ИММУННЫЙ ОТВЕТ НА ЛИПОПРОТЕИНЫ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ГИПОХЛОРИТОМ: СВЯЗЬ С АТЕРОСКЛЕРОЗОМ

Иванова А. А. [1],
Протасова А. А. [1],
Денисенко А. Д. [1]

[1] Федеральное Государственное Бюджетное Научное Учреждение «Институт экспериментальной медицины», отдела молекулярной биологии, генетики и фундаментальной медицины.

IMMUNE RESPONSE TO HYPOCHLORITE-MODIFIED LOW-DENSITY LIPOPROTEINS: ASSOCIATION WITH ATHEROSCLEROSIS

Ivanova A. A. [a],
Protasova A. A. [a],
Denisenko A. D. [a]

[a] Federal State Budgetary Scientific Institution ‘Institute of Experimental Medicine’, Department of molecular biology, genetics and fundamental medicine.

ISSN 1028-7221 (Print)
ISSN 2782-7291 (Online)

Резюме

В крови человека обнаружены антитела к различным модификациям липопротеинов низкой плотности. Особый интерес представляет наименее изученная модификация липопротеинов низкой плотности гипохлоритом, являющимся продуктом деятельности миелопероксидазы, и её антигенные свойства. Целью настоящего исследования было подтвердить специфичность антител к липопротеинам низкой плотности, модифицированным гипохлоритом и изучить их возможную роль в атерогенезе, включая связь с ишемической болезнью сердца и влияние на накопление холестерина макрофагами. Для оценки иммуногенности гипохлорит-липопротеинов низкой плотности, кроликов иммунизировали аутологичными липопротеинами низкой плотности, модифицированными гипохлоритом натрия *in vitro*. Методом твердофазного иммуноферментного анализа оценивали уровень антител, в качестве антигенов использовались человеческие липопротеины низкой плотности и кроличьи липопротеины низкой плотности, модифицированные гипохлоритом *in vitro*. Специфичность антител проверяли методом конкурентного иммуноферментного анализа. Захват липопротеинов низкой плотности, нативных или гипохлорит-модифицированных, оценивали по накоплению холестерина и его эфиров в макрофагах, дифференцированных из мононуклеаров периферической крови. Иммунизация кроликов аутологичными гипохлорит- липопротеинами низкой плотности приводит к появлению специфичных антител. Полученные результаты подтверждают, что модификация липопротеинов низкой плотности гипохлоритом, приводит к формированию на этих частицах специфических антигенных детерминант, отличных от образующихся при других изучаемых модификациях липопротеинов. У большинства пациентов в сыворотке крови были обнаружены антитела классов IgG к гипохлорит-липопротеинам низкой плотности. При этом содержание антител к лиопротеинам низкой плотности, модифицированным гипохлоритом у пациентов с ишемической болезнью сердца было существенно ниже, чем у пациентов с доклиническим атеросклерозом и здоровых лиц. Инкубация макрофагов, дифференцированных из мононуклеаров периферической крови, с гипохлорит-липопротеинами низкой плотности в присутствии специфичных антител приводила к снижению накопления эфиров холестерина этими клетками. Полученные данные свидетельствуют о потенциальной способности антител к гипохлорит модифицированным липопротеинам низкой плотности снижать атерогенные эффекты модифицированных липопротеинов, что может открывать перспективы для разработки новых подходов к лечению атеросклероза.

Ключевые слова: воспаление, атеросклероз, модифицированные липопротеины низкой плотности, антитела к модифицированным липопротеинам низкой плотности, гипохлорированные липопротеины низкой плотности, миелопероксидаза.

Abstract

Antibodies to various modifications of low-density lipoproteins have been detected in human blood. Of particular interest is the least studied modification of low-density lipoproteins with hypochlorite, which is a product of myeloperoxidase activity, and its antigenic properties. The aim of this study was to confirm the specificity of antibodies to hypochlorite-low-density lipoproteins and to study their possible role in atherogenesis, including the relationship with coronary artery disease and the effect on cholesterol accumulation by macrophages. To assess the immunogenicity of hypochlorite-low-density lipoproteins, rabbits were immunized with autologous low-density lipoproteins modified with sodium hypochlorite *in vitro*. The level of antibodies was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay, using human low-density lipoproteins and rabbit low-density lipoproteins, modified with hypochlorite *in vitro* as antigens. The specificity of antibodies was tested by competitive enzyme-linked immunosorbent assay. The uptake of native or hypochlorite-modified low-density lipoproteins was assessed by the accumulation of cholesterol and its esters in macrophages differentiated from peripheral blood mononuclear cells. Immunization of rabbits with autologous hypochlorite-low-density lipoproteins leads to the appearance of specific antibodies. The results confirm that the modification of low-density lipoproteins with hypochlorite leads to the formation of specific antigenic determinants on these particles, different from those formed with other studied modifications of low-density lipoproteins. In the blood serum of most patients, IgG antibodies to hypochlorite- low-density lipoproteins were detected. At the same time, the content of antibodies to hypochlorite-low-density lipoproteins in patients with coronary artery disease was significantly lower than in patients with preclinical atherosclerosis and healthy individuals. Incubation of macrophages differentiated from peripheral blood mononuclear cells with hypochlorite- low-density lipoproteins in the presence of specific antibodies led to a decrease in the accumulation of cholesterol esters by these cells. The obtained data indicate the potential ability of antibodies to hypochlorite-low-density lipoproteins to reduce the atherogenic effects of modified low-density lipoproteins, which may open up prospects for the development of new approaches to the treatment of atherosclerosis.

Keywords: inflammation, atherosclerosis, modified low-density lipoproteins, antibodies to modified low-density lipoproteins, hypochlorinated low-density lipoproteins, myeloperoxidase .

1 Введение

Накопление в интиме артерий липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) с последующей их модификацией является ключевым событием патогенеза атеросклероза. Модификация ЛПНП может происходить и в других тканях организма, в том числе и в крови. К настоящему времени описано несколько типов модификаций ЛПНП – перекисное окисление гликирование, гомоцистеинирование, ацетилирование и т.д. [5]. Наиболее изученной является модификация малоновым диальдегидом (МДА) [6], образующимся при перекисном окислении липидов. Модификация ЛПНП приводит к появлению антигенности этих частиц, то есть к выработке антител (АТ) к модифицированным ЛПНП и к формированию иммунных комплексов ЛПНП-антитело. Такие комплексы обнаруживаются как в атеросклеротических поражениях артерий, так и в крови обследованных пациентов [2, 10]. Тем не менее, поиск новых модификаций ЛПНП, и выяснение их роли в атерогенезе остается актуальной задачей.

