

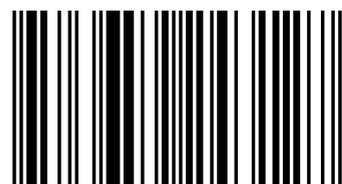
Иницирующим моментом атерогенеза является накопление липидов в интима артерий в результате взаимодействия клеток с ассоциатами модифицированных ЛНП. В настоящей работе проведено углублённое изучение механизмов атерогенной модификации липопротеидов низкой плотности (ЛНП), циркулирующих в крови пациентов; исследованы механизмы и роль ассоциации ЛНП в атерогенезе. Установлена диагностическая и прогностическая значимость ЛНП-содержащих циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), определяемых по уровню холестерина в них (Х-ЦИК), в отношении прогрессирования раннего атеросклероза. Показано, что по диагностической и прогностической значимости Х-ЦИК значительно превосходит широко применяемые для диагностики атеросклеротических заболеваний показатели липидного обмена. Выявлены амфифильные полимеры (полаксамеры), которые в зависимости от их гидрофобных свойств влияют на самопроизвольную ассоциацию ЛНП. Показано, что полаксамеры с большей гидрофобностью останавливают процесс ассоциации ЛНП, но не вызывают диссоциацию образовавшихся комплексов. Эти вещества можно рассматривать как перспективные агенты с точки зрения прямой антиатеросклеротической терапии.

Атерогенность липопротеидов



Александра Александровна Мельниченко

В 2002 году закончила химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, в 2006 году защитила кандидатскую диссертацию по теме "Агрегация циркулирующих множественно модифицированных ЛНП. Роль в атерогенезе". Является ведущим научным сотрудником НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, г. Москва.



978-3-659-24312-7

Мельниченко, Орехов, Собенин

Александра Александровна Мельниченко
Александр Николаевич Орехов
Игорь Александрович Собенин

Атерогенная модификация липопротеидов

Роль в атерогенезе

 **LAMBERT**
Academic Publishing

**Александра Александровна Мельниченко
Александр Николаевич Орехов
Игорь Александрович Собенин**

Атерогенная модификация липопротеидов

**Александра Александровна Мельниченко
Александр Николаевич Орехов
Игорь Александрович Собенин**

**Атерогенная модификация
липопротеидов**

Роль в атерогенезе

LAP LAMBERT Academic Publishing

Impressum / Выходные данные

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek: Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Alle in diesem Buch genannten Marken und Produktnamen unterliegen warenzeichen-, marken- oder patentrechtlichem Schutz bzw. sind Warenzeichen oder eingetragene Warenzeichen der jeweiligen Inhaber. Die Wiedergabe von Marken, Produktnamen, Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen u.s.w. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutzgesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Библиографическая информация, изданная Немецкой Национальной Библиотекой. Немецкая Национальная Библиотека включает данную публикацию в Немецкий Книжный Каталог; с подробными библиографическими данными можно ознакомиться в Интернете по адресу <http://dnb.d-nb.de>.

Любые названия марок и брендов, упомянутые в этой книге, принадлежат торговой марке, бренду или запатентованы и являются брендами соответствующих правообладателей. Использование названий брендов, названий товаров, торговых марок, описаний товаров, общих имён, и т.д. даже без точного упоминания в этой работе не является основанием того, что данные названия можно считать незарегистрированными под каким-либо брендом и не защищены законом о брендах и их можно использовать всем без ограничений.

Coverbild / Изображение на обложке предоставлено: www.ingimage.com

Verlag / Издатель:

LAP LAMBERT Academic Publishing

ist ein Imprint der / является торговой маркой

OmniScriptum GmbH & Co. KG

Heinrich-Böcking-Str. 6-8, 66121 Saarbrücken, Deutschland / Германия

Email / электронная почта: info@lap-publishing.com

Herstellung: siehe letzte Seite /

Напечатано: см. последнюю страницу

ISBN: 978-3-659-24312-7

Zugl. / Утверд.: Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии Российской Академии медицинских наук - 2013

Copyright / АВТОРСКОЕ ПРАВО © 2013 OmniScriptum GmbH & Co. KG

Alle Rechte vorbehalten. / Все права защищены. Saarbrücken 2013

Содержание	
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Роль модифицированных ЛНП в развитии атеросклероза.....	11
1.2 Модифицированные липопротеиды низкой плотности, циркулирующие в крови человека	14
1.3 Атерогенность липопротеидов низкой плотности.....	21
1.4 Усиление атерогенности модифицированных <i>in vitro</i> ЛНП в результате их ассоциации.....	23
1.5 Взаимодействие липопротеидов низкой плотности с компонентами внеклеточного матрикса	32
1.6 Липопротеидсодержащие циркулирующие иммунные комплексы	34
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	38
2.1 Аутопсийный материал.....	38
2.2 Гистохимическое выявление липидов.....	38
2.3 Исследование посредством трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ).....	38
2.4 Электронно-микроскопический гистохимический анализ.	39
2.5 Хроматографическое определение липидов на криостатном срезе	39
2.6 Первичная культура субэндотелиальных клеток аорты человека.....	39
2.7 Культура моноцитов-макрофагов крови человека.....	42
2.8 Получение сыворотки крови	43
2.9 Оценка антиатерогенного эффекта в модели <i>in vitro</i>	44
2.10 Определение пролиферативной активности.....	44
2.11 Определение синтеза клеточного белка	45
2.12 Определение синтеза коллагена.....	45
2.13 Изучение внутриклеточного метаболизма эфиров холестерина	46
2.14 Изучение внутриклеточного синтеза липидов	47
2.15 Выделение и фракционирование липопротеидов низкой плотности.	47
2.15.1 Доноры.	47
2.15.2 Получение плазмы и сыворотки крови.....	47
2.15.3 Выделение суммарной фракции липопротеидов низкой плотности из плазмы крови.....	48

2.15.4	Определение концентрации белка в препаратах ЛНП....	48
2.15.5	Получение фракций нативных и циркулирующих множественно модифицированных липопротеидов низкой плотности	49
2.16	Получение модифицированных ЛНП	50
2.16.1	Модификация ЛНП протеолитическими ферментами....	50
2.16.2	Модификация ЛНП миелопероксидазой (МПО).....	50
2.16.3	Модификация ЛНП липолитическими ферментами	51
2.16.4	Модификация ЛНП дегликозилирующими ферментами – нейраминидазой.....	51
2.16.5	Модификация ЛНП низкомолекулярными альдегидами эндогенного происхождения.....	52
2.17	Анализ модифицированных ЛНП.....	52
2.17.1	Экстракция липидов из ЛНП	52
2.17.2	Анализ липидов ЛНП при помощи тонкослойной хроматографии.....	53
2.17.3	Электрофорез в полиакриламидном геле	53
2.17.4	Электрофорез в агарозном геле	54
2.17.5	Определение тиобарбитуровая кислота (ТБК)-реактивных продуктов	54
2.17.6	Определение содержания сиаловой кислоты в ЛНП	55
2.17.7	Изучение особенностей структуры модифицированных ЛНП методом твердофазного иммуноферментного анализа	56
2.18	Определение степени ассоциации ЛНП и размера ассоциатов.....	58
2.18.1	Определение относительного размера ЛНП (метод флуктуации светопропускания).....	58
2.18.2	Определение размера ассоциатов ЛНП	59
2.18.3	Основные характеристики использованных в работе полаксамеров	59
2.19	Ультразвуковое сканирование сосудов.....	60
2.20	Статистическая обработка данных	61
РЕЗУЛЬТАТЫ		62
3.1	Морфологическая визуализация и анализ распределения липидов в атеросклеротических поражениях человека.	62

3.2	Оптимизация клеточной модели для оценки атерогенности ЛНП	68
3.3	Ассоциация ЛНП – ключевой фактор их атерогенности	71
3.3.1	Самоассоциация ЛНП	71
3.3.2	Разработка метода определения степени ассоциации (сравнение методов светопропускания и светорассеяния)	73
3.3.3	Ассоциация с внеклеточным матриксом	75
3.3.4	Образование циркулирующих иммунных комплексов	81
3.4	Модуляция ассоциации	92
3.4.1	Влияние различных модификаций частицы нативных липопротеидов низкой плотности на их устойчивость к ассоциации	92
3.4.2	Изучение конформационных изменений апоВ белка цмЛНП и ферментативно модифицированных ЛНП	106
3.4.3	Модуляция ассоциации полаксамерами	127
3.5	Разработка методов диагностики факторов атерогенности	138
3.5.1	Разработка и модификация метода определения уровня цмЛНП в сыворотке	138
3.5.2	Сравнение диагностической значимости цмЛНП и ЦИК-ЛНП	148
3.5.3	Оценка диагностической и прогностической значимости ЦИК	155
3.5.4	Разработка аналитической тест-системы для оценки атерогенных свойств сыворотки	160
	4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	161
4.1	Морфологическая визуализация и анализ распределения липидов в атеросклеротических поражениях человека	161
4.2	Ассоциация ЛНП – ключевой фактор их атерогенности	166
4.3	Влияние различных модификаций частицы нативных ЛНП на устойчивость липопротеидов к ассоциации	174
4.4	Изучение конформационных изменений апоВ белка цмЛНП и ферментативно модифицированных ЛНП	182
4.5	Экзогенные ингибиторы ассоциации ЛНП	183
4.6	Диагностическое и прогностическое значение ЦИК	185
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	189

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	190
ПРИЛОЖЕНИЕ	216
Лабораторный регламент на создание макета аналитической тест-системы для применения в медицине при экспрессной диагностике атерогенных дислипидемий при сердечно сосудистых патологиях..	216

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время сердечно-сосудистые заболевания – наиболее распространенная причина инвалидизации и смертности в России и других индустриально развитых странах (Windecker S, 2013; Quarles, 2013). Большинство сердечно-сосудистых заболеваний является следствием атеросклероза магистральных сосудов человека (Pranavchand R, 2013). Одним из первых проявлений атеросклероза на клеточном уровне принято считать накопление липидов, в частности эфиров холестерина, в интиме артерий (Аничков, 1947; Cianciola NL, 2011). Источником липидов, накапливающихся в интиме сосудов, являются циркулирующие в крови липопротеиды низкой плотности (ЛНП) (Vukovic I, 2006; Alaupovic, 1971; Cookson, 1971). При этом нативные ЛНП, не накапливаются в культивируемых клетках в значимых количествах, то есть они – не атерогенны (Badimón L, 2009). С другой стороны, многими исследователями (Soran H, 2011; Orsó E, 2011) было продемонстрировано, что ЛНП, модифицированные различным образом *in vitro* (ацетилированные, обработанные малоновым диальдегидом, вортексированные, гликозилированные и т.д.), эффективно захватываются субэндотелиальными и другими клетками, то есть являются атерогенными.

Оставалось не ясным, почему модифицированные такими разными способами ЛНП в конечном итоге обладают одним и тем же свойством – повышенным атерогенным потенциалом. В нашей лаборатории Тертов с соавт. (Orekhov AN, 1989; Sobenin IA, 1996; Tertov VV, 1998) изучали накопление липидов макрофагами после их инкубации с нативными, гликозилированными или окисленными ЛНП, а также с липопротеидами, модифицированными малоновым диальдегидом или нейраминидазой. Было показано, что модифицированные любым способом ЛНП образуют ассоциаты, и эти

ассоциаты проявляют атерогенные свойства. Авторы предположили, что все ЛНП, модифицированные разными способами *in vitro*, объединяет одно и то же свойство – пониженная устойчивость к ассоциации. Была выдвинута гипотеза: без модификации ЛНП невозможна их ассоциация (ассоциация)?, без ассоциации ЛНП не проявляют выраженные атерогенные свойства. Впоследствии эта гипотеза была подтверждена многими исследователями, изучающими захват клетками ЛНП, ассоциация которых была инициирована *in vitro* разными способами: интенсивное встряхивание или вортексирование (Walters MJ, 2010), окисление медью и железом (Satchell L, 2012; Saputri FC, 2012), обработка гипохлоритом (Guha M, 2010), миелопероксидазой (Панасенко ОМ, 2004), фосфолипазой А2 (Yamamoto K, 2011), сфингомиелиназой (Sneck M, 2012), протеазами (Piha M, 1995), гликозидазами (Панасенко ОМ, 2006). Тем не менее, в крови больных атеросклерозом так и не удалось обнаружить липопротеиды, аналогичные модифицированным *in vitro*.

Ранее в работах А. Н. Орехова и В. В. Тертова в крови больных ишемической болезнью сердца были обнаружены циркулирующие множественно модифицированные ЛНП (цмЛНП) (Orekhov AN et al., 1989; Tertov VV et al., 1990), значительно отличающиеся от нативных по физико-химическим свойствам, в частности, они имели пониженное содержание сиаловой кислоты, маннозы и других сахаров. Примерно в то же время другими исследователями были обнаружены так называемые мелкие, плотные (La Belle M et al., 1990; Avogaro P et al., 1991) и электроотрицательные (Avogaro P et al., 1988) ЛНП, которые, как выяснилось позже, по сути представляют собой наряду с цммЛНП одну и ту же подфракцию близких по свойствам липопротеидных частиц, подвергшихся множественной модификации *in vivo* (Тертов et al., 1999). Циркулирующие в крови модифицированные ЛНП обладали двумя общими свойствами:

стимулировали липоидоз на клеточном уровне и проявляли склонность к ассоциации, причем, их атерогенный потенциал напрямую зависел от устойчивости к ассоциации и увеличивался с ее понижением (Orekhov AN et al., 1991 a; Tertov VV et al., 1990; Tertov VV et al., 1992).

Однако оставались не вполне понятными механизмы атерогенной модификации ЛНП и её роль в атерогенезе. Оставались без ответа многие вопросы. В частности, какие именно изменения должны произойти в частице ЛНП, чтобы она потеряла устойчивость к самоассоциации? Каков механизм ассоциации ЛНП? Как зависит эффективность поглощения клеткой частиц ЛНП от их размера? Отличается ли клеточный метаболизм ассоциатов ЛНП от неассоциированных частиц ЛНП? Можно ли повлиять на процесс ассоциации липопротеидов?

Известно, что ЛНП способны не только к самоассоциации, но к ассоциации с компонентами внеклеточного матрикса (Soto Y, 2012) и образованию циркулирующих иммунных комплексов (Lopes-Virella MF, 2013; Tertov V.V., 1996). Но как сам процесс ассоциации, так и атерогенные свойства ассоциатов изучены недостаточно. Циркулирующие иммунные комплексы могут служить маркерами предрасположенности к инфаркту миокарда (Lopes-Virella MF, и др., 2012), но неизвестно, насколько велика прогностическая и диагностическая роль этого параметра. Не была разработана тест-система для оценки атерогенного потенциала крови больного на основе измерения показателей атерогенной модификации ЛНП. Учитывая это, цели и задачи настоящей работы были сформулированы следующим образом:

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Одним из наиболее ранних проявлений атеросклеротического поражения является внутриклеточное и внеклеточное отложение липидов, преимущественно эфиров холестерина, в интиме сосудов (Windecker S, 2013; Quarles, 2013; Аничков, 1947). Образование наполненных липидными включениями пенистых клеток является иницирующим моментом патогенеза атеросклероза, однако, механизмы накопления внутриклеточных липидов изучены недостаточно.

Было установлено, что источником липидов, накапливающихся в клетках сосудов, являются липопротеиды низкой плотности (ЛНП), циркулирующие в крови человека (Bates SR, 1976; Goldstein JL, 1979). Частица ЛНП состоит из гидрофобного ядра, которое покрыто оболочкой из фосфолипидов, холестерина и одной молекулы апо-В-100. Каждая частица ЛНП содержит примерно 1600 молекул этерифицированного холестерина, 700 молекул фосфолипидов, 600 молекул неэтерифицированного холестерина и 170 молекул триглицеридов (Davis HR Jr, 2011; Esterbauer H, 1992). Фосфолипиды представлены в-основном фосфатидилхолином (500 молекул) и сфингомиелином (200 молекул). Установлено, что апо-В-100 связывается в основном с молекулами фосфатидилхолина (Greig FH, 2012; Dominiczak MH, 2011; Ghesquiere SA, 2005), в то время как холестерин в большей степени связывается со сфингомиелином (Nilsson A, 2006).

Было показано, что инкубация нативных ЛНП с различными типами клеток не приводит к накоплению липидов (Kruth, 2011; Oörní K, 2006). Причиной служит то, что они попадают в клетку через специфические ЛНП-рецепторы, которые обладают механизмом отрицательной обратной связи (Armengol C, 2013; Goldstein JL, 1977).

Это дает возможность клетке регулировать ее внутриклеточное содержание холестерина. При обследовании больных с семейной гиперхолестеринемией, при которой наблюдается частичное или полное отсутствие специфических ЛНП-рецепторов, было показано, что липопротеиды низкой плотности все же попадают в клетки и накапливаются, образуя пенистые клетки. В поиске альтернативных рецепторов Браун и Гольдштейн (Armengol C, 2013; Goldstein JL, 1979) обнаружили рецептор для ацетилированных ЛНП или скэвенджер-рецептор, через который осуществляется неконтролируемый захват ЛНП клетками. Позднее было показано, что ацетил-ЛНП-рецептор – один из многих так называемых скэвенджер-рецепторов, присутствующих у макрофагов и других типов клеток (Krieger, 2001; Mineo C, 2012). Скэвенджер-рецепторы к ацетилированным ЛНП подразделяются на A1 и A2 (Kodama T, 1990). Известно также, что другие рецепторы, такие как CD68, CD36, SR-B1 и LOX-1, проявляют те же свойства, что и скэвенджер-рецепторы (Krieger, 2001). Недавно группой Зу (Xia F, 2013) было показано, что поглощение модифицированных липопротеинов, таких как окисленные ЛНП, происходит посредством CD36-рецептора, и IRGM1, играет важную роль в актин-зависимом CD36 опосредованном поглощении окисленных ЛНП макрофагами. IRGM/IRGM1 экспрессируются макрофагами вокруг атеросклеротической бляшки и их количество зависит от уровня окисленных ЛНП как *in vitro*, так и *in vivo*. Кроме того удаление IRGM/IRMG1 значительно снижает захват окисленных ЛНП макрофагами, как у мышей, так и у человека. Кроме того, IRGM1-нокаутные мыши характеризуются нарушениями интернализации CD36 макрофагов, что связано с дефицитом полимеризации α -актина. Эти результаты продемонстрировали новую функцию IRGM1 в

регулировании поглощения макрофагами окисленных ЛНП при атеросклерозе.

Семейная гиперхолестеринемия – достаточно редкое заболевание. В гомозиготной форме им болеет 1 человек на миллион, в гетерозиготной – 1 человек на 300 тысяч. Атеросклероз же наблюдается у каждого мужчины после сорока лет и у большинства женщин после наступления менопаузы. Следовательно, накопление липидов в интиме сосудов нельзя объяснить наличием скэвенджер-рецепторов, так как нативные ЛНП попадают в клетку через специфические апоВ,Е-рецепторы, а не через скэвенджер-рецепторы (Cianciola NL, 2011). Была выдвинута гипотеза о необходимости изменений свойств ЛНП в результате некой химической модификации, обязательной для того, чтобы произошло накопление липидов в клетках.

В интиме артерий и кровеносном русле существуют протеолитические и липолитические ферменты, способные модифицировать ЛНП. Во внеклеточном пространстве интимы были обнаружены химаза и триптаза, две нейтральные протеазы, секретируемые тучными клетками (Kovanen, 2007; Kaartinen M, 1994), металлопротеиназы, секретируемые макрофагами и гладкомышечными клетками (Packard RR, 2008; Galis ZS, 1994), плазмин (Suzuki, 2010; Grainger DJ, 1994) и тромбин (Kassel KM, 2012; Smith E, 1996).

Во внеклеточном матриксе интимы присутствуют фосфолипаза А2 (Ghesquiere SA, 2005; Plihtari R, 2010; Yamamoto K, 2011) и сфингомиелиназа (Nilsson A, 2006; Plihtari R, 2010; Marathe GK, 2000). Фосфолипаза А2 гидролизует фосфатидилхолин ЛНП (Yamamoto K, 2011), сфингомиелиназа при кислых значениях рН гидролизует

молекулы сфингомиелина, особенно после гидролиза ЛНП в нейтральной среде фосфолипазой А2 (Hurt-Camejo E, 2000).

В интиме была обнаружена рН-зависимая холестеринэстераза (Suriyaphol P, 2002), которая способна гидролизовать лизофосфолипиды в окисленных ЛНП, а также в присутствии холата, эфиры холестерина. Наконец, макрофаги и пенистые клетки в стенке сосуда синтезируют лизосомальную кислую липазу (Fouchier SW, 2013); активен ли этот фермент во внеклеточном пространстве – неизвестно.

В интиме аорты есть ферменты, способные к окислению липопротеидов: 15-липоксигеназа (Keidar S, 1995), миелопероксидаза (Delporte C, 2013), гемоксигеназа-1 (Csizsar A, 2007). Области атеросклеротического поражения содержат также церулоплазмин (Turgut A, 2013) и ионы металлов переходной валентности (Turgut A, 2013), которые способны к окислению ЛНП.

1.1 Роль модифицированных ЛНП в развитии атеросклероза

Итак, в интиме артерий существует множество ферментов, способных модифицировать ЛНП. Для моделирования этого явления ЛНП подвергали химическому, ферментативному или механическому воздействию.

Так, более 30 лет назад Браун и Гольдштейн показали (Goldstein et al., 1979), что ацетилированные ЛНП попадают в клетку не через апоВ,Е-, а через скэвенджер-рецепторы, что приводит к чрезмерному неконтролируемому накоплению липидов в клетках. Однако *in vivo* не существует предпосылок для ацетилирования ЛНП. Тем не менее, Браун и Гольдштейн считали, что существуют другие

еще не выявленные модификации ЛНП, после которых они захватываются скэвенджер-рецептором к ацетилированным ЛНП (Goldstein et al., 1979). Двумя годами позже Хенриксен с соавт. (Henriksen et al., 1981) обнаружили, что после инкубации с эндотелиальными клетками ЛНП приобретают способность вызывать накопление липидов в макрофагах, при этом захват клетками осуществлялся именно через скэвенджер-рецепторы к ацетилированным ЛНП.

Примерно в это же время было показано, что липопротеиды, обработанные малоновым диальдегидом (МДА) (Fogelman et al., 1980), также являются атерогенными, т.е. способными вызывать накопление внутриклеточных липидов. Причем скорость захвата и деградации клетками МДА-модифицированных ЛНП не изменялась при добавлении ацетилированных или нативных липопротеидов. Это значит, что они проникают в клетку не через апоВ,Е- или скэвенджер рецепторы.

Вортексирование (интенсивное встряхивание) может служить моделью поведения липопротеидов в местах ветвления сосудов, где возникает высокое турбодинамическое напряжение. ЛНП после воздействия вортексом (Khoо et al., 1990) также вызывают накопление липидов в клетках. В процессе вортексирования образуются частицы более крупные, чем нативные липопротеиды, которые захватываются клетками путем фагоцитоза.

Кроме того, было выдвинуто предположение, что ЛНП могут быть гликозилированы в *in vivo* (это особенно вероятно при заболевании диабетом). Были получены гликозилированные ЛНП (Klein RL, 1995), которые вызывали накопление липидов в клетках в 3 раза большее, чем нативные ЛНП. Показано, что обработка

липопротеидов различными ферментами, такими как липоксигеназа, миелопероксидаза, фосфолипаза А2 и С, сфингомиелиназа (Oestvang J, 2006; Adameova A, 2009) также вызывает увеличение атерогенности ЛНП.

Так как частицы ЛНП, которые попадают в интиму артерий, подвергаются протеолитической и липолитической модификации, группой Kovanen в сотрудничестве с Hurt-Camejo (Plihtari R, 2010) был изучен эффект последовательного протеолиза и липолиза на слияние ЛНП и последующее связывание образовавшихся частиц с протеогликанами стенки сосудов человека. Обработка химазой катепсином S и привела к более обширному протеолизу и высвобождению пептидных фрагментов ЛНП, чем обработка плазмином. Фосфолипаза типа 2-Па не способна гидролизовать немодифицированные ЛНП и даже протеолиз частицы ЛНП не привел к повышению липолиза этим ферментом. Тем не менее, протеолиз с помощью химазы и катепсина S приводил к ускоренному липолизу с помощью фосфолипазы типа 2-V и сфингомиелиназы, что ускоряло слияние частиц ЛНП между собой и связывание с протеогликанами. Взятые вместе, результаты показали, что протеолиз делает частицы ЛНП более чувствительными к гидролизу под воздействием фосфолипазы 2-V и сфингомиелиназы, таким образом, способствуя самоассоциации ЛНП и связыванию их с протеогликановым слоем, что в конечном итоге приводит к накоплению липидов в стенке сосудов.

1.2 Модифицированные липопротеиды низкой плотности, циркулирующие в крови человека

В ходе исследований группой А.Н. Орехова и В.В. Тертова с соавт. (Тертов, 1999; Орехов АН, и др.) в крови пациентов больных ишемической болезнью сердца были обнаружены ЛНП, отличающиеся от нативных ЛНП сниженным содержанием сиаловой кислоты (терминального сахара биантенных углеводных цепей липопротеидной частицы см рис. 1). Эти липопротеиды были выделены с помощью лектин-хроматографии на *Ricinus communis* агглютинин (RCA_{120}) агарозе и получили название циркулирующие множественно модифицированные ЛНП (цмЛНП) (Orekhov AN, 1989; Tertov VV, 1990; Орехов АН, 2012; Орехов, 2013).

Циркулирующие множественно модифицированные ЛНП вызывали накопление липидов в клетках интимы аорты человека и в макрофагах, то есть являлись атерогенными (Tertov VV, 1992 ; Орехов АН, 2012; Орехов, 2013). В цмЛНП, выделенных из крови больных атеросклерозом, содержание сиаловой кислоты было в среднем в 2-3 раза ниже, чем в нативных липопротеидах (Tertov VV, 1992 ; Тертов, 1999; Орехов АН, 2012). Была установлена достоверная обратная корреляция между содержанием сиаловой кислоты в ЛНП и их способностью вызывать накопление липидов *in vitro* (Tertov VV, 1992 ; Орехов АН, 2012; Орехов, 2013). Более того, нативные липопротеиды здоровых лиц после удаления сиаловой кислоты бактериальной нейраминидазой приобретали атерогенные свойства (Orekhov AN, 1989; Tertov VV, 1990; Орехов АН, 2012; Орехов, 2013). Кроме измененного содержания сиаловой кислоты цмЛНП обладали целым рядом свойств, отличающих их от нативных ЛНП. Так, диаметр частиц цмЛНП был на 10-15% меньше, чем диаметр нативных липопротеидов. Плотность циркулирующих множественно

модифицированных ЛНП была достоверно ниже по сравнению с нативными ЛНП (табл. 1). цмЛНП характеризовались более высокой электрофоретической подвижностью, что говорило о повышенном поверхностном отрицательном заряде липопротеидной частицы. Дальнейшими исследованиями были продемонстрированы существенные различия в липидном составе нативных и цмЛНП (Тертюв ВВ, 1992 ; Тертов, 1999; Орехов АН, 2012). Так, содержание свободного и этерифицированного холестерина и триглицеридов в цмЛНП здоровых лиц на 30-40% ниже, чем в нативных липопротеидах (для цмЛНП и нативных ЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом эта разница была 1,5-2 кратной). Уровень моноглицеридов и свободных жирных кислот цмЛНП здоровых лиц на 20-25% выше по сравнению с нативными липопротеидами (табл.1).



Рисунок 1 - Последовательность сахаров в углеводной цепи ЛНП. (Sial – сиаловая кислота, Gal – галактоза, Man – манноза, GlcNAc – N-ацетилглюкозаминогликан).

В цмЛНП больных коронарным атеросклерозом содержание триглицеридов в 1,5-2 раза выше, а свободных жирных кислот, моно- и диглицеридов – в 3-5 раз выше, чем в нативных ЛНП. Циркулирующие модифицированные ЛНП здоровых лиц имеют сниженный уровень фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, а также увеличенное содержание лизофосфатидилхолина. цмЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом содержат в 1,5-2 раза меньше фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и сфингомиелина, а также в 2 раза больше лизофосфатидилхолина по

сравнению с нативными ЛНП. Содержание основных оксистеролов (7-кето-, 5,6-диен-, 7-окси- и 25-оксихолестерина) в цмЛНП как здоровых лиц, так и пациентов с коронарным атеросклерозом, в 2-4 раза выше, чем в нативных липопротеидах.

Таблица 1 - Содержание основных классов липидов в нативных ЛНП и цмЛНП здоровых лиц и пациентов с коронарным атеросклерозом.

Липид	Содержание липидов в ЛНП, мкг/мг белка			
	Здоровые лица		Пациенты	
	Нативные ЛНП	цмЛНП	Нативные ЛНП	цмЛНП
Эфиры холестерина	2055±132	1507±58	2215±74	1412±30
Холестерин	628±29	427±14	638±27	359±38
Триглицериды	268±18	206±7	301±27	196±12
Диглицериды	15±1	15±1	15±2	25±1
Моноглицериды	29±2	39±1	27±2	82±4
Свободные жирные кислоты	58±2	79±3	53±2	196±2
Фосфатидилхолин	905±89	752±36	1105±96	673±37
Лизофосфатидилхолин	51±3	71±3	56±4	103±4

Уровень жирорастворимых витаминов (А и Е) в цмЛНП здоровых лиц достоверно ниже по сравнению с нативными ЛНП. В цмЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом содержание витаминов А и Е соответственно примерно в 1,5 и 2 раза ниже по сравнению с нативными липопротеидами. Была обнаружена повышенная предрасположенность циркулирующих

модифицированных ЛНП к окислению *in vitro*, которая, скорее всего, является следствием потери жирорастворимых витаминов, обладающих выраженными антиокислительными свойствами (Tertov VV, 1992 ; Орехов АН, 2012).

Было выявлено изменение третичной структуры белка ЛНП, а также модификация лизиновых аминокислотных остатков, что являлось, по-видимому, причиной снижения связывания цмЛНП с апоВ,Е-рецептором (Tertov VV, 1997; Орехов АН, 2012). В отличие от нативных ЛНП, цммЛНП способны связываться со скэвенджер-рецептором, асиалгликопротеид-рецептором и протеогликанами клеточной стенки (Orekhov AN, 1991 а; Орехов АН, 2012), что было подтверждено и другими исследователями (Tani M, 2011; Bancells C, 2010).

Исследованиями в других лабораториях, проводимых ещё 25 лет назад, в крови человека были обнаружены ЛНП, характеризующиеся повышенным электроотрицательным зарядом, впоследствии выделенные с помощью ионообменной хроматографии (Avogaro et al., 1988). «Электроотрицательные» липопротеиды отличались от нативных ЛНП повышенной способностью к ассоциации, увеличенным содержанием апобелка, модификацией некоторых аминокислотных остатков, сниженным содержанием эфиров холестерина, фосфолипидов, витамина Е, а также вызывали накопление липидов в перитониальных макрофагах мыши *in vitro* (Avogaro et al., 1991; Cazzolato et al., 1991). Впоследствии эти данные были подтверждены другими исследователями (Tani M, 2011; Mohty D, 2008). Также были получены данные о присутствии в крови человека фракции ЛНП, отличающейся от нативных меньшими размерами и более высокой плотностью – так называемые мелкие/плотные ЛНП (Shen et al., 1981). Такие ЛНП имели

пониженное содержание сиаловой кислоты (La Belle and Krauss, 1990) и вызывали накопление липидов макрофагами (Avogaro et al., 1991).

В табл. 2 приведены изменения основных физико-химических характеристик цмЛНП, «электроотрицательных» и «мелких/плотных» ЛНП по сравнению с нативными ЛНП. Можно видеть целый ряд признаков, общих как для циркулирующих модифицированных, так и для «электроотрицательных» и «мелких/плотных» ЛНП: малый размер частиц, высокая плотность, увеличенный поверхностный отрицательный заряд, измененный липидный состав и низкий уровень жирорастворимых витаминов, модификация аминокислотных остатков в составе апо-В-100, повышенная склонность к окислению, способность индуцировать внутриклеточное накопление липидов (атерогенность). Кроме того, было показано, что в так называемых «электроотрицательных» липопротеидах уровень сиаловой кислоты значительно ниже, чем в нативных ЛНП (Tertov VV, 1995; Орехов АН, 2012). На основе полученных данных был сделан вывод о том, что все обнаруженные в крови человека модифицированные *in vivo* ЛНП: «электроотрицательные», «мелкие/плотные» и циркулирующие модифицированные ЛНП – представляют собой одну и ту же подфракцию близких по свойствам липопротеидных частиц, подвергшихся множественной модификации (Tertov VV, 1995; Tertov V.V., 1996; Орехов АН, 2012). Важно отметить, что циркулирующие модифицированные, «электроотрицательные» и «мелкие/плотные» ЛНП имели повышенную склонность ассоциации (Tertov VV, 1995; Орехов, 2013; Орехов АН, 2012).

Таблица 2 - Сравнительная характеристика цмЛНП, обнаруженных в крови человека по сравнению с нЛНП (Тертов В.В., 1999).

Параметр	цмЛНП	Электроотрицательные ЛНП	Мелкие/плотные ЛНП
Атерогенность	↑	↑	↑
Размер	↓	↓	↓
Плотность	↑	?	↑
Отрицательный заряд	↑	↑	↑
Сиаловая кислота	↓	↓	↓
Эфиры холестерина	↓	↓	↓
Фосфолипиды	↓	↓	↓
Соотношение белок/липиды	↑	↑	↑
Окисляемость	↑	↑	↑
Антиоксиданты	↓	↓	↓
Модификация аминокислот	↑	↑	?
Ассоциация	↑	↑	↑

Примечание: ↑ - увеличение параметра по сравнению с нативными ЛНП, ↓ - уменьшение параметра по сравнению с нативными ЛНП,

? – исследования не проводилось.

В последние годы было показано, что уровень так называемых «окисленных» ЛНП, а именно сывороточных ЛНП, конъюгированных с диенами, является маркером окислительной модификации ЛНП (Nyüssönen K, 2012). Была исследована взаимосвязь между уровнем сывороточных ЛНП, конъюгированных с диенами, и кросс-секционным субклиническим атеросклерозом, который оценивали по толщине интимы меди (ТИМ) сонных артерий в группе высокого риска у субъектов, принявших участие в многоцентровом исследовании. В исследовании приняли участие 553 пациента в Финляндии, Франции, Италии, Нидерландах и Швеции, у них определяли уровень ЛНП, конъюгированных с диенами и с помощью УЗИ оценивали толщину интимы меди сонных артерий (ТИМ (средний), ТИМ (макс.) и ТИМ (среднее-макс)). Были получены данные, свидетельствующие о кросссекционной зависимости между увеличением уровня ЛНП, конъюгированных с диенами (окисленной модификации ЛНП), и развитием субклинического атеросклероза после поправки на традиционные факторы риска. Причем, у пациентов в северных странах Европы уровень холестерина ЛНП, конъюгированных с диенами, был выше, чем у пациентов из стран южной Европы.

С другой стороны, было продемонстрировано (Maeda S, 2012), что уровень холестерина мелких плотных ЛНП (в нашем исследовании цмЛНП) коррелирует с ТИМ у американцев японского происхождения, что делает его одним из надежных маркеров атеросклероза. Наряду с этим высокий уровень ЛВП-2 защищал данную группу из 481 человека от развития атеросклероза, а уровень холестерина ЛВП-3 никак не коррелировал с ТИМ.

1.3 Атерогенность липопротеидов низкой плотности

На первичной культуре субэндотелиальных клеток, выделенных из интимы аорты человека, было показано, что добавление сыворотки больных сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ) вызывает 2-5,5кратное накопление внутриклеточного холестерина (Chazov EI, 1986). В то время, как сыворотка крови здоровых пациентов не вызывает накопления липидов в клетках. Данное свойство, а именно способность сыворотки, содержащей липопротеиды низкой плотности (ЛНП), вызывать накопление липидов в культуре клеток получило название **атерогенность**. Атерогенными свойствами также обладают ЛНП, выделенные из крови больных ССЗ. Данные липопротеиды содержат подфракцию циркулирующих множественно модифицированных ЛНП (цмЛНП), которые характеризуются сниженным содержанием сиаловой кислоты (Orekhov AN, 1989), фосфолипидов, холестерина, триглицеридов и эфиров холестерина (рис. 2) . Данная подфракция липопротеидов практически отсутствует в крови здоровых доноров, в то время как у больных ССЗ может составлять до 70% от общего содержания ЛНП.

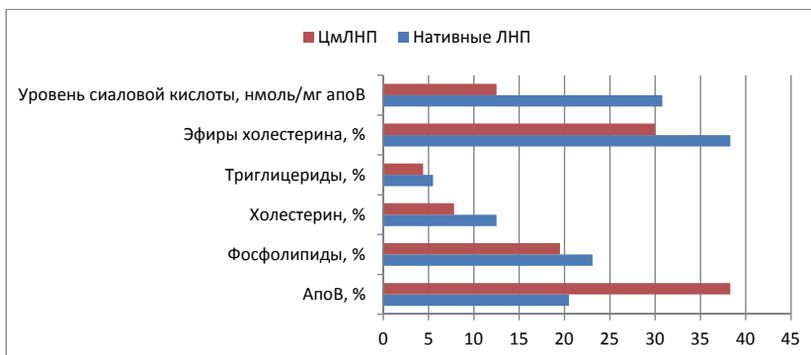


Рисунок 2 - Характеристика препаратов нЛНП и цмЛНП

В то же время из данных, представленных на рисунке 3 видно, что в отличие от нативных липопротеидов, цмЛНП вызывают накопление эфиров холестерина как в гладкомышечных клетках, выделенных из аорты человека, так и в макрофагах человека, что свидетельствует об их атерогенных свойствах. Важно отметить, что нативные ЛНП не вызывают накопления липидов ни в ГМК, ни в макрофагах, т.е. являются неатерогенными.

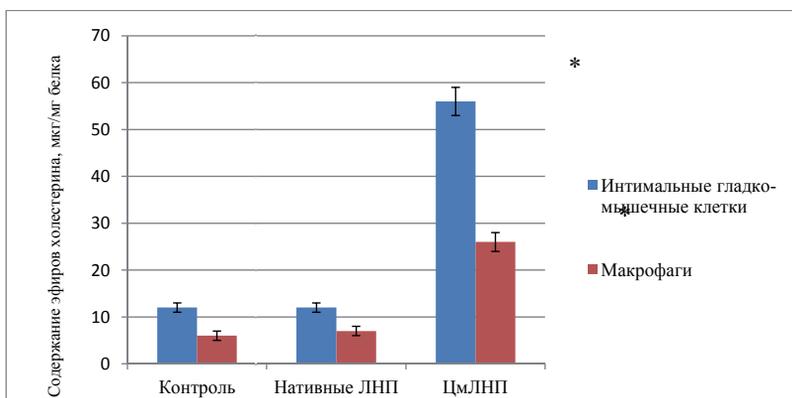


Рисунок 3 - Влияние нативных ЛНП и цмЛНП на содержание эфиров холестерина в гладкомышечных клетках интимы аорты и макрофагах человека.

Данные представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$.

1.4 Усиление атерогенности модифицированных *in vitro* ЛНП в результате их ассоциации

Как указывалось выше, при встряхивании ЛНП на вортексе образуются укрупненные частицы, которые захватываются клетками в несколько раз быстрее, чем нативные ЛНП. Это позволяет предположить, что ассоциаты ЛНП - атерогенны. Данные результаты послужили стимулом к изучению полученных различными группами исследователей модифицированных *in vitro* ЛНП с точки зрения их способности к ассоциации, ассоциации или слиянию. Ассоциация липопротеидов происходит при в контакте частиц ЛНП поверхностями, который не приводит к изменению размера индивидуальных частиц. При слиянии частиц ЛНП их индивидуальный размер увеличивается. Ассоциация ЛНП может быть обратимой, в то время как слияние – необратимый процесс.

Была продемонстрирована зависимость накопления внутриклеточных липидов от размеров агрегатов ЛНП (Мельниченко, 2006). Так, Guarino AJ, (2006) Были изучены агрегаты ЛНП трех размеров (75, 100 и 150 нм), которые инкубировали с клетками и J774A., захват ЛНП клетками контролировали путем измерения изменения клеточного холестерина и содержания белка. По сравнению с контрольным образцом, накопление холестерина был усилено под воздействием агрегатов ЛНП размером 75 и 150 нм. Промежуточный же размер агрегатов - 100 нм, вызывал значительно более выраженное накопление внутриклеточного холестерина, чем другие образцы, и было достаточным, чтобы вызвать гибель клеток. В наших исследованиях (Мельниченко, 2006), что частицы размером более 22нм, вызывают внутриклеточное накопление липидов.

Было показано, что протеолитическая деградация апо-B-100 приводит к ассоциации и слиянию частиц липопротеидов. Апо-B-100

– важный компонент структуры поверхности ЛНП (Nilsson J, 2012). Даже частичное удаление апобелка с поверхности частицы приводит к реорганизации ее структуры и как следствие изменению структуры липидного ядра. По мнению авторов работы (Fisher, 2012) при протеолизе апо-В-100 липиды ядра перемещаются к поверхности частицы ЛНП, увеличивая ее гидрофобность. Это может служить причиной слияния частиц ЛНП. Интересно, что при низкой температуре (15°C), когда эфиры холестерина находятся в относительно упорядоченном состоянии и, вероятно, не способны передвигаться в сторону поверхности, частицы ЛНП с поврежденным белком не агрегируют.

Сфингомиелиназа гидролизует молекулы сфингомиелина с образованием водорастворимых молекул фосфохолина, которые удаляются из частицы ЛНП, и молекул церамида, которые остаются в ЛНП. Было показано, что обработка ЛНП сфингомиелиназой приводит к ассоциации и слиянию ЛНП (Oörni K, 2005; Oörni K, 1998). Возможно, это происходит из-за увеличения содержания церамида в частице (Walters MJ, 2008). Известно, что церамид, в отличие от негидролизованного сфингомиелина, образует домены в частице ЛНП (Walters MJ, 2008; Kinnunen PK, 2002). Сформированные домены могут играть роль неполярных плотов на поверхности частиц, гидрофобное взаимодействие которых приведет к ассоциации ЛНП. При понижении температуры до 15°C увеличивается жесткость липидного ядра, вследствие чего замедляется диффузия сфингомиелина в поверхностном монослое ЛНП (Hurt-Camejo E, 2000), что в свою очередь частично замедляет образование микродоменов церамида. Deevska с соавт. (2012) показали, что полученные агрегаты вызывают 10-кратное увеличение уровня

эфиров холестерина в макрофагах по сравнению с нативными ЛНП. При этом скорость деградации возрастает лишь в 4 раза.

Недавно было исследовано влияние низкого, но физиологически правдоподобного значения pH на ассоциацию модифицированных сфингомиелиназой ЛНП (Sneck M, 2012). Липопопротеиды обрабатывали сфингомиелиназой, а затем изучали процесс ассоциации обработанных таким образом ЛНП при pH 5.5-7.5. Чем ниже было значение pH, тем более выражена была ассоциация одинаково липолизированных частиц ЛНП. При pH 5,5-6,0, агрегаты были намного больше (размер > 1 мкм), чем те, которые были образованы при нейтральном pH (100-200 нм). Обработка сфингомиелиназой приводила к резкому снижению α -спирали и сопутствующему увеличению β -листа структуры апо-100. Ассоциация частиц была вызвана взаимодействиями между вновь открытыми участками apoB-100. ЛНП-подобные микроэмульсии, состоящие из липидов, лишенных apoB, не смогли сформировать крупные агрегаты.

Другой группой также была выдвинута гипотеза о том, что совокупный размер агрегатов ЛНП определяется относительными скоростями гидролиза сфингомиелиназы и столкновений ЛНП между собой (Guarino AJ, 2004). При использовании комбинации методов динамического светорассеяния и спектроскопии УФ-поглощения для измерения кинетики ассоциации и размера частиц, а также математической модели для описания процесса ассоциации, было показано, что ассоциация ЛНП чувствительна к относительной концентрации сфингомиелиназы и pH.

Фосфолипаза A2 ускоряет гидролиз эфиров жирных кислот в *sn*-2 положении. Если ЛНП подвергаются действию фосфолипазы A2 в отсутствие связывающихся с липидами белков (таких как альбумин),

продукты липолиза – лизофосфатидилхолин и свободные жирные кислоты – накапливаются в ЛНП. Тем не менее, при физиологических концентрациях альбумина большая часть жирных кислот и некоторое количество лизофосфатидилхолина переносится на альбумин (Wang YT, 2009 ; Kleinman Y, 1988). Липолиз ЛНП с помощью фосфолипазы A2 в присутствии альбумина приводит к конформационным изменениям апоБелка и реорганизации липидного компонента ЛНП (Wang YT, 2009 ; Kleinman Y, 1988), что вызывает ассоциацию, но не слияние частиц ЛНП (Ghesquiere SA, 2005; Oörni K, 1998). При изучении с помощью электронной микроскопии частиц ЛНП, модифицированных фосфолипазой A2, было показано, что они более мелкие, чем нативные липопротеиды (Oörni K, 1998). В мелких частицах пропорциональное соотношение липидов в поверхностном монослое возрастает, что делает поверхность липопротеидов более гидрофобной, увеличивая склонность липопротеидов к ассоциации. В то же время, увеличение липидной составляющей в поверхностном слое делает его более жестким (Asatryan L, 2005; Gorshkova IN, 1996), что препятствует слиянию модифицированных частиц.

Интересно, что внесение гепарина до, во время или после обработки липопротеидов фосфолипазой A2, вызывает их слияние (Bancells C, 2010; Jayaraman S, 2007). Тот факт, что обработка гепарином до липолиза способствует слиянию ЛНП, наводит на мысль, что взаимодействие ЛНП с глюкозаминогликанами приводит к необратимым изменениям конформации апоБелка. Возможно, взаимодействие с гепарином увеличивает экспозицию лизин- и аргинин-содержащих сегментов апо-B-100 (Camejo et al., 2000) и делает структуру ЛНП менее стабильной (Camejo et al., 2000).

Поврежденные фосфолипазой A2 ЛНП более чувствительны к последующей модификации другими ферментами,

они проникают неспецифическим путем в макрофагальные клетки, что приводит к накоплению внутриклеточных липидов. К тому же лизофосфолипиды и свободные жирные кислоты, выделяемые при взаимодействии фосфолипазы с ЛНП, также проявляют атерогенные свойства (Hurt-Camejo et al., 2001).

Фосфолипаза С гидролизует фосфолипиды до фосфохолина и диацилглицерина. После обработки фосфолипазой С фосфохолин удаляется из ЛНП, а гидрофобный диацилглицерин остается как в липидном ядре, так и на поверхности частицы ЛНП. Взаимодействие с фосфолипазой С приводит к ассоциации и слиянию частиц ЛНП (Bancells C, 2010; Zhang WY, 2000). По всей вероятности, это обусловлено образованием гидрофобных доменов на поверхности ЛНП. С другой стороны было показано, ЛНП, модифицированные фосфолипазой С, вызывают накопление этерифицированных стеролов в культивируемых макрофагах (Bancells C, 2010; Heinecke JW, 1991). Причем модифицированные агрегаты ЛНП сначала локализуются в фагосомах, затем попадают во вторичные лизосомы, после чего образующийся свободный холестерин снова этерифицируется, формируя липидные капли в цитоплазме.

Окисленные ЛНП также имеют тенденцию к ассоциации. Это явление было изучено при взаимодействии липопротеидов с различными окислителями, такими как ионы меди (Turgut A, 2013), гипохлорит (Guha M, 2010). В результате окисления ионами меди теряется целостность частицы ЛНП, что приводит к ассоциации и слиянию липопротеидов (Daub K, 2010). Было проведено сравнение атерогенности агрегатов и мономеров липопротеидов, модифицированных ААПГ. Показано, что мономеры модифицированных частиц вызывали накопление липидов в клетках в гораздо меньшей степени, чем агрегаты.

В отличие от других типов модификаций, окисление приводит к изменениям как белковой, так и липидной частей ЛНП. Так, образующиеся при пероксидации липидов гидропероксиды разлагаются до альдегидов, которые могут реагировать с апо-В-100, что приводит к окислительной деградации аминокислотных остатков апобелка (Taleb A, 2011; Wang X, 1999). Изменения, которые происходят в ЛНП при окислении, сходны с таковыми при действии липолитических ферментов. Так, при окислении атакуются непредельные жирные кислоты фосфолипидов поверхности липопротеидов, которые затем могут быть гидролизованы эндогенной фосфолипазой А2. Как было сказано ранее, лизофосфолипиды и свободные жирные кислоты переносятся на альбумин, что приводит к изменениям в структуре поверхности ЛНП и повышению их склонности к ассоциации. При окислении снижается подвижность поверхностных фосфолипидов, что препятствует липид-белковому взаимодействию и приводит к повышению полярности липидной части ЛНП (Krisko A, 2007; Murphy HC, 2000). Окисление апо-В-100 также приводит к ассоциации и слиянию частиц ЛНП. Показано, что альдегиды реагируют с ЛНП, вызывая ассоциацию последних (Schiopu A, 2004). Хотя обработка гипохлоритом приводит к образованию малых количеств продуктов окислительной деградации ЛНП, она все же вызывает их ассоциацию, более того, показано, что преимущественно деградируют гидрофобные участки апобелка (Guha M, 2010; Jayaraman S, 2005). При изучении захвата ЛНП, модифицированных гипохлоритом, обнаружено, что окисленные липопротеиды вызывают внутриклеточное накопление липидов, частично проникая в клетку путем фагоцитоза, частично через CD36 и SR-BI рецепторы (Marsche et al., 2003).

