

© Коллектив авторов, 2016
УДК: 577.125.8:615.217.4+616.12-008.331.1

Агрегация модифицированных липопротеидов низкой плотности как фактор усиления атерогенности

Елизова Н.В.¹, Карагодин В.П.², Контуш А.³, Орехов А.Н.¹

¹ — ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия, 125315, Москва, ул. Балтийская, д.8

² — Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова, 117997, Стремянный переулок, 36, Москва, Россия

³ — «Национальный институт здоровья и медицинских исследований», подразделение 1166; Университет Пьера и Марии Кюри, Университетский госпиталь Питье-Сальпетриер, 75651 Париж, Франция, Госпитальный бульвар, 83

Цель исследования. Изучить влияние агрегации липопротеидов низкой плотности (ЛНП) на накопление внутриклеточного холестерина в макрофагах и оценить способность ЛНП к накоплению холестерина в зависимости от размера частиц ЛНП. **Методика.** Для данного исследования получали ЛНП от здоровых лиц и лиц с сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ). Фракцию ЛНП плотностью 1,019–1,065 г/мл получали путем ультрацентрифугирования сыворотки крови двухстадийным методом. В качестве модели для исследования влияния агрегации ЛНП использовали культуру моноцитов/макрофагов человека, которые выделяли из цельной крови методом магнитной сепарации CD14+ клеток при помощи набора для выделения моноцитов Miltenyi Biotech. Исследование захвата и деградации ЛНП макрофагами проводили с помощью ¹²⁵I-меченных ЛНП. Содержание внутриклеточного холестерина измеряли путем экстракции липидов из клеток в смеси гексан-изопропанола (соотношение объемов 3:2). Концентрацию холестерина в образцах измеряли методом спектрофотометрии с помощью набора для общего определения холестерина (Fluitest CHOL, Analyticon Biotechnologies AG). **Результаты.** Показано влияние агрегации ЛНП на накопление внутриклеточного холестерина макрофагами. Обнаружены достоверные различия в способности к агрегации ЛНП у здоровых лиц и лиц с ССЗ. Установлено, что нативные ЛНП не агрегировали до 6 часов инкубации, в то время как наблюдалось 3–3,5-кратное увеличение среднего размера частиц множественно-модифицированных ЛНП (ммЛНП) через 6 часов культивирования и 6,5–7-кратное увеличение частиц через 24 часа. **Заключение.** Циркулирующие множественно-модифицированные липопротеиды низкой плотности являются источником внутриклеточного холестерина в интима сосудов. Способность ЛНП вызывать накопление внутриклеточного холестерина зависит от размера их частиц.

Ключевые слова: липопротеиды, агрегация липопротеидов, атерогенность, атеросклероз

Для корреспонденции: Елизова Наталья Владимировна, e-mail: natalina5@yandex.ru

Для цитирования: Елизова Н.В., Карагодин В.П., Контуш А., Орехов А.Н. Агрегация модифицированных липопротеидов низкой плотности как фактор усиления атерогенности. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2016; 60(3): 49-52

Финансирование. Работа проведена при финансовой поддержке Национального института здоровья и медицинский исследований (INSERM, Франция) и CODDIM Ile-de-France (Париж, Франция) и Российской Федерации в лице Минобрнауки России (проект RFMEFI61614X0010).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Материалы статьи нигде ранее не публиковались.

Поступила 02.02.2016.

Aggregation of modified low-density lipoprotein as factor strengthening atherogenic

Elizova N.V.¹, Karagodin V.P.², Kontush A.³, Orekhov A.N.¹

¹ — FSBI «Institute of General Pathology and Pathophysiology», Moscow, Russia, 125315, Moscow, Baltiyskaya street, 8

² — Plekhanov Russian University of Economics, Stremyanny Pereulok, 36, Moscow, 117997, Russia

³ — «National Institute for Health and Medical Research (INSERM)», UMR-ICAN 1166, Pitie-Salpetriere University Hospital, University of Pierre and Marie Curie, Paris, France