Одна из таких модификаций – ЛПНП, модифицированные хлорноватистой кислотой (гипохлорит-ЛПНП) - образуется под действием миелопероксидазы (МПО) [11]. МПО – фермент врождённого иммунитета, была найдена в атеросклеротических бляшках [8]. Показано, что активность этого фермента в крови увеличивается при многих воспалительных заболеваниях, в том числе и при клинических проявлениях атеросклероза [13].

Модификация ЛПНП, так же, как и других белков, происходит основным продуктом реакции, катализируемой МПО, – хлорноватистой кислотой (HOCl). Хлорноватистая кислота или ее соли реагируют с ε-аминогруппами лизина, что приводит к образованию N-хлораминов. Небольшая часть этих хлораминов распадается до альдегидов, что может способствовать сшиванию и агрегации ЛПНП, таким образом появляются структуры похожие на продукт модификации ЛПНП малоновым диальдегидом (МДА-ЛПНП) [9]. Хлорамины также могут расщепляться с образованием алкоксильных радикалов [12], что приводит к появлению принципиально новых соединений. HOCl может взаимодействовать и с аминокислотными остатками цистеина и метионина [9].

Ранее нами было показано наличие АТ к гипохлорит-ЛПНП в плазме крови здоровых лиц и пациентов с атеросклерозом, причем уровень таких АТ был примерно в 3 раза ниже, чем АТ к МДА-ЛПНП [7]. Кроме того, нами было обнаружено, что АТ к этим двум типам модифицированных ЛПНП частично конкурируют друг с другом за связывание с соответствующими антигенами [1].

Поэтому целью настоящего исследования было подтвердить специфичность АТ к гипохлорит-ЛПНП и изучить их возможную роль в атерогенезе, включая связь с ишемической болезнью сердца (ИБС) и влияние на накопление холестерина макрофагами.

2 Материалы и методы

Пациенты. В настоящей работе было обследовано 253 человека в

возрасте от 27 до 67 лет, в том числе 59 практически здоровых лиц, 25 пациентов с доклиническим атеросклерозом (наличие атеросклеротических бляшек в сонной и бедренной артериях установлено с помощью УЗИ) и 169 пациентов с ИБС (наличие атеросклеротических бляшек в коронарных артериях по данным коронарографии). У всех лиц были определены концентрации общего холестерина (ХС), ХС-ЛПНП, ХС-липопротеинов высокой плотности, триглицеридов (информация представлена в [3]), а также содержание АТ к гипохлорит-ЛПНП.

Выделение ЛПНП из плазмы крови человека и кролика. ЛПНП были выделены из плазмы крови здоровых доноров с помощью ультрацентрифугирования в диапазоне плотности d=1,023-1,055 г/мл или из сыворотки крови кроликов d=1,023-1,063 г/мл с использованием NaBr. Содержание белка ЛПНП определяли по методу Лоури-Фолина в модификации Марквелла.

Иммунизация кролика. Кролика иммунизировали аутологичными гипохлорит-модифицированными ЛПНП (1 мг белка ЛПНП в 1 мл физраствора на иньекцию) с использованием адъюванта Фрейнда (1:1) внутрибрюшинно четыре раза с интервалом в 7 дней. Через 8 дней после заключительной иммунизации у животных брали кровь для получения сыворотки и определения в ней АТ. Наличие и специфичность АТ определяли с помощью иммуноферментного анализа.

Модификация ЛПНП химическими реагентами. Для получения гипохлорит-модифицированных белков использовали 0,2М раствор гипохлорита натрия (20 мкл на 1 мг белка). МДА-модификацию ЛПНП проводили свежеприготовленным раствором 0,5М МДА (6,6 мкл на 1 мг белка). Ацетилированные ЛПНП (ацет-ЛПНП) получали добавлением уксусного ангидрида из расчёта 3 мкл реагента на 1 мг белка. Уксусный ангидрид добавляли к растворам порционно с промежутками во времени при перемешивании. Контролировали pH реакционной среды, поддерживая его значения в пределах нейтрального, с помощью 1 М раствора гидроксида натрия**.** Во всех перечисленных случаях смеси инкубировали 2 часа при комнатной температуре, затем диализировали против фосфатного солевого буфера (ФСБ) при 4°С в течение 24 часов. Степень модификации оценивали по убыли поверхностных аминогрупп, определяемых с помощью тринитробензолсульфоновой кислоты.

Иммуноферментный анализ. Содержание АТ к модифицированным ЛПНП определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), как было описано ранее [1]. В качестве антигенов использовали ЛПНП кролика и человека, нативные, модифицированные МДА, гипохлоритом, уксусным ангидридом. Для определения уровня АТ к гипохлорит-ЛПНП использовали моноклональные АТ против IgG и IgM человека («Полигност») и козьи АТ против IgG кролика («Abcam»), меченые пероксидазой хрена в разведении согласно рекомендациям производителя. В качестве хромогенного субстрата пероксидазы использовали тетраметилбензидин («Хема», Россия).

О содержании АТ судили по разности оптических плотностей между модифицированными и нативными ЛПНП.

Конкурентный ИФА. *Конкуренция между АТ человека и кролика к модифицированным ЛПНП.* В качестве антигенов использовали нативные и гипохлорит-ЛПНП человека и кролика. Нанесение и инкубацию антигена, стадии промывки и блокировку осуществляли как описано ранее [1]. После отмывки от блокирующего буфера наносили кроличью антисыворотку в различных разведениях (от 1:5 до 1:1000) и выдерживали 1 час при 37°С. Далее планшет промывали и эти же лунки заполняли человеческой сывороткой, разведенной в 50 раз. После инкубации в течение одного часа при 37°С, планшет отмывали и добавляли антитела против IgG человека, меченые пероксидазой хрена. Последующие стадии проводили в соответствии с изложенным выше.

Конкуренция между антигенами. На планшет наносили антигены: нативные, модифицированные МДА, ацетилированные, гипохлорированные ЛПНП в концентрации 10 мкг/мл в ФСБ. Сыворотку кролика, разведенную в 50 раз преинкубировали с анализируемыми антигенами, добавленными в различных концентрациях (0,5 – 500 мкг/мл), в течение 1 часа при комнатной температуре. Последующие стадии проводили в соответствии с изложенным ранее [1].

Выделение антител человека к модифицированным липопротеинам низкой плотности (аффинная хроматография). Выделение АТ к гипохлорит-ЛПНП класса IgG из пула сывороток крови человека проводили, как было описано ранее [1]. Специфичность антител проверялась с помощью ИФА.

