

# ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЛИПОПРОТЕИНОВ В АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЯХ АОРТЫ ЧЕЛОВЕКА

Пигаревский П.В., Архипова О.Ю., Денисенко А.Д.

Отдел биохимии, ГУ НИИ Экспериментальной Медицины РАМН, г. Санкт-Петербург

**Резюме.** В плазме крови человека обнаружены специфические аутоантитела к ацетилированным, малеилированным липопротеинам, а также к липопротеинам, модифицированным малоновым диальдегидом (МДА). Иммунизация кроликов аутологичными модифицированными соответствующим образом липопротеинами низкой плотности (ЛПНП) приводила к продукции антител, направленных к МДА-модифицированным, ацетилированным и малеилированным ЛПНП. В атеросклеротических поражениях аорты человека иммуногистохимически удалось выявить эпитопы, распознаваемые антителами к ацетилированным, малеилированным и МДА-модифицированным ЛПНП. В целом, модифицированные белки обнаруживались на всех стадиях атерогенеза, начиная с самых ранних (липидные пятна), и характер их отложений был разнообразным. Были выявлены как внутриклеточные, так и диффузные внеклеточные отложения в покрышке, верхних и глубоких слоях поражений. Наиболее характерный тип отложений для всех модифицированных белков – внеклеточные накопления в покрышке липидных пятен и бляшек, особенно в переходной «плечевой» зоне. Отложения модифицированных белков в интиме были сходны по своему характеру с распределением апопротеин В-содержащих липопротеинов, а также липидов (выявляемых окраской Oil Red). В тех зонах, где обнаруживались модифицированные белки, а также апопротеин В-содержащие липопротеины, часто одновременно выявлялись очаги отложения IgG. В непораженных участках интимы аорты модифицированные белки не обнаруживались.

**Ключевые слова:** аутоантитела, модифицированные липопротеины, сосудистая стенка, иммуногистохимия.

*Pigarevsky P.V., Archipova O.Yu., Denisenko A.D.*

## DETECTION OF MODIFIED LIPOPROTEINS IN ATHEROSCLEROTIC LESIONS OF HUMAN AORTA

**Abstract.** Specific autoantibodies against acetylated, maleylated and malonic dialdehyde-(MDA)-modified lipoproteins are detectable in human plasma. Immunization of rabbits with autologous, correspondingly modified low-density lipoproteins (LDLs) did induce autoantibodies against acetylated, maleylated and MDA-modified lipoproteins. In atherosclerotic lesions from human aorta, the epitopes have been detected that were recognized by the antibodies to acetylated, maleylated, and MDA-modified LDLs. Such antigens were detected at all atherogenesis stages, beginning with the earliest lesions (lipid spots), and their deposition pattern was quite variable.

Rabbit and human autoantibodies against acetylated, maleylated and MDA-modified lipoproteins recognized antigens in human atherosclerotic aorta. Modified proteins were localized both intra- and extracellular in tectum, superficial and deep layers of the atherosclerotic lesions. The most typical mode of depositions for all modified proteins is represented by extracellular deposits in the cap of lipid streaks and fibrous plaques, especially in transitional “shoulder” area.

The intimal deposits of modified proteins shared similar features with distribution of apo-B-containing lipoproteins, like as of lipids detectable by Oil Red staining. The areas where modified proteins and apo-B-containing lipoproteins were revealed did often coincide with foci of IgG deposits. Modified proteins were not detectable in the non-affected segments of aortic intima. (*Med. Immunol.*, 2006, vol.8, № 5-6, pp 637-644)

### Адрес для переписки:

Архипова Ольга Юрьевна,  
ГУ НИИЭМ РАМН, отдел биохимии,  
197376, г. Санкт-Петербург, ул. акад. и.м.  
И.П.Павлова, д.12.  
Тел.: 234-93-41, факс 234-94-89.  
E-mail: arho@bk.ru

## Введение

Известно, что ранние стадии атерогенеза связаны с накоплением в интиме крупных сосудов модифицированных липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), в частности, окисленных и гликированных ЛПНП [10, 12]. В то же время, нельзя исключить и появление в организме человека других типов атерогенных модификаций ЛПНП.

До сих пор не проводилось систематического иммуногистохимического исследования по обнаружению различных эпитопов модифицированных липопротеинов в стенке крупных кровеносных сосудов человека. Большая часть исследований в этой области была сделана, в основном, на моделях (животные с экспериментальным атеросклерозом: кролики Ватанабе, апоЕ- и аполипопротеин В-рецептор-дефицитные мыши) и касалась распределения эпитопов окисленных ЛПНП в аорте [9]. Исследований на человеческом материале значительно меньше (что можно объяснить экспериментальными трудностями), и имеющиеся работы скорее констатируют факт наличия эпитопов модифицированных ЛПНП определенного типа, нежели дают представление о характере распределения этих ЛПНП в аорте на разных стадиях атерогенеза [5, 6]. Можно привести лишь одну работу такого рода, посвященную изучению распределения гликированных белков [10].