Недавно был выдвинута гипотеза (Jayaraman S, 2007) о том, что в процессе окисления ЛНП может происходить не только слияние окисленных ЛНП в артериальной стенке, но и окислительно-индуцированное образование амилоида из аполипопротеина В ЛНП. Для подтверждения данной гипотезы и определения влияния окисления на вторичную структуру белка и слияние липопротеидов *in vitro*, мы проанализировали окисление ЛНП неферментативными (Cu^{2+} , H_2O_2 , а HOCl) или ферментативными методами (миелопероксидаза/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Cl}^-$ и миелопреоксидаза/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NO}_2^-$). В работе было показано, что окисление ЛНП вызывает скорее частичное разворачивание вторичной структуры, чем сворачивание в поперечную бета амилоид конформацию. Это разворачивание коррелирует с увеличением отрицательного заряда окисленных ЛНП и с умеренным увеличением флуоресценции тиафлавина Т, которые могут возникнуть скорее в результате электростатического притяжения между катионным красителем и электроотрицательными ЛНП, чем от связывания красителя с образованием амилоидов. Эти и другие спектроскопические исследования ЛНП и ЛВП, которые позволяют изучать их в условиях, способствующих образованию амилоида (высокая концентрации белка, высокая температура, кислый pH), показывают, что *in vitro* окисление липопротеинов не вызывает образование амилоида. Удивительно, но данные, полученные с помощью электронной микроскопии показывают, что дополнительное окисление ингибирует слияние ЛНП под воздействием тепла, которое характерно для нативных ЛНП. Такое ингибирование слияния может возникнуть в результате накопления анионных липидов и лизофосфолипидов на поверхности частиц и / или белка сшитых после дополнительного окисления липопротеинов. Следовательно, только окисление может скорее препятствовать, а не способствовать слиянию частиц ЛНП Авторы высказали предположение, что другие факторы,

такие как альбумин-опосредованного удаление продуктов перекисного окисления липидов и / или связывание ЛНП с протеогликанами артериальной стенки, будет способствовать слиянию окисленных ЛНП в естественных условиях.

В.В. Тертовым с соавт. было показано, что ЛНП, окисленные 2,2'-азобис-(2-амидинопропан)-гидрохлоридом, ионами меди или гипохлоритом агрегировали и вызывали накопление липидов в макрофагах (Tertov VV, 1998; Орехов АН, 2012). После удаления агрегатов путем фильтрации окисленные липопротеиды не вызывали накопления липидов, т.е. были не атерогенны, хотя количество продуктов окисления у них не уменьшалось. Данный факт свидетельствует в пользу того, что сама по себе степень окисления ЛНП не является обязательным условием для проявления ими атерогенных свойств. Определяющей является потеря устойчивости ЛНП к ассоциации, чему, в свою очередь, способствует окисление.

В последнее время предпринято множество попыток изучить механизм ассоциации или слияния модифицированных частиц ЛНП. Появилась тенденция изучать данный процесс при нагревании частиц липопротеидов. Например, работах Lu с соавторами продемонстрировано, что изучение слияния ЛНП можно имитировать путем тепловой денатурации последних и судить, таким образом, о кинетической стабильности частиц ЛНП (Lu M, 2012). Этими исследователями впервые был проведен количественный анализ термической стабильности ЛНП. Денатурация ЛНП под воздействием тепла носит сигмоидальный характер, что является уникальным среди липопротеинов, давая возможность предполагать, что слиянию ЛНП предшествуют другие структурные изменения. Высокая энергия активации денатурации, $E(a) = 100 \pm 8$ ккал / моль, показывает разрушение обширных структурных взаимодействий в ЛНП. Анализ

слияния ЛНП методами гель-хроматографии, гель-электрофореза и электронной микроскопии показывают, что одним из первых явлений термоиндуцированного слияния ЛНП является их димеризация. Анализ связывания моноклональных антител с ЛНП, позволяет предположить возможное участие апо N-концевого домена ЛНП на ранних стадиях слипания частиц ЛНП. Слияние ЛНП ускоряется при $pH < 7$, чему может способствовать кислая среда атеросклеротических поражений. Слияние ЛНП также ускоряется при увеличении концентрации ЛНП до практически физиологического диапазона, что также, вероятно, вносит свой вклад в атерогенез. Термическая стабильность ЛНП уменьшается с увеличением размера частиц, поэтому маловероятно, что проатерогенные свойства мелких плотных ЛНП являются следствием их слияния. Также авторы предполагают, что гиполипидемическая терапия, которая позволяет снизить концентрацию ЛНП, но увеличивает их размер, может иметь противоположное воздействие на процесс слияния ЛНП.

Та же группа в другом исследовании (Jayaraman S, 2005) изучила стабильность липопротеинов низкой плотности человека при нагреве образцов ЛНП различной концентрации, со скоростью от 11 до 90 К / час. При сравнении данных, полученных методами кругового дихроизма, флуоресценции, турбодиметрии, электронной микроскопии и калориметрическим методом, было показано, что тепловое нарушение ЛНП включает в себя необратимые изменения в морфологии частиц и конформации белка, но не глобальное разворачивание белка. Нагревание ЛНП до 85°C вызывает переход липопротеидов в меньшие и большие по размеру частицы и очевидную частичную диссоциацию, но не к разворачиванию единственного белка ЛНП, апоВ. Дальнейшее нагревание приводит к частичному разворачиванию бета-листо в апоВ и слиянию

обедненных белком ЛНП в большие агрегированные липидные капли, в результате чего был выявлен ранее неизвестный высокотемпературный калориметрический пик. Образовавшиеся липидные капли похожи по размеру и морфологии на существующие во внеклеточном пространстве артериальной стенки на начальных стадиях атеросклероза. Была выявлена концентрационная зависимость слияния ЛНП и скорости нагрева, что предлагает высокую энергию активации, которая возникает в результате разрушения упаковки липид-белок в процессе слияния частиц и частичной диссоциации апоВ. Следовательно, термостабильность ЛНП модулируется с помощью кинетических барьеров. Аналогичные барьеры могут придавать структурную целостность подклассов ЛНП в естественных условиях.

1.5 Взаимодействие липопротеидов низкой плотности с компонентами внеклеточного матрикса

Отложение внеклеточных липидов на компонентах соединительнотканного матрикса, наряду с клеточным липоидозом, является одним из наиболее ранних проявлений атеросклеротического поражения сосудов человека. Хорошо изучено взаимодействие ЛНП с эластином и протеогликанами в артериальной стенке (Melchior JT, 2013). Было установлено, что ЛНП способны в условиях *in vitro* образовывать комплексы с клеточным дебрисом, коллагеном, эластином и протеогликанами интимы аорты человека (Orekhov A.N., 1990; Орехов АН, 2012).

За последнее десятилетие было продемонстрировано, что развитие атеросклероза вызвано связыванием ЛНП с протеогликанами в результате обогащения ядра ЛНП холестерилолеатом (Melchior JT, 2013). Для этого мышам, нокаутированным по апоВ100(-/-) с удаленным геном СОАТ2 давали корм, обогащенный либо цис-

мононенасыщенными жирными кислотами или омега-3 полиненасыщенными жирными кислотами. ЛНП выделяли из мышей, связывание ЛНП с протеогликанами определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса. Частицы с более высоким содержанием холестеринолеата имели более высокое сродство к человеческому бигликану и было показано, что количества связывающихся частиц пропорционально степени выраженности атеросклероза у мышей-доноров.

С другой, утолщение сосудов в ответ на высокий уровень ЛНП, является признаком атеросклероза, который характеризуется повышенным отложением гиалуроновой кислоты (ГК) в неоинтимае. Нативные ЛНП, попадая внутрь артериальной стенки претерпевает изменения, такие как окисление. Было показано, что синтез ГК может происходить в ответ на появление определенных окисленных стероидов, источником которых являются окисленные ЛНП (Viola M, 2013).

Были выработаны новые подходы, которые влияют на захват протеогликанами атерогенных ЛНП. Были исследованы антиатерогенные свойства химерного моноклонального антитела (МАТ), которое реагирует с сульфатированными молекулами (Soto Y, 2012). МАТ chP3R99 узнает сульфатированные глюкозаминогликаны, в-основном, хондроитинсульфат, оно блокирует примерно 70% ЛНП, связанных с хондроитинсульфатом и примерно 80% окисленных *in vitro* ЛНП, и при внутривенном введении крысам Sprague-Dawley данное МАК ингибировало задержку и окисление ЛНП в стенке артерий. Более того, иммунизация новозеландских белых кроликов МАК chP3R99 предупреждало развитие индуцированного Липофундином (Lipofundin) атеросклероза.

Была разработана новая возможность визуализации движения ЛНП в утолщение стенки сонной артерии после внутривенной инъекции мышам родамин-меченых ЛНП (Mayasari DS, 2013). С помощью данной методики как нативные ЛНП, так и меченые родамином ЛНП могут быть обнаружены методами спектрофотометрического и микроскопического анализа. Анализ кинетики родамин-меченого ЛНП продемонстрировал, что меченые ЛНП присутствуют почти во всех тканях, преимущественно в печени, через 6 часов после инъекции. Родамин-меченые ЛНП визуализировали в утолщении интимы сонных артерий от 6 до 18 часов после инъекции, что указывает на активный захват ЛНП в артериальной стенке. Таким образом, меченые родамином ЛНП могут быть полезным инструментом для исследования развития атеросклероза.

1.6 Липопротеидсодержащие циркулирующие иммунные комплексы

Роль ЛНП-содержащих ЦИК в атерогенезе активно изучалась в течение последних десятилетий, поскольку множественная модификация липопротеидных частиц предполагает развитие иммунного ответа организма на появление частиц с антигенными свойствами. Наиболее распространенным видом иммунного ответа на модификацию ЛНП является образование ауто-антител (Yla-Herttuala S., 1989; Orekhov AN, 1991 б). ЛНП-содержащие ЦИК были обнаружены в крови больных при атеросклерозе (Szondy E., 1983; Tertov VV, 1990 а; Орехов АН, 2012). Было установлено, что уровень ЛНП-содержащих ЦИК в крови больных коронарным атеросклерозом существенно повышен по сравнению со здоровыми лицами (Tertov VV, 1990 а; Tertov VV, 1990 б; Орехов АН, 2012; Орехов АН, 2013).

Был разработан метод выделения ЛНП-содержащих ЦИК из

сыворотки крови человека с помощью аффинной хроматографии на агарозе с ковалентно-связанными антителами к иммуноглобулинам крови человека (Orekhov A.N., 1987; Орехов АН, 2012). Было установлено, что ЛНП из циркулирующих иммунных комплексов представляют собой десалирированные, мелкие плотные частицы с повышенным электроотрицательным зарядом, низким содержанием нейтральных липидов и фосфолипидов, нейтральных сахаров, третичная структура апобелка которых нарушена, то есть по физико-химическим свойствам они идентичны подфракции цмЛНП. Поэтому можно считать, что антигеном для формирования ЛНП-содержащих ЦИК являются множественно-модифицированные (десалирированные) ЛНП (Tertov V.V., 1996; Орехов АН, 2012).

С помощью аффинной хроматографии на агарозе с ковалентно-связанными ЛНП из плазмы крови больных коронарным атеросклерозом были выделены аутоантитела против модифицированных ЛНП (Orekhov A.N., 1989; Orekhov AN, 1991 б; Орехов АН, 2012; Орехов АН, 2013). Эти аутоантитела представляли собой иммуноглобулины класса G с изоэлектрической точкой (pI), близкой к 8,5, взаимодействующие с белковой составляющей ЛНП. Аутоантитела были способны связываться с нативными, гликозилированными, ацетилированными и окисленными ЛНП, однако проявляли наибольшее сродство к ЛНП, обработанными малоновым диальдегидом, ЛНП больных коронарным атеросклерозом и десалирированным ЛНП.

Аутоантитела, взаимодействуя с нативными ЛНП *in vitro*, сообщали им атерогенные свойства, а формируя комплексы с цмЛНП, усиливали их атерогенный потенциал (Orekhov A.N., 1989; Orekhov AN, 1991 б; Орехов АН, 2012; Орехов АН, 2013). Связывание с образованным комплексом ЛНП-аутоантитело C1q-компонента

комплемента и фибронектина приводило к еще более выраженному накоплению липидов в гладкомышечных клетках непораженной интимы аорты человека.

В течение последнего десятилетия было продемонстрирована тесная корреляция между уровнем ЦИК в крови и количеством инфарктов миокарда и других сердечно-сосудистых катастроф у пациентов с сахарным диабетом 2 типа (Lopes-Virella MF, 2012), также повышенный уровень ЦИК, содержащих гликозилированные и окисленные ЛНП связан с повышенным риском ретинопатии у пациентов с сахарным диабетом 1 типа (Lopes-Virella MF, 2012). С другой стороны, на эпидемиологической выборке из почти 2000 изначально здоровых людей было показано (Ravandi A, 2011), что IgG и IgM, содержащие ЦИК не являются независимыми предикторами событий сердечно-сосудистых заболеваний, но могут влиять на риск ССЗ, связанный с повышенным уровнем окислительных биомаркеров. Также было показано, что включение ЦИК в тучные клетки приводит к экспрессии последними провоспалительных цитокинов (Lappalainen J, 2011). Другие исследователи определили связь уровня антител против окисленных ЛНП с многососудистым поражением (Garrido-Sánchez L, 2010) в зависимости от того принимались статины или нет. В исследование было включено 236 пациентов, которые подверглись инвазивной коронарной ангиографии с количественной оценкой атеросклеротического поражения коронарных артерий, чтобы определить присутствие нескольких коронарных артерий. Были измерены уровни IgG и IgM в антителах против окисленных ЛНП и выявлено, что тяжесть многососудистого поражения была обратно пропорциональна с уровнем IgM в антителах против окисленных ЛНП.

Таким образом, в настоящее время есть основания

рассматривать уровень ЛНП-содержащих ЦИК как новый независимый фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний, но патогенетическая значимость этого фактора в атерогенезе требует углубленной оценки.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Аутопсийный материал

Грудную аорту человека извлекали через 1.5—3 ч после внезапной смерти у 7 мужчин в возрасте 30—60 лет. Сосуды вскрывали продольно и промывали изотоническим фосфатным буферным раствором (ИФБ). Внешне непораженные участки и участки с атеросклеротическими изменениями обнаруживали макроскопически согласно классификации Совета по атеросклерозу Американской ассоциации сердца (Velican C, 1978). Макроскопически непораженные участки имели гладкую поверхность просвета. Микроскопически они классифицировались как интимальное утолщение с двумя структурированными субслоями: протеогликановым слоем и мышечно-эластическим слоем. После макроскопической идентификации участки образцов размером $5 \times 10 \text{ мм}^2$ вырезали перпендикулярно длинной оси сосуда. Нефиксированные образцы погружали в ОСТ compound (Miles Inc., Elkhart, IN, США), замораживали в жидком азоте и готовили криостатные срезы толщиной 5 мкм.

2.2 Гистохимическое выявление липидов

Для гистохимического выявления липидов масляным красным О срезы фиксировали 4%-ным формальдегидом в течение 4 мин, а затем окрашивали (Pearse, 1969).

2.3 Исследование посредством трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ)

Из различных зон каждого исследуемого тканевого образца сосудов вырезали как правило по 4-5 1 мм^3 кусочков, которые фиксировали в 1- 2,5% глутаровом альдегиде, на фосфатном буфере (РН 7,2). Затем тканевые образцы постфиксировали в 1% OsO_4 , как правило, на том же буфере, проводили через спирты возрастающей

концентрации, окись пропилена (или ацетон) и заливали в аралдит, Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме LKB-111. Ультратонкие срезы обрабатывали цитратом свинца и уранилацетатом, а затем изучали под электронным микроскопом Hitachi H7000.

2.4 Электронно-микроскопический гистохимический анализ.

Визуализацию нейтральных липидов выполняли, используя OsO_4 , (Guyton JR, 1988). Идентификацию неэтерифицированного холестерина проводили с использованием филипина по описанному протоколу (Kruth, 1984). В ряде опытов окрашивание филипином комбинировали с обработкой образцов OsO_4 для визуализации нейтральных липидов. Далее образцы заключали в аралдит согласно рутинному протоколу. Ультратонкие срезы изучали с помощью электронного микроскопа Hitachi H7000.

2.5 Хроматографическое определение липидов на криостатном срезе

Для хроматографического определения липидов на криостатном срезе интимальный слой отделяли от меди под бинокулярным контролем с помощью микродиссекционного пинцета. Фосфолипиды, триглицериды, холестерин и эфиры холестерина разделяли тонкослойной хроматографией на силикагеле с последующим количественным измерением (Mukhin et al., 1991).

2.6 Первичная культура субэндотелиальных клеток аорты человека

Выделение и культивирование клеток производили из грудного отдела аорт мужчин и женщин в возрасте 40-65 лет в течение 1.5-3 часов после внезапной смерти. Причиной смерти в подавляющем большинстве случаев была острая сердечно-сосудистая

недостаточность. Субэндотелиальные клетки выделяли из различных участков интимы аорты, различавшихся по степени атеросклеротического поражения, путем обработки коллагеназой и культивировали в соответствии с методом Орехова и соавторов (Orekhov A. N., 1987). Обработку аутопсийного материала проводили в стерильных условиях. После механического удаления адвентиции аорту рассекали вдоль и промывали в среде 199, содержащей по 100 ед/мл пенициллина и стрептомицина и 2,5 мкг/мл фунгизона. Из лоскута аорты вырезали участки, не пораженные атеросклерозом, а также участки, соответствующие жировой полосе или липофиброзной бляшке, в соответствии с классификацией Stary (693,694,696). Затем с помощью пинцетов интиму отделяли от меди, при этом разделение слоев происходило по внутренней пограничной эластической мембране (548). Полученный материал пинцетами разделяли на волокна. К измельченной интиме добавляли 0,15% раствор коллагеназы II типа (Worthington Diagnostic System, США) в среде 199, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Flow, Великобритания), 2 мМ L-глутамин, 100 ед/мл пенициллина, 100 ед/мл стрептомицина, 2,5 мкг/мл фунгизона (все реактивы Grand Island Biological Company - GIBCO, США) из расчета 10 мл раствора фермента на 1 г сырой ткани. Инкубацию интимы с коллагеназой проводили на водяной бане при 37°C с постоянным перемешиванием со скоростью 50 об/мин (Aquaterm, New Brunswick Scientific Company, США) до практически полного растворения ткани, что обычно занимало 2-3 часа. Эффективность растворения ткани оценивали визуально. Полученную суспензию клеток фильтровали через стерильную нейлоновую сетку и центрифугировали при 4°C в течение 20 мин при 1800 g на низкоскоростной центрифуге (Beckman TJ-6, Beckman Division, США). Осажденные клетки промывали в 10 мл ростовой среды 199, содержащей антибиотика и 10% эмбриональную

телячью сыворотку, и повторно центрифугировали при тех же условиях. Осадок ресуспендировали в 10 мл ростовой среды и производили подсчет полученного количества клеток в счетной камере. Клетки рассаживали в пластиковый стерильный 96-гнездный микротест для тканевых культур (Nunclon, Дания) из расчета 2-4x10⁴ клеток на 1 см² культуральной поверхности. Клетки культивировали при 37°C в насыщенной водяными парами атмосфере, содержащей 95% воздуха и 5% углекислого газа в увлажняемом CO₂-инкубаторе (Forma Scientific, США). Смену среды проводили через день. Для экспериментов использовали 7-10-дневную первичную культуру клеток. Такая культура представляет собой смешанную клеточную популяцию, состоящую преимущественно из типичных и модифицированных гладкомышечных клеток (13,14,548). Клетки, полученные из непораженных и атеросклеротических участков интимы аорты человека, культивировали отдельно и использовали в экспериментах различных типов, что позволяло в дальнейшем использовать две клеточных модели, различающихся по своим свойствам. Первичную культуру клеток, выделенных из непораженных атеросклерозом участков интимы аорты, использовали для воспроизведения процессов атерогенеза на клеточном уровне и оценки антиатерогенных свойств исследуемых веществ. Антиатерогенным действием называли эффекты, препятствующие основным проявлениям атерогенеза на клеточном уровне, и, прежде всего, накоплению внутриклеточного холестерина. Первичную культуру клеток, выделенных из пораженных атеросклерозом участков интимы аорты, использовали для оценки антиатеросклеротических свойств исследуемых веществ. Антиатеросклеротическим действием называли эффекты, проявляющиеся в уменьшении содержания внутриклеточного холестерина по сравнению с исходным уровнем.

2.7 Культура моноцитов-макрофагов крови человека

Моноциты крови человека выделяли из крови здоровых добровольцев и культивировали до их созревания в макрофаги. Из локтевой вены здорового донора утром натощак брали 50 мл крови в стерильную пластиковую пробирку объемом 50 мл, содержащую 5 мл стерильного 3,8% цитрата натрия в 0,15 М изотоническом фосфатном буфере (ФИБ) (рН=7,35). Кровь центрифугировали в течение 20 мин при 1800 g на центрифуге Beckman TJ-6. Плазму крови удаляли, а клеточный осадок, содержащий форменные элементы крови, доводили до первоначального объема стерильным ФИБ. В стерильную пластиковую пробирку вносили фиколл (Flow Laboratories, США) из расчета 0,5 мл на 1 мл полученной суспензии форменных элементов крови. На фиколл наслаивали суспензию форменных элементов крови и центрифугировали в течение 30 мин. при 1800 g. В стерильных условиях пипеткой с границы раздела плотности отбирали фракцию лейкоцитов. Полученные клетки ресуспендировали в 1 мл стерильного ИФБ, доводили стерильным ИФБ до 50 мл и центрифугировали в течение 15 мин при 1800 g. Последнюю процедуру отмывки клеток проводили трижды. Затем осадок лейкоцитов ресуспендировали в 1 мл среды 199 (GIBCO Europe, UK), содержащей 2 мМ L-глутамина, 100 Ед/мл пенициллина, 2,5 мкг/мл фунгизона и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Serva, USA). Количество полученных клеток подсчитывали под микроскопом Amplival (Carl Zeiss, Германия) в гемоцитометре. Клетки рассаживали в стерильные 48-луночные планшеты для клеточных культур (Nunc, Denmark) с плотностью 105 клеток на 1 см² культуральной поверхности. Клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе (5% CO₂ и 95% атмосферного воздуха) при 100% влажности и 37°C в

течение 1 часа, после чего неприкрепившиеся клетки (грагулоциты) удаляли путем трехкратного промывания средой 199. К прикрепившимся клеткам (агранулоцитам) добавляли по 250 мкл среды 199, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, антибиотики (преднизолон, стрептомицин и фунгизон), а также глютамин. Полученную чистую культуру моноцитов культивировали в CO₂-инкубаторе (5% CO₂ и 95% атмосферного воздуха) при 100% влажности и 37°C в течение 14 суток до превращения их в макрофаги (784). Смену инкубационной среды проводили каждые 48 часов. В экспериментах использовали культуру на 14-й день культивирования. Полученную таким образом культуру моноцитов-макрофагов крови человека использовали в клинических исследованиях при серийных измерениях атерогенных свойств сыворотки крови (ее способности вызывать накопление внутриклеточного холестерина).

2.8 Получение сыворотки крови

Кровь из локтевой вены в количестве 5-7 мл забирали стерильным одноразовым пластиковым шприцом в сухую пластиковую пробирку с завинчивающейся крышкой объемом 15 мл. Пробирку с кровью выдерживали при комнатной температуре в течение 1 часа для образования сгустка, затем в холодильнике при +4°C в течение 1 часа для ретракции сгустка. Сгусток отделяли стеклянной палочкой от стенок пробирки. Пробирку центрифугировали в настольной центрифуге Beckman TJ-6 при 1800 g в течение 15 мин. Полученную сыворотку крови (без примеси эритроцитов) разливали в пластиковые пробирки типа «Эппендорф» по 1 мл. Образцы сыворотки крови хранили в замороженном

состоянии (при -18°C) до проведения измерения атерогенности и других биохимических параметров.

2.9 Оценка антиатерогенного эффекта в модели *in vitro*

Накопление внутриклеточного холестерина в первичной культуре субэндотелиальных клеток из непораженной интимы аорты человека индуцировали с помощью атерогенной сыворотки крови, как описано выше. Одновременно с атерогенной сывороткой крови человека в инкубационную среду добавляли исследуемое вещество в различных концентрациях. Обычно использовали логарифмический диапазон концентраций исследуемого вещества. Инкубацию, экстракцию липидов из клеток, определение клеточного белка и расчет атерогенного эффекта проводили, как описано выше. Базовый атерогенный эффект сыворотки крови рассчитывали как разницу между содержанием внутриклеточного холестерина в контроле и в клетках, инкубированных в присутствии атерогенной сыворотки без добавления исследуемого вещества, и принимали за 100%. Антиатерогенный эффект исследуемых веществ определяли как их способность статистически достоверно препятствовать накоплению внутриклеточного холестерина, индуцированному атерогенной сывороткой крови.

2.10 Определение пролиферативной активности

Клетки, выделенные из нормальных или пораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека, инкубировали в течение 24 ч в присутствии 10 мКи/мл [^3H]-тимидина. По окончании инкубации липиды из клеток экстрагировали, как описано выше, а фиксированные на пластике клетки растворяли в 50 мкл 0,2 н. NaOH при комнатной температуре в течение 12-16 часов. После растворения

радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике 1215 Rackbeta II (LKB, Швеция).

2.11 Определение синтеза клеточного белка

Клетки, выделенные из нормальных или пораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека, инкубировали в течение 24 ч в присутствии 10 мкКи/мл [^{14}C]-лейцина. По окончании инкубации липиды из клеток экстрагировали, как описано выше, а фиксированные на пластике клетки растворяли в 50 мкл 0,2 н. NaOH при комнатной температуре в течение 12-16 часов. После растворения радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике 1215 Rackbeta II (LKB, Швеция).

2.12 Определение синтеза коллагена

Клетки, выделенные из нормальных или пораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека, инкубировали в течение 24 ч в присутствии 5 мкКи/мл [3H]-пролина. По окончании инкубации включение меченого пролина в обработанную коллагеназой фракцию культуральной среды определяли по методу Peterkofsky и Diegelmann (571). Из культуры отбирали 500 мкл среды и переносили в стеклянные пробирки. Клетки промывали 2 раза по 250 мкл ФИБ и смывы переносили в те же пробирки. Пробы нагревали в течение 15 мин при 80°C для инактивации протеиназ. После охлаждения до +4°C в пробы добавляли 1 мл 20% ледяной трихлоруксусной кислоты (ТХУ), содержащей 2 мМ пролина. Спустя 10 мин пробы центрифугировали (10 мин, 3500 g). Супернатант отбрасывали, а осадок промывали трижды 1 мл 5% ТХУ, содержащей

1 мМ пролина. Промытый осадок растворяли в 0,4 мл 0,1 N NaOH, разделяли на алиquotы по 200 мкл и нейтрализовали равным объемом 0,08 N HCl. К одной из алиquot добавляли 80 мкл 60 mM HEPES, содержащего 0,2 мМ фенилметилсульфонилфторида, 0,25 мМ CaCl₂, 1,25 мМ N-этиленамида, и 20 мкл раствора коллагеназы (1 мг/мл) (Worthington Diagnostic System, США). К другой алиquotе, служившей бланком, добавляли те же вещества за исключением коллагеназы. Пробы инкубировали 4 часа при 37°C. Инкубацию останавливали добавлением 0,5 мл 10% ТХУ, содержащей 0,5% таниновой кислоты. После центрифугирования в течение 10 мин при 1800 g определяли радиоактивность супернатанта на сцинтилляционном счетчике 1215 Rackbeta II (ЛКВ, Швеция). Синтез коллагена определяли по формуле $2 * ([dpm]_{образца} - [dpm]_{бланка}) / (\text{клеточный белок, мкг})$.

2.13 Изучение внутриклеточного метаболизма эфиров холестерина

Клетки, выделенные из нормальных или пораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека, инкубировали в течение 24 ч в присутствии ЛНП, меченых [³H]-холестериллинолеатом. После инкубации липиды из клеток экстрагировали по методу Nara и Radin, как описано выше (256), а из культуральной среды – по методу Bligh и Dyer смесью хлороформ – метанол в объемном соотношении 1:2 (80). Нейтральные липиды хроматографировали на силикагеле в системе n-гексан – диэтиловый эфир – уксусная кислота в объемном соотношении 75:23:2. Сканирование хроматограммы проводили при длине волны 200 нм на сканнере Shimadzu CS-930 (Shimadzu Corporation, Япония). Участки силикагеля, соответствующие свободному холестерину и эфирам

холестерина соскребали и измеряли радиоактивность на сцинтилляционном счетчике 1215 Rackbeta II (ЛКВ, Швеция).

2.14 Изучение внутриклеточного синтеза липидов

Клетки, выделенные из нормальных или пораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека, инкубировали в течение 24 ч в присутствии 10 мкКи/мл меченого [¹⁴C]-олеата (225). После инкубации липиды из клеток экстрагировали по методу Nara и Radin, как описано выше (256). Хроматографию и денситометрию липидов проводили, как описано выше. Участки силикагеля, соответствующие фосфолипидам, триглицеридам и эфирам холестерина соскребали и измеряли радиоактивность на сцинтилляционном счетчике 1215 Rackbeta II (ЛКВ, Швеция).

2.15 Выделение и фракционирование липопротеидов низкой плотности.

2.15.1 Доноры.

В работе была использована плазма и сыворотка крови мужчин и женщин в возрасте от 30 до 60 лет, больных ишемической болезнью сердца (ИБС), и здоровых лиц (25-55 лет), у которых отсутствовали признаки ИБС в анамнезе и при медицинском обследовании. Содержание холестерина и триглицеридов в плазме крови не превышало 200 мг/дл и 150 мг/дл, соответственно.

2.15.2 Получение плазмы и сыворотки крови

Для получения плазмы кровь забирали утром натощак в пробирку с цитратом натрия (конечная концентрация - 0,38%). Препараты центрифугировали 10 мин при 800xg (2500 об/мин) на центрифуге TJ-6 (Beckman Instruments, Inc., США). Для

предотвращения окисления ЛНП в ходе выделения к полученной плазме добавляли 10 мМ ионола.

Для получения сыворотки кровь забирали из локтевой вены в пластиковую пробирку и инкубировали 1 час при 37°C. Образовавшийся сгусток отделяли от стенок пробирки, после чего сыворотку центрифугировали в течении 15 мин при 800xg (2500 об/мин).

2.15.3 Выделение суммарной фракции липопroteидов низкой плотности из плазмы крови

К плазме добавляли бромид натрия (NaBr) из расчета 0,5 г соли на 1 мл, разливали по 5 мл в 16x76-мм поликарбонoвые центрифужные пробирки (Beckman Instruments, Palo Alto, CA) и насливали сверху по 5 мл раствора NaBr с плотностью 1,019 г/мл. Пробы центрифугировали в течение 2 часов при 41000 об./мин на центрифуге L8-55 (ротор 65Ti; Beckman Instruments, Inc., США). После ультрацентрифугирования отбирали зону, содержащую ЛНП. В образцы ЛНП снова добавляли NaBr из расчета 0,3 г соли на 1 мл пробы, повторно центрифугировали в тех же условиях и отбирали зону ЛНП. Полученные липопroteиды диализовали при 4°C в течение ночи против 4000 объемов ИФБ (изотонический фосфатный буфер) pH 7,4 и после этого стерилизовали фильтрацией (диаметр пор 0,45 мкм).

2.15.4 Определение концентрации белка в препаратах ЛНП

Концентрацию белка в препаратах липопroteидов определяли по методу Lowry et al. (1956) с модификациями. К пробе объемом 5-20 мкл добавляли 200 мкл свежеприготовленного 0,2 N раствора NaOH, содержащего 0,01% тартрата калия-натрия, 0,005% сульфата меди и 0,02% карбоната натрия, 10 мкл 1% раствора додецилсульфата натрия

(Boehringer Mannheim, ФРГ), затем 20 мкл 1 N реактива Фолина (Sigma Chemical Company, США), перемешивали и выдерживали при комнатной температуре в течение 30 минут, после чего измеряли оптическую плотность проб на спектрофотометре "Multiscan MCC" при длине волны 690 нм и рассчитывали концентрацию белка в препарате. В качестве стандарта использовали раствор БСА.

2.15.5 Получение фракций нативных и циркулирующих множественно модифицированных липопротеидов низкой плотности

ЛНП разделяли на нативные и циркулирующие модифицированные методом лектин-хроматографии на *Ricinus communis* агглютинин (RCA120) агарозе, как описано ранее (Tertov et al., 1990). Для разделения липопротеидов колонки, содержащие 1 мл RCA –120 -сефарозы (Sigma-Aldrich, США), уравнивали 10 мл ИФБ, рН 7,2. Наносили 0,5-1 мл препарата липопротеидов, содержащего от 0,2 до 2 мг белка. Колонку промывали тремя миллилитрами ИФБ. При этом на выходе получали фракцию липопротеидов с нормальным содержанием сиаловой кислоты – нативные липопротеиды низкой плотности. Для удаления не специфически связавшихся с сорбентом липопротеидов колонку промывали десятью миллилитрами ИФБ. Фракцию липопротеидов с низким содержанием сиаловой кислоты – циркулирующие множественно модифицированные элюировали тремя миллилитрами 50 мМ галактозы.

К полученным липопротеидам добавляли бромид натрия из расчета 0,3 г на 1 мл образца и концентрировали методом ультрацентрифугирования, затем диализовали против 4000 объемов ИФБ, как описано выше.

2.16 Получение модифицированных ЛНП

2.16.1 Модификация ЛНП протеолитическими ферментами

Нативные ЛНП подвергали протеолизу. Для этого их инкубировали в присутствии трипсина (1 Ед/мл) (Serva, Германия) или химотрипсина (1 Ед/мл и 0,5 Ед/мл) (Sigma, США) в течение 3,5 часов при 37°C в среде, содержащей изотонический фосфатный буфер (ИФБ; GIBCO, Paisley, Великобритания: KCl 0,2 г/л, K₂HPO₄ 0,2 г/л, NaCl 8 г/л, Na₂HPO₄ 1,15 г/л, pH 7,2). Концентрации ферментов указаны в подписях к рисункам. Далее к ЛНП, подвергнутым протеолизу, добавляли бромид натрия из расчета 0,3 г на 1 мл образца и отделяли от фермента рецентрифугированием при 41000 об/мин (ротатор Ti 50, Beckman, США) в течение 2 часов. Полученные ЛНП диализовали против ИФБ в течение 12 часов и использовали для иммуноферментного анализа.

2.16.2 Модификация ЛНП миелопероксидазой (МПО)

Нативные ЛНП обрабатывали МПО из нейтрофилов человека (Planta GmbH, Вена, Австрия). Для этого их инкубировали с ферментом (0,5 мкг/мл) в присутствии пероксида водорода (40 мкМ) в течение 3,5 часов при 37°C в среде, содержащей ИФБ. Далее к ЛНП, модифицированным МПО, добавляли бромид натрия из расчета 0,3 г на 1 мл образца и отделяли от фермента рецентрифугированием при 41000 об/мин (ротатор Ti 50, Beckman, США) в течение 2 часов. Полученные ЛНП диализовали против ИФБ в течение 12 часов и использовали для иммуноферментного анализа.

2.16.3 Модификация ЛНП липолитическими ферментами

Нативные ЛНП подвергали липолизитической модификации. Для этого 0,2 мг/мл (по белку) нативных ЛНП инкубировали с фосфолипазой А₂ (Boehringer Mannheim, Германия) или фосфолипазой С (Sigma, США) в присутствии 5 мкМ СаСl₂ в течение 3,5 часов при 37°С в среде, содержащей ИФБ. В экспериментах использовались следующие концентрации ферментов фосфолипазы А₂: 0,125 мг/мл и 0,06 мг/мл; фосфолипазы С - 1,5 Ед/мл и 0,83 Ед/мл.

Далее к ЛНП, подвергнутым липолизу, добавляли бромид натрия из расчета 0,3 г на 1 мл образца отделяли от фермента рецентрифугированием при 41000 об/мин (ротор Ti 50, Beckman, США) в течение 2 часов. Полученные ЛНП диализовали против ИФБ в течение 12 часов и использовали для иммуноферментного анализа.

2.16.4 Модификация ЛНП дегликозилирующими ферментами – нейраминидазой

Дегликозилирующая модификация ЛНП осуществлялась путем инкубации нативных ЛНП с ферментом нейраминидазой в среде, содержащей ИФБ. Далее к модифицированным ЛНП добавляли бромид натрия из расчета 0,3 г на 1 мл образца отделяли от фермента рецентрифугированием при 41000 об/мин (ротор Ti 50, Beckman, США) в течение 2 часов. Полученные ЛНП диализовали против ИФБ в течение 12 часов и использовали для иммуноферментного анализа.

2.16.5 Модификация ЛНП низкомолекулярными альдегидами эндогенного происхождения

ЛНП обрабатывали свежеприготовленным МДА, который получали из 1,1,3,3-тетраэтоксипропана путем кислотного гидролиза (Requena J. et al., 1997). Липопропротеиды (100 мкг апоВ) инкубировали с 1 мкмоль МДА в темноте при 37°C и рН 6.5 (Fogelman A. et al., 1980).

Другие альдегиды: глиоксаль, метилглиоксаль использовали для модификации ЛНП в количествах, эквивалентных МДА.

От избытка альдегидов, после модификации ЛНП, избавлялись при помощи диализа против 2000 объемов ИФБ, рН=7.2 в течение 18 часов при +4°C.

2.17 Анализ модифицированных ЛНП

2.17.1 Экстракция липидов из ЛНП

Суммарные липиды ЛНП экстрагировали по методу Bligh and Dyer, 1967. Для этого к 25 мкл ЛНП, содержащим 20-35 мкг белка добавляли 450 мкл смеси хлороформ-метанол 1:2 (объем-объем), встряхивали и инкубировали при комнатной температуре 2 часа в закрытых пробирках. Далее смесь центрифугировали (4500 об/мин, 15 мин) и супернатант переносили в другую пробирку. Осадок ресуспендировали в 120 мкл дистиллированной воды и повторяли экстракцию хлороформ-метанолом, описанную выше. Супернатанты объединяли и добавляли 600 мкл смеси хлороформа и воды в объемном соотношении 1:1, интенсивно встряхивали и центрифугировали 10 минут при 4500 об/мин. Затем тонкой пастеровской пипеткой отбирали хлороформную фазу, упаривали ее до сухого остатка, который растворяли в 50 мкл смеси хлороформ-метанола 2:1 (объем-объем).

2.17.2 Анализ липидов ЛНП при помощи тонкослойной хроматографии

Изменения липидного состава ферментативно модифицированных липпротеидов оценивались при помощи тонкослойной хроматографии. На пластины для тонкослойной хроматографии (Merck, Германия) наносили полученный экстракт липидов ЛНП, а также стандарты липидов. Нейтральные липиды отделяли при помощи хроматографии в системе гексан-ацетон 1:3 (объем-объем). Состав фосфолипидов анализировали при помощи тонкослойной хроматографии в системе хлороформ-метанол-уксусная кислота-вода 25:15:4:2 (объем-объем-объем-объем). Для визуализации пиков фосфолипидов пластину погружали в раствор $\text{CuSO}_4(3\%)/\text{H}_3\text{PO}_4(8\%)$ и затем осуществляли нагревание пластины до 150°C . Далее пластины сканировались при помощи денситометра Shimadzu CS-930 (Shimadzu, Япония) при длине волны 200 нм.

2.17.3 Электрофорез в полиакриламидном геле

Анализ фрагментации апоВ белка ферментативно модифицированных ЛНП проводили при помощи форе́за в полиакриламидном геле (ПААГ), используя буферную систему Laemmly (Laemmly et al 1970). Гели с концентрацией полиакриламида 3 и 7% готовили на основе исходного 30% акриламида и 0,8% N,N-бис-акриламида. Концентрирующий гель – 4% полиакриламид в 0,125 М Трис-НСl, рН 6,8, 0,1% додецилсульфат натрия. Разделяющий гель – 7% полиакриламид в 0,375 М Трис-НСl, рН 8,8, 0,1 % додецилсульфат натрия.

Электрофоретический буфер – 0,05 М Трис, 0,384 М глицин, рН 8,3, Исследуемые образцы (5-10 мкг белка) растворяли в 0,01М Трис-НСl, рН 8,0, 0,001 М ЭДТА, 1% додецилсульфат натрия и

нагревали 5 минут при 100°C. При проведении электрофореза поддерживалось напряжение 60 вольт, после вхождения белков в разделяющий гель напряжение поднимали до 120 вольт. Использовали прибор для вертикального электрофореза с пластинами размером 10*10 см, толщина геля 1 мм. Окрашивание геля производили 0,1 25% раствором Coomassie Blue R-250 (Sigma, США).

2.17.4 Электрофорез в агарозном геле

Суммарный поверхностный заряд частиц ЛНП определяли с помощью электрофореза в агарозном геле (Schalkwijk C. et al., 1998). Агарозный гель – 1% агароза в 40 мМ вероналовом буфере, pH 8,5 (40 мМ 5,5-диэтибарбитуровая кислота, 4 мМ ЭДТА). Буфер для электрофореза – 10 мМ Трис-глицин, pH 8,0. Исследуемые образцы белка (5 мкг) растворяли в 10 мМ Трис-глициновом буфере, pH 8,0, содержащем 10% глицерин. Электрофорез проводили в течение 45 минут при напряжении 90 В. Для анализа ЛНП использовали 1 % агарозный гель. Гель фиксировали 100 % метанолом (30 сек), окрашивали при помощи красителя Fat Red 7B. От избытка красителя избавлялись 70 % метанолом. Электрофоретическую подвижность модифицированных ЛНП сравнивали с нативными ЛНП.

2.17.5 Определение тиобарбитуровая кислота (ТБК)-реактивных продуктов

К образцу ЛНП концентрацией 0,4 мг/мл по белку объемом 0,5 мл добавляли 25 мкл 20 мМ ионола (для предотвращения окисления во время теста), перемешивали, добавляли 1,5 мл 1,5% H₃PO₄ и 0,5 мл 0,5% ТБК, перемешивали, неплотно прикрывали пробирки пробками, выдерживали при 100°C в течение 45 минут, охлаждали до комнатной температуры, добавляли по 2 мл *n*-бутанола, тщательно перемешивали и центрифугировали 20 минут при 3000 об./мин для достижения

расслоения фаз. Далее отбирали верхнюю бутанольную фазу и определяли спектр ее поглощения в области от 515 нм до 550 нм относительно бутанола. Рассчитывали оптическую плотность при 532 нм относительно двух базовых длин волн - 515 нм и 550 нм.

$$D_{532/515/550} = D_{532} - 0,5 * (D_{515} + D_{550})$$

Содержание ТБК-реактивных продуктов выражали через эквивалентное количество МДА, считая мольный коэффициент экстинкции МДА при 532 нм равным $1,56 * 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$:

$$(\text{МДА}), \text{ мкМ} = 6,41 * D_{532/515/550} * (2000 / (\text{объем образца в мл}))$$

$(\text{МДА}), \text{ нмоль/мг белка} = ((\text{МДА}), \text{ мкМ}) / (\text{белок}, \text{ мг/мл})$
(Uchiyama et al 1978)

2.17.6 Определение содержания сиаловой кислоты в ЛНП

Использовались по 4 аликвоты из каждого препарата (2 – опытные, 2- контрольные для определения поправки на содержание ТБК-реактивных продуктов). К образцу, содержащему 50-100 мкг ЛНП (по белку), добавляли равный объем трихлоруксусной кислоты, после чего перемешивали и инкубировали 20 минут при 4°C . Пробы центрифугировали при 4500 об./мин в течение 10 минут; к осадку добавляли 200 мкл 0,1N H_2SO_4 и перемешивали. Образцы гидролизovali при 80°C в течение 1 часа. После охлаждения к опытным образцам добавляли 10 мкл 0,2M NaIO_4 в 9 M H_3PO_4 , к контрольным – 10 мкл 9M H_3PO_4 ; образцы тщательно перемешивали и инкубировали 20 минут при комнатной температуре. Далее к опытным образцам добавляли 100 мкл 10% NaAsO_2 в 0,5M Na_2SO_4 и 0,1N H_2SO_4 , к контрольным 100 мкл 0,5M Na_2SO_4 ; образцы тщательно перемешивали до исчезновения желто-коричневого окрашивания. Сразу после этого к пробам добавляли 250 мкл 0,6% раствор

тиобарбитуровой кислоты в 0,5М Na₂SO₄, перемешивали. Далее образцы инкубировали на кипящей водяной бане в течение 15 минут. В охлажденные пробы добавляли 400 мкл трет-бутанола. Образцы интенсивно перемешивали на вортексе в течение 5 секунд дважды с интервалом 5 минут. Пробы центрифугировали при 4500 об./мин в течение 10 минут для разделения фаз. Из органической фазы отбирали 250 мкл и переносили в 96-луночную планшету и измеряли оптическую плотность при 540 нм (Multiskan Bichromatic (Labsystems OY, Helsinki, Финляндия)). Среднее значение, полученное в контрольных пробах, характеризует содержание ТБК-реактивных продуктов. Его вычитали из среднего значения, полученного в опытных образцах. В качестве стандарта использовался раствор водный сиаловой кислоты 1мг/мл.

2.17.7 Изучение особенностей структуры модифицированных ЛНП методом твердофазного иммуноферментного анализа

Моноклональные антитела мыши к апоВ-100 человека, полученные методом гибридизации, и их характеристики были любезно предоставлены лабораторией клеточной инженерии ИЭК РКНПК (зав. лаб. Т.Н. Власик) (Янушевская с соавт., 1999). Всего в работе было использовано 7 антител, продуцируемых клонами: 2Е3, 2G1, 7С2, 3С8, 5F8, 4С11 и 3G4. Основные характеристики использованных антител приведены в таблице 3.

Для определения связывания ЛНП с моноклональными антителами использовали 96-луночную плашку (Nunc, Roskilde, Дания). В лунки вносили 100 мкл поликлональных антител козы к апоВ-100 человека (ИМТЕК, Россия) в изотоническом фосфатном буфере (ИФБ; GIBCO, Paisley, Великобритания; KCl 0,2 г/л, КН₂РО₄ 0,2 г/л, NaCl 8 г/л, Na₂НРО₄ 1,15 г/л, рН 7,2) в концентрации 1 мкг/мл

и инкубировали в течение 24 ч при 4°C. После каждой инкубации лунки промывали ИФБ, содержащим 0,2% БСА. Далее в лунки вносили 100 мкл ИФБ, содержащего 2% БСА и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. В лунки добавляли ЛНП и инкубировали 2 ч при комнатной температуре. Диапазоны концентраций ЛНП были подобраны для каждого моноклонального антитела в предварительных экспериментах. Затем в лунки добавляли по 100 мкл моноклональных антител мыши к апоВ-100 человека и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Оптимальная концентрация моноклональных антител была подобрана в предварительных экспериментах и составляла то 10 до 50 мкг/мл. В лунки вносили по 100 мкл меченых пероксидазой поликлональных антител козы к иммуноглобулинам мыши (1 мкг/мл) и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Последующее проявление проводили добавлением 0,1 М цитратного буфера, pH 4,5, содержащего 0,04% ортофенилендиамина и 0,003% H₂O₂. Инкубировали 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 20 мкл 50% H₂SO₄. Оптическую плотность измеряли при длине волны 492 нм на многоканальном спектрофотометре Multiskan Bichromatic (Labsystems OY, Helsinki, Финляндия).

Для всех изученных моноклональных антител проводились предварительные эксперименты с целью исключения возможности их неспецифического связывания с поликлональными антителами козы к человеческому апоВ-100.

Таблица 3 - Характеристика использованных в работе моноклональных антител.

Антитело	Антиген	Эпитопная специфичность антител
5F8	Апо-В-100	1-1297 аминокислотные остатки апо-В-100
4C11	Апо-В-100	2377-2658 аминокислотные остатки апо-В-100
2E3	Апо-В-100	3728-4306 аминокислотные остатки апо-В-100
3C8	Апо-В-100	-
2G1	Апо-В-100, модифицированный МДА	-
7C2	Апо-В-100, модифицированный МДА	-
3G4	Апо-В-100, модифицированный МДА	-

2.18 Определение степени ассоциации ЛНП и размера ассоциатов

2.18.1 Определение относительного размера ЛНП (метод флуктуации светопропускания).

