

УДК 616.155.3-008
©Коллектив авторов

ОКИСЛЕНИЕ И ПОТРЕБЛЕНИЕ ЛПНП МОНОЦИТ-ПРОИЗВОДНЫМИ МАКРОФАГАМИ ИЗ КРОВИ БОЛЬНЫХ ИБС

М.В. Биленко^{1}, А.В. Хильченко¹, Н.А. Никитина¹, Д.В. Аксёнов²*

¹ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121, Москва,
ул. Погодинская д.10; тел.: +7(495)2465072; факс: +7(495)2450857;

эл. почта: Marianna.Bilenko@mail.ru

²НИИ Экспериментальной Кардиологии МЗСР, Москва

Целью работы являлась проверка и доказательство оригинальной гипотезы, о том, что макрофаги, полученные из моноцитов крови пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС, МФ_{ИБС}), являются *in vivo* предстимулированными (праймированными) или стимулированными клетками, поэтому их способность окислять и потреблять ЛПНП выше способности макрофагов, полученных из моноцитов крови здоровых доноров (МФ_Н).

Моноциты получали из крови 18 здоровых доноров (ЛПНП_Н) и 15 пациентов с гиперхолестеринемией (ЛПНП_Г). Инкубация ЛПНП_Н или ЛПНП_Г с МФ_{ИБС} в аэробных условиях вела к более раннему (на 1 ч) накоплению в ЛПНП ТБК-РП; более ранней агрегации ЛПНП (на 1 ч вместо 3 ч) и более выраженной фрагментации аров белка ЛПНП, а также большему потреблению ЛПНП с ростом аккумуляции общего холестерина (ОХ) в (1,8-2,1 раза, $p < 0,05-0,01$) и снижению числа жизнеспособных клеток ($p < 0,01$), по сравнению с МФ_Н. МФ_{ИБС} и МФ_Н также эффективнее окисляли и потребляли ЛПНП_Г, чем ЛПНП_Н. В большинстве тестов способность МФ_{ИБС} и МФ_Н окислять и потреблять ЛПНП_Н и ЛПНП_Г возрастала при инкубации в условиях гипоксии, по сравнению с аэробными условиями. Таким образом, выявлена предстимуляция или стимуляция моноцитов/макрофагов у больных ИБС *in vivo*, которая в сочетании с гиперхолестеринемией и локальной или генерализованной гипоксией создаёт у больных ИБС серьезные предпосылки для возникновения или прогрессирования атеросклероза. Создана экспресс-модель на основе МФ_{ИБС}, которая может быть использована для оценки активации моноцитов/макрофагов у больных с ИБС, подбора лечебных препаратов, скрининга новых антиатеросклеротических и противоишемических средств.

Ключевые слова: моноцит-производные макрофаги, ЛПНП, ишемическая болезнь сердца, гиперхолестеринемия, перекисное окисление липидов, атеросклероз, гипоксия.

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, ЛПНП – липопротеины низкой плотности, ЛПНП_Г – ЛПНП из плазмы крови пациентов с гиперхолестеринемией, ЛПНП_Н – ЛПНП из плазмы крови здоровых доноров, МИФ – фактор, ингибирующий миграцию макрофагов, МФ – макрофаг, МФ_Н – макрофаг от здоровых доноров, МФ_{ИБС} – макрофаг от пациентов с ИБС, ОЗ – опсонизированный зимозан, ОХ – общий холестерин, ОкЛПНП – окисленно модифицированный ЛПНП, ПАФ – тромбоцит-активирующий фактор, ПОЛ – перекисное окисление липидов, СДС-ПААГ – содиум-додецил-сульфат-полиакриламидный гель электрофорез, ИБС – ишемическая болезнь сердца, ТБК-РП – продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой, ФМА – форбол-12-миристал-13-ацетат, ФНО-альфа – фактор некроза опухоли альфа, ЭФП – электрофоретическая подвижность

* – адресат для переписки

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время известно, что ИБС - термин, объединяющий такие патологические состояния, как острый инфаркт миокарда (ОИМ), болезнь коронарных сосудов, стабильная и не стабильная грудная ангина, острый коронарный синдром, гипертония, гиперхолестеринемия и другие, - является опасным фактором риска возникновения атеросклероза, так как сопровождается выбросом в ткани и кровь ФНО- α , IL 1-6, МИФ и других провоспалительных и вазоактивных факторов [1-5], активных форм кислорода (АФК), продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), а также возникновения генерализованной гипоксии и множественных очагов ишемии. Последнее, ведет к интенсификации процессов ПОЛ в самих очагах ишемии и циркулирующей крови, а также к повреждению стенки сосудов. Этот факт, впервые доложенный в Москве в 1973 г на Всесоюзной конференции “Острая ишемия органов и меры борьбы с постишемическими расстройствами” [Биленко М.В., Алесенко А.В.], был позднее квалифицирован как приоритетная заявка на “Открытие” [6] и подтвержден многочисленными публикациями [7-10].

Увеличение при ИБС вышеуказанных факторов риска существенно связано и со стимуляцией функции моноцит-производных макрофагов. Эти клетки способны окислять, связывать и поглощать липопротеины низкой плотности (ЛПНП), что ведет к трансформации макрофагов в пенистые клетки (foam cells), являющиеся основой возникновению атеросклероза – субинтимальных полосок и атеросклеротических бляшек [1, 2].

Однако способность макрофагов к окислению и потреблению ЛПНП, так же как и провоспалительному и противоопухолевому эффектам, продукции цитокинов, радикалов кислорода и азота, и другим функциям, как известно, присуща лишь “стимулированным”, а не “интактным” клеткам. Согласно современным представлениям, стимуляция макрофагов проходит в две стадии [11, 12]. Первая стадия – престоимуляция или прайминг, возникает под действием низких доз интерферон (IFN)-зависимых цитокинов и сопровождается экспрессией неспецифичных “скавенжер” рецепторов (SR-CD36, SR-AI и SR-ALL и других), а также активацией гексозо - монофосфатного шунта (ГМФС) и других ферментных систем. Вторую стадию – стимуляции, инициирует вторичный стимул, вызванным цитокинами, пептидогликанами, интерлейкинами, продуктами ПОЛ, окисленными ЛПНП ($_{ок}$ ЛПНП) [13]. В нашей ранней работе, однократное введение низких доз ФНО- α *in vitro* стимулировало перитонеальные макрофаги крыс, что приводило к росту продукции АФК в 1,8 раза (метод хемилюминесценции, ХЛ), а двукратная стимуляция моноцит-производных макрофагов из крови здоровых доноров низкими дозами ФНО- α вела к усилению окисления макрофагами ЛПНП в 2 раза [14]. У собак с инфарктом миокарда лейкоциты крови более активно продуцировали АФК, чем лейкоциты здоровых животных [15]. У пациентов с ИБС и бессимптомическим склерозом был выявлен в крови рост маркеров активации лейкоцитов, а именно, нейтрофил желатиназо-связанного липокаина (NGAL), нейтрофильной протеазы 4 (NP4) и растворимого рецептора 1 ФНО- α (sTNFR-1) [16]. Кроме того, экспрессия CD11b/CD18 интегрина, маркера активации лейкоцитов и моноцитов была обнаружена на поверхности циркулирующих клеток у больных с ишемией сердца и мозга [17].

Таким образом, ряд косвенных признаков активации лейкоцитов (но не макрофагов) был выявлен в крови пациентов и животных с ИБС. Однако они не являются доказательством усиления атерогенной функции этих клеток, то есть их способности окислять и потреблять ЛПНП более активно, чем клетки здоровых доноров. Прямых доказательств престоимуляции или стимуляции функции моноцит-производных макрофагов, полученных от пациентов с ИБС, нами не обнаружено.

На основе наших и литературных данных, была сформулирована, а также частично доказана [18] гипотеза, согласно которой макрофаги, полученные из моноцитов крови больных ИБС, являются *in vivo* предстимулированными или уже стимулированными клетками, и вследствие этого, способны более активно, чем те же клетки из крови здоровых доноров, окислять и поглощать ЛПНП. Изучению этой гипотезы, а также выявлению роли гиперхолестеринемии и условий, в которых происходит взаимодействие макрофагов с ЛПНП (аэробные или гипоксия), и посвящено настоящее исследование. Конкретными задачами исследования являлись:

1. изучение способности $M\Phi_{ИБС}$ окислять и поглощать ЛПНП_Н и ЛПНП_Г по сравнению с $M\Phi_{Н}$;
2. изучение способности $M\Phi_{ИБС}$ и $M\Phi_{Н}$ окислять и поглощать ЛПНП, выделенные из плазмы крови пациентов с гиперхолестеринемией (ЛПНП_Г) по сравнению с ЛПНП из плазмы крови здоровых доноров (ЛПНП_Н);
3. изучение способности $M\Phi_{ИБС}$ и $M\Phi_{Н}$ окислять и поглощать ЛПНП_Н и ЛПНП_Г при их инкубации в условиях гипоксии по сравнению с аэробными условиями.

МЕТОДИКА. *Выделение ЛПНП.* ЛПНП ($d = 1,019-1,065 \text{ г/см}^3$) изолировали из плазмы взятой натощак крови 16-ти здоровых доноров (общий холестерин плазмы $3,6 \pm 0,7 \text{ мМ}$), и из плазмы крови 15 людей с гиперхолестеринемией (общий холестерин плазмы $9,8 \pm 2,0 \text{ мМ}$). ЛПНП выделяли методом препаративного ультрацентрифугирования в градиенте NaBr в присутствии 0,01% ЭДТА (“Sigma”, США) [19], два раза по 2 часа при 42000 rpm, используя центрифугу L8-80 и ротор Ti-90 (“Beckman”, США). Полученные ЛПНП вместе с NaBr и ЭДТА хранили при $+2^\circ - +4^\circ\text{C}$ не более 1-3 дней. Накануне опыта ЛПНП диализовали 18 ч при $+2^\circ - +4^\circ\text{C}$ в темноте, против 6000 объёмов 10 мМ фосфатного буфера (PBS, “Sigma”), pH 7,4; без добавления в диализат ЭДТА и антиоксидантов. ЛПНП стерилизовали, пропуская через мембранные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм (“Serva”, Германия). Белок ЛПНП определяли по Лоури; в клеточные культуры вводили 200 мкг белка ЛПНП/мл среды. Выбор дозы ЛПНП был обусловлен её успешным применением ранее в опытах с культурой эндотелиальных клеток (ЭК) и макрофагов [20, 21]. Содержание холестерина в плазме крови определяли на автоанализаторе AA-11 (“Technikon”, США).

Получение культуры макрофагов человека. Моноциты крови человека изолировали из крови локтевой вены 18-ти здоровых доноров (средний возраст 34 года) и 25 больных с ИБС (средний возраст – 57 лет; из них: 8 - после ОИМ, 6 - с нестабильной и 9 - со стабильной стенокардией, 2 - после аорто-коронарного шунтирования, 2 – с тяжелой гипертензией).