Целью данного исследования являлось выявление новых эпитопов модифицированных ЛПНП и изучение характера их распределения в стенке атеросклеротически поврежденной аорты человека. В настоящей работе, помимо хорошо изученных МДА-ЛПНП, исследован характер распределения в сосудистой стенке обнаруженных нами эпитопов ацетилированных и малеилированных ЛПНП.

## Материалы и методы

**Выделение ЛПНП и их модификация.** ЛПНП человека выделяли из плазмы с помощью ультрацентрифугирования в градиенте плотности NaBr ( $d=1,021-1,055$  г/мл) с последующим диализом против 0,01М фосфатно-солевого буфера (PBS), pH 7,4 [7]. Содержание белка в ЛПНП определяли по методу Лоури в модификации Марквелла [8].

**Модификация ЛПНП малоновым диальдегидом (МДА):** к раствору ЛПНП в 0,01М PBS добавляли свежеприготовленный 0,5М раствор МДА в соотношении 6,6 мкл на 1 мг белка, смесь инкубировали 1 ч при комнатной температуре. По окончании модификации здесь и далее ЛПНП диализовали против PBS. Малоновый диальдегид получали путем кислотного гидролиза 1,1,3,3-тетраметоксипропана. Степень модификации белков здесь и далее оценивали по убыли поверхностных  $\text{NH}_2$ -групп [2].

**Ацетилирование ЛПНП:** к раствору ЛПНП в 0,01М PBS добавляли уксусный ангидрид в соотно-

шении 3 мкл на мг белка и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. В ходе реакции pH поддерживали в пределах 7,0–7,4 с помощью 1М NaOH.

**Малеилирование ЛПНП:** к раствору ЛПНП в 0,01М PBS при комнатной температуре добавляли мелко растертый порошок малеинового ангидрида в соотношении 0,5 мг на мг белка и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. pH поддерживали в пределах 7,0–7,4 с помощью 1М NaOH.

Модификацию бычьего и человеческого сывороточного альбумина (БСА и ЧСА) осуществляли аналогичным образом.

**Получение кроличьих антисывороток к аполипопротеину (апо) В человека и модифицированным ЛПНП.** Кроликов иммунизировали нативными ЛПНП человека или аутологичными модифицированными ЛПНП, соответственно. Антиген (1 мг по белку) разводили в эквивалентном объеме полного адьюванта Фрейнда и вводили внутривенно. Иммунизацию проводили трехкратно, с интервалом 7–10 дней.

**Выделение антител к мЛПНП и апо В (аффинная хроматография).** В качестве сорбента использовали CNBr-Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция) с иммобилизованными МДА-, ацетилированным (ацет-) или малеилированным (мал-) БСА. Сначала проводили иммобилизацию нативного БСА по рекомендованной производителем методике, после чего осуществляли модификацию белка.

На колонку наносили освобожденную от липопротеидов плазму крови человека или соответствующую антисыворотку кролика с последующей промывкой колонки 0,01М PBS. Элюцию антител проводили 0,1М раствором уксусной кислоты (pH 2,5), содержащей 0,15М NaCl, pH полученной фракции доводили до 7,4 с помощью 1М раствора NaOH. Для стабилизации полученных антител в раствор добавляли сахарозу до конечной концентрации 4%.

Выделение антител кролика к апо В человека проводили аналогичным образом. В качестве аффинного лиганда использовали нативные ЛПНП человека, а источника антител — кроличью антисыворотку к апо В.

**Выявление антител плазмы крови человека и кролика (твердофазный иммуноферментный анализ, тИФА).** В качестве твердой фазы использовали 96-луночные планшеты для ИФА "Biohit" (Финляндия) высокой сорбционной емкости. Модифицированные и нативные ЛПНП (или же БСА и ЧСА) в 0,01М PBS наносили на планшеты (100 мкл/лунку в концентрации 10 мкг/мл) и инкубировали в течение 16 ч при +4°C. Планшеты промывали с помощью 0,01М PBS, содержащим 0,05% Tween-20 ("Sigma", США), после чего вносили 0,5% раствор казеина в PBS (200 мкл/лунку) и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Образцы плазмы или сыворотки человека либо кроличьих антисывороток последовательно разводили в 0,5% казеине в PBS, вно-

сили в лунки по 100 мкл и инкубировали 1 ч при 37°C. Планшеты вновь промывали и затем инкубировали с мечеными пероксидазой хрена (ПХ) антителами (100 мкл/лунку) против человеческих IgG ("Dako") или IgM ("Sigma") в течение 50 мин. Если тестировали кроличьи антисыворотки, то вносили меченые ПХ антитела к кроличьим IgG ("Sigma"). В качестве хромогенного субстрата использовали ортофенилендиамин (ОФД) (0,02М Na-ацетатный буфер (pH 4.5), содержащий 0,04% дигидрохлорида ОФД и 0.033%  $H_2O_2$ ). Оптическую плотность (ОП) считывали на автоматическом ридере ELx-800 ("BIO-TEK INSTRUMENTS", Финляндия) при 490 нм с фильтром сравнения 630 нм. Эффективность связывания антител выражали в относительных единицах (отношение значений ОП, полученных для модифицированного и нативного белка).

