

Наличие мелких плотных липопротеидов низкой плотности в сыворотке крови человека вызывает накопление холестерина моноцитоподобными клетками линии THP-1

О. И. Афанасьева¹, Е. А. Уткина¹, Е. Б. Вихрова², Е. А. Клесарева¹, О. А. Разова¹, Т. И. Арефьева¹, И. Ю. Адамова¹, С. Н. Покровский¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава РФ, Москва

² НПФ «Покард», Москва

Абстракт

Цель. Изучить накопление общего холестерина (ОХС) в макрофагальных клетках человека в зависимости от субфракционного профиля апоВ100-содержащих липопротеидов.

Материалы и методы. Клетки линии THP-1 после макрофагальной дифференцировки инкубировали 24 часа с образцами сывороток крови человека с уровнем ОХС < 240 мг/дл. Надосадочную жидкость удаляли, клетки промывали и лизировали. В лизатах клеток измеряли концентрацию ОХС и общего белка колориметрическим методом.

В исследуемых сыворотках определяли концентрации фракций и подфракций липопротеидов методом нативного электрофореза в полиакриламидном геле, апобелка В-100, циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), содержание окисленных липопротеидов низкой плотности (окЛНП) и титр аутоантител (ауто-Ат) к окЛНП.

Результаты. Образцы исследуемых сывороток были разделены на три группы в зависимости от концентрации подфракций мелких плотных липопротеидов низкой плотности (млЛНП): группа 1 – без млЛНП ($n = 11$); группа 2 – с концентрацией млЛНП от 1 до 4,9 мг/дл ($n = 13$); группа 3 – с концентрацией млЛНП > 5 мг/дл ($n = 11$) – атерогенный профиль Б.

В сыворотках группы 3 относительно группы 1 были выявлены более высокие уровни апоВ-100 (медиана, [25%; 75%] – 68,1 мг/дл [63,8; 84,1] и 58,6 мг/дл [43,9; 62,4], $p < 0,01$) и гигантских ЦИК (26,2 лаб. ед. [14,3; 31,8] и 11,3 лаб. ед. [9,7; 12,8], $p = 0,03$) соответственно.

Содержание ОХС в лизате, нормированное на белок, при инкубации клеток в присутствии сывороток с атерогенным профилем Б было значимо выше, чем в группе без млЛНП (6,5 отн. ед. [3,9; 9,1] и 2,7 отн. ед. [2,1; 3,9], $p = 0,03$). По данным многофакторного анализа с введением в модель уровня ОХС, холестерина липопротеидов высокой плотности, апоВ-100, окЛНП и частиц ЛНП среднего размера (ЛНП-2) только концентрация млЛНП ($r = 0,709$, $p < 0,001$) являлась независимым предиктором накопления клетками ОХС. При инкубации клеток с сыворотками пациентов с концентрацией млЛНП свыше 1 мг/дл, даже при наличии так называемого неатерогенного профиля А, было отмечено повышенное содержание ОХС в лизатах.

Заключение. Наличие млЛНП даже в незначительных (менее 5 мг/дл) концентрациях и независимо от других компонентов сыворотки крови вызывает накопление холестерина клетками THP-1.

Ключевые слова: мелкие плотные ЛНП, THP-1 клетки, атеросклероз, накопление холестерина.

The presence of small dense low-density lipoprotein subfractions in human serum induce the accumulation of cholesterol by monocyte-like THP-1 cells

O. I. Afanasieva¹, E. A. Utkina¹, E. B. Vikhrova², E. A. Klesareva¹, O. A. Razova¹, T. I. Arefieva¹, I. Ju. Adamova¹, S. N. Pokrovsky¹

¹Laboratory of problems of atherosclerosis, Institute of Experimental Cardiology of “National Medical Research Center of Cardiology” Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

²Pocard LTD, Moscow, Russia

Abstract

The aim of the study was to investigate the accumulation of total cholesterol (TC) in human macrophages depending on the subfractions' profile of apoB100-containing lipoproteins.

Materials and methods. THP-1 cells were incubated for 24 hours with human serum samples with TC level 240 mg/dl after macrophage differentiation. The supernatant was removed, the cells washed and lysed. The concentration of TC and total protein were measured by the colorimetric method in cell lysates.

The following data were determined in the sera: the concentration of lipoprotein fractions and subfractions by method of native polyacrylamide gel electrophoresis, B-100 apoprotein, circulating immune complexes (CIC), the content of oxidized low density lipoproteins (oxLDL) and titer of autoantibodies (autoAb) to oxLDL.

Results. Sera samples were divided into three groups depending on the concentration of subfractions of small dense low-density lipoproteins (sdLDL): group 1 – without sdLDL ($n=11$); group 2 – with the concentration of sdLDL from 1 to 4.9 mg/dl ($n=13$); group 3 – with the concentration of sdLDL ≥ 5 mg/dl ($n=11$) – atherogenic profile B.

In the sera of group 3 relative to group 1, higher levels of apoB-100 (median, [25%, 75%] – 68.1 mg/dl [63.8, 84.1] and 58.6 mg/dl [43.9, 62.4], $p < 0.01$) and giant CICs (26.2 lab units [14.3, 31.8] and 11.3 lab units [9.7, 12.8], $p = 0.03$), were found respectively.

When cells were incubated in the presence of sera with an atherogenic profile B, the level of TC in the lysate normalized to the protein, was significantly higher than in the group without sdLDL (6.5 rel. units [3.9, 9.1] and 2.7 rel. units [2.1, 3.9], $p = 0.03$). The data of multivariate analysis with including into the model the values of TC, high-density lipoprotein cholesterol, apoB-100, oxLDL and medium size LDL particles (LDL-2) showed that only the concentration of sdLDL ($r = 0.709$, $p < 0.001$) worked as the independent predictor of accumulation of TC.

When incubating the cells with the sera from patients with sdLDL concentration more than 1 mg/dl, the increased amount of TC in lysates was found even in the presence of the so-called non-atherogenic profile A.