Выделение моноцитов из донорской крови и культивирование макрофагов. Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделялись из цельной крови здорового донора центрифугированием с использованием раствора фиколла плотностью 1,077 г/мл. Кровь наслаивали поверх раствора фиколла (7:3) и центрифугировали в течение 30 мин при 400g 18°С. Кольцо мононуклеаров отбирали в отдельные пробирки и отмывали стерильным раствором Хенкса с последующим центрифугированием при 300g 7 минут. После удаления супернатанта МКПК ресуспензировали в культуральной среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки, L-глутамин и гентамицин. Клетки высевали на 24-х луночные планшеты и культивировали в CO_2 - инкубаторе (5% CO_2, 37°С). После двухчасовой инкубации и адгезии моноцитов происходила смена среды с добавлением 10 нг/мл макрофагального колониестимулирующего фактора. На 3-е сутки осуществлялась смена питательной среды. На 5-е сутки проводилась смена среды на среду с 2% сывороткой без липопротеинов и вносились различные агенты, в соответствии с планом эксперимента.

Определение внутриклеточного содержания холестерина и его эфиров. Клетки промывали охлаждённым ФСБ, заливали лизирующим буфером (0,1 М KH_2PO_4, 50 мМ NaCl, 5 мМ холевая кислота, 0,1% NP-40) и

инкубировали 30 минут на качалке при +4°С. Для определения содержания общего ХС готовили смесь, содержащую 40 μM Amplex Red©, 2 U/мл пероксидазы хрена, 0,04 U/мл холестериноксидазы, 0,2 U/мл холестеринэстеразы. Для определения содержания свободного ХС готовили аналогичную смесь без добавления холестеринэстеразы. Флуоресценцию оценивали при 535/587 нм. Содержание эфиров ХС определялось, как разница общего и свободного ХС. Концентрацию белка в клеточных лизатах определяли с помощью бицинхонинового реактива.

Информация и соблюдение этических норм при проведении исследования. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей и животных, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (протокол № 3/17 от 30.11.2017).

Методы статистической обработки. Математическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ статистического анализа данных Statistica. Для сравнения данных, имеющих непараметрическое распределение, применяли критерии Краскела-Уоллиса. В случае анализа нормально распределенных данных применяли дисперсионный анализ с апостериорным критерием Тьюки.

3 Результаты

Иммуногенность гипохлорит-ЛПНП

Для оценки иммуногенности гипохлорит-ЛПНП кроликов иммунизировали аутологичными ЛПНП, модифицированными гипохлоритом натрия *in vitro*. В результате были получены сыворотки, содержащие АТ класса IgG, реагирующие с гипохлорит-ЛПНП кролика. Важно отметить, что кроличьи АТ к гипохлорит-ЛПНП распознают не только кроличьи гипохлорит-ЛПНП, но и таким же образом модифицированные человеческие ЛПНП, но не взаимодействовали с нативными ЛПНП (рис.1).

Рисунок 1. Взаимодействие сыворотки кроликов, иммунизированных аутологичными гипохлорит-ЛПНП с нативными ЛПНП и гипохлорит-ЛПНП кролика и человека.

Figure 1. Interaction of serum of rabbits immunized with autologous hypochlorite-LDL with native LDL and hypochlorite-LDL of rabbit and human.

Кроме того, была изучена конкуренция кроличьих АТ класса IgG за связывание с гипохлорит-ЛПНП кролика и человека. Для проведения анализа использовалась следующая схема: на планшет сорбировались гипохлорит-ЛПНП кролика или человека, затем наносилась сыворотка кролика в различных разведениях, далее - сыворотка человека в одном разведении. Как показано на рисунке 2, с увеличением разведения сыворотки кролика (т.е. с уменьшением концентрации АТ) возрастает связывание АТ человека с гипохлорит-ЛПНП как кролика, так и человека. Это показывает, что кроличьи и человеческие антитела направлены к одному и тому же типу

модифицированных ЛПНП и распознают одинаковые эпитопы, как на гипохлорит-ЛПНП человека, так и кролика.

Рисунок 2. Конкуренция между АТ кролика и человека к гипохлорит-ЛПНП за связывание с гипохлорит-ЛПНП кролика или человека

Figure 2. Competition between rabbit and human antibodies to hypochlorite-LDL for binding to rabbit or human hypochlorite-LDL

Необходимо было также проверить, насколько специфически распознают АТ к гипохлорит-ЛПНП кролика соответствующие модификации и нет ли перекрестного связывания указанных АТ с другими типами модификации ЛПНП, в особенности МДА-ЛПНП. С этой целью был проведён конкурентный ИФА, в качестве конкурентов использовались человеческие ЛПНП - нативные, гипохлорит-ЛПНП, МДА-ЛПНП и ацет-ЛПНП (рис.3).

Рисунок 3. Связывание кроличьих АТ с гипохлорит-ЛПНП человека в присутствии возрастающих концентраций конкурентов: гипохлорит-ЛПНП, МДА-ЛПНП, ацет-ЛПНП, нативных ЛПНП

Figure 3. Binding of rabbit antibodies to human hypochlorite-LDL in the presence of increasing concentrations of competitors: hypochlorite-LDL, MDA-LDL, acetyl-LDL, native LDL

Оказалось, что взаимодействие кроличьих АТ класса IgG с гипохлорит-ЛПНП человека, почти полностью ингибировалось самими гипохлорит-ЛПНП, но не нативными или ацет-ЛПНП. В то же время, МДА-ЛПНП также конкурировали с гипохлорит-ЛПНП за связывание с кроличьими АТ, хотя и в значительно меньшей степени, чем сами гипохлорит-ЛПНП (рисунок 3).

Взаимосвязь уровня АТ к гипохлорит-ЛПНП в крови пациентов с клиническими проявлениями атеросклероза

При исследовании сывороток, полученных от 253 человек, были обнаружены АТ, связывающиеся с гипохлорит-ЛПНП. Содержание АТ в сыворотках оценивали в относительных единицах, представляющих собой разность оптических плотностей, отражающих связывание иммуноглобулинов с модифицированными или нативными ЛПНП. Полученные данные представлены в табл.1.

Таблица 1. Содержание антител к гипохлорит-ЛПНП в сыворотках крови человека.

Table 1. Content of antibodies to hypochlorite-LDL in human blood serum.

Как видно из таблицы 1, в сыворотках крови человека были обнаружены АТ к гипохлорит-ЛПНП, представленные, преимущественно, иммуноглобулинами класса G.

