

Окисленные липопротеиды низкой плотности и антитела к ним у больных с коронарным атеросклерозом и здоровых лиц

М. Х. Шогенова, Р. А. Жетисева, А. М. Карпов, В. П. Масенко, В. Г. Наумов
ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» МЗ РФ, Москва

Абстракт

Цель. Определить роль окисленных липопротеидов низкой плотности (ОкЛНП) и аутоантител к ним (АТ-ОкЛНП) в иммуно-воспалительном процессе у пациентов с коронарным атеросклерозом.

Методы. В исследование были включены 3 группы пациентов мужского пола в возрасте от 28 до 68 лет: группа условно здоровых пациентов без ишемической болезни сердца ($n=10$), группа с начальными атеросклеротическими поражениями коронарного русла ($<50\%$, $n=20$) и группа с ангиографически документированным тяжелым стенозированием коронарного русла ($>50\%$, $n=50$). Сывороточные ОкЛНП и АТ-ОкЛНП были определены методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов MDA-oxLDL и OLAB IgG фирмы Biomedica.

Результаты. Значимых различий в титрах ОкЛНП между этими группами пациентов обнаружено не было ($p>0,3$). Но титры АТ-ОкЛНП у пациентов в группе условно здоровых лиц были выше по сравнению с группой с тяжелым стенозированием коронарного русла ($p=0,03$). В группе пациентов с выраженным коронарным атеросклерозом проводилась оценка тяжести поражения коронарного русла с использованием шкалы SYNTAX Score. При этом уровень АТ-ОкЛНП оказался достоверно выше у пациентов с индексом SYNTAX ниже среднего значения медианы ($p=0,03$).

Заключение. В нашем клиническом исследовании связи между уровнем ОкЛНП и коронарным атеросклерозом выявлено не было. Однако, титры АТ-ОкЛНП у условно здоровых лиц были достоверно выше, чем у больных с тяжелым стенозированием коронарного русла. В то же время, среди больных с тяжелым коронарным атеросклерозом более высокий уровень АТ-ОкЛНП наблюдался у пациентов с меньшей степенью поражения коронарных артерий.

Ключевые слова: атеросклероз, окисленные липопротеиды низкой плотности, антитела к окисленным липопротеидам низкой плотности, воспаление.

Oxidized low-density lipoproteins and antibodies against oxidized low-density lipoproteins in patients with coronary atherosclerosis and healthy individuals

M. H. Shogenova, R. A. Zhetisheva, A. M. Karpov, V. P. Masenko, V. G. Naumov
Russian Cardiology Research Complex, Moscow, Russia

Abstract

Purpose. To determine the role of oxidized low-density lipoproteins (OxLDL) and antibodies against oxidized low-density lipoproteins (anti-OxLDL) in immuno-inflammatory process in patients (pts) with coronary atherosclerosis.

Methods. Three groups of male pts aged from 28 to 68 years were included in the study: healthy pts group without coronary heart disease ($n=10$); a group with initial coronary arteries' atherosclerotic lesions ($<50\%$, $n=20$) and group with angiographically documented severe coronary stenosis ($>50\%$, $n=50$). Serum OxLDL and anti-OxLDL were identified by immune-enzyme analysis using MDA-oxLDL and OLAB IgG Biomedica commercial kits.

Results. There were not significant differences in OxLDL levels between these groups of pts ($p>0.3$), but anti-OxLDL titers in healthy pts group were significantly higher compared to the pts with severe coronary stenosis

($p = 0.03$). SYNTAX Score was used to assess the severity of coronary lesions in group of pts with severe coronary atherosclerosis. The anti-OxLDL titers was significantly higher in pts with SYNTAX index below the average median ($p = 0.03$).

Conclusion. We didn't find significant evidence of association between OxLDL levels and coronary atherosclerosis in our clinical study. However, anti-OxLDL titers in healthy pts group were higher than in pts with severe coronary atherosclerosis. Among the pts with severe coronary atherosclerosis, a higher level of anti-OxLDL was observed in patients with a lower coronary lesions severity.

Keywords: atherosclerosis, oxidized low-density lipoproteins, antibodies against oxidized low-density lipoproteins, inflammation.