Conclusion. *The presence of sdLDL even in small (less than 5 mg/dl) concentrations and independently of other components of the blood serum causes the accumulation of cholesterol by THP-1 cells.*

Keywords: *small dense LDL, THP-1 cells, atherosclerosis, accumulation of cholesterol.*

Введение

Высокий уровень холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС-ЛНП) является основным фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [1]. Фракция циркулирующих в крови ЛНП не является гомогенной, а состоит из множества различных подфракций, которые могут быть разделены такими физико-химическими методами, как ультрацентрифугирование, электрофорез в градиентном геле полиакриламида, с помощью ядерного магнитного резонанса, а также методами осаждения [2]. Отличия в физико-химических свойствах частиц ЛНП обуславливают их различный вклад как в атерогенез [3], так и в оценку сердечно-сосудистого риска [4].

Мелкие плотные подфракции ЛНП (мпЛНП) диаметром менее 25,5 нм обладают пониженной способностью связываться с ЛНП-рецепторами и проявляют более высокое сродство к внеклеточному матриксу внутри сосудистой стенки, что делает их в большей степени подверженными окислительным модификациям и усиливает их атерогенный потенциал [5, 6]. По данным ряда клинических исследований, наличие мпЛНП связано с наличием и тяжестью атеросклероза [7, 8], а также с развитием ишемической болезни сердца (ИБС) [9]. Напротив, крупные частицы ЛНП не являются атерогенными и присутствуют у пациентов без значимого поражения коронарного русла [4, 10, 11].

Захват макрофагами атерогенных липопротеидов и образование пенистых клеток являются

ключевым звеном образования атеросклеротического повреждения. В качестве атерогенных липопротеидов могут выступать модифицированные ЛНП, ЛНП-содержащие циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК), а также ремнанты липопротеидов [12, 13, 14].

Однако данные о накоплении различных подфракций апоВ100-содержащих липопротеидов ЛНП макрофагами крайне ограничены. Цель работы – изучить способность макрофагальных клеток линии THP-1 к накоплению общего холестерина (ОХС) в зависимости от субфракционного профиля апоВ100-содержащих липопротеидов.

Методы

Для работы использовали иммортализованную моноцитоподобную клеточную линию THP-1 (ATCC®), полученную из периферической крови ребенка с острым монобластным лейкозом. Культивирование клеток проводили в CO₂-инкубаторе Forma Scientific (США, температура 37 °С, 5% содержания CO₂, повышенная влажность) в среде RPMI-1640 (ПанЭко), с добавлением пенициллин/стрептомицина (50 ед/мл/50 мкг/мл) (ПанЭко), 10% фетальной бычьей сыворотки (РАА), 50 мкмоль β-меркаптоэтанола. Смену среды производили 2 раза в неделю. Для дифференцировки клетки рассаживали в лунки 24-луночного планшета по 500 тыс. клеток в лунку и вносили по 1 мл среды, содержащей 5 нмоль форбол 12-миристан-13-ацетата (Sigma Aldrich).

Через 48 часов среду удаляли, добавляли 1 мл экспериментальной смеси, содержащей ростовую среду и 10% исследуемого образца сыворотки крови человека. Инкубацию с каждым из исследуемых образцов сыворотки проводили в трех параллелях. Через 22–24 часа надосадочную жидкость отбирали. Для получения клеточного лизата клетки 3 раза промывали 1 мл теплого раствора Хэнкса, затем добавляли 130 мкл 0,1%-ного раствора Тритон Х100. Интенсивно пипетировали и собирали лизат. Клеточный лизат центрифугировали при 1500 g 5 мин. Для проведения дальнейших измерений объединяли образцы лизатов, полученных из трех лунок (параллелей) для каждого образца сыворотки.

Образцы сыворотки были получены от нормолипидемических пациентов, проходивших обследование в институте клинической кардиологии им. Мясникова ФГБУ «НМИЦ кардиологии».

Во всех образцах сыворотки, а также в супернатантах культур измеряли концентрацию ОХС, триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеидов высокой плотности (ХС-ЛВП) ферментативным методом с использованием наборов Bioson/Analyticon (Германия) и двулучевого спектрофотометра (Shimadzu UV-180, Япония) при длине волны 546 нм. Концентрацию ОХС в препаратах клеточных лизатов определяли по аналогичной

методике, но объем исследуемой пробы увеличивали в 2,5 раза. Общий белок в лизатах определяли колориметрическим методом по Бредфорду [15] с использованием того же прибора.

Содержание ЦИК в исследуемых сыворотках определяли осаждением в присутствии полиэтиленгликоля (ПЭГ) в концентрациях от 3 до 6%, как было описано ранее [16]. В данной работе изучали суммарное содержание ЦИК, дифференцированных по размеру, но не по специфичности. Данные представляли в лабораторных единицах: (лаб. ед.) = $(\text{ОП}_{\text{образца в ПЭГ}} - \text{ОП}_{\text{образца в физ. растворе}}) \times 1000$.