Далее все обследованные пациенты были разделены на три группы: здоровые люди (n=59), пациенты с доклиническим атеросклерозом (n=25) и пациенты с ИБС (n=169). Методом ИФА оценивали уровни антител IgG к гипохлорит-ЛПНП в сыворотках пациентов. Оказалось, что у пациентов с ИБС содержание АТ класса IgG к гипохлорит-ЛПНП было достоверно снижено по сравнению со здоровыми пациентами и пациентами с доклиническим атеросклерозом (рис.4). Причем у пациентов с ИБС, перенесших инфаркт

миокарда, содержание АТ класса IgG к гипохлорит-ЛПНП не отличалось от такового у пациентов без инфаркта миокарда в анамнезе (данные не представлены).

Рисунок 4. Содержание АТ класса IgG к гипохлорит-ЛПНП. Данные представлены: медиана и межквартильные размахи (25% и 75%), * достоверное отличие от группы пациентов с ИБС, p<0,001; (критерий Краскела-Уоллиса)

Figure 4. Content of IgG antibodies to hypochlorite-LDL. Data presented: median and interquartile ranges (25% and 75%), * significant difference from the group of patients with coronary heart disease, p<0.001; (Kruskal-Wallis test)

Влияние специфических АТ на захват гипохлорит-ЛПНП макрофагами

Макрофаги, дифференцированные из мононуклеаров периферической крови человека, были проинкубированы в течение суток с гипохлорит-ЛПНП, нативными ЛПНП и комплексами гипохлорит-ЛПНП с выделенными с помощью аффинной хроматографии АТ человека против гипохлорит-ЛПНП.

Накопление как свободного ХС, так и особенно эфиров ХС в макрофагах после инкубации с гипохлорит-ЛПНП было существенно больше, чем после инкубации с нативными ЛПНП. При этом добавление специфических АТ совместно с гипохлорит-ЛПНП приводило к снижению накопления эфиров ХС практически в 2 раза (рис.5), тогда как добавление неспецифического IgG не влияло на захват гипохлорит-ЛПНП макрофагами. АТ к гипохлорит-ЛПНП не влияли на захват макрофагами нативных ЛПНП. Ранее схожие данные были получены нами в отношении МДА-ЛПНП и специфических АТ к ним [3].

Рисунок 5. Относительное содержание свободного ХС (А) и его эфиров (Б) в макрофагах, инкубированных в присутствии различных агентов *p<0,02; #p<0,005; &p=0,036 (дисперсионный анализ с апостериорным критерием Тьюки), данные представлены: среднее и ошибка среднего

Figure 5. Relative content of free cholesterol (A) and its esters (B) in macrophages incubated in the presence of various agents *p<0.02; #p<0.005; &p=0.036 (analysis of variance with Tukey's post hoc test), data are presented: mean and error of the mean.

4 Обсуждение

Иммунизация кроликов аутологичными ЛПНП, модифицированными гипохлоритом приводила к продукции АТ, специфично связывающихся с гипохлорит-ЛПНП как кролика, так и человека. Кроличьи АТ специфично взаимодействовали только со своим антигеном (гипохлорит-ЛПНП), ни нативные, ни ацет-ЛПНП не конкурировали за связывание АТ с гипохлорит-ЛПНП. Вместе с тем, МДА-ЛПНП также связывались с изучаемыми АТ, что подтверждает ранее полученные нами данные [1]. Это свидетельствует о том, что при этих двух типах модификации ЛПНП (гипохлоритом и МДА) образуются схожие эпитопы, как и предполагалось ранее [14]. При этом, большая часть АТ все же распознает отличающиеся эпитопы, образующиеся при модификации ЛПНП гипохлоритом.

Как было показано в настоящей работе, содержание циркулирующих АТ класса IgG к гипохлорит-ЛПНП значительно уменьшалось у пациентов с ИБС. Нельзя исключить, что активация воспалительных реакций в атеросклеротических поражениях, сопровождающихся выделением МПО и образованием большого количества гипохлорит-ЛПНП, связывающих антитела и приводит к элиминации АТ в составе комплексов. Как было показано ранее, у таких пациентов увеличивается содержание в крови ХС-содержащих циркулирующих иммунных комплексов пациентов с ИБС [7, 3]. Таким образом, снижение содержания АТ к гипохлорит-ЛПНП, найденное в крови у пациентов с ИБС, может объясняться истощением пула циркулирующих антилипопротеиновых АТ класса IgG в связи с увеличением количества антигена.

Несмотря на то, что было проведено достаточно большое количество исследований, посвященных изучению циркулирующих АТ к модифицированным ЛПНП, в том числе связанных с клиническими проявлениями атеросклероза, до настоящего времени нет сведений о патогенетической роли таких АТ в атерогенезе. Более того, нет даже единого мнения, о том является ли иммунный ответ на модифицированные ЛПНП про- или антиатерогенным событием. При этом имеются сведения о том, что иммунизация животных (мышей, кроликов) модифицированными ЛПНП снижает выраженность экспериментального атеросклероза у этих животных [4]. С этими работами согласуются сведения о том, что пассивная иммунизация (введение мышам моноклональных АТ класса IgM против гипохлорит-ЛПНП) приводила к уменьшению количества атеросклеротических бляшек у этих животных [15].

Однако механизмы защитного действия антилипопротеиновых АТ остаются невыясненным. В настоящей работе мы предприняли попытку выяснить, как специфические АТ влияют на захват гипохлорит-ЛПНП макрофагами. Известно, что модифицированные ЛПНП захватываются макрофагами с помощью нескольких типов скевенджер-рецепторов. Общим свойством этих рецепторов является отсутствие регуляции их активности внутриклеточным содержанием ХС. В то же время иммунные комплексы могут захватываться клетками при помощи Fc-рецепторов. Оказалось, что специфические АТ действительно тормозили захват гипохлорит-ЛПНП макрофагами, что проявлялось в уменьшении накопления ХС в этих клетках примерно в 2 раза. Это может замедлять трансформацию макрофагов в пенистые клетки и препятствовать развитию атеросклеротического поражения. Ранее нами было показано, что такой же эффект на захват МДА-ЛПНП макрофагами оказывали специфичные к ним АТ [3]. Вполне возможно, что этот феномен может являться одним из механизмов антиатерогенного действия АТ к модифицированным липопротеинам.

5 Заключение

Полученные результаты подтверждают, что модификация ЛПНП гипохлоритом, приводит к формированию на этих частицах специфических

антигенных детерминант, отличных от образующихся при других изучаемых модификациях ЛПНП. Иммунизация кроликов аутологичными гипохлорит-ЛПНП приводит к появлению специфичных АТ, некоторая часть которых взаимодействовала с МДА-ЛПНП.

