

Фефелова Е.В., Терешков П.П., Цыбиков Н.Н., Максименя М.В.

Гуморальный иммунный ответ на окисленные липопротеиды у никотинзависимых лиц в зависимости от стажа курения

ГБОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия, 672000, Россия, г.Чита, ул. Горького, д. 39а

Цель исследования: изучение гуморального иммунного ответа на окисленные липопротеиды у никотинзависимых лиц с различным стажем курения. **Методика.** Исследование проводилось на 2-х группах добровольцев мужского пола, средний возраст которых составил 22 ± 1 год, не имеющих сопутствующей соматической патологии. В 1-ю группу вошли — курящие ($n = 36$), во 2-ю группу (контрольную, $n = 10$) — некурящие молодые люди. В свою очередь группа курящих была разбита на 3 подгруппы: 1.1. — стаж курения до 5 лет, 1.2. — стаж курения от 5 до 10 лет, 1.3. — стаж курения 10 лет и более. В образцах сыворотки определяли концентрации гомоцистеина, окисленных ЛПНП, МДА окисленных липопротеидов, иммунные комплексы и комплексы, содержащие холестерин и триглицериды. **Результаты.** Показано увеличение количества окисленных ЛПНП, МДА окисленных липопротеидов и аутоантител к ним в зависимости от стажа курения. Концентрация иммунных комплексов и аутоантител к окисленным ЛПНП максимальна у никотинзависимых лиц со стажем курения более 10 лет. Содержание гомоцистеина имело значимые различия только между группой контроля и группой курящих молодых людей, зависимости от стажа курения не выявлено. **Заключение.** Полученные данные могут свидетельствовать о недостаточности механизмов элиминации повреждающих факторов у никотинзависимых лиц посредством аутоантител, а следовательно, о развитии дисфункции эндотелия и инициации развития атеросклероза.

Ключевые слова: курение, гомоцистеин, окисленные липопротеиды, аутоантитела к окисленным липопротеидам

Для корреспонденции: Фефелова Елена Викторовна, доцент каф. патологическая физиология ГБОУ ВПО ЧГМА, канд. мед. наук, e-mail: fefelova.elena@mail.ru

Для цитирования: Фефелова Е.В., Терешков П.П., Цыбиков Н.Н., Максименя М.В. Гуморальный иммунный ответ на окисленные липопротеиды у никотинзависимых лиц в зависимости от стажа курения. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(2): 39—43.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 04.02.15

Fefelova E.V., Tereshkov P.P., Tsybikov N.N., Maximenya M.V.

Humeral immune response to the oxidation of lipoproteins in nicotine addicted patients according to their smoking history

Chita State Medical Academy, 672000, Russia, Chita, ul. Gorky 39a

The purpose. To investigate the humoral immune response to oxidized lipoproteins in nicotine addictive patients with different experience of smoking. **Methods:** 2 groups of male volunteers aged 22 ± 1 without any somatic pathology have been examined. The first group included the smokers ($n = 36$), the second control one ($n = 10$) comprised non smoking young people. The group of smokers was divided into three subgroups: 1.1. — period of smoking under 5 years; 1.2. — period of smoking from 5 to 10 years; 1.3. — period of smoking more than 10 years. Common immune complexes, cholesterol and triglycerides complexes, MDA of the oxidized lipoproteins, oxidized LDL as well as homocysteine levels were registered in blood serum of the smokers. **Results.** Increased LDL oxidized index, MDA of the oxidized lipoproteins level and autoantibodies to them have been detected to be dependant on the smokers' experience. The concentration of immune complexes and auto antibodies to oxidized lipoproteins of low density (LPLD) turned to be the maximum in nicotine addictive patients with the period of smoking more than 10 years. Homocysteine level was characterized by marked difference only between the control ones and young smokers; smokers experience at the same time proved to be of no value. **Conclusion.** The data obtained may testify to the failure of mechanism of elimination of damaging factors in nicotine addictive patients by means of autoantibodies, and, consequently, the development of endothelial dysfunction as well as the beginning of atherosclerosis.

Keywords: smoking, homocysteine, oxidized lipoproteins, auto antibodies to oxidized lipoproteins.

