

**ВЛИЯНИЕ ЛИПИДСОДЕРЖАЩИХ ИММУННЫХ
КОМПЛЕКСОВ НА МИГРАЦИОННУЮ И СЕКРЕТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ
МОНОЦИТОВ IN VITRO**

ГУ «Институт терапии им. Л.Т.Малой НАМН Украины» (г. Харьков)

Работа выполнена в рамках НИР ««Виявити особливості розвитку атеросклерозу у хворих на хронічний гломеруло- та пієлонефрит з урахуванням функціонально-морфологічних чинників ендотелію і розробити методи їх лікування та профілактики ускладнень», № госрегистрации 0109U001126.

Вступление. Многочисленные экспериментальные и клинические исследования последних лет показали разнообразие течения и тесную взаимосвязь множества процессов, вовлеченных в развитие атеросклероза. [1, 8]. Как известно, функциональная и структурная дезорганизации моноцитов и превращение их в пенистые клетки связаны с образованием модифицированных липопротеинов низкой плотности (мЛПНП). [3, 12]. Многими авторами отмечена высокая иммуногенность мЛПНП, их способность к агрегации. Обладая аутоантигенными свойствами, циркулирующие мЛМНП инициируют выработку соответствующих антител и образуют с ними иммунные комплексы мЛПНП – IgG [9, 10]. Как показали исследования in vitro, циркулирующие комплексы мЛПНП-IgG обладают гораздо большей атерогенностью, чем сами ЛПНП [18]. По данным И.А.Собенина и соавт. уровень холестерина в изолированных иммунных комплексах коррелирует с тяжестью коронарного атеросклероза [4]. Моноциты, преинкубированные с комплексами мЛПНП-IgG активно их фагоцитируют, трансформируясь в липиднагруженные макрофаги [14]. В клинических и экспериментальных исследованиях была установлена связь между присутствием в крови циркулирующих иммунных комплексов ЛПНП- IgG и развитием атеросклероза [11].

Цель исследования – оценить влияние липидсодержащих иммунных комплексов (ЛИК) на миграционную и функциональную активность моноцитов крови в условиях in vitro.

Объект и методы исследования. В исследованиях использовалась стабилизированная 0,1% раствором ЭДТА кровь 10 здоровых доноров (мужчины и женщины в возрасте от 25 до 45 лет). Моноциты из цельной крови выделяли путем градиентного центрифугирования по Recalde [15]. В экспериментах использовали суспензию моноцитов, содержащую не менее 90 % живых клеток (окрашиванием моноцитов трипановым синим).

ЛИК выделяли у больных с острым коронарным синдромом реакцией преципитации с ПЭГ [6]. Содержание липидов в ЛИК определяли фотометрически. Миграцию моноцитов изучали в камере Бойдена на поликарбонатных мембранных фильтрах с

диаметром пор 8 мкм (Poretics Co.) [7]. В качестве хемоаттрактантов использовали ЛИК и трипептид формил-метионил-лейцин-фенилаланин (fMLP). Мигрировавшие моноциты подсчитывали под микроскопом в 10 случайных полях при 400-кратном увеличении. Для исследования секреторной активности моноциты инкубировали 18 часов с ЛИК (30 мкгХС/мл) при 37°C. Концентрацию ИЛ-1β и ИЛ-6 в аликвотах инкубационной среды определяли иммуноферментным методом с использованием тест-систем “ProCon” (Россия).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного пакета Statistica. Данные выражали в виде средних арифметических и их стандартных ошибок (M+m). Достоверность различий между сравниваемыми величинами определяли по t-критерию Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение.

В исследованиях хемотаксиса лейкоцитов в ответ на ЛИК in vitro в качестве стандартного хемоаттрактанта для сравнительного анализа использовали N-формилловый олигопептид fMLP (10⁻⁸ моль/л) [2, 13]. В качестве контроля определяли спонтанную миграцию моноцитов. Помещенные в нижний отдел камеры Бойдена fMLP или ЛИК вызывали активную миграцию моноцитов (10⁶ кл/мл среды) из верхнего отдела камеры вдоль градиента концентрации хемоаттрактанта. Величина таксиса моноцитов к fMLP составила (96±5) кл/мм². Как показали дальнейшие исследования, ЛИК являются мощным хемотаксисом и вызывают активную миграцию клеток – (63±8) кл/мм². Миграция моноцитов через поры фильтра в камере Бойдена представлена на **рисунке 1**.

Следует отметить, что выявленная хемоаттрактантная активность ЛИК является весьма существенным показателем, так как среди моноцитов крови человека только 35-40% клеток способны мигрировать в ответ на общепринятые хемотаксисические стимулы.