АТ к гипохлорит-ЛПНП могут играть защитную роль в атерогенезе. У пациентов с ИБС наблюдалось снижение уровня циркулирующих АТ класса IgG к гипохлорит-ЛПНП, что может быть связано с истощением пула антител вследствие увеличенного образования антигена в атеросклеротических поражениях. Эксперименты по изучению влияния специфичных АТ на захват гипохлорит-ЛПНП макрофагами показали, что АТ значительно уменьшали поглощение модифицированных ЛПНП клетками и снижали накопление эфиров холестерина, что препятствует образованию пенистых клеток. Это указывает на потенциальную способность АТ к гипохлорит-ЛПНП снижать атерогенные эффекты модифицированных ЛПНП, что может открывать перспективы для разработки новых подходов к лечению атеросклероза.

Благодарности

Авторы выражают свою благодарность д.б.н., заведующему лабораторией разработки молекулярных диагностических систем отдела молекулярной биологии вирусов ФГБНУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Соколову А.В. за предоставленные реактивы и конструктивные дискуссии; старшему научному сотруднику отдела молекулярной биологии, генетики и фундаментальной медицины ФГБНУ «ИЭМ» к.б.н. Орлову С.В. за консультации и обсуждение результатов.

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Содержание антител к гипохлорит-ЛПНП в сыворотках крови человека.
Table 1. Content of antibodies to hypochlorite-LDL in human blood serum.

Класс иммуноглобулинов Immunoglobulin Classes	Содержание антител (относительные единицы) Antibody content (relative units)		
	Медиана Median	Квартиль 25% Quartile 25%	Квартиль 75% Quartile 75%
IgG	0,28	0,17	0,42
IgM	0,04	0	0,11

ISSN 1028-7221 (Print)
ISSN 2782-7291 (Online)

РИСУНКИ

Рисунок 1. Взаимодействие сыворотки кроликов, иммунизированных аутологичными гипохлорит-ЛПНП с нативными ЛПНП и гипохлорит-ЛПНП кролика и человека.

Figure 1. Interaction of serum of rabbits immunized with autologous hypochlorite-LDL with native LDL and hypochlorite-LDL of rabbit and human.

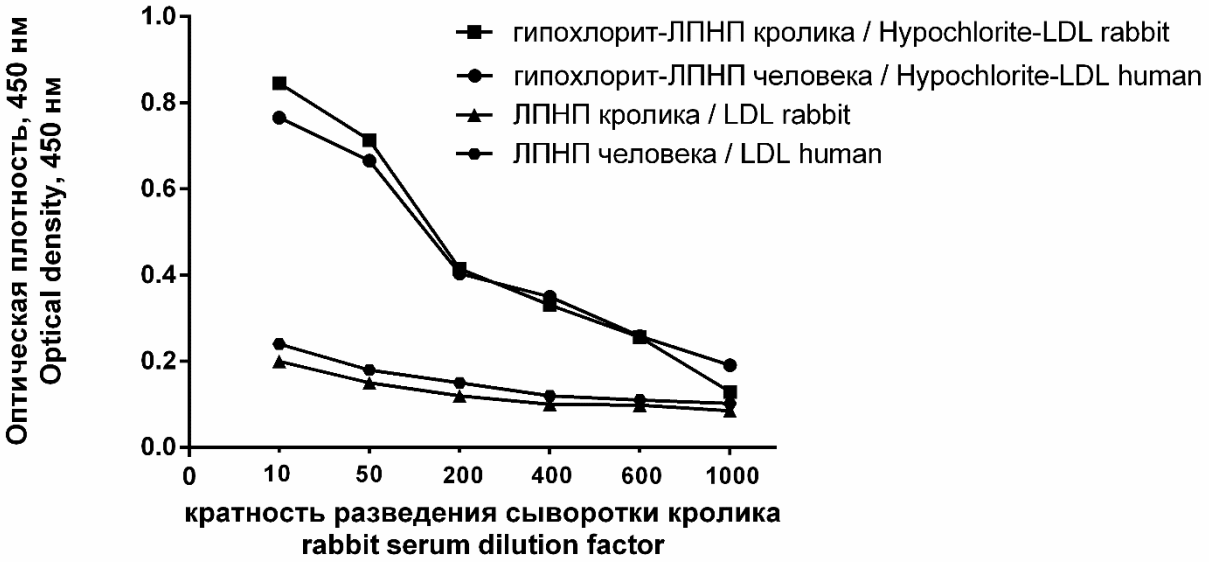
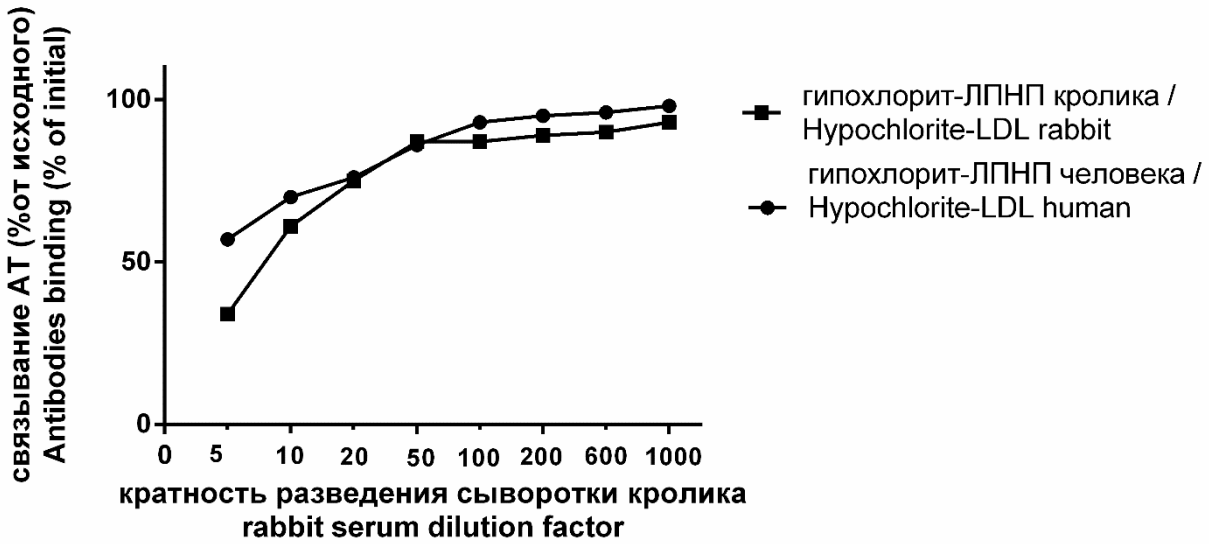


Рисунок 2. Конкуренция между АТ кролика и человека к гипохлорит-ЛПНП за связывание с гипохлорит-ЛПНП кролика или человека.

