

ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

На правах рукописи

ЛОЖКИН АНДРЕЙ ПЕТРОВИЧ

**ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ В
ФОРМИРОВАНИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА
ПРИ АТЕРОГЕНЕЗЕ**

03.01.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань-2011

Работа выполнена на кафедре микробиологии ФГАОУВПО “Казанский (Приволжский) федеральный университет”

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор,
академик АН РТ
Ильинская Ольга Николаевна

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Черепнев Георгий Викторович

доктор биологических наук, профессор
Алимова Фарида Кашивовна

Ведущая организация: Казанский институт биохимии и биофизики
КНЦ РАН, г. Казань

Защита диссертации состоится «24» ноября 2011 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при ФГАОУВПО “Казанский (Приволжский) федеральный университет” по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, главное здание, ауд. 211.
Факс 8(843)238-71-21, 233-78-40. *E-mail: lozhkinandrey@gmail.com*

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н. И. Лобачевского при ФГАОУВПО “Казанском (Приволжском) Федеральном университете”

Автореферат разослан « » октября 2011 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

З. И. Абрамова

Актуальность работы. Атеросклероз, представленный в форме цереброваскулярных и коронарно-артериальных заболеваний – лидирующая причина смертности взрослого населения в мире [Murray, Lopez, 1997, Okrainec *et al.*, 2004]. Только в 2005 году от сердечнососудистых заболеваний (ССЗ) в США погибло 864500 человек, что составило примерно 35,2% от общего количества смертей. К этому числу относятся 151000 смертей от инфаркта миокарда и 143000 смертей от ишемического инсульта. [Lloyd *et al.*, 2009].

В связи с тем, что атеросклероз является основной причиной ишемической болезни сердца и цереброваскулярной болезни, не только профилактика и лечение, но и своевременная диагностика данного заболевания представляют собой актуальную проблему. Существует множество определений атеросклероза, но большинство из них сходятся в одном – атеросклероз связан с патологическими процессами, происходящими в стенке сосуда, в которых участвуют несколько типов клеток, неотъемлемой частью атерогенеза также является процесс воспаления. Именно на воспалительный ответ указал в своем определении автор наиболее современной гипотезы атеросклероза – Рассел Росс: “Атерогенез - повреждение эндотелия, приводящее к воспалительному и фибропролиферативному ответам, переходящим в патологический процесс” [Ross, 1993]. В свою очередь Шварц с соавторами в своем определении атеросклероза достаточно полно описали типы клеток, участвующих в атерогенезе: “Атеросклероз – хроническое заболевание, вызванное повреждением стенок артерий в процессе воспаления и отложениями, состоящими из жировой и фиброзной ткани. В развитие заболевания вовлечено несколько типов клеток, в частности клетки гладкой мускулатуры, макрофаги, Т-лимфоциты и тромбоциты” [Schwartz *et al.*, 1993].

Повышенный уровень генерации активных форм кислорода (АФК) в стенке сосуда признан тремя доминирующими гипотезами атерогенеза как один стартовых механизмов, запускающих цепь событий, приводящих к формированию атеросклеротических повреждений сосудов.

Согласно модификационной гипотезе, перекисное окисление полиненасыщенных жирных кислот в составе липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), инициированное активными формами кислорода, представляет собой отправную точку атерогенеза [Jialal, 1998]. Окислительно-модифицированные ЛПНП представляют собой один из типов аутоантигенов, обнаруженных в атеросклеротических бляшках [Nilsson, Hansson, 2008]. Модификации ЛПНП, вызванные окислением, приводят к высвобождению фосфолипидов и пероксидов липидов, которые вызывают иммунный ответ у окружающих клеток [Glass, Witztum, 2001].

Гипотеза о митохондриальной дисфункции базируется на утверждении, что увеличенная генерация активных форм кислорода митохондриями ответственна за состояние эндотелиальной дисфункции, потерю способности релаксации [Wenzel *et al.*, 2008] и развитие воспаления в стенке сосуда,

ведущего к возникновению сердечнососудистых заболеваний [Ballinger, 2005].

В стенке сосуда присутствуют разнообразные ферментные системы, участвующие в генерации АФК, среди них NAD(P)H – оксидаза, ксантин оксидаза, мономерная форма эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), цитохром P-450, липоксигеназа, циклооксигеназа, а также митохондриальная электрон-транспортная цепь (ЭТЦ) [Li, Shah, 2004]. Внимание исследователей сконцентрировано на NAD(P)H оксидазе как основном регуляторе редокс состояния сосудов и миокарда [Griendling *et al.*, 2000]. Наиболее активная NAD(P)H оксидаза обнаружена у клеток иммунной системы [Babior, 2004] нейтрофилов [Batot *et al.*, 1995], эозинофилов, моноцитов и макрофагов [Segal *et al.*, 1981]. Показано, что повышенный уровень таких хемокинов, как MCP-1 и MIP-1, в сыворотке крови пациентов с нестабильной и стабильной стенокардией ассоциирован со сниженной концентрацией антиоксидантов и усиленным перекисным окислением липидов, предполагая наличие окислительного стресса [Aukrust *et al.*, 2001]. В свете данных о неоспоримой роли активированных клеток иммунной системы, в частности макрофагов, и окислительного стресса в развитии атеросклероза и сопутствующих ему осложнений, представляется весьма перспективным установление механизмов, лежащих в основе усиления экспрессии хемокинов, приводящих к активации и хемотаксису иммунных клеток, участвующих в генерации АФК.

Целью данной работы явился анализ вовлеченности биохимических и иммунологических процессов в формирование окислительного стресса при атерогенезе.

Ставились следующие **задачи**:

1. Выявить генерацию АФК методом спинового зондирования образцов атеросклеротических бляшек, оценить в исследуемых клинических образцах вклад реакции Фентона в окислительный стресс.

2. Определить методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой количественное содержание Ca, P, Cu, Fe, Zn, Mn в образцах атеросклеротических бляшек, оценить степень кальцификации образцов и выявить корреляцию между данными параметрами.

3. Идентифицировать методом ЭПР наличие ионов Mn^{2+} в образцах атеросклеротических бляшек с органоминеральным агрегатом и в образцах, не содержащих кальцифицированного матрикса.

4. Установить зависимость синтеза гормонов лептина и инсулина, а также хемокинов MCP-1, RANTES, KC, MIP-1 от наличия и активации рецептора CD40 в плазме мышей линии C57BL/6.

5. Определить влияние введения анти-CD40 активирующего антитела мышам линии C57BL/6 на продукцию хемокина MCP-1 и фосфорилирование провоспалительной p38 и противовоспалительной ERK киназ в перитонеальных макрофагах.

6. Выявить изменение синтеза хемокина MCP-1 в Т-клетках, выделенных из селезенки мышей, после активации рецептора CD40.

Научная новизна. Методом ЭПР-спектроскопии с применением методики спинового зондирования выявлена генерация АФК и протекание реакции Фентона в образцах атеросклеротических бляшек. Методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой определено содержание ряда элементов, установлена статистически значимая корреляция между концентрацией ионов марганца и степенью кальцификации, также W-диапазоне ЭПР обнаружен сигнал комплексов двухвалентного марганца образцах атеросклеротических бляшек и зафиксировано заметное различие формы линии ЭПР сигналов этого элемента в кальцифицированных тканях и образцах без минеральных отложений.

В ходе работы показаны возможные механизмы формирования окислительного стресса при активации рецептора CD40. Полученные нами данные о снижении продукции лептина жировой тканью, активированной агонистом CD40, согласуются с современными представлениями об иммунологической основе метаболических заболеваний. Кроме того выявлены зависимости концентраций ряда цитокинов, в том числе MCP-1, одного из наиболее значимых проатерогенных факторов, от дефицита и активации рецептора CD40. Установлено, что активация этого рецептора приводит к провоспалительному ответу макрофагов и усилению синтеза MCP-1.

Практическая значимость. Показанная в работе обратная взаимосвязь между концентрацией ионов марганца и степенью кальцификации в образцах атеросклеротических бляшек может послужить основой для разработки методов диагностики минерализации стенки сосуда.

Примененная нами модель атерогенеза у мышей, индуцированная диетой без генетических модификаций путей метаболизма ЛПНП, наиболее близка современной статистике, согласно которой гипергликемия и гиперхолестеринемия представляют собой одни из самых распространенных факторов риска развития сердечнососудистых заболеваний. Это позволяет нам полагать, что закономерности, установленные в процессе наших *in vivo* исследований на мышах, могут быть значимы в отношении человека. Установленная нами взаимосвязь между активацией рецептора CD40, усилением синтеза одного из наиболее перспективных предикторов нестабильности атеросклеротических бляшек, MCP-1, и фосфорилированием провоспалительной киназы p38 может послужить основой для разработки стратегии создания молекулярных лекарственных препаратов. Согласно новаторским работам блокада фосфорилирования ряда провоспалительных киназ на модели мышей уже зарекомендовала себя как действенное средство замедления развития атеросклероза.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Работа выполнена в соответствии с тематическим планом КФУ 1.15.56 «Механизмы регуляции функциональной активности клеток» при поддержке АБЦП «Развитие научного потенциала высшей школы» (2.1.1/920), государственного контракта №02.740.11.0391, гранта РФФИ 09-02-97017, совместного гранта Министерства образования и науки

Российской Федерации и Германской службы академических обменов «Михаил Ломоносов II».

Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора. ЭПР-спектроскопию проводили в отделе ЭПР спектроскопии под руководством д.ф.-м.н, профессора Силкина Н.И., масс-спектрометрию – в лаборатории д.ф.-м.н, профессора Гильмутдинова А.Х. при участии к.ф.-м.н. Волошина А.В. отдела аналитической спектроскопии Федерального центра коллективного пользования физико-химических исследований веществ и материалов Приволжского федерального округа. Иммунологические исследования осуществляли в исследовательской группе доктора Андреаса Цирлика, отделение кардиологии клиники университета Альберта-Людвига, (Freiburg-im-Breisgau, Germany).

Положения, выносимые на защиту:

1. С применением метода электронного парамагнитного резонанса выявлено, что в образцах атеросклеротических бляшках протекает окислительный стресс, в который вносит вклад реакция Фентона.

2. Активация рецептора CD40 в мышцах линии C57BL/6 приводит к увеличению концентрации хемокина MCP-1 в плазме и перитонеальной жидкости, нокаут гена рецептора CD40 вызывает снижение синтеза MCP-1 и не повлияет на концентрацию инсулина в плазме.

3. Введение активирующего анти-CD40 антитела мышам линии C57BL/6 приводит к фосфорилированию провоспалительной киназы p38 перитонеальных макрофагов, но не к фосфорилированию киназы ERK.

4. Содержание общего марганца достоверно снижается с возрастанием степени кальцификации образцов атеросклеротических бляшек, спектр ЭПР двухвалентного марганца наблюдается в образцах атеросклеротических бляшек, но не интактной аорты.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на XIV международной конференции «Ферменты микроорганизмов в биотехнологии и медицине» (Казань, 2009), ежегодной научно-практической конференции и выставке «Инновации РАН 2010» (Казань, 2011), семинаре стипендиатов совместных программ Минобрнауки РФ и Германской службы академических обменов (ДААД) "Михаил Ломоносов" и "Иммануил Кант" (Москва, 2011), а также на итоговых конференциях КГУ (2008-2010).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 научных работ, из них 4 статьи в центральных отечественных и зарубежных рецензируемых журналах.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 130 страницах машинописного текста, содержит 4 таблицы и 17 рисунков. Цитируемая литература включает 226 источника, из них 218 иностранных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1.1. Биологические образцы

1.1.1. Атеросклеротические бляшки. Двадцать образцов стенки аорты, содержащей атеросклеротическое повреждение, получены в результате постмортальной экспертизы согласно требованиям Этического Комитета Межрегионального Клинико-Диагностического Центра (Казань). Образцы промывали физиологическим раствором и лиофилизировали (P=10-5мбар, T=-50°C).

1.1.2. Подопытные животные. В работе использованы линейные мыши C57BL/6 для получения образцов плазмы, жировой ткани, спленоцитов и перитониальных макрофагов. Плазма крови мышей, нокаутированных по гену рецептора CD40, и мышей контрольной группы C57BL/6, содержащихся в течение 29 недель на стандартном корме (СК), и диете с высоким содержанием жиров (BCЖ) (Specialty Feeds) была предоставлена Backer Heart Research Institute, Мельбурн, Австралия. Проанализировано по 20 образцов в четырех группах:

1.2. Физико-химические методы

1.2.1. Определение активных форм кислорода методом ЭПР. Для определения уровня АФК использован спиновый зонд - циклический гидроксилламин N-(1-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-4-ил)-2-метилпропанамид гидрохлорид (ТМТН). Образец бляшки 0,07 г гомогенизировали на диспергаторе ULTRA-TURRAX® Tube Drive (IKA). В исследуемый раствор вносили 1мМ ТМТН, спектры ЭПР регистрировали в спектрометре ESP-300 (Bruker) при комнатной температуре (~25°C), мощности СВЧ излучения 50 мВт, на частоте 9,8 ГГц, амплитуде высокочастотной модуляции 0,5 Гаусс, применяя капилляры объемом 25мкл (Sigma).

1.2.2. Выявление участия в реакции Фентона металлов с переменной валентностью в составе атеросклеротической бляшки. Реакция Фентона приводит к генерации гидроксильного радикала из перекиси водорода под действием металлов с переменной валентностью. Участие в ней присутствующих в образцах атеросклеротической бляшки металлов с переменной валентностью устанавливали методом ЭПР по образованию продукта реакции, инициированной внесением 1мМ H₂O₂.

1.2.3. Количественное определение содержания элементов в атеросклеротической бляшке. Определение элементов проводили в соответствии со стандартами РФ согласно методическим указаниям (МУК 4.1.1483-03). Измерения осуществляли на масс-спектрометре Elan DRC II (PerkinElmer), образцы предварительно подвергали микроволновой подготовке в системе MWS-3 (Berghof) при температуре 150°C, в присутствии азотной кислоты (1 мл) и бидистиллированной воды (4 мл). Содержание элементов рассчитывали в мкг, относя к сухому весу образца атеросклеротической бляшки.

1.2.4. *Обнаружение парамагнитных центров двухвалентного марганца в образцах атеросклеротических бляшек методом ЭПР.* Образцы размером 0,3×0,3×2мм были исследованы на спектрометре Elexsys 680 (Bruker) с использованием стационарного режима при гелиевых температурах в W-диапазоне (93,5 ГГц).

1.3. Физиолого-биохимические методы

1.3.1. *Стимуляция мышцей фактором некроза опухолей TNF-альфа.* Две группы мышцей линии C57BL/6 содержали 17 недель на нормальной диете СК, и диете с высоким содержанием жиров ВСЖ. Далее мышцам в брюшную полость вводили 200нг мышечного TNF-альфа, после чего животные были разделены на 4 группы по 10 в каждой, двум из четырех групп вводили 100мкг активирующего анти-CD40 антитела и инкубировали 4 часа.

1.3.2. *Получение образцов плазмы мышцей.* Мышцей анестезировали введением в брюшную полость 200 мкл 2,2,2 – трибромэтанола. Дополнительно вводили 10 единиц гепарина чтобы предотвратить тромбообразование. Далее мышцей фиксировали на препарационном столике, вскрывали грудную клетку и забирали 500-800 мкл крови из правого желудочка сердца. Отобранную кровь помещали в эппендорф с 20 мкл 0,5М ЭДТА и центрифугировали для отделения плазмы 5000 об/мин 5 мин, плазму переносили в новый эппендорф и хранили до исследования при -80°C.

1.3.3. *Смыв перитонеальных макрофагов.* В нижнюю часть брюшной полости мышцам вводили 2 мл тиогликолата, и инкубировали 4 часа. Далее мышцей подвергались эвтаназии с применением углекислого газа и декапитации. В брюшную полость вводили 6 мл RPMI 1640, для достижения наилучшего смешения брюшную полость пальпировали в течение 3х минут. Суспензию, отобранную из брюшной полости, центрифугировали 5000 об/мин 5 мин, супернатант переносили в отдельный эппендорф. Осадок и супернатант хранили при -80°C.

1.3.4. *Цитометрия с использованием иммобилизованных на частицах антител (Cytometric bead array analysis, CBA).* Для определения концентрации цитокинов и хемокинов в плазме крови и супернатантах асептического перитонита, а также для установления уровня фосфорилирования киназ в лизатах перитонеальных макрофагов нами был применен метод CBA. Для анализа ряда цитокинов, IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-12, MCP-1, TNF- α , применяли BD Cytometric Bead Array Mouse Inflammation Kit. Концентрации хемокинов анализировали с применением Mouse/Rat Soluble ProteinMaster Buffer Kit, Mouse KC Flex Set, Mouse RANTES Flex Set и Mouse MIP-1 α Flex Set. Измерение концентраций фосфорилированных киназ осуществляли с применением Cell Signaling Master Buffer Kit, Phospho p38 (T180/Y182) Flex Set и Phospho ERK1/2 (T202/Y204) Flex Set. Каждый из перечисленных Flex Set китов содержит соответствующие захватывающие гранулы, конъюгированный с PE детектирующий реагент и стандарт. Анализ образцов проводили на цитометре BD FACScalibur (BD Bioscience), оснащенном 488нм аргон-ионным лазером и 635нм красным диодным

лазером. При анализе результатов использованы программные пакеты FlowJo 7.5 и GraphPad Prism 5.

