

Шойбонов Б.Б.¹, Кравченко М.А.², Баронец В.Ю.³, Толпыго С.М.¹, Костырева М.В.²,
Шабалина А.А.², Замолодчикова Т.С.¹, Котов А.В.¹, Панченко Л.Ф.^{3,4}

Определение атерогенности иммунных комплексов, содержащих модифицированные липопротеины, в тесте связывания комплемента

¹ — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина», 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

² — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр неврологии», 125367, Москва, Волоколамское ш., 80

³ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный научный центр наркологии» Минздрава России, 119002, Москва, М. Могильцевский пер., 3

⁴ — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

Разработан способ определения атерогенности иммунных комплексов, содержащих множественно модифицированные липопротеины низкой плотности (ммЛПНП) в тесте связывания комплемента. В предлагаемом способе преципитат иммунных комплексов, содержащих ммЛПНП (ИК-ммЛПНП), готовили из сыворотки крови человека путем обработки её буфером (8,3%-ный ПЭГ 3350 и 3,3%-ный ПВП 12600 в соотношении 1:1,2) в течение 10 мин при 23°C. Агрегаты ИК-ммЛПНП отделяли центрифугированием при 3100g в течение 10 мин при 23°C. Преципитат ИК-ммЛПНП растворяли в буфере без ПЭГ и ПВП, определяли в нем содержание холестерина и степень связывания комплемента морской свинки. Атерогенность ИК-ммЛПНП выражали как отношение степени связывания комплемента к холестерину в иммунных комплексах.

Ключевые слова: атеросклероз, иммунные комплексы, содержащие ммЛПНП, холестерин в иммунных комплексах, степень связывания комплемента, атерогенность иммунных комплексов

Shoibonov B.B.¹, Kravchenko M.A.², Baronets V.Y.³, Tolpygo S.M.¹, Kostyрева M.V.²,
Shabalina A.A.², Zamolodchikova T.S.¹, Kotov A.V.¹, Panchenko L.F.^{3,4}

Estimation of atherogenic immune complexes containing modified lipoproteins in complement fixation tests

¹ — Federal State Institution «Scientific-Research Institute of Normal Physiology named after P.K. Anokhin», Baltiyskaya st., 8, Moscow, 125315

² — Center Research of Neurology, 80, Volokolamskoye shosse, Moscow, 123367

³ — Federal State Institution «The National Research Center of Addictions» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 3, Mogilcevskyy pereulok, Moscow, 119002

⁴ — Federal State Institution «Scientific Research Institute of General Pathology and Pathophysiology», Baltiyskaya st., 8, Moscow, 125315

A method for determining atherogenicity of the immune complexes containing multiple modified low-density lipoprotein (mmLDL) in complement fixation test has been found. In the proposed method, the precipitate immune complexes containing mmLDL (IC mmLDL) was prepared from human serum by treating it with buffer (8.3% of th PEG 3350 and 3.3% PVP 12600 th in the ratio 1: 1.2) for 10 min at 23°C. IC mmLDL aggregates were separated by centrifugation at 3100g for 10 min at 23°C. The precipitate IC mmLDL was dissolved in buffer without PEG and PVP, cholesterol content and the degree of binding of guinea pig complement were measured. Atherogenicity of the IC mmLDL was registered as the ratio of the degree of complement binding to cholesterol in the the immune complexes.

Key words: atherosclerosis, immune complexes containing mmLDL, cholesterol in immune complexes, extent of binding of the complement, immune complexes atherogenicity

Для корреспонденции: Шойбонов Батожаб Батожаргалович, к.х.н., вед. науч. сотр. лаб. физиологии мотивации «НИИ нормальной физиологии им. П.К.Анохина», e-mail: shoibonov@mail.ru

Атеросклероз является ведущей причиной инвалидизации и смертности от сердечно-сосудистых заболеваний во всех развитых странах [1]. Образование атеросклеротической бляшки инициируется накоплением липопротеинов, в первую очередь липопротеи-