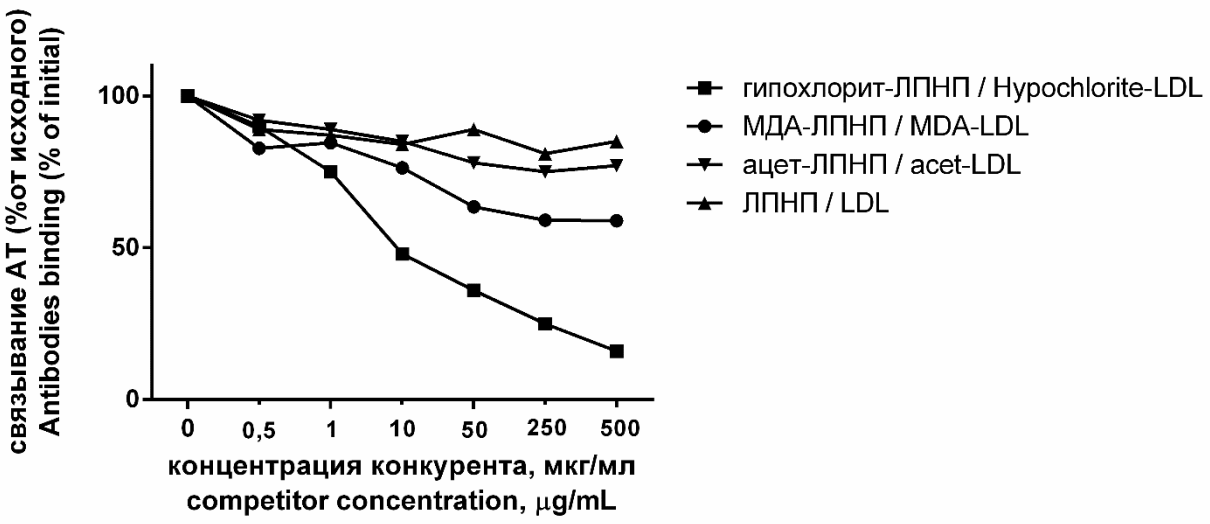
Figure 2. Competition between rabbit and human antibodies to hypochlorite-LDL for binding to rabbit or human hypochlorite-LDL.



ISSN 1028-7221 (Print)
ISSN 2782-7291 (Online)

Рисунок 3. Связывание кроличьих АТ с гипохлорит-ЛПНП человека в присутствии возрастающих концентраций конкурентов: гипохлорит-ЛПНП, МДА-ЛПНП, ацет-ЛПНП, нативных ЛПНП.

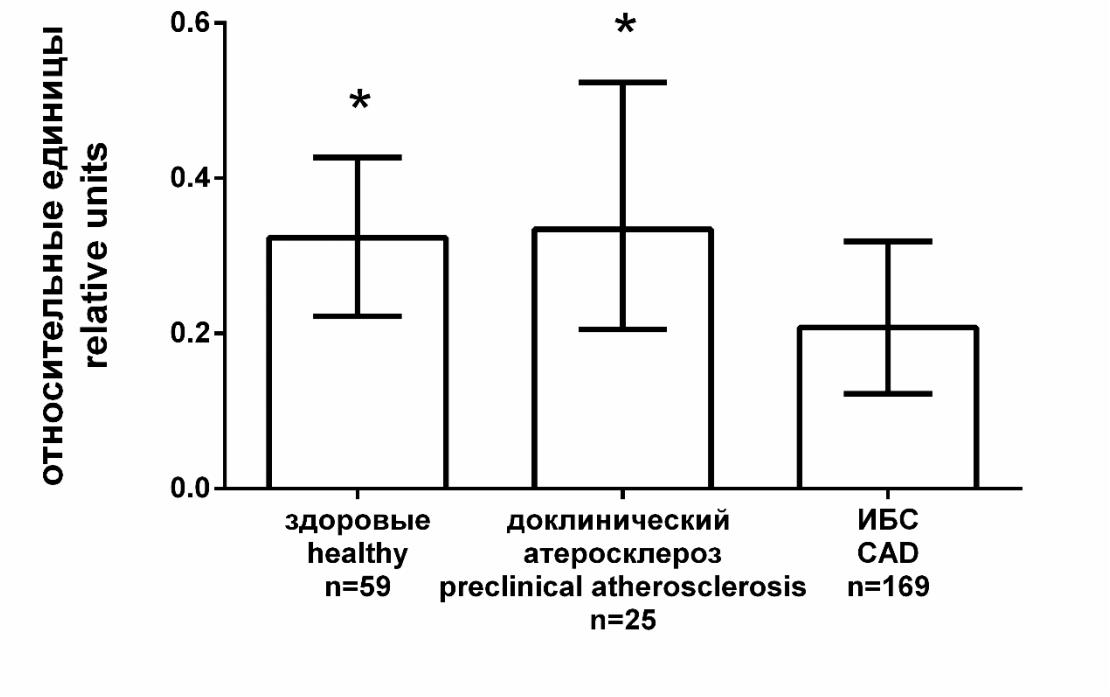
Figure 3. Binding of rabbit antibodies to human hypochlorite-LDL in the presence of increasing concentrations of competitors: hypochlorite-LDL, MDA-LDL, acetyl-LDL, native LDL.



ISSN 1028-7221 (Print)
ISSN 2782-7291 (Online)

Рисунок 4. Содержание АТ класса IgG к гипохлорит-ЛПНП. Данные представлены: медиана и межквартильные размахи (25% и 75%), * достоверное отличие от группы пациентов с ИБС, p<0,001; (критерий Краскела-Уоллиса).