1.3.5. Анализ концентрации сывороточного амилоида А, лептина, инсулина в плазме мышей. Для анализа концентрации сывороточного амилоида А в образцах плазмы крови мышей, применяли Phase range mouse SAA ELISA kit (Invitrogen). Для определения концентрации лептина в образцах плазмы крови мышей, применяли Mouse Leptin DuoSet ELISA Development kit (R&D Systems). Концентрацию инсулина анализировали, применяя Mercodia mouse insulin ELISA kit (Mercodia). Киты применялись согласно инструкциям производителей. Измерения проводили с применением спектрофотометра SpectraMax plus (Molecular Devices), оснащенного плейтридером при 450 нм. Для анализа результатов использованы программные пакеты GraphPad Prism 5 и SoftMax Pro 5.2

1.3.6. Активация Т-клеток, изолированных из селезенок мышей. Мыши линии C57BL/6, содержащиеся 20 недель на СК и ВСЖ, были умерщвлены с применением углекислого газа и декапитированы. Селезенки мышей были извлечены в асептических условиях и помещены в чашки петри с 15 мл охлажденного до 4°C фосатного буфера. Надрезанная селезенка помещалась между двух стекол, спленциты высвобождались легким сдавливанием. Суспензию, содержащую спленциты, фильтровали, трижды центрифугировали при 1500g 10 мин (4°C), осадок ресуспендировали в 1 мл среды DMEM. Далее производился подсчет клеток в камере Ньюбауэра.

Негативную селекцию Т-клеток производили с применением Dynal Mouse T cell Negative Isolation Kit (Invitrogen) согласно инструкции производителя. Для проверки чистоты и анализа популяционной принадлежности изолированных Т-клеток, применяли проточную цитометрию с флуоресцентно-мечеными анти- CD3, CD4, CD8 антителами и изотипическими контролями к ним. В 50 мкл суспензии клеток вносили по 1 мкл флуоресцентно-меченных антител, или их изотипов, инкубировали 15 мин в темноте на льду и вносили 500мкл BD CellFix буфера для фиксации клеток. Анализ проводили на проточном цитометре BD FACScalibur (BD Bioscience), оснащенный 488нм аргон-ионным лазером и 635нм красным диодным лазером. При анализе результатов применен программный пакет FlowJo 7.5

1.3.7. Активация жировой ткани мышей. Мыши линии C57BL/6, содержащиеся 20 недель на СК и ВСЖ, были умерщвлены с применением углекислого газа и декапитированы. Жировые падушки были извлечены в асептических условиях и помещены в маленькие чашки Петри с 5 мл охлажденной до 4°C среды DMEM, содержащей 3% фетальной телячьей сыворотки и 0,5% пенициллина и 0,5% стрептомицина. Стерильным скальпелем произведены множественные надрезы, далее фрагменты ткани подвергались ресуспендированию пипетированием, крупные фрагменты были удалены. Для активации клеток жировой ткани, планшеты для культивирования были покрыты 5мкг/мл анти-CD40 активирующего антитела. Через семь дней после начала инкубации, супернатанты были

отобраны, центрифугированы при 15000g 10 минут 4°C, концентрации лептина исследованы методом ELISA, как описано ранее.

1.4. Статистическая обработка результатов для каждого метода описана в соответствующем разделе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Окислительный стресс в клинических образцах стенок сосудов

В стенке сосуда присутствуют разнообразные ферментные системы, участвующие в генерации АФК, среди которых NAD(P)H – оксидаза, ксантин оксидаза, мономерная форма эндотелиальной NO-синтазы, цитохром P-450, липоксигеназа, циклооксигеназа [Li, Shah, 2004]. Однако исследователи предполагают, что четыре из них вносят наибольший вклад: NAD(P)H – оксидаза, неспаренная форма эндотелиальной NO-синтазы, ксантин оксидаза [Li, Shah, 2004]. Можно предполагать, что активность этих ферментных систем в совокупности со снижением активности системы антиоксидантной защиты приводит к увеличению уровня АФК в стенке сосуда и способствует атерогенезу. В результате анализа кинетических кривых накопления нитроксильного радикала в атеросклеротических бляшках, нами обнаружено, что все образцы атеросклеротических бляшек, полученных в результате постмортальной экспертизы, обладают активностью, связанной с генерацией АФК (рис. 1). Установлено, что в большинстве образцов окисление зонда происходит в меньшей степени, чем в системе ксантин/ксантинооксидаза. Однако в трех образцах отмечена более высокая степень образования радикала TMT^{*}, близкая к соответствующему показателю для реакции ксантин/ксантинооксидаза. Окисление зонда в образце интактной аорты находилось на существенно более низком уровне по сравнению с образцами бляшек.

При рассмотрении роли супероксид дисмутаза (СОД) Faraci и Didion констатируют, что данных о функциональной активности СОД в стенке кровеносных сосудов очень мало [Faraci, Didion, 2004]. Логично было бы предположить, что активность таких антиоксидантных ферментов как СОД 1 и 3 типа, должна была бы снижать уровень образования АФК и соответственно замедлять развитие атеросклеротического повреждения сосуда. Однако показано, что увеличенная экспрессия СОД 1 не влияла на атерогенез, у мышей на диете с высоким содержанием жиров [Tribble *et al.*, 1997] или ApoE^{-/-} мышей [Yang *et al.*, 2004]. В то же время дефицит СОД 3 так же не произвел никакого эффекта на атерогенез у ApoE^{-/-} мышей [Sentman, Brannstorm, 2001]. Особое внимание в литературе уделяется марганцевой супероксид дисмутазе. Хотя ее количество составляет лишь 2-12% от суммарного количества СОД в стенке сосуда [Faraci, Didion, 2004], недавние исследования показали неоспоримую роль митохондриального белка СОД 2 в развитии атеросклероза [Madamanchi, Runge, 2007]. Возрастные мыши с генотипом MnSOD^{+/-} фенотипически показали

значительное нарушение вазорелаксации, высокий уровень образования АФК в митохондриях и нарушение митохондриальной ДНК [Wenzel *et al.*, 2008].

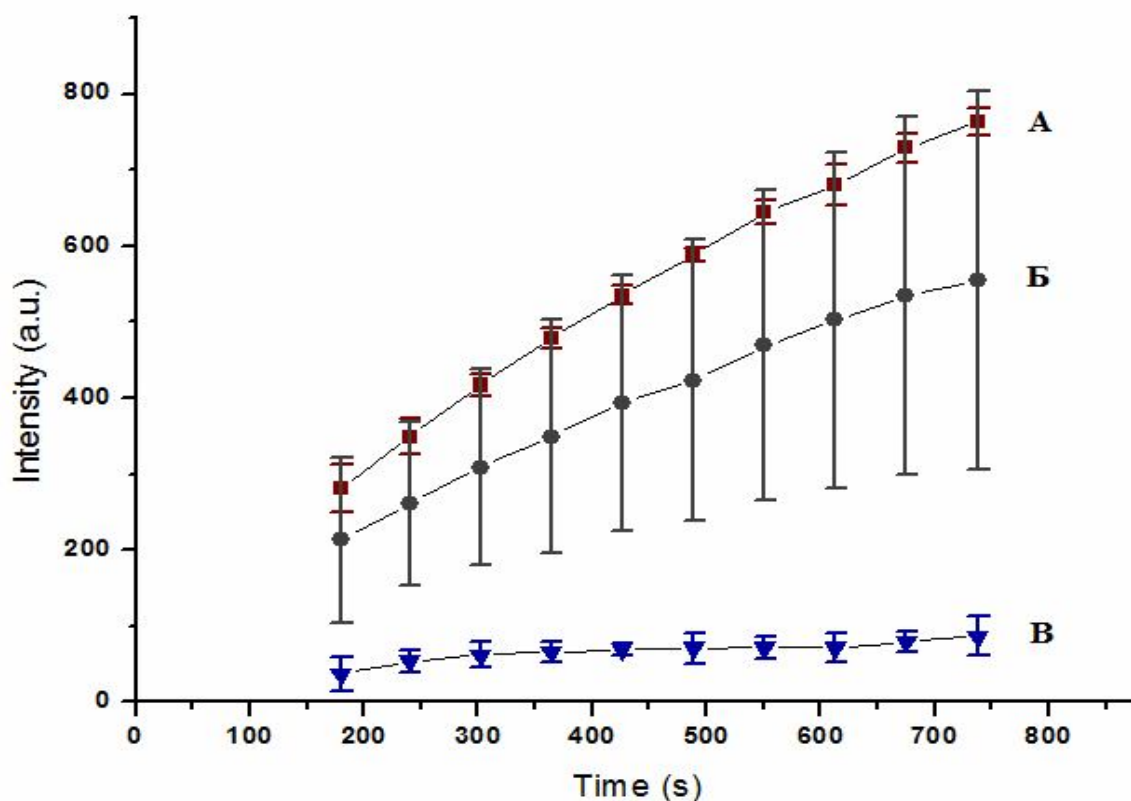


Рис. 1. Динамика накопления нитроксильного радикала. А – ксантиноксидазная реакция в фосфатном буфере. Б – в гомогенатах образцов бляшек. В – в гомогенатеобразца интактной аорты. Спектры ЭПР записывались в X-диапазоне при комнатной температуре.