Концентрацию окисленных ЛНП (окЛНП) в сыворотках (единиц/л) определяли с использованием коммерческого набора Mercodia Oxidized LDL ELISA (Швеция) в соответствии с инструкцией производителя на микропланшетном спектрофотометре Multiscan Go (Thermo Scientific, Финляндия). Определение титра аутоантител (аутоАт) против ЛНП, окисленных в присутствии двухвалентной меди (Cu²⁺, окЛНП), проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа в соответствии с описанным ранее [16] с использованием того же прибора. Концентрацию апоВ100 в сыворотках крови измеряли методом иммунотурбидиметрии с помощью реагентов Vital («Витал-Диагностик», Санкт-Петербург) на двухлучевом спектрофотометре (Shimadzu UV-180, Япония). Комплемент-связывающую способность сывороток (активацию комплемента) определяли с использованием комплемента морской свинки (Щёлковский биокомбинат, Россия) и гемолитической системы («Микроген», Россия) [17]. Перед постановкой реакции образцы сыворотки предварительно прогревали при 56 °С в течение 30 мин. для инактивации собственного комплемента. С помощью спектрофотометра Multiscan Go (Thermo Scientific, Финляндия) измеряли оптическую плотность (ОП) при длине волны 412 нм и рассчитывали степень лизиса (СЛ) по формуле: $\text{СЛ, \%} = ((\text{ОП}_{\text{обр-Кгс}}) / (\text{Кгс} - \text{Кгс})) \times 100\%$, где ОП_{обр} – ОП образца, Кгс – ОП гемолитической системы (смесь гемолитической сыворотки и эритроцитов барана), Кгс – ОП гемолитической системы и комплемента (смесь гемолитической сыворотки, эритроцитов барана и комплемента). Подфракции апоВ100-содержащих липопротеидов в сыворотках анализировали с помощью системы Липопринт® (Quantimetrix, США).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета статистических программ MedCalc 15.8. Ввиду ненормального распределения большинства исследуемых параметров и небольшого количества наблюдений использовали методы непараметрического анализа. Данные представляли как медиану и интерквартильный интервал. Анализ взаимосвязи различных параметров оценивали с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Сравнение независимых выборок проводили с использованием непараметрического критерия с поправкой Манна – Уитни. Определение

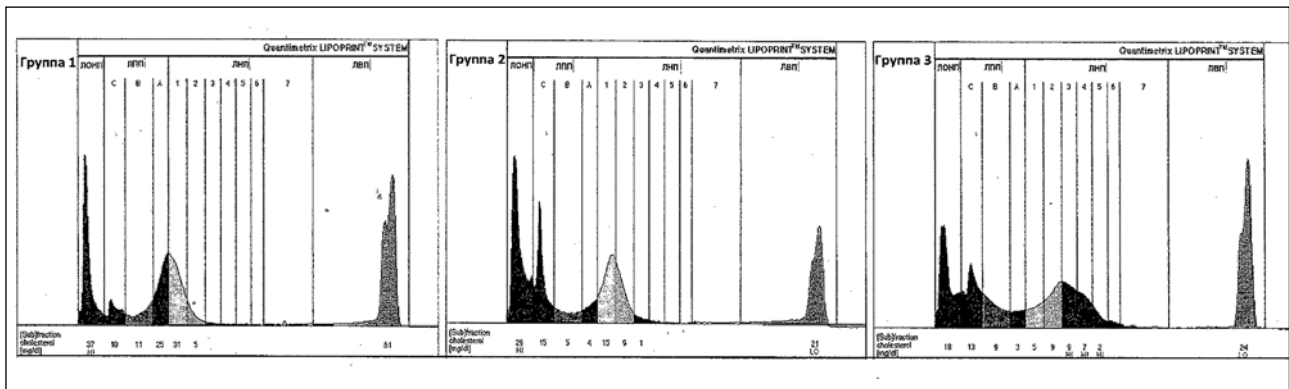
пороговой концентрации мЛНП, вызывающей накопление ОХС выше медианы распределения, рассчитывали с использованием анализа кривых операционных характеристик (ROC-анализ). Для оценки связи исследуемых показателей и степени накопления внутриклеточного холестерина ТНР-1 клетками применяли многофакторный регрессионный анализ.

Результаты

После проведенного скрининга были отобраны 35 образцов сыворотки с концентрацией ОХС не

более 240 мг/дл с концентрацией мЛНП, варьирующей от 0 до 46 мг/дл, которые были разделены на три группы в соответствии с терциями распределения концентрации мЛНП: группа 1 – без мЛНП ($n = 11$), группа 2 – с пограничным уровнем мЛНП от 1 до 4,9 мг/дл ($n = 13$), группа 3 – с повышенным уровнем мЛНП – больше или равно 5 мг/дл ($n = 11$). Согласно референсному значению концентрации мЛНП набора Липопринт® в сыворотках группы 1 и 2 присутствовал профиль А (неатерогенный), в группе 3 – профиль Б (атерогенный). На рис. 1 представлены профили подфракций липопротеидов для групп 1–3.

Рис. 1. Типичные липидограммы сывороток, полученные с помощью системы Липопринт®



Примечание: группы 1, 2 – неатерогенный профиль А; группа 3 – атерогенный профиль Б. ЛОНП – липопротеиды очень низкой плотности; ЛНП – липопротеиды низкой плотности; ЛВП – липопротеиды высокой плотности.

Группы не различались по исходному уровню ОХС, ХС-ЛВП и ТГ, а также по концентрации оЛНП. Также не было обнаружено значимых различий в уровне подфракций apoB100-содержащих липопротеидов (ЛНП и липопротеидов промежуточной плотности (ЛПП)), за исключением подфракций ЛНП-2 (табл. 1).

Уровень apoB100 в исследованных сыворотках был достоверно выше в группе с атерогенным профилем Б, чем в подгруппах с отсутствием или незначительной концентрацией мЛНП.

Концентрация ЦИК всех размеров была выше в группе с высоким содержанием мЛНП по сравнению с группой с отсутствием мЛНП (рис. 2), но только для гигантских ЦИК (гЦИК) различия достигали уровня значимости. В концентрации аутоАт против Cu^{2+} и степени лизиса эритроцитов в системе реакции активации комплемента различий не наблюдалось.

Уровень ОХС, аккумулированного клетками ТНР-1, был выше при инкубации с сыворотками с атерогенным профилем Б (рис. 3), однако для абсолютной концентрации ОХС в лизате эти различия не достигали достоверности (рис. 3а), в отличие от концентрации ОХС, нормированной на концентрацию белка (рис. 3б).

Согласно результатам однофакторного анализа количество ОХС, аккумулированное клетками, было взаимосвязано только с концентрацией мЛНП и более ни с какими из измеренных показателей (табл. 2).