Иммунные комплексы, (мЛПНП-антитело), являются мощным стимулом для активации моноцитов [16, 18]. Как известно, одним из наиболее значимых параметров активации моноцитов является повышение их секреторной активности, которое приводит к усиленному высвобождению активных радикалов, что, в свою очередь, увеличивает риск модификации ЛПНП и повышает их иммуногенность [11]. Для исследования влияния ЛИК на секреторную активность моноцитов клетки инкубировали с ЛИК и определяли уровни провоспалительных

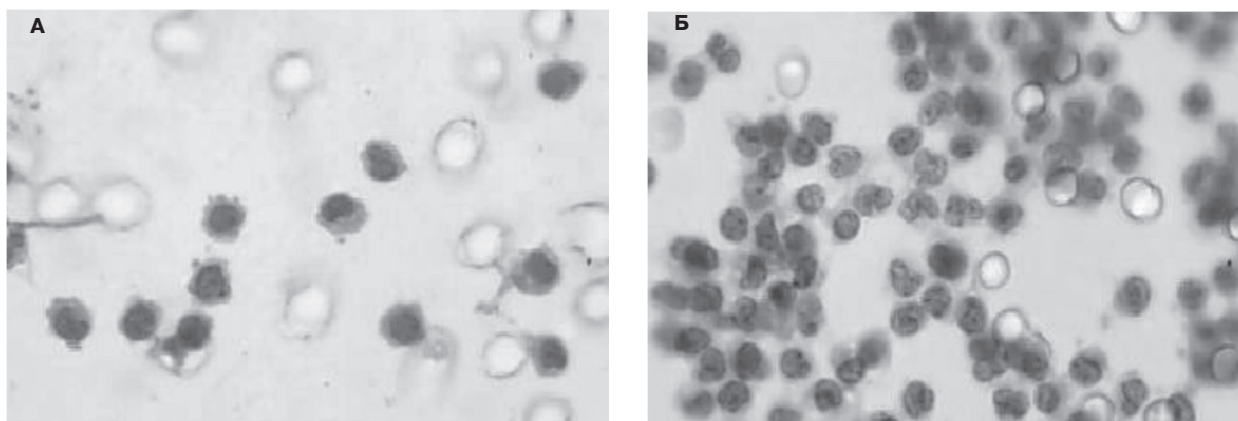


Рис. 1. Миграция моноцитов через поры поликарбонатных мембранных фильтров в камере Бойдена. Гематоксилин-эозин 4400. А – Спонтанная миграция; Б – Миграция в ответ на ЛИК.

цитокинов (ИЛ β -1 и ИЛ-6) в аликвотах инкубационной среды (**рис. 2**).

Инкубация моноцитов с ЛИК способствовала повышению секреторной активности клеток, о чем свидетельствовало достоверное ($P < 0,05$) возрастание уровня ИЛ-1 β и ИЛ-6 инкубационной среде до ($2165,8 \pm 87,8$) пкг/мл и ($1450,6 \pm 73,5$) пкг/мл

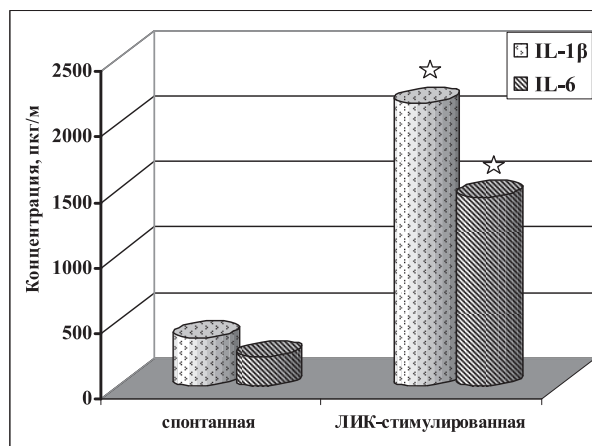


Рис. 2. Оценка секреторной активности моноцитов *in vitro*.

★ - достоверно по сравнению со спонтанной секрецией, $P < 0,05$.

по сравнению со спонтанным их высвобождением - ($375,4 \pm 38,9$) пкг/мл и ($226,3 \pm 23,8$) пкг/мл, соответственно.

В исследованиях секреторной функции моноцитов *in vitro* показано зависимое от длительности

культивирования увеличение спонтанной секреции провоспалительных цитокинов в культуральной среде [5]. В ряде работ показано, что ИК (ЛПНП-антитело) повышают трансформацию макрофагов в пенистые клетки и способствуют усилению секреции таких провоспалительных цитокинов, как ИЛ-1 β и TNF [16].