10 мл крови брали в пробирку, содержащую 1 мл PBS и 1 мг/мл гепарина; развели в два раза раствором PBS, на каждые 5 мл наслаивали 3 мл Ficoll Pack (“Amersham Biosciences”, США) и центрифугировали при 37°C , 20 мин при 400 g. Интерфазу (“кольцо” из моноклеаров) отсасывали, дважды отмывали PBS. Осадок клеток ресуспендировали в 10 мл среды “роста” на основе RPMI-1640 (“Flow”, США), в которую добавляли 1 мМ бикарбонат Na, 1 мМ пируват Na, 2 мМ L-глутамин (“Sigma”), +1 мг/мл гентамицина (“Pharmachim”, Болгария), 10% эмбриональной сыворотки теленка (ИЭИ РАМН им. Н.Ф. Гамалеи, Россия), pH 7,4. Использование в качестве основы для среды “роста” и среды “инкубации” макрофагов RPMI-1640 без добавления в неё железа или меди, обусловлено применением её для культуры макрофагов большинством исследователей, а также тем, что макрофаги сами достаточно богаты железом и используемая методика исключает вмешательство в процесс окисления ЛПНП других сильных оксидантов.

Подсчет клеток проводили в камере Горяева. Суспензию клеток доводили средой роста до концентрации $0,5 \times 10^6$ клеток/мл и по 1 мл заливали в чашки Петри ($d=35 \text{ мм}$) или в 6-12-24× луночные планшеты (“Costar”, Нидерланды),

которые инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе (воздух 95% + CO₂ 5%, “Assab”, Швеция) в течение 2 часов. Затем среду вместе с не прилипшими ко дну клетками (эритроциты, лейкоциты) меняли и продолжали инкубацию еще 18-20 часов, до превращения моноцитов в молодые макрофаги и их распластывания по дну чашки. Более длительных сроков инкубации макрофагов мы не применяли, так как дифференциация макрофагов при более длительной инкубации (5-7 дней и более), как известно, сама ведет к стимуляции клеток, что исключает возможность выявления различий между МФ_{ИБС} и МФ_Н.

Инкубация макрофагов с ЛПНП. Во время инкубации макрофагов с ЛПНП_Н или ЛПНП_Г среду “роста” в ячейках заменяли безбелковой субстрат-дефицитной – “инкубационной” средой (RPMI-1640+Na-бикарбонат+гентамицин) при отсутствии других добавок. Аэробную инкубацию проводили в CO₂-инкубаторе; инкубацию в условиях гипоксии – в герметичной камере, 15 мин вентилируемой 10 кратным объемом смеси газов: N₂ 95% + CO₂ 5% (содержание O₂ < 0,001%), затем камеру помещали в обычный инкубатор при 37°C. По окончании заданного срока “инкубационную” среду отбирали и центрифугировали 10 мин при 120 g для удаления открепившихся (нежизнеспособных) макрофагов и их фрагментов. Надосадочную жидкость, содержащую ЛПНП_Н или ЛПНП_Г, использовали для оценки окислительной модификации ЛПНП. Макрофаги, оставшиеся прикрепленными ко дну чашки (жизнеспособные клетки), открепляли 1% трипсином + 0,2% ЭДТА.

Оценка ТБК-РП в ЛПНП_Н и ЛПНП_Г. Измерение продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП), проводили на спектрофотометре Beckman DU-7 при максимуме поглощения 532 нм [22]. Количество ТБК-РП выражали через эквивалентное количество малонового диальдегида (МДА), используя коэффициент молярной абсорбции, равный 156000 М⁻¹·см⁻¹. Результаты представлены в нмоль МДА на мг белка ЛПНП.

Оценка электрофоретической подвижности ЛПНП_Н и ЛПНП_Г. Электрофоретическую подвижность (ЭФП) ЛПНП исследовали методом горизонтального 1% агарозного геля электрофореза (рН 8,4) [23]. Сила тока составляла 140 мА, напряжение – 100 мВ. ЛПНП смешивали с бромфеноловым синим (3:1); образец (3-4 мкг белка ЛПНП) помещали в лунку геля, электрофорез проводили 3 ч при комнатной температуре. Гели фиксировали 20 мин смесью 25% изопропанола и 10% ледяной уксусной кислоты, высушивали, окрашивали 8–10 мин Кумасси R-250. Гель отмывали в смеси 5% ледяная уксусная кислота+25% изопропанол. Абсолютные значения ЭФП рассчитывали на компьютере измерением длины пробега (R_f, см), динамику изменений ЭФП – либо по увеличению абсолютных цифр (см), либо по увеличению относительных цифр (%): отношения длины пробега в опытных лунках к длине пробега в контрольной лунке, принятой за 100%.

Оценка агрегации ЛПНП_Н и ЛПНП_Г. Степень агрегации ЛПНП оценивали путем регистрации флуктуации светопропускания лазерного луча с длиной волны 860 нм на модели двухканального агрегометра LA220 (НПФ, Россия).

Оценка фрагментации apoB ЛПНП. ЛПНП разделяли с помощью вертикального электрофореза в 4-20% градиентном СДС-ПААГ-электрофорезе [24] 2 часа в Mini-Protean system (“BioRad”, США). Гели были фиксированы и окрашены серебром.

Оценка потребления макрофагами ЛПНП. Потребление ЛПНП макрофагами оценивали по аккумуляции в них общего холестерина (ОХ) как описано [25]. Макрофаги, оставшиеся прикрепленными ко дну ячейки или чашки Петри после их инкубации с ЛПНП_Н или ЛПНП_Г (т.е. жизнеспособные клетки) заливали 96% этанолом, высушивали и замораживали при –20°C. Экстракцию липидов проводили смесью гексан-изопропанол (2:3 мл/мл). Содержание ОХ определяли, используя стандартный кит (“Boehringer Mannheim GmbH”, Германия) как рекомендовано в инструкции. Количество ОХ в ячейке с макрофагами (мкг ОХ)

делили на количество жизнеспособных клеток (использовали параллельную ячейку) и пересчитывали на 10^6 клеток.

Оценка жизнеспособности макрофагов. Жизнеспособность $\text{МФ}_\text{Н}$ и $\text{МФ}_{\text{ИБС}}$ определяли по количеству клеток, оставшихся прикрепленными ко дну ячеек или чашек Петри по окончании 1, 3 и 6 часов инкубации [26]. Для подсчета клетки промывали PBS, отслаивали от дна ячейки 0,1% трипсином + 0,02% ЭДТА и подсчитывали в камере Горяева. Относительное число клеток, сохранивших жизнеспособность в процессе различных видов и сроков инкубации, рассчитывали по отношению к числу клеток в ячейке или чашке Петри до начала инкубации, принятому за 100%.

Статистический анализ. Экспериментальные данные были обработаны с помощью программы Microsoft Excel, используя критерий Стьюдента для парных малых выборок и корреляционного анализа. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

1. Способность $\text{МФ}_\text{Н}$ и $\text{МФ}_{\text{ИБС}}$ окислять и поглощать ЛПНПН и ЛПНПГ в аэробных условиях и в условиях гипоксии *in vitro*.

1.1. Аккумуляция ТБК-РП в ЛПНПН и ЛПНПГ.

Контрольные данные без клеток. В нативных ЛПНПГ содержание ТБК-РП было выше, чем в ЛПНПН ($0,7 \pm 0,08$ против $0,45 \pm 0,07$ нмоль МДА/мг белка ЛПНП, $p < 0,01$). Содержание ТБК-РП не менялось в процессе кратковременного хранения при $+2^\circ - +4^\circ\text{C}$ и при инкубации в условиях гипоксии, но возрастало (на 3-5%) во время 1-6 ч аэробной инкубации при 37°C в CO_2 -инкубаторе. По предварительным данным, инкубация ЛПНПН в аэробных условиях без присутствия ЭК также не вела к существенному росту содержания ТБК-РП вплоть до 24 ч [27].

Экспериментальные данные: В аэробных условиях инкубация ЛПНП с $\text{МФ}_\text{Н}$ существенно не меняла содержания ТБК-РП в ЛПНПН (рис. 1А, линия 1), но вызывала заметное снижение ТБК-РП в ЛПНПГ (рис. 1Б, линия 1', $*p < 0,05$; $^{##}p < 0,01$). При инкубации $\text{МФ}_{\text{ИБС}}$ как с ЛПНПН, так и с ЛПНПГ, содержание ТБК-РП в течение 1-го часа возрастало (в 1,6 и 1,7 раз, соответственно), в ЛПНПГ больше, чем в ЛПНПН, и резко превышало содержание ТБК-РП в ЛПНПГ + $\text{МФ}_\text{Н}$ (рис. 1Б и 1А, линии 2' и 2, $^{##}p < 0,01$, $^{\$}p < 0,01$). При более длительных сроках инкубации с $\text{МФ}_{\text{ИБС}}$ содержание ТБК-РП и в ЛПНПН, и ЛПНПГ, снижалось, и на 3 и 6 ч снижение было более выражено в опытах с ЛПНПГ, чем с ЛПНПН (рис. 1Б, $^{#}p < 0,05$, $^{##}p < 0,01$).

В условиях гипоксии инкубация $\text{МФ}_{\text{ИБС}}$ с ЛПНП сопровождалась более длительным периодом накопления ТБК-РП в ЛПНПН (рис. 1А, линия 4 на 1 и 3 ч против линии 2, $^{\wedge}p < 0,05$). В опытах с инкубацией $\text{МФ}_{\text{ИБС}}$ с ЛПНПГ, существенного роста ТБК-РП не наблюдалось, зато в опытах с $\text{МФ}_\text{Н}$ + ЛПНПН + гипоксия наблюдался значительный рост содержания ТБК-РП (рис. 1Б, линия 3' против линии 1', на 1 и 3 ч, $^{\wedge}p < 0,05$).

Таким образом, $\text{МФ}_{\text{ИБС}}$ вызывали более сильное накопление ТБК-РП в ЛПНПН и, особенно, в ЛПНПГ, чем $\text{МФ}_\text{Н}$ в аэробных условиях, а в условиях гипоксии $\text{МФ}_{\text{ИБС}}$ + ЛПНПН или + ЛПНПГ, а $\text{МФ}_\text{Н}$ + ЛПНПГ усиливали аккумуляцию ТБК-РП по сравнению с аэробными условиями.

1.2. Электрофоретическая подвижность ЛПНПН и ЛПНПГ.

Контрольные данные без клеток. Электрофоретическая подвижность (ЭФП) нативных (до инкубации) ЛПНПГ была выше, чем ЛПНПН ($1,37 \pm 0,03$ против $1,2 \pm 0,13$ см, $^{#}p < 0,05$), но существенно не менялась при кратковременном хранении $+2^\circ - +4^\circ\text{C}$. При аэробной инкубации в течение 1, 3 и 6 ч ЭФП ЛПНПН либо не менялась, либо снижалась на 2-4%, а ЭФП ЛПНПГ снижалась на 6-8%, хотя различия с контролем и между ЛПНПН и ЛПНПГ не были достоверны. В условиях гипоксии величина ЭФП ЛПНПН и ЛПНПГ не отличалась от ЭФП в аэробных условиях.