For citation: Fefelova E.V., Tereshkov P.P., Tsybikov N.N., Maximenya M.V. Humeral immune response to the oxidation of lipoproteins in nicotine addicted patients according to their smoking history. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (2): 39—43. (in Russian).

For correspondence: Fefelova Elena, Department of Pathological physiology, Chita state medical academy of Russia, 672000, Russia, Chita, ul. Gorky 39a e-mail: fefelova.elena@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Fefelova E.V., <http://orcid.org/0000-0002-0724-0352>

Tereshkov P.P., <http://orcid.org/0000-0002-8601-3499>

Tsybikov N.N., <http://orcid.org/0000-0002-0975-2351>

Maximenya M.V., <http://orcid.org/0000-0001-6308-3411>

Received 04.02.15

Введение

Несмотря на достижения современной медицины, атеросклероз по-прежнему является ведущей причиной широкого спектра кардио- и цереброваскулярных заболеваний, а причины и механизмы развития его остаются дискуссионными. Это обусловлено наличием многолетней преclinical стадии развития данного патологического процесса и недостатком методов его обнаружения. К факторам, ведущим к развитию атеросклероза, относят избыточное потребление холестерина, аутоиммунные реакции, гипергомоцистеинемию, дефекты генов рецепторов липопротеинов, курение, артериальную гипертензию и др. [1—3]. Установлено, что развитие атеросклероза среди бывших курильщиков протекает более активно по сравнению с никогда не курившими людьми, а результат влияния курения на формирование атеросклеротических поражений может быть кумулятивным и, возможно, необратимым [4]. Одной из привлекательных на настоящий момент теорий о причинах и механизмах развития атеросклероза, является гипотеза, согласно которой окисление липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) приводит к их модификации и развитию на них аутоиммунной реакции [5], нарушению выработки межклеточных медиаторов, и развитию вторичной альтерации [6—10].

Однако, имеющиеся данные об уровне аутоантител к окисленным ЛПНП (оЛПНП) у больных атеросклерозом и здоровых людей противоречивы, однозначной связи между уровнем аутоантител к модифицированным ЛПНП и развитием атеросклеротического процесса не обнаружено [5, 11—13].

Цель исследования — изучение гуморального иммунного ответа на окисленные липопротеиды у никотинзависимых лиц с различным стажем курения.

Методика

Исследование проведено на двух группах добровольцев мужского пола, средний возраст которых составил 22 ± 1 год, не имеющих сопутствующей соматической патологии. В 1-ю основную группу вошли — курящие молодые люди ($n = 36$). Контрольную группу составили некурящие лица ($n = 10$). Группа курящих была разбита на 3 подгруппы: 1-я — стаж курения до 5 лет, 2-я — от 5 до 10 лет, 3-я — 10 лет и более.

Концентрацию гомоцистеина в образцах крови из локтевой вены определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовой детекцией при 330 нм и разделением на колонке Chromolith 100 Ч 4,6 мм с использованием в качестве элюента ацетонитрил — 0,05 М лимонная кислота (10:90, v/v) [14].

Уровень оЛПНП, МДА окисленных ЛПНП (МДА ЛПНП) и аутоантител к ним определяли методом ИФА с использованием тест-наборов «Biomedica» (Германия), содержание циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) — методом преципитации с 3,5% раствором полиэтиленгликоля (молекулярный вес 6000) (В.В. Меньшиков, 1987). Иммунные комплексы, содержащие холестерин и триглицериды, определяли по методу Шойбонова [15].

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программы Statistica 6.1. Описательная статистика представлена медианой и межквартильным интервалом (25-го; 75-го перцентилей); сравнение независимых выборок проводили с помощью U-критерия Манна—Уитни, сравнение зависимых переменных — с использованием критерия Вилкоксона. Различия двух сравниваемых величин считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Данные зависимости уровня оЛПНП от стажа курения представлена в табл. 1. Как видно из таблицы при стаже курения до 5 лет количество оЛПНП увеличивается в 7 раз, от 5 до 10 лет — более чем в 20 раз, а при стаже 10 лет и более — в 200 раз.