The purpose. This study shows the effect of low-density lipoprotein (LDL) aggregation on accumulation of intracellular cholesterol, evaluates an influence of intracellular LDL accumulation on cholesterol accumulation that depends on the LDL particle size. **Methods.** For this study, LDL were obtained from healthy persons and patients with cardiovascular disease. The LDL fraction with density of 1,019–1,065 g/ml was received by blood serum ultracentrifugation using the two-phase method. As a model to study the effect of aggregation of LDL, a culture of human monocytes/macrophages was used, CD14+ cells were isolated from whole blood by monocyte isolation kit «Miltenyi Biotech». Study of capture and degradation of LDL by macrophages was performed using ¹²⁵I-labeled LDL. The intracellular cholesterol content was measured by extraction of lipids from cells by a mixture of hexane-isopropanol (volume ratio 3:2). The concentration of cholesterol in the samples was measured by spectrophotometry using a kit for

determination of total cholesterol (Fluitest CHOL, Analyticon Biotechnologies AG). **Results.** It was shown that LDL aggregation influenced accumulation of intracellular cholesterol. Significant differences were found when comparing the ability to aggregate LDL from healthy persons and that from patients with cardiovascular disease. It has been shown that native LDL are not aggregated in 6 hours of incubation, whereas there was 3–3.5 fold increase in the average particle size of the multiply-modified low-density lipoprotein (mmLDL) after 6 hours of incubation and 6.5–7 fold increase in 24 hours. **Conclusion.** The circulating multiply-modified low-density lipoproteins are a source of intracellular cholesterol in the intima of blood vessels. For the diagnosis and treatment of atherosclerosis, it is very important to understand the mechanisms of intracellular lipid accumulation and to study the characteristics of LDL, as well as to identify ways to increase the atherogenic potential of LDL. The results show the dependence of LDL ability to cause intracellular accumulation of cholesterol on the particle size.

Keywords: lipoproteins, aggregation of lipoproteins, atherogenicity, atherosclerosis.

For citation: Elizova N.V., Karagodin V.P., Kontush A., Orekhov A.N. Aggregation of modified low-density lipoprotein as factor strengthening atherogenic. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (3): 49-52. (in Russ).

For correspondence: Natalia V. Elizova, Postgraduate «Institute of General Pathology and Pathophysiology», Moscow, Russia, 125315, Moscow, Baltiyskaya street, 8, e-mail: NataLina5@yandex.ru

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

Funding. This work was funded by the National Institute of Health and Medical Research (INSERM, France) and CODDIM Ile-de-France (Paris, France) and the Russian Federation represented by the Ministry of Education of Russia (RFMEFI61614X0010 project).

Received 02.02.16

Введение

Для диагностики и лечения атеросклероза очень важно понимание механизмов накопления внутриклеточных липидов и изучение характеристик ЛНП, а также определение механизмов увеличения атерогенного потенциала ЛНП. Одним из наиболее ранних проявлений атеросклероза является внутриклеточное отложение эфиров холестерина в интима сосудов [1, 2]. Источником эфиров холестерина в интима сосудов являются липопротеиды низкой плотности (ЛНП), циркулирующие в крови человека [2–4]. Установлено, что ЛНП, выделенные из сыворотки крови здоровых доноров, не вызывают накопления холестерина в культуре клеток моноцитов/макрофагов, однако ЛНП, выделенные из сыворотки крови пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ), являются атерогенными, т.е. вызывают накопление внутриклеточного холестерина [5].

В условиях *in vitro* различные химически модифицированные ЛНП (ацетилованные, дезацелированные, окисленные) также являются атерогенными [6, 7]. Одним из механизмов усиления атерогенного потенциала множественно-модифицированных ЛНП (ммЛНП) является агрегация [5, 8, 9].

На ранних этапах атеросклеротических изменений в интима за счёт агрегатов или комплексов [10], содержащих ЛНП, активизируется фагоцитоз, ослабляются межклеточные связи, что в дальнейшем ведет к накоплению внутриклеточных липидов, стимуляции пролиферации, а также синтеза и секреции внеклеточного матрикса [1].