В исследуемых сыворотках уровень IgG аутоантител против оЛНП ($r = 0,521$, $p < 0,01$), так же как и содержание гигантских и мелких ЦИК ($r = 0,428$, $p = 0,021$; $r = 0,382$, $p = 0,041$ соответственно) зависели от концентрации оЛНП, что согласовывалось с наблюдениями о способности модифицированных ЛНП выступать в качестве аутоантигена, участвующего в развитии атеросклероза и последующих сердечно-сосудистых осложнений [18], тогда как степень активации системы комплемента коррелировала только с концентрацией мелких ЦИК ($r = 0,433$, $p = 0,050$). Концентрация мЛНП также коррелировала с концентрацией ЛПП среднего размера ЛПП-В ($r = 0,354$, $p = 0,037$), ЛНП среднего размера – ЛНП-2 ($r = 0,712$, $p < 0,0001$) и концентрацией apoB100 ($r = 0,491$, $p < 0,01$). Тенденция к большему накоплению холестерина клетками была обнаружена при инкубации с сыворотками с концентрацией оЛНП $> 51,8$ ед/л (верхняя квартиль), чем с концентрацией оЛНП $< 31,3$ ед/л (нижняя квартиль) (рис. 4).

Таблица 1. Характеристика липидного спектра и субфракционного состава апоВ100-содержащих липопротеидов в исследуемых сыворотках в зависимости от концентрации мЛНП

Параметр	Профиль А		Профиль Б
	группа 1 (n = 11) мЛНП = 0 мг/дл	группа 2 (n = 13) мЛНП = 1–4,9 мг/дл	группа 3 (n = 11) мЛНП ≥ 5 мг/дл
ОХС, мг/дл	132,1 [125,3; 190,5]	121,4 [106,2; 166,7]	169,0 [144,2; 186,0]
ХС-ЛВП, мг/дл	63,5 [56,8; 72,4]	62,8 [57,6; 76,4]	67,6 [61,1; 77,7]
апоВ100, мг/дл	58,6 [43,9; 62,4]	54,1 [44,5; 69,0]	68,1 [63,8; 84,1]**.#
окЛНП, ед/л	39,4 [33,8; 45,0]	28,4 [26,6; 53,1]	48,2 [43,1; 61,5]
ЛОНП (%)	28,2 [24,3; 58,7]	31,5 [29,1; 34,2]	30,6 [30,1; 33,3]
ЛОНП, мг/дл	47,0 [34,8; 80,3]	41,0 [31,5; 55,0]	54,0 [48,2; 58,5]
ЛПП-С (%)	4,4 [0,8; 5,6]	4,2 [3,3; 5,3]	3,8 [3,6; 5,6]
ЛПП-С мг/дл	6,0 [0,5; 9,3]	6,0 [4,8; 7,2]	7,0 [6,0; 9,5]
ЛПП-В (%)	5,0 [1,1; 6,5]	5,4 [4,8; 5,7]	5,1 [4,3; 6,4]
ЛПП-В мг/дл	7,0 [0,8; 9,7]	7,0 [5,0; 9,2]	8,0 [8,0; 11,7]
ЛПП-А (%)	8,6 [1,4; 11,8]	6,1 [5,5; 7,1]	5,9 [4,7; 7,9]
ЛПП-А мг/дл	12,0 [1,3; 21,5]	9,0 [5,8; 10,0]	9,0 [7,2; 16,0]
ЛНП-1 (%)	16,1 [13,2; 17,1]	16,3 [13,9; 17,9]	15,3 [13,6; 17,2]
ЛНП-1 мг/дл	21,0 [11,5; 27,5]	20,0 [17,0; 26,7]	28,0 [18,7; 32,5]
ЛНП-2 (%)	3,1 [0,4; 4,1]	7,8 [5,7; 12,0]***	11,7 [8,5; 12,5]***
ЛНП-2 мг/дл	4,0 [1,0; 5,8]	11,0 [7,8; 13,0]****	20,0 [15,5; 21,0]****.#
мЛНП (%)	0	1,4 [1,3; 2,0]	4,2 [3,5; 6,9]
мЛНП, мг/дл	0	2,0 [1,0; 2,0]	7,0 [6,3; 11,0]

Примечание: данные представлены как медиана и интерквартильный интервал (медиана [25%; 75%]).

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,0001$ в сравнении с группой 1, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ в сравнении с группой 2. ОХС – общий холестерин; ХС-ЛВП – холестерин липопротеидов высокой плотности; апоВ100 – апобелок В100; окЛНП – окисленные липопротеиды низкой плотности; ЛОНП – липопротеиды очень низкой плотности; ЛПП (А, В, С) – липопротеиды промежуточной плотности подклассов А, В, С; ЛНП – липопротеиды низкой плотности; мЛНП – мелкие плотные липопротеиды низкой плотности; ЛВП – липопротеиды высокой плотности.

По результатам многофакторного анализа с введением в модель уровня ОХС в плазме, ХС-ЛВП, апоВ100, окЛНП и ЛНП-2 только концентрация мЛНП ($r = 0,709$, $p < 0,001$) являлась независимым предиктором накопления ОХС клетками, выраженным как холестерин, нормированный на единицу белка. Введение в модель таких показателей, как ЦИК гигантских размеров и титр IgM аутоАт против окЛНП – как возможных антиатерогенных факторов, – не изменяло значимости мЛНП как предиктора накопления холестерина клетками. Полученные в опытах *in vitro* результаты согласовывались с наблюдениями популяционных исследований, в которых уровень аутоАт к модифицированным ЛНП и ЦИК не являлся независимым предиктором степени тяжести атеросклероза [19].