**Конкурентный анализ для определения специфичности антител.** Плазму человека или кроличью антисыворотку в соответствующем разведении перед внесением на планшет преинкубировали 1 ч в присутствии возрастающих концентраций тестируемых антигенов (0–1000 мкг/мл). Все остальные стадии проводили, как описано выше.

**Иммуногистохимический анализ.** Объектом иммуноморфологического исследования был материал 18 аутопсий (мужчины, средний возраст 55±6 лет) — смерть от острой сердечно-сосудистой недостаточности атеросклеротической этиологии. На основании результатов патологоанатомического вскрытия из исследования исключен материал, взятый от людей, у которых были заболевания, способные оказать воздействие на иммунологическую реактивность.

В каждом случае изучались участки сосуда из грудного и брюшного отделов аорты. Исследованию были подвергнуты: неизмененные участки аорты (без атеросклеротических поражений), участки с начальными поражениями в виде липидных пятен и участки сосуда с выраженными поражениями в виде липидно-фиброзных и фиброзных бляшек.

Иммуноморфологическое и микроскопическое исследование проводили на параллельных криостатных срезах толщиной 4-6 мкм, которые фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 15 мин и промывали в PBS. При проведении иммуноморфологических окрашк все дальнейшие промывки срезов осуществляли также в PBS (два раза по 5 мин при комнатной температуре). В тех случаях, когда по условиям эксперимента требовалось предварительное промывание образцов ткани, криостатные срезы до фиксации помещали в PBS на 15 мин при 4°C. При проведении микроскопического анализа для выявления липидов, а также для определения степени выраженности атеросклеротических поражений срезы окрашивали Oil red O.

Апо В-содержащие липопротеины выявляли на срезах аорты прямым методом Кунса с помощью кроличьих антител к апо В человека, меченных ПХ

или флюоресцеин изотиоционатом (ФИТЦ), в концентрации 50 мкг/мл.

Модифицированные белки в стенке аорты человека выявляли прямым методом Кунса с помощью меченых ПХ кроличьих и человеческих антител к ацетилованному, малеилированному и обработанному МДА ЛПНП, в концентрации 100 мкг/мл. Кроме того, был использован непрямой метод Кунса. В одном варианте на срезы сначала наносили кроличьи антисыворотки к модифицированным ЛПНП, а затем — антитела к IgG кролика, меченные ФИТЦ. В другом варианте, при работе с аффинно очищенными человеческими или кроличьими антителами, срезы преинкубировали с Fc-рецептором (25 мкг/мл), затем наносили антитела (100 мкг/мл) и, наконец, Fc-рецептор, конъюгированный с ПХ. Для контроля специфичности окрашивания (или свечения) в непрямом методе Кунса опускали стадию нанесения антисыворотки (или антител к модифицированным ЛПНП), а в прямом методе — наносили меченые антитела несоответствующей специфичности. В качестве хромогенного субстрата для ПХ использовали 3,3'-диаминобензидин.

Во всех случаях после проведения иммуногистохимического окрашивания ядра клеток докрашивали гематоксилином.

Препараты просматривали и фотографировали в световом микроскопе Axiomat ("Opton", Германия) и в люминесцентном микроскопе МЛ-4 (Россия) с входными светофильтрами ФС1-2 и СЗС 7-4, запирающим фильтром ЖЗС19-ЖС18.

## Результаты

### Характеристика антител к модифицированным ЛПНП

**Человеческие аутоантитела.** С помощью тИФА было показано присутствие в плазме крови человека аутоантител (ААТ), взаимодействующих с МДА-модифицированными, ацетилованными и малеилированными ЛПНП (табл. 1).

Специфичность выявленных антител была исследована в ходе конкурентного тИФА. Было показано, что взаимодействие аутоантител с ацет-ЛПНП ингибировалось только собственным антигеном (т.е. самими ацет-ЛПНП), но не нативными или модифицированными иным образом ЛПНП (рис. 1а). Аналогичная картина наблюдалась и для аутоантител, взаимодействующих с мал-ЛПНП. Конкурентами за связывание с аутоантителами к МДА-ЛПНП выступали только сами МДА-ЛПНП, и, в меньшей степени, ацет-ЛПНП (рис. 1б). Эти результаты свидетельствуют о том, что изучаемые аутоантитела специфичны по отношению к соответственно модифицированным ЛПНП (мЛПНП).

Табл. 1. СВЯЗЫВАНИЕ АУТОАНТИТЕЛ (IGG) ЧЕЛОВЕКА С НАТИВНЫМИ И МОДИФИЦИРОВАННЫМИ ЛПНП (СРЕДНЕЕ ИЗ 18 ОПЫТОВ)

Антиген	Эффективность связывания ААТ (отн. ед., $M \pm m$ )
МДА-ЛПНП	$7,00 \pm 0,53$
ацетилованные ЛПНП	$3,17 \pm 0,36$
малеилированные ЛПНП	$2,90 \pm 0,28$
нативные ЛПНП (контроль)	1,00

Выяснилось, что обнаруженные у человека антигены распознают не только мЛПНП, но и аналогичным образом модифицированные белки иной природы. При использовании в качестве антигенов модифицированных БСА или ЧСА вместо мЛПНП в опытах по конкуренции были получены принципиально такие же результаты.