нов низкой плотности (ЛПНП), во внеклеточном матриксе субэндотелиального слоя сосудистой стенки. Частицы ЛПНП агрегируют, подвергаются окислительной, ферментативной и другим видам модификаций, в том числе липидной перекисидации и превращаются в атерогенные, множественно модифицированные ЛПНП (ммЛПНП), вызывающие аутоиммунную реакцию [2] и активацию системы комплемента [3]. Аутоантитела к модифицированным окислением липопротеинам низкой плотности (окЛПНП) были выявлены в сыворотке крови как больных ССЗ, так и здоровых людей [4, 5]. Наличие окЛПНП не всегда сопровождается развитием атеросклеротических изменений в ССЗ. Например, в экспериментах с иммунизацией животных окисленными *in vitro* ЛПНП только в 50% наблюдается экспериментальный атеросклероз [6]. Это может быть связано с тем, что в ряде случаев иммунная система имеет свойства позволяющие нейтрализовать окЛПНП.

Цель работы — определение атерогенности иммунных комплексов, содержащих ммЛПНП, в тесте связывания комплемента.

Методика

В работе исследовали сыворотки крови 26 доноров и 26 неврологических больных. Забор крови осуществляли из локтевой вены после 14-часового голодания. Содержание холестерина (ХС), триацилглицеридов (ТАГ) и общего белка в сыворотке крови определяли с помощью реактивов ЗАО «ЭКОлаб» (г.Электрoгорск, Россия). В работе использовали веронал, мединал, — фирмы «Serwa» (ФРГ), трис — «Merck» (ФРГ), полиэтиленгликоль 3350 «Sigma» (США), поливинилпирролидон 12600 ± 2700 «Синтвита» (Россия), комплемент морской свинки, консервированные эритроциты барана — ЗАО «ЭКОлаб» (г.Электрoгорск, Россия), остальные реактивы квалификации не ниже ч.д.а. отечественного производства.

Приготовление эритроцитов барана эритроцитов барана сенсibilизированных антителами кролика (ЭБ-А), вероналового буфера, рН 7,4 (ВБ), буфера, содержащего ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} (VCB^{2+}), описано ранее [7]. Состав буфера для агрегации ИК (Буфер-1): 8,3% ПЭГ-3350 и 3,3% ПВП 12600 в 0,01 М Трис-НСl-буфере, содержащем 0,15 М NaCl, 0,02% NaN_3 , рН 7,4. Состав буфера для растворения ЦИК (Буфер-2): 0,01М трис-НСl-буфер, содержащий 0,15М NaCl, 0,02% NaN_3 , рН 7,4.

Для оценки состояния стенки сонных артерий (СА) использовали ультрасонографию высокого разрешения в В-режиме с применением линейного сосудистого датчика с частотой 7,5 МГц на ультразвуковом сканере «SonoScare SSI-1000» (Китай). Прото-

кол обследования включал сканирование левой и правой общих СА (ОСА) с фокусировкой на задней стенке артерии в трех фиксированных проекциях — передне-боковой, боковой и задне-боковой. Измерение толщины интима-медиа (ТИМ) осуществляли на участке ОСА длиной 10 мм, противоположащем началу каротидного синуса. ТИМ задней стенки ОСА определяли как расстояние от ведущего края первой эхогенной зоны до ведущего края второй эхогенной зоны. Среднее значение трех измерений рассматривали как интегральный показатель ТИМ.

Этапы исследования

1. Подбор оптимальной концентрации ПВП-12600 (при постоянной концентрации 4,5% ПЭГ-3350) для осаждения иммунных комплексов, содержащих множественно модифицированные ЛПНП (ммЛПНП) из пулированной сыворотки крови здоровых доноров

К 50 мкл пулированной сыворотки крови здоровых доноров добавляли по 50 мкл 10% ПЭГ-3350 и от 10 до 40 мкл раствора 20% ПВП (молекулярная масса 12600 ± 2700), тщательно перемешивали и инкубировали 10 мин при 23°C. Контрольная проба содержала только 5% ПЭГ-3350 и 50% пулированную сыворотку крови человека. Образовавшиеся агрегаты иммунных комплексов осаждали центрифугированием при 3100g в течение 10 мин при 23°C. Супернатант тщательно декантировали, и преципитат растворяли в 50 мкл буфера-2.