Степень ассоциации ЛНП оценивали методом регистрации флуктуации светопропускания луча лазерного света длиной волны 780 нм на двухканальном агрегометре (модель LA220, НПФ БИОЛА, Россия).

Метод основан на том, что относительная дисперсия колебаний оптической плотности, вызванных случайными изменениями в количестве частиц, попадающих в оптический путь лазерного луча,

отражает отклонения от их среднего размера, то есть степень их ассоциации. Увеличение флуктуации светопропускания свидетельствует об увеличении взвешенного среднего оптического радиуса частиц. Это дает возможность оценить изменения среднего размера частиц ЛНП в условных единицах. Данный метод дает качественно схожие результаты с результатами, полученными методом квази-упругого светорассеяния, позволяющего непосредственно определять размер частиц ЛНП

Для изучения ассоциационной способности ЛНП их, как правило, предварительно освобождали от имеющихся ассоциатов путем фильтрования через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и инкубировали при 37°C в изотоническом фосфатном буфере (ИФБ; GIBCO, Paisley, Великобритания; KCl 0,2 г/л, KH_2PO_4 0,2 г/л, NaCl 8 г/л, Na_2HPO_4 1,15 г/л, pH 7,2), содержащем 1 мг/мл ЭДТА.

2.18.2 Определение размера ассоциатов ЛНП

Размеры частиц ЛНП и ассоциатов липопroteидов определяли методом квазиупругого лазерного рассеивания на приборе Autosizer 2 (Malvern Instrument, Великобритания).

2.18.3 Основные характеристики использованных в работе полаксамеров

В работе использованы полаксамеры P85, L61, L64, L81 и F68 (BASF, США), любезно предоставленные профессором Ярославовым А. А. (Химический факультет МГУ, Москва, Россия). Основные характеристики полаксамеров приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Основные характеристики использованных в работе полаксамеров

Полаксамер	ММ	Состав	ГЛБ*	ККМ при 37°С, %	ККМ при 37°С, мМ
L 61	1900	ЭО ₂ ПО ₃₀ ЭО ₂	3	0,002%	0,01
L 64	3000	ЭО ₁₃ ПО ₃₀ ЭО ₁₃	15	0.03 %	0,1
L 81	2750	ЭО ₃ ПО ₄₀ ЭО ₃	2	0,0007%	0,0026
P85	4500	ЭО ₂₆ ПО ₄₀ ЭО ₂₆	16	0.02 %	0.044
F68	8400	ЭО ₈₀ ПО ₂₇ ЭО ₈₀	29	0,4%	0.044

2.19 Ультразвуковое сканирование сосудов

Для оценки состояния стенки сонных артерий использовали ультрасонографию высокого разрешения в В-режиме с использованием линейного сосудистого датчика с частотой 7,5 МГц. Протокол обследования включал сканирование левой и правой сонных артерий и области каротидного синуса с фокусировкой на задней стенке артерии в трех фиксированных проекциях – переднебоковой, боковой и заднебоковой (625). Обследование проводили в положении лежа после 15-минутного отдыха. Все измерения проводили последовательно в течение одной сессии. Процедуру сканирования записывали на видеомэгнитофон высокого разрешения стандарта супер-VHS PAL. Анализ записей проводил

сертифицированный оператор, не участвовавший в процессе рандомизации. Толщину интимо-медиального слоя (ИМС) измеряли с помощью компьютерной программы Prosound (R. Seltzer, USA). Измерения проводили на участке общей сонной артерии длиной 10 мм, противоположном началу каротидного синуса. Толщину ИМС задней стенки общей сонно артерии определяли как расстояние от ведущего края первой эхогенной зоны до ведущего края второй эхогенной зоны. Среднее значение трех измерений (в переднебоковой, боковой и заднебоковой проекциях) рассматривали как интегральный показатель толщины ИМС.

2.20 Статистическая обработка данных

Статистическую оценку достоверности различий проводили с использованием пакета SPSS версии 12.0 (SPSS Inc., США). Графическую обработку данных проводили с использованием пакета SigmaPlot версии 7.0 (SPSS Inc., США). Достоверными считали различия при 95% вероятности безошибочного прогноза. Характер распределения признака определяли с помощью F-теста и теста Колмогорова-Смирнова. После оценки вариабельности признака в отношении нормальности распределения для межгрупповых сравнений использовали тест Манна-Уитни или групповой t-тест, для оценки изменений показателей в динамике использовали тест Уилкоксона или парный t-тест. Для сравнения распределений номинальных показателей и категориальных величин использовали показатель хи-квадрат по Пирсону с поправкой по Йетсу. Для оценки связи клинико-биохимических показателей и их изменений использовали корреляционный анализ по Пирсону с поправкой Бонферрони и регрессионный анализ. В окончательном виде данные для непрерывных величин представляли в виде среднего арифметического значения с указанием стандартной ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

2.21 Морфологическая визуализация и анализ распределения липидов в атеросклеротических поражениях человека.

Согласно общепринятой парадигме появление избыточных липидов в интима артерий связано с изменением композиции и состава липопротеидов проникающих в интиму из плазмы крови. В первую очередь, в нашей работе мы провели морфологический анализ распределения липидов в интима артерий, используя методы электронномикроскопического анализа, а также световую и электронномикроскопическую гистохимию.

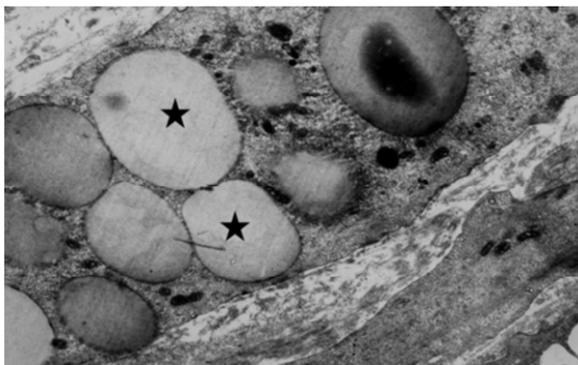


Рисунок 4 - Липидные включения (липидные капли, помечены звездочками) в интимальной клетке аорты. Электронная микроскопия. Масштабная линейка: 0.5 мкм.

Электронномикроскопический анализ артериальных тканевых образцов обнаружил присутствие клеток, содержащих в цитоплазме липидные включения. В непораженных атеросклерозом образцах интимы липидные включения («липидные капли») встречались достаточно редко, однако в атеросклеротических поражениях присутствие липидов интима являлось характерным явлением. В некоторых интимных клетках липидные включения были

многочисленными, что позволяло классифицировать такие клетки как пенные клетки (рис. 4).

В соответствии с данными световой микроскопии (с использованием для выявления липидов масляного красного О) (рис. 5), ультраструктурный анализ распределения липидов в интиме показал, что в прилюминальном субслое «липидные капли» располагаются как вне, так и внутри клеток, тогда как в примедиальном субслое липиды преобладают во внеклеточном матриксе, часто располагаясь там вдоль эластических волокон (рис 6).

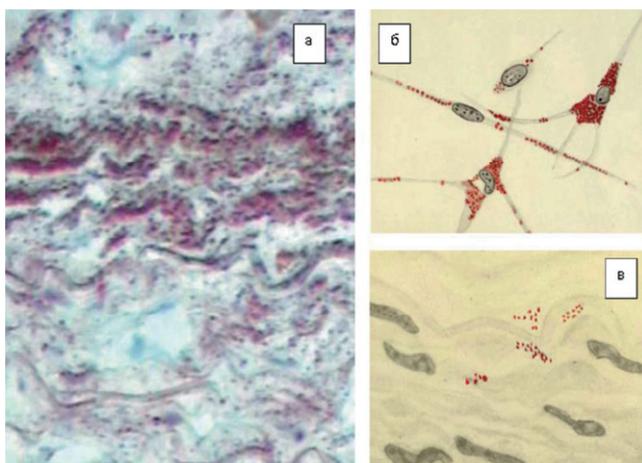


Рисунок 5 - Липиды в срезе интимы аорты, выявленные с помощью масляного красного О (а) и схемы, показывающие внутриклеточную локализацию липидов в интимных клетках (б) и внеклеточную локализацию липидов вдоль эластических волокон (в). Масштабная линейка: 100 мкм (а).

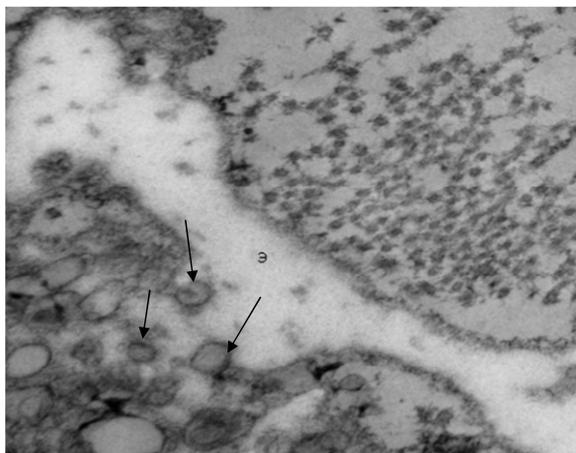


Рисунок 6 - Внеклеточные липиды (указаны *стрелками*), плотно прилежащие к эластическому волокну (э). Электронная микроскопия. κ - коллагеновые волокна; *масштабная линейка*: 0.3 мкм.

Электронномикроскопический гистохимический анализ обнаружил присутствие нейтральных липидов и незтерифицированного холестерина как в прилюминальном, так и в примедиальном субслое интимы. В отличие от прилюминального субслоя, где присутствие нейтральных липидов и незтерифицированного холестерина было зафиксировано во внеклеточном матриксе, отложение этих компонентов в примедиальном субслое ассоциировалось в основном с измененными эластическими волокнами. В примедиальном субслое 10—15 % эластических волокон имели признаки изменений в результате вакуолизации матрикса этих волокон.

Вакуолизация эластических волокон является, видимо, результатом образования безэластиновых полостей внутри относительно гомогенного эластинового матрикса волокон. Такие

полости в эластических волокнах наблюдались как в периферических, так и в центральных частях волокон. Полости в матрице эластических волокон часто соединялись.

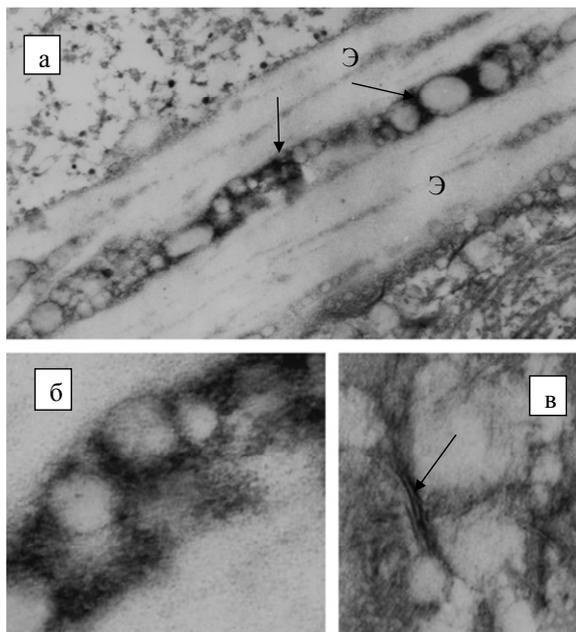


Рисунок 7 - Одновременная визуализация нейтральных липидов (по методу: Guyton, Klemp, 1988) и неэтерифицированного холестерина (с использованием филипина (по протоколу: Kruth, 1984), локализованных внутри поврежденного эластического волокна в интима аорты (а-в).

б – деталь рисунка, а; стрелки показывают зоны локализации нейтральных липидов (а) и на кристаллы неэтерифицированного холестерина (в), выявленного посредством реакции с филипином; э – эластин; масштабная линейка: 1 (а), 0.2 (б) и 0.1 (в) мкм.

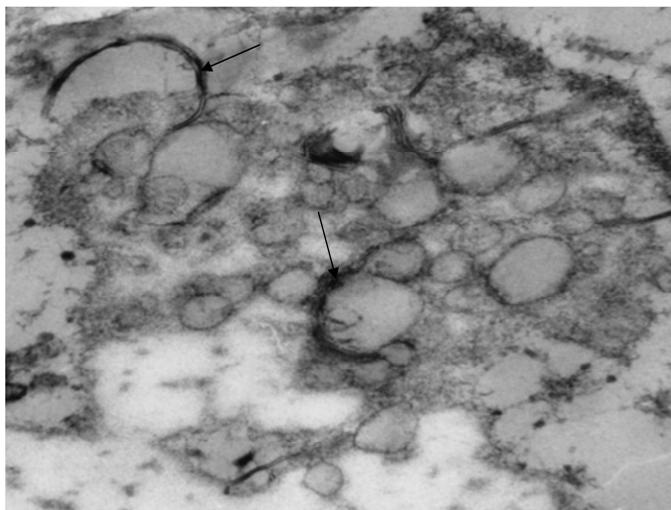


Рисунок 8 - Неэтерифицированный холестерин (указан *стрелками*), выявленный посредством использования филипина (по протоколу: Kruth, 1984), в межклеточном матриксе интимы аорты.

Масштабная линейка: 0.2 мкм.

Нейтральные липиды преимущественно были локализованы в зонах расположения таких полостей в эластичных волокнах (рис. 7, *а*, *б*). При гистохимическом окрашивании с использованием филипина, комплексы филипин-стерол, представляющие собой ламеллярные структуры с расстоянием между ламеллами 10—20 нм, наблюдались в ассоциации с разрушающимися эластическими волокнами (рис. 7, *в*). В примедиальном субслое комплексы филипин-стерол были обнаружены также во внеклеточном матриксе интимы, где они примыкали к внешней границе эластических волокон (рис. 8). Использование комбинации действия OsO_4 и гистохимического окрашивания филипином показало, что некоторые полости в эластических волокнах были заполнены нейтральными липидами и неэтерифицированным холестерином.

В работе мы также проверили, совпадают ли данные по определению количества разных классов липидов, определенных с помощью химического анализа после экстрагирования из криостатных зон интимы аорты и последующим хроматографическим разделением, с содержанием липидов, определенным гистохимически в последовательных срезах тех же образцов ткани. Морфометрический метод использовали для оценки количества липидов, наблюдаемых с помощью окрашивания масляным красным O, тогда как с помощью химического анализа идентифицировали триглицериды, холестерин, эфиры холестерина и фосфолипиды в одних и тех же локусах интимы.

Установили, что между общим количеством липидов, обнаруженных с помощью окрашивания, и количеством эфиров холестерина, свободным холестерином и фосфолипидами существует положительная корреляция ($r = 0.72—0.95$). Положительная корреляция существовала и между вне- и внутриклеточными липидами (окрашивание масляным красным O) и количеством свободного холестерина, эфиров холестерина и фосфолипидами ($r = 0.68—0.95$). Не обнаружили значимой корреляции между количеством триглицеридов, идентифицированных химическим способом, и количеством липидов, определенных морфометрически после окрашивания.

2.22 Оптимизация клеточной модели для оценки атерогенности ЛНП

Изучение накопления внутриклеточного холестерина проводили на двух моделях: субэндотелиальных клетках, выделенных из непораженной интимы аорты человека, и моноцитах-макрофагах, выделенных из крови человека.

Для решения вопроса об адекватности используемых в работе клеточных моделей было проведено иммуноцитохимическое типирование клеток и определение содержания внутриклеточных липидов. Иммуноцитохимическую идентификацию клеток в первичных культурах из непораженных участков интимы аорты человека с помощью антител против различных клеточных типов (гладкомышечных, макрофагов, перицитов) проводили на 7-й день культивирования.

Содержание гладкомышечных клеток культуры, полученные из непораженных атеросклерозом участков субэндотелиального слоя интимы, составляло 90 ± 7 . В культуре были выявлены клетки, положительно окрашенные антителами 3G5 против антигена о-сиалоганглиозида, свойственного перицитам. Морфологически эти клетки представляли собой крупные, хорошо распластанные клетки полигональной формы. Доля клеток, экспрессирующих этот антиген, достигала 50% (среднее значение $46 \pm 11\%$). Двойное иммуноцитохимическое окрашивание с помощью антител к 3G5 антигену и к гладкомышечному α -актину позволило установить, что часть 3G5-положительных клеток экспрессирует также и антиген гладкомышечных клеток. Также в культурах клеток был идентифицирован и другой антиген перицитов - 2A7. Доля таких клеток в культурах, полученных из нормальных участков интимы

аорты, составляла $24\pm 10\%$. Первичные культуры интимоцитов содержали также клетки, сходные с моноцитами периферической крови и положительно окрашиваемые антителами CD14 (антиген клеток моноцитарно-макрофагальной дифференцировки) и CDLC (общий антиген лейкоцитов). Соответственно, эти элементы были идентифицированы как гематогенные клетки. Их доля в культурах из нормальных участков интимы аорты составляла в среднем $4\pm 1\%$. Также в первичных культурах из нормальных участков интимы аорты человека были выявлены также клетки, экспрессирующие антиген макрофагов CD68, их содержание составляло $5\pm 1\%$. С помощью двойного иммуноцитохимического окрашивания было установлено, что часть клеток, содержащих CD68-положительные гранулы, экспрессируют также гладкомышечный α -актин.

Таким образом, используемые первичные культуры интимоцитов представляли собой смешанную популяцию клеток, состоящую из типичных гладкомышечных клеток, экспрессирующих α -актин и модифицированных гладкомышечных клеток, дополнительно экспрессирующих антигены перицитов, а также гематогенных клеток. Часть клеточных элементов одновременно экспрессировала макрофагальный антиген CD68 и гладкомышечный α -актин. В первичной культуре клеток, выделенных из непораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека, в среднем содержалось 75% гладкомышечных клеток, 15% клеток, одновременно экспрессирующих гладкомышечный α -актин и антиген макрофагов, 5% макрофагов, и 5% клеток не удалось идентифицировать с помощью иммуноцитохимических методов. Эти характеристики вполне соответствуют долевого содержанию гематогенных клеток в интима аорты человека, как было показано в многочисленных исследованиях *in situ* (Андреева Е.Р., 1999; Андреева

E.P., 1985; Andreeva E.R., 1992; Gown A.M., 1986; Katsuda S., 1992; Orekhov A.N., 1984; Tsukada T., 1986; Tsukada T., 1987)

Содержание липидов в первичных культурах клеток, выделенных из непораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека, было охарактеризовано следующим образом. В культуре из нормальных участков интимы аорты содержание свободного холестерина составляло 10 ± 3 мкг/мг клеточного белка, эфиров холестерина – 10 ± 4 мкг/мг, триглицеридов – 8 ± 3 мкг/мг, фосфолипидов – 85 ± 7 мкг/мг. Общее содержание липидов составляло от 80 до 130 мкг/мг клеточного белка, в среднем 115 ± 17 мкг/мг. Весовое содержание общего холестерина, триглицеридов и фосфолипидов составляло приблизительно 17%, 7% и 76%. Данные по содержанию липидов в культивируемых клетках хорошо сочетаются с результатами исследований липидного состава протеогликанового слоя интимы аорты человека в норме и при атеросклерозе (Orekhov A.N., 1985; Орехов А.Н., 1999; Андреева Е.Р., 1985).

Таким образом, используемая первичная культура клеток может считаться адекватной моделью для воспроизведения ключевых проявлений атеросклероза *in vitro*. Она имеет аналогичные иммуноцитохимические и биохимические показатели, что и исходная ткань, и сохраняет эти свойства в течение первых 1-2 недель культивирования. Источник получения клеток – протеогликановый (эластико-гиперпластический) слой интимы аорты человека, в свою очередь, является морфологическим субстратом для возникновения и прогрессирования атеросклероза.

Также было проведено дополнительное исследование возможности использования другой клеточной модели, а именно, первичной культуры моноцитов-макрофагов крови человека, для

оценки некоторых клеточных параметров атерогенеза. Был измерен атерогенный потенциал сыворотки крови (индуцированное накопление внутриклеточного холестерина), полученной от 18 пациентов, в первичной культуре клеток, выделенных из нормальных участков интимы аорты человека, и в культуре моноцит-макрофагов крови человека. Были получены сравнимые показатели, и коэффициент корреляции между двумя способами измерений составил 0,92 ($p=0,011$). Таким образом, было установлено, что культуру моноцитов-макрофагов крови человека допустимо использовать при серийных измерениях атерогенных свойств сыворотки крови, как более доступную и достаточно информативную. В дальнейшем, почти все данные были получены именно на этой модели.

2.23 Ассоциация ЛНП – ключевой фактор их атерогенности

2.23.1 Самоассоциация ЛНП

Под самоассоциацией ЛНП мы понимаем самопроизвольное слияние или слипание липопротеидов между собой. Нативные липопротеиды низкой плотности, выделенные из крови здоровых людей не подвержены самоассоциации (Tertov VV, 1992), в то время как модифицированные любым способом ЛНП агрегируют между собой, одновременно они вызывают накопление липидов в культуре гладкомышечных клеток.

Нами было продемонстрировано, что дегликозилирование, протеолитическая и липолитическая модификация приводит к самоассоциации ЛНП. Данные представлены в главе 3.2 Ферментативная модификация ЛНП.

Итак, модифицированные любым образом *in vitro* ЛНП склонны к ассоциации. Циркулирующие множественно

модифицированные ЛНП также склонны к самопроизвольной ассоциации и проявляют атерогенные свойства. Нами было исследовано влияние фильтрации препаратов ЛНП на их способность вызывать накопление эфиров холестерина в гладкомышечных клетках непораженной интимы аорты и макрофагах человека.

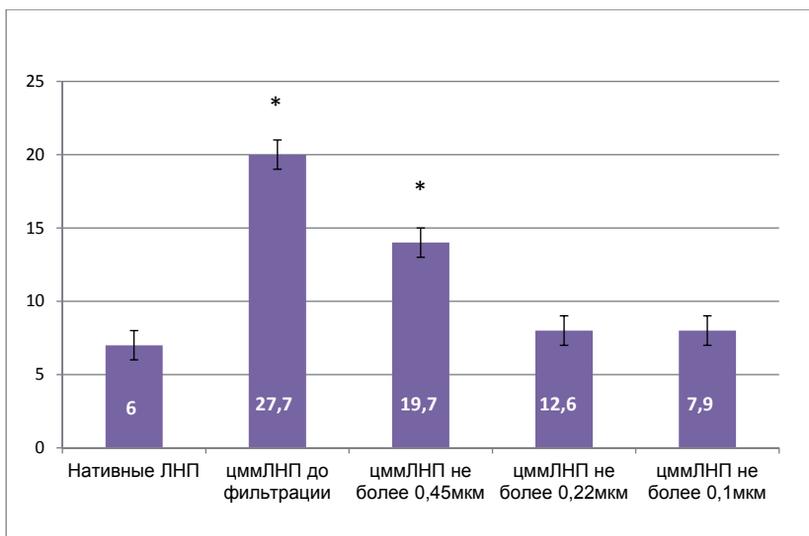


Рисунок 9 - Влияние фильтрации препаратов ЛНП на их способность вызывать накопление эфиров холестерина в макрофагах человека.

Данные представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$.

Препараты нативных и циркулирующих множественном модифицированных ЛНП фильтровали через фильтры с диаметром пор 10, 22 и 45 нм и инкубировали с клетками в течение 6 часов. На рисунке 9 представлены данные, из которых следует, что удаление

ассоциатов из препаратов цмМЛНП приводит к тому, что последние перестают вызывать накопление липидов в культуре клеток, т.е. теряют атерогенные свойства. Нативные ЛНП после 6 часов инкубации при 37°C не образуют ассоциатов и не вызывают накопления эфиров холестерина как в ГМК, так и в макрофагах. Наряду с этим цмМЛНП образуют ассоциаты, которые в среднем в 5 крупнее нативных ЛНП и вызывают многократное, по сравнению с нЛНП накопление ЭХ в обеих культурах клеток.

2.23.2 Разработка метода определения степени ассоциации (сравнение методов светопропускания и светорассеяния)

Мы определяли степень ассоциации липопротеидов низкой плотности двумя методами: методом регистрации флуктуации светопропускания и квазиупругого лазерного рассеивания. В первом случае мы определяем относительное изменение размера частиц, во втором – абсолютный размер.

Метод регистрации флуктуации светопропускания луча основан на том, что относительная дисперсия колебаний оптической плотности, вызванных случайными изменениями в количестве частиц, попадающих в оптический путь лазерного луча, отражает отклонения от их среднего размера, то есть степень их ассоциации. Мы регистрировали флуктуацию светопропускания луча лазерного света длиной волны 860 нм при помощи прибора Агрегометр (Aggregation analyzer, Biola, RF) через определенные промежутки времени.

Средний размер образовавшихся ассоциатов оценивали методом квазиупругого лазерного рассеивания на приборе Аутосайзер 2-Малверн (Autosizer 2-Malvern, Malvern Instruments, UK). Для этого образцы ЛНП с концентрацией 2,5 мг белка/мл инкубировали при 37°C в изотоническом фосфатном буфере при постоянном

перемешивании – 1000 оборотов в минуту. Через определенные промежутки времени проводили измерение размера частиц.

На рисунках 10 и 11 представлены результаты экспериментов по исследованию влияния полаксамера Р85 на самопроизвольную ассоциацию ЛНП от больных ССЗ. Условия перемешивания в случае измерения методом квазиупругого лазерного рассеяния, т.е. определения абсолютного размера частиц, были несколько иные, чем в случае измерения относительного размера агрегатов ЛНП. В первом случае скорость перемешивания составляла 1000 оборотов в минуту, а во втором в 10 раз меньше – 100 оборотов в минуту. Но из данных, представленных на рисунках видно, что тенденция одинакова при измерении как относительного, так и абсолютного размера частиц. Далее мы в-основном использовали метод флуктуации светорассеяния, т.к. этот метод позволяет изучать ассоциацию ЛНП в динамике.

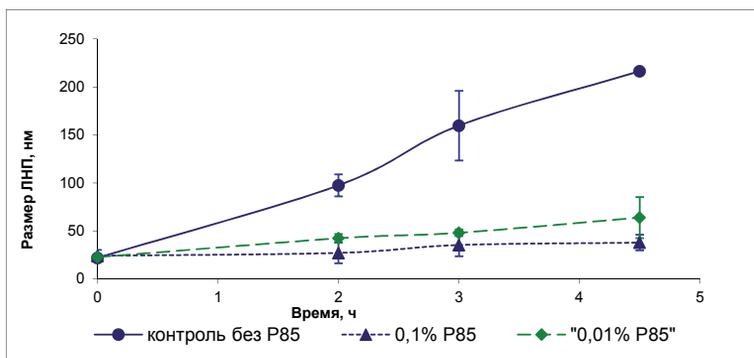


Рисунок 10 - Кинетические кривые изменения среднего размера частиц ЛНП под влиянием полаксамера Р85. Среда инкубации – ИФБ, рН 7,4, концентрация ЛНП 2,5 мг белка/мл, температура инкубации 37°C, скорость перемешивания 1000 об/мин.

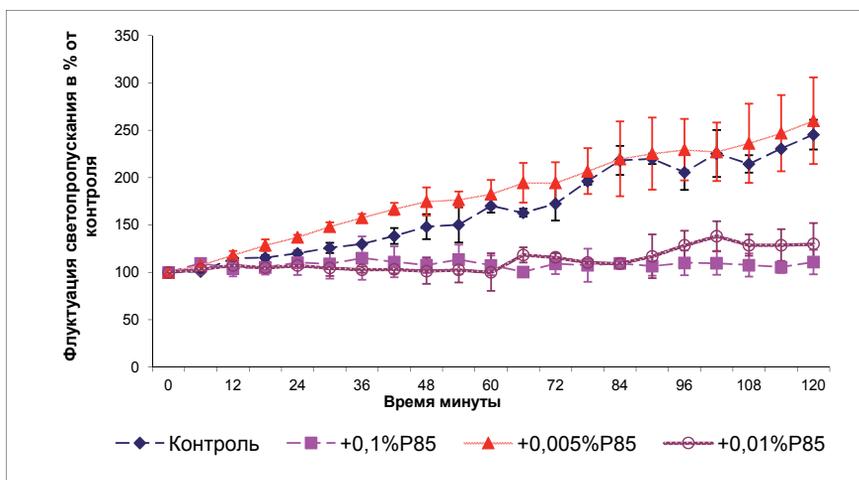


Рисунок 11 - Кинетические кривые изменения флуктуации светопропускания суспензии под влиянием полаксамера P85. Среда инкубации – ИФБ, pH 7,4, концентрация ЛНП 0,5 мг белка/мл, температура инкубации 37°C, скорость перемешивания 100 об/мин.

2.23.3 Ассоциация с внеклеточным матриксом

Известно, что в интиме артерий присутствуют компоненты соединительно-тканного матрикса, а именно коллаген, эластин (Bergethon PR, 2013), фибронектин, гепарин и др. И ЛНП образуют комплексы с ними, в частности, с глюкозаминогликанами (Srinivasan SR, 1972). Мы поставили перед собой задачу выяснить, влияет ли добавление в культуру одновременно с ЛНП таких глюкозаминогликанов, как гиалуроовая кислота, хондроитин-сульфат и синтетический гликозаминогликан, декстран-сульфат, на ЛНП-опосредованное накопление холестерина клетками. Как видно из данных рисунка 12, ни гиалуроовая кислота, ни хондроитин сульфат, ни гепарин не влияли на внутриклеточное накопление липидов, в то время как добавление декстран сульфата одновременно с ЛНП

вызывало почти двукратное увеличение уровня холестерина в культивируемых клетках.

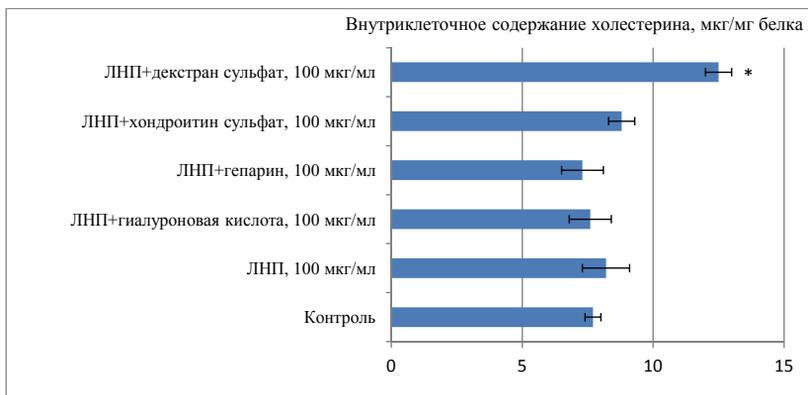


Рисунок 12 - Влияние ЛНП и глюкозаминогликанов на содержание суммарного холестерина в клетках макрофагах. Данные представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$.

Ранее нами было замечено, что в сильно загрязненных коллагеназа-резистентным дебрисом культурах за несколько дней культивирования в клетках появлялись липидные включения в виде гранул и мелких капель. Поэтому мы провели эксперимент по одновременному добавлению в культуру клеток, выделенных из интимы аорты человека, данного дебриса и ЛНП. Внесение в культуру только коллагеназа-резистентного дербиса вызывало увеличение уровня внутриклеточного холестерина более, чем на 400% за 24 часа инкубирования (рис. 13). При одновременном добавлении в культуру дебриса и ЛНП наблюдали почти 7-кратное, увеличение содержания холестерина. Наряду с этим делипидированный дебрис в отсутствие ЛНП не вызывал накопления холестерина в культивируемых клетках,

однако одновременное добавление в культуру делипидированного дебриса и ЛНП приводило к 4-кратному увеличению общего внутриклеточного холестерина.

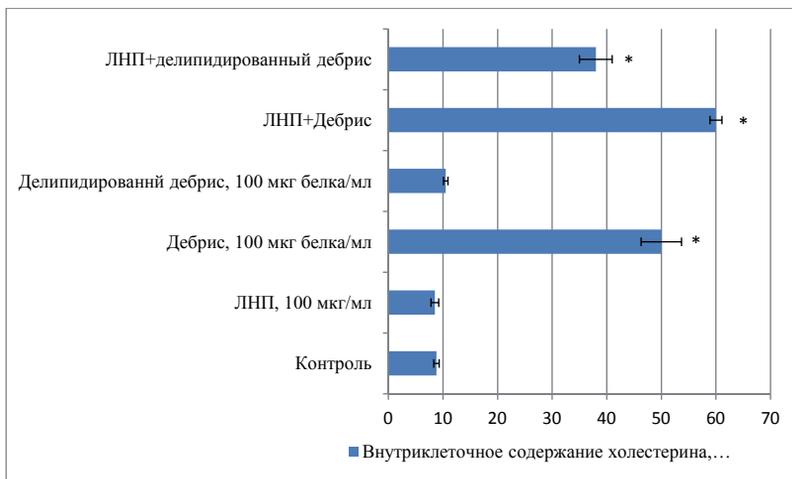


Рисунок 13 - Влияние ЛНП и коллагеназа-резистентного дебриса на содержание суммарного холестерина в макрофагах.

Данные представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$.

В состав коллагеназа-резистентных участков внеклеточного матрикса стенки аорты может входить эластин. Поэтому на следующем этапе мы исследовали, каким образом добавление эластина влияет на ЛНП-опосредованное накопление холестерина. Эластин, выделенный из аорты человека, вызывал 3.5-кратное увеличение внутриклеточного холестерина, в то же время делипидированный эластин в отсутствие ЛНП практически не влиял на содержание холестерина (Рис. 14). Наряду с этим добавление в

культуру делипидированного эластина вместе с ЛНП приводило к существенному (более, чем 3-кратному) накоплению холестерина в культивируемых клетках.

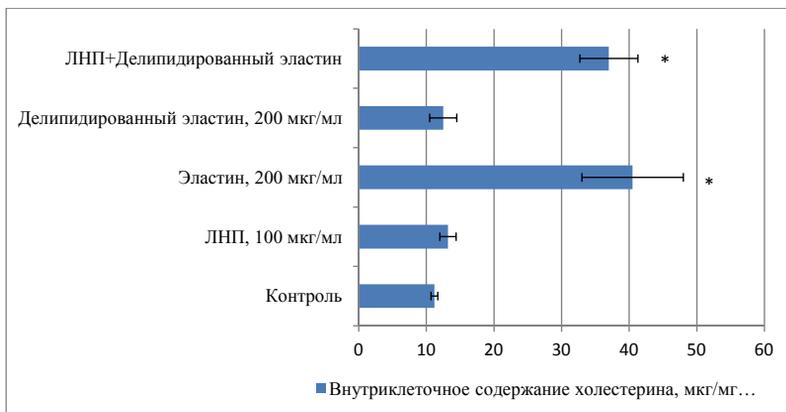


Рисунок 14 - Влияние ЛНП и эластина на содержание суммарного холестерина в макрофагах. Данные представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение, *, достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$.

Во внеклеточном матриксе также присутствуют коллаген, фибронектин и гепарин (Huang AS, 2013). Денатурированный коллаген – желатин вызывал значимое - на 50% - увеличение содержания внутриклеточного холестерина. Добавление гепарина или фибронектина по-отдельности накопления внутриклеточных липидов не вызывало. Одновременное же внесение гепарина и фибронектина с ЛНП вызывало такое же, как в случае с коллагеном, т.е. 1,5 кратное, увеличение содержания холестерина в клетках.

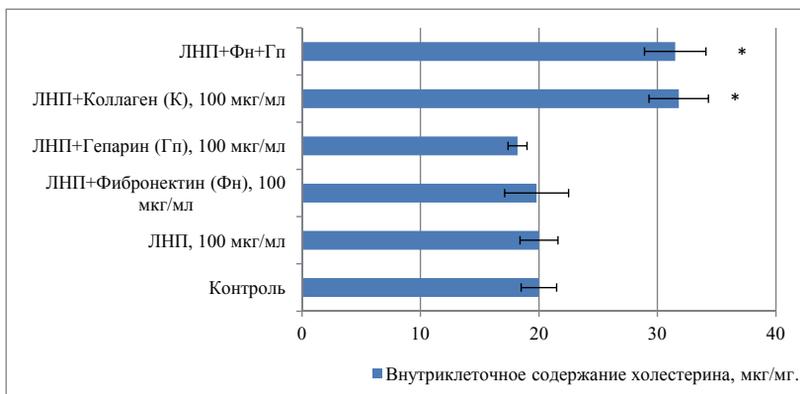


Рисунок 15 - Влияние ЛНП и фибронектина, коллагена и гепарина на содержание суммарного холестерина в макрофагах.

Данные представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение.

*, достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$.

Ранее было продемонстрировано, что внутриклеточное накопление холестерина, вызванное холестеринсодержащими частицами, зависит от размера последних или их способности образовывать нерастворимые ассоциаты. Поэтому было интересно выяснить, образуются ли нерастворимые ассоциаты между ЛНП и испытанными ранее веществами: эластином, коллагеном, гликозаминогликанами, фибронектоном и пр.?

Для этого липопротеиды низкой плотности в концентрации 100 мкг белка/мл инкубировали в культуральной среде в течение 24 часов при 37°C в CO₂ инкубаторе. Через определенные промежутки времени образовавшуюся смесь подвергали центрифугированию с усилием 10 тысяч g в течение 20 минут. Полученный осадок анализировали на содержание суммарного холестерина. подвергали центрифугированию (10.000xg, 20 мин) и в осадке определяли суммарный холестерин. В

условиях культивирования частицы коллагеназа-резистентного дебриса и эластина образовывали нерастворимые комплексы с ЛНП, причем эластин связывал ЛНП эффективнее и быстрее чем дебрис. Среди использованных нами глюкозаминогликанов лишь декстран-сульфат образовывал нерастворимые ассоциаты с ЛНП. За 24 часа инкубации в условиях культивирования ЛНП с декстран-сульфатом, дебрисом и эластином в осадок выпали ассоциаты, содержащие 20, 30 и 37% от исходных липопротеидов, соответственно.

Исследуемые гликозаминогликаны, а именно хондроитин-сульфат, гиалуроновая кислота и гепарин, не приводили к образованию нерастворимых ассоциатов с ЛНП. Желатин и фибронектин при инкубации с ЛНП в условиях культивирования не вызывали появления холестерина в осадке, в то время как 24-часовая инкубация ЛНП с фибронектином и гепарином или фибронектином, гепарином и желатином приводила к появлению в осадке, соответственно, 73% и 82% от исходно внесенных в инкубационную смесь ЛНП.

При сопоставлении данных, полученных в экспериментах представленных выше, очевидно, что внутриклеточное накопление холестерина возникает в случае инкубации ЛНП в комбинации только с теми агентами, которые образуют с липопротеидами нерастворимые ассоциаты. Одновременно, исследованные компоненты внеклеточного матрикса, которые не образуют в условиях культивирования нерастворимых ассоциатов с ЛНП, не способны вызывать внутриклеточное накопление холестерина. Была обнаружена прямая зависимость (коэффициент корреляции равен 0.927) между содержанием холестерина в нерастворимом ассоциате, образующемся в условиях культивирования, и приростом холестерина в культивируемых клетках.

2.23.4 Образование циркулирующих иммунных комплексов.

В течение последнего десятилетия было продемонстрирована тесная корреляция между уровнем ЦИК в крови и количеством инфарктов миокарда и других сердечно-сосудистых катастроф у пациентов с сахарным диабетом 2 типа (Lopes-Virella MF, 2012), также повышенный уровень ЦИК, содержащих гликозилированные и окисленные ЛНП связан с повышенным риском ретинопатии у пациентов с сахарным диабетом 1 типа (Lopes-Virella MF, 2012). С другой стороны, на эпидемиологической выборке из почти 2000 изначально здоровых людей было показано (Ravandi A, 2011), что IgG и IgM, содержащие ЦИК не являются независимыми предикторами событий сердечно-сосудистых заболеваний, но могут влиять на риск ССЗ, связанный с повышенным уровнем окислительных биомаркеров. Также было показано, что включение ЦИК в тучные клетки приводит к экспрессии последними провоспалительных цитокинов (Lappalainen J, 2011). Таким образом, ЛНП-содержащие циркулирующие иммунные комплексы могут играть роль в развитии атеросклероза.

В нашей лаборатории были обнаружены два экспериментальных факта, подтверждающих важную роль циркулирующих иммунных комплексов в развитии атеросклероза. Во-первых, было показано, что содержание холестерина и апоВ в циркулирующих иммунных комплексах тесно коррелирует со степенью развития коронарного атеросклероза и атеросклеротических поражений других локализаций (Tertov VV, 1990 б), (Tertov VV, 1990 а), (Orekhov AN, 1991 а), (Orekhov AN, 1991 б) (Kacharava AG, 1993). Во-вторых, из крови пациентов были выделены и детально охарактеризованы аутоантитела против модифицированных ЛНП (Orekhov AN, 1991в), (Orekhov A.N., 1991 г), (Orekhov A.N., 1992).

Итак, основные характеристики аутоантител: 1) представлены

иммуноглобулинами класса G; 2) представляют собой несколько подфракций с изоэлектрическими точками 8,1-8,9; 3) имеют различные константы сродства к нативным и модифицированным ЛНП; 4) связываются с апобелком ЛНП; 5) после связывания с ЛНП, способны взаимодействовать с C1q-компонентом комплемента; 6) вызывают появление атерогенных свойств нативных ЛНП; 7) усиливают атерогенность цмЛНП.

В задачи настоящей работы входило изучение ЛНП, входящих в состав циркулирующих иммунных комплексов.

Для изучения характеристик нативных, модифицированных и ЦИК-ЛНП и их влияния на содержание липидов в клетках были получены три пула сыворотки крови десяти здоровых лиц и три пула сыворотки крови пациентов. Каждый пул содержал по 10 сывороток. Выделенные из пулированных сывороток ЛНП были разделены с помощью лектин-хроматографии на РКА₁₂₀-агарозе на подфракцию нативных (нЛНП) и циркулирующих множественномодифицированных липопротеидов (цммЛНП). Ниже приводятся данные, полученные с использованием ЛНП, выделенных из одного пула сывороток крови здоровых лиц и одного пула сывороток крови пациентов. 24-часовое культивирование клеток непораженной интимы аорты в среде, содержащей 100 мкг/мл нЛНП, полученных от здоровых лиц, не вызывало изменений внутриклеточного содержания фосфолипидов и нейтральных липидов (рис. 16). Такие же результаты были получены в случае нЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом. Напротив, 100 мкг/мл цммЛНП пациентов вызывали увеличение внутриклеточного уровня свободного и этерифицированного холестерина в 1,5 и 2,3 раза, соответственно, а также возрастание уровня триглицеридов на 40% (рис. 16). ЛНП, входящие в состав циркулирующих иммунных комплексов,

стимулировали накопление триглицеридов, а также свободного и этерифицированного холестерина на 180%, 166% и 300%, соответственно. При этом содержание фосфолипидов в интимальных клетках достоверно не изменялось (рис. 16).

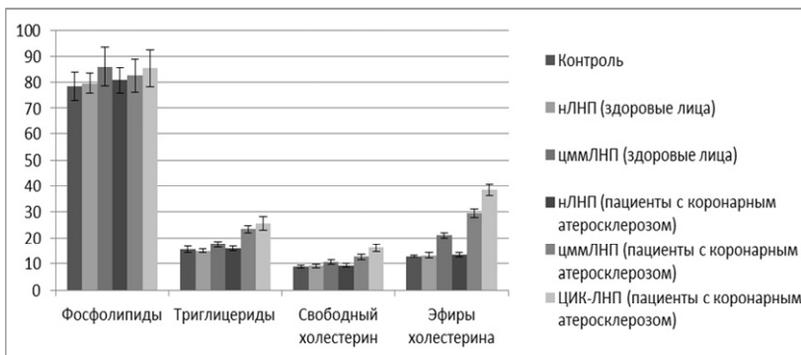


Рисунок 16 - Влияние нативных ЛНП, цмЛНП и ЦИК-ЛНП на содержание липидов в клетках непораженной интимы аорты человека.

Данные представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$.

Липидный состав выделенных препаратов липопротеидов приведен в таблице 48. Можно видеть, что цмЛНП пациентов отличаются от нативных липопротеидов, как здоровых лиц, так и пациентов, сниженным на 11-31% содержанием фосфолипидов и нейтральных липидов. Низкий уровень свободного и этерифицированного холестерина, а также триглицеридов и фосфолипидов наблюдался также и у ЦИК-ЛНП (таблица 5).

Таблица 5 - Липидный состав нативных ЛНП, цмЛНП и ЦИК-ЛНП.

ЛНП	Содержание липидов, мкг/мг апоВ			
	Фосфолипиды	Триглицериды	Свободный холестерин	Эфиры холестерина
Здоровые лица				
Нативные ЛНП	1289±17	308±6	306±20	1884±76
ЦмЛНП	1087±32*	261±7*	263±9*	1455±39*
Пациенты с коронарным атеросклерозом				
нЛНП	1250±59	315±8	293±17	1828±57
цммЛНП	1095±42*	253±14*	245±18*	1386±17*
ЦИК-ЛНП	1053±28*	242±13*	243±4*	1313±8*

Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от нативных ЛНП, $p < 0,05$.

Содержание липидных гидроперекисей в свежесыводенных препаратах липопротеидов было низким и близким по значению для всех типов ЛНП (таблица 49). Также не было обнаружено различий в уровне ТБК-активных продуктов в нЛНП, цммЛНП и ЦИК-ЛНП. Содержание оксистеролов в десалированных ЛНП и ЦИК-ЛНП было в 1,5-2 раза выше, чем в салированных липопротеидах (таблица 6).

Размеры липопротеидных частиц определяли с помощью нативного электрофореза в градиентном полиакриламидном геле. Как следует из таблицы 50 диаметр цммЛНП и ЛНП, входящих в состав циркулирующих иммунных комплексов, был меньше, чем диаметр нативных ЛНП.

Таблица 6 - Электрофоретическая подвижность и размеры нативных ЛНП, цммЛНП и ЦИК-ЛНП.

Препарат ЛНП	Диаметр ЛНП, нм	Относительная электрофоретическая подвижность
Здоровые лица		
нЛНП	24,9	1,00
цммЛНП	22,0	1.16
Пациенты с коронарным атеросклерозом		
нЛНП	24,0	1,04
цммЛНП	21,3	1,30
ЦИК-ЛНП	19,5	1,39

Циркулирующие множественно модифицированные ЛНП и, в еще большей степени, ЦИК-ЛНП обладали повышенной электрофоретической подвижностью в агарозном геле, по сравнению с сialiрованными липопротеидами (таблица 50).

На рисунке 17 приведено распределение по плотности выделенных липопротеидов. По сравнению с нативными ЛНП, распределение цммЛНП имеет сдвиг в сторону большей плотности

(рисунок 17.1). Еще более выраженный сдвиг наблюдался в случае ЦИК-ЛНП. При исследовании липидного состава липопротеидов во фракциях различной плотности было показано, что наиболее плотные фракции содержат наименьшие количества как нейтральных липидов, так и фосфолипидов. При этом содержание эфиров холестерина, триглицеридов и фосфолипидов в десиалированных ЛНП и ЦИК-ЛНП было ниже, чем в сиалированных липопротеидах во всем интервале плотностей (рисунок 17.3, 4, 6). Уровень свободного холестерина в нЛНП был выше, чем в цммЛНП во фракциях с плотностью $d < 1,035$ (рисунок 17.5).

На рисунке 18 представлена корреляционная зависимость между концентрацией (рисунок 18.1) циркулирующих множественно модифицированных ЛНП в крови людей и уровнем апоВ в сыворотке (рисунок 18.2) и содержанием апоВ в циркулирующих иммунных комплексах (рисунок 18.1). Коэффициент корреляции составил $-0,02$ и $0,78$ ($p < 0,01$), соответственно. Таким образом, содержание апоВ и, следовательно, ЛНП в циркулирующих иммунных комплексах прямо коррелирует с уровнем десиалированного апоВ в сыворотке, но не с суммарным уровнем апоВ.

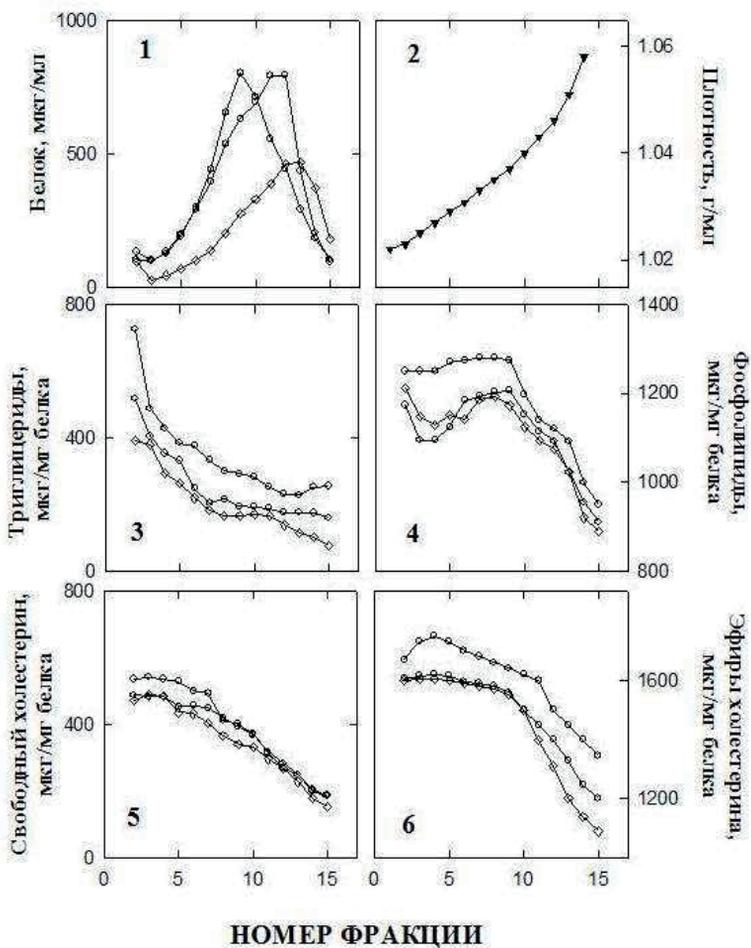


Рисунок 17 - Содержание apoB (1) и липидов (3-6) во фракциях, полученных при градиентном ультрацентрифугировании нативных ЛНП (o), цмЛНП (o) и ЦИК-ЛНП (). Каждое значение - среднее двух определений.