Максимальная концентрация окисленных липопротеидов малонового диальдегидом зафиксирована у никотинзависимых лиц со стажем курения 10 лет и более и составила около 80% от всех оЛПНП. В содержании гомоцистеина значимые различия выявлены только между группой контроля и курящими молодыми людьми. Повышение концентрации этого тилола в зависимости от стажа курения не выявлено (табл. 1).

Увеличение количества окисленных малоновым диальдегидом ЛПНП у молодых людей со стажем курения 5 и более лет свидетельствует об активном течении процессов перекисного окисления липидов [16] и срыве механизмов антиоксидантной защиты. В то же время наблюдалось повышение содержания иммунных комплексов: в 4 раза у лиц 1-й и 2-й подгрупп основной группы и в 8 раз — у лиц со стажем курения более 10 лет. Уровень аутоантител к окисленным ЛПНП возрастал только при стаже курения 5 лет и более: во 2-й подгруппе — в 1,5 раза, а в 3-й — в 6 раз (табл. 2).

На следующем этапе исследования оценивали качественный состав иммунных комплексов. Для этой цели кровь брали на исследование у никотинзависимых лиц до курения и через 10 мин после. Результаты показали, что у никотинзависимых лиц со стажем курения 5 лет, возрастал уровень иммунных комплексов, содержащих как холестерин, так и триглицериды.

Причем после курения изменения оказались более выраженными. В дальнейшем количество иммунных комплексов снижалось, достигая значений контрольной группы. Характер снижения уровня иммунных комплексов был различен: у лиц со стажем курения от 5 до 10 лет резко уменьшалось количество иммунных комплексов, содержащих холестерин, в подгруппе со стажем курения 10 лет и более их уровень приближается к контрольным значениям. Максимальное количество иммунных комплексов, содержащих триглицериды, отмечено у лиц 2-й подгруппы (табл. 3).

Таким образом, у лиц со стажем курения до 5 лет иммунный ответ направлен против избыточного количества холестерина и триглицеридов, а у людей со стажем курения более 5 лет — против окисленных липопротеидов. Но, при этом, концентрация антител к окисленным липопротеидам нарастает с гораздо меньшей скоростью, по сравнению с увеличением уровня оЛПНП. Так в 1-й подгруппе количество антител не увеличивалось, а уровень окисленных липопротеидов возрастал в 7 раз, во 2-й подгруппе — в 1,5 и 23 раза, а в 3-й — в 6 и 20 раз соответственно по сравнению с группой контроля.

Полученные данные могут свидетельствовать о недостаточности механизмов элиминации повреждающих факторов посредством аутоантител, а следовательно, о развитии дисфункции эндотелия и инициации развития атеросклероза.

Выводы

1. Уровень окисленных ЛПНП, окисленных липопротеидов малоновым диальдегидом и гомоцистеином в сыворотке крови возрастает в зависимости от стажа курения.

Таблица 1

Содержание окисленных липопротеидов в сыворотке крови у молодых людей в зависимости от стажа курения (Ме (25-й; 75-й))

| Группа | оЛПНП мкг/мл | МДА ЛПНП, мкг/мл | Соотношение МДА ЛПНП / оЛПНП, % | Гомоцистеин, мкмоль/л |
|--------------------------------------|--|---|---|--|
| Контрольная группа (n = 10) | 0,36 [0,25; 0,37] | 0,00 [0,00; 0,12] | 0,0085 [0,0026; 32,61] | 5,7 [5,00; 6,46] |
| Стаж курения до 5 лет (n = 12) | 2,493 [2,41; 2,50] p1 = 0,00009 | 0,4 [0,4; 0,578] p1 = 0,00010 | 16,40 [12,21; 17,23] p1 = 0,55 | 11,20 [10,49; 17,18] p1 = 0,00009 |
| Стаж курения 5—10 лет (n = 12) | 8,537 [6,47; 9,04] p1 = 0,000089 p2 = 0,00000 | 4,819 [3,94; 4,84] p1 = 0,00009 p2 = 0,00000 | 56,68 [50,22; 74,45] p1 = 0,000089 p2 = 0,00000 | 13,40 [12,94; 13,40] p1 = 0,00009 p2 = 0,35 |
| Стаж курения 10 лет и более (n = 12) | 74,19 [38,81; 77,49] p1 = 0,00009 p2 = 0,00000 p3 = 0,00000 | 60,08 [20,25; 70,90] p1 = 0,000089 p2 = 0,00000 p3 = 0,00000 | 77,53 [57,99; 95,56] p1 = 0,000089 p2 = 0,00000 p3 = 0,016 | 14,30 [11,50; 17,18] p1 = 0,00009 p2 = 0,37 p3 = 0,97 |