Анализ кривых операционных характеристик (ROC-анализ) продемонстрировал, что наличие мЛНП в любой концентрации (свыше 0 мг/дл) с чувствительностью 88% и специфичностью 50% (площадь под кривой (AUC) 0,737 (95% ДИ 0,561–0,871), $p < 0,01$) определяло накопление холестерина клетками в количестве, превышающем

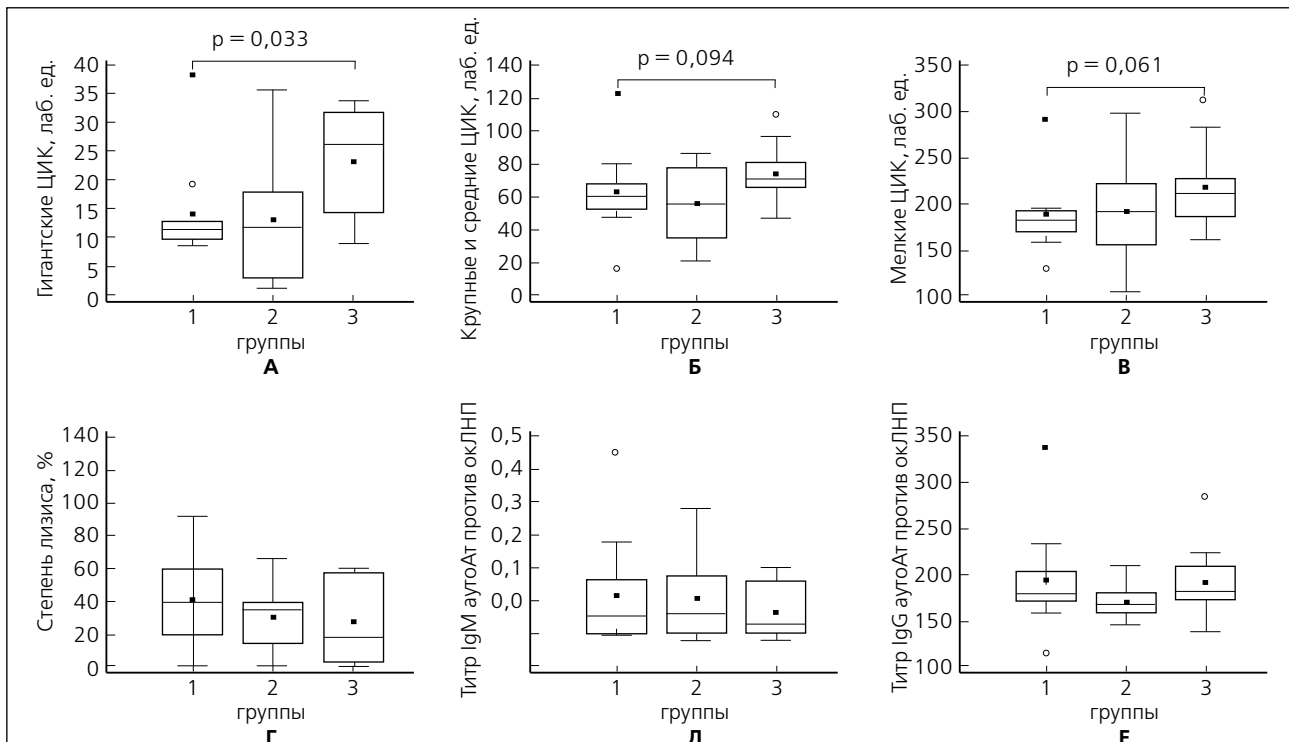
медиану распределения (относительное содержание холестерина в лизате, нормированное на белок, больше 4,3 отн. ед.).

Таким образом, в опыте *in vitro* было показано, что наличие мЛНП способствует захвату холестерина клетками независимо от других компонентов сыворотки крови, таких как окЛНП, титр аутоАт против окЛНП, ЦИК различных размеров и ЛНП среднего размера (ЛНП-2). При этом даже незначительная концентрация мЛНП (менее 5 мг/дл) вызывает накопление холестерина в клетках ТНР-1.

Обсуждение

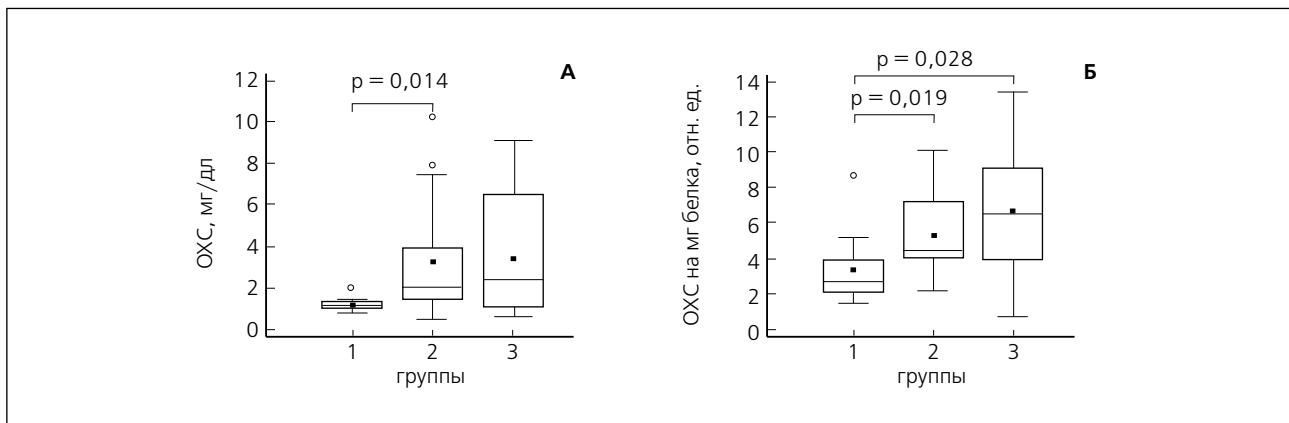
Накопление липидов макрофагами с последующим их превращением в пенные клетки является одним из ключевых звеньев атерогенеза. Согласно современным представлениям, наиболее интенсивно захватываются не нативные ЛНП, а каким-либо образом модифицированные ЛНП – окисленные, ацилированные, десалирированные или содержащие другие модификации [12]. Роль мЛНП как факторов риска атеросклероза активно

Рис. 2. Концентрация циркулирующих иммунных комплексов (А, Б, В), степень лизиса (Г) и титр аутоАт против окисленных ЛНП (Д, Е) в группах с различным уровнем мЛНП



Примечание: группа 1 – сыворотки без мЛНП, группа 2 – сыворотки с концентрацией мЛНП от 1 до 4,9 мг/дл, группа 3 – сыворотки с концентрацией мЛНП ≥ 5 мг/дл. ЦИК – циркулирующие иммунные комплексы; окЛНП – окисленные липопротеиды низкой плотности; аутоАт – аутоантитела.