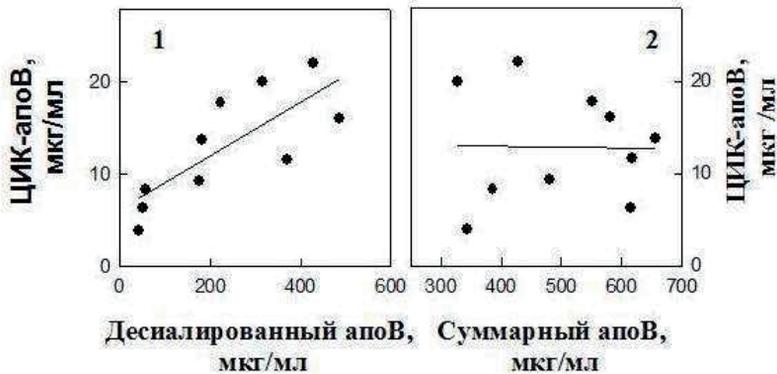


Рисунок 18 - Корреляционные зависимости между содержанием апоВ в циркулирующих иммунных комплексах и содержанием десиалярированного апоВ (1) и суммарного апоВ (2) в сыворотке.

На следующем этапе была изучена атерогенность иммунных комплексов. На рисунке 19 представлены данные о влиянии ЛНП и аутоантител против них на содержание суммарного холестерина в клетках, культивируемых из непораженной интимы аорты человека. Можно видеть, что совместное добавление нативных ЛНП и аутоантител ведет к увеличению содержания внутриклеточного холестерина. В случае цммЛНП, эффект аутоантител еще более выражен.

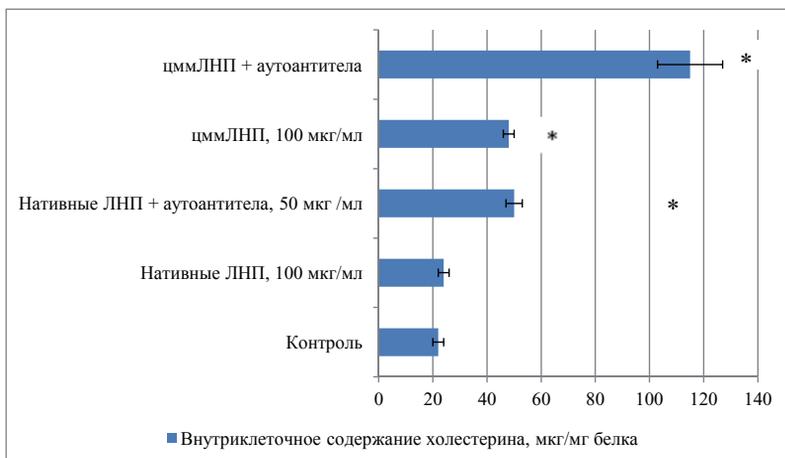


Рисунок 19 - Влияние аутоантител на атерогенность нативных ЛНП и цМЛНП.

Данные представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$.

Необходимо отметить, что увеличение размеров иммунных комплексов ведет к заметному увеличению их атерогенного потенциала (рисунок 20). Так C1q-компонент комплемента, а также фибронектин вызывали выраженное усиление атерогенности иммунных комплексов.

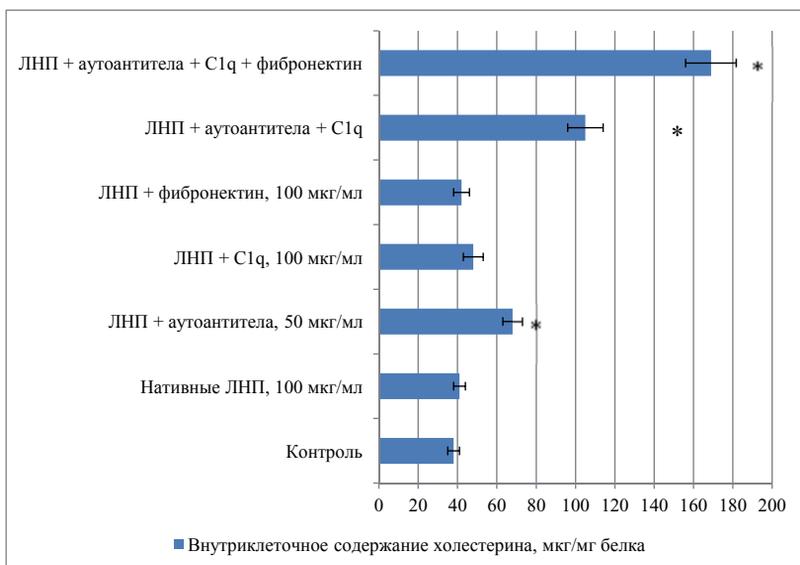


Рисунок 20 - Влияние C1q-компонента комплемента и фибронектина на атерогенность иммунных комплексов.

Данные представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$.

Данные о ингибирующем влиянии цитохалазина В на обусловленное иммунными комплексами накопление внутриклеточного холестерина, свидетельствуют о захвате комплексов путем фагоцитоза (таблица 7).

Таблица 7 - Влияние цитохалазина В на атерогенность иммунных комплексов.

Добавки	Внутриклеточное содержание холестерина, мкг/мг белка
Контроль	28±2
Нативные ЛНП, 100 мкг/мл	28±1
ЛНП + аутоантитела, 50 мкг/мл	62±2*
ЛНП + аутоантитела + цитохалазин В	36±3

Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$.

2.24 Модуляция ассоциации

2.24.1 Влияние различных модификаций частицы нативных липопротеидов низкой плотности на их устойчивость к ассоциации

2.24.1.1 Влияние протеолитических ферментов на устойчивость нативных ЛНП к ассоциации.

В качестве протеолитических ферментов использовались сериновые протеиназы: трипсин и химотрипсин. Известно, что трипсин специфически гидролизует пептидные связи, образованные карбоксильными группами остатков аргинина и лизина, несущих при физиологических значениях рН положительно заряженную группу. Химотрипсин, напротив специфически гидролизует пептидные связи, образованные карбоксильными группами гидрофобных ароматических аминокислот – фенилаланина, тирозина и триптофана, а также и лейцина, имеющего сравнимую с ними гидрофобность. Таким образом, используя трипсин и химотрипсин, мы имели возможность гидролизовать апо В-100 в составе ЛНП преимущественно по положению гидрофильных и гидрофобных аминокислотных остатков соответственно.

Методом электрофореза в полиакриламидном геле было показано, что использованные концентрации ферментов вызывают протеолитическую деградацию апо В-100 в составе ЛНП (см. рис. 21). С другой стороны, присутствие в среде инкубации фенилметансульфонилфторида (ФМСФ) - неспецифического ингибитора протеиназ, предохраняло основной белок ЛНП от протеолиза.

Для изучения влияния протеолитических ферментов на ассоциацию ЛНП липопротеиды инкубировались в присутствии

трипсина или химотрипсина в течение 6 часов при 37°C в среде содержащей изотонический фосфатный буфер.

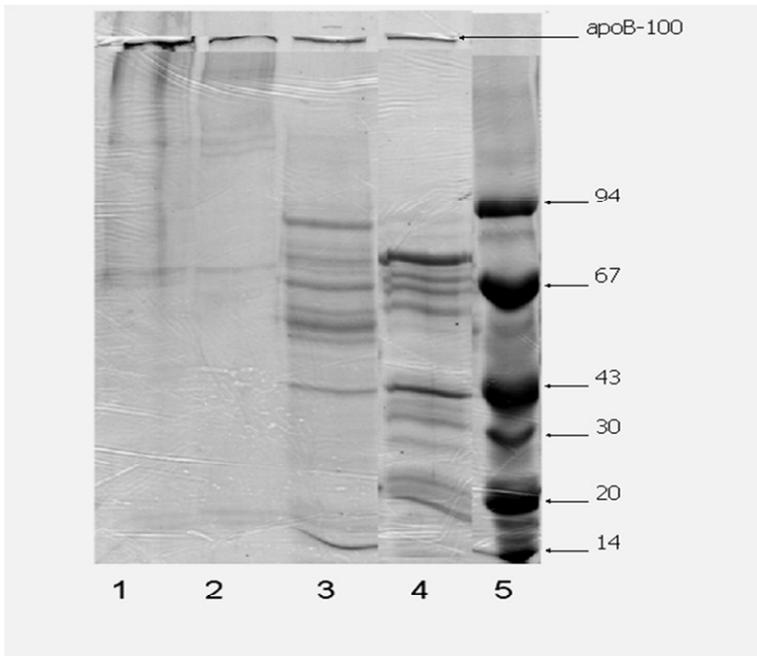


Рисунок 21- Электрофорез в полиакриламидном геле (3-7%) apoB белка ЛНП, обработанных протеолитическими ферментами. 1 – нативные ЛНП, 2 – нативные ЛНП + химотрипсин 1 Ед/мл + 10 мМ ФМСФ, 3 – нативные ЛНП + химотрипсин 1 Ед/мл – 4 часа, 4 – нативные ЛНП + трипсин 1 Ед/мл – 4 часа, 5 – маркер молекулярного веса

Типичные кинетические кривые изменения флуктуация светопропускания эмульсии ЛНП в присутствии протеолитических ферментов приведены на рисунках 22 и 23. В отсутствие ферментов за 6 часов инкубации флуктуация светопропускания эмульсии нативных ЛНП практически не изменяется, что свидетельствует об отсутствии ассоциации ЛНП (кривые 2 и 4 на рис. 22 и 23 соответственно).

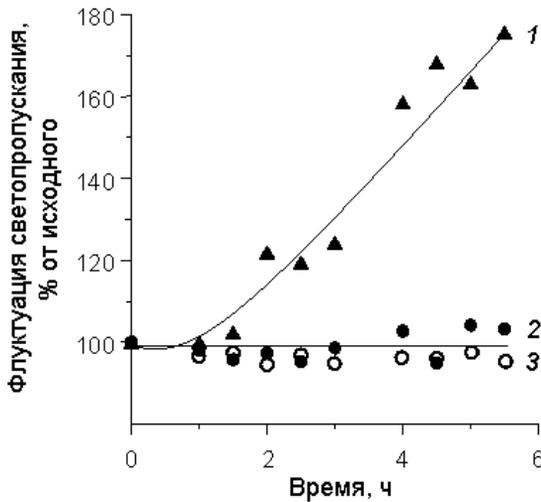


Рисунок 22 - Кинетические кривые изменения флуктуации светопропускания суспензии ЛНП в присутствии (1) и в отсутствие (2) трипсина (1 Ед/мл). Кривая 3 – то же самое, что и 1, но в присутствии 0,5 мМ ФМСФ. Концентрация ЛНП 0,2 мг белка/мл, температура инкубации 37°С. Среда инкубации - ИФБ.

Добавление к ЛНП трипсина или химотрипсина приводит к увеличению флуктуации светопропускания, что указывает на стимуляцию образования ассоциатов ЛНП. В случае химотрипсина

повышение концентрации фермента, как показано на рис. 23, увеличивает флуктуацию светопропускания эмульсии ЛНП, а значит, повышает степень ассоциации частиц ЛНП.

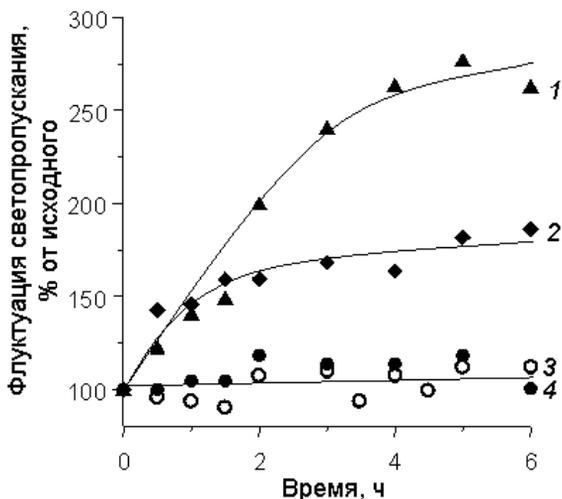


Рисунок 23 - Кинетические кривые изменения флуктуации светопропускания суспензии ЛНП в присутствии (1,2,3) и в отсутствие (4) химотрипсина. Концентрация химотрипсина: 1 и 3 – 1 Ед/мл, 2 – 0,5 Ед/мл; ЛНП 0,2 мг белка/мл, температура инкубации 37°С. Среда инкубации - ИФБ. Кривая 3 – то же, что и 1, но в присутствии 0,5 мМ ФМСФ.

В то же время, если в среду инкубации ферментов с ЛНП добавляли ФМСФ, то рост флуктуации светопропускания эмульсии ЛНП не наблюдался (кривые 3 на рис. 22 и 23). Это позволяет предположить, что наблюдаемое увеличение ассоциации частиц ЛНП

является следствием протеолиза апоВ-100 и, возможно, изменения его конформации. Результаты экспериментов указывают на то, что протеолитические ферменты являются стимуляторами ассоциации ЛНП.

2.24.1.2 Влияние липолитических ферментов на устойчивость нативных ЛНП к ассоциации.

В работе использовались такие липолитические ферменты как фосфолипаза А₂ и фосфолипаза С. Известно, что фосфолипаза А₂, являясь карбоксил-эстеразой, гидролизует сложноэфирную связь в sn-2 положении фосфолипидов. При обработке липопротеидных частиц ферментом происходит расщепление фосфолипидов (главным образом фосфатидилхолина) с образованием лизофосфолипидов и свободных жирных кислот. Фосфолипаза С является фосфогидролазой и в свою очередь гидролизует эфирную связь между диглицеридом и замещенной фосфорной кислотой в фосфолипидах с образованием диацилглицерида и фосфохолина (в случае фосфатидилхолина).

Липолиз фосфолипидов ЛНП под влиянием использованных фосфолипаз был подтвержден при помощи тонкослойной хроматографии (рис.24). В случае липопротеидов, обработанных фосфолипазой А₂, был повышен уровень лизофосфотидилхолина, а при обработке фосфолипазой С повышался уровень диацилглицерола.

Типичные кинетические кривые изменения флуктуации светопропускания эмульсии ЛНП в присутствии липолитических ферментов приведены на рис. 25 и 26. Видно, что в отсутствие ферментов за 6 часов инкубации флуктуация светопропускания эмульсии нативных ЛНП практически не изменяется, что свидетельствует об отсутствии ассоциации ЛНП (кривые 3 на рис. 25и 26). Добавление к ЛНП фосфолипазы А₂ или фосфолипазы С приводит к увеличению флуктуации светопропускания, что указывает

на ассоциацию частиц ЛНП. Повышение концентрации фермента, как показано на рис. 25 и 26 (кривые 1 и 2), увеличивает флуктуацию светопропускания эмульсии ЛНП, следовательно, повышает степень ассоциации частиц ЛНП. Если в среду инкубации ЛНП с ферментом добавляли ЭДТА – ингибитор работы кальций–зависимых фосфолипаз, то ассоциация частиц ЛНП не наблюдалась (кривые 4 на рис. 25 и 26).

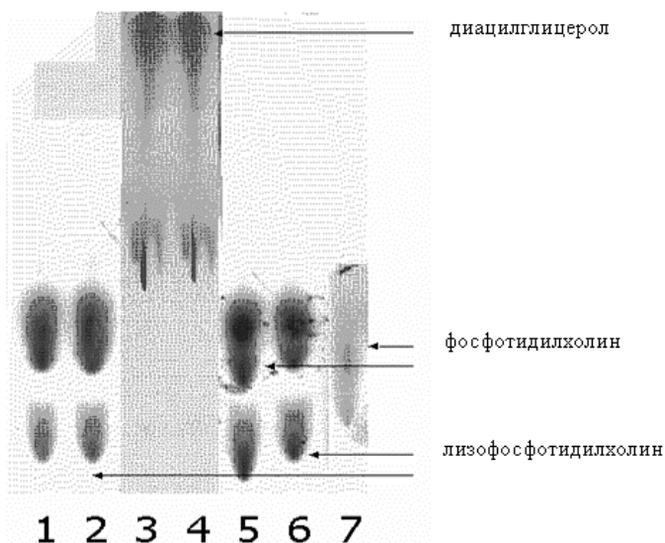


Рисунок 24 - Тонкослойная хроматография фосфолипидов ЛНП, обработанных фосфолипазой А2 и фосфолипазой С 1-2 - нативные ЛНП 3-4 - нативные ЛНП + фосфолипаза С 1 Ед/мл 5-6 - нативные ЛНП + фосфолипаза А2 7 - стандарт фосфотидилхолина

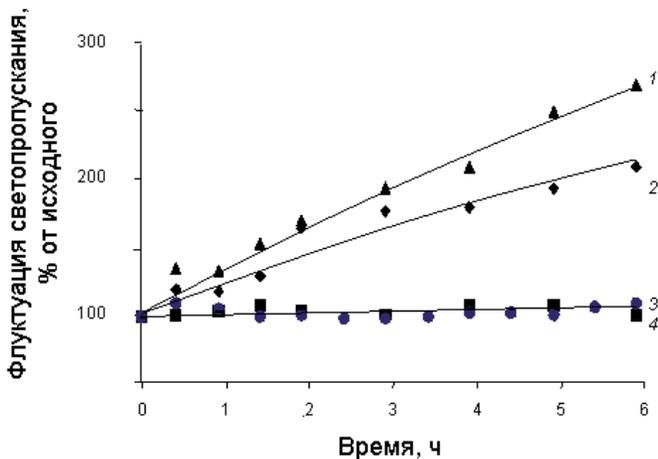


Рисунок 25 - Кинетические кривые изменения флуктуации светопропускания суспензии ЛНП в присутствии (1,2,4) и в отсутствие (3) фосфолипазы A_2 . Концентрация фосфолипазы A_2 : 1 - 0,125 мг/мл, 2 - 0,06 мг/мл; ЛНП 0,2 мг белка/мл, температура инкубации 37^oС. Среда инкубации: ИФБ, рН 7,2. Кривая 4 - то же самое, что и 1, но в присутствии 15 мМ ЭДТА

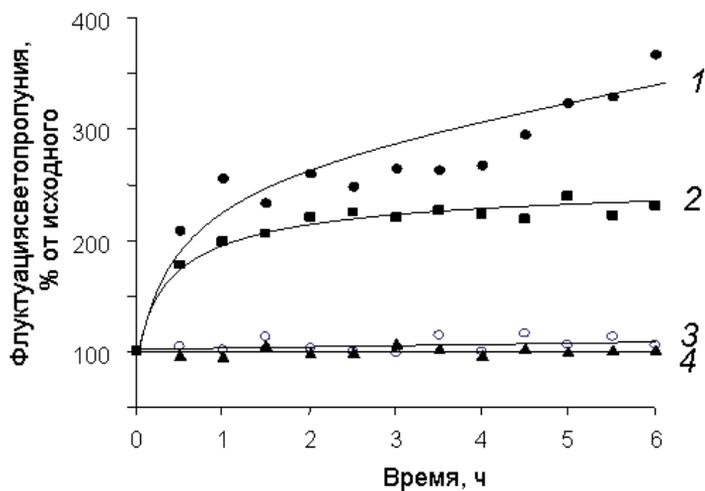


Рисунок 26 - Кинетические кривые изменения флуктуации светопропускания суспензии ЛНП в присутствии (1,2,4) и в отсутствие (3) фосфолипазы С. Концентрация фосфолипазы С: 1 – 1,5 Ед/мл, 2 – 0,83 Ед/мл; ЛНП 0,2 мг белка/мл, температура инкубации 37°С. Среда инкубации: ИФБ, рН 7,2. Кривая 4 – то же, что и 1, но в присутствии 15 мМ ЭДТА.

2.24.1.3 Влияние миелопероксидазы на устойчивость нативных ЛНП к ассоциации.

Как известно, миелопероксидаза катализирует образование гипохлорита, используя в качестве субстрата пероксид водорода. Гипохлорит – сильный окислитель и хлорирующий агент. Он способен реагировать со всеми компонентами ЛНП, но особенно эффективно он окисляет SH- и хлорирует NH₂-группы белков.

Таблица 8 - Содержание ТБК-реактивных продуктов в ЛНП после их инкубации с миелопероксидазой.

Миелопероксидаза, мкг/мл	ТБК-реактивные продукты, мкмоль/мг белка
0	0,09 ± 0,02
0,6	1,52 ± 0,20
0,9	2,54 ± 0,12

Результаты исследования ассоциации ЛНП под влиянием миелопероксидазы приведены на рис 31. Видно, что инкубация нативных ЛНП при 37°С в течение 6 часов не приводит к увеличению флуктуации светопропускания эмульсии липопротеидов, а значит и не стимулирует ассоциацию частиц. В присутствии же миелопероксидазы наблюдается заметное увеличение флуктуации светопропускания, что свидетельствует об ассоциации частиц ЛНП. Такая потеря устойчивости ЛНП к ассоциации обусловлена активностью миелопероксидазы, поскольку, как видно из рис. 27 (кривая 3), в отсутствие одного из субстратов миелопероксидазы, а

именно пероксида водорода, заметных изменений во флуктуации светопропускания, а значит и в размере частиц ЛНП не наблюдается.

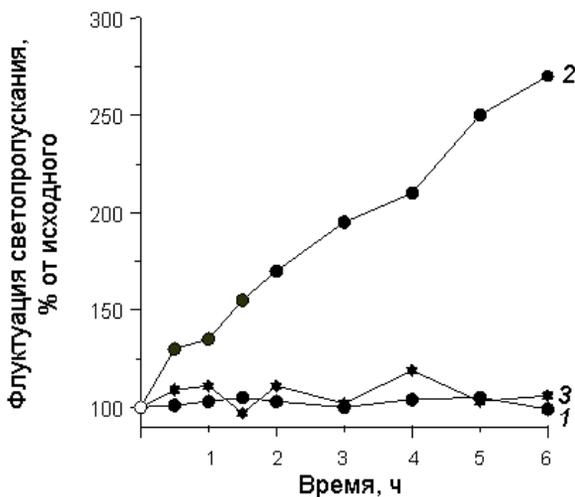


Рисунок 27 - Кинетические кривые изменения флуктуации светопропускания суспензии ЛНП в отсутствие (1) и в присутствии МПО (2). Среда инкубации: ИФБ, ЛНП – 200 мкг белка/мл, МПО – 0,5 мкг/мл, H_2O_2 – 40 мкМ. Температура $37^{\circ}C$. Кривая 3 – то же, что 2, но в отсутствие H_2O_2 .

2.24.1.4 Влияние альдегидов эндогенного происхождения на устойчивость ЛНП к ассоциации.

Альдегидные группы могут вступать в реакцию с ε-аминогруппами лизиновых остатков молекул апоВ с образованием прочных внутри- и межмолекулярных сшивок, в том числе и ковалентных связей типа оснований Шиффа. Далее, относительно нестабильные связанные с белком основания Шиффа подвергаются перегруппировке по реакции Амадори с образованием более стабильных производных, которые в свою очередь преобразуются через дикарбонильные интермедиаты в конечные продукты гликозилирования. Таким образом, альдегиды могут вызывать модификацию ЛНП. Известно, что в ходе окислительного и карбонильного стресса, сопровождающего многие патологические процессы в организме человека, могут формироваться эндогенные низкомолекулярные альдегиды, такие, например, как глиоксаль и метилглиоксаль. Кроме того, модифицирующее действие на ЛНП способен оказывать МДА, образующийся в результате окислительной деструкции липидных гидропероксидов

Степень модификации ЛНП под действием альдегидов оценивали по изменению электрофоретической подвижности частиц. Известно, что обработка ЛНП альдегидами приводит к увеличению отрицательного заряда частиц ЛНП за счет уменьшения количества свободных аминогрупп и, следовательно, к увеличению электрофоретической подвижности. Из рис. 28 видно, что частицы ЛНП, модифицированные МДА, метилглиоксалем и глиоксалем, обладают значительной электрофоретической подвижностью по сравнению с нативными ЛНП.

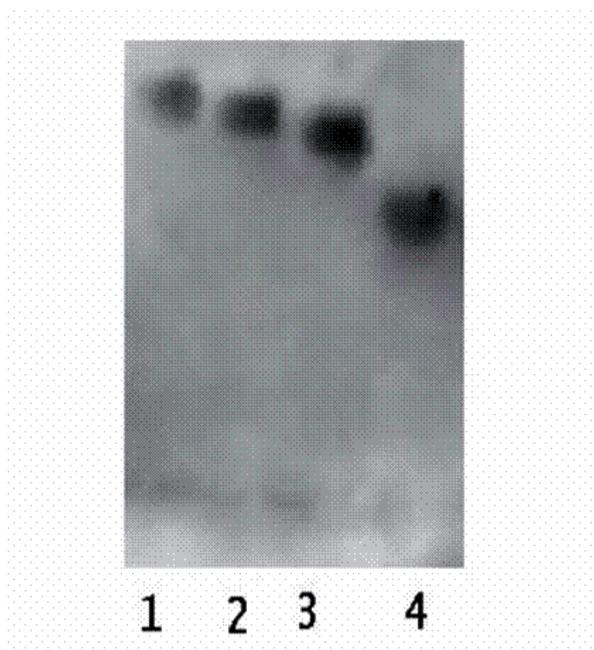


Рисунок 28 - Электрофореграмма нативных ЛНП и ЛНП, модифицированных альдегидами эндогенного происхождения в 1 % агарозном геле. (1) – ЛНП, модифицированные МДА; (2) – ЛНП, модифицированные метилглиоксалем; (3) – ЛНП, модифицированные глиоксалем; (4) – нативные ЛНП.

Совместно с лабораторией биохимии свободнорадикальных процессов ИКК РКНПК Росздрава (зав. лаб. профессор В.З. Ланкин) было изучено влияние малонового диальдегида (МДА), глиоксаля и метилглиоксаля на процесс ассоциации ЛНП. Результаты эксперимента приведены на рис 33. Видно, что инкубация нативных ЛНП при 37°C в течение 6 часов не вызывает изменений флуктуации светопропускания эмульсии (рис.29, кривая 1), а значит не приводит к изменению и среднего размера частицы. В присутствии же альдегидов

наблюдается заметное увеличение флуктуации светопропускания, что свидетельствует об увеличении среднего размера частиц ЛНП. При этом ЛНП, модифицированные МДА (рис.29, кривая 2), агрегируют в 2 раза медленнее, чем ЛНП, модифицированные глиоксалем и метилглиоксалем (рис.29 кривая 3 и 4).

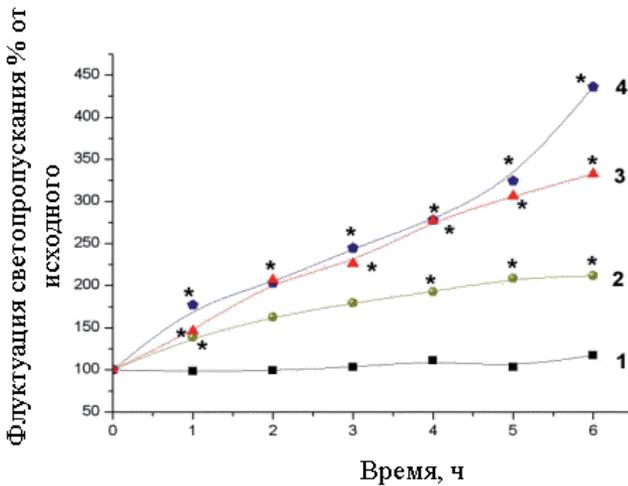


Рисунок 29 - Кинетические кривые изменения флуктуации светопропускания ЛНП в присутствии и отсутствии альдегидов (1) нативные ЛНП; (2) ЛНП модифицированные МДА; (3) ЛНП модифицированные глиоксалем; (4) ЛНП модифицированные метилглиоксалем; (* - достоверность отличий от контроля $p \leq 0.05$)

2.24.1.5 Влияние нейраминидазы на устойчивость нативных ЛНП к ассоциации.

Десиалирующий фермент бактериального происхождения нейраминидаза отщепляет α 2-6 связанную сиаловую кислоту, занимающую терминальное положение в гликопротеине апоВ-100.

Резкое снижение содержания сиаловой кислоты в ЛНП, обработанных нейраминидазой, было подтверждено при помощи модифицированного метода Воррена. Так, содержание сиаловой кислоты в ЛНП, инкубированных с 0,02 Ед нейраминидазы в течение 6 часов, снизилось на 73+/-2% по сравнению с контролем.

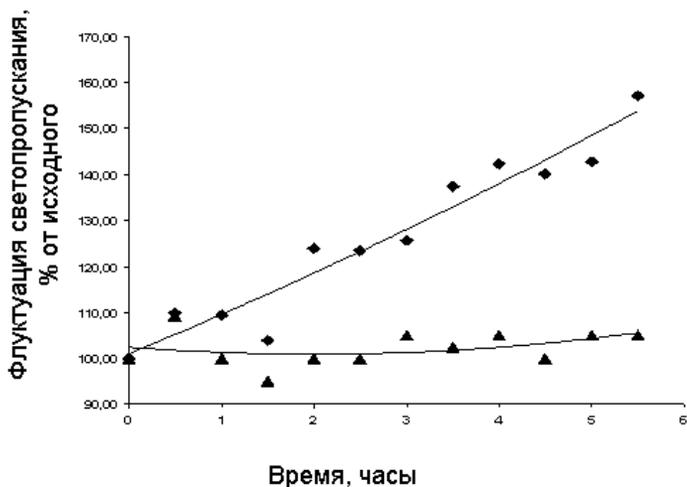


Рисунок 30 - Кинетические кривые изменения флуктуации светопропускания суспензии нативных ЛНП в отсутствие (1) и в присутствии 0,125 Ед нейраминидазы (2). Среда инкубации: ИФБ, ЛНП – 200 мкг белка/мл, Температура 37°С.

Влияние нейраминидазы на ассоциацию частиц ЛНП отражено на рисунке 34. Как и в предшествующих экспериментах нативные

ЛНП, не обработанные нейраминидазой, сохраняли устойчивость к ассоциации на протяжении 6 часов инкубации. В то же время, флуктуация светопропускания эмульсии ЛНП, обработанных нейраминидазой, неуклонно возрастала, что свидетельствует об ассоциации липопротеидов.

2.24.2 Изучение конформационных изменений апоВ белка

цммЛНП и ферментативно модифицированных ЛНП.

Все типы модификаций, которые мы использовали: протеолитическая, липолитическая, окислительная и дезаилирующая – имеют место в циркулирующих модифицированных ЛНП (Tertov et al., 1992; Тертов, 1999). В данной работе было показано, что любая из этих модификаций приводит к ассоциации ЛНП. Остается неясным какая модификация изменяет частицу липопротеида *in vivo*, делая ее атерогенной. Для ответа на этот вопрос мы сопоставили изменения в цммЛНП с изменениями, вызываемыми различными модификациями в нативных липопротеидах. В качестве показателя изменений, имеющих принципиальное значение, была выбрано поверхностное расположение аполипипропротеида В, которое оценивали при помощи моноклональных антител. Известно, что именно молекула апоВ играет особую роль в стабилизации частицы ЛНП (Hevonoja et al, 2000). Существенные нарушения структуры апобелка В неизбежно ведут к ассоциации липопротеидных частиц.

2.24.2.1 Изучение конформационных изменений апоВ белка цммЛНП

Результаты исследования взаимодействия нативных и цммЛНП с моноклональными антителами различных клонов представлены на рис. 35. По различиям в связывании антител с нативными ЛНП и

цммлНП можно судить об изменениях в структуре множественно модифицированных липопротеидов. Так, было обнаружено, что антитело 3С8 лучше взаимодействует с нативными ЛНП, чем с множественно модифицированными. Можно предположить, что соответствующий эпитоп в составе апоВ цммлНП подвергается маскированию в результате модификаций и перестройки апоВ белка. С другой стороны, цммлНП эффективнее, чем нЛНП взаимодействуют с антителами клонов 2Е3, 2G1 и 7С2. По-видимому, эпитоп, ответственный за связывание 2Е3 антитела (аминокислотные остатки апоВ100 3728-4306) становится более доступным для взаимодействия с антителом в цммлНП. Повышенная способность цммлНП связываться с антителами 2G1 и 7С2 может свидетельствовать о некоторой гомологии цммлНП и МДА-модифицированных липопротеидов, к которым получены эти антитела (см. табл. 3). С другой стороны, в экспериментах с антителом 3G4, также распознающим МДА-модифицированные ЛНП, не было выявлено достоверных различий во взаимодействии нативных и цммлНП с этим антителом. Следовательно, нельзя говорить о полном совпадении поверхностных структур МДА-модифицированных ЛНП и *in vivo* модифицированных липопротеидов.

Также не было выявлено изменений в структуре апоВ цммлНП при использовании антител 5F8 и 4С11. Эти антитела получены к участкам апоВ белка с 1 по 1297 аминокислотный остаток и с 2377 по 2658 аминокислотный остаток соответственно. Вероятно, изменения структуры апоВ происходящие в цммлНП не затрагивают соответствующие фрагменты N концевой участка макромолекулы апоВ.

Таким образом, при использовании четырех моноклональных антител к из семи были обнаружены различия во взаимодействии антител с цммлНП и нативными липопротеидами.

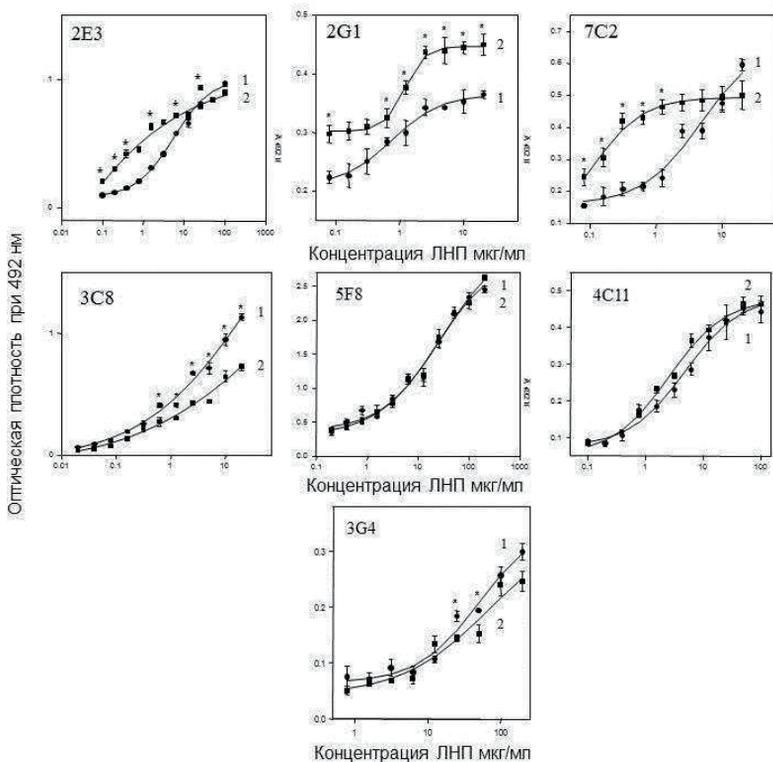


Рисунок 31 - Концентрационные зависимости взаимодействия нативных (1) и циркулирующих модифицированных ЛНП (2) с моноклональными антителами к апо-В человека. На графиках показаны данные типичного эксперимента, результаты которого представлены как среднее трех определений \pm стандартное математическое отклонение. Звездочкой отмечено достоверное отличие от нативных ЛНП, $p < 0,05$.

2.24.2.2 Изучение конформационных изменений апоВ белка под влиянием протеолитических ферментов.

Результаты исследования взаимодействия нативных и модифицированных протеолитическими ферментами ЛНП с моноклональными антителами различных клонов представлены на рис. 32 и 33. Было обнаружено, что ЛНП, предварительно обработанные химотрипсином, эффективнее, чем нативные ЛНП взаимодействуют с антителами клонов 3С8 и 2Е3 (рис. 32). С другой стороны, нативные ЛНП лучше, чем ферментативно-модифицированные, связывались с антителами клона 4С11 (рис. 32). Использование других клонов не выявило достоверных различий в их связывании с нативными и обработанными химотрипсином ЛНП. В качестве примера на рис. 32 приведены результаты, полученные для клона 5F8. В таблице 9 приведены результаты исследования антигенных профилей апоВ цмЛНП и протеолитически модифицированных ЛНП. Видно, что только антитело 2Е3 в обоих случаях предпочтительно распознает модифицированные липопротеиды. Возможно, в структуре цмЛНП и модифицированных химотрипсином ЛНП происходят сходные изменения в результате которых соответствующий участок апоВ, с 3728 по 4306 аминокислотные остатки, становится более доступным для взаимодействия с антителом. Кроме того, антитела 5F8 и 3G4, также как в случае циркулирующих модифицированных ЛНП, одинаково взаимодействовали с нативными и модифицированными липопротеидами. Видимо, соответствующие участки апоВ белка не изменены как в составе цмЛНП, так и в структуре модифицированных химотрипсином ЛНП. Приведенные факты могут говорить об определенном сходстве структур цмЛНП и модифицированных химотрипсином липопротеидов.

Таблица 9 - Антигенные различия апо В-100 нативных, цммЛНП и обработанных протеолитическими ферментами ЛНП. М – антитело достоверно лучше связывается с ЛНП, модифицированными ферментом; Н - антитело лучше связывается с нативными ЛНП; 0 – различия в связывании антитела с нативными и модифицированными ферментом ЛНП не достоверны.

клон	цммЛНП	химотрипсин	трипсин
3С8	Н	М	Н
4С11	0	Н	Н
2Е3	М	М	0
5F8	0	0	0
2G1	М	0	0
7С2	М	0	0
3G4	0	0	0

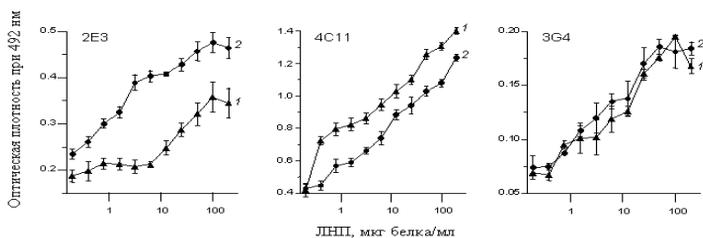


Рисунок 32 - Концентрационные зависимости взаимодействия нативных (1) и обработанных химотрипсином ЛНП (2) с моноклональными антителами к апо В-100 человека. На графиках показаны данные типичного эксперимента, результаты которого представлены как среднее трех определений \pm стандартное математическое отклонение

Изучение связывания моноклональных к апо В-100 антител с модифицированными трипсином ЛНП показало, что клоны 3С8 и 4С11 лучше взаимодействовали с нативными, чем с модифицированными трипсином ЛНП. Клоны 5F8, 2G1, 7C2 и 3G4 не выявили достоверной разницы в связывании с нативными и модифицированными химотрипсином ЛНП. В качестве примера на рис. 33 приведены результаты, полученные в случае использования клонов 4С11 и 5F8. Сопоставляя результаты взаимодействия моноклональных антител с цммЛНП и липопротеидами, модифицированными трипсином необходимо отметить, что только антитело 3С8 в обоих случаях сильнее связывалось с нативными

липопротеидами чем с модифицированными (таблица 9). Еще два антитела не выявили различий как между нативными и цммЛНП, так и между ферментативно модифицированными и нативными липопротеидами. Как и в случае ЛНП модифицированных химотрипсином это антитела 5F8 и 3G4 (таблица 9). Вообще, как видно из таблицы 9 антигенные профили ЛНП, модифицированных трипсином и химотрипсином отличаются значительной гомологией – пять из семи использованных антител одинаково реагируют с модифицированными трипсином и химотрипсином ЛНП. В то же время, и в случае модификации трипсином, и при обработке химотрипсином, только три антитела реагировали с протеолитически модифицированными липопротеидами также как с цммЛНП. Итак, сравнивая антигенные профили протеолитически модифицированных липопротеидов и цммЛНП можно сделать вывод о некотором, но далеко неполном сходстве поверхностного расположения апоВ белка в циркулирующих модифицированных и ферментативно модифицированных ЛНП.

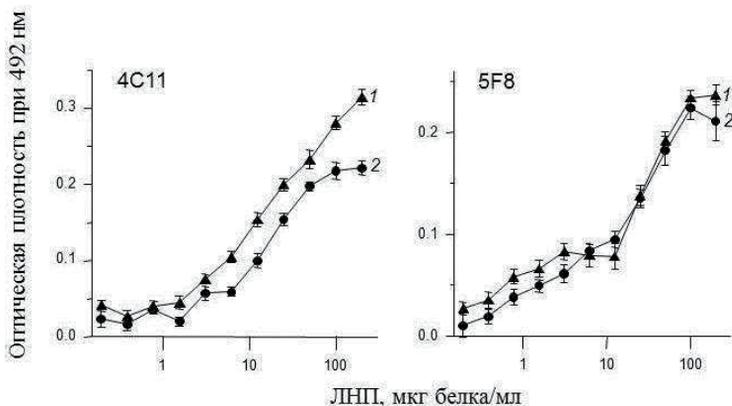


Рисунок 33 - Концентрационные зависимости взаимодействия нативных (1) и обработанных трипсином ЛНП (2) с моноклональными антителами к апо В-100 человека. На графиках показаны данные типичного эксперимента, результаты которого представлены как среднее трех определений \pm стандартное математическое отклонение.

2.24.2.3 Изучение конформационных изменений апоВ под влиянием липолитических ферментов.

С целью исследования влияния гидролиза фосфолипидов на конформацию апо В-100 изучалось связывание моноклональных антител с нативными ЛНП и ЛНП, модифицированными фосфолипазами С или А₂. Было показано, что клоны 2Е3 и 5F8 эффективнее связывались с ЛНП, подвергнутыми липолизу под действием фосфолипазы А₂. Клоны 4С11 и 3С8 напротив лучше взаимодействовали с нативными ЛНП, чем с ЛНП, модифицированными фосфолипазой А₂. Клоны 7С2, 2G1 и 3G4 не

выявили достоверной разницы в связывании с нативными и модифицированными фосфолипазой A₂ ЛНП.

Таблица 10 - Антигенные различия апо В-100 нативных, цммЛНП и обработанных липолитическими ферментами ЛНП. М – антитело достоверно лучше связывается с ЛНП, модифицированными ферментом; Н - антитело лучше связывается с нативными ЛНП; 0 – различия в связывании антитела с нативными и модифицированными ферментом ЛНП не достоверны.

клон	цммЛНП	фосфолипаза A ₂	фосфолипаза С
3С8	Н	Н	0
4С11	0	Н	0
2Е3	М	М	0
5F8	0	М	0
2G1	М	0	0
7C2	М	0	М
3G4	0	0	М

На рисунке 34 приведены результаты типичных экспериментов для клонов 7C2, 3С8, 5F8. Из таблицы 10 видна гомология антигенных профилей цммЛНП и липопротеидов модифицированных фосфолипазой A₂ – в обоих случаях антитело 3С8 предпочтительно реагирует с нативными липопротеидами, а антитело 2Е3 лучше связывается с модифицированными ЛНП. В то же время, антитело

3G4 не выявило различий как между цммЛНП и нативными липопротеидами, так и между нативными ЛНП и липопротеидами, модифицированными фосфолипазой A₂ и ЛНП, модифицированные фосфолипазой C, лучше чем нативные связывались с антителами 7C2 и 3G4, для остальных антител достоверной разницы между взаимодействием с модифицированными фосфолипазой C и нативными ЛНП не обнаружено.

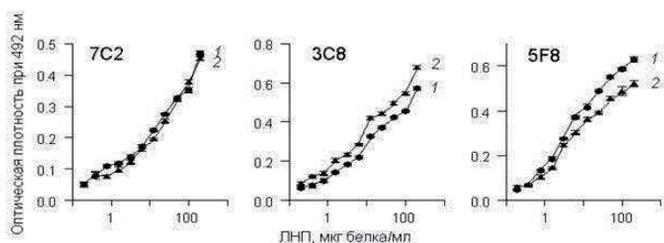


Рисунок 34 - Концентрационные зависимости взаимодействия нативных (1) и обработанных фосфолипазой A₂ ЛНП (2) с моноклональными антителами к апо В-100 человека. На графиках показаны данные типичного эксперимента, результаты которого представлены как среднее трех определений ± стандартное математическое отклонение.

В качестве примера на рис. 35 приведены концентрационные зависимости связывания клонов 3G4 и 7C2 с нативными и обработанными фосфолипазой C ЛНП. Необходимо отметить очевидную разницу между взаимодействием использованных клонов антител с ЛНП, обработанными фосфолипазой C и цмм ЛНП. Только антитело 7C2 предпочтительно распознавало как цммЛНП, так и

липопротеиды, модифицированные фосфолипазой С. Кроме того, для антител 4С11 и 5F8 не было выявлено достоверной разницы в связывании с модифицированными и нативными липопротеидами как в случае цммЛНП, так и в случае ферментативно модифицированных липопротеидов (см. таблицу 10). Таким образом, можно заключить, что липолитическая модификация ЛНП фосфолипазой С или фосфолипазой А₂ не приводят к формированию антигенной структуры апоВ, идентичной таковой у цммЛНП. При сравнении антигенных профилей ЛНП, модифицированных двумя разными фосфолипазами выявлено только одно совпадение – антитело 2G1 в обоих случаях одинаково взаимодействовало с нативными и ферментативно модифицированными ЛНП. Интересно, что антитела 2G1, 7C2 и 3G4 специфичны к апо В-100, модифицированному МДА не выявили антигенных различий между нативными ЛНП и ЛНП, обработанными фосфолипазой А₂. В то же время два антитела (7C2 и 3G4) лучше связывались с ЛНП, обработанными фосфолипазой С, по сравнению с нативными ЛНП (см. таблицу 11). По-видимому, это значит, что фосфолипаза С в отличие от фосфолипазы А₂ вызывает конформационные изменения апо В-100 на поверхности ЛНП отчасти аналогичные тем, которые происходят под действием известного продукта пероксидации липидов – МДА.

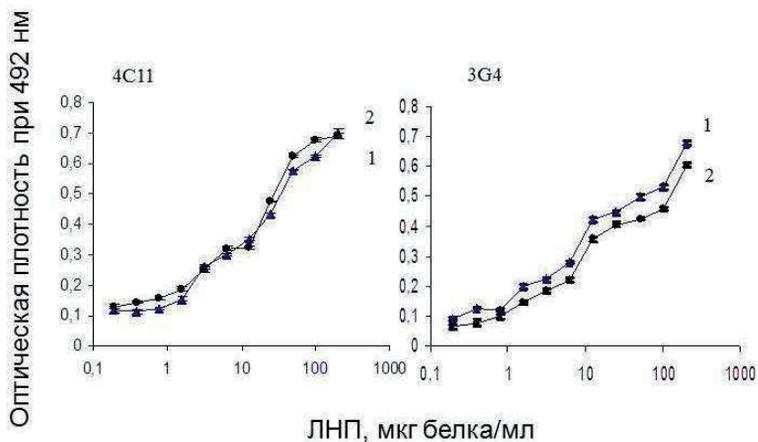


Рисунок 35 - Концентрационные зависимости взаимодействия нативных (1) и обработанных фосфолипазой С ЛНП (2) с моноклональными антителами к апо В-100 человека. На графиках показаны данные типичного эксперимента, результаты которого представлены как среднее трех определений \pm стандартное математическое отклонение

2.24.2.4 Изучение конформационных изменений апоВ под влиянием миелопероксидазы.

При сравнении антигенных различий апоВ белка нативных ЛНП и обработанных миелопероксидазой липопротеидов было продемонстрировано, что нет достоверных различий во взаимодействии антител клонов 2G1, 5F8, 7C2 с нативными и ферментативно модифицированными ЛНП. С другой стороны, антитела клонов 2E3 и 3C8 достоверно эффективнее связывались с апоВ на поверхности модифицированных миелопероксидазой нативных ЛНП в сравнении с нативных ЛНП, тогда как антитела клонов 3G4 и 4C11, напротив, интенсивнее взаимодействовали с апоВ нативных ЛНП. Результаты экспериментов суммированы в таблице 11.