Введение

Окислительная модификация липопротеидов низкой плотности (ЛНП) играет одну из ключевых ролей в патогенезе атеросклероза [1]. Окисленные ЛНП (ОкЛНП) способствуют активации макрофагов и внутриклеточному накоплению эфиров холестерина, оказывают цитотоксическое действие на эндотелиальные клетки, увеличивают тромбоцитарную активность, стимулируют миграцию и пролиферацию гладкомышечных клеток, тем самым инициируя развитие атеросклеротического процесса [2]. Существует мнение, что при ишемической болезни сердца уровень окисленных ЛНП характеризует тяжесть патологического процесса [3].

ОкЛНП являются более иммуногенными формами, чем нативные ЛНП и индуцируют образование иммуногенных эпитопов в молекулах ЛНП, что приводит к образованию специфических антител против ОкЛНП (АТ-ОкЛНП) [4, 5]. О существовании АТ-ОкЛНП известно в течение длительного времени, но их клиническая роль до конца не ясна [6]. Ряд исследований показали связь уровня циркулирующих АТ-ОкЛНП с развитием атеросклеротического поражения и сердечно-сосудистыми заболеваниями [7–9]. В то же время, другие авторы отмечают обратную связь между атеросклерозом и уровнем этих антител [10, 11], демонстрируя способность АТ-ОкЛНП блокировать поглощение ОкЛНП макрофагами в атеросклеротических поражениях [12]. ОкЛНП образуют иммунные комплексы (ИК) с АТ-ОкЛНП, активируют систему комплемента, связываясь с Fc рецепторами, посредством чего могут влиять на воспалительный процесс при атеросклерозе [13]. Эти ИК обнаружены как в сыворотке, так и в атеросклеротических бляшках [14–16], являются мощными активаторами макрофагов [17, 18] и более эффективны в индукции накопления липидов, чем ОкЛНП [17].

Хотя ОкЛНП активно изучались в предыдущих работах, имеющиеся данные об участии АТ-ОкЛНП в атерогенезе противоречивы. Дальнейшее исследование позволит лучше понять их роль в иммунно-воспалительном процессе при атеросклерозе и, возможно, рассматривать их в будущем как мишень для терапевтического воздействия. Целью настоящего исследования является изучение мета-

болической регуляции этих биомаркеров у пациентов с различной степенью атеросклеротического поражения коронарного русла и условно здоровых лиц.

Материалы и методы

В исследование включено 80 мужчин в возрасте 28–68 лет. Первую группу составили 50 пациентов с ангиографически документированным гемодинамически значимым ($>50\%$) стенозированием коронарного русла. Вторую группу составили 20 пациентов с верифицированными при КАГ начальными атеросклеротическими поражениями коронарных артерий (КА). В контрольную группу вошли 10 условно здоровых добровольцев без ишемической болезни сердца. Критериями исключения являлись острые инфекционные и воспалительные заболевания, постоянный прием нестероидных противовоспалительных препаратов или глюкокортикоидов, операция аортокоронарного шунтирования и эндоваскулярные вмешательства любой локализации в анамнезе, перенесенные в течение последних трех месяцев инфаркт миокарда или острое нарушение мозгового кровообращения, хроническая почечная недостаточность, кардиальный синдром Х, стенозы более 40% некоронарной локализации.

Всем исследуемым были определены уровни в крови окисленных ЛНП и аутоантител к ним, а также уровни ключевых липидных (общий холестерин (ХС), липопротеиды высокой плотности (ЛВП), липопротеиды низкой плотности (ЛНП), триглицериды (ТГ)) и воспалительных (высокочувствительный С-реактивный белок (вЧСРБ), интерлейкин-6 (ИЛ-6)) биомаркеров атеросклероза. Забор крови проводился однократно утром натощак из локтевой вены в пробирки без консерванта. Сыворотку получали путем центрифугирования крови при 1500 G в течение 15 минут. Далее сыворотка замораживалась и хранилась при температуре -70°C до выполнения анализов.