Рис. 3. Содержание общего холестерина в лизате клеток



Примечание: А – абсолютная концентрация ОХС; Б – концентрация ОХС, нормированная на концентрацию белка; отн. ед. = мг ОХС/100 мг белка; ОХС – общий холестерин.

обсуждается на протяжении последнего десятилетия, при этом в настоящее время интерес к данной проблеме не только не ослабевает, но и растет [20]. Ранее в наших работах было показано, что у пациентов, находящихся на оптимальной гиполипидемической терапии, уровень мЛНП не является независимым предиктором наличия и тяжести гемодинамически значимых (стеноз более 50%) поражений коронарных артерий [10].

В настоящей работе мы исследовали накопление внутриклеточного холестерина моноцитоподобными клетками ТНР-1 в зависимости

от субфракционного состава апоВ100-содержащих липопротеидов. Данная клеточная линия широко используется как инструмент для исследования структуры и функций моноцитов/макрофагов как для фундаментальных, так и для прикладных исследований [21].

Полученные данные позволяют предположить, что наличие у пациента мЛНП, вне зависимости от других потенциальных факторов риска, таких как уровень окЛНП, концентрация апоВ100, ЛНП среднего размера (ЛНП-2), наличие аутоАт против окЛНП и циркулирующих иммунных комплексов,

Таблица 2. Взаимосвязь концентрации измеренных липидных и иммунологических показателей с накоплением общего холестерина клетками

Показатель, концентрация в сыворотке	Концентрация ОХС в лизате, мг/дл		Удельная концентрация ОХС в лизате, отн. ед.	
	r	p	r	p
ОХС, мг/дл	-0,173	0,320	-0,15	0,388
не-ЛВП-ХС, мг/дл	-0,110	0,528	-0,087	0,618
ЛОНП, мг/дл	-0,125	0,476	-0,223	0,197
ЛПП-С, мг/дл	-0,098	0,576	0,025	0,885
ЛПП-В, мг/дл	0,095	0,589	0,16	0,358
ЛПП-А, мг/дл	-0,062	0,725	0,039	0,825
ЛНП-1, мг/дл	-0,121	0,490	-0,155	0,375
ЛНП-2, мг/дл	0,286	0,096	0,23	0,183
мпЛНП, мг/дл	0,344	0,043	0,442	0,008
ЛВП, мг/дл	-0,207	0,233	-0,115	0,512
апоВ100, мг/дл	0,092	0,599	0,037	0,831
окЛНП, ед/л	0,072	0,710	-0,014	0,943
гЦИК, лаб. ед.	0,228	0,187	0,078	0,655
кЦИК, лаб. ед.	0,056	0,750	0,066	0,708
мЦИК, лаб. ед.	0,021	0,905	-0,014	0,935
Титр IgG аутоАт против Cu ²⁺ окЛНП, опт. ед.	0,042	0,815	0,099	0,578
Титр IgM аутоАт против Cu ²⁺ окЛНП, опт. ед.	-0,197	0,256	-0,159	0,360
Активация комплемента, %	0,054	0,817	0,115	0,621

Примечание: ОХС – общий холестерин; не-ЛВП-ХС – холестерин, не входящий в липопротеиды высокой плотности; ЛОНП – липопротеиды очень низкой плотности; ЛПП (А, В, С) – липопротеиды промежуточной плотности подклассов А, В, С; ЛНП – липопротеиды низкой плотности; мпЛНП – мелкие плотные липопротеиды низкой плотности; ЛВП – липопротеиды высокой плотности; апоВ100 – апобелок В-100; окЛНП – окисленные липопротеиды низкой плотности; гЦИК – гигантские циркулирующие иммунные комплексы; кЦИК – крупные и средние циркулирующие иммунные комплексы; мЦИК – мелкие циркулирующие иммунные комплексы; IgG аутоАт против окЛНП – аутоантитела класса IgG к окисленным липопротеидам низкой плотности; IgM аутоАт против окЛНП – аутоантитела класса IgM к окисленным липопротеидам низкой плотности.

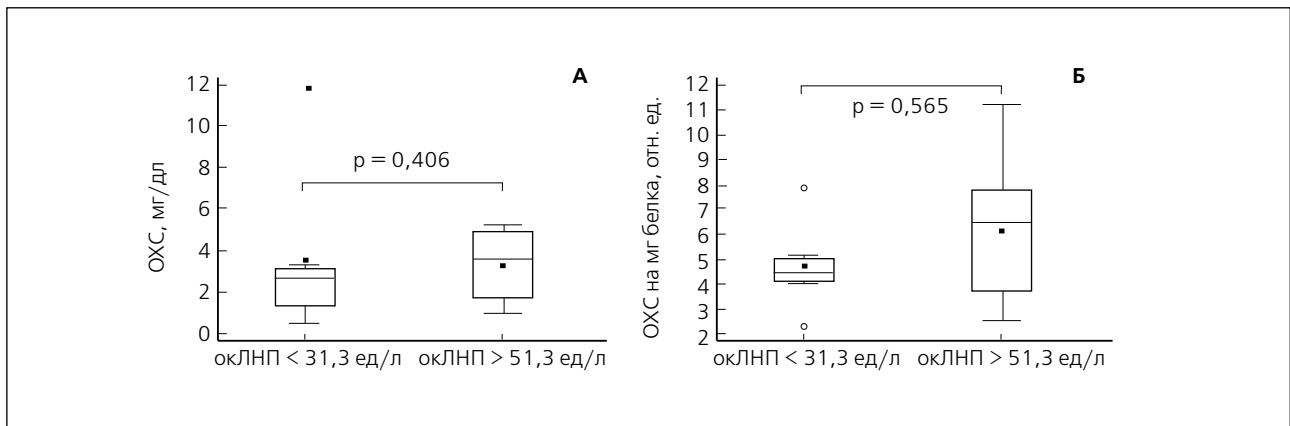
является значимым предиктором накопления холестерина клетками.