В данном случае повышение ЛИК-индуцированной секреции цитокинов *in vitro* отражает потенциальную, резервную способность моноцитов отвечать на антигенный стимул (в частности, на присутствие ЛИК) *in vivo* и свидетельствует о несомненном активном участии этих клеток в реализации локального воспалительного ответа при атеросклерозе.

Выводы.

1. ЛИК обладают выраженными хемоаттрактантными свойствами по отношению к моноцитам и могут вызывать активную миграцию моноцитов в интиму артерий *in vivo*.

2. ЛИК оказывают на изолированные моноциты стимулирующее действие, вызывая активную секрецию провоспалительных цитокинов ИЛ-1 и ИЛ-6 в инкубационную среду.

3. Способность ЛИК влиять на миграционную и секреторную активность моноцитов *in vitro* доказывает их существенную роль в пусковых механизмах атерогенеза *in vivo*.

Перспективы дальнейших исследований. В дальнейшем планируется изучение влияния ЛИК на фенотипические характеристики моноцитов в плане изменения популяционного состава клеток при атеросклерозе.

Список литературы

1. Визир В.А. Иммунопатология атеросклероза. Значение биологических маркеров в оценке кардиоваскулярного риска / В.А. Визир, А.Е. Березин //Укр. мед. часопис. – 2010. - № 2 76), III/IV. - С. 76-83.
2. Гоженко А.И. Механизмы хемотаксиса моноцитов при воспалении / А.И. Гоженко, В.П. Бабий, С.Г. Котюжинская и др. //Акт. пробл. трансп. медицины. - 2006. - № 3(5). - С. 56-63.
3. Ланкин В.З. Особенности модификации липопротеинов низкой плотности в развитии атеросклероза и сахарного диабета типа 2 / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, Е.М. Кумскова //Кардиол. Вестник. – 2008. – Т. 3, № 1. – С. 60-67.
4. Собенин И.А. Иммунный холестерин в крови – прогностическая ценность / И.А. Собенин, В.П. Карагодин, А.А. Мельниченко //Физиотерапия. – 2011. – Т. 12, № 19. - С 1147-1155 – Режим доступа до журн.: WWW . MEDLINE . RU
5. Стериони И.В. Секреторная активность интактных моноцитов *in vitro*. / И.В Стериони //Укр. медич. Альманах. – 2009. – Т. 12, № 1. – С. 158-159.

6. Стручков И.В. Скрининг-тест для оценки патогенных свойств иммунных комплексов / И.В.Стручков, И.А. Константинова, А.А. Лавреница // Лаб. дело. - 1985. - №7. - С.411-412.
7. Adams D.O. The cell biology of macrophage activation / D.O. Adams, T.A. Hamilton // Ann. Rev. Immunol. - 1984. - Vol. 2. - P. 283-318.
8. Badimyna L Lipoproteins, Platelets and Atherothrombosis / L. Badimyna, G. Vilahurb, T. Padryc // Rev. Esp. Cardiol. - 2009. - Vol. 62, № 10. - P. 1161-1178.
9. Burut D.F. The role of immune complexes in atherogenesis. / D.F. Burut, Y. Karim, G.A. Ferns // Angiology. - 2010. - № 61(7). - P. 679-689.
10. Kurien B.T. Autoimmunity and oxidatively modified autoantigens / B.T. Kurien, R.H. Scofield // Autoimmun. Rev. - 2008. - № 7(7). - P. 567-573.
11. Mayr M. Oxidized low-density lipoprotein autoantibodies, chronic infections, and carotid atherosclerosis in a population-based study. / M. Mayr, S. Kiechl, S. Tsimikas et al. // J. Am. Coll. Cardiol. - 2006. - № 47. - P. 2436-2443.
12. Oksjoki R., OxLDL-IgG immune complexes induce survival of human monocytes / R. Oksjoki, P.T. Kovanen, K.A. Lindstedt et al. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. - 2006. - Vol. 26(3). - P.576-583.
13. Parent C.A. Making all the right moves: chemotaxis in neutrophils and Dictyostelium / C.A Parent // Curr. Opin. in Cell Biology. - 2004. - Vol. 16, Issue 1. - P. 4-13.
14. Persson J. Cytokine response to lipoprotein lipid loading in human monocyte-derived macrophages / J. Persson, J. Nilsson, M.W. Lindholm // Lipids in Health and Disease. - 2006. - Vol. 5(17). - P. 1-8.
15. Recalde H.R. A simple method of obtaining monocytes in suspension / H.R Recalde // J. Immunol. Meth. - 1984. - Vol.69, № 1. - P. 71-72.
16. Saad A.F. OxLDL immune complexes activate complement and induce cytokine production by MonoMac 6 cells and human macrophages. / A.F. Saad, G. Virella, C. Chassereau, et al. // J. Lipid Res. - 2006. - Vol. 47. - P. 1975-1983.
17. Sprague A.H.. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease / A.H. Sprague, R.A Khalil. // Biochem. Pharmacol. - 2009. - Vol. 78(6). - P.539-552.
18. Virella G. Atherosclerosis and the humoral immune response to modified lipoproteins / G. Virella, M. F Lopes-Virella. // Atherosclerosis. - 2009. - № 1. - P. 2-12.