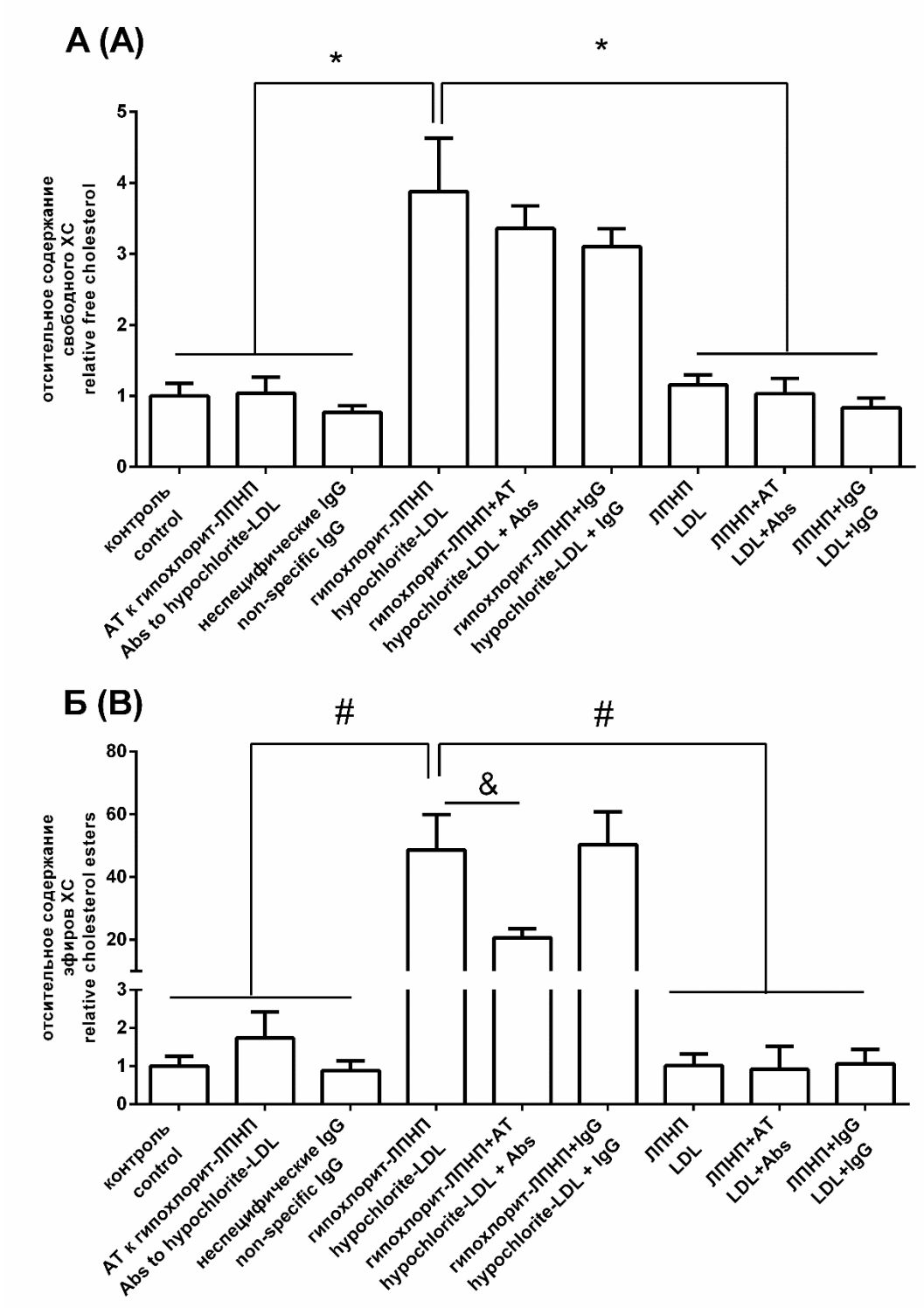
Figure 4. Content of IgG antibodies to hypochlorite-LDL. Data presented: median and interquartile ranges (25% and 75%), * significant difference from the group of patients with coronary heart disease, p<0.001; (Kruskal-Wallis test).



ISSN 1028-7221 (Print)
ISSN 2782-7291 (Online)

Рисунок 5. Относительное содержание свободного ХС (А) и его эфиров (Б) в макрофагах, инкубированных в присутствии различных агентов *p<0,02; #p<0,005; &p=0,036 (дисперсионный анализ с апостериорным критерием Тьюки), данные представлены: среднее и ошибка среднего.

Figure 5. Relative content of free cholesterol (A) and its esters (B) in macrophages incubated in the presence of various agents *p<0.02; #p<0.005; &p=0.036 (analysis of variance with Tukey's post hoc test), data are presented: mean and error of the mean.



ISSN 1028-7221 (Print)
ISSN 2782-7291 (Online)

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДАННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку
Иванова Анна Андреевна, научный сотрудник;
адрес: 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12;
телефон: (812) 234-93-41;
e-mail: anna.ivantcova@gmail.com
Ivanova Anna Andreevna, research assistant;
address: 197022, Saint-Petersburg, 12, Acad. Pavlov Street;
telephone: (812) 234-93-41;
e-mail: anna.ivantcova@gmail.com

Блок 2. Информация об авторах
Протасова Александра Андреевна, младший научный сотрудник;
Protasova Alexandra Andreevna, junior research assistant;

Денисенко Александр Дорофеевич, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией молекулярно-клеточных механизмов атерогенеза отдела молекулярной биологии, генетики и фундаментальной медицины;
Denisenko Alexandr Dorofeevich, Doctor of Medicine Science, professor, Head of the Laboratory of Molecular and Cellular Mechanisms of Atherogenesis.

ISSN 1028-7221 (Print)
ISSN 2782-7291 (Online)

Блок 3. Метаданные статьи

ИММУННЫЙ ОТВЕТ НА ЛИПОПРОТЕИНЫ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ГИПОХЛОРИТОМ: СВЯЗЬ С АТЕРОСКЛЕРОЗОМ

IMMUNE RESPONSE TO HYPOCHLORITE-MODIFIED LOW-DENSITY LIPOPROTEINS: ASSOCIATION WITH ATHEROSCLEROSIS

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

РОЛЬ АНТИТЕЛ К ГИПОХЛОРИТ-ЛПНП

THE ROLE OF ANTIBODIES TO HYPOCHLORITE-LDL

Ключевые слова: воспаление, атеросклероз, модифицированные липопротеины низкой плотности, антитела к модифицированным липопротеинам низкой плотности, гипохлорированные липопротеины низкой плотности, миелопероксидаза.

Keywords: inflammation, atherosclerosis, modified low-density lipoproteins, antibodies to modified low-density lipoproteins, hypochlorinated low-density lipoproteins, myeloperoxidase.

Оригинальные статьи.

Количество страниц текста – 8,

Количество таблиц – 1,

Количество рисунков – 5.