2. Определение холестерина и общего белка в ПЭГ/ПВП-преципитатах, приготовленных при разных концентрациях ПВП-12600 и постоянной концентрации 4,5% ПЭГ-3350

В преципитатах после растворения в 50 мкл буфера-2 определяли содержание холестерина и общего белка с использованием наборов реагентов фирмы «ЗАО Эколаб» (Россия). Общий белок в преципитате представлял собой циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК), содержащие в качестве антигена как ммЛПНП, так и другие антигены. Полученные результаты представлены в табл. 1.

3. Определение степени связывания комплемента морской свинки циркулирующими иммунными комплексами в преципитатах, приготовленных при возрастающих концентрациях ПВП и постоянной концентрации 4,5% ПЭГ-3350

К 10 мкл растворов ПЭГ/ПВП-преципитатов, разбавленных в соотношении 1:99 буфером VCB^{2+} , добавляли 20 мкл, разбавленного 1:19 комплемента морской свинки. Общий объем доводили до 0,3 мл

буфером ВСБ²⁺ и инкубировали 20 мин при 37°C. После инкубации добавляли 200 мкл ЭБ-А и повторно инкубировали 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 2,5 мл холодного раствора 0,15М NaCl, центрифугировали и оценивали степень лизиса эритроцитов по выходу гемоглобина в супернатант. Контрольная проба не содержала преципитата иммунных комплексов. Снижение гемолиза в опытных пробах по сравнению с контролем свидетельствовало о связывании комплемента.

Степень лизиса эритроцитов (У) определяли по формуле:

$$Y(\%) = [(X - R) / (H - R) \times 100],$$

где H, R и X — величины оптической плотности A₄₀₅ в гемолитических системах контрольной пробы, в контроле спонтанного лизиса ЭБ-А и в опытной пробе соответственно.

Степень связывания комплемента (ССК) определяли по формуле:

$$ССК(\%) = 100 - Y.$$

Полученные результаты представлены в табл. 1.

Определение содержания IgG в преципитатах

Приготовление эритроцитов барана, сенсibilизированных гетерофильными антителами человека. Предварительно определяли титр гетерофильных антител в сыворотке крови человека. Использовали инактивированную прогреванием при 56°C в течение 20 мин сыворотку крови человека с титром гетерофильных антител 1:512 для получения иммунного комплекса. Для этого эритроциты барана сенсibilизировали антителами человека (ЭБ-А_ч) в субагглютинирующей дозе, 1:1024). После 30 мин инкубации сформированный комплекс EA_ч отделяли центрифугированием, осадок при центрифугировании 3 раза промывали 0,15 М раствором NaCl и готовили 1% взвесь EA_ч.

Определение титра антител барана к IgG человека с использованием приготовленного иммунного комплекса (EA_ч). Предварительно титровали препарат антител барана в 96-луночных круглодонных иммунологических плашках, добавляли равный

объем 1% суспензии EA_ч, тщательно перемешивали и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После инкубации определяли конечное разведение антител барана, при котором наблюдалась полная гемагглютинация.

Проведение реакции торможения гемагглютинации (РТГА). Предварительно титровали прогрессивным разведением преципитаты иммунных комплексов, разведенных 1:99, в круглодонных иммунологических плашках. В качестве стандарта использовали препарат IgG с исходной концентрацией 1 мг/мл. После титрования преципитатов и стандартного препарата IgG добавляли равный объем разбавленного раствора поликлональных антител барана против IgG человека, содержащего 4 гемагглютинирующие единицы. Тщательно перемешивали и добавляли равный объем 1% суспензии иммунных комплексов (EA_ч), повторно перемешивали и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После инкубации определяли для каждой пробы лунку, где наблюдалось торможение гемагглютинации. Расчеты проводили с использованием данных по торможению гемагглютинации стандартного препарата IgG человека. Полученные данные представлены в табл. 1.