Примечание. n — число обследованных; p1 — уровень статистической значимости различий групп никотинзависимых лиц по сравнению с контрольной группой, p2 — уровень статистической значимости различий 1-й подгруппы обследуемых со 2-й и 3-й подгруппами, p3 — уровень статистической значимости различий 2-й подгруппы по сравнению с 3-й.

Концентрация иммунных комплексов и аутоантител к окисленным липопротеидам в сыворотке крови у молодых людей в зависимости от стажа курения (Ме (25-й; 75-й))

| Группа | 3,5% ПЭГ | АТ к оЛПНП, мЕд/мл |
|--------------------------------------|---|--|
| Контрольная группа (n = 10) | 0,005 [0,001; 0,008] | 243,40 [143,40; 348,80] |
| Стаж курения до 5 лет (n = 12) | 0,022 [0,017; 0,036] p1 = 0,000089 | 203,2 [198,9; 855,2] p1 = 0,025 |
| Стаж курения 5—10 лет (n = 12) | 0,017 [0,001; 0,017] p1 = 0,0043 p2 = 0,00001 | 373,90 [373,90; 594,50] p1 = 0,0072 p2 = 0,06 |
| Стаж курения 10 лет и более (n = 12) | 0,040 [0,035; 0,046] p1 = 0,000089 p2 = 0,00000 p3 = 0,00000 | 1434,00 [885; 1674,00] p1 = 0,00089 p2 = 0,00000 p3 = 0,00000 |

Примечание. n — число обследованных; p1 — уровень статистической значимости различий у никотинзависимых лиц по сравнению с лицами контрольной группы, p2 — уровень статистической значимости различий 1-й подгруппы с 2-й и 3-й, p3 — уровень статистической значимости различий 2-й подгруппы по сравнению с 3-й.

Уровень холестерина и триглицеридов иммунных комплексов у никотинзависимых лиц (Ме (25-й; 75-й))

| Группа | Холестерин ИК до курения, мг/дл | Холестерин ИК после курения, мг/дл | ТГ ИК до курения | ТГ ИК после курения |
|--------------------------------------|--|--|---|--|
| Контрольная группа (n = 10) | 6,026 [4,44; 7,051] | | 5,26 [3,393; 5,789] | |
| Стаж курения до 5 лет (n = 12) | 9,36 [6,03; 11,33] p1 = 0,0024 | 12,34 [7,81; 17,2] p4 = 0,051 | 7,19 [5,26; 8,07] p1 = 0,015 | 16,44 [6,32; 36,51] p4 = 0,012 |
| Стаж курения 5—10 лет (n = 12) | 4,44 [4,17; 6,01] p1 = 0,044 p2 = 0,00025 | 4,72 [2,92; 5,57] p1 = 0,00001 p4 = 0,059 | 9,21 [7,28; 18,59] p1 = 0,00002 p2 = 0,0031 | 8,64 [6,14; 13,29] p2 = 0,002 p4 = 0,117 |
| Стаж курения 10 лет и более (n = 12) | 5,51 [3,61; 10,02] p1 = 0,41 p2 = 0,07 p3 = 0,046 | 4,31 [3,75; 10,75] p2 = 0,0044 p3 = 0,0165 p4 = 0,133 | 5,53 [3,39; 5,88] p1 = 0,79 p2 = 0,041 p3 = 0,000012 | 6,27 [5,35; 9,74] p2 = 0,003 p3 = 0,154 p4 = 0,0035 |

Примечание. n — число обследованных; p1 — уровень статистической значимости различий групп никотинзависимых лиц по сравнению с контрольной группой, p2 — уровень статистической значимости различий 1-й подгруппы со 2-й и 3-й, p3 — уровень статистической значимости различий 2-й подгруппы по сравнению с 3-й, p4 — уровень статистической значимости различий показателей до и после курения.