Гидроксильный радикал (HO^\bullet) – крайне реактивная АФК, образующаяся в реакциях Фентона и Хабер-Вайсса при взаимодействии пероксида водорода переходными металлами [Venov, 2001]. Реакционная смесь, содержащая соль двухвалентного железа и пероксид водорода, традиционно используется для генерации гидроксильного радикала в реакции Фентона. Для моделирования реакции Фентона в раствор ТМТН в фосфатном буфере был введен пероксид водорода в концентрации 1мМ, в нашем случае некоторое количество железа, достаточное для инициации реакции находилось в фосфатном буфере. В результате было зарегистрировано достаточно быстрое образование радикала ТМТ• (рис. 2.б). Десфероксамин, связывая ионы железа в фосфатном буфере, минимизировал протекание реакции Фентона и снижал окисление ТМТН (рис. 2.в).

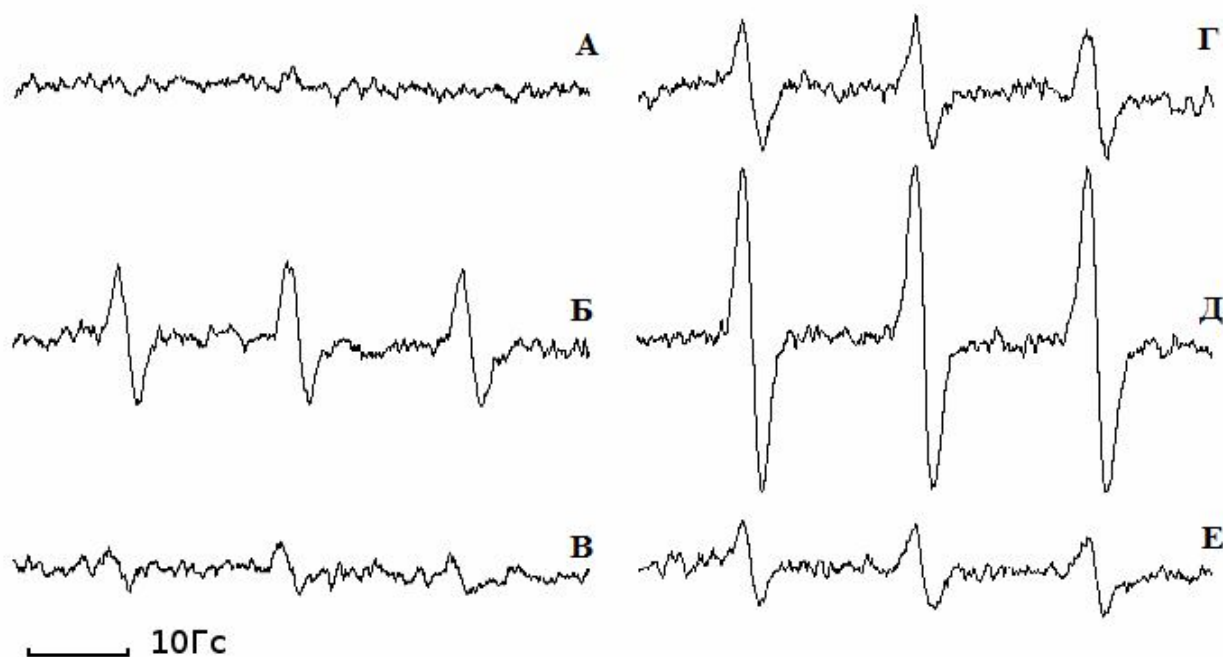


Рис. 2. Спектры ЭПР нитроксильного радикала ТМТ•, образующегося в результате окисления спинового зонда ТМТН под влиянием гидроксильного радикала, генерируемого в реакции Фентона. А – контроль, спиновый зонд ТМТН в фосфатном буфере (1мМ). Б – спиновый зонд в буфере при внесении 1мМ H₂O₂. В – спиновый зонд в буфере при внесении 1мМ H₂O₂ и 3мМ десфероксамина. Г – спиновый зонд в гомогенате образца бляшки. Д – спиновый зонд в гомогенате образца бляшки при внесении 1мМ H₂O₂. Е – спиновый зонд в гомогенате образца бляшки при внесении 3мМ десфероксамина. Спектры записаны через 20 минут после введения зонда в реакционную смесь.

Внесение пероксида водорода в гомогенат атеросклеротических бляшек приводило к значительному увеличению интенсивности сигнала ЭПР зонда ТМТН, что свидетельствует об инициации реакции Фентона металлами с переменной валентностью в восстановленной форме, находящимися в бляшке (рис. 2.д). Полученные данные убедительно свидетельствуют о возможности протекания реакции Фентона в образцах атеросклеротических бляшек. При внесении десфероксамина в гомогенат образца бляшки наблюдалось некоторое снижение интенсивности окисления зонда, что свидетельствует в пользу вклада реакции Фентона в окислительный стресс в бляшке (Рис. 2.е), однако вероятно присутствие иных металлов с переменной валентностью, которые наравне с железом участвуют в реакции Фентона. Так не только для железа, но и для меди показана проатерогенная роль [Stadler *et al.*, 2004; Brewer, 2007; Watt *et al.*, 2006], которая возможно связана с участием в реакции Фентона [Watt *et al.*, 2006]

2.2. Определение содержания элементов в образцах стенок сосудов и корреляционный анализ

В современной литературе имеются данные об изменении концентрации некоторых элементов в атерогенезе: стенка сосуда человека с атеросклеротическим повреждением содержит больше кальция, фосфора, меди, железа, цинка, чем стенка здорового сосуда [Peltomaa *et al.*, 1991;

Stadler *et al.*, 2004, 2008]. В семи образцах стенок аорты с атеросклеротическим повреждением и трех стенок интактных сосудов методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой было проведено исследование содержания ряда элементов (табл. 1.а) и проведен корреляционный анализ между ними (табл. 1.б). Все аутопсийные образцы значительно отличались по степени кальцификации (отношение Ca/P находилось в диапазоне от 0.3 до 3.5). Данное обстоятельство позволило провести корреляционный анализ изменения содержания элементов в зависимости от Ca/P.

Таблица 1.

Анализ Zn, Cu, Fe, Mn, Ca и P, в образцах атеросклеротических бляшек и стенок интактных сосудов: (А) Содержание исследованных элементов, (Б) Матрица коэффициентов ранговой корреляции Спирмена между парами исследованных элементов.

Элемент	Диапазон значений, мкг/г образца	
	Максимальное	Минимальное
Zn	141.9 ± 2.1	20.3 ± 0.5
Cu	6.33 ± 0.08	0.22 ± 0.01
Fe	96.22 ± 0.48	1.76 ± 0.08
Mn	0.767 ± 0.035	0.106 ± 0.002
Ca	132430.8 ± 2781.0	429.8 ± 5.6
P	53035.4 ± 530.4	695.3 ± 15.3

А

	Zn	Cu	Fe	Mn	Ca	P	Ca/P
Zn		-0.15	0.26	-0.29	0.85	0.63	0.58
Cu	-0.15		-0.39	0.15	-0.55	-0.55	-0.17
Fe	0.26	-0.39		0.09	0.36	0.65	-0.13
Mn	-0.29	0.15	0.09		-0.41	0.10	-0.72
Ca	0.85	-0.55	0.36	-0.41		0.71	0.64
P	0.63	-0.55	0.65	0.10	0.71		-0.04
Ca/P	0.58	-0.17	-0.13	-0.72	0.64	-0.04	

Б

На сегодняшний день в литературе значительное внимание уделяется металлам - цинку, железу, меди – содержащимся в стенках кровеносных сосудов, имеющих атеросклеротические повреждения. Так, для цинка установлен антиатерогенный эффект [Ren *et al.*, 2005, 2006; Watt *et al.*, 2006; Giacconi *et al.*, 2007; Zago, Oteiza, 2001]. Считается, что цинк защищает мембраны от окисления, индуцированного железом, замещая его из отрицательно заряженных сайтов связывания [Zago, Oteiza, 2001]. Также предполагается, что высокий уровень цинка стабилизирует структуру бляшки, предохраняя ее от разрушения и последующего повреждения тканей [Stadler *et al.*, 2008]. Возможно, антиатерогенная роль цинка связана с противовоспалительными и антипролиферативными свойствами цинка как кофактора ряда ферментов [Watt *et al.*, 2006]. Нами не обнаружено какой-либо корреляции между содержанием цинка и железа (табл. 1.б). Это согласуется с результатами, полученными Stadler с соавторами [Stadler *et al.*, 2008] и свидетельствует в пользу дискуссионности гипотезы [Zago, Oteiza, 2001] о взаимосвязи антиатерогенной роль цинка и его способности замещать железо. Полученные нами данные свидетельствуют о наличии корреляции содержания цинка и кальция (табл. 1.б). Ранее методом ЭПР было

обнаружено, что образцы максимально кальцифицированной бляшки содержат в своем составе гидроксиапатит [Абдульянов с соавт., 2008]. Наблюдаемая корреляция, вероятно, объясняется тем, что именно гидроксиапатит сорбирует цинк [Lee *et al.*, 2005].