16.09.2025

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1	Григорьева К.Н., Дмитриева А.А., Иванова А.А., Денисенко А.Д. Выделение антител к гипохлорит-модифицированным липопротеинам низкой плотности из сыворотки крови человека и изучение их специфичности // Медицинский академический журнал. — 2024. — Т. 24, № 2. — С. 61-68.	Grigoryeva K.N., Dmitrieva A.A., Ivanova A.A., Denisenko A.D. Isolation of antibodies to hypochlorite-modified low-density lipoproteins from human serum and study of their specificity. Medical Academic Journal., 2024, Vol.24, no.2, pp.61-68 (In Russ.)	[doi: 10.17816/MAJ630075]
2	Денисенко А. Д. Аутоиммунные комплексы липопротеин-антитело и их роль в атерогенезе // Медицинский академический журнал. – 2007. – Т. 7, № 1. – С. 38-44.	Denisenko A.D. Autoimmune lipoprotein-antibody complexes and their role in atherogenesis. Meditsinskij Akademitsjeskij Journal, 2007, Vol.7, no.1, pp.38-44. (In Russ.)	https://elibrary.ru/item.asp?id=9489960
3	Иванова А.А., Дмитриева А.А., Денисенко А.Д. Антитела к липопротеинам низкой плотности, модифицированным малоновым диальдегидом: содержание в крови и роль в атерогенезе // Медицинская иммунология. — 2025. — Т. 27, № 1. — С. 131-142	Ivanova A.A., Dmitrieva A.A., Denisenko A.D. Antibodies to low-density lipoproteins modified by malonic dialdehyde: contents in blood and role in atherogenesis. Med immunol (Russia). 2025, Vol.27, no.1, pp.131-142 (In Russ.)	https://doi.org/10.15789/1563-0625-ATL-2955
4	Кетлинский С.А., Денисенко А.Д., Пигаревский П.В., Синева С.А.,	Ketlinskiy C.A., Denisenko A.D., Pigarevskiy P.V., Ketlinskiy C.A.,	https://elibrary.ru/item.asp?id=16905352

	Мальцева С.В., Рекстин А.Р. Влияние иммунизации мышей C57Bl/6J перекисно-модифицированными липопротеинами низкой плотности на выраженность атеросклеротических поражений // Архив патологии. — 2011. — Т. 73, № 4. — С. 38-41	Denisenko A.D., Pigarevskiy P.V., Sineva C.A., Maltseva S.V., Rekstin A.P. The influence of C57BL/6J mice immunization by oxidized low-density lipoprotein on the intensity of atherosclerotic changes. Arkhiv Patologii., 2011, Vol.73, no.4, pp.38-41 (In Russ.)	
5	Климов А.Н., Шляхто Е.В. Атеросклероз. Проблемы патогенеза и терапии. – Санкт-Петербург: Медицинская литература, 2006. - 13-33	Klimov A.N., Shljahto E.V. Atherosclerosis. Problems of pathogenesis and therapy. Saint-Petersburg: Medicinskaja literatura 2006. - 13-33.	
6	Amioka N., Miyoshi T., Otsuka H., Yamada D., Takaishi A., Ueeda M., Hirohata S., Ito H. Serum malondialdehyde-modified low-density lipoprotein levels on admission predict prognosis in patients with acute coronary syndrome undergoing percutaneous coronary intervention. J Cardiol., 2019, Vol.74, no.3, pp.258-266.		https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2019.02.012
7	Belik I. V., Ivantsova A. A., Mamedova Z. E., Denisenko A. D. Antibodies against modified low-density lipoproteins and their complexes in blood of patients with various manifestations of atherosclerosis.		doi:10.18097/PBMC20166204471

	Biochemistry Suppl. Ser. B: Biomed. Chem., 2016, Vol.10, no.4, pp.346-350		
8	Daugherty A., Dunn J. L., Rateri D. L., Heinecke J. W. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. J Clin Invest., 1994, Vol.94, no.1, pp.437-444.		[doi:10.1172/JCI117342]
9	Delporte C., Boudjeltia K.Z., Noyon C., Furtmüller P.G., Nuyens V., Slomianny M.C., Madhoun P., Desmet J.M., Raynal P., Dufour D., Koyani C.N., Reyé F., Rousseau A., Vanhaeverbeek M., Ducobu J., Michalski J.C., Nève J., Vanhamme L., Obinger C., Malle E., Van Antwerpen P. Impact of myeloperoxidase-LDL interactions on enzyme activity and subsequent posttranslational oxidative modifications of apoB-100. J Lipid Res., 2014, Vol.55, no.4, pp.747-757		[doi:10.1194/jlr.M047449]
10	Denisenko A.D., Makovejchuk E.G., Vinogradov A.G., Kuznetzov A.S., Klimov A.N. Autoantibodies against oxidized low density lipoproteins and lipoprotein-antibody autoimmune complexes in human atherosclerosis. Eur. J. Lab. Med., 1996, Vol.4, pp.85-90.		https://elibrary.ru/item.asp?id=20957542

11	Frangie C., Daher J. Role of myeloperoxidase in inflammation and atherosclerosis (Review). Biomed Rep., 2022, Vol.16, no.6, p.5.		[doi:10.3892/br.2022.1536]
12	Hazell L.J., Davies M.J., Stocker R. Secondary radicals derived from chloramines of apolipoprotein B-100 contribute to HOCl-induced lipid peroxidation of low-density lipoproteins. Biochem J., 1999, Vol.339, Pt 3, pp.489-495.		https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10215584/
13	Mayyas F.A., Al-Jarrah M.I., Ibrahim K.S., Alzoubi K.H. Level and significance of plasma myeloperoxidase and the neutrophil to lymphocyte ratio in patients with coronary artery disease. Exp Ther Med., 2014, Vol.8, no.6, pp.1951-1957		[doi: 10.3892/etm.2014.2034]
14	Slot M.C., Theunissen R., van Paassen P., Damoiseaux J.G., Tervaert J.W.; Limburg Nephrology Working Group. Anti-oxidized low-density lipoprotein antibodies in myeloperoxidase-positive vasculitis patients preferentially recognize hypochlorite-modified low density lipoproteins. Clin Exp Immunol., 2007, Vol.149, no.2, pp.257-264.		[doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03420.x]

ISSN 1028-7221 (Print)
ISSN 2782-7291 (Online)

15	van Leeuwen M., Kemna M.J., de Winther M.P., Boon L., Duijvestijn A.M., Henatsch D., Bos N.A., Gijbels M.J., Tervaert J.W. Passive immunization with hypochlorite-oxLDL specific antibodies reduces plaque volume in LDL receptor-deficient mice. PLoS One., 2013, Vol.8, no.7, e68039.		[doi:10.1371/journal.pone.0068039]

ISSN 1028-7221 (Print)
ISSN 2782-7291 (Online)