2. Концентрация иммунных комплексов и аутоантител к окисленным ЛПНП максимальна у никотинзависимых лиц со стажем курения более 10 лет.

3. Содержание гомоцистеина увеличено у никотинзависимых лиц, но при этом не зависит от стажа курения.

References

1. Nagornev V.A., Voskan'janc A.N. Modern conceptions of the pathogenesis of atherosclerosis. *Vestn. RAMN.* 2006; 9-10: 66-74.
2. Tsybikov N.N., Tsybikova N.M. The role of homocysteine in human pathology. *Uspekhi sovremennoy biologii.* 2007; T.127, № 5: 471-482.
3. Hansson G. K., Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat. Immunol.* 2011; 12 (3): 204-212.

4. Parahonskij A.P. The effect of smoking on the development of atherosclerosis. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya.* 2009; 9: 165-166.

5. Zhdanova O.Ju. *Autoantibodies to modified lipoproteins rights and their role in atherogenesis.* avtoref. dis... k.b.n. Sankt-Peterburg., 2005.

6. Stepanov A.V., Tsepelev V.L., Melnikova S.L. Immunostimulator from the central body of humoral immunity — bursa of Fabricius // *Sibirskij Medicinskij Zurnal.* — 2013. — № 2. — P. 32-34.

7. Stepanov A.V., Tsepelev V.L. Influence of synthetic peptides bursa of fabricius on the functional activity of macrophages // *Transbaikalian Medical Bulletin.* — 2014. — № 2. — P. 44-47.

8. Stepanov A.V., Tsepelev V.L., Tsepelev S.L., Tsybikov N.N., Byambaa A.B. The results of research on the effectiveness of synthetic immunostimulant new generation // *Fundamental research* — 2012. — №12 (1). — V.142-145.

9. Stepanov A.V. Vlijanie peptidov iz limfoidnoj tkani na immunitet i vospalenie: Avtoref. dis. ...dokt. med. nauk, Irkutsk, 1995 (in Russian)

10. Tsepelev V.L., Stepanov A.V. The impact of regulatory peptides on the proinflammatory cytokines production // *Transbaikalian Medical Bulletin*. — 2015. — № 2. — P. 147-150.
11. Mel'nichenko A.A., Orehov A.N., Sobenin I.A. *Atherogenic lipoprotein modification. Role in atherogenesis*. LAP LAMBERT Academic Publishing; 2013. 253 с.
12. Nikiforov N.G., Grachev A.N., Sobenin I.A. in dr. Interaction of native and modified LDL with the intimal cells in atherosclerosis. *Patologicheskaja fiziologija i jeksperimental'naja medicina*. 2013; 1: 109-117 (in Russian)
13. Maiolino G., Rossitto G., Caielli P. et al. The Role of Oxidized Low-Density Lipoproteins in Atherosclerosis: the myths and the facts. *Mediators of Inflammation*. 2013; 2013 (13). Available at: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/714653>.
14. Dutov A.A., Nikitin D.A., Fedotova A.A. Determination of homocysteine and cysteine in plasma / serum HPLC with UV detection method and solid phase extraction on a polymeric sorbent. *Biomeditsinskaja khimiya*. 2010; T. 56, vyp. 5: 609-615 (in Russian).
15. Shojbonov B.B., Baronec V.Ju., Panchenko L.F., Kubatiev A.A. Express method for determining cholesterol in immune complexes. *Patologicheskaja fiziologija i jeksperimental'naja terapija*. 2013; 4: 109-114 (in Russian).
16. Hyshiktuev B.S. Applied and fundamental aspects of the study of adaptation and disadaptation reactions in health and disease. *Zabajkal'skij medicinskij vestnik*. 2008; 2: 14-20. Available at: <http://medacadem.chita.ru/zmv> (in Russian).

Сведения об авторах:

Терешков Павел Петрович, канд. мед. наук, зав. лаб. экспериментальной и клинической биохимии и иммунологии
Цыбиков Намжил Нанзатович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патологической физиологии ГБОУ ВПО ЧГМА
Максименя Мария Владимировна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. экспериментальной и клинической биохимии и иммунологии НИИ молекулярной медицины ГБОУ ВПО ЧГМА