Из данных, представленных в табл. 1, следует, что при концентрации 4,5% ПЭГ-3350 в сыворотке наблюдается агрегация иммунных комплексов, содержащих множественно модифицированные липопротеины (ммЛПНП). Показателем агрегации как иммунных комплексов, содержащих ммЛПНП, так и нативных ЛПНП, является содержание холестерина в преципитатах. Добавление ПВП-12600 в раствор сыворотки, содержащей 4,5% ПЭГ-3350, вызывает агрегацию иммунных комплексов, содержащих ммЛПНП от 0,3% до 1,8%. Дальнейшее увеличение концентрации ПВП-12600 выше 1,8% в системе приводит к агрегации и преципитации нативных ЛПНП. Об этом свидетельствует отсутствие возрастания степени связывания комплемента преципитатами, полученными при концентрации ПВП-12600 свыше 1,8%. Сохранение степени связывания комплемента на уровне 65-68% и возрастание концентрации холестерина и общего белка в преципитатах при увеличении концентрации ПВП-12600

Таблица 1

Содержание холестерина, общего белка, IgG в преципитатах и степень связывания комплемента (ССК) иммунными комплексами, приготовленными из пулированной сыворотки крови доноров, в зависимости от концентрации ПВП-12600 при постоянной концентрации 4,5% ПЭГ-3350

Концентрация ПВП-12600, %	0,3	0,7	1,0	1,3	1,8	2,0	2,3	2,7	3,0	3,3	0
Холестерин, мг/дл	1,1	1,3	2,0	5,3	7,1	8,5	10,2	15,7	20,4	24,2	0
IgG мг/мл	0,06	0,06	0,12	0,120	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0
Общий белок, мг/мл	0,5	0,62	0,74	0,82	0,97	1,2	1,4	1,62	1,88	2,1	0,3
ССК, %	7	14	26	50	65	64	66	63	68	67	0

(более 1,8%) свидетельствует, с одной стороны, о полной агрегации иммунных комплексов, содержащих ммЛПНП, с другой стороны, об агрегации нативных ЛПНП, которые не обладают комплемент связывающей способностью. Возрастание уровня общего белка также подтверждает агрегацию и преципитацию нативных ЛПНП. Наличие IgG в преципитатах, приготовленных в присутствии ПВП, свидетельствует об иммунных комплексах, содержащих ммЛПНП, тогда как постоянный уровень IgG в преципитатах, полученных при концентрации ПВП 1,8% и выше, свидетельствует о специфической преципитации иммунных комплексов, содержащих ммЛПНП.

Таким образом, при постоянной концентрации ПЭГ 3350 (4,5%) и концентрациях ПВП-12600 в диапазоне от 0,3% до 1,8% наблюдается избирательная агрегация и преципитация иммунных комплексов, содержащих ммЛПНП, и не наблюдается агрегация и преципитация как нативных ЛПНП, так и свободных IgG.

Определение содержания холестерина в иммунных комплексах в сыворотке крови доноров и больных с атеросклерозом брахиоцефальных артерий

Приготовление преципитата сыворотки крови при 1,8% ПВП-12600 и 4,5% ПЭГ-3350. К 50 мкл сыворотки крови неврологических больных и относительно здоровых доноров добавляли по 60 мкл буфера-1 и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Образовавшиеся агрегаты иммунных комплексов осаждали центрифугированием строго при 23°C в течение 10 мин при 3100g. Супернатант тщательно декантировали и

осадок растворяли в 50 мкл буфера-2. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Как видно из данных, представленных в табл. 2, в группе относительно здоровых доноров в трех пробах содержание ХИК было заметно выше, чем в остальных пробах этой контрольной группы. Полученные данные о повышенном уровне ХИК у трех доноров, возможно, свидетельствуют о субклиническом атеросклерозе у данных лиц. При исключении данных доноров из группы контроля по ХИК, средний уровень ХИК составляет $7,07 \pm 1,15$, при колебании от 5,9 до 8,3 мг/дл. В группе больных в 100% случаев определяется повышенный уровень иммунных комплексов, содержащих ммЛПНП, и колебания составили от 11,7 до 40,3 мг/дл.