Аутоантитела к мЛПНП обнаруживались не только в плазме крови человека. В экстракте аорты человека с атеросклеротическими поражениями были выявлены антитела, принадлежащие к классу IgG, которые распознавали МДА-, ацет- и мал-ЛПНП человека, а также соответствующим образом модифицированные БСА и ЧСА.

**Кролиčky антитела.** В ходе иммунизации кроликов аутологичными модифицированными *in vitro* ЛПНП, удалось получить сыворотки с высоким титром специфических антител, направленных, соответственно, к МДА-, ацет- и мал-ЛПНП. Как и в случае с человеческими аутоантителами, кроличьи антисыворотки взаимодействовали также с модифицированными БСА и ЧСА. В ходе конкурентного иммуноферментного анализа была показана высокая специфичность кроличьих антител: для каждого из трех типов антител конкурентами выступали только соответствующим образом модифицированные белки.

#### Характеристика кроличьих антител к апо В

Антитела к апо В обладали высоким сродством к ЛПНП человека (титр в ИФА  $>10^6$ ). Важно, что и

после модификации ЛПНП сохраняли способность связываться с этими антителами. Это позволило использовать данные антитела для иммуногистохимического выявления модифицированного апо В.

#### Результаты иммуногистохимических исследований

Для выявления модифицированных ЛПНП в стенке аорты были использованы как аутоантитела к мЛПНП, выделенные из сыворотки крови человека, так и кроличьи антисыворотки или аффинно выделенные кроличьи антитела к мЛПНП. Результаты исследований принципиально не отличались при использовании антител из разных источников.

Все изученные типы модифицированных липопroteинов человека были обнаружены только в измененных участках аорты на всех стадиях атерогенеза.

МДА-модифицированные белки часто выявлялись внеклеточно в поверхностных отделах интимы. Они присутствовали в виде диффузных отложений в покрышке и субэндотелиальном слое интимы в липидных пятнах, липидно-фиброзных и фиброзных бляшек, а также на волокнистых структурах в поверхностных слоях этих атеросклеротических поражений (рис. 2 а, б). Кроме того, в липидно-фиброзных и фиброзных бляшках МДА-белки были выявлены в глубоких слоях интимы на границе с медией в виде диффузных, внеклеточных отложений с пропитыванием волокнистых структур (рис. 2 в). Интересно, что их распределение часто было сходным с отложе-

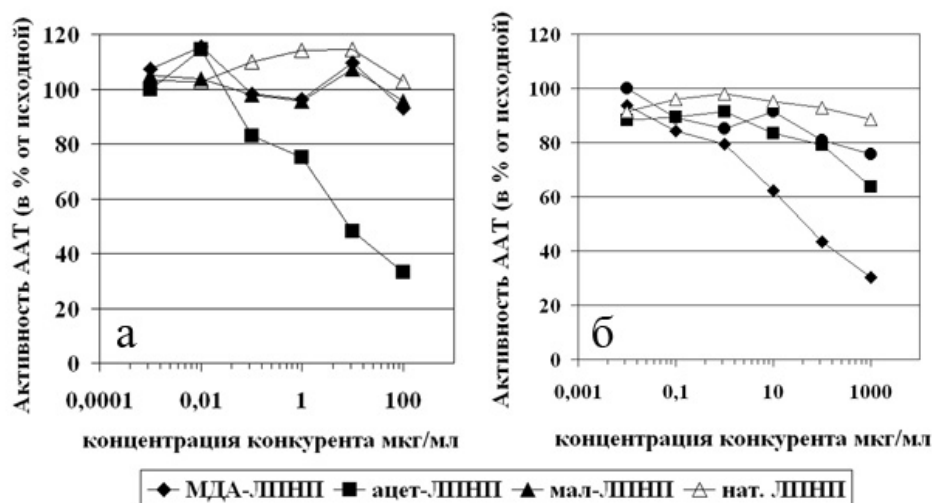
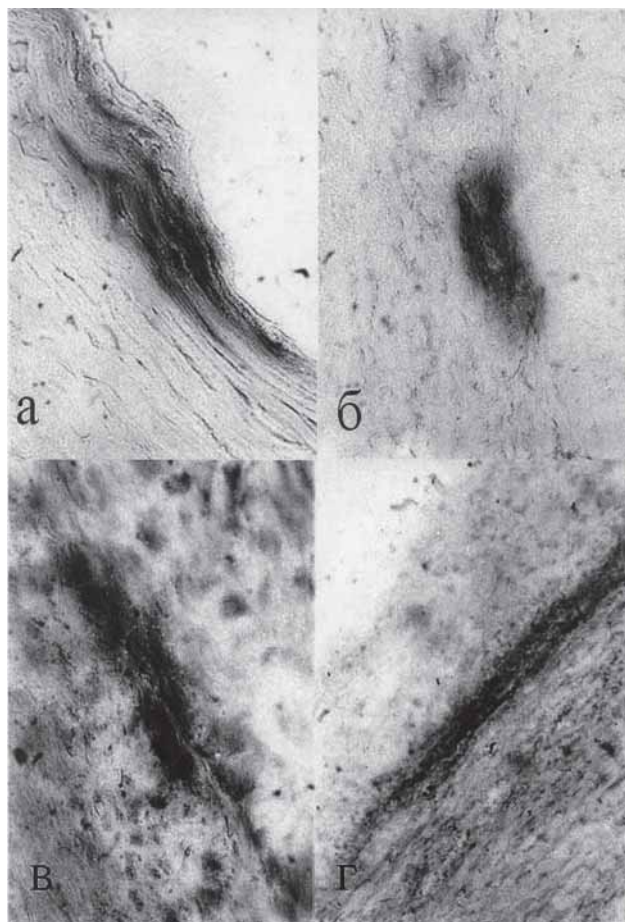


