительных единицах с межквартильными размахами у здоровых пациентов ($n=59$) (без штриховки), пациентов с доклиническим атеросклерозом ($n=25$) (диагональная штриховка) и пациентов с ИБС ($n=79$) (вертикальная штриховка). * - $p=0,006$; ** - $p=0,01$.

СОДЕРЖАНИЕ АНТИТЕЛ К МОДИФИЦИРОВАННЫМ ЛПНП ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

Таблица 1. Коэффициенты корреляций между АТ к различным модификациям ЛПНП

АТ к типам модификаций	МДА (IgG)	ацет (IgG)	гипохлорит (IgG)	МДА (IgM)	ацет (IgM)	гипохлорит (IgM)
МДА (IgG)	-	0,11	0,37*	0,53*	0,08	0,1
ацет (IgG)	0,11	-	0,31*	0,17*	0,21*	0,15
гипохлорит (IgG)	0,37*	0,31*	-	0,21*	-0,04	0,15*
МДА (IgM)	0,53*	0,17*	0,21*	-	0,39*	0,20*
ацет (IgM)	0,078	0,21*	-0,04	0,39*	-	0,02
гипохлорит (IgM)	0,1	0,15	0,15*	0,20*	0,02	-

Примечание: * $p < 0,05$.

Таблица 2. Коэффициенты корреляций между АТ к различным модификациям ЛПНП и содержанием ХС-ЦИК

	МДА (IgG)	ацет (IgG)	гипохлорит (IgG)	МДА (IgM)	ацет (IgM)	гипохлорит (IgM)
ХС-ЦИК	0,07	0,08	-0,02	0,16*	0,22*	0,02

Примечание: * $p < 0,05$.

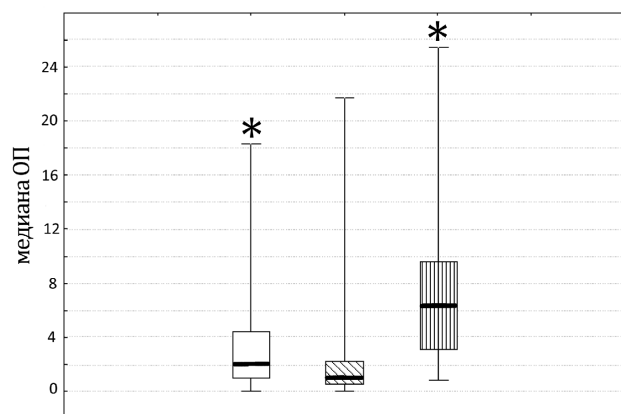


Рисунок 3. Содержание ХС-ЦИК в группах пациентов. Содержание ХС-ЦИК с межквартильными размахами у здоровых пациентов ($n=59$) (без штриховки), пациентов с доклиническим атеросклерозом ($n=25$) (диагональная штриховка) и пациентов с ИБС ($n=79$) (вертикальная штриховка). * - $p < 0,0001$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Модификация ЛПНП гипохлоритом приводит к формированию эпитопов, отличных от продуктов ацетилирования и модификации липопротеинов МДА. Эти эпитопы ответственны за образование специфических АТ классов IgG и IgM. Наличие положительной корреляционной связи между уровнями АТ к различным модификациям ЛПНП позволяет предположить множественную модификацию ЛПНП [26]. Поскольку уровень АТ к гипохлорит-ЛПНП был снижен у пациентов с ИБС по сравнению со здоровыми лицами, результаты исследования подтверждают гипотезу, что уровень АТ к модифицированным ЛПНП обратно пропорционально связан с тяжестью атеросклероза. В тоже время не было установлено такой связи АТ к другим модификациям, исследуемым в работе. Поэтому, связь уровней АТ с наличием или отсутствием атеросклероза остаётся не до конца понятной. Напротив, найденные различия

концентраций ХС-ЦИК в группах исследуемых пациентов свидетельствует в пользу того, что концентрация ХС-ЦИК может служить маркером атеросклеротического процесса.