Единственным из исследованных элементов, содержание которого коррелирует с Ca/P, оказался марганец (рис. 3). Нами установлено, что его уровень достоверно снижается с возрастанием степени кальцификации (табл. 1.6).

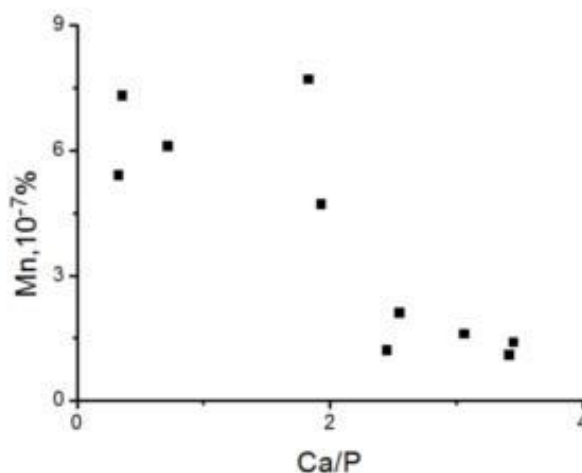


Рис. 3. Корреляция марганца и степени кальцификации.

Предположим, что марганец так или иначе может попадать в очаг кальцификации и удерживаться в органоминеральном матриксе. Эти соображения имеют под собой почву, поскольку известно, что кристаллические фосфаты кальция способны сорбировать ионы переходных металлов (в том числе ионы марганца) [Matsunaga *et al.*, 2008]. Таким образом, для подтверждения данной гипотезы принципиально установить, в каком окружении находятся ионы марганца в кальцифицированных тканях атеросклеротических бляшек: попадают ли они в органоминеральный агрегат или же находятся преимущественно в тех же комплексах, что и в здоровой ткани. С этой целью образцы стенок аорты были исследованы с помощью высокочастотного ЭПР с использованием методики детектирования электронного спиновго эха. В ходе исследования из кальцифицированных образцов отбирались пробы органоминерального агрегата и пробы, не содержащие кальцифицированного матрикса (рис. 4). Для сравнения были также исследованы образцы интактных стенок аорты.

Сравнение спектров исследованных образцов (рис. 4) выявило заметное различие формы линии ЭПР сигналов двухвалентного марганца для кальцифицированного образца и образцов без минеральных отложений. Более того, в двух исследованных образцах интактной аорты спектр двухвалентного марганца практически не наблюдался. Предположительно, полученные данные говорят о различном окружении ионов Mn^{2+} в указанных образцах. Кроме того, согласно литературе, в здоровой клетке основная доля

марганца содержится в биологических комплексах [Culotta *et al.*, 2006], где он может иметь валентность 3+ (электронная конфигурация d^4) либо испытывать дипольное взаимодействие со стороны находящихся в непосредственной близости парамагнитных центров (например, олигомерных ферментах). Этим можно объяснить отмеченную для интактных образцов крайне низкую интенсивность сигнала двухвалентного марганца. Кроме того, после облучения кальцифицированных образцов рентгеновскими лучами, в пробах органоминерального матрикса наблюдался сигнал радикала $CO_2^{\cdot-}$, характерного для минеральной части кальцифицированных бляшек (рис. 5).

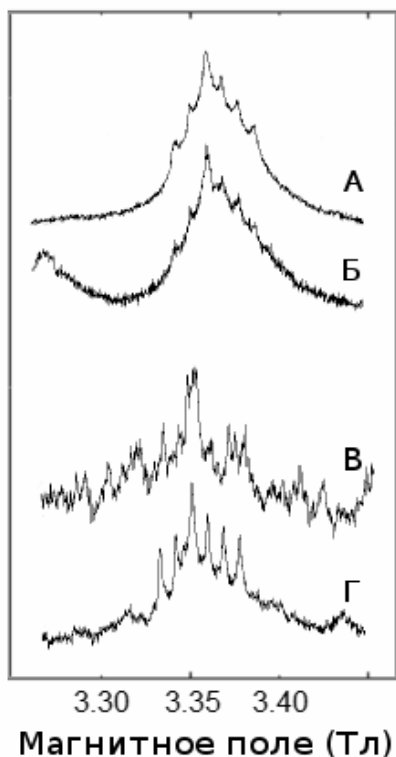
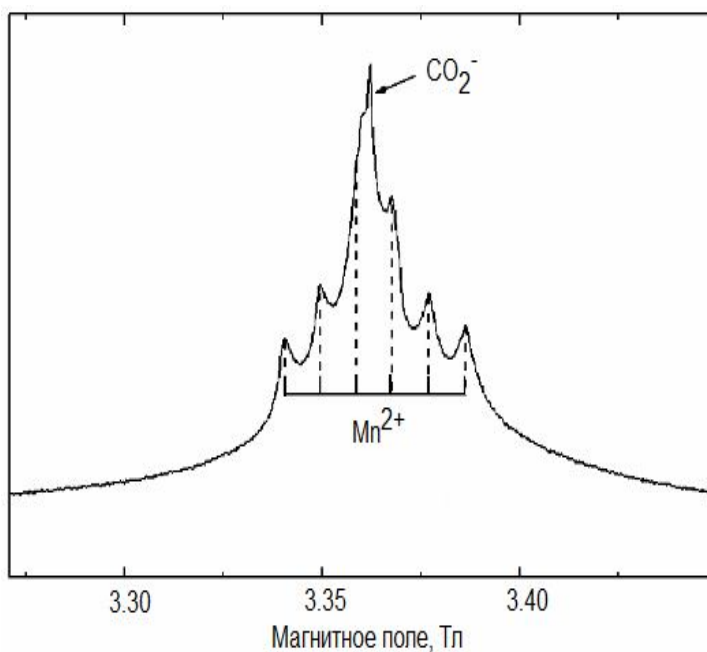


Рис. 4. Нормированные спектры ЭПР образцов стенок аорты (не подвергавшихся облучению), полученные с помощью методики детектирования электронного спинового эха в W-диапазоне при $T=17,5K$. А — проба образца бляшки, содержащая минерализованный матрикс, Б — проба того же образца, не содержащая следов кальцификации, В, Г — образцы интактных стенок аорты.

Рис. 5. Спектр ЭПР парамагнитных центров двухвалентного марганца в образцах атеросклеротических бляшек. $T=50K$, W-диапазон (93.5 ГГц). Параметры сверхтонкой структуры марганца $A=9,05$ мТл.



Полученные предварительные результаты можно рассматривать как косвенное подтверждение гипотезы о том, что в кальцифицированной стенке сосуда марганец может быть тем или иным образом интегрирован в органоминеральный матрикс.

2.3. Иммунологические аргументы участия CD40-CD40L в формировании окислительного стресса в атерогенезе

Мы показали, что окислительный стресс в атеросклеротических бляшках может быть связан с неферментативными механизмами при участии металлов с переходной валентностью, содержащихся в стенках сосуда с атеросклеротическим повреждением. Здесь мы обсудим источники и иммунологические аспекты возможных механизмов реализации окислительного стресса в атерогенезе.