В данном исследовании проведена оценка способности ЛНП к агрегации, сравнение степени агрегации ЛНП здоровых доноров и ЛНП пациентов с ССЗ, а также представлены результаты по влиянию агрегированных ЛНП на накопление внутриклеточного холестерина клеточной культурой макрофагов человека, включая захват и деградацию ЛНП.

Материалы и методы

В клиническом исследовании приняли участие здоровые лица (в возрасте 25–55 лет), у которых отсутствовали признаки ишемической болезни сердца (ИБС) в анамнезе, а содержание холестерина и триглицеридов в плазме крови

не превышало соответственно 200 мг/дл и 150 мг/дл, а также не имеющие заболеваний, способных повлиять на результаты исследования (сахарный диабет, артериальная гипертензия). В другую группу включали пациентов с ИБС, со стенокардией напряжения функционального класса II–IV, с ангиографически выявленным атеросклерозом (в возрасте 30–60 лет). Для получения сыворотки кровь забирала из локтевой вены в пластиковую пробирку и инкубировали 1 час при 37°C. Образовавшийся сгусток отделяли от стенок пробирки, после чего кровь центрифугировали в течение 15 мин при 800g.

Фракцию ЛНП получали путем ультрацентрифугирования сыворотки крови двухстадийным методом и выделяли фракции плотностью от 1,019 до 1,065 г/мл. Каждое центрифугирование проводили в течение 2 часов при 12°C со скоростью 40000 об./мин на центрифуге L8-55 (ротор Type 50Ti, Beckman Instruments, Inc., США). Для разделения нативных и ммЛНП использовали колонки, содержащие 1–5 мл РКА₁₂₀сефарозы, на которые наносили ЛНП. Сначала их промывали 50 мл изотонического фосфатного буфера (получали не связавшиеся нативные ЛНП), затем промывали 0,5 М NaCl. Сорбируемые ЛНП элюировали 50 мМ раствором галактозы, то есть получали ммЛНП. Размеры ЛНП и их агрегатов определяли методом анализа флуктуаций светопропускания суспензий с помощью агрегометра «Биола». Моноциты выделяли из цельной венозной крови с использованием метода магнитной сепарации CD14+ клеток при помощи набора для выделения моноцитов Miltenyi Biotec. Моноциты культивировали в стерильных 24-луночных планшетах в количестве 10⁵ клеток на лунку с использованием бессывороточной среды X-Vivo (Lonza). Клетки культивировали при 37°C и 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе. На 6-й день после смены культуральной среды добавляли исследуемые ЛНП в концентрации 100 мкг/мл белка. В качестве контроля использовали клеточную культуру без добавления ЛНП.

Для исследования захвата и деградации ЛНП к макрофагам, после смены среды, добавляли ¹²⁵I-меченные ЛНП и инкубировали в течение 5 часов (37°C, 5% CO₂). После инкубации культуральную среду использовали для изучения деградации ЛНП, а клеточную культуру инкубировали

Изменение степени агрегации нативных ЛНП (от здоровых лиц) и модифицированных ЛНП (от больных лиц) в течение 24 часов инкубирования

Время инкубации, ч	Средний размер агрегации частиц ЛНП, отн.ед.	
	Нативные ЛНП	ммЛНП
0	2,5 ± 1,1	6,8 ± 2,2
2	3,0 ± 1,3	8,2 ± 1,9
6	2,1 ± 0,9	20,2 ± 2,6
24	4,9 ± 1,6	32,7 ± 3,8

в 0,1 N NaOH в течение 1 часа при комнатной температуре, после чего измеряли интенсивность гамма-излучения при помощи гамма-счетчика («Clinigamma» LKB, Швеция).