Схожие результаты были получены в работе Tanі и соавт., показавших, что препараты как окисленных, так и нативных мпЛНП, в отличие от фракции ЛНП крупного размера, способны вызывать значимое накопление липидов ТНР-1 клетками. Возможными причинами такого наблюдения, по мнению авторов, может быть как большая склонность мпЛНП к окислению, так и способность нативных мпЛНП оказывать влияние на захват липидов макрофагами через увеличение экспрессии лектиноподобного рецептора-1 окисленных ЛНП (LOX-1 рецептор) макрофагами [22].

В настоящее время нет общепринятого референсного значения для концентрации подфракций мпЛНП. Пограничное значение, предлагаемое в системе «Липопринт» для оценки атерогенного профиля липопротеидов, составляет 6 мг/дл и выше.

Однако по результатам ROC-анализа присутствие мпЛНП в концентрации свыше 2 мг/дл было достоверно связано с наличием ИБС при обследовании 187 обследованных пациентов [22]. Недавно были опубликованы данные о том, что у пациентов с концентрацией мпЛНП свыше 4 мг/дл количество «неклассических» моноцитов с фенотипом CD14+CD16++ достоверно больше, чем у пациентов с концентрацией мпЛНП не более 1 мг/дл, что также свидетельствует о роли мпЛНП как не зависящего от уровня ЛНП фактора атерогенеза [23]. Дальнейшее исследование роли мпЛНП в развитии атеросклеротического поражения сосудов является перспективным направлением как для ранней профилактики развития ИБС, так и для поиска новых методов терапевтического воздействия на уровень данного показателя.

Рис. 4. Накопление общего холестерина клетками при инкубации с сыворотками с уровнем окЛНП из нижней (<31,3 ед/л) и верхней (>51,3 ед/л) квартилей распределения



Примечание: А – абсолютная концентрация ОХС; Б – концентрация ОХС, нормированная на концентрацию белка: отн. ед. = мг ОХС/100 мг белка.

ОХС – общий холестерин, окЛНП – окисленные липопротеиды низкой плотности.

Заключение

Полученные нами результаты демонстрируют, что наличие мЛНП в сыворотке вызывает накопление холестерина макрофагами вне зависимости от других потенциально «атерогенных» и «антиатерогенных» компонентов плазмы крови. Таким образом, в опытах *in vitro* на клеточной модели мы подтвердили, что методы определения подфракций

мЛНП могут оказаться перспективными на стадии первичной профилактики ИБС для выявления пациентов, имеющих повышенный риск развития атеросклероза.

Конфликт интересов

Конфликт интересов отсутствует.

Список литературы

1. Goodman WS, Hulley SB, Clark LT, Davis CE, Fuster V, LaRosa JC, Oberman A, Schaefer EJ, Steinberg D, Brown WV, Grundy SM, Becker D, Bierman E, Sooter-Bochenek J, Mullis R, Stone N, Hunningbake DB, Dunbar JM, Ginsberg HN, Illingworth DR, Sadin HC, Schonfeld G, Cleeman JI, Brewer Jr HB, Ernst N, Friedewald W, Hoeg JM, Rifkind B, Gordon D. Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. The Expert Panel. *Arch Intern Med.* 1988; 148(1):36-69.
2. Hirano T, Ito Y, Yoshino G. Measurement of small dense low-density lipoprotein particles. *J Atheroscler Thromb.* 2005; 12(2):67-72.
3. Krauss R. Lipoprotein subfractions and cardiovascular disease risk. *Curr Opin Lipidol.* 2010; 21(4):305-11. doi: 10.1097/MOL.0b013e32833b7756.
4. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration, Fulcher J, O'Connell R, Voysey M, Emberson J, Blackwell L, Mibaylova B, Simes J, Collins R, Kirby A, Colhoun H, Braunwald E, La Rosa J, Pedersen TR, Tonkin A, Davis B, Sleight P, Franzosi MG, Baigent C, Keech A. Efficacy and safety of LDL-lowering therapy among men and women: meta-analysis of individual data from 174,000 participants in 27 randomised trials. *Lancet.* 2015; 385(9976):1397-405. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61368-4. Epub 2015 Jan 9.
5. Mora S, Caulfield MP, Woblgemuth J, Chen Z, Superko HR, Rowland CM, Glynn RJ, Ridker PM, Krauss RM. Atherogenic Lipoprotein Subfractions Determined by Ion Mobility and First Cardiovascular Events After Random Allocation to High-Intensity Statin or Placebo: The Justification for the Use of Statins in Prevention: An Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER) Trial. *Circulation.* 2015; 132:2220-2229. doi:10.1161/Circulationaha.115.016857. Epub 2015 Sep 25.
6. Packard CJ. Small dense low-density lipoprotein and its role as an independent predictor of cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol.* 2006; 17(4):412-7. doi: 10.1097/01.mol.0000236367.42755.c1.
7. Ebara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Itob A, Otsuka M, Komatsu R, Matsuo T, Itabe H, Takano T, Tsukamoto Y, Yoshiyama M, Takeuchi K, Yoshikawa J, Becker AE. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation.* 2001; 103(15):1955-60.
8. Hirayama S, Miida T. Small dense LDL: An emerging risk factor for cardiovascular disease. *Clin Chim Acta.* 2012; 414:215-24. doi: 10.1016/j.cca.2012.09.010. Epub 2012 Sep 16.