Исследование уровня высокочувствительного С-реактивного белка (вЧСРБ) в сыворотке крови проводили нефелометрическим методом на анализаторе белков крови «Беринг Нефелометр» (BN ProSpec, Dade-Behring Marburg GmbH, Германия) с использованием реактивов фирмы Dade-

Таблица 1. Характеристика пациентов

Показатель	Значимые стенозы КА (n = 50)	Начальные изменения КА (n = 20)	Здоровые добровольцы (n = 10)
Возраст	58,5 (51–65)	58,5 (47–68,5)	29,5 (28–30)
ИМТ	30 (27–31)	28,5 (27,5–33,5)	23,5 (23–25)
АГ	44 (88%)	17 (85%)	—
ИМ	23 (46%)	2 (10%)	—
ОНМК	3 (6%)	—	—
НРС	15 (30%)	10 (50%)	—
СД	13 (26%)	6 (30%)	—
Курение	36 (72%)	10 (50%)	2 (20%)
Семейный анамнез	19 (38%)	8 (40%)	1 (10%)
Прием статинов	50 (100%)	15 (75%)	—

Примечание: данные представлены как медиана и квартили, Me (LQ-UQ); абсолютное число пациентов (% от общего числа).

КА – коронарные артерии; ИМТ – индекс массы тела; АГ – артериальная гипертензия; ИМ – инфаркт миокарда; ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения; НРС – нарушение ритма сердца; СД – сахарный диабет.

Таблица 2. Сравнение показателей липидного обмена, биомаркеров воспаления, окисленных ЛНП и антител к ним

Показатель	Значимые стенозы КА (n = 50)	Начальные изменения КА (n = 20)	Здоровые добровольцы (n = 10)
ХС ммоль/л	4,67 (3,95–5,95)	5,24 (4,88–6,46)	4,12 (3,32–4,99)
ТГ ммоль/л	1,57 (1,28–2,30)	1,82 (1,33–2,36)	1,30 (0,98–1,64)
ЛВП ммоль/л	0,95 (0,88–1,04)	1,04 (0,95–1,22)	1,13 (0,90–1,54)
ЛНП ммоль/л	2,93 (2,36–3,85)	3,34 (2,87–4,37)	2,27 (1,83–2,73)
вЧСРБ мг/л	2,15 (1,08–4,55)	1,74 (0,63–5,12)	0,83 (0,44–1,50)
ИЛ-6 пг/мл	3,00 (2,00–4,00)	3,00 (2,00–4,00)	1,00 (1,00–1,00)
ОкЛНП U/мл	0,84 (0,01–2,56)	0,87 (0,11–3,97)	1,19 (0,47–5,57)
АТ-ОкЛНП U/мл	146,92 (83,92–278,55)	203,53 (111,72–352,43)	268,65 (170,53–897,56)
Прием статинов	50 (100%)	15 (75%)	—

Примечание: данные представлены как медиана и квартили, Me (LQ-UQ).

ХС – холестерин ТГ – триглицериды; ЛНП – липопротеиды высокой плотности; ЛВП – липопротеиды низкой плотности; вЧСРБ – высокочувствительный С-реактивный белок; ИЛ-6 – интерлейкин-6; ОкЛНП – окисленные липопротеиды низкой плотности; АТ-ОкЛНП – аутоантитела к окисленным липопротеидам низкой плотности.

Behring. Определение уровня ИЛ-6 проводили методом твердофазного хемилюминесцентного иммуноферментного анализа («сэндвич-метод»), на хемилюминесцентном анализаторе IMMULITE 1000 (Siemens Diagnostics, США) с использованием реактивов фирмы IMMULITE. Сывороточные

ОкЛНП и АТ-ОкЛНП были определены методом иммуноферментного анализа на спектрофотометре Sunrise (Tecan, Австрия) при длине волны 450 нм с использованием коммерческих тест-наборов MDA-oxLDL и OLAV IgG фирмы Biomedica (Австрия). Концентрацию ХС, ЛНП, ЛВП, ТГ определяли

на многоканальном биохимическом анализаторе Architect C-800 (Abbott, США) с использованием ферментных наборов.