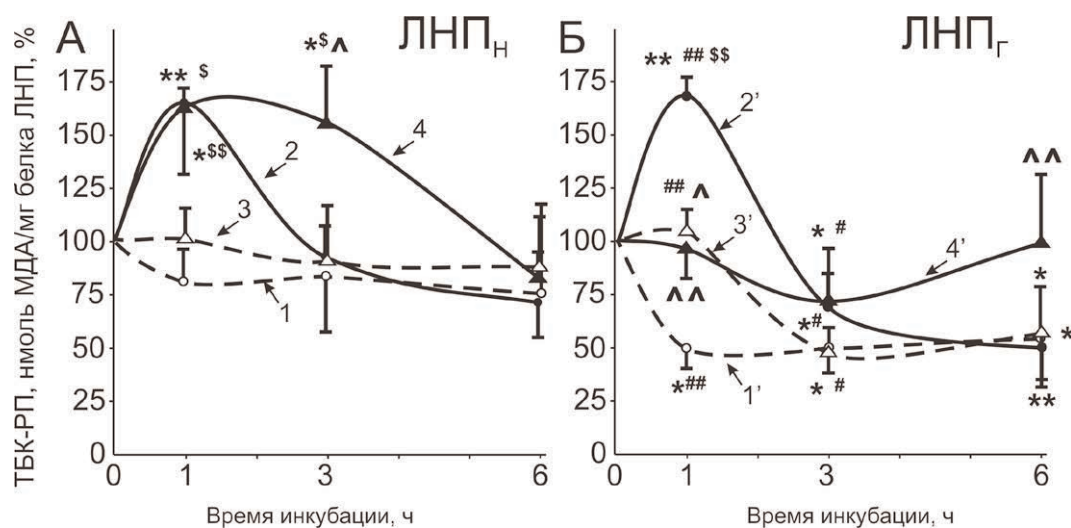


Рисунок 1.

Содержание ТБК-РП (нмоль МДА/мг белка ЛПНП, %), аккумулированных в ЛПНП_Н (А) и ЛПНП_Г (Б) после их инкубации с МФ_Н или МФ_{ИБС} в течение 1-6 ч в аэробных условиях и при гипоксии (n=6).

ТБК-РП были измерены в инкубационной среде после ее центрифугирования.

В аэробных условиях содержание ТБК-РП было достоверно увеличено и в ЛПНП_Н и ещё больше в ЛПНП_Г после 1ч инкубации их с МФ_{ИБС} (см. А и Б, линии 2' против 2, ^{##}p<0,01; линия 2 против 1 и линия 2' против 1', ^{ss}p<0,0) и существенно не менялось (ЛПНП_Н) или резко снижалось (ЛПНП_Г), после инкубации с МФ_Н (см. Б, линия 1' против 2')

В условиях гипоксии после инкубации МФ_{ИБС} с ЛПНП_Н содержание ТБК-РП превышало их содержание после аэробной инкубации и сохранялось дольше (1-3 часа вместо 1 часа, линия 4 против 2, [^]p<0,05), а после инкубации МФ_{ИБС} с ЛПНП_Г при гипоксии содержание ТБК-РП сохранялось примерно на исходном уровне, и он был ниже, чем в аэробных условиях (см. Б, линия 4' против линии 2', ^{^^}p<0,01). После инкубации МФ_Н с ЛПНП_Н содержание ТБК-РП было примерно аналогично аэробным условиям, а при инкубации МФ_Н с ЛПНП_Г в условиях гипоксии на 1 час было выше, чем в аналогичных опытах, проведенных в аэробных условиях (см. Б, линия 3' против 1', [^]p<0,05), и выше, чем в опытах МФ_Н + ЛПНП_Н (см. Б и А, линия 3' против линий 3 и 1, ^{##}p<0,01) проведенных в гипоксических, и в аэробных условиях.

- | | |
|---|--|
| 1—○—МФ _Н +ЛПНП _Н аэробные условия | 1'—○—МФ _Н +ЛПНП _Г аэробные условия |
| 2—●—МФ _{ИБС} +ЛПНП _Н аэробные условия | 2'—●—МФ _{ИБС} +ЛПНП _Г аэробные условия |
| 3—△—МФ _Н +ЛПНП _Н условия гипоксии | 3'—△—МФ _Н +ЛПНП _Г условия гипоксии |
| 4—▲—МФ _{ИБС} +ЛПНП _Н условия гипоксии | 4'—▲—МФ _{ИБС} +ЛПНП _Г условия гипоксии |

Примечание: здесь и на рис. 2-6 уровень значимости различий равен:

*p<0,05; **p<0,01; против исходного уровня; ^sp<0,05; ^{ss}p<0,01; МФ_{ИБС} против МФ_Н; [#]p<0,05; ^{##}p<0,01; ЛПНП_Г против ЛПНП_Н; [^]p<0,05; ^{^^}p<0,01, условия гипоксии против аэробных условий; % - отношение к исходному уровню, принятому за 100.

n — число независимых опытов в каждом условиях.

Экспериментальные данные: В аэробных условиях инкубация МФ_Н и МФ_{ИБС} с ЛПНП_Н и ЛПНП_Г ЭФП ЛПНП, представленная в виде абсолютных значений (см.), достоверно возрастала уже к 1 часу и продолжала слабо увеличиваться вплоть до 6 ч инкубации (рис. 2А и 2Б, линии 1 и 1'; 2 и 2'); рост ЭФП ЛПНП_Н и рост ЭФП ЛПНП_Г, инкубированных с МФ_Н и МФ_{ИБС} на 1-6 ч превышали исходные значения примерно в 1,3-1,34 раза, достоверность между ними на всех сроках инкубации отсутствовала. Отсутствие различий между ростом ЭФП ЛПНП в различных условиях их аэробной инкубации особенно наглядно видна из данных ЭФП, приведенных в процентах (рис. 2Б).

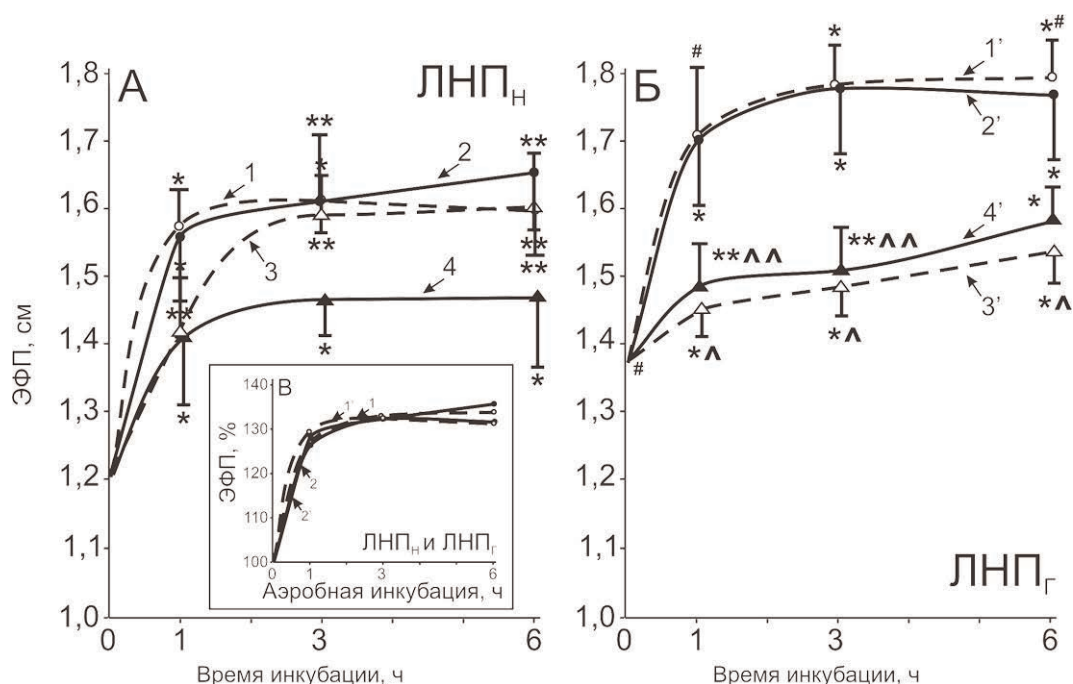


Рисунок 2.

Абсолютная (см.) и относительная (%) ЭФП ЛПНП_Н и ЛПНП_Г после их инкубации с МФ_Н или МФ_{ИБС} в течение 1-6 ч в аэробных условиях и при гипоксии (n=6).

В аэробных условиях ЭФП ЛПНП_Н и ЛПНП_Г, инкубированных с МФ_Н и МФ_{ИБС}, во всех случаях достоверно возрастала с 1 по 6 час инкубации, однако, между величиной роста ЭФП ни при представлении данных в абсолютных цифрах (см. А и Б), ни при представлении данных в процентах (рис. В) достоверных различий обнаружено не было.

В условиях гипоксии инкубация существенно снижала ЭФП ЛПНП_Г (см. Б, линия 3' против 1' и линия 4' против 2', $\hat{p}<0,05$, $\hat{p}<0,01$). Влияние гипоксии на ЛПНП_Н было выражено слабее (см. А, линия 3 против 1 и линия 4 против 2, достоверность отсутствует).

То есть, инкубация с МФ_Н и МФ_{ИБС} в аэробных условиях вызвала сходный рост ЭФП ЛПНП_Н и ЛПНП_Г; гипоксия в опытах с МФ_Н и с МФ_{ИБС} приводила к снижению ЭФП ЛПНП_Г.

- | | |
|---|--|
| 1— \diamond - МФ _Н +ЛПНП _Н аэробные условия | 1'— \diamond - МФ _Н +ЛПНП _Г аэробные условия |
| 2— \bullet - МФ _{ИБС} +ЛПНП _Н аэробные условия | 2'— \bullet - МФ _{ИБС} +ЛПНП _Г аэробные условия |
| 3— \triangle - МФ _Н +ЛПНП _Н условия гипоксии | 3'— \triangle - МФ _Н +ЛПНП _Г условия гипоксии |
| 4— \blacktriangle - МФ _{ИБС} +ЛПНП _Н условия гипоксии | 4'— \blacktriangle - МФ _{ИБС} +ЛПНП _Г условия гипоксии |

Уровень значимости различий - см. примечание к рис 1.

На условия гипоксии ЛПНП_Н, инкубированные с МФ_{ИБС} и особенно с МФ_Н реагировали слабо (рис. 2А, линия 3 против 1 и линия 4 против 2, достоверность отсутствует). ЭФП ЛПНП_Г, инкубированных с МФ_Н и особенно с МФ_{ИБС} в условиях гипоксии, была достоверно ниже, чем после инкубации в аэробных условиях (рис. 2Б, линия 3' против 1' и линия 4' против 2', $\hat{p}<0,05$, $\hat{p}<0,01$).