На рисунке 36 приведены 3 типичных примера для случаев, когда антитела обладают более высоким сродством к нативным ЛНП, модифицированным миелопероксидазой (клон 3C8), к нативных ЛНП (клон 3G4) или когда достоверные различия в связывании с апоВ на поверхности модифицированных миелопероксидазой и нативных ЛНП отсутствуют (клон 7C2).

Таблица 11 - Антигенные различия апо В-100 нативных, цммЛНП и обработанных миелопероксидазой ЛНП. М – антитело достоверно лучше связывается с ЛНП, модифицированными ферментом; Н - антитело лучше связывается с нативными ЛНП; 0 – различия в связывании антитела с нативными и модифицированными ферментом ЛНП не достоверны.

клон	цммЛНП	миелопероксидаза а
3С8	Н	М
4С11	0	Н
2Е3	М	М
5F8	0	0
2G1	М	0
7С2	М	0
3G4	0	Н

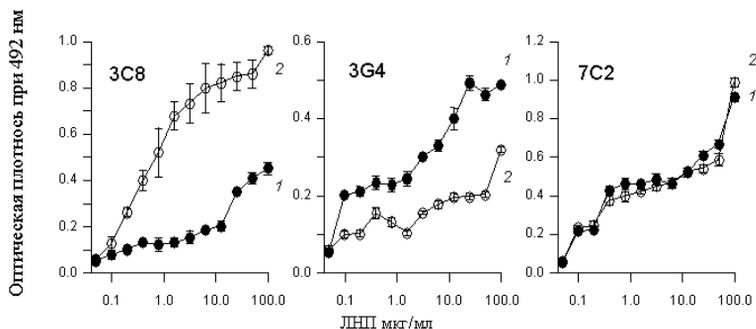


Рисунок 36 - Концентрационные зависимости взаимодействия нативных (1) и обработанных миелопероксидазой ЛНП (2) с моноклональными антителами к апо В-100 человека. На графиках показаны данные типичного эксперимента, результаты которого представлены как среднее трех определений \pm стандартное математическое отклонение.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что инкубация нативных ЛНП с миелопероксидазой в присутствии субстратов фермента (H_2O_2 , Cl) приводит к изменению конформации макромолекулы апоВ на поверхности частицы нативных ЛНП. Эти изменения отчасти сходны с теми, которые происходят на поверхности цммЛНП – выявлено два антитела одинаково взаимодействующих с циркулирующими множественно модифицированными липопroteидами и нативными ЛНП. Так, антитело 2Е3 предпочтительно взаимодействует с модифицированными миелопероксидазой липопroteидами и цммЛНП чем с нативными (таблица 11). В то же время, антитело 5F8 одинаково взаимодействовало с нативными, цммЛНП и модифицированными миелопероксидазой липопroteидами. Таким образом, при сравнении антигенных профилей цммЛНП и

липопротеидов, модифицированных миелопероксидазой выявлено только два совпадения. Видимо, модификация ЛНП миелопероксидазой не может привести к появлению цммЛНП.

2.24.2.5 Изучение конформационных изменений апоВ под влиянием нейраминидазы.

При сравнении способности моноклональных антител к апоВ-100 белку взаимодействовать с нативными и обработанными нейраминидазой липопропротеидами было показано, что антитела 3С8, 2Е3, 5F8 и 7С2 предпочтительно связывались с ферментативно-модифицированными ЛНП. Другие клоны: 4С11, 2G1 и 3G4 одинаково взаимодействовали с нативными и ферментативно модифицированными ЛНП. Результаты типичных экспериментов с моноклональными антителами 2Е3 и 3G4 приведены на рисунке 41. Из четырех клонов, показавших лучшее связывание с цмЛНП по сравнению с нативными ЛНП, два антитела 2Е3 и 7С2 также предпочтительно распознавали модифицированные нейраминидазой ЛНП (таблица 12). Другое антитело 4С11 не выявило различий как между нативными и цммЛНП, так и между нативными и модифицированными нейраминидазой липопропротеидами. Только три из семи антител одинаково взаимодействовало с цммЛНП и липопропротеидами, модифицированными нейраминидазой. Это говорит о незначительном сходстве поверхностных структур цммЛНП и обработанных нейраминидазой липопропротеидов.

Таблица 12 - Антигенные различия апо В-100 нативных, цммЛНП и обработанных нейраминидазой ЛНП. М – антитело достоверно лучше связывается с ЛНП, модифицированными ферментом; Н - антитело лучше связывается с нативными ЛНП; 0 – различия в связывании антитела с нативными и модифицированными ферментом ЛНП не достоверны.

клон	цммЛНП	нейраминидаза
3С8	Н	М
4С11	0	0
2Е3	М	М
5F8	0	М
2G1	М	0
7С2	М	М
3G4	0	0

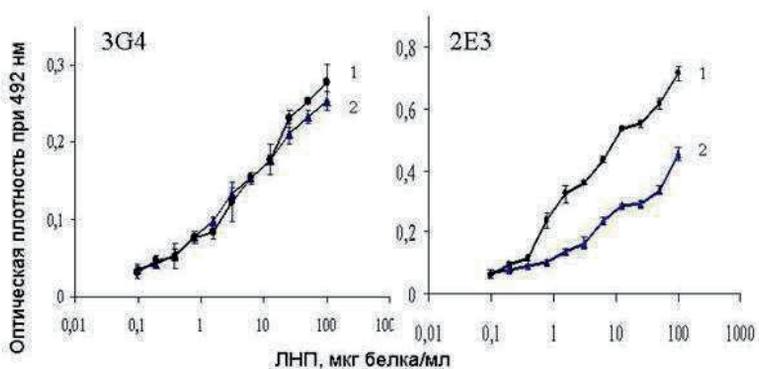


Рисунок 41 - Концентрационные зависимости взаимодействия нативных ЛНП (1) и нативных ЛНП, предварительно модифицированных нейраминидазой (2) с моноклональными антителами к апо-В человека (клоны 2Е3, 3G4). На графиках показаны данные типичного эксперимента, результаты которого представлены как среднее трех определений \pm стандартное математическое отклонение

2.24.2.6 Сопоставление результатов изучения конформационных изменений апоВ цммЛНП и ферментативно модифицированных липопротеидов.

Описанные выше результаты изучения взаимодействия моноклональных антител с цммЛНП и ферментативно модифицированными липопротеидами

обобщены в таблице 13. Из данных таблицы 13 видно можно сделать вывод, что ни одна из использованных ферментативных модификаций не воспроизводит антигенный профиль, свойственный для цммЛНП. Для большинства ферментативных модификаций количество антител одинаково распознающих цммЛНП и ферментативно модифицированные липопротеиды составляет три из семи использованных в работе. В случае модификации ЛНП миелопероксидазой выявлено два совпадения с антигенным профилем цммЛНП. Можно также отметить некоторые общие закономерности взаимодействия моноклональных антител к апоВ белку с модифицированными различным образом липопротеидами. Так, антитело 2Е3 лучше реагирует с цммЛНП, липопротеидами модифицированными химотрипсином, фосфолипазой А2, миелопероксидазой, нейраминидазой чем с нативными липопротеидами.

Вероятно, распознаваемый этим антителом фрагмент апоВ белка с 3728 по 4306 аминокислотный остаток, становится более доступным для взаимодействия с антителом в результате большинства исследованных модификаций ЛНП. С другой стороны, антитело 5F8 выявило различия между модифицированными и нативными ЛНП, только в случае модификаций фосфолипазой А2 и нейраминидазой. Возможно, соответствующий фрагмент апоВ (1-1297

аминокислотные остатки) устойчив к большинству исследованных модификаций.

Таблица 13 - Антигенные различия апо В-100 нативных и обработанных различными ферментами ЛНП. М – антитело достоверно лучше связывается с ЛНП, модифицированными ферментом; Н - антитело лучше связывается с нативными ЛНП; 0 – различия в связывании антитела с нативными и модифицированными ферментом ЛНП не достоверны.

	3С8	4С11	2Е3	5F8	2G1	7С2	3G4
цмЛНП	Н	0	М	0	М	М	0
химотрипсин	М	Н	М	0	0	0	0
трипсин	Н	Н	0	0	0	0	0
фосфолипаза А ₂	Н	Н	М	М	0	0	0
фосфолипаза С	0	0	0	0	0	М	М
миелопероксидаза	М	Н	М	0	0	0	Н
нейраминидаза	М	0	М	М	0	М	0

2.24.3 Модуляция ассоциации полаксамерами

Ранее нами было продемонстрировано, что модифицированные любым способом ЛНП образуют ассоциаты, и эти ассоциаты проявляют атерогенные свойства, вызывая накопление внутриклеточных липидов. Была выявлена прямая зависимость между размером ассоциатов ЛНП и их способностью вызывать накопление липидов в клетках, причем нативные ЛНП не образовывали ассоциатов и не обладали атерогенными свойствами, т.е. не вызывали накопление внутриклеточных липидов. Можно сделать предположение, что без модификации ЛНП невозможна их ассоциация, без ассоциации ЛНП не проявляются их атерогенные свойства. Исходя из этого, особый интерес представляет поиск модуляторов процесса ассоциации ЛНП.

Известно несколько эндогенных ингибиторов ассоциации ЛНП, такие как липопротеид-дефицитная сыворотка (Talbot RM, 2003), бычий сывороточный альбумин (БСА), липопротеиды высокой плотности (ЛВП) (Khoо JC, 1990) здоровых доноров и основной аполипопротеид ЛВП - apoA-I. Все они обладают амфифильными свойствами и, по-видимому, взаимодействуя с гидрофобными участками на поверхности ЛНП, предотвращают взаимодействие частиц ЛНП между собой и, тем самым, ингибируют ассоциацию. Мало известно об экзогенных ингибиторах ассоциации. Между тем, поиск и изучение нетоксичных и биодоступных ингибиторов ассоциации ЛНП представляет большой практический интерес, если рассматривать подавление ассоциации ЛНП в качестве терапевтического подхода. Мы предположили, что на эту роль могут претендовать амфифильные сополимеры окиси пропилена (ОП) и окиси этилена (ОЭ), так называемые полаксамеры. В данной работе

изучена способность различных полаксамеров влиять на ассоциацию ЛНП. Данные изученных полаксамеров представлены в таблице.

Таблица 4 – Основные характеристики использованных в работе полаксамеров

Полаксамер	ММ	Состав	ГЛБ*	ККМ при 37°С, %	ККМ при 37°С, мМ
L 61	1900	ЭО ₂ ПО ₃₀ ЭО ₂	3	0,002%	0,01
L 64	3000	ЭО ₁₃ ПО ₃₀ ЭО ₁₃	15	0.03 %	0,1
L 81	2750	ЭО ₃ ПО ₄₀ ЭО ₃	2	0,0007%	0,0026
P85	4500	ЭО ₂₆ ПО ₄₀ ЭО ₂₆	16	0.02 %	0.044
F68	8400	ЭО ₈₀ ПО ₂₇ ЭО ₈₀	29	0,4%	0.044

Было проведено сравнительное исследование действия полаксамеров с различными гидрофильно-липофильными свойствами на процесс ассоциации ЛНП. Так, использовались полаксамер F68, обладающий высоким значением ГЛБ 29 и выраженными гидрофильными свойствами, полаксамеры L61 и L81, характеризующиеся значительной гидрофобностью (ГЛБ 3 и 2, соответственно), и полаксамер P85 и L64 с умеренными гидрофильными и липофильными свойствами (ГЛБ 16 и 15, соответственно). В экспериментах были использованы концентрации

полаксамеров кратные ККМ амфифильных блок-сополимеров. Эта часть работы была проведена в сотрудничестве с кафедрой ВМС Химического факультета МГУ, (зав. лабораторией - профессор А.А. Ярослав).

2.24.3.1 Влияние полаксамеров P85 и L64 на ассоциацию ЛНП.

На рисунках приведены типичные кинетические кривые изменения размера ассоциатов ЛНП в случае спонтанной ассоциации и в присутствии полаксамера P85. Видно, что при спонтанной ассоциации происходит образование ассоциатов ЛНП и увеличение их размера в зависимости от времени инкубации (Рис. 38, кривая 1). В то же время в случае присутствия в инкубационной среде различных концентраций полаксамера P85 формирование ассоциатов заметно ингибировалось. Так, добавление к эмульсии ЛНП до начала инкубации полаксамера P85 в концентрации 0,1% (в/в %) ингибировало процесс ассоциации после 4,5 часов инкубации на 93%, а применение концентрации 0,01% вызывало подавление процесса ассоциации после 4,5 часов инкубации на 79 % (Рис. 38, кривые 2 и 3). Аналогичные данные были получены другим методом. На рисунке 39 представлены типичные кривые изменения флуктуации светопропускания эмульсии ЛНП в присутствии различных концентраций полаксамера в инкубационной среде. Как видно из рисунка 39, наименьшая концентрация полаксамера P85 – 0.001% не оказывала влияния на процесс ассоциации ЛНП.

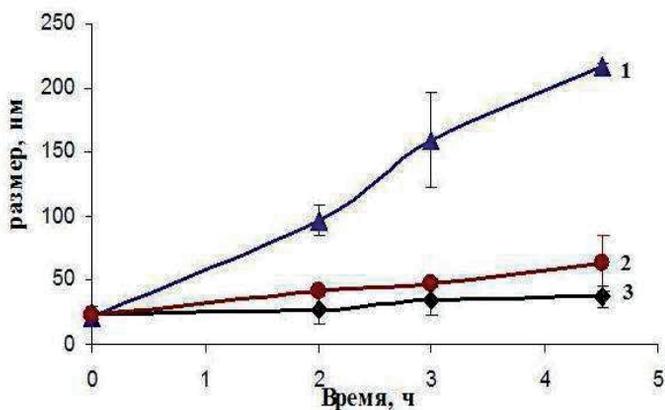


Рисунок 38 - Кинетические кривые изменения среднего размера частиц ЛНП под влиянием полаксамера P85. Среда инкубации – ИФБ, pH 7,4, концентрация ЛНП 2,5 мг белка/мл, температура инкубации 37°С, скорость перемешивания 1000 об/мин. Кривая (1) – суспензия ЛНП в отсутствие полаксамера P85, кривые (2) и (3) в присутствии, соответственно, 0,1% и 0,01% полаксамера P85.

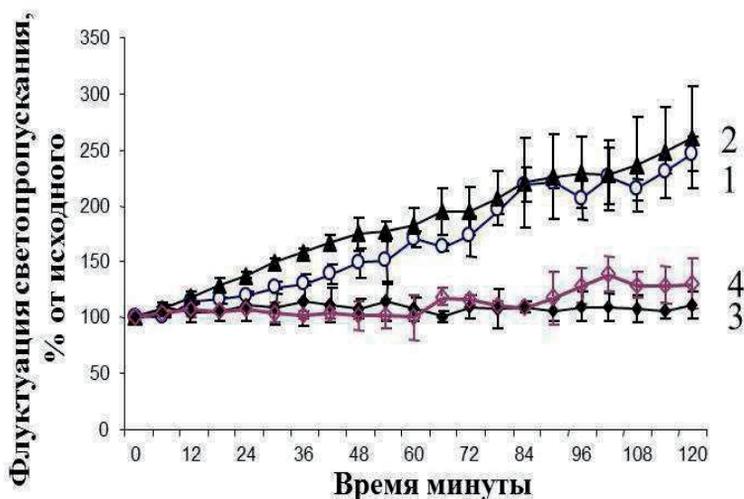


Рисунок 39 - Кинетические кривые изменения флуктуации светопропускания суспензии под влиянием полаксамера Р85. Среда инкубации – ИФБ, рН 7,4, концентрация ЛНП 0,5 мг белка/мл, температура инкубации 37°С, скорость перемешивания 100 об/мин. Кривая (1) – суспензия ЛНП в отсутствие полаксамера Р85, кривые (2),(3) и (4) в присутствии, соответственно, 0,001% 0,1% и 0,01% полаксамера Р85.

Когда полаксамер Р85 добавлялся в эмульсию ЛНП в ходе инкубации, то есть когда процесс ассоциации частиц уже был инициирован, также наблюдалось предотвращение ассоциации липопротеидов (Рис. 40). Полаксамер Р85 в концентрации 0,1% добавлялся к эмульсии ЛНП после первого и после второго часа инкубации, в обоих случаях не

происходило дальнейшего увеличения среднего размера частиц, т.е. ассоциация полностью подавлялась. Необходимо отметить, что добавление полаксамера не вызывало уменьшение среднего размера ассоциатов, можно предположить, что под действием полаксамера не происходило диссоциации образовавшихся ассоциатов ЛНП.

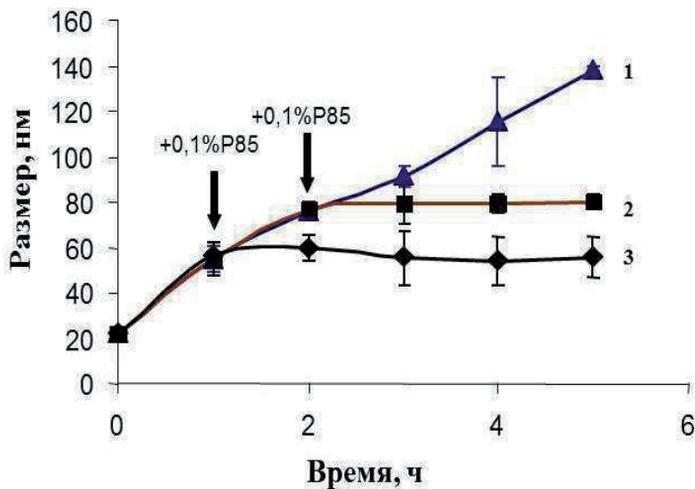


Рисунок 40 - Кинетические кривые изменения среднего размера частиц ЛНП под влиянием полаксамера P85. Среда инкубации – ИФБ, pH 7,4, концентрация ЛНП 2,5 мг белка/мл, температура инкубации 37°С, скорость перемешивания 1000 об/мин. Кривая (1) – суспензия ЛНП в отсутствие полаксамера P85, кривая (2) – в присутствии 0,1 % полаксамера P85, добавленного после 2 часов инкубации, кривая (3) – в присутствии 0,1 % полаксамера P85, добавленного после 1 часа инкубации.

Аналогичные данные были получены при внесении различных концентраций полаксамера L61 к инкубируемым липопротеидам. При концентрации полаксамера, близкой к ККМ (0,03%), липопротеиды не слипались, при меньшей концентрации – образовывались агрегаты (рис. 45)

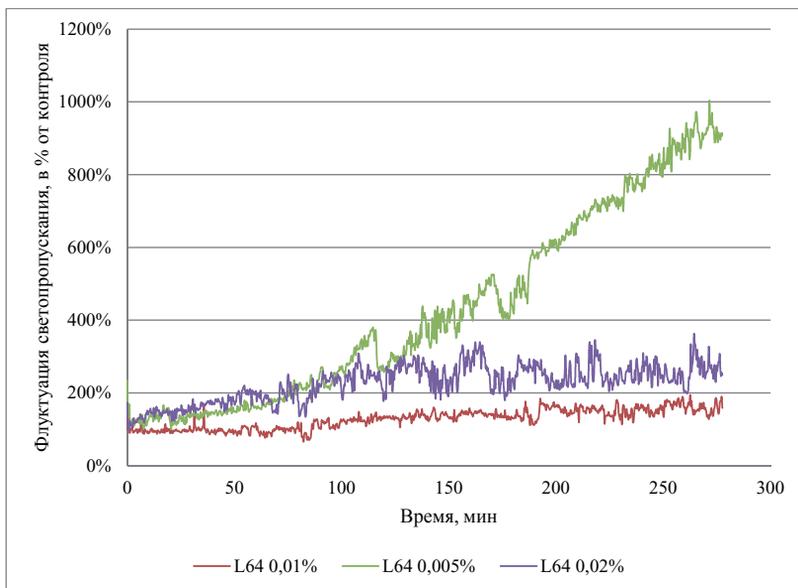
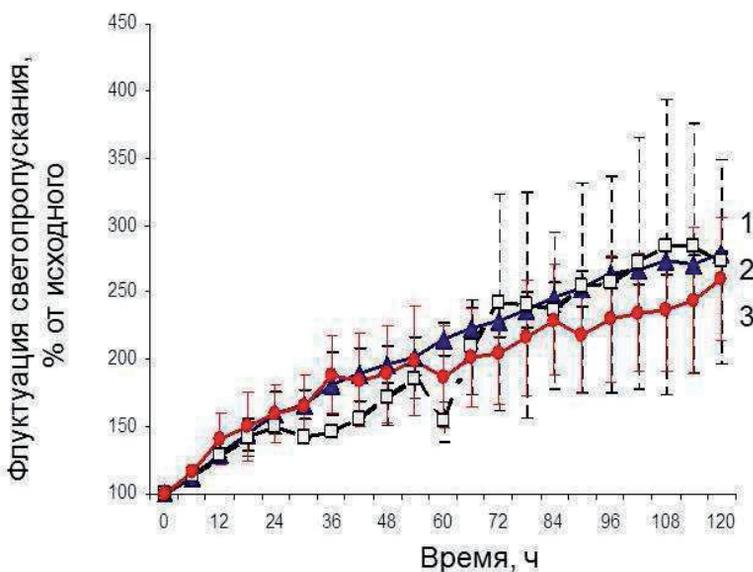


Рисунок 41- Кинетические кривые изменения среднего размера частиц ЛНП под влиянием полаксамера L64.

Среда инкубации – ИФБ, рН 7,4, концентрация ЛНП 1,0 мг белка/мл, температура инкубации 37 °С, скорость перемешивания 100 об/мин. Кривая L64 0,01% – суспензия ЛНП в присутствии 0,01% полаксамера L64, кривая L64 0,005% – суспензия ЛНП в присутствии 0,005% полаксамера L64, кривая L64 0,02% – суспензия ЛНП в присутствии 0,02% полаксамера L64.

2.24.3.2 Влияние полаксамера F68 на ассоциацию ЛНП

Было показано, что другой полаксамер - F68, характеризующийся выраженными гидрофильными свойствами и высоким значением ГЛБ, не оказывает влияния на процесс ассоциации частиц ЛНП. На рисунке 42 приведены типичные кинетические кривые изменения флуктуации светопропускания в присутствии полаксамера F68 в концентрации 0,4% и в отсутствие полаксамера (Рис. 42, кривые 1 и 2). Использование большей концентрации полаксамера F68 (4%) также не приводило к угнетению процесса ассоциации ЛНП (Рис. 42, кривая 3).



Риснок 42 - Кинетические кривые изменения флуктуации светопропускания суспензии ЛНП под влиянием полаксамера F68. Среда инкубации – ИФБ, рН 7,4, концентрация ЛНП 0,5 мг белка/мл, температура инкубации 37^oС, скорость перемешивания 100 об/мин. Кривая (1) – суспензия ЛНП в отсутствие полаксамера F68, кривая (2) в присутствии 0,4% полаксамера F68.

2.24.3.3 Влияние полаксамеров L61 и L81 на ассоциацию ЛНП

Применение обладающих выраженными гидрофобными свойствами и низким значением ГЛБ полаксамеров L61 и L81 с ГЛБ 3 и 2, соответственно, приводило к подавлению ассоциации ЛНП. Так, в концентрации 0,022% полаксамер L61 на 78% ингибировал рост флуктуации светопропускания эмульсии ЛНП после 2 часов инкубации (Рис. 43, кривая 2). Использование большей концентрации полаксамера L61 - 0,22% приводило к почти полному подавлению ассоциации ЛНП, а применение меньшей концентрации – 0,0022% не влияло на ассоциацию частиц ЛНП (рис. 43 кривая 3). Наряду с этим, использование полаксамера L81 с аналогичными по гидрофобности свойствами в любых концентрациях не приводило к замедлению ассоциации ЛНП (рис. 44)

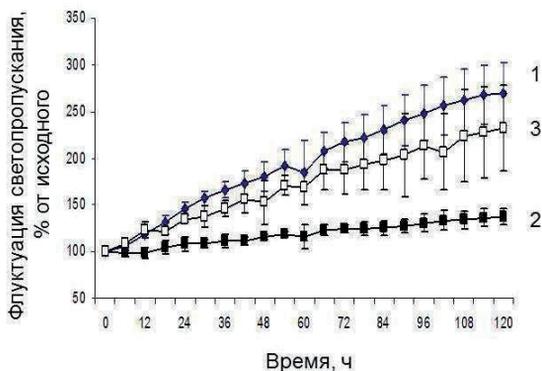


Рисунок 43 - Кинетические кривые изменения флуктуации светопропускания суспензии ЛНП под влиянием полаксамера L61. Среда инкубации – ИФБ, рН 7,4, концентрация ЛНП 0,5 мг белка/мл, температура инкубации 37°С, скорость перемешивания 100 об/мин. Кривая (1) – суспензия ЛНП в отсутствие полаксамера L61, кривая (2) в присутствии 0,022% полаксамера L61, кривая (3) в присутствии 0,0022% полаксамера L61

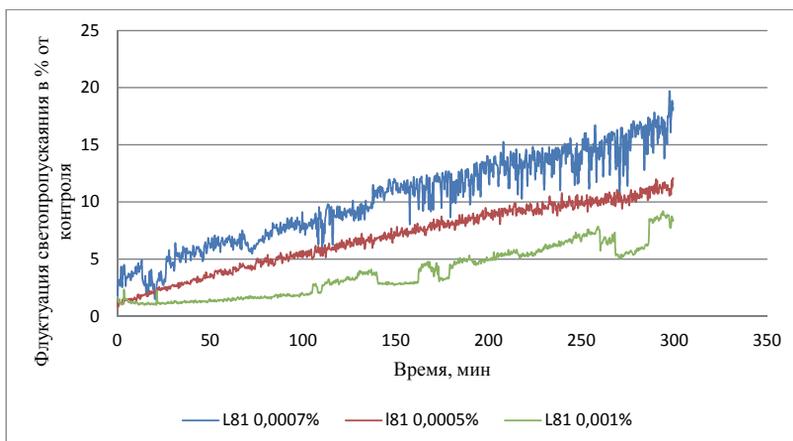


Рисунок 44 - Кинетические кривые изменения флуктуации светопропускания суспензии ЛНП под влиянием полаксамера L81. Среда инкубации – ИФБ, рН 7,4, концентрация ЛНП 0,5 мг белка/мл, температура инкубации 37⁰С, скорость перемешивания 100 об/мин.

Кривая L81 0,0007 – суспензия ЛНП в 0,0007% полаксамера L81, кривая L81 0,005 в присутствии 0,005% полаксамера L81, кривая L81 0,0001 в присутствии 0,0001% полаксамера L81

Представляется интересным тот факт, что как в случае полаксамера P85, так и в случае полаксамера L61 подавление процесса ассоциации вызывалось только в концентрациях превышающих или близких к ККМ. Так, ККМ для P85 составляет 0,01-0,03% и в концентрациях больших, чем 0,01% наблюдалось значительное угнетение ассоциации, а при уменьшении концентрации полаксамера до 0,001% ингибирующее действие не развивалось. ККМ полаксамера L61 равна 0,022% и использование концентраций больших, чем 0,022% эффективно ингибировало ассоциацию ЛНП, в то время как меньшие концентрации - 0,0022% не оказывали влияние на процесс ассоциации.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что способность амфифильных сополимеров окиси пропилена и окиси этилена ингибировать ассоциацию ЛНП прямо зависит от выраженности гидрофобных свойств полаксамера. Полаксамеры с выраженными и умеренными гидрофобными свойствами способны значительно ингибировать ассоциацию ЛНП. Необходимо отметить, что степень подавления ассоциации прямо зависит от концентрации полаксамера. Очевидно, именно мицеллярная форма полаксамера

способна вызывать ингибирование ассоциации частиц ЛНП, а унимеры полаксамеров ингибирующими свойствами не обладают.

2.25 Разработка методов диагностики факторов атерогенности

2.25.1 Разработка и модификация метода определения уровня цмЛНП в сыворотке

Как было показано выше, сыворотка больных с коронарным атеросклерозом вызывает накопление липидов в клетках, выделенных из неповрежденной интимы аорты человека, т.е. атерогенны. Циркулирующие множественно модифицированные ЛНП и антитела к ним также являются атерогенными компонентами сыворотки больных ССЗ. Было показано, что биохимический состав, физические характеристики, а также взаимодействие с клеточными рецепторами данных липопротеидов кардинально отличается от нативных ЛНП. Основное различие заключается в низком содержании сиаловой кислоты, терминальном сахаре биантенной цепи аполипопротеина (апо) В. Учитывая, что после удаления сиаловой кислоты, терминальным сахаром становится галактоза, был разработан способ выделения модифицированных ЛНП на сорбенте с иммобилизованным агглютинином *Ricinus communis* (РКА120). Данный агглютинин имеет высокое сродство к терминальной бета-галактозе и низкое сродство к другим сахарным остаткам, входящим в состав полисахаридных цепей ЛНП (Baenziger JU, 1979). Таким образом, цмЛНП связывались на колонке с пришитым РКА120 и элюировались 50мМ раствором галактозы (Tertov VV, 1990).

В данном исследовании был разработан метод для определения содержания циркулирующих множественно модифицированных ЛНП в сыворотке крови. Этот метод основан на связывании цмЛНП с помощью иммобилизованного на пластик РКА120, с последующим

измерением связавшегося апоВ конъюгированными с пероксидазой поликлональными антителами.

Были изучены образцы крови 22 мужчин в возрасте от 28 до 56 лет. Содержание общего холестерина и триглицеридов в сыворотке не превышало 5,2 и 1,7 ммоль/л, соответственно. Кровь для исследований забирали натощак в пробирку с ЭДТА, полученную сыворотку стерилизовали пропусканием через фильтр с размером пор 45 нм. ЛНП и цмЛНП были выделены и охарактеризованы, как описано в главе Материалы и методы.

Для определения содержания десалированных ЛНП в сыворотке использовали 96 –луночный плашки (Nunc, Roskilde, Denmark). В лунки вносили по 100 мкл раствора RCA₁₂₀ в изотоническом фосфатном буфере (ИФБ; GIBCO, Paisley, Великобритания; KCl 0,2 г/л, K₂PO₄ 0,2 г/л, NaCl 8 г/л, Na₂HPO₄ 1,15 г/л, pH 7,2) в концентрации 30 мкг/мл и инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Заем лунки промывали четыре раза ИФБ, содержащем 2 г/л бычьего сывороточного альбумина (БСА) (ИФБ/БСА), затем в лунки вносили по 100мкл раствора БСА в ИФБ в концентрации 20 г/л и оставляли при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем лунки снова промывали раствором ИФБ/БСА и вносили 100 мкл исследуемого образца в ИФБ и инкубировали в течение 2-х часов при 20°C. Потом лунки снова промывали раствором ИФБ/БСА и вносили по 100 мкл меченых пероксидазой поликлональных антител (1 мкг/мл) и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Последующее проявление проводили добавлением 0,1 М цитратного буфера, pH 4,5, содержащего 0,04% ортофенилендиамина и 0,003% H₂O₂. Инкубировали 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 20 мкл 50% H₂SO₄. Оптическую плотность измеряли при длине волны

492 нм на многоканальном спектрофотометре Multiskan Bichromatic (Labsystems OY, Helsinki, Финляндия).

Для определения оптимальной концентрации РКА120, необходимой для связывания цмЛНП, был проведен ряд экспериментов. Из данных, представленных на рисунке 45 видно, что количество десалированных ЛНП, связывающихся с РКА120 остается постоянным при концентрации агглютинина 30-50мг/л. Таким образом, в дальнейшем РКА120 использовали в концентрации 30мг/л.

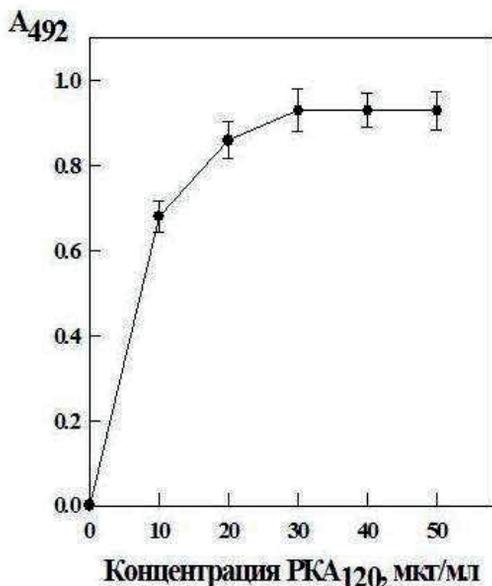


Рисунок 45 - Концентрационная зависимость для покрывающего раствора

Для определения оптимальной концентрации антиапо-В поликлональных антител были исследованы пять разведений

последних. На рисунке 46 видно, что в диапазоне концентраций 5-20 мг/л количество определяющегося апоВ остается неизменным, поэтому в качестве оптимальной была выбрана концентрация поликлональных антител к апоВ100 в 10мг/л.

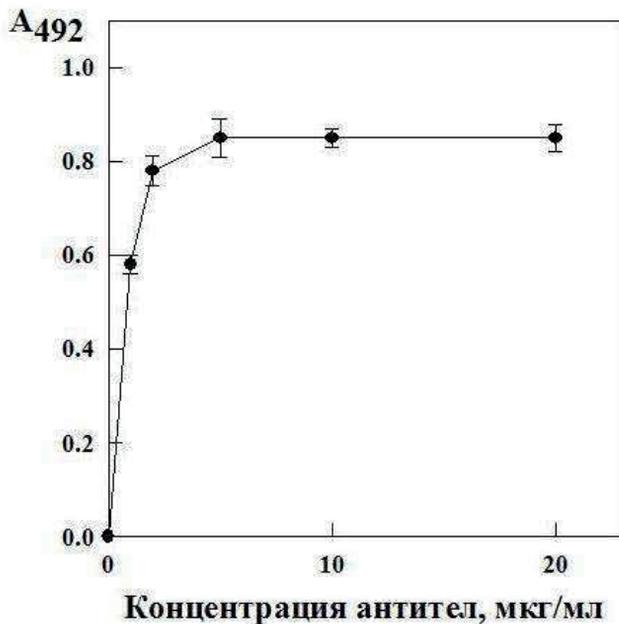


Рисунок 46 - Концентрационная зависимость для анти-апоВ поликлональных антител.

На рисунке 47 представлена типичная кривая титрования обработанных нейраминидазой десалированных ЛНП при использовании оптимальных концентраций лектина (30мг/л) и антител к апоВ (10мг/л).

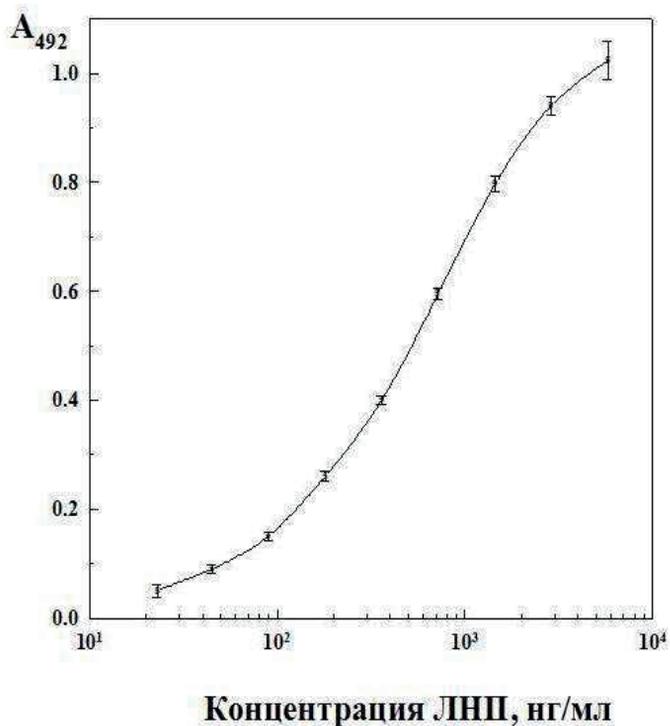


Рисунок 47 - Калибровочная кривая для ЛНП, обработанных нейраминидазой

Калибровочные кривые обработанных нейроминидазой ЛНП, выделенных из крови больных цммЛНП и нативных ЛНП представлены на рис. 48. Видно, что кривые обработанных нейраминидазой ЛНП и цммЛНП практически совпадают. Также видно, что данный метод может использоваться при определении концентрации десиалированных ЛНП в сыворотке крови в диапазоне 20-800г/л. При этом сиалированные (нативные) ЛНП, выделенные с помощью лектиновой хроматографии, не связываются с РКА120 вплоть до концентрации 1000г/л.

Для определения специфичности РКА120 при определении содержания десиалированных ЛНП, образцы ЛНП были обработаны галактозидазой для удаления углеводных остатков, как описано у Nafai с соавт. (Nagai T, 1989). Данная методика позволяет удалить более 95% галактозы, содержащейся в ЛНП. Обработанные галактозидазой десиалированные ЛНП не связывались с лектиновой подложкой по сравнению с необработанными ЛНП.

На рисунке 49 представлено сравнение кривых титрации сыворотки и ЛНП, выделенных из крови больных ССЗ и здоровых лиц. Видно, что данные кривые практически совпадают при определении содержания десиалированных ЛНП как в сыворотке, так и в липопротеинах, выделенных из крови. Таким образом, можно сделать вывод о том, что компоненты сыворотки практически не влияют на точность определения содержания десиалированных ЛНП в ней в диапазоне концентраций 20-200μг/л. При сравнении содержания цммЛНП в сыворотке крови от 12 пациентов и в общей фракции ЛНП, выделенной из крови тех же пациентов, коэффициент корреляции составил 0,9 (см. рис 50).

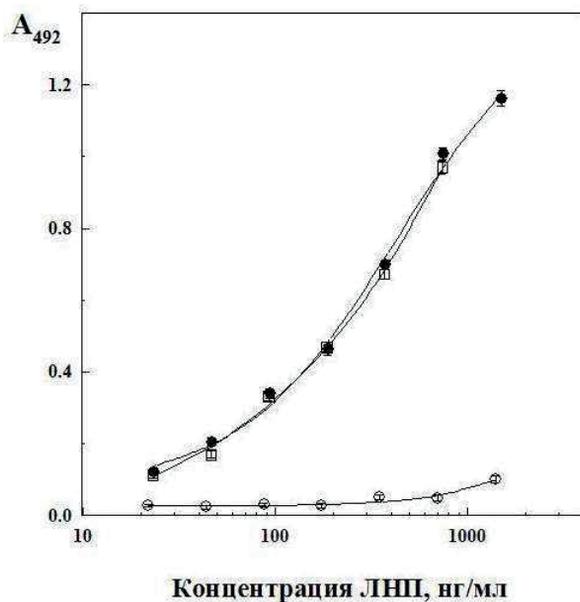


Рисунок 48 - Калибровочные кривые для нативных ЛНП (o), цмЛНП (•) и ЛНП, обработанных нейраминидазой (□).

На рисунке 52 представлены данные определения уровня дезацелированных ЛНП в сыворотке методами ИФА и лектиновой хроматографии. Видно, что они практически совпадают.

Таким образом, данная методика может быть использована в дальнейшем для рутинного определения содержания цмЛНП в сыворотке крови. Именно этот метод использован при разработке макета аналитической тест-системы для применения в медицине при экспрессной диагностике атерогенных дислипидемий при сердечно-сосудистых патологиях

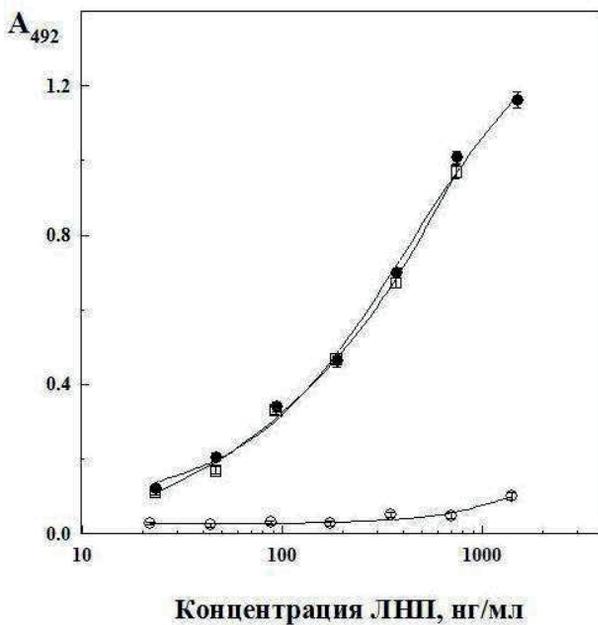


Рисунок 49 - Определение цмЛНП здоровых лиц (1, 2) и пациентов с коронарным атеросклерозом (3, 4) в цельной сыворотке (1, 4) и выделенных препаратах суммарных ЛНП (2, 3).

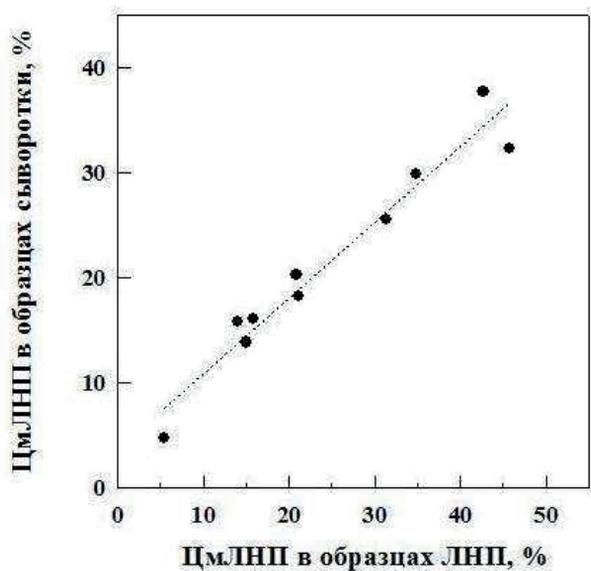


Рисунок 51 - Корреляция между количеством цмЛНП, определенном в цельной сыворотке, и количеством цмЛНП, измеренном в выделенном препарате суммарных липопротеидов.

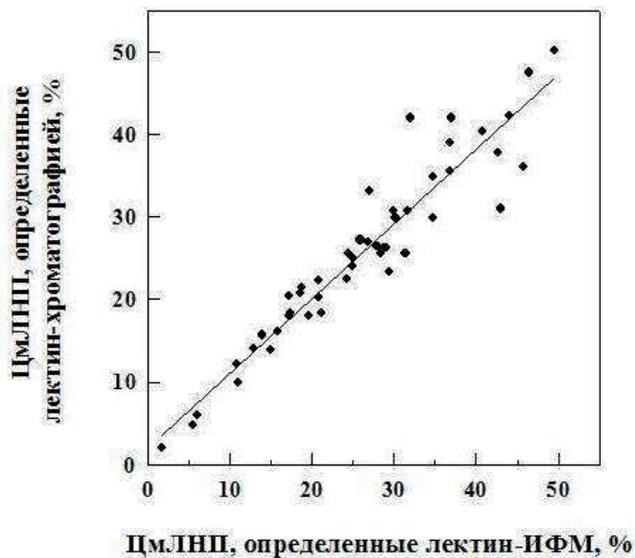


Рисунок 52 - Корреляция между уровнями цМЛНП, определенными твердофазным лектин-иммуноферментным методом (лектин-ИФМ) и с помощью колоночной хроматографии.

2.25.2 Сравнение диагностической значимости цмЛНП и ЦИК-

ЛНП

Как было сказано выше уровень ЦИК, цмЛНП и атерогенность сыворотки крови (способность сыворотки вызывать внутриклеточное накопление холестерина) являются факторами риска развития атеросклероза. Мы обследовали три группы пациентов, у которых определили указанные параметры и выяснили, есть ли корреляция между ними.

Было обследовано три группы пациентов:

- I. пациенты без симптомов атеросклероза,
- II. пациенты с выраженной гиперхолестеринемией,
- III. пациенты с клиническими проявлениями атеросклероза (ишемическая болезнь сердца, перенесенный инфаркт миокарда, перенесенный инсульт).

В первую группу вошли 58 человек, мужчины от 45 до 70 лет и женщины после менопаузы, уровень холестерина в сыворотке которых составлял менее 6,5 ммоль/л (250 мг/дл).

Во II группу вошли 134 пациента с гиперхолестеринемией - мужчины 45-69 лет и женщины после менопаузы, уровень холестерина в сыворотке которых составлял более 6,5 ммоль/л (250 мг/дл). Средний уровень холестерина ЛНП в группе составил 6,85 ммоль/л, а ИМТ был 27,1 кг/м².

В III группу вошли пациенты 53-78 лет с клиническими проявлениями атеросклероза (ишемическая болезнь сердца, перенесенный инфаркт миокарда, перенесенный инсульт).

Регулярный прием антиоксидантов, ацетилсалициловой кислоты, или любого другого препарата с антиоксидантными свойствами являлся критерием исключения. Женщины в пременопаузе или принимающие гормональные контрацептивы были исключены. Также критериями исключения были печеночная дисфункция, выраженное ожирение (индекс массы тела > 32 кг/м²), сахарный диабет 1 типа, неконтролируемая артериальная гипертензия (диастолическое артериальное давление > 105 мм рт.ст.).

В таблицах 14 и 15 представлены клинико-антропометрические характеристики мужчин и женщин в обследованных нами группах.

Таблица 14 - Клинико-антропометрические характеристики мужчин, без симптомов атеросклероза (I группа), с гиперхолестеринемией (II группа) и с выраженными проявлениями атеросклероза (III группа).

Показатель	I группа	II группа	III группа	P*
Возраст, лет	60,3 (11,7)	60,8 (9,5)	70,3 (8,2)	<0,001
Рост, см	175,1 (6,4)	176,0 (6,0)	162,4 (7,6)	0,034
Масса тела, кг	81,4 (12,7)	84,1 (13,3)	82,2(13,8)	0,30
Индекс массы тела, кг/м ²	26,5 (3,7)	27,1 (3,4)	27,2 (3,8)	0,36
САД, мм рт. ст.	141,1 (17,3)	146,0 (16,9)	144,2 (20,0)	0,13
ДАД, мм рт. ст.	85,5 (9,9)	87,3 (12,0)	81,9 (12,7)	0,002
ГЛЖ миокарда (по ЭКГ)	18%	20%	55%	<0,001
ЧСС, мин ⁻¹	78,0 (11,1)	77,3 (10,5)	73,6 (10,8)	<0,001

* - оценка по вариационному анализу (ANOVA).

Таблица 15 - Клинико-антропометрические характеристики женщин, без симптомов атеросклероза (I группа), с гиперхолестеринемией (II группа) и с выраженными проявлениями атеросклероза (III группа).

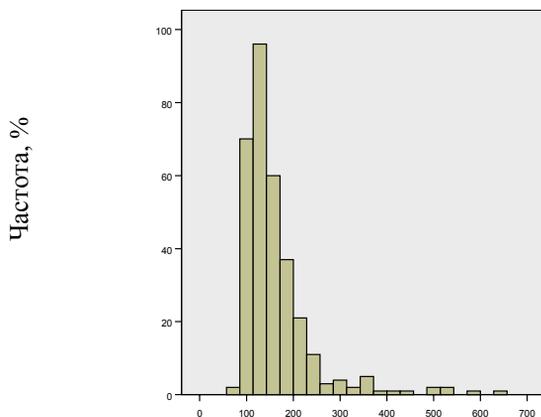
Показатель	I группа	II группа	III группа	P*
Возраст, лет	60,6 (9,8)	62,2 (9,0)	69,8 (8,3)	<0,001
Рост, см	162,0 (5,7)	163,2 (5,6)	162,1 (5,8)	0,052
Масса тела, кг	69,9 (12,6)	74,3 (13,0)	73,0(14,2)	0,002
Индекс массы тела, кг/м ²	26,7 (4,9)	27,9 (4,4)	27,7 (4,7)	0,015
САД, мм рт. ст.	130,6 (15,4)	140,2 (19,9)	140,1 (20,5)	<0,001
ДАД, мм рт. ст.	81,6 (9,8)	83,9 (10,5)	80,5 (11,0)	0,004
ГЛЖ миокарда (по ЭКГ)	18%	24%	48%	<0,001
ЧСС, мин ⁻¹	77,7 (12,5)	74,5 (11,5)	71,9 (12,3)	<0,001

* - оценка по вариационному анализу (ANOVA).