Рис. 1. Конкуренция различных антигенов за аутоантитела человека к ацетилованным (а) и МДА-модифицированным (б) ЛПНП.



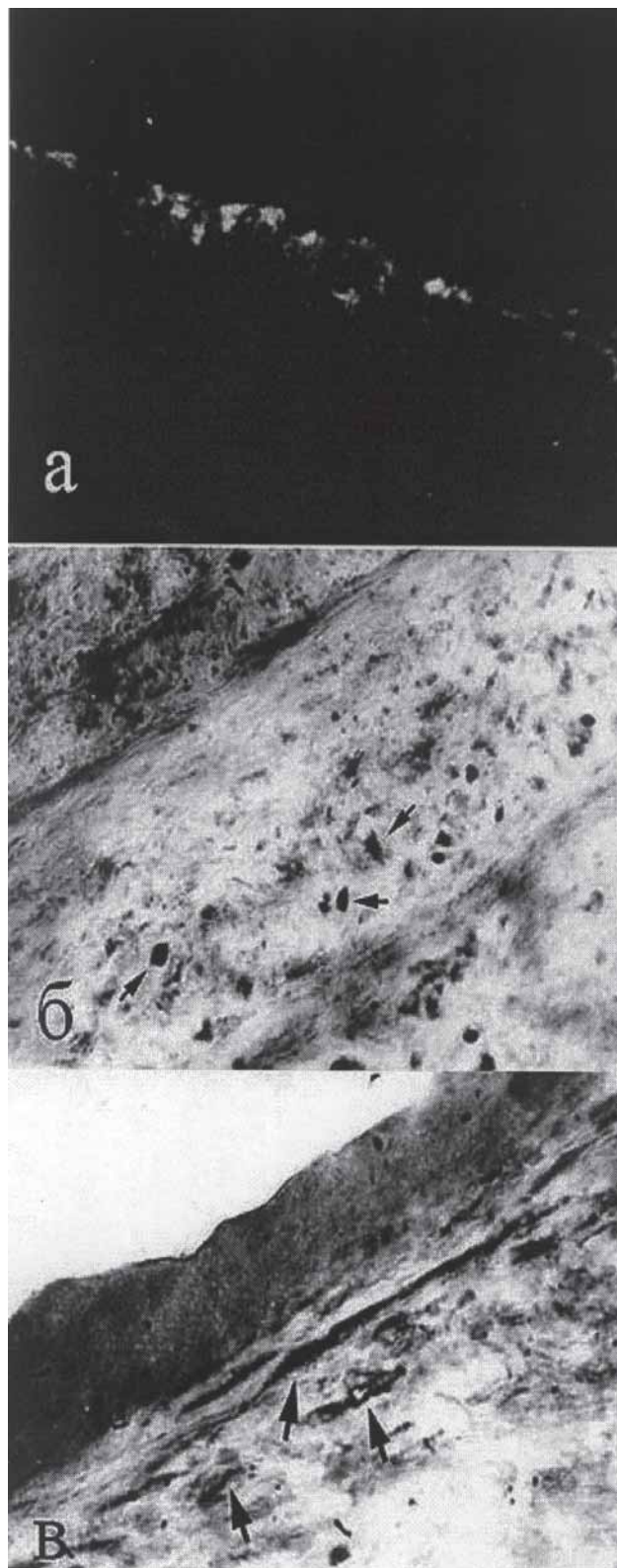


**Рис. 2. Внеклеточное отложение МДА-модифицированных белков в атеросклеротически измененной аорте человека:** а — в покрывке фиброзной бляшки, на месте перехода измененной интимы в нормальную; б — в субэндотелиальном слое в липидном пятне; в — на волокнистых структурах, находящихся на границе интимы и меди; г — отложение липидов на волокнистых структурах вдоль внутренней эластической мембраны. а, б, в — иммунопероксидазный метод, x 250; г — окраска Oil red O с докраской ядер гематоксилином, x 250.

нием липидов на границе интимы и меди вдоль внутренней эластической мембраны (рис. 2 г).