Таким образом, МФ_{ИБС} и МФ_Н в аэробных условиях инкубации обнаружили примерно одинаковую способность увеличивать отрицательный заряд ЛПНП_Н и ЛПНП_Г. Гипоксия достоверно снижала ЭФП ЛПНП_Г и слабо влияла на ЭФП ЛПНП_Н.

1.3. Агрегация ЛПНП_Н и ЛПНП_Г.

Контрольные данные без клеток. Показатели агрегация ЛПНП_Н и ЛПНП_Г до инкубации были минимальными (37-40 условных единиц), не отличались друг от друга и не менялись во время кратковременного хранения +2° - +4°С а также при инкубации без клеток в течение 1-6 ч в аэробных условиях или условиях гипоксии.

Экспериментальные данные. В условиях аэробной инкубации степень агрегации ЛПНП_Н и ЛПНП_Г заметно возрастала и была максимальной через 1 час в опытах с МФ_{ИБС} (рис. 3А, линии 2 и 4) и через 3 часа в опытах с МФ_Н (рис. 3А, линии 1 и 3). Различия между величиной агрегации ЛПНП_Н и ЛПНП_Г были незначительными. В более длительные сроки инкубации изменения в ЛПНП_Н и ЛПНП_Г были сходными (рис. 3А).

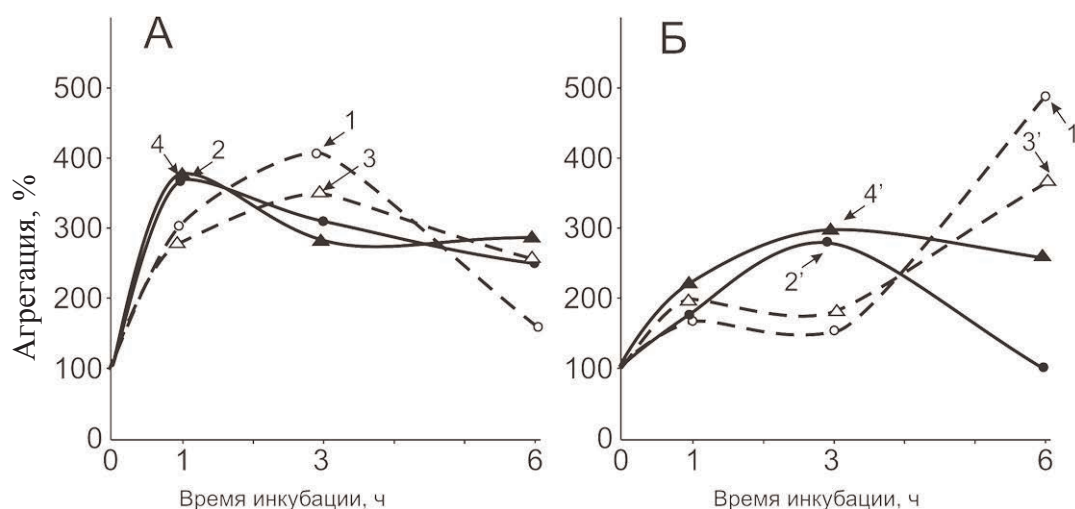


Рисунок 3.

Типичные кривые агрегации ЛПНП_Н и ЛПНП_Г (%) после 1-6 ч их инкубации с МФ_Н или МФ_{ИБС} в аэробных условиях (А) и при гипоксии (Б).

В аэробных условиях пик максимальной агрегации ЛПНП_Н и ЛПНП_Г в опытах с МФ_{ИБС} возникал на 1 ч, а в опытах с МФ_Н - позже, лишь на 3 ч.

В условиях гипоксии пик максимальной агрегации ЛПНП_Н и ЛПНП_Г в опытах с МФ_{ИБС} возникал позже, на 3 ч инкубации, а с МФ_Н - лишь на 6ч., но агрегация ЛПНП_Н, и особенно ЛПНП_Г, была выражена резче, чем в аэробных условиях.

В условиях гипоксии пик агрегации в опытах: МФ_{ИБС} + ЛПНП_Г или + ЛПНП_Н (рис.3Б, линии 2' и 4') приходился на 3 ч инкубации и был ниже, чем в аэробных условиях; пик агрегации в опытах: МФ_Н + ЛПНП_Г или + ЛПНП_Н (рис. 3Б, линии 1' 3') соответствовал 6 часу инкубации и был выше, чем в аэробных условиях.

Таким образом, агрегация ЛПНП при инкубации с МФ_{ИБС} и в аэробных условиях (после 1 ч) и при гипоксии (после 3 ч) достигала максимальных значений раньше, чем при инкубации с МФ_Н (3 ч и 6 ч, соответственно); гипоксия усиливала агрегацию и ЛПНП_Г и ЛПНП_Н, после их 6-часовой инкубации с МФ_Н.

1.4. Фрагментация апоВ ЛПНП_Н и апоВ ЛПНП_Г.

Контрольные данные без клеток. Ни кратковременное хранение ЛПНП при +2° - +4°С, ни их инкубация в аэробных условиях или в условиях гипоксии без макрофагов в течение 1-6 ч не вызывали появления дополнительных полос в SDS-ПААГ-электрофореze ЛПНП_Н и ЛПНП_Г.

Экспериментальные данные. Исследование ЛПНП_Н (рис. 4А) и ЛПНП_Г (рис. 4Б) с помощью SDS-ПААГ после 1, 3 или 6 часов их инкубации в *аэробных условиях* с МФ_Н и МФ_{ИБС} обнаружило множественные дополнительные полосы с молекулярной массой 120-200 и 250-300 кДа, которые отсутствовали в контролях (ЛПНП_Н и ЛПНП_Г без инкубации и в среде инкубации), и свидетельствуют о фрагментации ЛПНП апоВ. Эти полосы были более выражены в ЛПНП_Г, чем в ЛПНП_Н, и при инкубации с МФ_{ИБС}, чем с МФ_Н.



Рисунок 4.

Типичный СДС-ПААГ образца ЛПНП_Н (А) и ЛПНП_Г (Б) до и после их инкубации с МФ_Н или МФ_{ИБС} в аэробных условиях.

Из рисунка видно, что многочисленные полосы (около 120-200 и 250-300 кДа, см. стандартный Кит) появились в гелях, содержащих ЛПНП_Н (А) и ЛПНП_Г (Б) и инкубированных с МФ_Н и МФ_{ИБС}. Полосы толще и значительно лучше выражены в ЛПНП_Г, чем ЛПНП_Н и после 3-6 часов инкубации с МФ_{ИБС}, чем с МФ_Н. Эти полосы (апо-В белок) отсутствуют в ЛПНП_Н и ЛПНП_Г до инкубации (контроль, 0) и в среде инкубации.

В условиях гипоксии SDS-ПААГ анализ ЛПНП_Н и ЛПНП_Г, инкубированных с МФ_Н и МФ_{ИБС}, не выявил существенных различий в характере и интенсивности фрагментов, по сравнению с инкубацией в аэробных условиях (данные не представлены).

Таким образом, применение SDS-ПААГ-электрофореза выявило фрагментацию апоВ белка ЛПНП_Н и ЛПНП_Г, инкубированных с МФ_{ИБС} и МФ_Н в аэробных условиях и в условиях гипоксии. В опытах с МФ_{ИБС}, по сравнению с МФ_Н, и в ЛПНП_Г, по сравнению с ЛПНП_Н, а также на 3 и 6 ч, по сравнению с 1 ч, фрагментация была выражена резче; аэробные условия и условия гипоксии существенных различий не выявили.

1.5. Способность МФ_Н и МФ_{ИБС} поглощать ЛПНП_Н и ЛПНП_Г.

Контрольные данные без ЛПНП. Культуры МФ_Н и МФ_{ИБС} до инкубации с ЛПНП существенно не отличались между собой по количеству внутриклеточного общего холестерина (ОХ) ($3,1 \pm 0,2$ против $2,3 \pm 0,3$ мкг/10⁶ клеток, соответственно). Во время инкубации МФ_Н и МФ_{ИБС} в аэробных условиях и в условиях гипоксии в течение 1, 3 и 6 ч содержание ОХ (особенно в МФ_{ИБС}), умеренно снижалось, что, как будет представлено ниже (раздел 1.6), примерно соответствовало умеренному снижению числа жизнеспособных клеток.

ОКИСЛЕНИЕ И ПОТРЕБЛЕНИЕ ЛПНП МАКРОФАГАМИ ПРИ ИБС

Экспериментальные данные. В аэробных условиях при инкубации макрофагов с ЛПНП_Н в течение 1, 3 и 6 ч содержание ОХ в макрофагах заметно возрастало, превышая исходный уровень в опытах с МФ_{ИБС} в 2,5, 4,8 и 5,8 раз; в опытах с МФ_Н - в 2,3, 3,4 и 3,3 раза, соответственно. К 6-му часу различия в аккумуляции ОХ между МФ_{ИБС} и МФ_Н составляли 1,8 и были достоверны (рис. 5А, линии 2 и 1, ^sp < 0,05). При инкубации макрофагов с ЛПНП_Г в течение 1, 3 и 6 ч содержание ОХ в МФ_{ИБС} возрастало ещё больше: в 5,0, 9,2 и 6,5 раза, а в МФ_Н - в 2,5, 4,8 и 7,7 раз, по сравнению с исходным уровнем, соответственно, то есть на 1 и 3 часах содержание ОХ в МФ_{ИБС} превышало содержание ОХ в МФ_Н в 2,0 и 1,9 раза, различия были высоко достоверны (рис. 5Б, линия 2' против 1', ^{ss}p < 0,01). Количество ОХ, аккумулированное МФ_{ИБС} при их инкубации с ЛПНП_Г, на 1 и 3 часах было выше, чем при инкубации с ЛПНП_Н в 2,0 и 1,9 раз (рис. 5Б и 5А, линия 2' против 2, на 1 и 3 ч ^{##}p < 0,01), а аккумуляция ОХ в МФ_Н при инкубации с ЛПНП_Г была выше, чем с ЛПНП_Н на 3 и 6 ч в 1,4 и в 2,3 раза (рис. 5Б и 5А, линия 1' против 1, на 3 и 6 ч ^{##}p < 0,01).