Из крови пациентов получали сыворотку крови и определяли ее атерогенность на культуре клеток, выделенных из неповрежденных участков интимы аорты человека, как это описано в материалах и методах. Атерогенный эффект сыворотки определяли как отношение накопленного внутриклеточного холестерина к контрольному опыту (без добавления сыворотки). Холестерин ЦИК определяли ферментативным колориметрическим методом после осаждения циркулирующих иммунных комплексов, как это описано в Материалах и методах 2,5% раствором ПЭГ6000. Уровень цммЛНП в сыворотке крови определяли путем связывания с *Ricinus Communis*, как это описано в материалах и методах, в исследовании применяли отношение апоВ цммЛНП к общему апоВ сыворотки крови, который

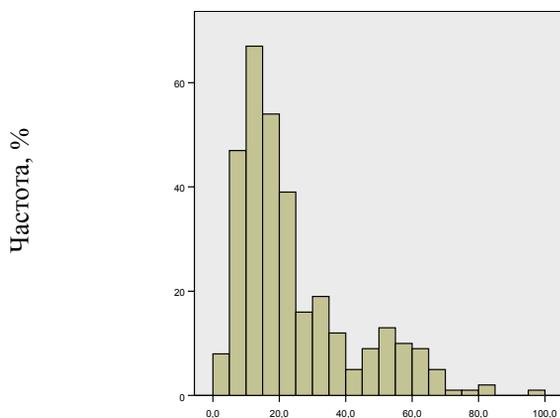
определяли ИФА при связывании с поликлональными антителами к апоВ, как это описано в Материалах и методах.

Во всех трех группах сыворотка вызвала в среднем 1,5-2 кратное накопление внутриклеточных липидов в культуре клеток, выделенных из непораженной интимы аорты человека (данные представлены на рис. 53). Доля цмМЛНП от общего содержания апоВ-содержащих липопротеидов составляла в среднем 10-25%. (рис. 54). Уровень холестерина ЦИК у подавляющего числа пациентов составлял 10-25мкг/мл сыворотки (рис. 55)



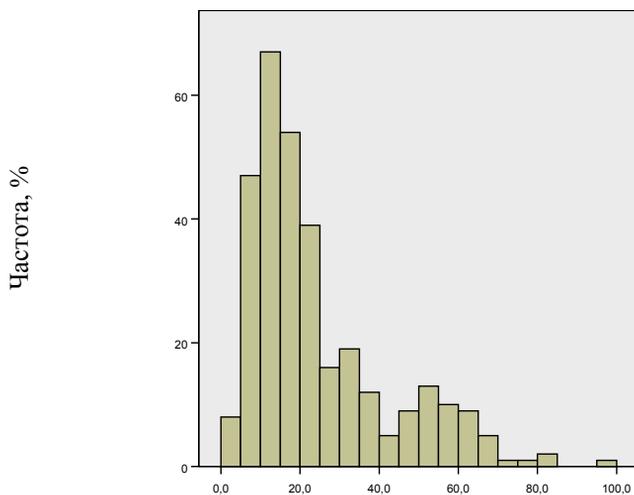
Внутриклеточное содержание холестерина, % от контроля

Рисунок 53 – Распределение сывороток по атерогенности



Доля цммЛНП в общем содержании ЛНП в сыворотке, %

Рисунок 54 - распределение сывороток по содержанию цммЛНП



Холестерин ЦИК мкг/мл сыворотки

Рисунок 55 – Распределение сывороток по уровню циркулирующих иммунных комплексов

При анализе полученных во всех трех группах данных были выявлены следующие зависимости. Существует прямая корреляция ($p=0,027$) между способностью сыворотки пациентов вызывать накопление внутриклеточных липидов при добавлении изучаемых сывороток к культуре клеток выделенных из непораженной интимы аорты человека, т.е. их атерогенностью и уровнем цмЛНП в изучаемых сыворотках, данные представлены на рисунке 56.

Также существует корреляционная связь $P<0,001$ между атерогенностью сывороток и относительным содержанием цмЛНП в общем пуле ЛНП сывороток. Она еще более выражена, чем в случае Х-ЦИК. Данные представлены на рис. 57.

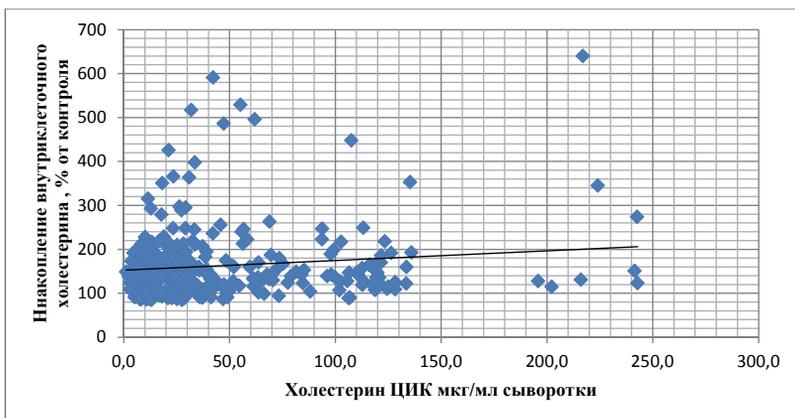


Рисунок 56 – Связь между способностью сыворотки вызывать накопление внутриклеточного холестерина и уровнем холестерина ЦИК данных сывороток.

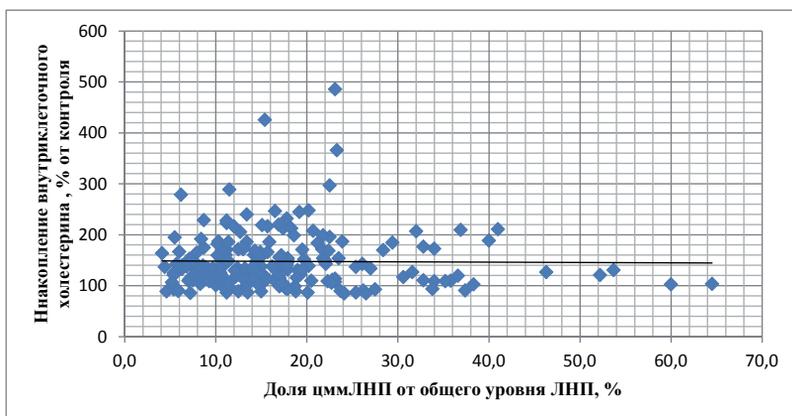


Рисунок 57 - Связь между способностью сыворотки вызывать накопление внутриклеточного холестерина и долей цмЛНП в данных сыворотках крови.

2.25.3 Оценка диагностической и прогностической значимости ЦИК

Выше было показано, что уровень холестерина ЦИК (Х-ЦИК) коррелирует со степенью выраженности и распространенностью атеросклеротических поражений и обладает высокой диагностической значимостью. Прогностическая значимость данного параметра ранее не изучалась. Можно предположить, что ЛНП-содержащие ЦИК имеют важное значение в прогрессировании атеросклероза, поскольку могут вызывать накопление холестерина в клетках сосудистой стенки. В данном исследовании была изучена связь между уровнем Х-ЦИК и прогрессированием атеросклероза.

В проспективном 2-летнем исследовании участвовали 98 мужчин в возрасте 40-74 лет с ранним бессимптомным атеросклерозом сонных артерий. Ультразвуковое обследование проводилось трижды перед включением в исследование, 1 раз в 3 месяца в течение первого года наблюдения, 1 раз в 6 месяцев в течение второго года наблюдения, и трижды по окончании исследования. Протокол ультразвукового обследования включал сканирование обеих сонных артерий в В-режиме в трех проекциях до области каротидного синуса с помощью линейного датчика 7,5 МГц (12). Толщину ИМС измеряли по видеозаписи с помощью компьютерной программы Prosound (R.Seltzer, США). Измерения проводили на участке общей сонной артерии длиной 10 мм, непосредственно прилегающему к каротидному синусу. Содержание холестерина и триглицеридов в сыворотке крови определяли с помощью ферментативных наборов (Boehringer Mannheim GmbH, Германия). Уровень иммунного холестерина определяли по содержанию холестерина в ЦИК, выделенных из сыворотки крови

путем преципитации иммунных комплексов полиэтиленгликолем 6000.

В таблице 16 представлены исходные клинические и биохимические характеристики участников исследования. Для установления диагностической и прогностической значимости уровня иммунного холестерина и других липидных показателей, их пороговые значения для данной выборки были определены методом наибольшего χ^2 . Пороговое значение для иммунного холестерина составило 16 мкг/мл.

Таблица 16 - Исходные клинические и биохимические показатели.

Показатель	Все больные	Х-ЦИК	Х-ЦИК
	(n=98)	≤ 16.0 мкг/мл (n=55)	> 16.0 мкг/мл (n=43)
Толщина ИМС, мм	0,939 \pm 0,015	0,920 \pm 0,008	0,963 \pm 0,018 *
Возраст, лет	60,6 \pm 0,8	60,2 \pm 0,5	61,1 \pm 0,8
Общий холестерин, мг/дл	231 \pm 4	224 \pm 2	240 \pm 3 *
Триглицериды, мг/дл	196 \pm 10	203 \pm 6	187 \pm 9
Холестерин ЛВП, мг/дл	42,6 \pm 1,1	42,0 \pm 0,6	43,4 \pm 1,0
Холестерин ЛНП, мг/дл	149 \pm 4	141 \pm 2	159 \pm 3 *
Х-ЦИК, мкг/мл	14,9 \pm 0,7	9,3 \pm 0,6	22,1 \pm 2,8 *

* , достоверное различие между больными с нормальным и повышенным уровнем Х-ЦИК, $p < 0,05$.

У пациентов с повышенным уровнем иммунного холестерина также отмечалось повышенное содержание общего холестерина и холестерина ЛНП. Средняя и максимальная толщина ИМС у пациентов с повышенным уровнем Х-ЦИК была достоверно выше, чем у пациентов с нормальным уровнем Х-ЦИК (Таблица 16).

Анализ сопряженности липидных показателей с исходной толщиной ИМС сонных артерий выявил, что только уровни Х-ЦИК и холестерина ЛНП были достоверно сопряжены со степенью выраженности каротидного атеросклероза и при этом имели высокие значения относительного риска и отношения шансов (таблица 17).

Таблица 17 - Диагностическая значимость липидных показателей и Х-ЦИК.

Показатель	χ^2	p	Относительный риск	Отношение шансов	Чувствительность, %	Специфичность, %
Х-ЦИК	8,490	0,045	1,18	1,43	64,7 (62,1-67,1)	60,1 (56,8-65,9)
Холестерин ЛНП	7,102	0,049	1,11	1,35	61,7 (56,5-66,8)	42,9 (38,8-47,0)
Холестерин ЛВП	3,987	0,159	1,12	1,33	61,8 (58,2-65,4)	45,3 (39,3-51,3)
Общий холестерин	1,605	0,373	1,11	1,20	61,6 (58,3-65,0)	45,7 (39,3-52,2)
Триглицериды	0,128	0,820	0,97	0,94	50,2 (39,9-61,0)	38,1 (34,1-42,2)

Примечание: в скобках указан 95% доверительный интервал.

Показатель Х-ЦИК имел наивысшую чувствительность и специфичность по сравнению с другими липидными параметрами, то есть обладал диагностической ценностью. Следует отметить, что такие показатели, как общий холестерин, холестерин ЛНП и

липопротеидов высокой плотности (ЛВП), характеризовались чувствительностью, сравнимой с Х-ЦИК, но их специфичность была низкой. Уровень триглицеридов сыворотки крови не имел достоверной диагностической значимости.

Увеличение толщины ИМС сонных артерий составило в среднем $0,029 \pm 0,011$ мм за 2 года наблюдения при исходной средней толщине ИМС $0,939 \pm 0,015$ мм ($p=0.028$). Таким образом, динамика изменений толщины ИМС может быть расценена как медленное, но статистически достоверное прогрессирование каротидного атеросклероза. Индивидуальные изменения толщины ИМС расценивались как прогрессирование, регрессия или стабильное состояние на основании статистически достоверных различий между средними величинами трех измерений при включении и по завершении исследования. Прогрессирование атеросклероза было отмечено у 52 больных (53,1%). Спонтанная регрессия была отмечена у 21 больного (21,4%). Соответственно, у 25 больных (25,5%) за 2 года наблюдения толщина ИМС достоверно не изменилась.

Анализ сопряженности липидных показателей с динамикой изменений толщины ИМС выявил, что только уровень Х-ЦИК был достоверно сопряжен с прогрессированием каротидного атеросклероза и имел высокие показатели относительного риска и отношения шансов (таблица 18). Повышенный уровень Х-ЦИК, наряду с повышенным общим холестерином и повышенным холестерином ЛНП, имел достаточно высокую прогностическую значимость. Повышенный уровень триглицеридов сыворотки крови, как и сниженный уровень холестерина ЛВП, не имели прогностической значимости в отношении прогрессирования каротидного атеросклероза. Нормальный уровень Х-ЦИК (менее 16 мкг/мл) был единственным параметром, предвещающим отсутствие

прогрессирования каротидного атеросклероза в течение 2 лет с прогностической значимостью 78,3% (таблица 18).

Таблица 18. Прогностическая значимость липидных показателей и X-ЦИК.

Показатель	χ^2	p	Относительный риск	Отношение шансов	Значимость повышенных показателей, %	Значимость нормальных показателей, %
X-ЦИК	15,602	0,001	2,57	6,25	63,5 (53,6-71,5)	78,3 (67,1-87,3)
Холестерин ЛНП	0,031	0,904	0,96	0,92	72,4 (67,7-77,6)	58,1 (53,5-62,9)
Общий холестерин	0,031	0,904	0,97	0,91	64,3 (56,0-72,8)	39,0 (34,2-43,5)
Триглицериды	0,010	0,973	0,99	0,98	36,3 (31,0-41,3)	34,8 (30,1-39,0)
Холестерин ЛВП	0,008	0,986	1,00	1,00	48,0 (42,4-53,7)	43,4 (38,7-47,4)

Примечание: в скобках указан 95% доверительный интервал.

Нормальные уровни общего холестерина, холестерина ЛНП и ЛВП и триглицеридов не обладали достоверной прогностической ценностью.

2.25.4 Разработка аналитической тест-системы для оценки атерогенных свойств сыворотки

В процессе проведенной работы было продемонстрировано, что уровень холестерина ЦИК (Х-ЦИК) коррелирует со степенью выраженности и распространенностью атеросклеротических поражений и обладает высокой диагностической прогностической значимостью. Поэтому нами разработан макет аналитической тест-системы (мАТС) для одновременного определения контролируемых специфических биомаркеров, в частности, холестерина ЦИК, общего холестерина, холестерина ЛНП и ЛВП, а также триглицеридов. Созданная АТС обеспечивает возможность проведения анализа и регистрации результата и предназначена для применения в медицине в целях экспрессной диагностики сердечно-сосудистых патологий.

Для определения этих выше перечисленных биомаркеров применен модифицированный (минимизированный) ферментативный метод, позволяющий уменьшить объем образца и реакционной смеси, и, как следствие этого, снизить стоимость анализа. Значения определенных биомаркеров позволят не только установить диагноз и определить тип дислипидемий, но и оценить риск наиболее опасных проявлений сердечно-сосудистых патологий.

Предлагаемая АТС позволяет определять новые виды и сочетания биомаркеров, которые, наряду с традиционными факторами риска, помогут идентифицировать лиц, имеющих высокий риск развития атеросклеротических заболеваний, и предпринять своевременные меры по ранней профилактике атеросклероза.

Лабораторный регламент на создание макета аналитической тест-системы для применения в медицине при экспрессной диагностике атерогенных дислипидемий при сердечно-сосудистых патологиях приведен в Приложении к работе.

3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1 Морфологическая визуализация и анализ распределения липидов в атеросклеротических поражениях человека.

Согласно общепринятой парадигме появление избыточных липидов в интиме артерий связано с изменением композиции и состава липопротеидов проникающих в интиму из плазмы крови (Климов, 1980; Ross, 1999). В ряде работ на аутопсийном материале было показано, что присутствие липидов в интиме артерий часто обнаруживается в местах, которые не проявляют макроскопических признаков атеросклеротического поражения (Аничков, 1947). В этой связи предполагается, что фокальное накопление липидов в интиме может служить микроцентрами, в которых инициируется каскад реакций, приводящих к образованию атеросклеротического поражения (Geer J. C., 1960; Schwartz S. M., 1995; Hansson, 2009; Hansson G. K., 2011). Общеизвестно, что накопление иммуно-воспалительных клеток и отложение липидов могут быть взаимосвязаны, начиная с самых ранних стадий атерогенеза (Schwartz S. M., 1995; Ross, 1999; Hansson, 2009; Hansson G. K., 2011).

В ряде ранних публикаций была исследована структурная и биохимическая сложность интимы артерий человека и описаны ее характеристики как в макроскопически неизменных участках артерий, так и в различных типах атеросклеротических (Аничков, 1947; Geer J. C., 1960; Velican C., 1978; Orekhov A.N., 1985; Bobryshev Y. V., 1995; Андреева Е.Р., 1999). Было показано также, что на ранних стадиях атеросклероза в интиме наблюдаются избыточное отложение липидов, клеточная пролиферация и накопление коллагена, но изменения интимы происходят неравномерно по ее толщине (Orekhov A.N., 1985; Guyton J. R., 1985; Velican C., 1988; Mukhin D. N., 1991).

Два основных субслоя интимы были названы прилюминальным и примедиальным (Velican C, 1978; Mukhin D. N., 1991). Было показано, что прилюминальный субслоем обогащен протеогликаном и распространяется от люминальной поверхности артерий на две трети толщины интимы, тогда как оставшаяся треть ее толщины соответствует примедиальному субслою, являющемуся мышечно-эластическим (Orekhov A. N., 1987; Velican C., 1988; Velican C, 1978; Mukhin D. N., 1991; Orekhov A. N., 2010). Было показано, что примедиальный мышечно-эластический слой, в отличие от прилюминального, вовлечен в атерогенез в значительно меньшей степени (Orekhov A.N., 1987; Orekhov A. N., 2010; Андреева Е.Р., 1999; Mukhin D. N., 1991). Хотя отложения липидов главных классов были обнаружены в обоих субслоях, увеличение содержания липидов в прилюминальном субслое было более выраженным и обусловлено в основном свободным и этерифицированным холестерином (Mukhin et al., 1991).

В нашей работе был проведен морфологический анализ распределения липидов в интима артерий, используя методы электронномикроскопического анализа, а также методы световой и электронно-микроскопической гистохимии. Электронномикроскопический анализ артериальных тканевых образцов обнаружил присутствие клеток, содержащих в цитоплазме липидные включения. В непораженных атеросклерозом образцах интимы липидные включения, выявляемые как «липидные капли», встречались достаточно редко, однако в атеросклеротических поражениях присутствие липидов в интима являлось характерным явлением. В некоторых интимальных клетках липидные включения были многочисленными, что позволяло классифицировать такие клетки как пенные клетки. В соответствии с данными световой

микроскопии (с использованием для выявления липидов масляного красного O), ультраструктурный анализ распределения липидов в интиме показал, что в прилюминальном субслое «липидные капли» располагаются как вне, так и внутри клеток, тогда как в примедиальном субслое липиды преобладают во внеклеточном матриксе, часто располагаясь там вдоль эластических волокон. В отличие от прилюминального субслоя, где присутствие нейтральных липидов и неэтерифицированного холестерина было зафиксировано во внеклеточном матриксе, отложение этих компонентов в примедиальном субслое ассоциировалось в основном с измененными эластическими волокнами. В примедиальном субслое 10—15 % эластических волокон имели признаки изменений в результате вакуолизации матрикса этих волокон.

Вакуолизация эластических волокон является, видимо, результатом образования безэластиновых полостей внутри относительно гомогенного эластинового матрикса волокон. Такие полости в эластических волокнах наблюдались как в периферических, так и в центральных частях волокон. Полости в матриксе эластических волокон часто соединялись. Нейтральные липиды преимущественно были локализованы в зонах расположения таких полостей в эластичных волокнах. При гистохимическом окрашивании с использованием филипина, комплексы филипин-стерол, представляющие собой ламеллярные структуры с расстоянием между ламеллами 10—20 нм, наблюдались в ассоциации с разрушающимися эластическими волокнами. В примедиальном субслое комплексы филипин-стерол были обнаружены также во внеклеточном матриксе интимы, где они примыкали к внешней границе эластических волокон. Использование комбинации действия OsO₄ и гистохимического окрашивания филипином показало, что некоторые

полости в эластических волокнах были заполнены нейтральными липидами и незтерифицированным холестерином.

В отличие от прилюминального субслоя, в котором липиды обнаруживаются внутри клеток и во внеклеточном матриксе, в примедиальном субслое липиды, включая незтерифицированный холестерин и нейтральные липиды, обнаруживаются, главным образом, вдоль и внутри эластических волокон. Эластические волокна, которые содержали липидные отложения, имели признаки дегенерации, выраженные в виде вакуолизации и разрушения. Эластин – наиболее распространенный белок в стенке больших артерий, подвергаемый пульсирующему напряжению при сердечном сокращении (Brooke B. S., 2003). В последние годы интенсивно изучали процессы биосинтеза и функции эластина. Стало известно, в частности, что эластин – важный аутокринный фактор, обеспечивающий гомеостаз сосудов за счет биомеханической поддержки и биосигнализации (Brooke B. S., 2003; Katsuda S, 2003). Накапливаются данные о том, что эластин – важный регулятор активности гладкой мускулатуры в сосудистом морфогенезе и патологии (Katsuda, Kaji, 2003). С возрастом происходят структурные изменения эластина (Brooke, Bayes-Genis, 2003; Katsuda, Kaji, 2003). Показано, что содержание эластина снижается по мере накопления липидов в процессе атеросклероза, что приводит к потере эластичности и увеличению подверженности действию ферментов, разрушающих эластин (Katsuda, Kaji, 2003).

Факт, что незтерифицированный холестерин и нейтральные липиды захватываются деградирующими эластическими волокнами в примедиальном субслое интимы, свидетельствует о вкладе внеклеточных структур в аккумуляцию холестерина, начиная с самых ранних стадий патологии. Взаимодействия между эластином и

липидами, имеющие место в разрушающихся эластических волокнах, изучены недостаточно (Noma A., 1981; Seyama Y., 2004). Мы надеемся возродить интерес к анализу взаимодействия между липидами и эластином, а также вкладу этого взаимодействия в атеросклеротическое поражение.

В работе мы также проверили, совпадают ли данные по определению количества разных классов липидов, определенных с помощью химического анализа после экстрагирования из криостатных зон интимы аорты и последующим хроматографическим разделением, с содержанием липидов, определенным гистохимически в последовательных срезах тех же образцов ткани. Морфометрический метод использовали для оценки количества липидов, наблюдаемых с помощью окрашивания масляным красным O, тогда как с помощью химического анализа идентифицировали триглицериды, холестерин, эфиры холестерина и фосфолипиды в одних и тех же локусах интимы.

В работе установлено, что между общим количеством липидов, обнаруженных с помощью окрашивания, и количеством эфиров холестерина, свободным холестерином и фосфолипидами существует положительная корреляция ($r = 0.72—0.95$). Положительная корреляция существовала и между вне- и внутриклеточными липидами (окрашивание масляным красным O) и количеством свободного холестерина, эфиров холестерина и фосфолипидами ($r = 0.68—0.95$).

В целом, настоящая работа свидетельствует, что имеются существенные различия в распределении липидов различны в разных субслоях интимы. На основании наблюдений, сделанных в нашей работе, мы склонны считать, что преимущественно в примедиальном

субслое происходит удержание липидов внутри деградирующих эластических волокон. Разрушение эластических волокон в глубине интимы может являться весьма существенным и самым ранним событием в образовании фокальных зон, свободных от волокон, в которых формируется в конечном счете липидно-некротический локус.

3.2 Ассоциация ЛНП – ключевой фактор их атерогенности

Основным итогом исследований, посвященных изучению ассоциации ЛНП, является заключение, что цмЛНП способны образовывать агрегаты, иммунные комплексы и комплексы с компонентами соединительнотканного матрикса. Эти комплексы захватываются клетками с помощью фагоцитоза и вызывают значительное накопление внутриклеточных липидов.

Диаметр агрегатов ЛНП составляет от 50 до 500 нм. Зная, что диаметр частицы ЛНП составляет 24-27 нм и, предполагая, что он не изменяется при ассоциации, а агрегат имеет сферическую форму, можно приблизительно рассчитать количество частиц, формирующих агрегат. Расчет показывает, что агрегат может содержать от 5 до 4000 частиц ЛНП. Большая часть агрегатов содержит около 500 частиц ЛНП. Следовательно, захват одного агрегата эквивалентен захвату нескольких сотен или тысяч частиц ЛНП. Это делает понятным высокий атерогенный потенциал агрегатов ЛНП.

Такой же высокий атерогенный потенциал проявляли и ЛНП-содержащие иммунные комплексы. Результаты этого исследования показывают, что ЛНП, входящие в состав циркулирующих иммунных комплексов, отличаются от нативных липопротеидов по многим параметрам. ЦИК-ЛНП имеют низкое содержание сиаловой кислоты, таким образом, это - десилированные ЛНП. Содержание

нейтральных липидов и фосфолипидов в ЦИК-ЛНП значимо ниже, чем в нативных липопротеидах. ЦИК-ЛНП имеют меньший диаметр и большую плотность. Повышенная электрофоретическая подвижность указывает на больший отрицательный заряд частиц ЦИК-ЛНП. Наконец, в отличие от нативных ЛНП, ЦИК-ЛНП способны вызывать отложение нейтральных липидов и, в первую очередь, эфиров холестерина в клетках непораженной интимы аорты человека. Таким образом, ЦИК-ЛНП по всем исследованным характеристикам сходны с цммЛНП, обнаруженными и описанными нами.

Мы обнаружили тесную корреляцию между содержанием ЛНП в циркулирующих иммунных комплексах и уровнем цмЛНП, но не общих ЛНП в крови людей. Этот факт свидетельствует о том, что преимущественно цмЛНП образуют комплексы с аутоантителами. Это наблюдение хорошо согласуется с полученными нами ранее данными о том, что сродство аутоантител к *in vitro* десалирированным ЛНП выше, чем к нативным липопротеидам (Orekhov AN, 1991 б). Более того, мы показали ранее, что связывание аутоантител с суммарными ЛНП пациентов, содержащих высокий процент десалирированных липопротеидов, выше, чем с суммарными ЛНП здоровых лиц, где доля десалирированных ЛНП низка.

В данном исследовании мы обнаружили, что содержание оксистеролов в ЦИК-ЛНП выше, чем в нативных салирированных ЛНП. Это может указывать на протекание процессов перекисного окисления липидов в этих липопротеидах. В литературе есть множество сообщений о наличии в крови пациентов антител против окисленных ЛНП (Lopes-Virella MF, 2013; Maiolino G, 2013; Lopes-Virella MF, et al., 2012) При этом в большинстве работ были использованы антитела не против окисленных ЛНП, а против МДА-лизина и против МДА-модифицированных ЛНП. Нами также

обнаружено, что аутоантитела, выделенные из крови пациентов с коронарным атеросклерозом и имеющие наивысшее сродство к десалированным ЛНП, имеют также большее сродство к МДА-модифицированным ЛНП, чем к нативным липопротеидам (Orekhov A.N., 1991 г). Таким образом, факт наличия в крови антител к МДА-модифицированным ЛНП не вызывает сомнения. С другой стороны, мы не обнаружили ЛНП с высоким уровнем малонового диальдегида, выявляемого как ТБК-реактивный продукт, в циркулирующих иммунных комплексах. Этот факт может объясняться отсутствием или очень низким содержанием МДА-модифицированных ЛНП в циркуляции. Можно предположить, что образование антител против МДА-лизина вызвано наличием в крови других МДА-модифицированных белков, отличных от апоВ. Это предположение подтверждается перекрестной реактивностью анти-МДА-ЛНП и анти-МДА-альбумина (Salonen JT, 1992).. Наконец, нельзя исключить периодического появления в циркуляции МДА-ЛНП, обусловленного повышением концентрации малонового диальдегида при активации процессов перекисного окисления липидов.

Использование техники иммуноблоттинга после разделения человеческих аутоантител против ЛНП методом изоэлектрофокусировки продемонстрировало наличие 12-15 хорошо разделяющихся фракций иммуноглобулинов G, взаимодействующих с ЛНП (Orekhov AN, 1991 б). Это позволяет предположить, что различные подфракции иммуноглобулинов представляют собой аутоантитела к различным эпитопам модифицированной липопротеидной частицы. Дальнейшие исследования позволят определить вклад отдельных модификаций в иммуногенность модифицированных липопротеидов. Однако, уже сейчас ясно, что

появление в крови пациентов аутоантител против липопропротеидов связано с наличием в циркуляции цмЛНП.

Во многих исследованиях было продемонстрировано наличие высоких концентраций циркулирующих иммунных комплексов, включая комплексы, содержащие ЛНП, в крови пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и гиперлипидемиями (Lopes-Virella MF, 2012; Orekhov A.N., 1995). В атеросклеротических поражениях сосудов человека и в пенистых клетках были найдены иммуноглобулины и другие компоненты иммунных комплексов (Garrido-Sánchez L, 2010; Ravandi A, 2011). Возможно, циркулирующие иммунные комплексы, содержащие ЛНП, *in vivo* могут также стимулировать накопление внутриклеточных липидов в зоне атеросклеротических реакций.

В нашем исследовании было обнаружено формирование крупных нерастворимых комплексов ЛНП с рядом природных и искусственных компонентов. Первым из таких комплексов был описан комплекс ЛНП с декстран-сульфатом (Basu SK, 1979). Добавленный в сыворотку декстран-сульфат осаждает в основном ЛНП и ЛОНП (Vambauer R, 2003). С другой стороны, известно, что нативные ЛНП образуют комплексы с декстран-сульфатом (Zhao YH, 2007). Было показано, что ЛНП-декстран-сульфат комплексы деградируются с высокой эффективностью макрофагами и, что холестерин ЛНП накапливается в клетках (Basu SK, 1979)

Давно известно, что ЛНП образуют комплексы с определенными гликозаминогликанами, и предполагается, что это свойство ЛНП важно в накоплении ЛНП в интерстициальном пространстве и клетках при патологических условиях (Businaro R, 2012; Libby P, 2011). Однако, Basu et al. не смогли показать, что какие-

либо из естественных гликозаминогликанов увеличивают захват и деградацию ЛНП в перитонеальных макрофагах мыши, хотя некоторые из них, особенно декстран-сульфат, как известно, образуют комплексы с ЛНП. Эти наблюдения хорошо согласуются с нашими данными. Из всех исследованных нами гликозаминогликанов только декстран-сульфат индуцировал ЛНП-опосредованное накопление холестерина в культивируемых субэндотелиальных клетках аорты человека и перитонеальных макрофагах мыши. Мы связываем это с тем, что только декстран-сульфат, но не другие гликозаминогликаны, способен образовывать нерастворимый комплекс с ЛНП в условиях культивирования.

Гепарин способен образовывать комплексы с ЛНП, но, в отличие от декстран-сульфата, гепарин образует растворимые комплексы и, вероятно, поэтому комплексы ЛНП-гепарин не вызывают накопления липидов. С другой стороны, (Lipponen K, 2012) показали недавно, что гепарин вместе с фибронектином или вместе с фибронектином и денатурированным коллагеном образует ЛНП-содержащие комплексы, которые вызывают существенное накопление эфиров холестерина в культивируемых макрофагах. Используя эти комплексы, мы получили на культивируемых субэндотелиальных клетках аорты такие же эффекты, какие получили Falcone et al. на макрофагах. Кроме того, нам удалось продемонстрировать, что каждый из компонентов, входящих в комплекс ЛНП-гепарин-фибронектин-желатин или комбинация этих компонентов вызывает ЛНП-опосредованное накопление внутриклеточного холестерина только в том случае, если в процессе инкубации их с ЛНП образуются нерастворимые ЛНП-содержащие комплексы.

Данные о том, что декстран-сульфат или гепарин вместе с фибронектином и коллагеном индуцируют накопление

внутриклеточных липидов, позволяют предположить, что гликозаминогликаны, как составная часть протеогликанов, являются необходимым компонентом в ЛНП-опосредованном липоидозе артериальных клеток. Протеогликаны артериальной стенки связываются с ЛНП *in vitro* и ассоциация нативных агрегатов протеогликанов с ЛНП необходима для стимуляции ЛНП-опосредованного накопления эфиров холестерина в макрофагах (Vijayaagopal P, 2005).

Взаимодействие ЛНП и сосудистого внеклеточного матрикса в течение долгого времени рассматривалось как важный момент в накоплении липидов в атеросклеротическом поражении (Rodríguez-Lee M, 2007). Большая часть ЛНП, инфильтрирующих сосудистую стенку, остается внеклеточной (Hoff HF, 1995). Было обнаружено, что пропорция связанных нерастворимых ЛНП к экстрагируемым ЛНП в атеросклеротическом поражении увеличивается (Hoff HF, 1995). Связывание ЛНП с внеклеточным матриксом может происходить за счет их взаимодействия как с протеогликанами, так и с другими компонентами артериальной соединительной ткани. В этой связи мы исследовали коллагеназа-резистентные частицы (неидентифицированный компонент сосудистой стенки), очищенный эластин аорты и денатурированный коллаген. Эластин был исследован потому, что давно известен как весьма важный фактор в патогенезе атеросклероза (Helske S, 2007). Было предположено, что эластин или ЛНП-эластин комплексы могут играть уникальную и важную роль в ранних внеклеточных накоплениях липидов в артериях человека (Podet EJ, 1991). Эластин, коллагеназа-резистентные частицы и денатурированный коллаген индуцировали ЛНП-опосредованное накопление холестерина в интимальных клетках аорты человека и перитонеальных макрофагах мыши. В то же время, эти агенты

способствовали инсолюбилизации ЛНП. Мы склонны предполагать, что именно образование нерастворимых ассоциатов с ЛНП обеспечивает накопление внутриклеточных липидов в тех случаях, когда культивируемые клетки инкубируются с компонентами внеклеточного матрикса.

Наши данные свидетельствуют о том, что конечный результат - накопление внутриклеточных липидов - не зависит от природы агента, индуцирующего это накопление. Более того, наши эксперименты с антителами и латексом, которые тоже вызывают ЛНП-опосредованное накопление липидов, позволили предположить, что присутствие в комплексе определенных компонентов внеклеточного матрикса на самом деле не так уж важно. Значительно более важным оказалось то, сколько ЛНП может сорбировать на себе инсолюбилизирующий субстрат. Это демонстрируют наши эксперименты с полистероловыми и карбоксилированными шариками латекса. Чем больше ЛНП сорбировалось на шариках, тем выше было накопление холестерина в культивируемых клетках. Мы обнаружили прямую и очень тесную корреляцию между накоплением внутриклеточного холестерина и содержанием холестерина в нерастворимых ассоциатах, образующихся при инкубации клеток с ЛНП в присутствии различных агентов. Величина холестерина, накапливающегося в клетках, зависела не от природы агента, но от количества холестерина, связанного с нерастворимым ассоциатом. Ни в одном случае мы не обнаружили накопления липидов, если параллельно не отмечалась инсолюбилизация ЛНП.

Итак, накопление внутриклеточного холестерина за счет нерастворимого ЛНП-содержащего ассоциата - это неспецифическое явление в том смысле, что оно не зависит от природы вещества, взаимодействующего с ЛНП. Кроме того, это явление неспецифично

еще и потому, что не только ЛНП, но и другие липопротеиды, такие как ЛОНП и даже ЛВП вызывали накопление холестерина в клетках, если образовывали нерастворимые ассоциаты с каким-либо субстратом. Как и ЛНП, ЛОНП и ЛВП вызывали тем большее накопление внутриклеточного холестерина, чем больше холестерина попадало в нерастворимый ассоциат, образующийся при инкубации. ЛОНП- и ЛВП-опосредованное накопление холестерина в клетках не было обнаружено, если нерастворимый ассоциат не образовывался. Более того, агрегаты ЛНП и их иммунные комплексы также вызывают отложение внутриклеточного холестерина. Из этого мы делаем вывод, что накопление внутриклеточных липидов индуцируемое ЛНП-содержащими нерастворимыми ассоциатами - это неспецифическое явление, которое не зависит ни от природы инсолубилизирующего агента, ни от природы липид-несущей частицы, но зависит, прежде всего, от количества липида в ассоциате.

Существует еще один признак неспецифичности накопления внутриклеточных липидов, индуцируемого инсолубилизацией ЛНП. Инсолубилизация липопротеида вызывала накопление внутриклеточного холестерина как в субэндотелиальных клетках интимы аорты человека, так и в макрофагах. Следовательно, клеточный липидоз, индуцируемый инсолубилизацией ЛНП, может проявляться на клетках разных типов.

Какое значение может иметь инсолубилизация ЛНП в патогенезе атеросклероза, точнее, в липидозе клеток, который сопровождает атеросклероз, начиная с самых ранних его проявлений? Если попытаться экстраполировать наши данные, полученные в культуре клеток на ситуацию *in vivo*, резонно поставить вопрос, какие частицы в сосудистой стенке или в крови способны образовывать нерастворимый комплекс с ЛНП и тем самым индуцировать

внутриклеточное накопление холестерина, которое имеет место при атеросклерозе. В сосудистой стенке в зоне атероматозного распада недостатка в таких частицах, по-видимому, нет. Атероматозная деградация эластических и коллагеновых волокон, а также других внеклеточных соединительнотканых структур может приводить к появлению в артериальной стенке частиц эластина, коллагена, протеогликанов, способных образовывать нерастворимые комплексы с ЛНП. Исходя из этого, следует предположить, что обнаруженное нами и другими исследователями накопление внутриклеточных липидов, опосредуемое ЛНП-содержащими нерастворимыми комплексами, может иметь отношение по крайней мере к далеко зашедшему процессу атеросклеротического изменения артерии, сопровождающимся разрушением соединительной ткани.

3.3 Влияние различных модификаций частицы нативных ЛНП на устойчивость липопротеидов к ассоциации

Ранее в нашей лаборатории было установлено существование в плазме крови больных атеросклерозом циркулирующих модифицированных ЛНП (Orekhov et al., 1989; Tertov et al., 1990) В ходе изучения цмЛНП было показано, что помимо измененных физико-химических свойств они отличаются от нативных липопротеидов атерогенностью и повышенной склонностью к ассоциации. Эти два свойства цмЛНП тесно связаны: степень ассоциации прямо коррелирует со способностью вызвать накопление липидов в культуре клеток. В данной работе была предпринята попытка получить ответ на ряд вопросов: какие изменения в структуре частиц нативных ЛНП должны произойти для того чтобы у липопротеидов появилась склонность к ассоциации, какая *in vitro*

модификация наиболее близка к той, что происходит *in vivo* и ведет к появлению цмЛНП?

Чтобы ответить на эти вопросы мы подвергали ЛНП различным модификациям, затрагивающим основные компоненты частицы липопропротеида. Из полученных нами результатов можно заключить, что модификация любого из компонентов частицы нативных ЛНП: белковой ее части, липидной, полисахаридной ведет к снижению устойчивости липопропротеидов к ассоциации и к значительным изменениям конформации апоВ белка. Так, использованные нами протеолитические ферменты стимулировали ассоциацию ЛНП и вызывали расщепление апоВ белка. По-видимому, такое нарушение структуры поверхности частицы ЛНП дестабилизирует ее и вызывает структурные перестройки в частице, снижая устойчивость к ассоциации. Кроме того, в отсутствие ферментов или в присутствии ингибитора протеолитических ферментов ассоциации не наблюдалась. Это доказывает, что описанная нами ассоциация ЛНП связана именно с протеолитической модификацией липопропротеидов.

Поскольку различные протеолитические агенты, такие как химазы, триптаза, металлопротеиназы, калликреин, лизосомальные протеазы обнаруживаются в участках сосудов, пораженных атеросклерозом (Öörni K et al, 2000), то можно полагать, что ассоциация ЛНП, инициированная протеолизом, может иметь место *in vivo*. В пользу данного предположения свидетельствуют следующие факты. Фрагментированный апо В-100 неоднократно обнаруживался в ЛНП, выделенных из участков артерий, пораженных атеросклерозом (Lojda Z et al, 1984; Steinbrecher U.P et al, 1992) в то время как в артерии без заметных очагов поражения фрагменты апо В-100 не обнаруживались (Ylä-Herttuala S et al, 1988). ЛНП, изолированные из

сосудов, подвергнутых атеросклерозу, имели пониженную плотность, что свидетельствует о частичной потере белка в результате его протеолиза (Chao et al, 1990). Полученные нами результаты, в целом, не противоречат работам, посвященных изучению влияния различных протеолитических ферментов на ассоциацию ЛНП. Так, было показано, что использование протеаз с высокой субстратной специфичностью (калликреин, тромбин, плазмин) не приводит к ассоциации частиц ЛНП (Piha M et al, 1995). В то же время такие протеолитические ферменты как химотрипсин, отличающиеся низкой субстратной специфичностью и отщепляющие от апоВ значительные пептидные фрагменты, вызывали слияние частиц ЛНП (Pentikiinen et al, 1996, Piha M et al, 1995). Значительная протеолитическая деградация апоВ под действием трипсина и химотрипсина продемонстрирована и в данной работе.

Другой модификацией стимулирующей ассоциацию ЛНП является липолиз фосфолипидов поверхности ЛНП. Липолитическая модификация в данной работе моделировалась при помощи фосфолипазы А2 и фосфолипазы С. В обоих случаях наблюдалась стимуляция ассоциации ЛНП. В случае увеличения концентрации фермента повышалась и степень ассоциации модифицированных ЛНП. В то же время при использовании ингибитора фосфолипаз или в отсутствие фермента ассоциации ЛНП не наблюдалось. Эти результаты согласуются с данными, полученными Nakala (Nakala et al 1999, Nakala et al 2003). В этих работах было показано, что фосфолипаза А2 стимулирует ассоциацию частиц ЛНП, а в присутствии гепарина и протеогликанов вызывает слияние частиц липопротеидов. Ассоциация ЛНП под влиянием фосфолипазы С была продемонстрирована в работе Liu (Liu et al 1993).

Причины наблюдаемой ассоциации заключаются, по-видимому, в увеличении гидрофобности частицы ЛНП под действием фосфолипаз. Так, в нашей работе было продемонстрировано повышение уровня лизофосфотидилхолина и диацилглицерола под действием, соответственно, фосфолипазы A₂ и фосфолипазы C. Известно, что лизофосфотидилхолин и диацилглицерол способствуют формированию гидрофобных микродоменов на поверхности частицы ЛНП (Nevonoja et al 2000). Таким образом, можно предположить, что гидролиз фосфолипидов, инициированный фосфолипазами A₂ и C приводит к модификации физико-химических свойств поверхности частиц ЛНП. Так как рядом авторов было установлено присутствие ряда липолитических ферментов, в том числе фосфолипазы A₂, в очаге атеросклеротического поражения (Nevonoja et al 2000, Öömi K et al, 2000), то продемонстрированная нами ассоциация ЛНП под воздействием фосфолипаз вполне возможно имеет место и *in vivo*. Это предположение также косвенно подтверждает факт повышения уровня фосфолипазы A₂ в плазме больных сердечно-сосудистыми заболеваниями (Hurt-Camejo E et al 2001). В то же время, попытки обнаружить присутствие внеклеточной фосфолипазы C в стенке сосуда успехом не увенчались. Уровень диацилглицерола в ЛНП выделенных из участков атеросклеротических поражений также не был повышен.

Еще одним ферментом, который предположительно вызывает модификацию ЛНП *in vivo* является миелопероксидаза. Этот фермент отсутствует в неповрежденных участках аорты, но обнаружен в активном состоянии в интиме аорты с характерными атеросклеротическими повреждениями. В данной работе миелопероксидаза использовалась для моделирования окислительной модификации. Присутствие МПО в среде инкубации ЛНП приводило к уменьшению устойчивости липопротеидов к ассоциации. В

отсутствие фермента или его субстрата – перекиси водорода ассоциации не наблюдалось. Это значит, что фермент, вероятно, через образование гипохлорита снижает устойчивость частиц ЛНП к ассоциации.

Рассуждая о механизмах ассоциации ЛНП под действием миелопероксидазы, можно предположить, что гипохлорит действует на аминокислотные остатки или углеводную компоненту апоВ (Jerlich et al 1998). Помимо этого, возможно и опосредованное нарушение конформации апоВ через воздействие НОС1/ОС1 на фосфолипиды или холестерин (Carr et al, 2000, Hazen et al 1996), расположенные в непосредственной близости от апоВ. Гипохлорит также разрушает липидорастворимые антиоксиданты в ЛНП, снижая их резистентность к окислительной модификации. Подобные химические реакции приводят к значительным изменениям физико-химических свойств поверхности ЛНП. Увеличивается полярность липидной фазы, снижается подвижность ацильных цепей фосфолипидов, увеличивается отрицательный потенциал поверхности частицы ЛНП. Такие значительные нарушения физико-химических свойств поверхности ЛНП, по всей вероятности, приводят к потере устойчивости ЛНП, как коллоидной системы. Результатом является усиление ассоциации ЛНП, продемонстрированное также Jerlich (Jerlich et al 2000). Таким образом, результаты работы позволяют заключить, что миелопероксидаза способна модифицировать физико-химические свойства поверхности ЛНП таким образом, что они теряют устойчивость к ассоциации.

В литературе широко обсуждается возможность модификации ЛНП *in vivo* при окислительном и карбонильном стрессе. Предполагается, что в возникновении повреждений частиц ЛНП и стенки сосуда при атеросклерозе важную роль играют вторичные

продукты свободнорадикального окисления липидов альдегидной природы, накапливающиеся в процессе окислительной деструкции липидных гидропероксидов. Типичным примером таких альдегидов является МДА. Было показано, что альдегиды, генерируемые при деструкции липопероксидов в окисленных ЛНП, образуют аддукты с ϵ -аминогруппами лизиновых остатков молекул апоВ, вызывая изменение структуры молекулы белка и модификации частиц ЛНП (Uchida K., 2003). Кроме того, большое количество низкомолекулярных альдегидов, способных модифицировать ЛНП накапливается в процессе автоокисления глюкозы. Свободная, а также связанная с белками глюкоза подвергается неферментативным и ферментативным модификациям, в результате которых образуются низкомолекулярные альдегиды, такие как глиоксаль, метилглиоксаль, 3-деоксиглюкозон и гликольальдегид (Thornalley P. et al., 1999; Knott H. et al., 2003; Weiswenger P. et al., 2003). В данной работе было проведено исследование влияния альдегидов эндогенного происхождения – глиоксаля, метилглиоксаля и МДА на ассоциацию ЛНП. Было установлено, что все использованные альдегиды стимулировали ассоциацию ЛНП. Параллельно, было показано, что частицы ЛНП, обработанные МДА, метилглиоксалем и глиоксалем, обладают значительной электрофоретической подвижностью по сравнению с нативными ЛНП. При сравнении этих данных с данными по ассоциации ЛНП ясно видно, что наиболее сильную ассоциацию вызывают именно те альдегиды (метилглиоксаль>глиоксаль>МДА), при модификации которыми отмечены изменения в степени электрофоретической подвижности ЛНП. Эти результаты не противоречат данным полученным ранее (Schalkwijk et al, 1998; Knott et al 2003).

Для моделирования десиалирующей модификации в данной работе использовалась бактериальная нейраминидаза. Было продемонстрировано значительное снижение устойчивости к ассоциации нативных ЛНП, обработанных нейраминидазой. Эти результаты дополняют ранее полученные данные, свидетельствующие о значительной роли десиалирующей модификации липопротеидов низкой плотности в атерогенезе. Так, было показано, что цммлнп отличаются от нативных ЛНП сниженным содержанием сиаловой кислоты. (Orekhov et al., 1990; Tertov et al., 1992). В цммлнп, выделенных из крови больных атеросклерозом, содержание сиаловой кислоты было в среднем в 2-3 раза ниже, чем в нативных липопротеидах (Tertov et al., 1992; 1995). Была установлена достоверная обратная корреляция между содержанием сиаловой кислоты в ЛНП и способностью липопротеидов вызывать накопление липидов *in vitro* (Orekhov et al., 1992). Кроме того, нативные липопротеиды здоровых лиц после удаления сиаловой кислоты бактериальной нейраминидазой приобретали атерогенные свойства (Orekhov et al., 1989; 1991). Наконец, было продемонстрировано достоверное снижение уровня сиаловой кислоты в результате инкубации липопротеидов с аутологичной плазмой (Tertov et al, 1998).

В зависимости от характера модификации были продемонстрированы разноплановые изменения, происходившие в структуре частицы ЛНП: расщепление апоВ белка в результате протеолитической модификации, изменение липидного состава липопротеидов, обработанных фосфолипазами, накопление ТБК-реактивных продуктов вследствие окисления миелопероксидазой. Все эти различные по своей природе изменения различных компонентов частицы ЛНП дестабилизируют частицу ЛНП и приводят к потере устойчивости к ассоциации.

С физико-химической точки зрения ЛНП представляют собой мелкодисперсную липидную эмульсию в водной среде. Устойчивость такой коллоидной системы обусловлена тем обстоятельством, что неполярные липиды ядра ЛНП экранированы от гидрофильного окружения полярными группами фосфолипидов и апоВ-100, экспонированными в сторону водной среды. В результате любой из использованных нами модификаций происходит нарушение поверхностной структуры ЛНП, обнажение неполярных гидрофобных участков и, благодаря этому, возникает возможность взаимодействия частиц между собой. В настоящей работе мы подтвердили, что модификация любого компонента частицы ЛНП приводит к ассоциации липопротеидов. Помимо ферментативной модификации разнообразные физические факторы, такие, например, как изменение сольватной оболочки частицы ЛНП, стимулируют ассоциацию частиц ЛНП. Поверхность ЛНП в целом заряжена отрицательно (Панасенко с соавт., 1985). Как и любая заряженная частица ЛНП в водной среде окружены сольватной оболочкой, целостность которой определяет устойчивость частиц ЛНП к ассоциации и стабильность коллоидной системы в целом (Зонтаг, Штрэнге, 1973). Поскольку формирование сольватной оболочки напрямую зависит от физико-химических свойств поверхности частицы, то можно ожидать, что любое изменение структурной организации поверхности ЛНП приведет к нарушению сольватной оболочки, а значит, повлияет на устойчивость частиц ЛНП к ассоциации.