Содержание внутриклеточного холестерина измеряли путем экстракции липидов из клеток в смеси гексан-изопропанола (соотношение объемов 3:2), после чего концентрацию холестерина в экстракте измеряли при помощи набора Woehringer Mannheim (Германия). Липидные экстракты высушивали под потоком воздуха, далее полученный сухой осадок растворяли в 50 мкл изопропанола, добавляли 50 мкл 15 мМ холата натрия и 0,05% Тритона X-100 и 100 мкл 50% раствора для общего определения холестерина (Fluitest CHOL, Analyticon Biotechnologies AG). Смесь инкубировали при 37°C в течение 10 минут, затем измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 492 нм.

Данные представлены как среднее ± SEM. Для статистической обработки результатов использовали критерий Вилкоксона—Манна—Уитни (критерий U).

Результаты и обсуждение

Ключевым событием атерогенеза является отложение липидов в стенках артерий, вызванное модифицированными ЛНП [11–13]. Именно накопление липидов стимулирует основные проявления атерогенности на клеточном уровне. Взаимодействие ммЛНП с макрофагами принципиально отличается от взаимодействия нативных ЛНП [1]. Связывание, интернализация и деградация нативных ЛНП и ммЛНП различны [13, 14]. В таблице представлено сравнение способности нативных и модифицированных ЛНП образовывать агрегаты в условиях культивирования. Нативные ЛНП не агрегировались до 6 часов инкубации, в то время как наблюдалось 3–3,5-кратное увеличение среднего размера частиц ммЛНП через 6 часов культивирования и 6,5–7-кратное увеличение размера через 24 часа.

Одним из этапов атерогенеза является инфильтрация моноцитов в сосудистую стенку [15, 16]. Исследование влияния нативных ЛНП и агрегированных ммЛНП на накопление эфиров холестерина первичной культурой макрофагов человека показало, что нативные ЛНП здоровых лиц не вызывали увеличения внутриклеточного содержания эфиров холестерина. В то же время инкубация с агрегированными ммЛНП вызвала увеличение уровня эфиров холестерина в макрофагах. Средняя концентрация эфиров холестерина в культуре макрофагов после 24 часов инкубации без добавления ЛНП составила 6 ± 1 мкг/мл белка, а при добавлении нативных ЛНП 7 ± 1 мкг/мл белка (что составляет 17% от контроля). Вместе с тем, после добавления агрегированных ЛНП средняя концентрации эфиров холестерина составила 26 ± 2 мкг/мл белка (333% от контроля). Различия уровней эфиров холестерина в клетках, инкубированных с на-

тивными ЛНП и агрегированными ЛНП, было статистически значимым ($p < 0,05$).

Связь между размером частиц ЛНП и их способностью вызывать накопление внутриклеточного холестерина макрофагами человека отражена на рис. 1. Обнаружена прямая и тесная корреляция между степенью агрегации ЛНП и содержанием эфиров холестерина в клетках. ЛНП фильтровали при помощи фильтров с определенным размером пор, после чего инкубировали с клетками в течение 6 часов. Размер частиц, агрегированных ЛНП составил 27,7 отн.ед. после фильтрации через фильтр со средним размером пор 0,45–19,7 отн.ед., через фильтр 0,22 мкм — 12,6 отн.ед., через фильтр 0,10 мкм — 7,9 отн.ед. Из рисунка видно, что размер фильтрации ЛНП влияет на способность вызывать накопление холестерина в клетках, а именно, с увеличением размера частиц наблюдается увеличение содержания внутриклеточного холестерина в клеточной культуре.

В результате проведенных экспериментов по изучению захвата и деградации радиоактивно-меченных ЛНП было обнаружено, что скорость захвата неагрегированных частиц меньше, чем скорость захвата агрегированных частиц ЛНП (рис. 2). Аналогично, скорость деградации неагрегированных ЛНП (коронарный атеросклероз) и ЛНП от здоровых доноров ниже, чем агрегированных ЛНП.

Из полученных результатов можно сделать вывод о том, что модифицированные ЛНП более способны к агрегации, чем немодифицированные ЛНП. Это может быть связано с физико-химическими свойствами липопротеидов, физико-химические свойства которых, такие, как размер, плотность и структура апобелков, могут варьировать. Для модифицированных ЛНП характерны малый размер частиц, высокая плотность, увеличенный поверхностный отрицательный заряд [6]. По-видимому, именно изменение распределения поверхностного заряда частицы является основной причиной агрегации ЛНП.