В качестве атерогенной нами выбрана модель метаболического синдрома (МС) у мышей, которая ведет к развитию патологии в связи с особенностями питания, в отличие от моделей генетических модификаций, как LDLR^{-/-} и ApoE^{-/-}. Данные модели генно-нокаутированных мышей с недостатком LDLR и ApoE не воспроизводят всех свойств атеросклеротических бляшек и пригодны в первую очередь для исследования функций специфических генов на ранних стадиях атерогенеза [Lucas, Greave, 2001]. Диета с высоким содержанием жиров, или как назвали ее Lucas и Greave, “диета западного типа”, содержит 21% жиров и 0,2% холестерина [Lucas, Greave, 2001]. На наш взгляд данная модель более приближена к медицинской практике, поскольку гипергликемия и гиперхолестеринемия – два основополагающих фактора метаболического синдрома, зачастую сопутствуют атерогенезу и стоят первыми в списке признанных факторов риска развития ССЗ [Stamler *et al.*, 1993]. Мышей C57BL/6 содержали на стандартизированной диете ВСЖ для развития атеросклероза, индуцированного метаболическим синдромом, контрольная группа мышей росла на нормальной диете. О развитии ССЗ у мышей, содержащихся на диете с высоким содержанием жиров, свидетельствует повышенная концентрация сывороточного амилоида А (САА) (рис. 6), детектированного нами в плазме мышей методом ELISA, которая в норме у этих животных не превышает 20 мкг/мл. САА имеет непосредственную взаимосвязь с атерогенезом и представляет собой высокочувствительный маркер ССЗ в частности ишемической болезни сердца (ИБС) [Johnson *et al.*, 2004].

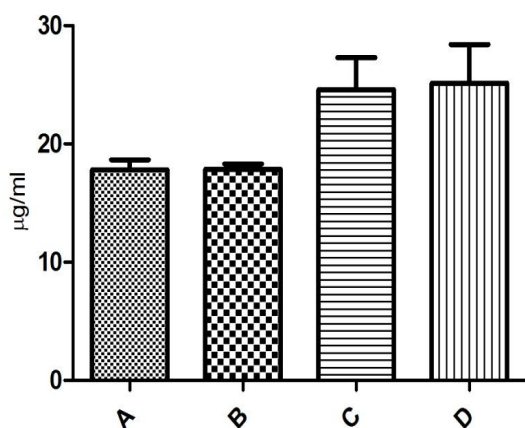


Рис. 6. Концентрация сывороточного амилоида А в плазме мышей линии C57BL/6. А - Контрольная группа мышей, СК. В - Группа мышей с дефицитом CD40, СК. С – Контрольная группа мышей, ВСЖ. D - Группа мышей с дефицитом CD40, ВСЖ.

CD40 рецептор экспрессируется значительным количеством клеток – участников атеросклеротического процесса, среди которых В-клетки [van Kooten, 2000], моноциты и макрофаги, тромбоциты [Schonbeck *et al.*, 2000], клетки эндотелия (ЭК) и гладкомышечные клетки (ГМК) [Mach *et al.*, 1997], мастоциты [Trunilhas *et al.*, 2006], дендритные клетки, фибробласты [Phipps, 2000], нейтрофилы [Cella *et al.*, 1997], Т-клетки [Yang, Wilson 1996]. Однако этот же рецептор экспрессируют адипоциты, что играет ключевую роль в адипогенезе и приобретении жировой тканью иммунной функции [Missou *et al.*, 2010]. Система CD40 рецептор-лиганд влияет на воспаление за счет производства цитокинов и активации ряда транскрипционных факторов [Mach *et al.*, 1997]. Стимуляция CD40 лигандом типичных резидентных клеток атеросклеротических бляшек, таких как ЭК, макрофаги, ГМК, приводила к экспрессии различных медиаторов воспаления, хемокинов, молекул адгезии, прокоагулянтов и матриксных металлопротеиназ, способствуя проатерогенному состоянию [Mach *et al.*, 1997]. Причастность взаимодействия рецептора CD40 со своим лигандом к атерогенезу была неоднократно продемонстрирована в различных работах. Кроме того, показано, что взаимодействие рецептора с лигандом вызывало продукцию АФК тромбоцитами и клетками эндотелия [Urbich *et al.*, 2002], что деактивировало eNOS, приводило к эндотелиальной дисфункции [Cipollone *et al.*, 2005, Aggarwal *et al.*, 2004]. Инкубация с рекомбинантным CD40L индуцировала генерацию АФК тромбоцитами [Chakrabarti *et al.*, 2005], эндотелиальными клетками [Chakrabarti *et al.*, 2007] и нейтрофилами [Vanichakarn *et al.*, 2008]. В то же время в плазме пациентов с метаболическим синдромом показано повышенное содержание растворимого CD40L [Angelico *et al.*, 2006], поэтому данный лиганд может быть рассмотрен как связующее звено между атеросклерозом и метаболическим синдромом [Lee *et al.*, 2006].

Ввиду того, что продемонстрирована непосредственная взаимосвязь CD40-CD40L и генерации АФК, данное взаимодействие рассмотрено нами в качестве модулятора иммунологических процессов при метаболическом синдроме, альтернативно ведущих к окислительному стрессу в атерогенезе.

Можно выделить два механизма, посредством которых метаболический синдром мог бы инициировать окислительный стресс проатерогенного характера.

2.3.1 Влияние рецептора CD40 на синтез инсулина и лептина

Показано, что гиперхолестеринемия [Shimizu *et al.*, 1994, Ohara *et al.*, 1993] и избыточное содержание лептина в крови [Bouloumie *et al.*, 1999] неизбежно ведут к усилению генерации АФК клетками эндотелия. Данное событие ссылает нас к теории митохондриальной дисфункции, ключевым событием в которой является усиленный синтез АФК митохондриальной ЭТЦ эндотелия, который ведет через состояние митохондриальной дисфункции к эндотелиальной дисфункции, возрастающей проницаемости эндотелия для ЛПНП и нарушению вазомоторной функции сосуда [Wenzel *et al.*, 2008]. В то же время повышенные концентрации ЛПНП и ряда других

маркеров окислительного стресса обнаружены при диабете [Patrono, Fitzgerald, 1997]. Наше исследование показало, что в плазме мышей, рацион которых был представлен диетой с высоким содержанием жиров, наблюдались повышенные концентрации инсулина (рис. 7) и лептина (рис. 8), в сравнении с контрольной группой.

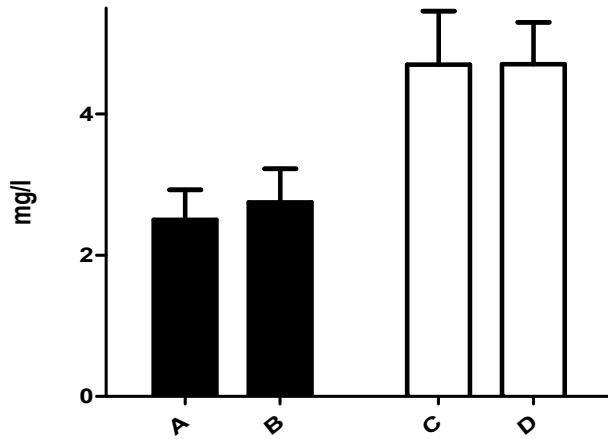


Рис. 7. Концентрации инсулина в плазме мышей линии C57BL/6. А - Контрольная группа мышей, СК. В - Группа мышей с дефицитом CD40, СК. С - Контрольная группа мышей, ВСЖ. D - Группа мышей с дефицитом CD40, ВСЖ

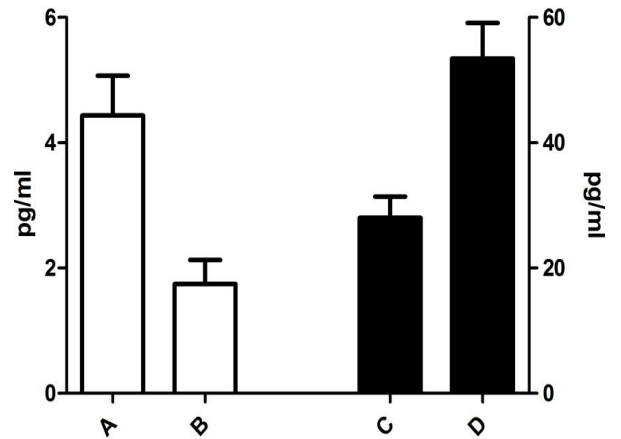


Рис. 8. Концентрации лептина в плазме мышей линии C57BL/6. А - Контрольная группа мышей, СК. В - Группа мышей с дефицитом CD40, СК. С - Контрольная группа мышей, ВСЖ. D - Группа мышей с дефицитом CD40, ВСЖ

Однако нокаут CD40 никак не повлиял на синтез инсулина вне зависимости от диеты, что позволяет нам утверждать об отсутствии связи между синтезом данного гормона и сигнальных путей, активируемых данным рецептором (рис. 7). Что касается лептина, картина представляется весьма неоднозначной. Нокаут CD40 приводил к увеличению концентрации лептина в плазме животных на диете ВСЖ (рис. 8), в то время как у нокаутных мышей на СК диете наблюдалось снижение концентрации гормона. Одновременное введение агониста CD40 и TNF- α не повлияло на синтез гормона вне зависимости от диеты (рис. 9).