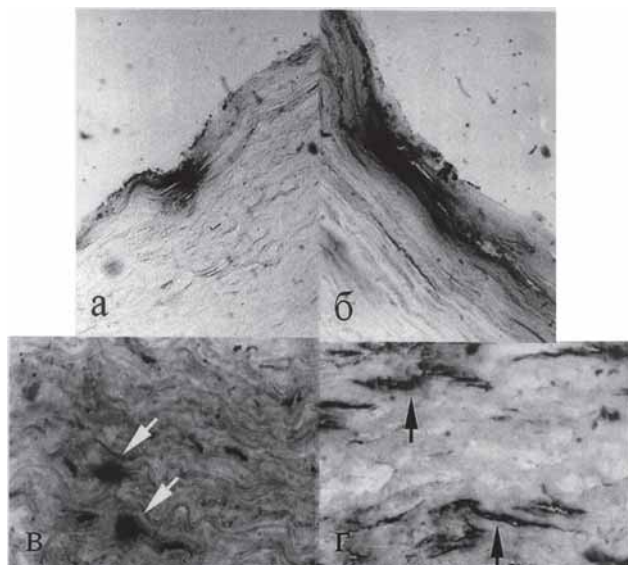
Наряду с внеклеточными отложениями, МДА-белки обнаруживались также в цитоплазме пенистых и гладкомышечных клеток, располагающихся как в субэндотелиальном слое интимы во всех исследованных поражениях, так и в глубоких отделах липидно-фиброзных и фиброзных бляшек (рис. 3 а-в).

Сходный характер распределения наблюдался и в отношении ацетилированных и малеилированных белков. Внеклеточные отложения этих белков выявлялись в субэндотелиальном слое липидных пятен в зоне свежих липидных отложений, а также в покрывке липидно-фиброзных и фиброзных бляшек (рис. 4 а, б). Как и в случае с МДА-модифицированными белками, они часто локализовались на месте перехода атеросклеротически измененной интимы в нормальную, в районе «плеча» бляшки. Внеклеточная локализация малеилированных и ацетилированных белков наблюдалась также в глубоких отделах

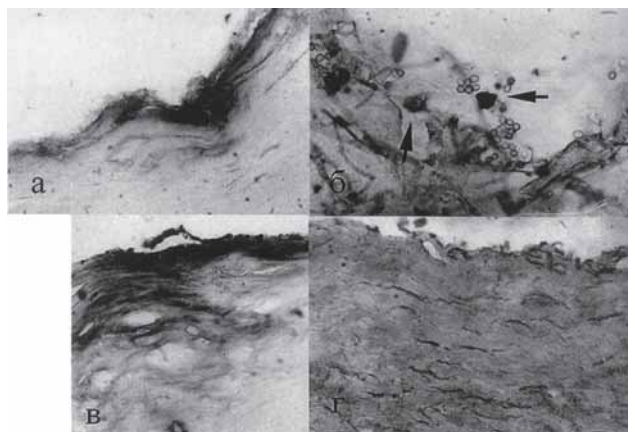


**Рис. 3. Внутриклеточное отложение МДА-модифицированных белков в атеросклеротически измененной аорте человека:** а — в цитоплазме пенистых клеток в субэндотелиальном слое липидного пятна; б — в макрофагах, располагающихся в основании фиброзной бляшки (указано стрелками); в — в цитоплазме гладкомышечных клеток из субэндотелиального слоя липидно-фиброзной бляшки (указано стрелками). а — окраска по Кунсу с использованием антител, меченных ФИТЦ, x 640; б, в — иммунопероксидазный метод, б x 250; в x 500.

липидно-фиброзных и фиброзных бляшек, в основном, на волокнистых структурах. Внутриклеточная локализация этих белков обнаруживалась преимущественно в цитоплазме макрофагов в глубоких слоях на границе нормальной и измененной интимы (рис. 4в). Кроме этого, ацетилированные белки были выявлены в цитоплазме отдельных гладкомышечных



**Рис. 4.** Вне- и внутриклеточные отложения ацетилированных и малеилированных белков в атеросклеротически измененной аорте человека: ацетилированные (а) и малеилированные (б) белки в покрывке фиброзной бляшки на месте перехода измененной интимы в нормальную; отложения ацетилированных белков (в) в макрофагах (указано стрелками) и малеилированных белков (г) в гладкомышечных клетках (указано стрелками), расположенных в основании липидно-фиброзной бляшки. а-г: иммунопероксидазный метод. а, в, г х 100; б х 500; в х 700; г х 450.



**Рис. 5.** Отложения апо В-содержащих липопротеинов в покрывке липидно-фиброзной бляшки в зоне перехода измененной интимы в нормальную (а) и в макрофагах (б), находящихся в адвентиции аорты под атеросклеротическими поражениями (указано стрелками); в — очаг отложения IgG в поверхностном отделе фиброзной бляшки; г — отсутствие апо В-содержащих липопротеинов в неизмененных участках сосудистой стенки. а-г: иммунопероксидазный метод. а, в, г х 160; б х 650.

клеток, которые располагались в верхней трети меди под липидными пятнами и липидно-фиброзными бляшками (рис. 4г).

Важно подчеркнуть, что в атероматозном ядре бляшек не были обнаружены эпитопы изученных типов модифицированных липопротеинов.