Математическая обработка полученных результатов проводилась с использованием пакета статистического анализа данных Statistica 6. Количественные переменные описывались числом пациентов, верхним и нижним квартилями, медианой. Оцениваемые показатели имели непараметрическое распределение, поэтому для проведения корреляционного анализа использовался ранговый коэффициент Спирмана. Для парных сравнений использовался критерий Манна-Уитни, статистическая значимость присваивалась при значении $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При оценке полученных данных выявлены статистически значимые различия. В группе с начальными изменениями КА при сравнении с группой со значимым стенозированием КА достоверно выше был уровень ХС ($p = 0,03$) и ЛВП ($p = 0,02$), а при сравнении с группой здоровых добровольцев отмечался более высокий уровень ХС ($p = 0,01$), ЛНП ($p = 0,01$) и ИЛ-6 ($p = 0,001$). В группе со значимым стенозированием КА при сравнении с группой здоровых добровольцев выявлены более высокие уровни ЛНП ($p = 0,03$), вЧРБ ($p = 0,01$) и ИЛ-6 ($p = 0,001$).

Достоверной разницы между уровнями сывороточных ОжЛНП во всех трех группах не получено. Однако, в группе здоровых добровольцев уровни АТ-ОжЛНП ($p = 0,03$) были достоверно выше по сравнению с показателями группы с тяжелым стенозированием КА. Не смотря на то, что пациенты этих групп не сопоставимы по возрасту (средний возраст 29,5 и 58,5 лет), зависимости между уровнем ОжЛНП, титрами АТ-ОжЛНП и возрастом не отмечено. Следует отметить, что прием статинов не влиял на уровни ОжЛНП и АТ-ОжЛНП, статистически значимой разницы этих показателей у пациентов не принимавших статины и пациентов, находящихся на терапии статинами в различной дозировке, выявлено не было.

В группе со значимым стенозированием КА проводилась оценка тяжести поражения коронарного русла с использованием шкалы SYNTAX Score. Для этого показателя была вычислена медиана – 10 баллов. Обращает на себя внимание, что уровень АТ-ОжЛНП оказался достоверно выше у пациентов с баллами по шкале SYNTAX ниже значения медианы ($p = 0,03$). Интересно отметить, что при анализе влияния факторов риска на уровень исследуемых показателей титры АТ-ОжЛНП оказались достоверно выше у некурящих пациентов ($p = 0,02$).

Таким образом, не смотря на то, что в ряде ранних исследований описывалась связь уровня ОжЛНП с тяжестью коронарного атеросклероза, а титры АТ-ОжЛНП рассматривались как независимый предиктор прогрессирования атеросклероза, наши данные не могут предоставить дополнительную поддержку роли ОжЛНП и аутоантител к ним в атерогенезе. Принимая во внимание то, что в группе здоровых добровольцев уровни АТ-ОжЛНП были достоверно выше, чем в группе с тяжелым стенозированием КА, а среди больных с тяжелым коронарным атеросклерозом более высокий уровень АТ-ОжЛНП наблюдался у пациентов с меньшей степенью поражения коронарных артерий, результаты нашего исследования подтверждают гипотезу о том, что АТ-ОжЛНП могут быть обратно пропорционально связаны с наличием атеросклероза [19]. Также наши результаты не противоречат данным существующих по этой проблеме работ, в которых было продемонстрировано, что уровень АТ-ОжЛНП у больных с ишемической болезнью сердца снижен по сравнению с группой здоровых доноров [20], а при сравнении молодых здоровых лиц и пациентов с сердечно-сосудистой патологией наиболее высокий уровень АТ-ОжЛНП регистрировался у молодых здоровых доноров, что может быть обусловлено тем, что высокое содержание антител регулирует уровень антигенов, ингибируя атерогенез [3].

Конфликт интересов

Конфликт интересов отсутствует.

Список литературы

1. Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witzum JL, Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci.* 1984;81:3883-7.
2. Mizuno Y, Jacob RF, Mason RP. Inflammation and the development of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2011;18(5):351-8.
3. Fefelova EV, Hysbiktuev YS, Maksimenya MV, Tereshkov PP, Mikbilichenco SI, Tsybikov NN. The contents of oxidized LDL and their antibodies in healthy individuals and in patients with cardiovascular disease. *Far Eastern medical journal.* 2013;1:6-8. Russian (Фефелова ЕВ, Хышиктыев БС, Максименя МВ, Терешков ПП, Михайличенко СИ, Цыбиков НН. Содержание окисленных липопротеидов низкой плотности и антител к ним у здоровых лиц и у пациентов с сердечно-сосудистой патологией. *Дальневосточный медицинский журнал.* 2013;1:6-8.)