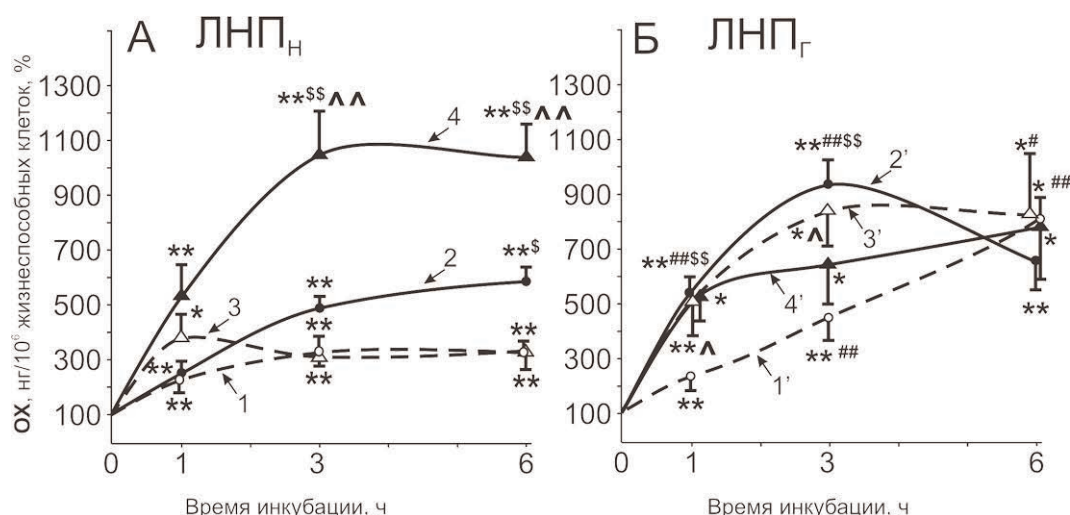


Рисунок 5.

Содержание общего холестерина (ОХ, мкг/10⁶ жизнеспособных клеток, %), аккумулированного в МФ_Н и МФ_{ИБС} после их инкубации с ЛПНП_Н (А) или ЛПНП_Г (Б) в течение 1-6 ч в аэробных условиях и при гипоксии (n=6).

Количество ОХ, аккумулированного в МФ_{ИБС} (или МФ_Н) пересчитывали на количество клеток в данной яйчейке (использовали параллельную яйчейку), а затем на 10^6 клеток.

Видно, что количество ОХ в МФ_{ИБС} в аэробных условиях достоверно больше, чем в МФ_Н (см. А, линии 2 против 1, на 6ч, ^sp<0,05; см. Б, линия 2' против 1', на 1 и 3, ^{ss}p<0,01), а в обоих видах макрофагов - после инкубации с ЛПНП_Г, больше, чем с ЛПНП_Н; (см.Б, линия 2' против 2, ^{##}p<0,01, на 1 и 3 ч; линия 1' против линии 1, на 3 и 6 ч, ^{###}p<0,01; [#]p<0,05).

Гипоксия резко усиливает накопление ОХ в опытах с МФ_{ИБС}+ЛПНП_Н (см. А, линия 4 против линии 2, на 3 и 6 ч, $\hat{p} < 0,01$), несколько меньше в МФ_Н+ЛПНП_Г (см. Б, линия 3' против линии 1', на 1 и 3 ч, $\hat{p} < 0,05$).

A

Б

- 1— \circ - $M\Phi_H + \text{ЛПНП}_H$ аэробные условия 1'— \circ - $M\Phi_H + \text{ЛПНП}_r$ аэробные условия
2— \bullet - $M\Phi_{\text{ИБС}} + \text{ЛПНП}_H$ аэробные условия 2'— \bullet - $M\Phi_{\text{ИБС}} + \text{ЛПНП}_r$ аэробные условия
3— \triangle - $M\Phi_H + \text{ЛПНП}_H$ условия гипоксии 3'— \triangle - $M\Phi_H + \text{ЛПНП}_r$ условия гипоксии
4— \blacktriangle - $M\Phi_{\text{ИБС}} + \text{ЛПНП}_H$ условия гипоксии 4'— \blacktriangle - $M\Phi_{\text{ИБС}} + \text{ЛПНП}_r$ условия гипоксии

Уровень значимости различий - см. примечание к рис 1.

В условиях гипоксии при инкубации макрофагов с ЛПНП_Н содержание ОХ в МФ_{ИБС} возрастало в 5,1, 10,3 и 10,2 раза по сравнению с их исходным уровнем, что превышало содержание ОХ в аналогичных опытах, но проведенных в аэробных условиях в 2,0, 2,1 и 1,8 раза (рис. 5А, линия 4 против 2, на 3 и 6 ч $\hat{p} < 0,01$). Рост содержания ОХ в МФ_Н+ЛПНП_Н при гипоксии существенно не отличался от роста ОХ в МФ_Н в аэробных условиях. При инкубации МФ_{ИБС} с ЛПНП_Г в условиях гипоксии содержание ОХ на 1, 3 и 6 ч увеличивалось в 5,3, 6,3 и 7,6 раза, что достоверно не отличалось от содержания ОХ в опытах, проведенных в аэробных условиях (рис. 5Б, линия 4' против 2'). В то же время при инкубации МФ_Н с ЛПНП_Г в условиях гипоксии рост ОХ был выше, чем в аэробных условиях (рис. 5Б, линия 3' против 1', на 1 и 3 ч $\hat{p} < 0,05$).

Таким образом, потребление ЛПНП, оцененное по критерию аккумуляции в макрофагах ОХ, в аэробных условиях в МФ_{ИБС} + ЛПНП_Н или + ЛПНП_Г было значительно выше, чем в МФ_Н; в опытах с ЛПНП_Г + МФ_{ИБС} или +МФ_Н – значительно выше, чем в опытах с ЛПНП_Н; а в условиях гипоксии в опытах с МФ_{ИБС} + ЛПНП_Н или МФ_Н + ЛПНП_Г – значительно выше, чем в аэробных условиях.

1.6. Жизнеспособность МФ_Н и МФ_{ИБС}.

Контрольные данные без ЛПНП. Количество МФ_Н и МФ_{ИБС}, прикрепленных ко дну культуральной ячейки до начала их инкубации, составляло $0,5 \times 10^6$ клеток/мл. Во время аэробной инкубации без ЛПНП в течение 1, 3 и 6 ч количество прикрепленных ко дну ячеек МФ_Н снижалось до 97, 92 и 90% от начального уровня; число МФ_{ИБС} – до 96, 89 и 87%.

В условиях гипоксии число МФ_Н в те же сроки снижалось до 95, 95 и 89%, а МФ_{ИБС} – до 96, 94 и 85%, соответственно, т.е. примерно в одинаковой степени. Различия между числом МФ_Н и МФ_{ИБС}, а также различия с контролем были не достоверны.

Экспериментальные данные. Во время аэробной инкубации макрофагов с ЛПНП_Н в течение 1, 3 и 6 часов число прикрепленных ко дну ячейки (т.е. жизнеспособных) МФ_{ИБС} снижалось более резко, чем число жизнеспособных МФ_Н, составляя 61, 50 и 47%, по сравнению с 84, 71 и 62% от контрольного уровня, соответственно (рис. 6А, линия 2 против 1). В опытах с ЛПНП_Г число жизнеспособных МФ_{ИБС} снижалось до 41, 31 и 30% по сравнению с 66, 45 и 29% жизнеспособных МФ_Н от контрольного уровня, соответственно. Различия между числом жизнеспособных МФ_{ИБС} и МФ_Н в опытах с ЛПНП_Н на 3 и 6 часах инкубации (рис. 6А; линия 2 против 1, $^{ss}p < 0,01$), а в опытах с ЛПНП_Г на 3 часу инкубации (рис. 6Б; линия 2' против 1', $^sp < 0,05$) были достоверны. Снижение числа жизнеспособных МФ_{ИБС} (рис. 6Б и 6А, линия 2' против 2 на 1 и 3 ч $^{\#}p < 0,05$, $^{\#\#}p < 0,01$) и МФ_Н (рис. 6Б и 6А, линия 1' против 1 на 1, 3 и 6 ч, $^{\#\#}p < 0,01$) было более выраженным при инкубации с ЛПНП_Г, чем с ЛПНП_Н.

Условия гипоксии значительно влияли на жизнеспособность МФ_{ИБС}, инкубированных с ЛПНП_Н и ЛПНП_Г. В опытах с МФ_{ИБС} + ЛПНП_Н в течение 1, 3 и 6 часов инкубации содержание жизнеспособных клеток снижалось до 49, 35 и 24% против их числа в аэробных условиях (рис. 6А, линия 4 против 2, на 1 и 2 ч $\hat{p} < 0,05$; на 6 ч, $\hat{p} < 0,01$). В опытах с МФ_{ИБС} + ЛПНП_Г снижение числа МФ_{ИБС} было ещё более резким – до 38, 26 и 24% (рис. 6Б, линия 4' против 2'), но достоверность различий отсутствовала. В опытах МФ_Н + ЛПНП_Н различия между гипоксией и аэробными условиями отсутствовали (рис. 5А, линия 3 против 1); в опытах МФ_Н+ЛПНП_Г - снижение жизнеспособности МФ_Н на 1, 3 и 6 ч доходило до 29, 23 и 20% (рис. 5Б, линия 3' против 1', на 1 и 3 ч $\hat{p} < 0,01$), то есть МФ_Н слабее, чем МФ_{ИБС} теряли жизнеспособность в опытах с ЛПНП_Н, как в аэробных условиях, так и при гипоксии (рис. 6А, линии 1 против 3), но их число резко снижалось в опытах с ЛПНП_Г, как в аэробных условиях, так и при гипоксии (рис. 6Б, линия 3' против 2').

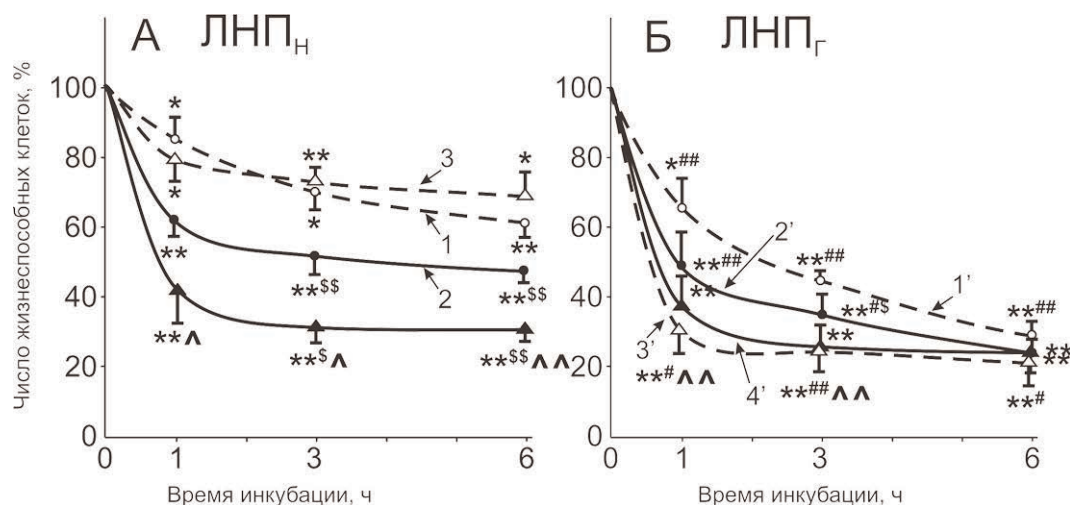


Рисунок 6.

Количество жизнеспособных МФ_Н и МФ_{ИБС} (%), после их инкубации с ЛПНП_Н или ЛПНП_Г в течение 1-6 ч в аэробных условиях и при гипоксии (n=6).