Нарушения сольватной оболочки в данной работе добивались путем добавления в среду инкубации ЛНП полиэтиленгликоля (ПЭГ). Оказалось, что любое из указанных нарушений сольватной оболочки ЛНП приводило к их ассоциации, причем цммЛНП агрегировали быстрее нативных. Этот факт еще раз подтверждают высокую склонность цммЛНП к ассоциации.

3.4 Изучение конформационных изменений апоВ белка цммЛНП и ферментативно модифицированных ЛНП

Повышенная склонность к ассоциации является общим свойством всех исследованных типов модифицированных ЛНП.

Этот вывод позволил сформулировать другой вопрос на который мы пытались ответить в данной работе: какая из использованных нами модификаций наиболее близка к той, что происходит *in vivo* и ведет к появлению цммЛНП? Ответ на этот вопрос мог пролить свет на причины возникновения цммЛНП. Специфичность изменений, происходящих в частице ЛНП в результате той или иной модификации, подтверждает сравнительное исследование изменений конформации апоВ белка модифицированных различным образом липопротеидов. При любой использованной модификации наблюдалось значительное изменение конформации апоВ. Не только протеолитическая модификация способствует изменению структуры аполипопротеина В-100, но также липолитическая, дегликозилирующая, окислительная модификации также приводят к перестройкам апоВ. Ранее конформационные перестройки апоВ-100 индуцированные липолизом и выражающиеся в изменении иммунореактивности моноклональных антител, сокращении доли α - спирали и увеличение содержания β - складчатого слоя в структуре белка были продемонстрированы в ряде работ (Asatryan et al, 2004; Chauhan et al, 1997).

Довольно сложно отметить общие закономерности при сравнении профилей антигенных изменений апоВ под действием различных ферментов. Сравнение антигенных профилей цммЛНП и ферментативно модифицированных ЛНП приводит к выводу, что ни

одна ферментативная модификация не воспроизводит изменений структуры апоВ, происходящих в цммЛНП. В то же время известно, что цммЛНП характеризуются модификацией всех известных компонентов липопротеидной частицы. Полученные данные подтверждают предположение о том, что формирование структуры цммЛНП является следствием множественной модификации липопротеидной частицы и невозможно указать конкретную модификацию, ответственную за появление цммЛНП.

3.5 Экзогенные ингибиторы ассоциации ЛНП

Таким образом, склонность к ассоциации является общим и важнейшим свойством как *in vitro*, так и *in vivo* модифицированных ЛНП. Возможности модуляции ассоциации ЛНП изучены недостаточно. С целью поиска ингибиторов ассоциации было проведено сравнительное исследование влияния различных амфифильных блок сополимеров оксида пропилена и оксида этилена – полаксамеров на ассоциацию ЛНП. В работе использовалось пять полаксамеров отличающихся по выраженности гидрофильно-липофильных свойств. Удалось показать, что полаксамеры P85 и L61, характеризующиеся выраженными или умеренными липофильными свойствами, способны значительно ингибировать ассоциацию ЛНП. В то же время гидрофильный полаксамер не оказывал влияния на ассоциацию липопротеидных частиц. Полученные данные косвенно подтверждают предположение, впервые выдвинутое Khoo и соавторами (Khoo et al, 1990) о роли гидрофобных взаимодействий в процессе ассоциации ЛНП. Предположительно, в ходе инкубации при постоянном перемешивании происходят конформационные изменения структуры ЛНП, приводящие к экспозиции гидрофобных участков на поверхности частиц. Далее начинает происходить взаимодействие гидрофобных участков разных частиц, приводящее к ассоциации

ЛНП. В случае присутствия в эмульсии ЛНП амфифильных веществ, липофильная часть амфифильной молекулы может взаимодействовать с гидрофобными доменами на поверхности частицы ЛНП экранировать их и, таким образом, предотвращать процесс ассоциации ЛНП. По-видимому, полаксамеры образуют с ЛНП комплекс и стабилизируют, таким образом, частицы липопротеидов. Это предположение подтверждается в работе Morita и соавторов (Morita et al 2003), показавших, что полаксамер L81, сходный по свойствам с использованным нами L61, образует при инкубации с ЛНП комплекс диаметром 30 нм. Также нам удалось показать, что полаксамеры не вызывают диссоциации уже образовавшихся ассоциатов ЛНП, но предотвращают дальнейшую ассоциацию частиц. Вероятно, это может означать, что амфифильные полимеры способны стабилизировать не только нативные частицы ЛНП, но и образующиеся ассоциаты, однако не способны обратить процесс ассоциации вспять.

Примечательно, что минимальная ингибирующая концентрация полаксамера тесно связана с критической концентрации мицеллообразования (ККМ). Как для полаксамера P85, так и в случае полаксамера L61 концентрации меньшие ККМ не оказывали влияния на процесс ассоциации. Эта закономерность, состоящая в проявлении биологической активности полаксамера только в концентрациях превышающих ККМ, отмечается в большинстве работ, посвященных изучению свойств полаксамеров.

Учитывая большое значение ассоциации ЛНП в патогенезе атеросклероза, полученные данные о возможности подавления ассоциации с помощью полаксамеров могут стимулировать разработку новых подходов к терапии и профилактике атеросклероза. С другой стороны, получены новые данные о разносторонней

биологической активности полаксамеров. Причины влияния полаксамеров на ассоциацию ЛНП, закономерности взаимодействия полимеров с частицами липопропротеидов заслуживают дальнейшего изучения. Решение этих вопросов позволит окончательно раскрыть механизмы ассоциации ЛНП.

3.6 Диагностическое и прогностическое значение ЦИК

В течение последних десятилетий активно изучалась роль ЛНП-содержащих ЦИК в атерогенезе. Наличие в крови аутоантител к ЛНП является результатом иммунного ответа организма на модификацию липопропротеидов (Yla-Herttuala S., 1989). ЛНП-содержащие ЦИК были обнаружены в крови больных при атеросклерозе (Tertov VV, 1990 а; Orekhov AN, 1991в; Szondy E, 1983; Orekhov AN, 1991в). Было установлено, что уровень X-ЦИК в крови больных коронарным атеросклерозом повышен по сравнению со здоровыми лицами (Tertov VV, 1990 б; Tertov VV, 1990 а). Анализ физико-химических свойств ЛНП, входящих в состав ЛНП-содержащих ЦИК, показал, что антигеном для формирования подобных комплексов являются множественно-модифицированные (десалирированные) ЛНП (Tertov V.V., 1996). ЛНП-содержащие ЦИК вызывают накопление холестерина в культивируемых клетках интимы аорты человека (Tertov VV, 1990 б) и в макрофагах (Klimov AN, 1988). Удаление ЛНП-ЛНП-содержащих ЦИК из сыворотки крови больных атеросклерозом приводит к существенному снижению ее атерогенного потенциала (Orekhov AN, 1991в). Поскольку накопление холестерина в клетках сопровождается стимуляцией других проявлений атерогенеза на клеточном уровне (Orekhov A.N., 1990), то возможно, что присутствие ЛНП-содержащих ЦИК в крови

способствует возникновению и прогрессированию атеросклеротического процесса в сосудистой стенке.

Однако некоторые авторы предполагают, что формирование ЦИКаутоиммунных комплексов модифицированный липопротеин низкой плотности–антитело может носить защитный характер: такие комплексы обладают меньшей способностью индуцировать накопление эфиров холестерина в макрофагах по сравнению с исходными модифицированными липопротеинами и быстро элиминируются из кровотока (Климов А. Н., 2008).

В ряде исследований у больных с ишемической болезнью сердца (ИБС) выявлено повышение уровня ЦИК и показана их связь с течением ИБС и нарушениями липидного обмена, уровнями окисленных ЛНП (Bing H., 2004; Wang J., 2003). Согласно экспериментальным данным, ЦИК, в зависимости от изотипа входящих в их состав антител, способны индуцировать секрецию провоспалительных цитокинов, матриксных металлопротеиназ, генерацию кислородных радикалов (Virella G., 2002). Эти молекулярные механизмы определяют патофизиологическое значение ЦИК иммунных комплексов в развитии атеросклеротических поражений стенки сосуда.

Атерогенные свойства ЛНП-содержащих ЦИК позволяют предлагать использование X-ЦИК в качестве биохимического маркера атеросклероза. Недавно была выявлена взаимосвязь между уровнем X-ЦИК и наличием коронарных и экстракоронарных стенозов. Диагностическая значимость X-ЦИК у больных с выраженными клиническими проявлениями атеросклероза оказалась выше, чем у широко используемых биохимических маркеров атеросклероза, таких как общий холестерин и холестерин ЛНП, холестерин ЛВП и

соотношение apoB:apoA-I (Orekhov A.N., 1995). В настоящем исследовании диагностическая значимость X-ЦИК была оценена у пациентов с бессимптомным ранним атеросклерозом. Было установлено, что повышенный уровень X-ЦИК ассоциирован с увеличенной толщиной ИМС сонных артерий, ультразвукографическим признаком раннего атеросклероза. Чувствительность и специфичность X-ЦИК оказалась наивысшей по сравнению с другими липидными параметрами.

Помимо диагностической значимости, повышенный уровень X-ЦИК при раннем атеросклерозе имеет также и высокое прогностическое значение, сравнимое с повышенными уровнями общего холестерина и холестерина ЛНП. Следует отметить, что нормальный уровень X-ЦИК оказался единственным высокоспецифичным биохимическим маркером, прогнозирующим отсутствие прогрессирования атеросклероза в течение 2 последующих лет.

Связь ЛНП-содержащих ЦИК с прогрессированием атеросклероза изучена недостаточно. Было показано, что титр антител к модифицированным ЛНП имеет прогностическую значимость в отношении острого инфаркта миокарда (Lopes-Virella MF, и др., 2012), но прогностическая ценность ЛНП-содержащих ЦИК не была оценена. Результаты недавнего 20-летнего проспективного исследования показали, что повышенный уровень ЦИК и антител к кардиолипину ассоциирован с риском инфаркта миокарда (Mustafa A., 2000). Тем не менее, состав ЦИК не был охарактеризован, поэтому невозможно сделать вывод об участии модифицированных ЛНП в формировании иммунных комплексов. В нашем исследовании впервые установлена прогностическая значимость ЛНП-содержащих ЦИК, определяемых по уровню X-ЦИК, в отношении

прогрессирования раннего атеросклероза. Результаты данного исследования показывают, что содержание иммунного холестерина в крови не только является маркером раннего атеросклероза, но также имеет высокую прогностическую ценность. Тем не менее, требуются дальнейшие проспективные исследования для выявления атерогенной роли этого параметра.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

апоВ-100 – аполипопротеид В-100

БСА – бычий сывороточный альбумин

ГЛБ – гидрофильно – липофильный баланс

ИФА – иммуноферментный анализ

ИФБ – изотонический фосфатный буфер, рН 7,4

ККМ – критическая концентрация мицеллообразования

ЛНП – липопротеиды низкой плотности

ЛВП – липопротеиды высокой плотности

МДА – малоновый диальдегид

МПО – миелопероксидаза

ПААГ – полиакриламидный гель

ПЭГ – полиэтиленгликоль со средней мол. массой 6000

ТБК – 2-тиобарбитуровая кислота

цмЛНП – циркулирующие множественно модифицированные ЛНП

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Андреева Е.Р. Михайлова И.А., Пугач И.М., Орехов А.Н. Клеточный состав атеросклеротических поражений аорты человека. // Ангиол сосуд хир. - 1999 г. - Т. 5 (приложение). - С. 6-26.
- 2 Андреева Е.Р. Тертов В.В., Мухин Д.Н., Орехов А.Н. Клеточный состав и биохимические особенности аорты человека. // Бюлл ВКНЦ АМН СССР. - 1985 г. - Т. 8. - С. 63-71.
- 3 Аничков Н Н Частня патологическая анатомия. Выпуск II. Сердце и сосуды. Второе издание. . - Москва-Ленинград : Медгиз, 1947.
- 4 Климов А. Н. Денисенко А. Д. Может ли иммунная система защищать нас от атеросклероза? // Мед. акад. журн. - 2008 г. - Т. 8. - № 2. - С. 115–117.
- 5 Климов АН [Раздел книги] // Биохимические основы патогенеза атеросклероза. - Ленинград - 1980.
- 6 Мельниченко А А Агрегация циркулирующих в крови модифицированных липопротеидов низкой плотности. Роль в накоплении внутриклеточного холестерина // Диссертация на соискание степени кандидата биологических наук. - Москва, 2006 г.
- 7 Орехов А Н Атеросклероз. Молекулярно-клеточные механизмы атерогенеза человека; антиатеросклеротическая терапия. . - [б.м.] : Palmarium Academic Publishing, 2013.
- 8 Орехов А.Н. Андреева Е.Р. Клеточные механизмы атеросклероза: роль субэндотелиальных клеток интимы // Ангиол сосуд хир. - 1999 г. - Т. 5 (приложение). - С. 96-136.
- 9 Орехов АН Тертов ВВ, Собенин ИА Модифицированные липопротеиды и атеросклероз. Обнаружение, характеристика, механизмы модификации, атерогенность. // LAP Lambert Academic Publishing , 2012.

- 10 Орехов АН Тертов ВВ, Собенин ИА. Модифицированные липопротеиды и атеросклероз. Обнаружение, характеристика, механизмы модификации, атерогенность. // LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH, 2012, 295 с. ISBN: 978-3-8433-8798-9.
- 11 Панасенко ОМ Мельниченко АА, Аксенов ДВ, Вахрушева ТВ, Супрун ИВ, Янушевская ЕВ, Власик ТН, Собенин ИА, Орехов АН Миелопероксидаза, модифицируя поверхность и снижая устойчивость к ассоциации липопротеинов низкой плотности крови человека, повышает их атерогенный потенциал // Биол. мембраны. - 2004 г. - Т. 21. - С. 498-505.
- 12 Панасенко ОМ Тертов ВВ, Мельниченко АА, Аксенов ДВ, Собенин ИА, Каплун ВВ, Супрун ИВ, Орехов АН Связь размера дегликозилированных различными ферментами апо-В-содержащих липопротеинов с их атерогенным потенциалом. // Биол. мембраны. - 2006 г. - Т. 23. - С. 43-52.
- 13 Тертов ВВ Множественно-модифицированные липопротеиды низкой плотности, циркулирующие в крови человека // Ангиология и сосудистая хирургия. - 1999 г. - Т. 5. - С. 218-236.
- 14 Adameova A Xu YJ, Duhamel TA, Tappia PS, Shan L, Dhalla NS. Anti-atherosclerotic molecules targeting oxidative stress and inflammation. // Curr Pharm Des. - 2009 г. - Т. 15(27). - С. 3094-107.
- 15 Alaupovic P Apolipoproteins and lipoproteins . - 1971 г. - 2 : Т. 13. - С. 141-6.
- 16 Andreeva E.R. Rekhter M.D., Romanov YuA et al. Stellate cells of aortic intima: II. Arborization of intimal cells in culture. // Tissue Cel. - 1992 г. - Т. 24. - С. 697-704.
- 17 Armengol C Bartolí R, Sanjurjo L, Serra I, Amézaga N, Sala M, Sarrias MR. Role of scavenger receptors in the pathophysiology of chronic liver diseases. // Crit Rev Immunol. - 2013 г. - Т. 33(1). - С. 57-96.

- 18 Asatryan L Hamilton RT, Isas JM, Hwang J, Kayed R, Sevanian A. LDL phospholipid hydrolysis produces modified electronegative particles with an unfolded apoB-100 protein. // *J Lipid Res.* - 2005 г. - Т. 46(1). - С. 115-22.
- 19 Avogaro P Bon GB and Cazzolato G Presence of a modified low density lipoprotein in humans // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* - 1988 г. - Т. 8. - С. 79.
- 20 Avogaro P Cazzolato G and Bittolo-Bon G Some questions concerning a small, more electronegative LDL circulating in human plasma // *Atherosclerosis.* - 1991 г. - 1-2 : Т. 91. - С. 163-71.
- 21 Badimón L Vilahur G, Padró T. Lipoproteins, platelets and atherothrombosis. // *Rev Esp Cardiol.* - 2009 г. - Т. 62(10). - С. 1161-78.
- 22 Baenziger JU Fiete D Structural determinants of Ricinus communis agglutinin and toxinspecificity for oligosaccharides // *J Biol Chem.* - 1979 г. - Т. 254. - С. 9795-9.
- 23 Bambauer R Schiel R, Latza R. Low-density lipoprotein apheresis: an overview. // *Ther Apher Dial.* . - 2003 г. - Т. 7(4). - С. 382-90.
- 24 Bancells C Villegas S, Blanco FJ, Benítez S, Gállego I, Beloki L, Pérez-Cuellar M, Ordóñez-Llanos J, Sánchez-Quesada JL. Aggregated electronegative low density lipoprotein in human plasma shows a high tendency toward phospholipolysis and particle fusion. // *J Biol Chem.* . - 2010 г. - Т. 285(42). - С. 32425-35.
- 25 Basu SK Brown MS, Ho YK, Goldstein JL. Degradation of low density lipoprotein . dextran sulfate complexes associated with deposition of cholesteryl esters in mouse macrophages. // *J Biol Chem.* . - 1979 г. - Т. 254(15). - С. 7141-6.
- 26 Bates SR Wissler RW. Effect of hyperlipemic serum on cholesterol accumulation in monkey aortic medial cells // *Biochim Biophys Acta.* - 1976 г. - 1 : Т. 450. - С. 78-88.

- 27 Bergethon PR Kindler DD, Hallock K, Blease S, Toselli P. Continuous exposure to low amplitude extremely low frequency electrical fields characterizing the vascular streaming potential alters elastin accumulation in vascular smooth muscle cells. // *Bioelectromagnetics*. - 2013 г. - 5 : Т. 34. - С. 358-65.
- 28 Bing H. Wang J., Zhang C., Cai H. Positive correlation between in vivo oxidized LDL and LDL immune complexes // *Clin. Biochem*. - 2004 г. - Т. 37, № 1. - С. 72-75.
- 29 Bobryshev Y. V. Lord R. S. Ultrastructural recognition of cells with dendritic cell morphology in human aortic intima. Contacting interactions of vascular dendritic cells in athero-resistant and athero-prone areas of the normal aorta. // *Arch. Histol*. - 1995 г. - Т. 58. - С. 307-322.
- 30 Brooke B. S. Bayes-Genis A. Li DY. New insights into elastin and vascular disease // *Trends Cardiovasc. Med*. - 2003 г. - Т. 13. - С. 176-81.
- 31 Brown MS Goldstein JL Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis // *Annu. Rev. Biochem*. - 1983 г. - Т. 52. - С. 223-261.
- 32 Businaro R Tagliani A, Buttari B, Profumo E, Ippoliti F, Di Cristofano C, Capoano R, Salvati B, Riganò R. Cellular and molecular players in the atherosclerotic plaque progression. // *Ann N Y Acad Sci* . - 2012 г. - Т. 1262. - С. 134-141.
- 33 Buton X Mamdouh Z, Ghosh R, Du H, Kuriakose G, Beatini N, Grabowski GA, Maxfield FR and Tabas I Unique Cellular Events Occurring during the Initial Interaction of Macrophages with Matrix-retained or Methylated Aggregated Low Density Lipoprotein (LDL) // *J. Biol. Chem*. - 1999 г. - Т. 274. - С. 32112-21.
- 34 Camejo G. Lopez A., Lopez F., Quinones J.t Interaction of low density lipoproteins with arterial proteoglycans. The role of sialic acid content // *Atherosclerosis*. - 1985 г. - Т. 55. - С. 93-105.

- 35 Chazov EI Tertov VV, Orekhov AN, Lyakishev AA, Perova NV, Kurdanov KA, Khashimov KA, Novikov ID, Smirnov VN Atherogenicity of blood serum from patients with coronary heart disease [Journal] // Lancet. - Sep 13, 1986. - Vol. 2(8507). - pp. 595-8.
- 36 Cianciola NL Carlin CR, Kelley TJ Molecular pathways for intracellular cholesterol accumulation: common pathogenic mechanisms in Niemann-Pick disease Type C and cystic fibrosis. // Arch Biochem Biophys. - 2011 г. - T. 515(1-2). - C. 54-63.
- 37 Cianciola NL Carlin CR, Kelley TJ. Molecular pathways for intracellular cholesterol accumulation: common pathogenic mechanisms in Niemann-Pick disease Type C and cystic fibrosis. // Arch Biochem Biophys. - 2011 г. - T. 515(1-2). - C. 54-63.
- 38 Cookson FB The origin of foam cells in atherosclerosis // Br J Exp Pathol. - 1971 г. - 1 : T. 52. - C. 62-9.
- 39 Csiszar A Labinskyy N, Zhao X, Hu F, Serpillon S, Huang Z, Ballabh P, Levy RJ, Hintze TH, Wolin MS, Austad SN, Podlutzky A, Ungvari Z. Vascular superoxide and hydrogen peroxide production and oxidative stress resistance in two closely related rodent species with disparate longevity. // Aging Cell. - 2007 г. - T. 6(6). - C. 783-97.
- 40 Daub K Siegel-Axel D, Schönberger T, Leder C, Seizer P, Müller K, Schaller M, Penz S, Menzel D, Büchele B, Bültmann A, Münch G, Lindemann S, Simmet T, Gawaz M. Inhibition of foam cell formation using a soluble CD68-Fc fusion protein. // J Mol Med (Berl). - 2010 г. - T. 88(9). - C. 909-20.
- 41 Davis HR Jr Tereshakovec AM, Tomassini JE, Musliner T. Intestinal sterol transporters and cholesterol absorption inhibition. . - 2011 г. - T. 22(6). - C. 467-78.
- 42 Deevska GM Sunkara M, Morris AJ, Nikolova-Karakashian MN. Characterization of secretory sphingomyelinase activity, lipoprotein

sphingolipid content and LDL aggregation in ldlr^{-/-} mice fed on a high-fat diet. // *Biosci Rep.* . - 2012 г. - Т. 32(5). - С. 479-90.

43 Delporte C Van Antwerpen P, Vanhamme L, Roumeguère T, Zouaoui Boudjeltia K. Low-density lipoprotein modified by myeloperoxidase in inflammatory pathways and clinical studies // *Mediators Inflamm.* - 2013 г. - С. 971579.

44 Dominiczak MH Caslake MJ. Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. // *Ann Clin Biochem. Nov;.* - 2011 г. - Т. 48(Pt 6). - С. 498-515.

45 Esterbauer H Gebicki J, Puhl H and Jürgens G The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL // *Free Radic. Biol. Med.* - 1992 г. - Т. 13 . - С. 341–390.

46 Fisher E A The degradation of apolipoprotein B100: multiple opportunities to regulate VLDL triglyceride production by different proteolytic pathways. // *Biochim Biophys Acta.* - 2012 г. - Т. 1821(5). - С. 778-81.

47 Fogelman AM Shechter I, Seager J, Hokom M, Child JS and Edwards PA. Malondialdehyde Alteration of Low Density Lipoproteins Leads to Cholesteryl Ester Accumulation in Human Monocyte-Macrophages // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1980 г. - Т. 77. - С. 2214-18.

48 Fouchier SW Defesche JC. Lysosomal acid lipase A and the hypercholesterolaemic phenotype. // *Curr Opin Lipidol.* . - 2013 г. - Т. 24(4). - С. 332-8.

49 Fowler SM Scio MA, Haley NJ. Characterization of lipid-laden aortic cells from cholesterol rabbits. IV. Investigation of macrophage-like proteins of aortic cell populations. . - 1979 г. - Т. 41. - С. 372-378.

50 Galis ZS Sukhova GK, Lark MW, Libby . Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques // *J. Clin. Invest.* - 1994 г. - Т. 94. - С. 2493–2503.

- 51 Garrido-Sánchez L Chinchurreta P, García-Fuentes E, Mora M, Tinahones FJ A higher level of IgM anti-oxidized LDL antibodies is associated with a lower severity of coronary atherosclerosis in patients on statins // *Int J Cardiol.* - 2010 г. - Т. 145(2). - С. 263-4.
- 52 Geer J. C. McGill H. C., Strong J. P., Holman R. L. Electron microscopy of human atherosclerotic lesions. // *Fed. Proc.* - 1960 г. - Т. 19. - С. 15–8.
- 53 Ghesquiere SA Hofker MH, de Winther MP. The role of phospholipases in lipid modification and atherosclerosis. // *Cardiovasc Toxicol.* - 2005 г. - Т. 5(2). - С. 161-82.
- 54 Ghesquiere SA Hofker MH, de Winther MP. The role of phospholipases in lipid modification and atherosclerosis. // *Cardiovasc Toxicol.* - 2005 г. - Т. 5(2). - С. 161-82.
- 55 Goldstein JL Brown MS. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis // *Annu Rev Biochem.* - 1977 г. - Т. 46. - С. 897–930.
- 56 Goldstein JL Ho YK, Basu SK, and Brown MS Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. // *Proc Natl Acad Sci USA* . - 1979 г. - Т. 76. - С. 333-7.
- 57 Gorshkova IN Menschikowski M, Jaross W. Alterations in the physiochemical characteristics of low and high density lipoproteins after lipolysis with phospholipase A2. A spin-label study. . - 1996 г. - Т. 1300(2). - С. 103-13.
- 58 Goswami B Rajappa M, Chakraborty B, Patra SK, Kumar S, Mallika V. Comparison of the various lipid ratios and indices for risk assessment in patients of myocardial infarction. // *Clin Biochem.* . - 2012 г. - Т. 45(6). - С. 445-9.
- 59 Gown A.M. Tsukada T., Ross R. Human atherosclerosis. II. Immunocytochemical analysis of the cellular composition of human

- atherosclerotic lesions. [Journal] // Am J Pathol. - 1986. - Vol. 125. - pp. 191-207.
- 60 Grainger DJ Kemp PR, Liu AC, Lawn RM and Metcalfe JC
Activation of transforming growth factor-beta is inhibited in transgenic apolipoprotein(a) mice // Nature. - 1994 г. - Т. 370. - С. 460–462.
- 61 Greig FH Kennedy S, Spickett CM. Physiological effects of oxidized phospholipids and their cellular signaling mechanisms in inflammation. // Free Radic Biol Med. . - 2012 г. - Т. 52(2). - С. 266-80.
- 62 Guarino AJ Lee SP, Tulenko TN, Wrenn SP Aggregation kinetics of low density lipoproteins upon exposure to sphingomyelinase // J Colloid Interface Sci. - 2004 г. - Т. 279(1). - С. 109-16.
- 63 Guarino AJ Tulenko TN, Wrenn SP Sphingomyelinase-to-LDL molar ratio determines low density lipoprotein aggregation size: biological significance. // Chem Phys Lipids. - 2006 г. - Т. 142(1-2). - С. 33-42.
- 64 Guha M Gursky O. Effects of oxidation on structural stability and remodeling of human very low density lipoprotein. // Biochemistry. - 2010 г. - Т. 49(44). - С. 9584-93.
- 65 Guyton J. R. Bocan T. M., Schifani T. A. Quantitative ultrastructural analysis of perifibrous lipid and its association with elastin in nonatherosclerotic human aorta. // Arteriosclerosis. - 1985 г. - Т. 5. - С. 644–652.
- 66 Guyton JR Klemp KF Ultrastructural discrimination of lipid droplets and vesicles in atherosclerosis: value of osmium-thiocarbohydrazide-osmium and tannic acid-paraphenylenediamine techniques. // J. Histochem. Cytochem. - 1988 г. - Т. 36. - С. 1319–1328.
- 67 Hansson G. K. Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. // Nat. Immunol. - 2011 г. - Т. 12. - С. 204–212.
- 68 Hansson GK Atherosclerosis – an immune disease: the Anitschkov lecture 2007. // Atherosclerosis. - 2009 г. - Т. 202. - С. 2–10.

- 69 Hazell LJ van den Berg JJ and Stocker R Oxidation of low-density lipoprotein by hypochlorite causes aggregation that is mediated by modification of lysine residues rather than lipid oxidation // *Biochem J.* - 1994 г. - 1 : T. 302. - C. 297-304.
- 70 Heinecke JW Suits AG, Aviram M, Chait A. Phagocytosis of lipase-aggregated low density lipoprotein promotes macrophage foam cell formation. Sequential morphological and biochemical events. // *Arterioscler Thromb.* . - 1991 г. - T. 11(6). - C. 1643-51.
- 71 Helske S Kupari M, Lindstedt KA, Kovanen PT. Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process. // *Curr Opin Lipidol.* - 2007 г. - T. 18(5). - C. 483-91.
- 72 Hoff HF Hoppe G. Structure of cholesterol-containing particles accumulating in atherosclerotic lesions and the mechanisms of their derivation. // *Curr Opin Lipidol.* . - 1995 г. - T. 6(5). - C. 317-25.
- 73 Hoff HF Whitaker TE and O'Neil J Oxidation of low density lipoprotein leads to particle aggregation and altered macrophage recognition // *J. Biol. Chem.* - 1992 г. - T. 267. - C. 602-9.
- 74 Huang AS Gonzalez JM Jr, Le PV, Heur M, Tan JC Sources of Structural Autofluorescence in the Human Trabecular Meshwork. // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* - 2013 г. - T. 1. - C. 12-11235.
- 75 Hurt-Camejo E Camejo G, Sartipy P. Phospholipase A2 and small, dense low-density lipoprotein. // *Curr Opin Lipidol.* . - 2000 г. - T. 11(5). - C. 465-71.
- 76 Jayaraman S Gantz D, Gursky O. Structural basis for thermal stability of human low-density lipoprotein. // *Biochemistry.* - 2005 г. - T. 44(10). - C. 3965-71.
- 77 Jayaraman S Gantz DL, Gursky O Effects of oxidation on the structure and stability of human low-density lipoprotein // *Biochemistry.* - 2007 г. - T. 46(19). - C. 5790-7.

- 78 Kaartinen M Penttilä A, Kovanen PT Mast cells of two types differing in neutral protease composition in the human aortic intima. Demonstration of tryptase- and tryptase hymasecontaining mast cells in normal intimas, fatty streaks, and the shoulder regions of atheromas. // *Arterioscler. Thromb.* - 1994 г. - T. 14. - C. 966–972.
- 79 Kacharava AG Tertov VV, Orekhov AN. Autoantibodies against low-density lipoprotein and atherogenic potential of blood. // *Ann Med.* . - 1993 г. - T. 25. - C. 551-5.
- 80 Kassel KM Sullivan BP, Cui W, Copple BL, Luyendyk JP. Therapeutic administration of the direct thrombin inhibitor argatroban reduces hepatic inflammation in mice with established fatty liver disease. // *Am J Pathol.* . - 2012 г. - T. 181(4). - C. 1287-95.
- 81 Katsuda S Kaji T. Atherosclerosis and extracellular matrix. // *Atheroscler. Thromb.* - 2003 г. - T. 10. - C. 267–274.
- 82 Katsuda S. Boyd H.C., Fluckiger R., et al. Human atherosclerosis. III. Immunocytochemical analysis of the cell composition of lesions of young adults. // *Am J Pathol.* - 1992 г. - T. 140. - C. 907-14.
- 83 Kawabe Y Cynshi O, Takashima Y, Suzuki T, Ohba Y and Kodama T Oxidation-induced aggregation of rabbit low-density lipoprotein by azo initiator // *Arch Biochem Biophys.* - 1994 г. - T. 310(2). - C. 489-96.
- 84 Keidar S Kaplan M, Hoffman A, Aviram M. Angiotensin II stimulates macrophage-mediated oxidation of low density lipoproteins. // *Atherosclerosis.* . - 1995 г. - T. 115(2). - C. 201-15.
- 85 Khoo JC Miller E, McLoughlin P and Steinberg B. Prevention of low density lipoprotein aggregation by high density lipoprotein or apolipoprotein A-I // *J. Lipid Res.* - 1990 г. - T. 31. - C. 645.
- 86 Kinnunen PK Holopainen JM. Sphingomyelinase activity of LDL: a link between atherosclerosis, ceramide, and apoptosis? // *Trends Cardiovasc Med.* . - 2002 г. - T. 12(1). - C. 37-42.

- 87 Klein RL Laimins M, Lopes-Virella MF. Isolation, characterization, and metabolism of the glycosylated and nonglycosylated subfractions of low-density lipoproteins isolated from type I diabetic patients and nondiabetic subjects. // *Diabetes*. - 1995 г. - Т. 44(9). - С. 1093-8.
- 88 Kleinman Y Krul ES, Burnes M, Aronson W, Pflieger B, Schonfeld G. Lipolysis of LDL with phospholipase A2 alters the expression of selected apoB-100 epitopes and the interaction of LDL with cells. // *J Lipid Res*. - 1988 г. - Т. 29(6). - С. 729-43.
- 89 Klimov AN Denisenko AD, Vinogradov AG, Nagornev VA, Pivovarova YI, Sitnikova OD, Pleskov VM Accumulation of cholesterol esters in macrophages incubated with human lipoprotein-antibody autoimmune complex. // *Atherosclerosis*. - 1988 г. - Т. 74(1-2). - С. 41-46.
- 90 Kodama T Freeman M, Rohrer L, Zabrecky J, Matsudaira P, and Krieger M. Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. // *Nature*. - 1990 г. - Т. 343. - С. 531-535.
- 91 Kovanen P T Mast cells: multipotent local effector cells in atherothrombosis. // *Immunol Rev*. Jun.;:Review. - 2007 г. - Т. 217. - С. 105-22. .
- 92 Krieger M Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. // *J Clin Invest*. - 2001 г. - Т. 108(6). - С. 793-7.
- 93 Krieger M Acton S, Ashkenas J, Pearson A, Penman M, and Resnick D. Molecular flypaper, host defense, and atherosclerosis. Structure, binding properties, and functions of macrophage scavenger receptors. // *J. Biol. Chem*. - 1993 г. - Т. 268. - С. 4569-4572.
- 94 Krieger M The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. // *Curr. Opin. Lipidol*. - 1997 г. - Т. 8. - С. 275-280.
- 95 Krisko A Stjepanović G, Pifat G, Ruysschaert JM, Goormaghtigh E. Detection of apolipoprotein B100 early conformational changes during oxidation. // *Biochim Biophys Acta*. - 2007 г. - Т. 1768(11). - С. 2923-30.

- 96 Kruth H S Receptor-independent fluid-phase pinocytosis mechanisms for induction of foam cell formation with native low-density lipoprotein particles. // *Curr Opin Lipidol.* - 2011 г. - Т. 22(5). - С. 386-93.
- 97 Kruth HS Localization of unesterified cholesterol in human atherosclerotic lesions. Demonstration of filipin-positive, Oil-Red-O-negative particles. // *Am. J. Pathol.* - 1984 г. - Т. 114. - С. 201–208.
- 98 La Belle M Krauss RM Differences in carbohydrate content of low density lipoproteins associated with low density lipoprotein subclass patterns // *J Lipid Res.* - 1990 г. - Т. 31. - С. 1577-1588.
- 99 Lappalainen J Lindstedt KA, Oksjoki R, Kovanen PT OxLDL-IgG immune complexes induce expression and secretion of proatherogenic cytokines by cultured human mast cells. // *Atherosclerosis.* - 2011 г. - Т. 214(2). - С. 357-63.
- 100 Libby P Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. // *Nature.* - 2011 г. - Т. 473(7347). - С. 317-325.
- 101 Lipponen K Liu Y, Stege PW, Öörni K, Kovanen PT, Riekkola ML. Capillary electrochromatography and quartz crystal microbalance, valuable techniques in the study of heparin-lipoprotein interactions. // *Anal Biochem.* - 2012 г. - Т. 424(1). - С. 71-8.
- 102 Lojda Z Ruzickova M, Havrankova E and Synkova V Lysosomal proteases in the normal and atherosclerotic arterial wall // *Histochem. J.* - 1984 г. - Т. 16. - С. 399–405.
- 103 Lopes-Virella MF Baker NL, Hunt KJ, Lyons TJ, Jenkins AJ, Virella G High concentrations of AGE-LDL and oxidized LDL in circulating immune complexes are associated with progression of retinopathy in type 1 diabetes. // *Diabetes Care.* - 2012 г. - Т. 35(6). - С. 1333-4.
- 104 Lopes-Virella MF Hunt KJ, Baker NL, Virella G, Moritz T The levels of MDA-LDL in circulating immune complexes predict myocardial

infarction in the VADT study. // *Atherosclerosis*. - 2012 г. - Т. 224(2). - С. 526-31.

105 Lopes-Virella MF Hunt KJ, Baker NL, Virella G, Moritz T и Investigators. VADT The levels of MDA-LDL in circulating immune complexes predict myocardial infarction in the VADT study. //

Atherosclerosis. - 2012 г. - Т. 224(2). - С. 526-31.

106 Lopes-Virella MF Klein RL, Lyons TJ, Stevenson HC and Witztum JL Glycosylation of low-density lipoprotein enhances cholesteryl ester synthesis in human monocyte-derived macrophages // *Diabetes*. - 1988 г. - Т. 37. - С. 550.

107 Lopes-Virella MF Virella G. Pathogenic Role of Modified LDL Antibodies and Immune Complexes in Atherosclerosis. // *J Atheroscler Thromb.* . - 2013 г. - Т. Aug 20. [Epub ahead of print].

108 Lottin H Motta C, Simard G. Differential effects of glycerol- and sphingo-phospholipolysis on human high-density lipoprotein fluidity. // *Biochim Biophys Acta.* . - 1996 г. - Т. 1301(1-2). - С. 127-32.

109 Lu M Gantz DL, Herscovitz H, Gursky O. Kinetic analysis of thermal stability of human low density lipoproteins: a model for LDL fusion in atherogenesis. // *J Lipid Res.* - 2012 г. - Т. 53(10). - С. 2175-85.

110 Lund-Katz S Laboda HM, McLean LR and Phillips MC Influence of molecular packing and phospholipid type on rates of cholesterol exchange // *Biochemistry*. - 1988 г. - Т. 27. - С. 3416–3423.

111 Lund-Katz S Phillips MC Packing of cholesterol molecules in human low-density lipoprotein // *Biochemistry*. - 1986 г. - Т. 25. - С. 1562–1568.

112 Maeda S Nakanishi S, Yoneda M, Awaya T, Yamane K, Hirano T, Kohno N. Associations between small dense LDL, HDL subfractions (HDL2, HDL3) and risk of atherosclerosis in Japanese-Americans // *J Atheroscler Thromb.* - 2012 г. - Т. 19(5). - С. 444-52.

113 Maiolino G Pedon L, Cesari M, Frigo AC, Barisa M, Rossitto G, Seccia TM, Zanchetta M, Rossi GP. Antibodies to malondialdehyde

oxidized low-density lipoproteins predict long term cardiovascular mortality in high risk patients. // *Int J Cardiol.* . - 2013 г. - Т. 168(1). - С. 484-9.

114 Marathe GK Harrison KA, Murphy RC, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Bioactive phospholipid oxidation products. // *Free Radic Biol Med.* . - 2000 г. - Т. 28(12). - С. 1762-70.

115 Marathe S Schissel SL, Yellin MJ, Beatini N, Mintzer R, Williams KJ and Tabas I Human vascular endothelial cells are a rich and regulatable source of secretory sphingomyelinase. Implications for early atherogenesis and ceramide-mediated cell signaling // *J. Biol. Chem.* - 1998 г. - Т. 273. - С. 4081–4088.

116 Mattjus P Slotte JP Does cholesterol discriminate between sphingomyelin and phosphatidylcholine in mixed monolayers containing both phospholipids? // *Chem. Phys. Lipids.* - 1996 г. - Т. 81. - С. 69–80.

117 Mayasari DS Emoto N, Yagi K, Vignon-Zellweger N et al Rhodamine-labeled LDL as a tool to monitor the lipoprotein traffic in experimental model of early atherosclerosis in mice // *Kobe J Med Sci.* - Kobe J Med Sci. 2013 Apr 18;59(2):E54-63. Rhodamine-labeled LDL as a tool to monitor the lipoprotein traffic in experimental model of early atherosclerosis in mice. : [б.н.], 2013 г. - Т. 59(2). - С. 54-63.

118 Melchior JT Sawyer JK, Kelley KL, Shah R, Wilson MD, Hantgan LDL particle core enrichment in cholesteryl oleate increases proteoglycan binding and promotes atherosclerosis. // *J Lipid Res.* - 2013 г. - Т. 54(9). - С. 2495-503.

119 Mineo C Shaul PW. Functions of scavenger receptor class B, type I in atherosclerosis. // *Curr Opin Lipidol.* - 2012 г. - Т. 23(5). - С. 487-93.

120 Mohty D Pibarot P, Després JP, Côté C, Arsenaault B, Cartier A, Cosnay P, Couture C, Mathieu P. Association between plasma LDL particle size, valvular accumulation of oxidized LDL, and inflammation in

patients with aortic stenosis. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* . - 2008 г. - T. 28(1). - C. 187-93.

121 Mukhin D. N. Orekhov A. N., Andreeva E. R., Schindeler E. M., Smirnov V. N. Lipids in cells of atherosclerotic and uninvolved human aorta. III. Lipid distribution in intimal sublayers // *Exp. Mol. Pathol.* - 1991 г. - T. 54. - C. 22-30.

122 Murphy HC Ala-Korpela M, White JJ, Raoof A, Bell JD, Barnard ML, Burns SP and Iles RA . Evidence for distinct behaviour of phosphatidylcholine and sphingomyelin at the low density lipoprotein surface // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1997 г. - T. 234. - C. 733-737.

123 Murphy HC Burns SP, White JJ, Bell JD, Iles RA. Investigation of human low-density lipoprotein by (1)H nuclear magnetic resonance spectroscopy: mobility of phosphatidylcholine and sphingomyelin headgroups characterizes the surface layer. // *Biochemistry.* - 2000 г. - T. 39(32). - C. 9763-70.

124 Mustafa A. Nityanand S., Berglund L. et a Circulating immune complexes in 50-year-old men as a strong and independent risk factor for myocardial infarction // *Circulation.* - 2000 г. - T. 102. - C. 2576-2581.

125 Nagai T Miyaichi Y, Tomimori T, Yamada H. Inhibition of mouse liver sialidase by plant flavonoids. // *Biochem Biophys Res Commun.* - 1989 г. - T. 163. - C. 25-32.

126 Nilsson A Duan RD. Absorption and lipoprotein transport of sphingomyelin. // *J Lipid Res.* - 2006 г. - T. 47(1). - C. 154-71.

127 Nilsson J Björkbacka H, Fredrikson GN. Apolipoprotein B100 autoimmunity and atherosclerosis - disease mechanisms and therapeutic potential. // *Curr Opin Lipidol.* . - 2012 г. - T. 23(5). - C. 422-8.

128 Noma A. Takahashi T., Wada T Elastin-lipid interaction in the arterial wall. Part 2. In vitro binding of lipoprotein lipids to arterial elastin

- and the inhibitory effect of high density lipoproteins on the process // *Atherosclerosis*, - 1979 г. - Т. 33. - С. 373-382.
- 129 Noma A, Takahashi T., Wada T Elastin–lipid interaction in the arterial wall. Part 2. In vitro binding of lipoprotein–lipids to arterial elastin and the inhibitory effect of high density lipoproteins on the process. // *Atherosclerosis*. - 1981 г. - Т. 38. - С. 373–382.
- 130 Nyssönen K, Kurl S, Karppi J, Nurmi T, Baldassarre D, Veglia F, Rauramaa R, de Faire U, Hamsten A, Smit AJ, Mannarino E et al LDL oxidative modification and carotid atherosclerosis: results of a multicenter study // *Atherosclerosis*. - 2012 г. - Т. 225(1). - С. 231-6.
- 131 Oestvang J, Johansen B. PhospholipaseA2: a key regulator of inflammatory signalling and a connector to fibrosis development in atherosclerosis. // *Biochim Biophys Acta*. . - 2006 г. - Т. 1761(11). - С. 1309-16.
- 132 Öörni K, Hakala JK, Annala A, Ala-Korpela M, Kovanen PT. Sphingomyelinase induces aggregation and fusion, but phospholipase A2 only aggregation, of low density lipoprotein (LDL) particles. Two distinct mechanisms leading to increased binding strength of LDL to human aortic proteoglycans. // *J Biol Chem*. . - 1998 г. - Т. 273(44). - С. 29127-34.
- 133 Öörni K, Kovanen PT. Enhanced extracellular lipid accumulation in acidic environments. // *Curr Opin Lipidol*. . - 2006 г. - Т. 17(5). - С. 534-40.
- 134 Öörni K, Posio P, Ala-Korpela M, Jauhiainen M, Kovanen PT. Sphingomyelinase induces aggregation and fusion of small very low-density lipoprotein and intermediate-density lipoprotein particles and increases their retention to human arterial proteoglycans. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. . - 2005 г. - Т. 25(8). - С. 1678-83.
- 135 Orekhov A. N., Andreeva E. R., Andrianova I. V., Bobryshev Y. V. Peculiarities of cell composition and cell proliferation in different type

- atherosclerotic lesions in carotid and coronary arteries // *Atherosclerosis*. - 2010 г. - Т. 212. - С. 436–443.
- 136 Orekhov A. N. Andreeva E. R., Tertov V. V The distribution of cells and chemical components in the intima of human aorta // *Soc. Med. Rev. A: Cardiol.* - 1987 г. - Т. 1. - С. 75–100.
- 137 Orekhov A.N. Andreeva E.R., Tertov V.V., Krushinskii A.V. Dissociated cells from different layers of adult human aortic wall // *Acta Anat (Basel)*. - 1984 г. - Т. 119. - С. 99-105.
- 138 Orekhov A.N. Kalenich O.S., Tertov V.V. Diagnostic value of immune cholesterol as a marker for atherosclerosis. // *J. Cardiovasc. Risk*. - 1995 г. - Т. 2. - С. 459-466.
- 139 Orekhov A.N. Tertov V.V. Atherogenicity of anti-LDL autoantibodies // *Treatment of Severe Dyslipoproteinemia in the Prevention of Coronary Heart Disease*. - Basel : [б.н.], 1992 г. - Т. 3. - С. 91-8.
- 140 Orekhov A.N. Tertov V.V. Atherogenicity of autoantibodies against low density lipoprotein. // *Agents and Actions*. - 1991 г. - Т. 32. - С. 128-9.
- 141 Orekhov A.N. Tertov V.V., Kudryashov S.A., Smirnov V.N. Triggerlike stimulation of cholesterol accumulation and DNA and extracellular matrix synthesis induced by atherogenic serum or low density lipoprotein in cultured cells // *Circ Res*. - 1990 г. - Т. 66(2). - С. 311-320.
- 142 Orekhov A.N. Tertov V.V., Mukhin D.N., et al. Association of low-density lipoprotein with particulate connective tissue matrix components enhances cholesterol accumulation in cultured subendothelial cells of human aorta // *Biochim Biophys Acta*. - 1987 г. - Т. 928(3). - С. 251-258.
- 143 Orekhov A.N. Tertov V.V., Mukhin D.N., et al. Insolubilization of low density lipoprotein induces cholesterol accumulation in cultured subendothelial cells of human aorta // *Atherosclerosis*. - 1989 г. - Т. 79. - С. 59-70.

- 144 Orekhov A.N. Tertov V.V., Novikov I.D., et al. Lipids in cells of atherosclerotic and uninvolved human aorta. I. Lipid composition of aortic tissue and enzyme-isolated and cultured cells. // *Exp Mol Pathol.* - 1985 г. - T. 42(1). - C. 117-37.
- 145 Orekhov AN Kalenich OS, Tertov VV, Novikov ID. Lipoprotein immune complexes as markers of atherosclerosis. // *Int. J. Tissue React.* - 1991Б г. - T. 13. - C. 233-6.
- 146 Orekhov AN Tertov VV, Kabakov AE, Adamova IYu, Pokrovsky SN, Smirnov VN Autoantibodies against modified low density lipoprotein. Nonlipid factor of blood plasma that stimulates foam cell formation. // *Arterioscler Thromb.* - 1991 б г. - T. 11. - C. 316-26.
- 147 Orekhov AN Tertov VV, Mukhin DN, Mikhailenko IA Modification of low density lipoprotein by desialylation causes lipid accumulation in cultured cells: discovery of desialylated lipoprotein with altered cellular metabolism in the blood of atherosclerotic patients. // *Biochem Biophys Res Commun.* - 14 Jul 1989 г. - T. 162 (1). - C. 206-11.
- 148 Orekhov AN Tertov VV, Mukhin DN, Mikhailenko IA Modification of low density lipoprotein by desialylation causes lipid accumulation in cultured cells: discovery of desialylated lipoprotein with altered cellular metabolism in the blood of atherosclerotic patients. // *Biochem Biophys Res Commun.* - 1989 г. - T. 162(1). - C. 206-11.
- 149 Orekhov AN Tertov VV, Mukhin DN. Desialylated low density lipoprotein - naturally occurring lipoprotein with atherogenic potency. // *Atherosclerosis.* - 1991 а г. - T. 86. - C. 153-61.
- 150 Orsó E Grandl M, Schmitz G. Oxidized LDL-induced endolysosomal phospholipidosis and enzymatically modified LDL-induced foam cell formation determine specific lipid species modulation in human macrophages. // *Chem Phys Lipids.* - 2011 г. - T. 164(6). - C. 479-87.