Одновременно с модифицированными белками были исследованы отложения апо В-содержащих липопротеинов в сосудистой стенке. Было показано, что эти липопротеины, как и липиды, выявляемые с помощью окраски Oil red O, обнаруживаются во всех типах атеросклеротических поражений. Причем характер их распределения оказался сходным с тем, который наблюдался в отношении изученных типов модифицированных белков. Так, были выявлены характерные диффузные отложения в поверхностных участках липидных пятен, а также липидно-фиброзных и фиброзных бляшек — на волокнистых структурах, в покрывке и переходной зоне между бляшкой и нормальной интимой (рис. 5а). Кроме того, очаги апо В-содержащих липопротеинов можно было наблюдать и в глубоких отделах интимы — в районе атеромы и в основании атеросклеротической бляшки. Они обнаруживались также в цитоплазме отдельных макрофагов в субэндотелиальном слое интимы в зоне липидных пятен, а также изредка — в макрофагах, располагающихся в адвентиции аорты непосредственно под атеросклеротическими поражениями (рис. 5б).

Оказалось, что после предварительного промывания образцов ткани с помощью PBS, в интиме аорты, в поверхностных или глубоких участках липидных пятен и атеросклеротических бляшек не удавалось обнаружить ни апо В-содержащие липопротеины, ни МДА-модифицированные, ацетилированные или малеилированные белки (рис. 5в). Этот факт может служить доказательством того, что обнаруживаемые с помощью антител к ЛПНП эпитопы принадлежат не структурным, но неким водорастворимым белкам, какими являются и ЛПНП.

При изучении нормальных, неизмененных участков сосудистой стенки отложения апо В-содержащих липопротеинов, а также модифицированных белков не были обнаружены (рис. 5г). Отсутствие окрашивания в неизмененных участках аорты свидетельствует о том, что выявление эпитопов модифицированных белков не было артефактом, т.е. не происходила их модификация в ходе экспериментальных процедур.

Следует отметить, что в тех зонах, где определялись модифицированные белки, а также апо В-содержащие липопротеины, часто одновременно выявлялись очаги отложения IgG (рис. 5в).

Важно, что при постановке отрицательных контролей во всех исследованных образцах окрашивание (свечение) не наблюдалось. Кроме того, после предварительного нанесения немеченых специфических



антител к МДА-модифицированным, ацетилованным и малеилированным ЛПНП, в образцах не удавалось выявить соответствующие модифицированные белки. В совокупности эти данные свидетельствуют о специфическом выявлении эпитопов модифицированных белков.

## Обсуждение

Обнаружение в крови человека новых типов ААТ, направленных к ацет- и мал-ЛПНП, помимо хорошо описанных аутоантител к МДА-ЛПНП [11], послужило стимулом к поиску соответствующих лигандов *in vivo*, которые могли бы служить причиной появления таких антител. Поскольку хорошо известна способность модифицированных липопротеинов накапливаться в стенке крупных кровеносных сосудов, с чем и связана их атерогенность [1], объектом исследования стали срезы человеческой аорты с атеросклеротическими поражениями.

Действительно, в результате иммуногистохимических исследований, нам удалось показать присутствие в сосудистой стенке эпитопов, распознаваемых антителами к МДА-, ацет- и мал-ЛПНП.

В целом, модифицированные белки обнаруживались на всех стадиях атерогенеза, начиная с самых ранних (липидные пятна), и характер их отложений был разнообразным. Были выявлены как внутриклеточные, так и диффузные отложения, в покрышке, верхних и глубоких слоях поражений.

Наиболее характерный тип отложений для всех модифицированных белков, а также апо В — внеклеточные отложения в покрышке липидных пятен и бляшек, особенно в переходной «плечевой» зоне. Эти результаты особенно интересны в свете сложившихся к настоящему времени представлений о том, что именно в этих зонах происходит активный рост бляшки [3]. По-видимому, это сопряжено с проникновением в эти участки модифицированных ЛПНП или же модификацией липопротеинов *in situ*.

Хорошо известна способность ЛПНП образовывать комплексы со структурными белками матрикса [1], что может обуславливать задержку ЛПНП в интимае и их последующую модификацию. Этим можно объяснить частое обнаружение отложений модифицированных белков, пропитывающих волокнистые структуры бляшек. К отложениям такого типа относится и локализация модифицированных белков вдоль внутренней эластической мембраны. Наблюдаемая картина может быть объяснена тем, что проникшие в интиму ЛПНП, достигнув границы внутренней эластической мембраны, частично задерживаются на ней.

Помимо диффузных отложений, встречались и внутриклеточные отложения модифицированных белков, предположительно, в цитоплазме макрофагов и гладкомышечных клеток, как в поверхностных,

так и в глубоких отделах пораженной интимы. Эти наблюдения согласуются с хорошо известным фактом, что модифицированные ЛПНП активно захватываются макрофагами, в результате чего последние, в условиях клеточного дефицита в интимае, превращаются в пенистые клетки [4].