Выживаемость макрофагов определяли как часть клеток, сохранивших прикрепленность ко дну культуральной ячейки после их инкубации в течение 1, 3 и 6 часов с ЛПНП_Н или ЛПНП_Г, затем пересчитывали на 10⁶ клеток.

Содержание жизнеспособных МФ_{ИБС} снижалось в следующей последовательности:
МФ_{ИБС} + ЛПНП_Н (аэробные условия, линия 2) >> МФ_{ИБС} + ЛПНП_Г (аэробные условия, линия 2') = МФ_{ИБС} + ЛПНП_Н (гипоксия, линия 3) ≥ МФ_{ИБС} + ЛПНП_Г (гипоксия, линия 3').

Содержание жизнеспособных МФ_Н снижалось в следующей последовательности:
МФ_Н + ЛПНП_Н (аэробные условия, линия 1) = МФ_Н + ЛПНП_Н (условия гипоксии, линия 3)
МФ_Н + ЛПНП_Г (аэробные условия, линия 1') >>> МФ_Н + ЛПНП_Г (условия гипоксии, линия 3').

- | | |
|--|--|
| <p>А</p> <p>1—○— МФ_Н+ЛПНП_Н аэробные условия</p> <p>2—●— МФ_{ИБС}+ЛПНП_Н аэробные условия</p> <p>3—△— МФ_Н+ЛПНП_Н условия гипоксии</p> <p>4—▲— МФ_{ИБС}+ЛПНП_Н условия гипоксии</p> | <p>Б</p> <p>1'—○— МФ_Н+ЛПНП_Г аэробные условия</p> <p>2'—●— МФ_{ИБС}+ЛПНП_Г аэробные условия</p> <p>3'—△— МФ_Н+ЛПНП_Г условия гипоксии</p> <p>4'—▲— МФ_{ИБС}+ЛПНП_Г условия гипоксии</p> |
|--|--|

Уровень значимости различий - см. примечание к рис. 1.

Таким образом, снижение числа жизнеспособных макрофагов при их инкубации с ЛПНП было выражено сильнее (1) в МФ_{ИБС}, чем МФ_Н; (2) в макрофагах, инкубированных с ЛПНП_Г, чем с ЛПНП_Н и (3) при инкубации в условиях гипоксии, чем в аэробных условиях.

ОБСУЖДЕНИЕ.

Обобщая результаты, полученные с применением разных методов исследования, можно ответить на задачи, поставленные в начале этого исследования.

Во-первых, МФ_{ИБС} при инкубации с ЛПНП в аэробных условиях *in vitro* обладают более высокой способностью окислять и потреблять ЛПНП, по сравнению с МФ_Н, что подтверждается следующими фактами:

- аккумуляция ТБК-РП в ЛПНП_Г и ЛПНП_Н, инкубированных с МФ_{ИБС}, выявлялась через 1 ч после начала инкубации, в то время как рост ТБК-РП в ЛПНП_Н и ЛПНП_Г в экспериментах с МФ_Н либо отсутствовал, либо наблюдалось снижение содержания ТБК-РП;

- снижение содержания ТБК-РП в среде инкубации наблюдалось в опытах и с МФ_{ИБС}, и с МФ_Н, но с МФ_{ИБС} оно начиналось раньше и было выражено резче;
- фрагментация апоВ белка ЛПНП_Н и ЛПНП_Г была выражена резче в экспериментах с МФ_{ИБС}, чем с МФ_Н, основные признаки фрагментации проявлялись на 3 и 6 ч инкубации;
- количество общего холестерина (ОХ), аккумулированного в МФ_{ИБС}, после инкубации с ЛПНП_Н на 3 и 6 ч было выше в 1,4 и 1,8 раза, чем после инкубации с МФ_Н, а после инкубации с ЛПНП_Г на 1 и 3 ч было выше в 2 и 1,9 раза, чем с МФ_Н;
- содержание ОХ в МФ_{ИБС} на 3 и 6 часах находилось в отрицательной корреляции с содержанием ТБК-РП в ЛПНП_Н: $r_1 = -0,64$, $p < 0,01$ и в ЛПНП_Г: $r_2 = -0,54$, $p < 0,01$;
- число жизнеспособных клеток при инкубации МФ_{ИБС} с ЛПНП_Н снижалось на 3 и 6 часах, а с ЛПНП_Г на 1 и 3 часах инкубации и в обоих случаях оно было выражено существенно резче, чем при инкубации с МФ_Н;
- снижение числа жизнеспособных МФ_{ИБС} на 3 и 6 часах прямо коррелировало со снижением содержания ТБК-РП в ЛПНП_Н: $r_3 = 0,67$, $p < 0,01$ и в ЛПНП_Г: $r_4 = 0,64$, $p < 0,01$;

Таким образом, обобщенные результаты согласуются с высказанной выше гипотезой о том, что МФ_{ИБС} *in vivo* трансформируются в престимулированные или стимулированные клетки и, вследствие этого, обладают более высокой атерогенной активностью *in vitro*.

Во-вторых, способность МФ_{ИБС} и МФ_Н окислять и потреблять ЛПНП_Г в одинаковых условиях аэробной инкубации выше, чем их способность окислять и потреблять ЛПНП_Н, что подтверждается следующими фактами:

- содержание ТБК-РП в ЛПНП_Г после 1-го часа инкубации ЛПНП_Г с МФ_{ИБС} в аэробных условиях было достоверно выше, чем в ЛПНП_Н;
- снижение ТБК-РП на 3 и 6 часах инкубации в опытах с ЛПНП_Г было выражено сильнее, чем в ЛПНП_Н;
- фрагментация апоВ ЛПНП_Г была резче выражена, чем в ЛПНП_Н и при инкубации с МФ_{ИБС}, и с МФ_Н;
- аккумуляция ОХ в МФ_{ИБС} на 1 и 3 ч, и в МФ_Н на 3 и 6 ч была достоверно больше после инкубации с ЛПНП_Г, чем с ЛПНП_Н;
- жизнеспособность МФ_{ИБС} и МФ_Н, инкубированных с ЛПНП_Г снижалась раньше и резче, чем с ЛПНП_Н;
- атерогенный эффект МФ_{ИБС} в опытах с ЛПНП_Г проявлялся раньше (на 1 и 3 ч инкубации), чем в опытах с ЛПНП_Н (на 3 и 6 ч инкубации).

Таким образом, результаты согласуются с представлением о том, что предстимулированные и стимулированные МФ_{ИБС} более активно и в более ранние сроки окисляют и потребляют ЛПНП_Г, по сравнению с ЛПНП_Н, что ведет к более ранней и резкой гибели самих стимулированных макрофагов.

В-третьих, способность МФ_{ИБС} и МФ_Н окислять и потреблять ЛПНП_Г и ЛПНП_Н возрастает в условиях гипоксии, по сравнению с аэробными условиями что подтверждается следующими фактами:

- инкубация МФ_Н с ЛПНП_Г в условиях гипоксии вела к небольшому, но достоверному росту содержания ТБК-РП по сравнению с ЛПНП_Г в аэробных условиях; содержание ТБК-РП в ЛПНП_Н, инкубированных с МФ_{ИБС} возрастало и сохранялось дольше (в течение 3 ч вместо 1 ч) при гипоксии, чем в аэробных условиях;
- гипоксия в опытах с МФ_Н и МФ_{ИБС} снижала отрицательный заряд ЛПНП_Н и, особенно резко - ЛПНП_Г, по сравнению с аэробными условиями;
- гипоксия снижала величину и увеличивала срок появления пика агрегации в ЛПНП_Н и ЛПНП_Г в опытах с МФ_{ИБС} (вместо 1 ч на 3 ч), а в опытах с МФ_Н увеличивала срок появления пика агрегации в ЛПНП_Н и ЛПНП_Г (вместо 3 ч на 6 ч), причём, начиная с 6 ч резко усиливала степень агрегации;
- содержание ОХ в МФ_{ИБС}, инкубированных с ЛПНП_Н в условиях гипоксии, на 3 и 6 ч, а в МФ_Н, инкубированных с ЛПНП_Г в условиях гипоксии, на 1 и 3 ч, достоверно превышало содержание ОХ в аэробных условиях;

• жизнеспособность МФ_{ИБС}, инкубированных с ЛПНП_Н в течение 1, 3 и 6 часов в условиях гипоксии, снижалась в значительно большей степени, чем в аэробных условиях, однако различия между МФ_{ИБС}, инкубированными с ЛПНП_Г в гипоксических и аэробных условиях были выражены слабее; число жизнеспособных МФ_Н, инкубированных с ЛПНП_Г в условиях гипоксии было на 1 и 3 ч достоверно ниже, чем в аэробных условиях.

Таким образом, гипоксия, несомненно, оказывает усиливающий эффект на атерогенную функцию не только МФ_{ИБС} + ЛПНП_Н, но и МФ_Н + ЛПНП_Г. Последнее чётко проявляется при оценке накопления в МФ_Н ТБК-РП, росте величины агрегации на 6 ч, росте аккумуляции ОХ, снижении числа жизнеспособных МФ_Н.

Основным результатом проведенного исследования является тот факт, что макрофаги, полученные из моноцитов крови ИБС пациентов (МФ_{ИБС}), обладают иной, более высокой, атерогенной способностью, по сравнению с макрофагами, полученными из моноцитов крови здоровых доноров (МФ_Н), что позволяет считать их престоимированными или стимулированными *in vivo* клетками.

Наиболее ранним и выраженным проявлением “стимуляции” макрофагов, как известно, является ускоренное образование в них АФК и выброс их во внешнюю среду (“респираторный взрыв”). Для выявления различий между МФ_Н и МФ_{ИБС} в продукции и выделении АФК, нами, параллельно с настоящей работой, проводилось изучение ХЛ макрофагов, используя хемилюминометр Lum-5773. Опыты показали, что активность собственной ХЛ(1) люминол-зависимой ХЛ (2), активированной опсонизированным зимозаном ХЛ (ОЗ) (3) или активированной форбол-12-миристан-13-ацетатом ХЛ (ФМА) (4) МФ_Н составляла 0,09; 0,53; 5,58; 23,72 (вольт); а МФ - 0,13; 0,96; 11,61; 36,87 (вольт), соответственно, то есть превышала ХЛ МФ_Н в 1,4, 1,8, 2,1 и 1,6 раза (различия между всеми видами ХЛ, $p < 0,05-0,01$) [28]. Преимущественным источником АФК в стимулированных МФ принято считать активацию NADPH-оксидазы [9, 10, 29], однако и циклооксигеназы и 15-липоксигеназы [30, 31], а также миелопероксидаза [32] принимают в этом активное участие.

Известно, что окисление ЛПНП любыми факторами, включая макрофаги, проходит через ряд стадий: слабое окисление, сопровождающееся ростом содержания продуктов ПОЛ, таких как гидроперекиси липидов (ГП), изопростаны, гидроксистеролы, гидроокиси жирных кислот, альдегиды (в том числе МДА) и другие [1, 33]; умеренное до сильного окисление, ведущее к образованию ЛПНП-агрегатов; очень сильное окисление, проявляющееся фрагментацией апоВ белка ЛПНП. Эти стадии не всегда протекают последовательно, могут проходить одновременно, как правило, они сопровождаются ранней модификацией апоВ белка ЛПНП и ростом отрицательного заряда ЛПНП [34, 35]. Фрагментация апоВ белка ЛПНП может также происходить под влиянием протеолитических энзимов, продуцируемых макрофагами [36].