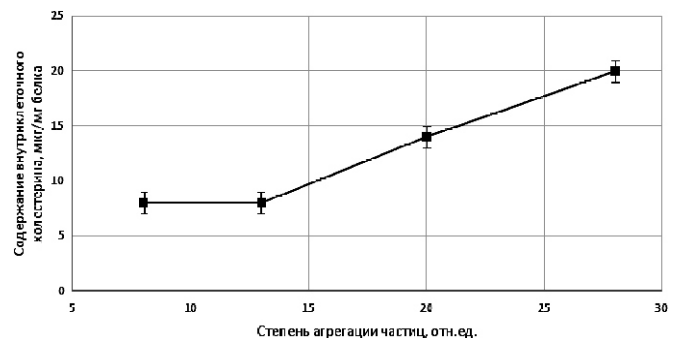


Рис. 1. Влияние степени агрегации ЛНП на их способность накапливать внутриклеточный холестерин в макрофагах человека. По оси ординат — содержание внутриклеточного холестерина в мкг/мг белка, по оси абсцисс — степень агрегации частиц ЛНП в отн.ед.

References

1. Nikiforov N.G., Gratchev A.N., Sobenin I.A., et al. [Interaction of native and modified low density lipoprotein with intimal cells in atherosclerotic lesion]. *Pathological Physiology and Experimental Therapy*. 2013; (1): 109-117. (in Russian).
2. Navratil A.R., Vozenilek A.E., Cardelli J.A., et al. Lipin-1 contributes to modified low-density lipoprotein-elicited macrophage pro-inflammatory responses. *Atherosclerosis*. 2015; 242(2): 424-432.
3. Mel'nichenko A.A., Orekhova V.A., Sobenin I.A., et al. [The development of cellular models to assess the reverse cholesterol transport]. *Pathogenesis*. 2013; 11(4): 39-48. (in Russian).
4. Titov V.N. [Statin-induced inhibition of cholesterol synthesis in liver and very low density lipoproteins. Statins, fatty acids and insulin resistance]. *Pathogenesis*. 2013; 11(1): 18-26. (in Russian).
5. Getz G.S., Reardon C.A. Atherogenic lipids and macrophage subsets. *Curr Opin Lipidol*. 2015; 26(5): 357-361.
6. Sobenin I.A., Feoktistov A.S., Karagodin V.P., et al. [Low-density lipoproteins in atherogenesis — value of sialic acid]. *Pathogenesis*. 2012; 10(1): 62-65. (in Russian).
7. Arnal-Levron M., Chen Y., Delton-Vandenbroucke I., et al. Bis(monoacylglycerol)phosphate reduces oxysterol formation and apoptosis in macrophages exposed to oxidized LDL. *Biochemical Pharmacology*. 2013; 86(1): 115-121.
8. Martinez-Bujidos M., Rull A., Gonzalez-Cura B., et al. Clusterin/apo-lipoprotein J binds to aggregated LDL in human plasma and plays a protective role against LDL aggregation. *FASEB Journal*. 2015; 29(5): 1688-1700.
9. Hadjinicolaou M., Protopapas E. Translation of two aggregated low-density lipoproteins within blood plasma: a mathematical model. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2015; 820: 185-192.
10. Sneek M., Nguyen S.D., Pihlajamaa T., et al. Conformational changes of apoB-100 in SMase-modified LDL mediate formation of large aggregates at acidic pH. *Journal of Lipid Research*. 2012; 53(9): 1832-1839.
11. Haka A.S., Grosheva I., Singh R.K., et al. Plasmin promotes foam cell formation by increasing macrophage catabolism of aggregated low-density lipoprotein. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2013; 33(8): 1768-1778.
12. Zhao B., Huang W., Zhang W.Y., et al. Retention of aggregated LDL by cultured human coronary artery endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004; 321(3): 728-735.
13. Badimon L., Vilahur G., Padro T. Lipoproteins, platelets and atherothrombosis. *Revista Espanola de Cardiologia*. 2009; 62(10): 1161-1178.
14. Virella G., Derrick M.B., Pate V., et al. Development of capture assays for different modifications of human low-density lipoprotein. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2005; 12(1): 68-75.
15. Anogeianaki A., Angelucci D., Cianchetti E., et al. Atherosclerosis: a classic inflammatory disease. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2011; 24(4): 817-825.
16. Namiki M., Kawashima S., Yamashita T., et al. Local overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 at vessel wall induces infiltration of macrophages and formation of atherosclerotic lesion: synergism with hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2002; 22(1): 115-120.