Может показаться удивительным, что эпитопы модифицированных белков не были обнаружены в самом атероматозном ядре, в «эпицентре событий». Следует учитывать, что именно в этой зоне очень интенсивно протекают деструктивные процессы. По-видимому, попадающие сюда ЛПНП претерпевают очень сильные превращения, в том числе протеолиз и изменение конформации, в результате чего антитела теряют способность с ними связываться. В этом случае, становится непонятным, почему удавалось обнаружить апо В в атероматозном ядре. Можно предполагать, что использованные в данном исследовании поликлональные антитела к апо В были направлены к самым различным эпитопам этого белка, в том числе и к небольшим пептидам, которые, по-видимому, сохранялись даже в атероме и обеспечивали возможность иммуногистохимического окрашивания.

Тот факт, что кроличьи и человеческие антитела, специфичные к модифицированным ЛПНП, распознавали также и соответствующим образом модифицированные (МДА-модифицированные, ацетилованные и малеилированные) белки иной природы, не позволяет однозначно говорить о том, что в стенке аорты были выявлены именно модифицированные ЛПНП. В то же время, ряд данных косвенно свидетельствуют в пользу этого предположения. Во-первых, обнаружена солокализация модифицированных белков с отложениями апо В-содержащих липопротеинов. Отмечался также сходный характер распределения модифицированных белков и липидов, что указывает на липидную природу выявляемого антигена. Во-вторых, было доказано, что выявляемые эпитопы не могли располагаться на белках клеточного матрикса или на поверхности клеточных мембран, поскольку белки, несущие эти эпитопы, растворялись в фосфатно-солевом буфере.

Очень важным результатом является тот факт, что эпитопы модифицированных белков были обнаружены только в атеросклеротически пораженных участках аорты, но не в нормальной интимае. Эти данные могут говорить о вероятном участии белков, несущих подобные эпитопы, в развитии атеросклеротических поражений.

Солокализация иммуноглобулинов с отложениями модифицированных белков и апо В, в совокупности с фактом обнаружения специфических аутоантител к ЛПНП в экстрактах аорты, может косвенно свидетельствовать о присутствии в сосудистой стенке иммунных комплексов, содержащих изучаемые ЛПНП.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что выявленные модификации ЛПНП, по-видимому, формируются в артериальной стенке, где накапливающиеся ЛПНП могут сохраняться длительное время.

## Список литературы

1. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения // СПб.: Питер Ком, 1999.
2. Fields R. The rapid determination of amino groups with TNBS // *Methods Enzymol.* 1972. — Vol.25. — P.464-468.
3. Hansson G.K. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease // *N. Eng. J. Med.* — 2005. — Vol.352. — P.1685-1695.
4. Itabe H. Oxidized low-density lipoproteins: what is understood and what remains to be clarified // *Biol. Pharm. Bull.* — 2003. — Vol.26. — №1. — P.1-9.
5. Kawai Y., Kato Y., Fujii H., Makino Y., Mori Y., Naito M., Osawa T. Immunochemical detection of a novel lysine adduct using an antibody to linoleic acid hydroperoxide-modified protein // *J. Lipid Res.* — 2003. — Vol.44. — P.1124-1131.
6. Kim J.G., Taylor W.R., Parthasarathy S. Demonstration of the presence of lipid peroxide-modified proteins in human atherosclerotic lesions using a novel lipid peroxide-modified anti-peptide antibody. // *Atherosclerosis.* — 1999. — Vol.143. — P.335-340.
7. Lindgren F.T., Jensen L.C., Hatch F.T. The isolation and quantitative analysis of serum lipoproteins / *Blood lipids and lipoproteins: Quantitation, Composition and Metabolism* / Ed. G.J. Nelson, - N.Y., Interscience, 1972. — P.181-274.
8. Markwell M.A.K., Haas S.M., Bieber L.L., Tolbert N.E. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples // *Anal. Biochem.* — 1978. — Vol.87. — P.206-210.
9. Rosenfeld M.E., Palinski W., Yla-Herttuala S., Butler S., Witztum J.L. Distribution of oxidation specific lipid-protein adducts and apolipoprotein B in atherosclerotic lesions of varying severity from WHHL rabbits // *Arteriosclerosis.* — 1990. — Vol.10. — P.336-349.
10. Sakata N., Imanaga Y., Meng J., Tachikawa Y., Takebayashi S., Nagai R., Horiuchi S., Itabe H., Takano T. Immunohistochemical localization of different epitopes of advanced glycation end products in human atherosclerotic lesions // *Atherosclerosis.* — 1998. — Vol.141. — P.61-75.
11. Virella G., Koskinen S., Krings G., Onorato J.M., Thorpe S.R., Lopes-Virella M. Immunochemical characterization of purified human oxidized low-density lipoprotein antibodies // *Clin. Immunol.* — 2000. — Vol.95. — P.135-144.
12. Yla-Herttuala S., Palinski W., Rosenfeld M.E., Parthasarathy S., Carew T.E., Butler S., Witztum J.L., Steinberg D. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man // *J. Clin. Invest.* — 1989. — Vol. 84. — P.1086-1095.

поступила в редакцию 11.09.2006

принята к печати 29.09.06