На стадии скавенжер-зависимого распознавания, связывания и потребления окЛПНП макрофагами, важными условиями являются, во-первых, образование на поверхности макрофага SR-рецепторов; во-вторых, окисление ЛПНП до стадии, достаточной для их распознавания SR-рецепторами. Согласно [37], пороговый уровень окисления ЛПНП для их связывания и поглощения перитонеальными макрофагами мышей, был равен окислению ЛПНП, при котором ЭФП окЛПНП была равна 2,6 и 3,0, что соответствовало потере 49% и 57% свободных аминок групп. Для ТНР-1, полученных из моноцитов крови человека, пороговый уровень для связывания окЛПНП с макрофагами не был обнаружен, но порог для потребления окЛПНП макрофагами был равен окислению ЛПНП, при котором ЭФП=3,0, а потеря аминок групп равна 57% [37]. В свете этих данных становится понятным, почему в наших опытах содержание ТБК-РП в ЛПНП_Н и ЛПНП_Г, инкубированных с МФ_{ИБС}, возрастало после 1 ч аэробной или 1-2 ч гипоксической инкубации, а затем снижалось. В этот период ЛПНП_Н и ЛПНП_Г, по видимому,

окислились до той степени, которая обеспечивала их селективное потребление макрофагами, что вело к удалению ТБК-РП (+ЛПНП) из среды, используемой для определения продуктов ПОЛ. Альтернативным фактором могло быть связывание ТБК-РП (МДА) с апоВ белками ЛПНП, что вело к модификации апоВ белка ЛПНП и снижению ТБК-РП в среде. Важно отметить, что в наших опытах с оценкой величины ХЛ разными макрофагами, ЛПНП_Н спустя 60 мин повышали ХЛ МФ_Н в 1,4 раза, а ЛПНП_Г – через те же 60 мин, но в 2,5 раза ($p < 0,05$ в обоих случаях). В то же время, ни ЛПНП_Н, ни ЛПНП_Г не усиливали ХЛ МФ_{ИБС}, но содержание ТБК-РП в них возрастало [28].

Как известно, усиление агрегации и/или фрагментации ЛПНП увеличивает отрицательный заряд ЛПНП, а также их атерогенность, т.е. облегчает потребление их макрофагами [38], так как они, во-первых, легче инвагинируются в мембрану макрофага, во-вторых, подвергаются в макрофаге более медленной и неполной деградации, что ведет к перегрузке макрофага холестерином и эфирами холестерина, падению в клетках cAMP и увеличению cGMP [35].

В то же время, мы не обнаружили значительных различий в скорости роста ЭФП ЛПНП_Н или ЛПНП_Г, инкубированных с МФ_Н или МФ_{ИБС} в аэробных условиях вплоть до 6 ч инкубации, и выявили снижение ЭФП в ЛПНП_Н и ЛПНП_Г после их инкубации в условиях гипоксии, по сравнению с аэробными условиями. Это был единственный метод, не выявивший существенных различий между атерогенной функцией МФ_Н и МФ_{ИБС}, причины чего пока неясны, так как ЭФП ЛПНП реагирует как на различные окислители, так и на антиоксиданты. Рост ЭФП отчетливо наблюдался при использовании нами для окисления ЛПНП, ЭК, CuSO₄, H₂O₂, ФНО- α [10, 14, 39], однако сравнения МФ_{ИБС} с МФ_Н ни нами, ни другими исследователями ранее проведено не было.

В опытах с применением антиоксиданта пробукола (10,0 мкМ) величина ЭФП ЛПНП_Н, инкубированных с макрофагами *in vitro*, снижалась до 85%, а после инкубации ЛПНП с ЭК пупочной вены плода человека - до 77% (против 100% в контроле) [40]. Десферал (10⁻⁷ М), пробукол (10⁻⁷ М) и калия фенозан (10⁻⁵ М) после добавления в среду с ЛПНП_Н + МФ_Н снижали ЭФП ЛПНП_Н до 119-122% (против 140% в контроле, $p < 0,05-0,01$) [21].

Объяснением отсутствия различий в стимулирующем эффекте МФ_{ИБС} по сравнению с МФ_Н, на ЭФП в аэробных условиях, так же как объяснением снижения величины ЭФП в условиях гипоксии по сравнению с аэробными условиями, может быть лишь тот факт, что ЭФП является параметром, зависящим не только от окисления, но и от множества других факторов, не всегда поддающихся учёту [34, 35].

SR-зависимое потребление окЛПНП осуществляется с помощью различных форм эндоцитоза, а именно пиноцитоза слабо окисленных ЛПНП (размер частиц около 1 мкм) и фагоцитоза или паноцитоза умеренно или сильно окисленных ЛПНП (размер частиц до 5,0 мкм) [41]. При агрегации диаметр ЛПНП возрастает от начальных 22 нм до 75 нм, хотя впоследствии происходит дезагрегация ЛПНП на частицы меньшего размера [42].

Среди факторов, вызывающих гибель макрофагов *in vitro* или пенистых клеток *in vivo*, ведущую роль отводят чрезмерной аккумуляции в клетках холестерина и эфиров холестерина окЛПНП (болезнь накопления) [43], что ведет к нарушению клеточного метаболизма, трансформации макрофагов в нестабильные клетки. Однако, цитотоксический эффект (ЦТ) самих окЛПНП также может быть причиной клеточной смерти, что следует из результатов экспериментов с культурами эндотелиальных клеток (ЭК) [20, 21, 44], фибробластов и гладкомышечных клеток [44], макрофагов [21, 45].

Более выраженная атерогенная активность МФ_{ИБС} к ЛПНП_Г по сравнению с ЛПНП_Н вполне объяснима, так как хорошо известно, что нативные ЛПНП_Г отличаются от нативных ЛПНП_Н большим отрицательным зарядом [35, см. также наши данные] и более низким содержанием антиоксидантов (СоQ₁₀ и витамина Е) [46]. Показано, что субфракция ЛПНП_Г и субфракция отрицательно заряженных

ЛПНП (ЛПНП-) более чувствительны к окислению CuSO_4 , чем ЛПНП_H [47]. Более того, антиоксиданты, добавленные в среду “инкубации” ЛПНП с ЭК или макрофагами, резко снижали не только ЭФП, но и аккумуляцию продуктов ПОЛ в ЛПНП [21, 40]. Таким образом, гиперхолестеринемия, являющаяся существенным фактором риска при атеросклерозе [1, 2], особенно опасна для пациентов с ИБС.

Как уже указано выше, одним из ведущих факторов, способствующих предстимуляции и стимуляции макрофагов *in vivo* является ишемия/гипоксия [11, 12]. Естественно предположить наличие стимулирующего эффекта ишемии/гипоксии и *in vitro*. Действительно, способность ЭК окислять ЛПНП_H в условиях ишемии/гипоксии возрастала [27], а ЦТ эффект окЛПНП на ЭК при ишемии/гипоксии и реперфузии усиливался [20]. Стимулирующий эффект ишемии/гипоксии был получен и в экспериментах с лейкоцитами крыс, контактирующим с ЭК *in vivo* [48], и с лейкоцитами здоровых доноров, инкубированных в газовой смеси (12% или 6% O_2) *in vitro* [49]. Результаты, близкие нашим данным, но на модели макрофагов, полученных из моноцитов крови только здоровых доноров, были представлены в работе [31], в которой показано, что рост содержания ТБК-РП и диеновых конъюгатов в МФ, инкубированных с ЛПНП_H вплоть до 24 ч при 37°C в аэробных условиях (21% O_2), был выражен меньше, чем в условиях гипоксии (0% O_2).

Результаты наших экспериментов также показывают, что гипоксия оказывает стимулирующий эффект на МФ_{ИБС}, причем более сильный, чем на функцию МФ_H. В случае с МФ_{ИБС} гипоксия, вероятно, способствует трансформации предстимулированных макрофагов в стимулированные клетки, действуя как второй стимулирующий фактор [11, 12].

В отличие от МФ_{ИБС}, атерогенная функция МФ_H повышается при гипоксии лишь в сочетании с инкубацией МФ_H с ЛПНП_Г. Это следует объяснить тем, что для усиления функции нестимулированных макрофагов необходимо два стимулирующих фактора, какими и являлись ЛПНП_Г и гипоксия. Что касается повышения роста содержания ОХ в МФ_H и МФ_{ИБС} в условиях гипоксии, то он может быть связан с аккумуляцией ОХ в макрофаге и рецептор-зависимым, и рецептор-независимым способом [39], а также ухудшением при гипоксии выхода ОХ из макрофагов в среду инкубации. Эти механизмы нуждаются в дальнейшем изучении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Использовали атерогенную функцию макрофагов, полученных из моноцитов крови пациентов с ИБС, и макрофагов, полученных из моноцитов крови здоровых доноров, то есть оценке их способности окислять и потреблять ЛПНП, полученные из плазмы крови людей с нормальным содержанием холестерина и пациентов с гиперхолестеринемией.

Результаты исследования показали, что МФ_{ИБС} практически по всем показателям обладают более высокой функциональной активностью, чем МФ_H, что подтвердило ранее высказанную гипотезу, о том, что макрофаги от пациентов с ИБС являются предстимулированными или стимулированными *in vivo* клетками. Исследования также доказали, что гиперхолестеринемия и гипоксия, как правило сопутствующие ИБС, усиливают атерогенный эффект макрофагов.

Таким образом, пациенты с ИБС, особенно с ИБС спазматического характера, находятся в условиях наибольшего риска для возникновения или прогрессии атеросклероза, что делает необходимым применение раннего превентивного лечения антиоксидантными, антиишемическими и снижающими холестерин препаратами.

ВЫВОДЫ.

1. Макрофаги, полученные из моноцитов крови больных ИБС (МФ_{ИБС}) являются *in vivo* преактивированными или активированными клетками, что в условиях аэробной инкубации проявляется их более выраженной способностью окислять и потреблять ЛПНП, по сравнению с макрофагами, полученными из моноцитов крови здоровых доноров (МФ_H).

2. ЛПНП, полученные из плазмы крови больных с гиперхолестеринемией (ЛПНП_Г), раньше и резче подвергаются окислению и потреблению в условиях аэробной инкубации с МФ_Н и МФ_{ИБС}, чем ЛПНП, полученные из плазмы крови здоровых доноров (ЛПНП_Н).

3. Инкубация в условиях гипоксии усиливает способность МФ_Н и МФ_{ИБС} окислять и потреблять ЛПНП, по сравнению с аэробными условиями.

4 На основе культуры макрофагов разработана экспресс-модель для оценки степени стимуляции макрофагов, предрасположенности больных к атеросклерозу, скрининга новых средств профилактики и лечения.