4. Lopes-Virella MF, Virella G. Clinical significance of the humoral immune response to modified LDL. *Clin Immunol.* 2010;134:55–65.
5. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol.* 2011;12(3):204–12.
6. Steinerova A, Racek J, Stozicky F, Zima T, Fialova L, Lapin A. Antibodies against oxidized LDL—theory and clinical use. *Physiol Res.* 2001;50(2):131–41.
7. Salonen JT, Yla-Herttuala S, Yamamoto R, Butler S, Korpela H, Salonen R, Nyysönen K, Palinski W, Witztum JL. Autoantibody against oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet.* 1992;339:883–7.
8. Virella G, Virella I, Leman RB, Pryor MB, Lopes-Virella MF. Anti-oxidized low-density lipoprotein antibodies in patients with coronary heart disease and normal healthy volunteers. *Int J Clin Lab Res.* 1993;23(2):95–101.
9. Maggi E, Finardi G, Poli M, Bollati P, Filippini M, Stefano PL, Paolini G, Grossi A, Clot P, Albano E. Specificity of autoantibodies against oxidized LDL as an additional marker for atherosclerotic risk. *Coron Artery Dis.* 1993;4(12):1119–22.
10. Tinabones FJ, Gyme-Zumaquero JM, Garrido-Sánchez L, Garcha-Fuentes E, Rojo-Martínez G, Esteva I, Ruiz de Adana MS, Cardona F, Soriguer F. Influence of age and sex on levels of anti-oxidized LDL antibodies and anti-LDL immune complexes in the general population. *J Lipid Res.* 2005;46(3):452–7.
11. Karvonen J, Paivansalo M, Kesaniemi YA, Horkko S. Immunoglobulin M type of autoantibodies to oxidized low-density lipoprotein has an inverse relation to carotid artery atherosclerosis. *Circulation.* 2003;108(17):2107–12.
12. Shaw PX, Hukkanen S, Tsimikas S, Chang MK, Palinski W, Silverman GJ, Chen PP, Witztum JL. Human-derived anti-oxidized LDL autoantibody blocks uptake of oxidized LDL by macrophages and localizes to atherosclerotic lesions in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001(8);21:1333–9.
13. Burut DF, Karim Y, Ferns GA. The role of immune complexes in atherogenesis. *Angiology.* 2010;61(7):679–89.
14. Virella G, Lopes-Virella MF. Atherogenesis and the humoral immune response to modified lipoproteins. *Atherosclerosis.* 2008;200(2):239–46.
15. Yla-Herttuala S, Palinski W, Butler SW, Picard S, Steinberg D, Witztum JL. Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized
16. LDL. *Arterioscler Thromb.* 1994;14(1):32–40.
17. Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, Witztum JL, Steinberg D. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest.* 1989;84(4):1086–95.
18. Virella G, Atchley D, Koskinen S, Zheng D, Lopes-Virella MF. Proatherogenic and proinflammatory properties of immune complexes prepared with purified human oxLDL antibodies and human oxLDL. *Clin Immunol.* 2002;105(1):81–92.
19. Saad AF, Virella G, Chassereau C, Boackle RJ, Lopes-Virella MF. OxLDL immune complexes activate complement and induce cytokine production by MonoMac 6 cells and human macrophages. *J Lipid Res.* 2006;47(9):1975–83.
20. Tinabones FJ, Gyme-Zumaquero JM, Garrido-Sánchez L, Garcha-Fuentes E, Rojo-Martínez G, Esteva I, Ruiz de Adana MS, Cardona F, Soriguer F. Influence of age and sex on levels of anti-oxidized LDL antibodies and anti-LDL immune complexes in the general population. *J Lipid Res.* 2005;46(3):452–7.
21. Ogurkova OH, Suslov TE, Levasbkin EA, Kulagin IW, Likhomanov KS, Kosbelskaya OA. Change the content of oxidation-modified LDL and antibodies to them in the application of atorvastatin in patients with coronary heart disease. *Siberian Medical Journal.* 2008;23(4):21–3. Russian (Огуркова ОН, Сулова ТЕ, Левашкина ЕА, Кулагина ИВ, Лихоманов КС, Кошельская ОА. Изменение содержания окисленно-модифицированных липопротеидов низкой плотности и антител к ним при применении аторвастатина у больных с ишемической болезнью сердца. *Сибирский медицинский журнал.* 2008;23(4):21–3).