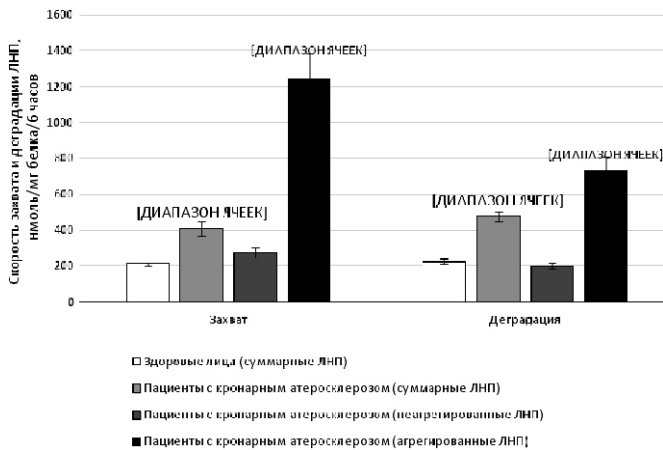


Рис. 2. Скорость захвата и деградации агрегированных и неагрегированных ¹²⁵I-ЛНП макрофагами. * — достоверное отличие скорости захвата и деградации ЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом от здоровых лиц (p<0,05). По оси ординат — скорость захвата и деградации ЛНП, нмоль/мг белка/6 ч.

Из этого предположения следует, что любая модификация ЛНП, затрагивающая его поверхностный заряд, способна придать липопротеиду атерогенные свойства.

Поиск факторов, лежащих в основе влияния агрегированных ЛНП на увеличение внутриклеточного уровня холестерина, является важной задачей. В данной статье берется во внимание такой фактор, как скорость захвата ЛНП. Показано, что скорость захвата агрегированных ЛНП достоверно превосходит скорость захвата неагрегированных ЛНП. Причем скорость захвата агрегированных ЛНП достоверно превосходит скорость деградации, что приводит к накоплению холестерина в клетках.

Таким образом, агрегация модифицированных ЛНП играет важную роль в процессах накопления внутриклеточного холестерина клетками в условиях *in vitro*. При сравнении нативных ЛНП и агрегированных модифицированных ЛНП было показано, что нативные ЛНП не способны влиять на накопление холестерина культурой клеток макрофагов, а агрегированные модифицированные ЛНП способны вызывать накопление холестерина. Кроме того, существует тесная связь между степенью агрегации ЛНП и количеством накопленных эфиров холестерина макрофагами.

Сведения об авторах:

Елизова Наталья Владимировна, аспирант Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». natalina5@yandex.ru
 Карагодин Василий Петрович, д.б.н., профессор Российского экономического университета им. Г.В. Плеханова. vprka@mail.ru

Контущ Анатолий, директор исследований в лаборатории Национального института здоровья и медицинских исследований (госпиталь Питье-Сальпетриер, университет Пьера и Марии Кюри).

Орехов Александр Николаевич, д.б.н., проф., заведующий лабораторией ангиопатологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

Information about authors:

Elizova N.V., <http://orcid.org/0000-0002-9646-8091>

Karagodin V.P., <http://orcid.org/0000-0003-0501-8499>

Kontush A., не зарегистрирован

Orekhov A.N. <http://orcid.org/0000-0002-7493-2121>