Работа поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований (Проект №02-04-50033-а (2003) и №06-04-48451-а (2006,2007), и Грантами Московского Научного и Технологического Комитета, №1.1.215 (2004) и 1.2.16 (2005).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Takahashi K., Takeya M., Sakashita N.* (2002) *Med. Electron Microsc.*, **35**, 179-203.
2. *Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T., Khoo J., Witztum J.* (1989) *N. Engl. J. Med.*, **320**, 915-924.
3. *Holm T., Damas J.K., Holven K., Nordoy I., Brosstad F.R., Ueland T., Wahre T., Kjekshus J., Froland S.S., Eiken H.G., Solum N.O., Gullestad L., Nenseter M., Aukrust P.* (2003) *J. Thromb. Haemost.*, **1**(2), 257-262.
4. *Hojo Y., Ikeda U., Takahashi M., Shimada K.* (2002) *Atherosclerosis*, **161**, 403-408.
5. *Mizia-Stec K., Gasior Z., Zahorska-Markiewicz B., Janowska J., Szulc A., Jastrzebska-Maj E., Kobielusz-Gembala I.* (2003) *Coronary Artery Dis.*, **14**(6), 431-438.
6. *Биленко М.В., Алесенко А.В., Бурлакова Е.Б., Коган А.Х., Кудрин А.Н., Николаев В.В.* (1991) Явление усиления перекисного окисления липидов в ишемизированных тканях (миокарда и почки). Диплом на Открытие № 393 от 13.12.1990. ГК по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР. Приоритетная публикация 23 ноября 1973г. Бюллетень Открытий и Изобретений, №30, 3.
7. *Алесенко А.В., Биленко М.В., Бурлакова Е.Б., Мольнар А.А., Учитель А.Е., Шеленкова Л.Н.* (1976) *Вестник АМН СССР*, №8, 61-67.
8. *Чуракова Т.Д., Биленко М.В., Показеева З.Т., Заславская Р.М., Полумисков В.Ю., Голиков А.П.* (1985) *Вестник АМН СССР*, № 4, 71-74.
9. *Биленко М.В.* (1989) Ишемические и реперфузионные повреждения органов. Медицина, Москва.
10. *Bilenko M.V.* (2001) *Ischemia and Reperfusion of Various Organs: Injury Mechanisms, Methods of Prevention and Treatment.* (Boriotti S. and Dennis D., eds.) Nova Science Publishers, Inc., Huntington, N.Y., USA.
11. *Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А.* (1999) *Усп. совр. биол.*, **119**(5), 461-474.
12. *Ma J., Chen T., Mandelin J., Ceronis A., Miller N.E., Nikkanen M., Ma G.F., Kontinen Y.T.* (2003) *Cell. Mol. Life Sci.*, **60**, 2334-2346.
13. *Fuhrman B., Volkova N., Aviram M.* (2002) *Atherosclerosis*, **161**(2), 307-316.
14. *Биленко М.В., Хильченко А.В., Шматько Н.А.* (2003) *Бюлл. экспер. биол. мед.*, **135**(4), 410-413.
15. *Клебанов Г.И., Крейнина М.В., Позин В.М., Скуратовская С.Г., Почепцова Г.А., Владимиров Ю.А.* (1988) *Бюлл. экспер. биол. мед.*, **106**(9), 297-299.
16. *Elneihout A.M., Falke P., Hedblad B., Lindgarde F., Ohlsson K.* (1997) *Atherosclerosis*, **131**, 79-84.
17. *Berliner S., Rogowski O., Rotstein R., Fusman R., Shapira I., Bornstein N.M., Prochoren V., Roth A., Keren G., Eldor A., Zeltser D.* (2000) *Cardiology*, **94**, 19-25.
18. *Bilenko M.V., Khilchenko A.V., Nikitina N.A.* (2004) *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **37**(1), 242-243.

19. *Lindgren F.* (1975) in: Analysis of Lipids and Lipoproteins: Preparative ultracentrifugal laboratory procedures and suggestions for lipoprotein analysis, (E.G. Perkins ed.) American Oil Chemistry Society, Champaign, IL, pp. 204-224.
20. *Биленко М.В., Ладыгина В.Г., Федосова С.В.* (1998) Бюлл. exper. биол. мед., **126**(9) 302-306.
21. *Биленко М.В., Хильченко А.В., Павлова С.А.* (2004) Биомед. химия, **49**(6), 554-565.
22. *Uchiyama M., Mihara M.* (1978) Anal. Biochem., **86**, 271-278.
23. *Noble R.P.* (1968) J. Lipid Res., **9**, 693-700.
24. *Laemmli U.K.* (1970) Nature (London), **227**, 680-685.
25. *Chazov E.I., Tertov V.V., Orekhov A.N., Lyakishev A.A., Perova N.V., Kurdanov Kh.A., Khashimov K.A., Novikov I.D., Smirnov V.N.* (1986) Lancet, **2**(8507), 595-598.
26. *Morel D.W., Hessler J.R., Chisolm G.M.* (1983) J. Lipid Res., **24**, 1070-1076.
27. *Биленко М.В., Вахрушева Т.В., Федосова С.В.* (1998) Бюл. exper. биол. мед., **126**(9), 314-317.
28. *Биленко М.В., Владимиров Ю.А., Павлова С.А., Нгуен Тху Тху Туй, Чан Тху Хай Йен* (2008) Биомед. химия, **54**, (принята в печать).
29. *Aviram M., Rosenblat M., Etzioni A., Levy R.* (1996) Metabolism, **45**, 1069-1079.
30. *Folcik V.A., Nivar-Aristy R.A., Krajewsky L.P., Cathcart M.K.* (1995) J. Clin. Invest., **96**, 504-510.
31. *Rydberg E.K., Krettek A., Ulstrom C., Ekstrom K., Svensson P.A., Carlsson L.M., Jönsson-Rylander A.C., Hansson G.I., McPheat W., Wiklund O., Ohlsson B.G., Hultén L.M.* (2004) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., **24**(11), 2040-2045.
32. *Podrez E.A., Abu-Soud H.M., Hasen S.L.* (2000) Free Radic. Biol. Med., **28**, 1717-1725.
33. *Berliner J.A., Heinecke J.W.* (1996) Free Radic. Biol. Med., **20**, 707-727.
34. *Kuznetsov A.S., Missyul B.V.* (1992) Ukr. Biochim. Zh., **64**, 3-19.
35. *Панасенко О.М., Сергиенко В.И.* (1993) Биол. мембраны, **10**, 341-382.
36. *Edelstein C., Nakajima K., Pfaffinger D., Scam A.M.* (2001) J. Lipid Res., **42**, 1664-1670.
37. *Wang X., Greilberger J., Ledinski G., Kager G., Jurgens G.* (2001) J. Cell. Biochem., **81**, 557-569.
38. *Tertov V.V., Orekhov A.N., Sobenin L.A., Gabbasov Z.A., Popov E.V., Yaroslavov A.A., Smirnov V.N.* (1992) Circ. Res., **71**(1), 218-228.
39. *Вольнова Т.В., Панасенко О.М., Заречнева Н.В., Азизова О.А., Владимиров Ю.А.* (1990). Биол. мембраны, **7**(2), 141-145.
40. *Биленко М.В., Хильченко А.В., Коновалова Г.Г., Ланкин В.З.* (2003) Бюлл. exper. биол. мед., **136**(8), 145-147.
41. *Kruth H.S., Jones N.L., Huang W., Zhao B., Ishii I., Chang J., Combs C.A., Malide D., Zhang W.Y.* (2004) J. Biol. Chem., **280**, 2352-2360.
42. *Kruth H.S.* (2002) Curr. Opin. Lipidol., **13**, 483-488.
43. *Тумов В.Н.* (1999) Росс. кард. ж., №5, 48-56.
44. *Morel D., DiCorleto P., Chisolm G.* (1984) Atherosclerosis, **4**, 357-364.
45. *Hardwick S., Carpenter K.L., Allen E.A., Michinson M.J.* (1999) Free Radic. Res., **30**(1), 11-19.
46. *Konush A., Reich A., Baum K., Spronger T., Finckh B., Kohischutter A., Beisiegel U.* (1997) Atherosclerosis, **129**, 119-126.
47. *Lavy A., Brook G.J., Dankner G., Ben Amotz A., Aviram M.* (1991) Metabolism, **40**, 794-799.
48. *Mian R., Westwood D., Stanly P., Coote J.H.* (1993) Exp. Physiol., **78**, 839-842.
49. *Sanidas D., Garnham A., Mian R.* (2000) Exp. Physiol., **85**, 2023-2026.

Поступила: 24. 10. 2007.

LDL OXIDATION AND UPTAKE BY MONOCYTE-DERIVED MACROPHAGES FROM THE BLOOD OF PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE

M.V. Bilenko¹, A.V. Khilchenko¹, N.A. Nikitina¹, D.V. Aksenov²

¹Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Pogodinskaya St. 10, 119121 Russia; tel.: +007(495) 246-50-72; fax: +007(495) 245-08-57; e-mail: Marianna.Bilenko@mail.ru

²Institute of Experimental Cardiology, Ministry of Public Health and Social Development of the Russian Federation, Moscow, Russia.

The aim of this study was to test our hypothesis that monocyte-derived macrophages of patients with ischemic heart diseases (IHD, MP_{IHD}) were prestimulated (primed) or stimulated cells whose capacity for LDL oxidation and uptake exceeded that of macrophages from healthy donors (MP_N). Monocytes were obtained from the blood of 18 healthy donors and 25 IHD patients; plasma LDL - from 16 another group healthy donors (LDL_N) and 15 patients with family hypercholesterolemia. Incubation of LDL_N or LDL_H with MP_{IHD} or MP_N was carried out under aerobic and hypoxic conditions. It was shown that incubation of LDL_N or LDL_H with MP_{IHD} TBARS accumulation, LDL aggregation, apoB fragmentation were observed earlier and proceeded more actively than in the case of incubation with MP_N. MP_{IHD} (compared to MP_N) more actively uptook LDL_H and LDL_N as accumulated greater amounts of total cholesterol (TCh) (by a factor of 1.8–2.1; $p < 0.05$ – 0.01), and their viability decreased to a markedly greater degree ($p < 0.01$). MP_{IHD} and MP_N also oxidized and took up LDL_H with a higher intensity than LDL_N, and their capacity for LDL oxidation and uptake increased, under hypoxic condition, compared to those under aerobic conditions. Thus, new experimental results provide direct evidence that macrophages of IHD patients are in vivo priming or stimulated cells and that this stimulation, especially in combination with hypercholesterolemic LDL and hypoxia, is a very strong risk factor that can predispose these patients to the onset or progression of atherosclerosis. Using MP_{IHD}, it was created express-method for evaluation the degree of monocyte/macrophage stimulation in patients with IHD, selection of premedication medicine and new antiatherosclerotic and antiischemic drugs.

Key words: monocyte-derived macrophages, low density lipoproteins, ischemic heart disease, hypercholesterolemia, lipid peroxidation, atherosclerosis, hypoxia.