9. Koba S, Yokota Y, Hirano T, Ito Y, Ban Y, Tsunoda F, Sato T, Sboji M, Suzuki H, Gesbi E, Kobayashi Y, Katagiri T. *J Atheroscler Thromb.* 2008; 15(5):250–60.
10. Sacks F, Campos H. *Clinical review 163: Cardiovascular endocrinology: Low-density lipoprotein size and cardiovascular disease: a reappraisal. J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88(10):4525–32. DOI: 10.1210/jc.2003-030636.
11. Utkina EA, Afanasyeva OI, Yezhov MV, Artemieva NV, Matchin YuG, Bayda SM, Adamova IYu, Pokrovsky SN. Association between different lipoprotein subfractions and coronary atherosclerosis in middle-aged men on statin therapy. *Kardiologicheskij Vestnik* 2014; IX(1):68–76. Russian (Уткина ЕА, Афанасьева ОИ, Ежов МВ, Артемьева НВ, Матчин ЮГ, Байда СМ, Адамова ИЮ, Покровский СН. Связь различных подфракций липопротеидов с коронарным атеросклерозом у мужчин среднего возраста, получавших терапию статинами. *Кардиологический вестник.* 2014; IX(1):68–76).
12. Ozerova IN, Metel'skaja VA, Perova NV, Gavrilova NE, Chernushevich OI. Relationship of low densities lipoprotein subfractions with triglycerides level in patients with different grade of coronary arteries stenosis. *The Journal of Atherosclerosis and Dyslipidemias* 2014; 2:33–37. Russian (Озерова ИИ, Метельская ВА, Перова НВ, Гаврилова НЕ, Чернушевич ОИ. Связь субфракционного спектра липопротеинов низких плотностей с уровнем триглицеридов в крови при разной степени стенозов коронарных артерий. *Атеросклероз и дислипидемии* 2014; 2:33–37).
13. Alique M, Luna C, Carracedo J, Ramírez R. LDL biochemical modifications: a link between atherosclerosis and aging. *Food Nutr Res.* 2015; 59:29240. doi: 10.3402/fnr.v59.29240. eCollection 2015.
14. Kawakami A, Yoshida M. Remnant lipoproteins and atherogenesis. *J Atheroscler Thromb.* 2005; 12(2):73–6.
15. Virella G, Atchley D, Koskinen S, Zheng D, Lopes-Virella MF, DCCT/EDIC Research Group. Proatherogenic and proinflammatory properties of immune complexes prepared with purified human oxLDL antibodies and human oxLDL. *Clin Immunol.* 2002; 105(1):81–92.
16. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72, 248–254.
17. Klesareva EA, Afanas'eva OI, Donskikh VV, Adamova IY, Pokrovskii SN. Characteristics of Lipoprotein(a)-Containing Circulating Immune Complexes as Markers of Coronary Heart Disease. *Bull Exp Biol Med.* 2016; 162(2):231–236. DOI: 10.1007/s10517-016-3583-z. Russian (Клесарева ЕА, Афанасьева ОИ, Донских ВВ, Адамова ИЮ, Покровский СН. Характеристика липопротеид(а) содержащих циркулирующих иммунных комплексов как маркеров ишемической болезни сердца. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2016; 162(8):195–202).
18. Kamyschnikov VS. MEDpress-inform, 2009. P. 823–824. Russian (Камышников ВС. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. М.: МЕДпресс-информ, 2009. С. 823–824).
19. 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; 52(10):1829–36. doi: 10.1194/jlr.M015776. Epub 2011 Aug 5.
20. Mayr M, Kiechl S, Tsimikas S, Miller E, Sheldon J, Willeit J, Witztum JL, Xu Q. Oxidized low-density lipoprotein autoantibodies, chronic infections, and carotid atherosclerosis in a population-based study. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 47(12):2436–43. doi: 10.1016/j.jacc.2006.03.024 Epub 2006 May 30.
21. Gerber P, Nikolic D, Rizzo M. Small, dense LDL: an update. *Curr Opin Cardiol.* 2017; 32(4):454–459. doi: 10.1097/HCO.0000000000000410.
22. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol.* 2014;23(1):37–45. doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002.
23. Tani M, Kawakami A, Mizuno Y, Imase R, Ito Y, Kondo K, Isbii H, Yoshida M. Small dense LDL enhances THP-1 macrophage foam cell formation. *J Atheroscler Thromb.* 2011; 18(8):698–704.
24. Afanasieva OI, Utkina EA, Artemieva NV, Ezhov MV, Adamova IY, Pokrovsky SN. Elevated Lipoprotein(a) Concentration and Presence of Subfractions of Small Dense Low Density Lipoproteins as Independent Factors of Risk of Ischemic Heart Disease. *Kardiologia.* 2016 Jun;56(6):5–11. Russian (Афанасьева ОИ, Уткина ЕА, Артемьева НВ, Ежов МВ, Адамова ИЮ, Покровский СН. Повышенная концентрация липопротеида(а) и наличие мелких плотных подфракций атерогенных липопротеидов как независимые факторы риска ИБС. *Кардиология,* 2016, 56:5–12).
25. Krychtiuk K, Kastl S, Pfaffenberger S, Lenz M, Hofbauer S, Wonnerth A, Koller L, Katsaros K, Pongratz T, Gollasch G, Niessner A, Gaspar L, Huber K, Maurer G, Dostal E, Wojta J, Oravec S, Speidl WS. Association of small dense LDL serum levels and circulating monocyte subsets in stable coronary artery disease. *PLoS One.* 2015; 10(4):e0123367. doi: 10.1371/journal.pone.0123367. eCollection 2015.