- 151 Packard RR Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. // Clin Chem. . - 2008 г. - Т. 54(1). - С. 24-38.
- 152 Pearse A G Histochemistry: theoretical and applied. . - London : Churchill Ltd., 1969.
- 153 Piha M Lindstedt L, Kovanen PT Fusion of proteolyzed low-density lipoprotein in the fluid phase: a novel mechanism generating atherogenic lipoprotein particles // Biochemistry. - 1995 г. - 32 : Т. 34. - С. 10120-9.
- 154 Plihtari R Hurt-Camejo E, Oörni K, Kovanen PT Proteolysis sensitizes LDL particles to phospholipolysis by secretory phospholipase A2 group V and secretory sphingomyelinase // J Lipid Res. - 2010 г. - Т. 51(7). - С. 1801-9.
- 155 Podet EJ Shaffer DR, Gianturco SH, Bradley WA, Yang CY, Guyton JR. Interaction of low density lipoproteins with human aortic elastin. // Arterioscler Thromb. . - 1991 г. - Т. 11(1). - С. 116-22.
- 156 Pranavchand R Reddy BM. Current status of understanding of the genetic etiology of coronary heart disease. // J Postgrad Med. Jan-Mar;.: - 2013 г. - Т. 59(1). - С. 30-41.
- 157 Quarles L D Reducing cardiovascular mortality in chronic kidney disease: something borrowed, something new. // J Clin Invest. - 2013 г. - Т. 123(2). - С. 542-3.
- 158 Ravandi A Boekholdt SM, Mallat Z, Talmud PJ, Kastelein JJ, Wareham NJ, Miller ER, Benessiano J, Tedgui A, Witztum JL, Khaw KT, Tsimikas S Relationship of IgG and IgM autoantibodies and immune complexes to oxidized LDL with markers of oxidation and inflammation and cardiovascular events: results from the EPIC-Norfolk Study. // J Lipid Res. - 2011 г. - Т. 52(10). - С. 1829-36.
- 159 Rodríguez-Lee M Bondjers G, Camejo G. Fatty acid-induced atherogenic changes in extracellular matrix proteoglycans. // Curr Opin Lipidol. . - 2007 г. - Т. 18(5). - С. 546-53.

- 160 Ross R Atherosclerosis – an inflammatory disease. // *N. Engl. J. Med.* - 1999 г. - T. 340. - C. 115–126.
- 161 Salonen JT Ylä-Herttuala S, Yamamoto R, Butler S, Korpela H, Salonen R, Nyssönen K, Palinski W, Witztum JL Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. // *Lancet.* - 1992 г. - T. 339(8798). - C. 883-7.
- 162 Saputri FC Jantan I. Inhibitory activities of compounds from the twigs of *Garcinia hombroniana* Pierre on human low-density lipoprotein (LDL) oxidation and platelet aggregation. // *Phytother Res.* . - 2012 г. - T. 26(12). - C. 1845-50.
- 163 Satchell L Leake DS. Oxidation of low-density lipoprotein by iron at lysosomal pH: implications for atherosclerosis. // *Biochemistry.* . - 2012 г. - T. 51(18):. - C. 3767-75.
- 164 Schiopu A Bengtsson J, Söderberg I, Janciauskiene S, Lindgren S, Ares MP, Shah PK, Carlsson R, Nilsson J, Fredrikson GN. Recombinant human antibodies against aldehyde-modified apolipoprotein B-100 peptide sequences inhibit atherosclerosis. // *Circulation.* - 2004 г. - T. 110(14). - C. 2047-52.
- 165 Schwartz S. M. deBlois D., O'Brien E.R. The intima: soil for atherosclerosis and restenosis. // *Circ. Res.* - 1995 г. - T. 77. - C. 445–465.
- 166 Seyama Y. Wachi H. : Atherosclerosis and matrix dystrophy. // *Atheroscler. Thromb.* - 2004 г. - T. 11. - C. 236–245.
- 167 Smith E B The relationship between plasma and tissue lipids in human atherosclerosis. . - 1974 г. - T. 12. - C. 1-49.
- 168 Smith E Crosbie L, Carey S Prothrombin-related antigens in human aortic intima // *Semin. Thromb. Hemost.* - 1996 г. - T. 22. - C. 347–350.
- 169 Sneek M Nguyen SD, Pihlajamaa T, Yohannes G, Riekkola ML, Milne R, Kovanen PT, Oörni K Conformational changes of apoB-100 in SMase-modified LDL mediate formation of large aggregates at acidic pH // *J Lipid Res.* - 2012 г. - T. 53(9). - C. 1832-9.

- 170 Sobenin IA Tertov VV, Orekhov AN. Atherogenic modified LDL in diabetes. // *Diabetes*. . - 1996 г. - 3 : T. 45. - C. 35-9.
- 171 Sommer A Prenner E, Gorges R, Stütz H, Grillhofer H, Kostner GM, Paltauf F and Hermetter A Organization of phosphatidylcholine and sphingomyelin in the surface monolayer of low density lipoprotein and lipoprotein(a) as determined by time-resolved fluorometry. // *J. Biol. Chem.* - 1992 г. - T. 267. - C. 24217–24222.
- 172 Soran H Durrington PN Susceptibility of LDL and its subfractions to glycation. // *Curr Opin Lipidol.* . - 2011 г. - T. 22(4). - C. 254-61.
- 173 Soto Y Acosta E, Delgado L, Pérez A, Falcón V, Bécquer MA et al Antiatherosclerotic effect of an antibody that binds to extracellular matrix glycosaminoglycans // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* - 2012 г. - T. 32(3). - C. 595-604.
- 174 Srinivasan SR Dolan P, Radhakrishnamurthy B, Berenson GS. Isolation of lipoprotein-acid mucopolysaccharide complexes from fatty streaks of human aorta. // *Prep Biochem* . - 1972 г. - 1 : T. 2. - C. 83-91.
- 175 Sukhova GK Shi GP, Simon DI, Chapman HA and Libby P. Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. // *J. Clin. Invest.* - 1998 г. - T. 102. - C. 576–583.
- 176 Suriyaphol P Fenske D, Zähringer U, Han SR, Bhakdi S, Husmann M. Enzymatically modified nonoxidized low-density lipoprotein induces interleukin-8 in human endothelial cells: role of free fatty acids. // *Circulation*. . - 2002 г. - T. 106(20). - C. 2581-7.
- 177 Suzuki Y Role of tissue-type plasminogen activator in ischemic stroke. // *J Pharmacol Sci.* . - 2010 г. - T. 113(3). - C. 203-7.
- 178 Szondy E Horváth M, Mezey Z, Székely J, Lengyel E, Füst G, Gerö S. Free and complexed anti-lipoprotein antibodies in vascular diseases. // *Atherosclerosis*. - 1983 г. - T. 49(1). - C. 69-77.

- 179 Szondy E, Horvath M., Mezey Z Free and complexed anti-lipoprotein antibodies in vascular diseases // *Atherosclerosis*. - 1983 г. - Т. 49(1). - С. 69-77.
- 180 Talbot RM del Rio JD, Weinberg PD. Effect of fluid mechanical stresses and plasma constituents on aggregation of LDL // *J. of Lipid Res*. - 2003 г. - Т. 44. - С. 837.
- 181 Taleb A Witztum JL, Tsimikas S. Oxidized phospholipids on apoB-100-containing lipoproteins: a biomarker predicting cardiovascular disease and cardiovascular events. // *Biomark Med.* . - 2011 г. - Т. 5(5). - С. 673-94.
- 182 Tani M Kawakami A, Mizuno Y, Imase R, Ito Y, Kondo K, Ishii H, Yoshida M. Small dense LDL enhances THP-1 macrophage foam cell formation. // *J Atheroscler Thromb.* - 2011 г. - Т. 18(8). - С. 698-704.
- 183 Tertov V.V. Sobenin I.A., Orekhov A.N., et al. Characteristics of low density lipoprotein isolated from circulating immune complexes // *Atherosclerosis*. - 1996 г. - Т. 122(2). - С. 191-199.
- 184 Tertov VV Bittolo-Bon G, Sobenin IA, Cazzolato G, Orekhov AN, Avogaro P. Naturally occurring modified low density lipoproteins are similar if not identical: more electronegative and desialylated lipoprotein subfractions. // *Exp Mol Pathol.* - 1995 г. - Т. 62(3). - С. 166-72.
- 185 Tertov VV Kaplun VV, Sobenin IA, Orekhov AN. Low-density lipoprotein modification occurring in human plasma possible mechanism of in vivo lipoprotein desialylation as a primary step of atherogenic modification. // *Atherosclerosis.* . - 1998 г. - Т. 138(1). - С. 183-95.
- 186 Tertov VV Kaplun VV, Sobenin IA, Orekhov AN. Low-density lipoprotein modification occurring in human plasma possible mechanism of in vivo lipoprotein desialylation as a primary step of atherogenic modification. // *Atherosclerosis.* . - 1998 г. - Т. 138(1). - С. 183-95.
- 187 Tertov VV Kaplun VV, Sobenin IA, Orekhov AN. Low-density lipoprotein modification occurring in human plasma possible mechanism of

- in vivo lipoprotein desialylation as a primary step of atherogenic modification. // *Atherosclerosis*. - 1998 г. - Т. 138(1). - С. 183-95.
- 188 Tertov VV Orekhov AN, Kacharava AG, Sobenin IA, Perova NV, Smirnov VN. Low density lipoprotein-containing circulating immune complexes and coronary atherosclerosis. // *Exp Mol Pathol*. - 1990 а г. - Т. 52. - С. 300-8.
- 189 Tertov VV Orekhov AN, Sayadyan KhS, Serebrennikov SG, Kacharava AG, Lyakishev AA, Smirnov VN. Correlation between cholesterol content in circulating immune complexes and atherogenic properties of CHD patients' serum manifested in cell culture. // *Atherosclerosis*. - 1990 б г. - Т. 81. - С. 183-9.
- 190 Tertov VV Orekhov AN, Sobenin IA, Gabbasov ZA, Popov EG, Yaroslavov AA, Smirnov Three types of naturally occurring modified lipoproteins induce intracellularlipid accumulation due to lipoprotein aggregation // *Circ Res*. - 1992 г. - 1 : Т. 71. - С. 218-28.
- 191 Tertov VV Orekhov AN. Metabolism of native and naturally occurring multiple modified low density lipoprotein in smooth muscle cells of human aortic intima. // *Exp Mol Pathol*. - 1997 г. - Т. 64(3). - С. 127-45.
- 192 Tertov VV Sobenin IA, Tonevitsky AG, Orekhov AN, Smirnov VN Isolation of atherogenic modified (desialylated) low density lipoprotein from blod of atherosclerotic patients: separation from native lipoprotein by affinity chromatogrphy // *Biochem Biophys Res Commun*. - 1990 г. - Т. 167. - С. 1122-7.
- 193 Tsukada T. Rosenfeld M.E., Ross R., Gown A.M. Immunocytochemical analysis of cellular components in atherosclerotic lesions. Use of monoclonal antibodies with the Watanabe and fat-fed rabbit. // *Arteriosclerosis*. - 1986 г. - Т. 6. - С. 601-13.
- 194 Tsukada T. Tippens D., Gordon D., et al. HHF35, a muscle-actin-specific monoclonal antibody. I. Immunocytochemical and biochemical characterization // *Am J Pathol*. - 1987 г. - Т. 126. - С. 51-60.

- 195 Turgut A Özler A, Görük NY, Tunc SY, Evliyaoglu O, Gül T. Copper, ceruloplasmin and oxidative stress in patients with advanced-stage endometriosis. // *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* - 2013 г. - Т. 17(11). - С. 1472-8.
- 196 Velican C Velican D Heterogeneity in the composition and aggregation patterns of coronary intima acid mucopolysaccharides (glycosaminoglycans) // *Atherosclerosis.* - 1978 г. - Т. 29. - С. 141–159.
- 197 Velican C. Velican D., Tancu I. The relationship between intimal necrosis and lipid accumulation during the onset and progression of atherosclerotic lesions. // *Med. Interne.* - 1988 г. - Т. 26. - С. 97–107.
- 198 Vijayagopal P Menon PV. Varied low density lipoprotein binding property of proteoglycans synthesized by vascular smooth muscle cells cultured on extracellular matrix. // *Atherosclerosis.* - 2005 г. - Т. 178(1). - С. 75-82.
- 199 Viola M Bartolini B, Vigetti D, Karousou E, Moretto P, Deleonibus S, Sawamura T, Wight TN, Hascall VC, De Luca G, Passi A. Oxidized LDL affects hyaluronan synthesis in human aortic smooth muscle cells. // *J Biol Chem.* . - 2013 г. - Т. Aug 26. [Epub ahead of print] .
- 200 Virella G. Atchley D., Koskinen S. et al. Proatherogenic and proinflammatory properties of immune complexes prepared with purified human oxLDL antibodies and human oxLDL // *Clin. Immunol.* - 17. P // – . – Vol. . – P. . : [б.н.], 2002 г. - Т. 105, № 1. - С. 81-92.
- 201 Vukovic I Arsenijevic N, Lackovic V, Todorovic V The origin and differentiation potential of smooth muscle cells in coronary atherosclerosis. // *Exp Clin Cardiol.* - 2006 г. - Т. 11(2). - С. 123-8.
- 202 Walters MJ Wrenn SP. Effect of sphingomyelinase-mediated generation of ceramide on aggregation of low-density lipoprotein. // *Langmuir.* . - 2008 г. - Т. 24(17). - С. 9642-7.

- 203 Walters MJ Wrenn SP. Size-selective uptake of colloidal low density lipoprotein aggregates by cultured white blood cells. // *J Colloid Interface Sci.* . - 2010 г. - Т. 350(2). - С. 494-501.
- 204 Wang J. Qiang H., Zhang C. et al. Detection of IgG-bound lipoprotein(a) immune complexes in patients with coronary heart disease // *Clin. Chim. Acta.* - 2003 г. - Т. 327, № 1-2. - С. 115-122.
- 205 Wang X Greilberger J, Levak-Frank S, Zimmermann R, Zechner R, Jürgens G. Endogenously produced lipoprotein lipase enhances the binding and cell association of native, mildly oxidized and moderately oxidized low-density lipoprotein in mouse peritoneal macrophages. // *Biochem J.* - 1999 г. - Т. 343 Pt 2:.. - С. 347-53.
- 206 Wang YT von Zychlinski A, McCormick SP. Dimyristoylphosphatidylcholine induces conformational changes in apoB that lowers lipoprotein(a). // *J Lipid Res.* - 2009 г. - Т. 50(5). - С. 846-53.
- 207 Windecker S Bax JJ, Myat A, Stone GW, Marber MS. Future treatment strategies in ST-segment elevation myocardial infarction. // *Lancet.* - 2013 г. - Т. 382(9892). - С. 644-57.
- 208 Xia F Li R, Wang C, Yang S, Tian L, Dong H, Pei C, He S, Jiang P, Cheng H, Fang IRGM1 regulates oxidized LDL uptake by macrophage via actin-dependent receptor internalization during atherosclerosis // *Sci Rep.* - 2013 г. - Т. 3. - С. 1867.
- 209 Yamamoto K Isogai Y, Sato H, Taketomi Y, Murakami M. Secreted phospholipase A2, lipoprotein hydrolysis, and atherosclerosis: integration with lipidomics. // *Anal Bioanal Chem.* - 2011 г. - Т. 400(7). - С. 1829-42.
- 210 Yla-Herttuala S. Palinski W., Rosenfeld M.E., et al. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. // *J Clin Invest.* - 1989 г. - Т. 84(4). - С. 1086-1095.
- 211 Zhang W-Y Gaynor PM and Kruth HS Aggregated low density lipoprotein induces and enters surface-connected compartments of human

- monocyte-macrophages. Uptake occurs independently of the low density lipoprotein receptor // J. Biol. Chem. - 1997 г. - Т. 272. - С. 31700-31.
- 212 Zhang WY Ishii I, Kruth HS Plasmin-mediated macrophage reversal of low density lipoprotein aggregation // J Biol Chem. - 2000 г. - Т. 275(42). - С. 33176-83.
- 213 Zhao YH Zou YG, Sun QJ, Xi D, Xing CY. Treatment of hyperlipidemia with a modified low density lipoprotein apheresis system with dextran sulfate. // Ther Apher Dial. - 2007 г. - Т. 11(4). - С. 249-54.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Лабораторный регламент на создание макета аналитической тест-системы для применения в медицине при экспрессной диагностике атерогенных дислипидемий при сердечно сосудистых патологиях

Содержание

Содержание	216
Часть 1. Измерение содержания в крови общего холестерина	217
Спецификация оборудования	217
Характеристика сырья, вспомогательных материалов и полупродуктов	217
Изложение технологического процесса	218
Часть 2. Измерение содержания в крови триглицеридов	221
Спецификация оборудования	221
Характеристика сырья, вспомогательных материалов и полупродуктов	221
Изложение технологического процесса	222
Часть 3. Измерение содержания в крови альфа-холестерина (холестерина липопротеидов высокой плотности)	225
Спецификация оборудования	225
Характеристика сырья, вспомогательных материалов и полупродуктов	226
Изложение технологического процесса	226
Часть 4. Измерение содержания в крови циркулирующих иммунных комплексов, содержащих липопротеиды	231
Спецификация оборудования	231
Характеристика сырья, вспомогательных материалов и полупродуктов	232

Изложение технологического процесса.....	233
Часть 5. Расчет величины содержания в крови холестерина.....	238
липопротеидов низкой плотности.....	238
Часть 6. Расчет величины липидного индекса атерогенности.....	239
Часть 7. Определение типа дислипидемии	239
Часть 8. Расчет величины риска сердечно-сосудистых заболеваний .	241

3.7 Измерение содержания в крови общего холестерина

3.7.1 Спецификация оборудования

1. Механический одноканальный дозатор с переменным объемом 5-50 мкл типа Biohit Proline кат. №720020 или аналогичный
2. Механический одноканальный дозатор с переменным объемом 20-200 мкл типа Biohit Proline кат. № 720070 или аналогичный
3. Наконечники типа Biohit Optifit без фильтров объемом до 300 мкл кат. № 790300 или аналогичные
4. Планшет полистироловый для иммуноферментного анализа 96-луночный типа Медполимер ТУ 9398-058-00480230-2009 или аналогичный
5. Восьмиканальный планшетный спектрофотометр Multiscan/Multiscan Pro/Multiscan Bichromatic, оснащенный светофильтром с длиной волны 540 нм, или аналогичный
6. Бак для сбора, хранения и удаления отходов класса А, Марка ОБЕН или аналогичный

3.7.2 Характеристика сырья, вспомогательных материалов и полупродуктов

1. Сыворотка крови
2. Изотонический фосфатный буфер с pH $7,2 \pm 0,1$

3. Стандартный раствор холестерина в изопропанол
200 мг/дл

4. Реагент для определения холестерина (pH=6,9 ммоль/л, фенол 23 ммоль/л, холестериноксидаза 100 Ед/л, холестеринэстераза 150 Ед/л, пероксидаза 625 Ед/л, 4-аминоантипирин 0,2 ммоль/л)

3.7.3 Изложение технологического процесса

1. Установить объем дозатора переменного объема 5-50 мкл на 20 мкл

2. Надеть наконечник на дозатор

3. Набрать в наконечник 20 мкл изотонического фосфатного буфера

4. Перенести изотонический фосфатный буфер в лунку a1 планшета

5. Сменить наконечник

6. Набрать в наконечник 20 мкл стандартного раствора холестерина

7. Перенести стандартный раствор холестерина в лунку a2 планшета

6. Сменить наконечник

7. Открыть пробирку с сывороткой крови

8. Опустить наконечник дозатора под мениск сыворотки крови и, нажав и отпустив кнопку плунжера дозатора 2-3 раза, перемешать сыворотку крови

9. Набрать в наконечник 20 мкл сыворотки крови

10. Перенести набранную сыворотку в первую свободную лунку планшета

11. Повторить шаги 6-10 для всех испытуемых проб сыворотки крови

12. Установить объем дозатора переменного объема 20-200 мкл на 180 мкл

13. Надеть наконечник на дозатор

14. Набрать в наконечник 180 мкл изотонического фосфатного буфера

15. Перенести набранный раствор в первую лунку планшета

16. Опустить наконечник дозатора под мениск и, нажав и отпустив кнопку плунжера дозатора 2-3 раза, перемешать буфер с испытуемым образцом

17. Сбросить использованный наконечник в бак для сбора, хранения и удаления отходов

18. Повторить шаги 13-17 для всех испытуемых образцов

19. Установить объем дозатора переменного объема 5-50 мкл на 20 мкл

20. Надеть наконечник на дозатор

21. Перенести 20 мкл смеси из лунки a1 планшета в лунку a1 чистого сухого планшета

22. Сбросить использованный наконечник в бак для сбора, хранения и удаления отходов

23. Повторить шаги 20-22 для всех лунок планшета, содержащих испытуемые образцы

24. Установить объем дозатора переменного объема 20-200 мкл на 80 мкл

25. Надеть наконечник на дозатор

26. Набрать в наконечник 80 мкл реагента для определения холестерина

27. Перенести реагент для определения холестерина в лунку a1 планшета с подготовленными испытуемыми пробами

28. Повторить шаги 26-27 для всех лунок планшета, содержащих подготовленные пробы

29. Инкубировать планшет при комнатной температуре в течение 10 минут

30. Включить спектрофотометр и дождаться окончания его загрузки

31. Установить параметры измерения: фильтр 540 нм, зануление по лунке a1

32. Установить планшет с подготовленными пробами в выдвижную кювету спектрофотометра

33. Запустить измерение, нажав кнопку start

34. Дождаться распечатки результатов измерения

35. Рассчитать концентрацию холестерина в каждой испытуемой пробе по формуле $x=200 \cdot a_1/a_2$, где 200 – концентрация холестерина (мг/дл) в стандартной пробе в лунке a2, a_1 – оптическая

плотность в испытуемой пробе в лунке a₁, a₂ – оптическая плотность в стандартной пробе в лунке a₂; результат имеет размерность мг/дл.

3.8 Измерение содержания в крови триглицеридов

3.8.1 Спецификация оборудования

1. Механический одноканальный дозатор с переменным объемом 5-50 мкл типа Biohit Proline кат. №720020 или аналогичный
2. Механический одноканальный дозатор с переменным объемом 20-200 мкл типа Biohit Proline кат. № 720070 или аналогичный
3. Наконечники типа Biohit Optifit без фильтров объемом до 300 мкл кат. № 790300 или аналогичные
4. Планшет полистироловый для иммуноферментного анализа 96-луночный типа Медполимер ТУ 9398-058-00480230-2009 или аналогичный
5. Восьмиканальный плащечный спектрофотометр Multiscan/Multiscan Pro/Multiscan Bichromatic, оснащенный светофильтром с длиной волны 540 нм, или аналогичный
6. Бак для сбора, хранения и удаления отходов класса А, Марка ОВЕН или аналогичный

3.8.2 Характеристика сырья, вспомогательных материалов и полупродуктов

1. Сыворотка крови
2. Изотонический фосфатный буфер с pH 7,2 ± 0,1
3. Стандартный раствор триглицеридов 200 мг/дл
4. Реагент для определения триглицеридов (pipes)

буфер рН=50 ммоль/л, р-хлорфенол 1 ммоль/л, липопротеинлипаза 75000 Ед/л, глицеринкиназа 400 Ед/л, глицерин-3-фосфатоксидаза 2000 Ед/л, пероксидаза 220 Ед/л, 4-аминоантипирин 0,35 ммоль/л, АТФ 0,15 ммоль/л, Mg²⁺ 20 ммоль/л, натрия холат 0,10 ммоль/л, гексоцианоферрат калия 0,5 мкмоль/л)

3.8.3 Изложение технологического процесса

1. Установить объем дозатора переменного объема 5-50 мкл на 20 мкл
2. Надеть наконечник на дозатор
3. Набрать в наконечник 20 мкл изотонического фосфатного буфера
4. Перенести изотонический фосфатный буфер в лунку а1 планшета
5. Сменить наконечник
6. Набрать в наконечник 20 мкл стандартного раствора триглицеридов
7. Перенести стандартный раствор триглицеридов в лунку а2 планшета
6. Сменить наконечник
7. Открыть пробирку с сывороткой крови
8. Опустить наконечник дозатора под мениск сыворотки крови и, нажав и отпустив кнопку плунжера дозатора 2-3 раза, перемешать сыворотку крови
9. Набрать в наконечник 20 мкл сыворотки крови

10. Перенести набранную сыворотку в первую свободную лунку планшета

11. Повторить шаги 6-10 для всех испытуемых проб сыворотки крови

12. Установить объем дозатора переменного объема 20-200 мкл на 180 мкл

13. Надеть наконечник на дозатор

14. Набрать в наконечник 180 мкл изотонического фосфатного буфера

15. Перенести набранный раствор в первую лунку планшета

16. Опустить наконечник дозатора под мениск и, нажав и отпустив кнопку плунжера дозатора 2-3 раза, перемешать буфер с испытуемым образцом

17. Сбросить использованный наконечник в бак для сбора, хранения и удаления отходов

18. Повторить шаги 13-17 для всех испытуемых образцов

19. Установить объем дозатора переменного объема 5-50 мкл на 20 мкл

20. Надеть наконечник на дозатор

21. Перенести 20 мкл смеси из лунки a1 планшета в лунку a1 чистого сухого планшета

22. Сбросить использованный наконечник в бак для сбора, хранения и удаления отходов

23. Повторить шаги 20-22 для всех лунок планшета, содержащих испытуемые образцы

24. Установить объем дозатора переменного объема 20-200 мкл на 80 мкл

25. Надеть наконечник на дозатор

26. Набрать в наконечник 80 мкл реагента для определения триглицеридов

27. Перенести реагент для определения триглицеридов в лунку a1 планшета с подготовленными испытуемыми пробами

28. Повторить шаги 26-27 для всех лунок планшета, содержащих подготовленные пробы

29. Инкубировать планшет при комнатной температуре в течение 10 минут

30. Включить спектрофотометр и дождаться окончания его загрузки

31. Установить параметры измерения: фильтр 540 нм, зануление по лунке a1

32. Установить планшет с подготовленными пробами (см. Пробоподготовка) в выдвижную кювету спектрофотометра

33. Запустить измерение, нажав кнопку start

34. Дождаться распечатки результатов измерения

35. Рассчитать концентрацию триглицеридов в каждой испытуемой пробе по формуле $x=200 \cdot a_n/a_2$, где 200 – концентрация холестерина (мг/дл) в стандартной пробе в лунке a2, a_n – оптическая

плотность в испытуемой пробе в лунке a_1 , a_2 – оптическая плотность в стандартной пробе в лунке a_2 ; результат имеет размерность мг/дл.

3.9 Измерение содержания в крови альфа-холестерина (холестерина липопротеидов высокой плотности)

3.9.1 Спецификация оборудования

1. Механический одноканальный дозатор с переменным объемом 5-50 мкл типа Biohit Proline кат. №720020 или аналогичный
2. Механический одноканальный дозатор с переменным объемом 20-200 мкл типа Biohit Proline кат. № 720070 или аналогичный
3. Наконечники типа Biohit Optifit без фильтров объемом до 300 мкл кат. № 790300 или аналогичные
4. Планшет полистироловый для иммуноферментного анализа 96-луночный типа Медполимер ТУ 9398-058-00480230-2009 или аналогичный
5. Восьмиканальный плащечный спектрофотометр Multiscan/Multiscan Pro/Multiscan Bichromatic, оснащенный светофильтром с длиной волны 540 нм, или аналогичный
6. Лабораторная низкооборотная центрифуга типа Eppendorf 5804/5804R/5810/5810R, оснащенная бакетным ротором типа Eppendorf A-2-DWP (cat no 5804 740.009) с адаптерами для центрифугирования микропланшетов, или аналогичная
7. Равноплечие лабораторные весы или любые лабораторные цифровые весы, позволяющие взвешивание грузов до 200 г
8. Бак для сбора, хранения и удаления отходов класса

А, Марка ОВЕН или аналогичный

3.9.2 Характеристика сырья, вспомогательных материалов и полупродуктов

1. Сыворотка крови
2. Преципитирующий реагент (фосфорновольфрамовая кислота 0,44 ммоль/л, $MgCl_2$ 20 ммоль/л), типа Fluitest HDL-CHOL (Analyticon Biotechnologies, cat no 410), разведенный дистиллированной водой в 1,25 раз или аналогичный Стандартный раствор холестерина в изопропаноле 200 мг/дл
3. Изотонический фосфатный буфер с $pH\ 7,2 \pm 0,1$
4. Стандартный раствор холестерина в изопропаноле 200 мг/дл
5. Реагент для определения холестерина (pipes буфер $pH=6,9$ ммоль/л, фенол 23 ммоль/л, холестериноксидаза 100 Ед/л, холестеринэстераза 150 Ед/л, пероксидаза 625 Ед/л, 4-аминоантипирин 0,2 ммоль/л)

3.9.3 Изложение технологического процесса

1. Установить объем дозатора переменного объема 5-50 мкл на 50 мкл
2. Надеть наконечник на дозатор
3. Открыть пробирку с сывороткой крови
4. Опустить наконечник дозатора под мениск сыворотки крови и, нажав и отпустив кнопку плунжера дозатора 2-3 раза, перемешать сыворотку крови
5. Набрать в наконечник 50 мкл сыворотки крови

6. Перенести набранную сыворотку в первую свободную лунку планшета
7. Сбросить использованный наконечник в бак для сбора, хранения и удаления отходов
8. Повторить шаги 2-7 для всех испытуемых проб сыворотки крови
9. Установить объем дозатора переменного объема 20-200 мкл на 125 мкл
10. Надеть наконечник на дозатор
11. Набрать в наконечник 125 мкл преципитирующего реагента
12. Перенести набранный раствор в первую лунку планшета с образцом сыворотки
13. Опустить наконечник дозатора под мениск и, нажав и отпустив кнопку плунжера дозатора 2-3 раза, перемешать буфер с сывороткой крови
14. Сбросить использованный наконечник в бак для сбора, хранения и удаления отходов
15. Повторить шаги 10-14 для всех проб сыворотки крови
16. Инкубировать планшет с пробами при комнатной температуре в течение 10 минут
17. В течение инкубации взвесить планшет на лабораторных весах, и приготовить второй планшет с ячейками, заполненными водой до такого же веса (уравновесить планшеты)
18. Поместить планшет с пробами и уравновешивающий планшет в адаптеры для центрифугирования

19. Поместить адаптеры в бакетный ротор напротив друг друга
20. Центрифугировать планшеты при 4000 g (для описанной центрифуги – 4700 об/мин) в течение 10 минут
21. По окончании центрифугирования вынуть планшеты из адаптеров
22. Установить объем дозатора переменного объема 5-50 мкл на 20 мкл
23. Надеть наконечник на дозатор
24. Набрать в наконечник 20 мкл изотонического фосфатного буфера
25. Перенести изотонический фосфатный буфер в лунку a1 чистого сухого планшета
26. Сменить наконечник
27. Набрать в наконечник 20 мкл стандартного раствора холестерина
28. Перенести стандартный раствор холестерина в лунку a2 планшета
29. Установить объем дозатора переменного объема 20-200 мкл на 180 мкл
30. Надеть наконечник на дозатор
31. Набрать в наконечник 180 мкл изотонического фосфатного буфера
32. Перенести набранный раствор в лунку a1 планшета, содержащего холостую пробу

33. Опустить наконечник дозатора под мениск и, нажав и отпустив кнопку плунжера дозатора 2-3 раза, перемешать буфер с испытуемым образцом

34. Сбросить использованный наконечник в бак для сбора, хранения и удаления отходов

31. Надеть наконечник на дозатор

32. Набрать в наконечник 180 мкл изотонического фосфатного буфера

33. Перенести набранный раствор в лунку a2 планшета, содержащего контрольную пробу

34. Опустить наконечник дозатора под мениск и, нажав и отпустив кнопку плунжера дозатора 2-3 раза, перемешать буфер с испытуемым образцом

35. Сбросить использованный наконечник в бак для сбора, хранения и удаления отходов

36. Установить объем дозатора переменного объема 5-50 мкл на 20 мкл

37. Надеть наконечник на дозатор

38. Перенести 20 мкл смеси из лунки a1 планшета (холостая проба) в лунку a1 чистого сухого планшета

39. Сбросить использованный наконечник в бак для сбора, хранения и удаления отходов

40. Надеть наконечник на дозатор

41. Перенести 20 мкл смеси из лунки a2 планшета (контрольная проба) в лунку a2 чистого сухого планшета

42. Сбросить использованный наконечник в бак для сбора, хранения и удаления отходов

43. Надеть наконечник на дозатор

44. Перенести 20 мкл надосадочной жидкости из первой лунки планшета, изъятого из центрифуги, в первую свободную лунку чистого сухого планшета

45. Повторить шаги 42-44 для всех лунок планшета, изъятого из центрифуги, содержащих испытуемые образцы

46. Установить объем дозатора переменного объема 20-200 мкл на 80 мкл

47. Надеть наконечник на дозатор

48. Набрать в наконечник 80 мкл реагента для определения холестерина

49. Перенести реагент для определения холестерина в лунку a1 планшета с подготовленными испытуемыми пробами

50. Повторить шаги 48-49 для всех лунок планшета, содержащих подготовленные пробы

51. Инкубировать планшет при комнатной температуре в течение 10 минут

52. Включить спектрофотометр и дождаться окончания его загрузки

53. Установить параметры измерения: фильтр 540 нм, зануление по лунке a1

54. Установить планшет с подготовленными пробами (см. Пробоподготовка) в выдвижную кювету спектрофотометра

55. Запустить измерение, нажав кнопку start

56. Дождаться распечатки результатов измерения

57. Рассчитать концентрацию холестерина липопротеидов высокой плотности в каждой испытуемой пробе по формуле $x=200 \cdot a_n/a_2/2,5$, где 200 – концентрация холестерина (мг/дл) в стандартной пробе в лунке a_2 , a_n – оптическая плотность в испытуемой пробе в лунке a_n , a_2 – оптическая плотность в стандартной пробе в лунке a_2 , 2,5 – коэффициент пересчета на разведение образца при пробоподготовке; результат имеет размерность мг/дл.

3.10 Измерение содержания в крови циркулирующих иммунных комплексов, содержащих липопротеиды

3.10.1 Спецификация оборудования

1. Механический одноканальный дозатор с переменным объемом 5-50 мкл типа Biohit Proline кат. №720020 или аналогичный
2. Механический одноканальный дозатор с переменным объемом 20-200 мкл типа Biohit Proline кат. № 720070 или аналогичный
3. Механический одноканальный дозатор с переменным объемом 100-1000 мкл типа Biohit Proline кат. № 720060 или аналогичный
4. Наконечники типа Biohit Optifit без фильтров объемом до 300 мкл кат. № 790300 или аналогичные
5. Наконечники типа Biohit Optifit без фильтров объемом до 1000 мкл кат. № 780021 или аналогичные
6. Тонкостенные стеклянные пробирки (65-80)х(8-11) мм или аналогичные

7. Штатив для пробирок (65-80)х(8-11) мм или аналогичный
8. Вортекс ELMi V-3 или аналогичный
9. Лабораторная низкооборотная центрифуга типа Eppendorf 5804/5804R/5810/5810R, оснащенная бакетным ротором с адаптерами для центрифугирования пробирок, или аналогичная
10. Равноплечие лабораторные весы или любые лабораторные цифровые весы, позволяющие взвешивание грузов до 200 г
11. Планшет полистироловый для иммуноферментного анализа 96-луночный типа Медполимер ТУ 9398-058-00480230-2009 или аналогичный
12. Восемиканальный планшетный спектрофотометр Multiscan/Multiscan Pro/Multiscan Bichromatic, оснащенный светофильтром с длиной волны 540 нм, или аналогичный
13. Бак для сбора, хранения и удаления отходов класса А, Марка ОВЕН или аналогичный

3.10.2 Характеристика сырья, вспомогательных материалов и полупродуктов

1. Сыворотка крови
2. Раствор полиэтиленгликоля 6000 5% в изотоническом фосфатном буфере
3. Раствор полиэтиленгликоля 6000 2,5% в изотоническом фосфатном буфере
4. Изотонический фосфатный буфер, рН=7,2±0,1
5. Раствор холестерина в изопропанол, 1мкг/мл
6. Изопропанол х.ч.
7. Раствор детергентов (натрия холат 15 ммоль/л, 0,05% Тритон X-100 в дистиллированной воде)

8. Реагент для определения холестерина (pipes буфер рН=6,9 ммоль/л, фенол 23 ммоль/л, холестериноксидаза 100 Ед/л, холестеринэстераза 150 Ед/л, пероксидаза 625 Ед/л, 4-аминоантипирин 0,2 ммоль/л)

3.10.3 Изложение технологического процесса

1. Установить объем дозатора переменного объема 20-200 мкл на 200 мкл

2. Надеть наконечник на дозатор

3. Открыть пробирку с сывороткой крови

4. Опустить наконечник дозатора под мениск сыворотки крови и, нажав и отпустив кнопку плунжера дозатора 2-3 раза, перемешать сыворотку крови

5. Набрать в наконечник 200 мкл сыворотки крови

6. Перенести набранную сыворотку в сухую стеклянную пробирку, поместить пробирку в штатив

7. Сбросить использованный наконечник в бак для сбора, хранения и удаления отходов

8. Повторить шаги 2-7 для всех испытуемых проб сыворотки крови

10. Сменить наконечник на дозаторе

11. Набрать в наконечник 200 мкл 5% раствора полиэтиленгликоля 6000

12. Перенести набранный раствор в пробирку с испытуемой пробой сыворотки крови, поместить пробирку в штатив

13. Повторить шаги 11-12 для всех испытуемых проб сыворотки крови

14. Встряхнуть пробирки с пробами сыворотки крови на вортексе в течение 2 сек при средней скорости встряхивания, поместить пробирки в штатив

16. Инкубировать пробирки с пробами при комнатной температуре в течение 18 часов

17. Поместить пробирки в адаптеры для центрифуги

18. Уравновесить адаптеры с пробирками на равноплечих лабораторных весах

17. Поместить уравновешенные адаптеры в бакетный ротор напротив друг друга

18. Центрифугировать при 4000 g (для описанной центрифуги – 4700 об/мин) в течение 15 минут

21. По окончании центрифугирования вынуть пробирки из адаптеров, поместить пробирки в штатив

22. Слить супернатант из пробирок в бак для сбора, хранения и удаления отходов, не встряхивая пробирки и не разрушая осадок

23. Установить объем дозатора переменного объема 100-1000 мкл на 1000 мкл

24. Надеть наконечник на дозатор

25. Набрать в наконечник 1000 мкл 2,5% раствора полиэтиленгликоля 6000

26. Перенести набранный раствор в пробирку с испытуемой пробой, поместить пробирку в штатив

27. Повторить шаг 14 для всех испытуемых проб
28. Повторить шаги 17-26 для всех испытуемых проб
29. Повторить шаг 14 для всех испытуемых проб
30. Повторить шаги 17-26 для всех испытуемых проб
31. Установить объем дозатора переменного объема 5-50 мкл на 10 мкл
32. Надеть наконечник на дозатор
33. Набрать в наконечник 10 мкл изотонического фосфатного буфера
34. Перенести содержимое в сухую стеклянную пробирку (холостая проба)
35. Сменить наконечник
36. Набрать в наконечник 10 мкл раствора холестерина в изопропаноле
37. Перенести содержимое в сухую стеклянную пробирку (контрольная проба)
38. Установить объем дозатора переменного объема 20-200 мкл на 50 мкл
39. Надеть наконечник на дозатор
40. Набрать в наконечник 50 мкл изопропанола
41. Перенести изопропанол в пробирку с холостой пробой
42. Набрать в наконечник 50 мкл изопропанола
43. Перенести изопропанол в пробирку с контрольной пробой

44. Набрать в наконечник 50 мкл изопропанола
45. Перенести изопропанол в пробирку с подготовленной испытуемой пробой
46. Повторить шаги 14-15 для всех пробирок, содержащих подготовленные пробы
47. Сменить наконечник на дозаторе
48. Набрать в наконечник 50 мкл раствора детергентов
49. Перенести раствор детергентов в пробирку с холостой пробой
50. Набрать в наконечник 50 мкл раствора детергентов
51. Перенести раствор детергентов в пробирку с контрольной пробой
52. Набрать в наконечник 50 мкл раствора детергентов
53. Перенести раствор детергентов в пробирку с подготовленной испытуемой пробой
54. Повторить шаги 52-53 для всех пробирок, содержащих подготовленные испытуемые пробы
55. Сменить наконечник на дозаторе
56. Установить объем дозатора переменного объема 20-200 мкл на 100 мкл
57. Набрать в наконечник 100 мкл реагента для определения холестерина
58. Перенести реагент для определения холестерина в пробирку с холостой пробой

59. Набрать в наконечник 100 мкл реагента для определения холестерина

60. Перенести реагент для определения холестерина в пробирку с контрольной пробой

61. Набрать в наконечник 100 мкл реагента для определения холестерина

62. Перенести реагент для определения холестерина в пробирку с подготовленной испытуемой пробой

63. Повторить шаги 61-62 для всех пробирок, содержащих подготовленные испытуемые пробы

64. Инкубировать пробирки при комнатной температуре в течение 10 минут

65. Установить объем дозатора переменного объема 20-200 мкл на 180 мкл

66. Сменить наконечник на дозаторе

67. Перенести 180 мкл раствора из пробирки с холостой пробой в лунку a1 планшета

68. Сменить наконечник на дозаторе

69. Перенести 180 мкл раствора из пробирки с контрольной пробой в лунку a2 планшета

70. Сменить наконечник на дозаторе

71. Перенести 180 мкл раствора из пробирки с испытуемой пробой в следующую пустую лунку планшета

72. Повторить шаги 70-71 для всех пробирок, содержащих испытуемые пробы

73. Включить спектрофотометр и дождаться окончания его загрузки

74. Установить параметры измерения: фильтр 540 нм, зануление по лунке a1

75. Установить планшет в выдвижную кювету спектрофотометра

76. Запустить измерение, нажав кнопку start

77. Дождаться распечатки результатов измерения

78. Рассчитать концентрацию холестерина циркулирующих иммунных комплексов в каждой испытуемой пробе по формуле $x=10 \cdot a_1/a_2 \cdot 5$, где 10 – содержание холестерина (мкг) в стандартной пробе в лунке a2, a_1 – оптическая плотность в испытуемой пробе в лунке a1, a_2 – оптическая плотность в контрольной пробе в лунке a2, 5- коэффициент пересчета на разведение образца при пробоподготовке; результат имеет размерность мкг/мл.

3.11 Расчет величины содержания в крови холестерина липопротеидов низкой плотности

Содержание в крови холестерина липопротеидов низкой плотности (ХЛНП) рассчитывается по формуле:

$$\text{ХЛНП} = (\text{Хлст}) - (\text{ХЛВП}) - (\text{Тргл} / 5),$$

где Хлст – содержание в крови холестерина,

ХЛВП - содержание в крови холестерина липопротеидов высокой плотности,

Тргл - содержание в крови триглицеридов.

3.12 Расчет величины липидногоиндекса атерогенности

Величина липидногоиндекса атерогенности (ЛИА) рассчитывается по формуле:

$$\text{ЛИА} = (\text{ХЛНП})/(\text{ХЛВП}),$$

где ХЛНП - содержание в крови холестерина липопротеидов низкой плотности,

ХЛВП - содержание в крови холестерина липопротеидов высокой плотности.

3.13 Определение типа дислипидемии

Тип дислипидемии определяется по сочетаниям нарушений в липидной формуле.

ГЛП (гиперлипидемия) типа I - редкая форма: определяется на этапе пробоподготовки. Хиломикроны при приготовлении сыворотки крови всплывают на поверхность в виде сливообразного слоя, в то время как нижележащая сыворотка остается прозрачной. Умеренное повышение холестерина и триглицеридов.

ГЛП типа IIa - наиболее распространенная форма: повышенные концентрации холестерина липопротеидов низкой плотности и общего холестерина, уровень триглицеридов находится в пределах нормы

ГЛП типа IIb - комбинированная форма: повышенные концентрации общего холестерина, холестерина липопротеидов низкой плотности, триглицеридов.

ГЛП типа III - редкая форма: повышение общего холестерина и триглицеридов, повышение холестерина липопротеидов низкой плотности незначительное или уровень в норме.

ГЛП типа IV - распространенная форма: повышение триглицеридов, уровень общего холестерина и холестерина липопротеидов низкой плотности в норме или незначительно повышен.

ГЛП типа V - редкая форма: определяется на этапе пробоподготовки. Хиломикроны при приготовлении сыворотки крови всплывают на поверхность в виде сливообразного слоя, а нижележащая сыворотка мутная. Повышение триглицеридов, нормальный уровень или умеренное повышение холестерина и холестерина липопротеидов низкой плотности.

Нормы для России следующие:

- 1) показатель общего холестерина не больше 6,2 ммоль/л 240 мг/дл;
- 2) холестерина ЛНП не больше 160 мг/дл;
- 3) триглицеридов не больше 200 мг/дл;
- 4) холестерина ЛВП не меньше 45 мг/дл для мужчин и 50 мг/дл для женщин.

3.14 Расчет величины риска сердечно-сосудистых заболеваний

Методика расчета 10-летнего прогностического риска возникновения ИБС:

$$\text{Риск_ИБС} = 100 * (1 - \exp(-\exp(X2))),$$

где второе промежуточное значение $X2 = (-2,1155149 - X1) / \exp(-0,3155 - 0,2784 * X1)$,

а первое промежуточное значение $X1$ рассчитывается по формуле:

а) для мужчин:

$$X1 = 11,1122 - 1,4792 * \ln(\text{Возраст}) - 0,9119 * \ln(\text{САД}) - 0,7181 * \ln(\text{ХС/ХЛВП}) - 0,6727 * \text{Курение} - 0,1759 * \text{СД} - 0,5865 * \text{ГЛЖ}$$

б) для женщин:

$$X1 = 5,2573 + 1,8515 * \ln(\text{Возраст}/74) - 0,9119 * \ln(\text{САД}) - 0,7181 * \ln(\text{ХС/ХЛВП}) - 0,2767 * \text{Курение} - 0,3758 * \text{СД} - 0,5865 * \text{ГЛЖ}$$

Параметры липидного профиля вводятся в размерности мг/дл.

Методика расчета 10-летнего прогностического риска инфаркта миокарда и внезапной коронарной смерти:

а) Для мужчин:

$$\text{Риск_ОИМ} = 100 * (1 - 0,9369^a),$$

где $a = \exp(y)$,

при этом

$$y = -8.9769 + 0.103 * \text{Возраст} + 0.010 * \text{САД} + 0.013 * \text{ХЛНП} - 0.032 * \text{ХЛВП} + 0.317 * \log(\text{ТГ}) + 0.658 * \text{Курение} + 0.399 * \text{СД} + 0.382 * \text{Ан_ОИМ}$$

б) Для женщин:

$$\text{Риск_ОИМ} = 31,25 / (1 + \exp(12,5054 - 0.1031 * \text{Возраст} - 0.0117 * \text{САД} - 0.0146 * \text{ХЛНП} + 0.0418 * \text{ХЛВП} - 0.3362 * \log(\text{ТГ}) - 0.9361 * \text{Курение} - 0.3818 * \text{СД} - 0.3908 * \text{Ан_ОИМ}))$$

Параметры липидного профиля вводятся в размерности мг/дл.

Расшифровка используемых переменных: САД - систолическое артериальное давление; ХС - общий холестерин; ХЛВП - холестерин липопротеидов низкой плотности; ХЛНП - холестерин липопротеидов высокой плотности; ТГ - триглицериды; СД - наличие сахарного диабета (0 или 1); ГЛЖ - наличие гипертрофии левого желудочка миокарда (0 или 1); курение 0 или 1; Ан_ОИМ - наличие инфаркта миокарда у родственников 1-й степени в возрасте до 60 лет.

**More
Books!** 



yes
i want morebooks!

Покупайте Ваши книги быстро и без посредников он-лайн – в одном из самых быстрорастущих книжных он-лайн магазинов! окружающей среде благодаря технологии Печати-на-Заказ.

Покупайте Ваши книги на
www.more-books.ru

Buy your books fast and straightforward online - at one of world's fastest growing online book stores! Environmentally sound due to Print-on-Demand technologies.

Buy your books online at
www.get-morebooks.com