УДК 616.155.33:576.8.077.3

ВПЛИВ ІМУННИХ КОМПЛЕКСІВ, ЩО ВМІЩУЮТЬ ЛІПІДИ, НА МІГРАЦІЙНУ І СЕКРЕТОРНУ АКТИВНІСТЬ МОНОЦИТІВ IN VITRO

Єфімова Н.В., Гальчинська В.Ю., Семенових П.С., Шапкін А.С.

Резюме. Досліджено вплив імунних комплексів з підвищеним вмістом ліпідів (ЛІК) на міграційну та секреторну активність моноцитів in vitro. Таксис моноцитів на fMLP становив (96 ± 5) кл/мм², на ЛІК - (63 ± 8) кл/мм². ЛІК підвищують секрецію моноцитами ІЛ-1 β до $(2165,8 \pm 87,8)$ пкг/мл та ІЛ-6 до $(1450,6 \pm 73,5)$ пкг/мл в порівнянні з контролем ($P < 0,05$). ЛІК-індуковане підвищення міграційної та секреторної активності моноцитів in vitro відображає потенційну здібність клітин відповідати на патогенні стимули in vivo та свідчить про несумнівну активну участь цих клітин в атерогенезі.

Ключові слова: імунні комплекси, що вміщують ліпіди, моноцити, міграція, секреція інтерлейкінів.

УДК 616.155.33:576.8.077.3

ВЛИЯНИЕ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ, СОДЕРЖАЩИХ ЛИПИДЫ, НА МИГРАЦИОННУЮ И СЕКРЕТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ МОНОЦИТОВ IN VITRO

Ефимова Н.В., Гальчинская В.Ю., Семеновых П.С., Шапкин А.С.

Резюме. Исследовано влияние иммунных комплексов с повышенным содержанием липидов (ПСЛ) на миграционную и секреторную активность моноцитов in vitro. Таксис моноцитов на fMLP составлял (96 ± 5) кл/мм², на ПСЛ - (63 ± 8) кл/мм². ПСЛ повышают секрецию моноцитами ИЛ-1 β к $(2165,8 \pm 87,8)$ пкг/мл и ИЛ-6 к $(1450,6 \pm 73,5)$ пкг/мл по сравнению с контролем ($P < 0,05$). ПСЛ-индуцированное повышение миграционной и секреторной активности моноцитов in vitro отображает потенциальную способность клеток отвечать на патогенные стимулы in vivo и свидетельствует о несомнительном активном участии этих клеток в атерогенезе.

Ключевые слова: иммунные комплексы, содержащие липиды, моноциты, миграция, секреция интерлейкина.

UDC 616.155.33:576.8.077.3

Influence Of Lipid-Containing Immune Complexes On Monocytes Migratory And Secretory Activity In Vitro
Yefimova N.V., Galchinskaya V.Yu., Semenovih P.S., Shapkin A.S.

Summary. Influence of lipid-containing immune complexes (LIC) on the monocyte functional state was investigated in vitro. The monocyte taxis to fMLP was (96 ± 5) cells/mm² and to LIC - (63 ± 8) cells/mm². LIC increased of IL-1 β and IL-6 secretion to $(2165,8 \pm 87,8)$ pg/ml and $(1450,6 \pm 735)$ pg/ml compared to control ($P < 0,05$). LIC-stimulated elevation of migration and cytokine secretion in vitro may be evidence of potential ability of monocytes to answer on the pathogenic stimulus in vivo. These data suggest that these cells may play a key role in an atherogenesis.

Key words: monocytes, lipid-containing immune complexes, chemotaxis, secretion of interleukines in vitro.

Стаття надійшла 14.03.2012 р.

Рецензент – проф. Цебржинський О.І.