ЛИТЕРАТУРА

- Климов А.Н. (ред.) (1986) Иммунореактивность и атеросклероз, Медицина, 192 с.
- Sokolov A.V., Kostevich V.A., Runova O.L., Gorudko I.V., Vasilyev V.B., Cherenkevich S.N., Panasenکو O.M. (2014) Chem. Phys. Lipids, **180**, 72-80.
- Панасенко О.М., Вахрушева Т.В., Власова И.И., Чеканов А.В., Баранов А.В., Сергиенко В. (2007) Бюлл. экпер. биол. мед., **144**(3), 428-431.
- Sokolov A.V., Chekanov A.V., Kostevich V.A., Aksenov D.V., Vasilyev V.B., Panasenکو O.M. (2011) Chem. Phys. Lipids, **164**, 49-53.
- Hazell L.J., Stocker R. (1993) Biochem J., **290**, 165-172.
- Resch U., Semlitsch M., Hammer A., Susani-Etzerodt H., Walczak H., Sattler W., Malle E. (2011) Biochem. Biophys. Res. Commun., **410**, 895-900.
- Kopprasch S., Leonhardt W., Pietzsch J., Kühne H. (1998) Atherosclerosis, **136**, 315-324.
- Malle E., Waeg G., Schreiber R., Gröne E.F., Sattler W., Gröne H.J. (2000) Eur. J. Biochem., **267**(14), 4495-503.
- Rouhl R.P., van Oostenbrugge R.J., Theunissen R.O., Knottnerus I.L., Staals J., Henskens L.H., Kroon A.A., de Leeuw P.W., Lodder J., Tervaert J.W., Damoiseaux J.G. (2010) Stroke, **41**, 2687-2689.
- Salonen J.T., Ylä-Herttuala S., Yamamoto R., Butler S., Korpela H., Salonen R., Nyyssönen K., Palinski W., Witztum J.L. (1992) Lancet., **339**(8798), 883-887.
- Virella G.I., Virella I., Leman R.B., Pryor M.B., Lopes-Virella M.F. (1993) Int. J. Clin. Lab. Res., **23**(2), 95-101.
- Tinahones F.J., Gómez-Zumaquero J.M., Garrido-Sánchez L., García-Fuentes E., Rojo-Martínez G., Esteva I., Ruiz de Adana M.S., Cardona F., Soriguer F. (2005) J. Lipid Res., **46**, 452-457.
- Karvonen J., Päivänsalo M., Kesäniemi Y.A., Hörrkö S. (2003) Circulation., **108**, 2107-2112.
- Virella G., Lopes-Virella M.F. (2008) Atherosclerosis, **200**, 239-246.

15. Virella G., Atchley D., Koskinen S., Zheng D., Lopes-Virella M.F.; DCCT/EDIC Research Group (2002) Clin. Immunol., **105**(1), 81-92.
16. Пугаревский П.В., Архипова О.Ю., Денисенко А.Д. (2006) Мед. иммунол., **8**(5-6), 637-644.
17. Malle E., Hazell L., Stocker R., Sattler W., Esterbauer H., Waeg G. (1995) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., **15**, 982-989.
18. Hazell U., van den Berg J.J.M., Stocker R. (1994) Biochem. J., **302**, 297-304.
19. Palinski W.S., Ylä-Herttuala S., Rosenfeld M.E. (1990) Arteriosclerosis, **10**, 325-335.
20. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. (1985) Anal. Biochem., **150**(1), 76-85.
21. Fredrikson G.N., Schiopu A., Berglund G., Alm R., Shah P.K., Nilsson J. (2007) Atherosclerosis, **194**(2), 188-192.
22. Björkbacka H., Alm R., Persson M., Hedblad B., Nilsson J., Fredrikson G.N. (2016) Arterioscler Thromb Vasc Biol., doi: 10.1161/ATVBAHA.115.306938.
23. Денисенко А.Д. (2007) Мед. акад. журн., **7**(1), 38-44.
24. Уразильдеева С.А., Шатилина Л.В., Денисенко А.Д. (1997) Кардиология, **37**(10), 17-20.
25. Denisenko A.D., Makovejchuk E.G., Vinogradov A.G. (1996) Eur. J. Lab. Med., **4**, 85-90.
26. Орехов А.Н., Тертов В.В., Назарова В.Л. (1995) Бюлл. экспер. биол. мед., **120**(8), 118-121.

Поступила: 25. 02. 2016.
Принята к печати: 03. 06. 2016.

ANTIBODIES AGAINST MODIFIED LOW-DENSITY LIPOPROTEINS AND THEIR COMPLEXES IN BLOOD OF PATIENTS WITH VARIOUS MANIFESTATIONS OF ATHEROSCLEROSIS

I.V. Belik¹, A.A. Ivantsova¹, Z.E. Mamedova¹, A.D. Denisenko^{1,2}

¹Institute of Experimental Medicine,

12 Akad. Pavlov str., St.Petersburg, 197376 Russia;

tel : 7(812)2346868; fax : 7(812) 2349489; e-mail: ivanbelik2014@yandex.ru

²Saint-Petersburg State University, 7/9 Universitetskaya emb., St.Petersburg, 199034 Russia

The study included 79 patients with coronary artery disease, 25 individuals with preclinical atherosclerosis and 59 healthy controls. Key lipid parameters were examined in all the participants. Levels of antibodies (Abs) against (IgG and IgM) LDL modified by malondialdehyde (MDA), acetic anhydride and hypochlorite, were determined by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Abs specificity was tested by competitive ELISA. Circulating immune complexes (CIC) were isolated by precipitation in polyethylene glycol. Abs to hypochlorite-modified low density lipoprotein (hypochlorite-LDL) were detected in the serum samples. These Abs did not demonstrate cross-reactivity with MDA-modified LDL (MDA-LDL) and acetylated LDL (acetyl-LDL). Patients with coronary artery disease had increased levels of CIC ($p<0.0001$) and decreased levels of Abs (IgM) to hypochlorite-LDL, compared with healthy controls and patients with preclinical atherosclerosis ($p=0.006$). A correlation between the levels of Abs (IgG) to the hypochlorite-LDL and Abs to MDA- and acetyl-LDL was found. There was a correlation between the content of the Abs (IgM) to MDA- and acetyl-LDL and the concentration of CIC-cholesterol. Lipid parameters did not correlate with Abs levels.

Key words: atherosclerosis, modified low-density lipoprotein, antibodies against modified low-density lipoprotein, cholesterol circulating immune complexes