Определение степени связывания комплемента морской свинки иммунными комплексами, содержащими ммЛПНП. К 10 мкл растворов преципитатов, разбавленных 1:99 буфером ВСБ²⁺, добавляли 12 мкл разбавленного 1:19 буфером комплемента морской свинки. Общий объем доводили до 0,3 мл буфером ВСБ²⁺ и инкубировали 20 мин при 37°C. После этого добавляли 200 мкл ЭБ-А_{кр} и продолжали инкубацию в течение 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 2,5 мл холодного раствора 0,15М NaCl, центрифугировали и определяли величину лизиса эритроцитов по выходу гемоглобина в супернатант. Контрольная проба не содержала преципитата иммунных комплексов. Пониженный гемолиз в опытных пробах по сравнению с контролем сви-

Таблица 2

Содержание холестерина в иммунных комплексах (ХИК) в сыворотке крови доноров и неврологических больных

Доноры	ХИК, мг/дл	Больные	ХИК, мг/дл
1	5,2	1	12,6
2	7,4	2	14,2
3	6,8	3	11,7
4	6,5	4	17,4
5	7,8	5	22,3
6	8,2	6	14,8
7	6,8	7	16,3
8	17,8	8	13,7
9	9,2	9	13,4
10	6,7	10	12,2
11	15,3	11	24,8
12	8,3	12	40,3
13	17,5	13	16,5
14	5,9	14	22,4
15	6	15	18,2
M ± m	9,03 ± 4,21	M ± m	18,05 ± 7,34

Содержание холестерина иммунных комплексов (ХИК), степень связывания комплемента (ССК) и атерогенность иммунных комплексов, содержащих ммЛПНП (АИК-ммЛПНП) в ПЭГ/ПВП-преципитатах сывороток крови доноров и неврологических больных

Доноры	ХИК, мг/дл	ССК, %	АИК-ммЛПНП	Больные	ХИК, мг/дл	ССК, %	АИК-ммЛПНП
1	5,2	56	108	1	16,6	43	2,6
2	6,4	70	109	2	15,6	52	3,3
3	2,3	27	117	3	33,4	74	2,2
4	4,5	80	178	4	13,8	18	3,5
5	9,2	78	85	5	44,5	8	0,2
6	5	41	82	6	67,5	22	0,3
7	5,3	53	100	7	34,2	19	0,6
8	5,7	82	144	8	17,5	45	2,6
9	6,8	73	107	9	27,7	89	3,2
10	7,8	69	89	10	24,9	78	3,1
11	8,4	49	58	11	18,6	74	4
М ± m	6,1 ± 2,0	62 ± 18	107 ± 32	М ± m	28,6 ± 16,1	47 ± 28	2,3 ± 1,4

детельствовал о связывании комплемента. Степень лизиса эритроцитов (У) определяли по формуле:

$$Y(\%) = [(X - R) / (H - R) \times 100],$$

где H, R и X — величины оптической плотности A_{405} в гемолитических системах контрольной пробы, в контроле спонтанного лизиса ЭБ-А_{кр} и в опытной пробе соответственно.

Степень связывания комплемента (ССК) определяли по формуле:

$$ССК(\%) = 100 - Y.$$

Определение атерогенности иммунных комплексов, содержащих ммЛПНП, в тесте связывания комплемента рассчитывали как отношение степени связывания комплемента к холестерину преципитированных иммунных комплексов в индивидуальных сыворотках. Полученные результаты представлены в табл. 3.