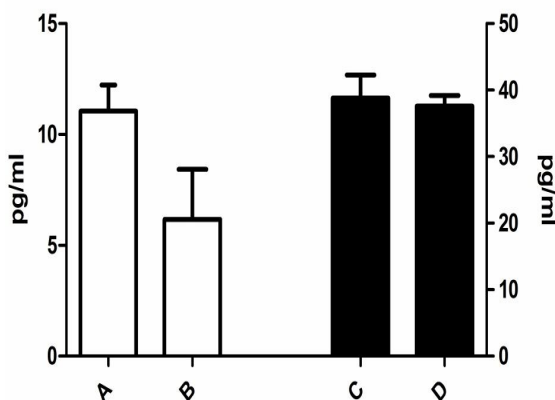


Рис. 9. Концентрация лептина в плазме мышей линии C57BL/6 после инъекции TNF- α . 1 - IL-6, 2 - IL-10, 3 - MCP-1. А-Контрольная группа мышей, СК. В - Группа мышей с инъекцией агониста CD40, СК. С - Контрольная группа мышей, ВСЖ. D - Группа мышей с инъекцией агониста CD40, ВСЖ.

Стимуляция жировой ткани активирующим анти-CD40 антителом вела к заметному снижению продукции лептина в случае обеих диет (рис. 10).

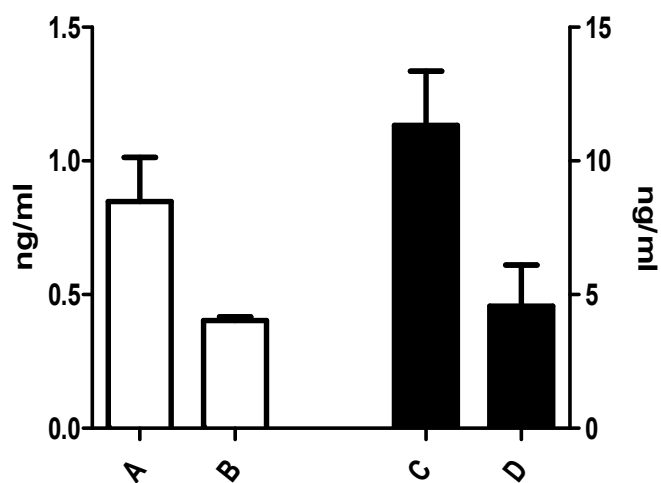


Рис. 10. Концентрация лептина, продуцируемого жировой тканью, выделенной из мышей линии C57BL/6 после 48 часовой инкубации. А – Жировая ткань выделена из мышей на СК, инкубировалась с контрольным изотипом IgG. В – Жировая ткань выделена из мышей на СК, инкубировалась с CD40 агонистом. С – Жировая ткань выделена из мышей на ВСЖ, инкубировалась с контрольным изотипом IgG. D – Жировая ткань выделена из мышей на ВСЖ, инкубировалась с CD40 агонистом.

Вероятно, активация рецептора CD40 не связана либо отрицательно коррелирует с развитием эндотелиальной дисфункции, опосредованной активацией генерации АФК ЭК в ответ на высокие концентрации глюкозы и лептина в крови.

2.3.2. Зависимость концентрации хемокинов в плазме мышей от дефицита и активации рецептора CD40

Второй возможный механизм взаимосвязи МС и окислительного стресса – усиленная выработка хемокинов и цитокинов вследствие сопутствующего метаболическому синдрому хронического системного воспаления. Развитие системного воспаления у мышей на ВСЖ подтверждает повышенный уровень в плазме животных сывороточного амилоида А (рис. 6), дефицит интересующего нас рецептора CD40 не повлиял на выработку данного белка.

Такие факторы иммунной системы, как хемокины и цитокины активируют иммунные клетки, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, профессиональные функции которых связаны с генерацией АФК, в результате чего преактивированные лейкоциты могут адгезироваться на эндотелии и проникать в интиму, где вырабатывают АФК, модифицируя ЛПНП. Было показано, что лигирование CD40 приводит к выработке цитокинов и привлечению моноцитов в интиму [Mach *et al* 1998], а повышенный уровень таких хемокинов, как MCP-1 и MIP-1, в сыворотке крови пациентов с нестабильной и стабильной стенокардией ассоциирован со сниженной концентрацией антиоксидантов и усиленным перекисным окислением липидов, предполагая наличие окислительного стресса [Aukrust *et al.*, 2001]. Следует также отметить, что ЭК экспрессируют молекулы адгезии VCAM-1 и ICAM также в ответ на активацию CD40 [Karmann *et al.*, 1995].

NAD(P)H-оксидазы макрофагов и нейтрофилов – мощнейшее антибактериальное оружие, АФК, генерируемые эозинофилами служат организму в борьбе с эндопаразитами [Coffman *et al.*, 1989]. Ряд авторов рассматривает NAD(P)H-оксидазы как один из главнейших источников АФК в атеросклеротических бляшках [Spiekermann *et al.*, 2003], и наиболее активными ферментами обладают перечисленные иммунные клетки [Batot *et al.*, 1995]. В отношении данного механизма активация CD40 более релевантна, что подтверждают результаты наших экспериментов. Так нами выявлена определенная концентрационная зависимость MCP-1 в плазме животных от рецептора CD40. Нокаут гена рецептора приводил к снижению концентрации MCP-1 в плазме мышей (рис. 11), что согласуется со сниженными концентрациями провоспалительных цитокинов, IL-6, IL-12. Концентрации TNF- α , IFN- γ , MIP-1 оказалась ниже детектируемого уровня. В то же время активация рецептора агонистом сопровождалась повышением концентрации MCP-1 и TNF- α без изменения IL-6, IL-12 (рис. 12). Показано, что данный хемокин не только активирует хемотаксис моноцитов, но и активирует генерацию АФК этим типом клеток [Aukrust *et al.*, 2001].

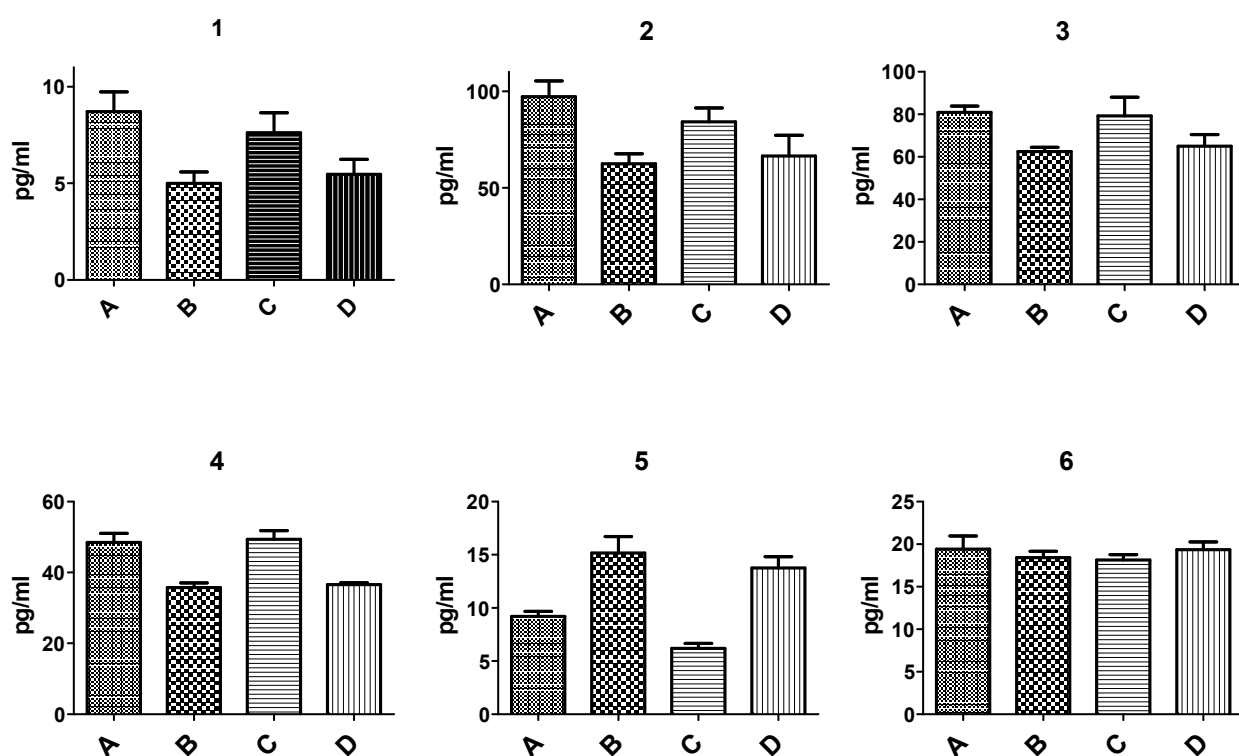


Рис.11. Концентрации цитокинов в плазме мышей линии C57BL/6. 1 – IL-6, 2 – IL-10, 3 – IL-12, 4 – MCP-1, 5 – RANTES, 6 – KC. А - Контрольная группа мышей, СК. В - Группа мышей с дефицитом CD40, СК. С – Контрольная группа мышей, ВСЖ. D - Группа мышей с дефицитом CD40, ВСЖ.