Как видно из данных, представленных в табл. 3, содержание холестерина в иммунных комплексах в сыворотке крови здоровых доноров в 100% случаев было ниже 10 мг/дл (разброс от 2,3 до 9,2 мг/дл), в то время как в сыворотке крови неврологических больных, с инструментально подтвержденным атеросклерозом каротидных артерий, ХИК был в среднем в 4,7 раза выше нормальных величин и варьировал от 13,8 до 67,5 мг/дл. Степень связывания комплемента морской свинки ПЭГ-преципитатом в группе здоровых доноров была значительно выше, чем в группе больных (в среднем 62% и 47% соответственно).

Полученные результаты по оценке атерогенности иммунных комплексов в тесте связывания комплемента свидетельствуют о том, что иммунные комплексы больных с атеросклерозом каротидных артерий обладают сниженной комплемент-активирующей, в данном случае гетерологичного комплемента морской свинки. И как

следствие — повышенный уровень иммунных комплексов, содержащих ммЛПНП, в крови у больных с атеросклерозом каротидных артерий, из-за нарушения их солюбилизации и элиминации с участием аутологичной системы комплемента. Сниженная комплемент-активирующая способность иммуноглобулинов в иммунных комплексах больных с атеросклерозом также приводит к незавершенному фагоцитозу и как следствие — образованию «пенистых» клеток при данной патологии.

Список литературы

1. Braunwald E. Shattuck lecture — cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *N. Engl. J. Med.* 1997; 337: 1360-9.
2. Vaarala O. Antibodies to oxidised LDL. *Lupus.* 2000; 9: 202-5.
3. G.Szeplaki, L. Varga, G.Fust, Z.Prohaszka Role of complement in the pathomechanism of atherosclerotic vascular diseases. *Molecular Immunology.* 2009; 46: 2784-93.
4. Schumacher M., Eber B., Tatzber F., Kaufmann P., Halwachs G., Fruhwald F.M. et al. Transient reduction of autoantibodies against oxidized LDL in patients with acute myocardial infarction. *Free Radic. Biol. Med.* 1995; 18: 1087-91.
5. Uusitupa M.I., Nishanen L., Luoma J., Vilja P., Mercuri M., Rauramaa R. et al. Autoantibodies against oxidized LDL do not predict atherosclerotic vascular disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1996; 16: 1236-42.
6. Palinski W., E Miller E., J L Witztum J.L. Immunization of Low Density Lipoprotein (LDL) Receptor-Deficient Rabbits with Homologous Malondialdehyde-Modified LDL Reduces Atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995; 92: 821-5.
7. Shoibonov B.B., Osipov A.V., Kryukova E.V. Zinchenko A.A., Lakhtin V.M., Tsetlin V.I. et al. Oxiagin from the Naja oxiana cobra venom is the first reprolysin inhibiting the classical pathway of complement. *Mol. Immunol.* 2005; 42: 1141-53.

Поступила 29.10.14

Received 29.10.14

Сведения об авторах:

Кравченко Михаил Андреевич, ст. науч. сотр. лаб. эпидемиологии и профилактики заболеваний нервной системы «Научный центр неврологии»;

Баронец Валерия Юрьевна, ст. науч. сотр. лаб. биохимии ННЦ наркологии Минздрава России, 119002, Москва, Малый Могильцевский пер., 3;

Толпыго Светлана Михайловна, вед. науч. сотр. лаб. физиологии мотивации «НИИ нормальной физиологии им. П.К.Анохина»

Костырева Марина Владимировна, науч. сотр. лаб. биохимии «Научный центр неврологии», 125367, Москва, Волоколамское ш., 80;

Шабалина Алла Анатольевна, с.н.с., зав. лабораторией биохимии «Научный центр неврологии», 125367, Москва, Волоколамское ш., 80

Замолодчикова Татьяна Степановна, с.н.с. лаборатории физиологии мотивации «НИИ нормальной физиологии им. П.К.Анохина»

Котов Александр Владимирович, д.м.н., профессор, зав. лабораторией физиологии мотивации «НИИ нормальной физиологии им. П.К.Анохина»

Панченко Леонид Федорович, д.м.н., проф., акад. РАН, зав. лаб. молекулярных механизмов наркотической зависимости НИИ общей патологии и патофизиологии