Полученные данные не несут какой-либо информации о взаимосвязи активации CD40 рецептора и модуляции синтеза MIP-1, поскольку концентрация данного хемокина в образцах плазмы крови как нокаутированных по гену рецептора CD40 мышей, так и мышей, которым

был введен агонист рецептора, находилась за пределами нижнего уровня детекции метода СВА (рис. 11,12). Ни нокаутирование гена рецептора CD40, ни его активация не оказали влияние на синтез цитокина КС. Неоднозначными оказались результаты для RANTES, поскольку и нокаут и активация CD40 сопровождались повышением концентрации этого хемокина.

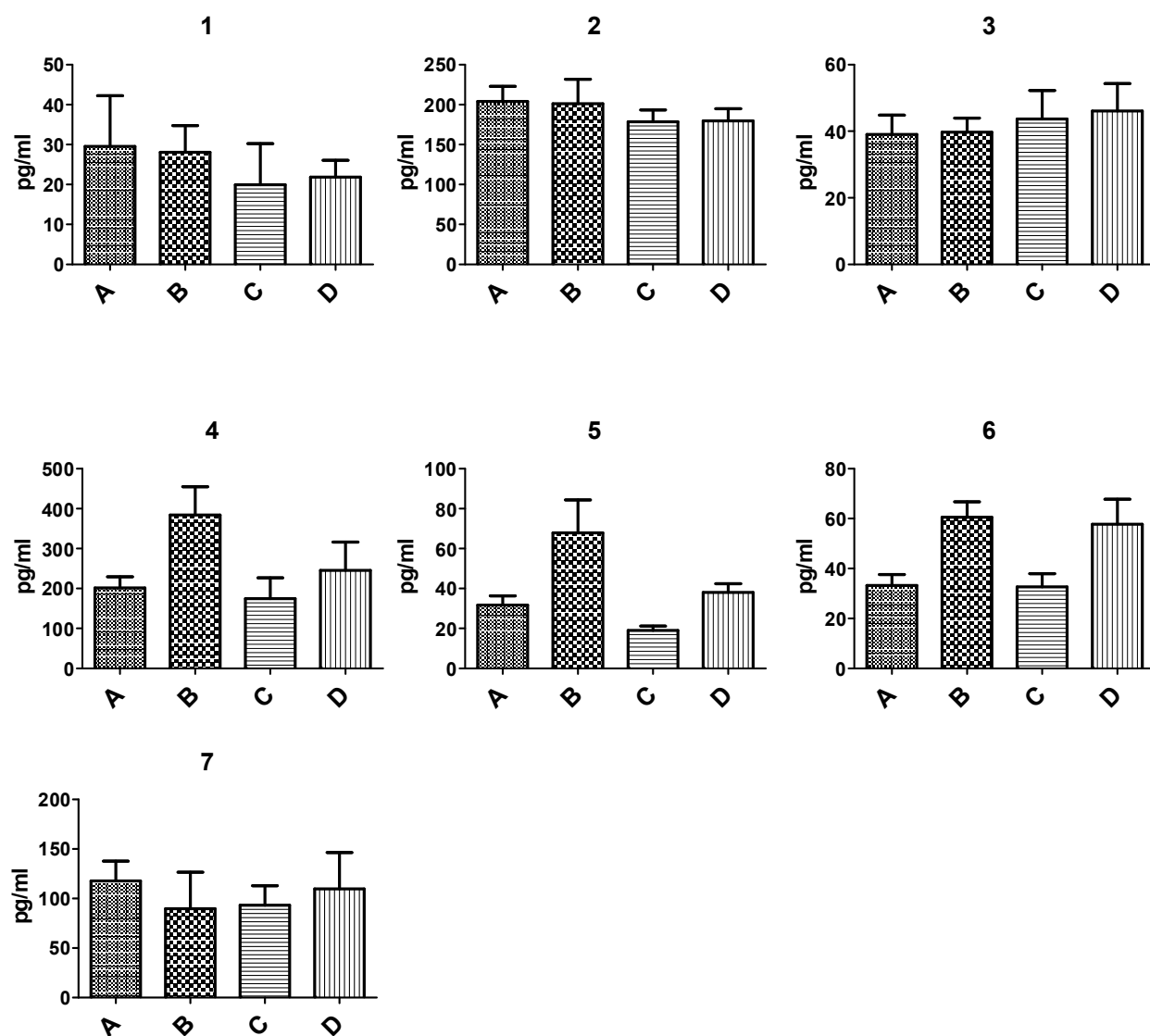


Рис. 12. Концентрации цитокинов в плазме мышей линии C57BL/6 после инъекции TNF- α . 1 – IL-6, 2 – IL-10, 3 – IL-12, 4 – MCP-1, 5 – TNF-альфа, 6 – RANTES, 7 – КС. А– Контрольная группа мышей, СК. В - Группа мышей с инъекцией агониста CD40, СК. С– Контрольная группа мышей, ВСЖ. D - Группа мышей с инъекцией агониста CD40, ВСЖ.

2.3.3. Влияние активации рецептора CD40 на синтез MCP-1 перитониальными макрофагами и Т-клетками

Макрофаги и Т-клетки представляются одними из главных участников атеросклеротического процесса. Накопление макрофагов и Т-клеток а также их взаимодействие играет ключевую роль в развитии заболевания [Lucas, Greave, 2001]. Поэтому влияние лигирования CD40 на синтез хемокинов данными типами клеток нами будет рассмотрено подробнее.

Для извлечения макрофагов мы применили метод перитонеального лаважа. Показано, что у макрофагов CD40 может быть связан с передачей как про- так и противовоспалительного сигнала в зависимости от того, какая киназа фосфорилируется. Так при инфекции лейшманиоза фосфорилирование киназы p38 вело к проинфламаторному ответу макрофагов, в то время как фосфорилирование ERK-1/2 – к антиинфламаторному. Данный процесс регулируется привлечением различных TRAF [Rub *et al.*, 2009]. Результат наших исследований показал, что связывание CD40 рецептора агонистом на фоне цитокинового шторма в значительной степени увеличивала фосфорилирование p38 в независимости от диеты, в то время, как фосфорилирование ERK1/2 находилось на низком уровне и не отличалось от такового в контроле (рис. 13).

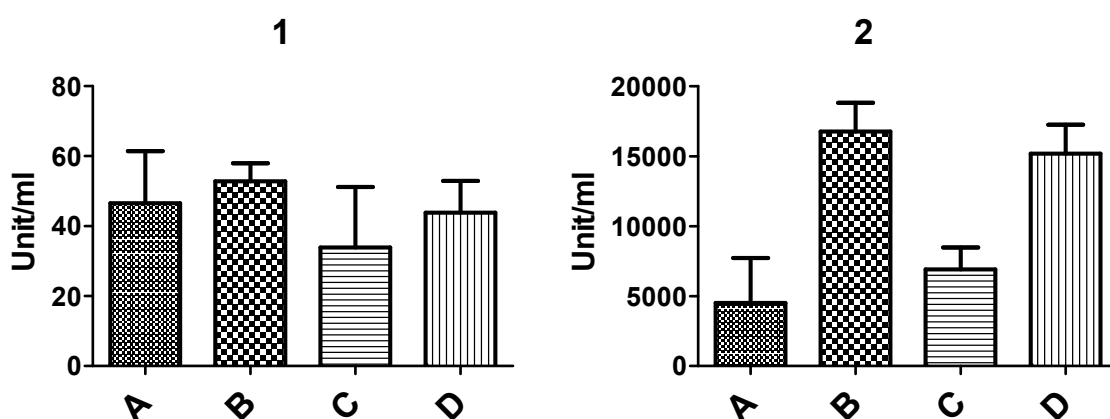


Рис. 13. Уровень фосфорилирования киназ 1 – ERK, 2 – p38 в лизатах перитонеальных макрофагов мышей линии C57BL/6 после инъекции TNF- α . А – Контрольная группа мышей, СК. В - Группа мышей с инъекцией агониста CD40, СК. С – Контрольная группа мышей, ВСЖ. D - Группа мышей с инъекцией агониста CD40, ВСЖ.

Об активации провоспалительного пути также говорит увеличенное содержание IL-6 в супернатантах перитонеальных макрофагов мышей после инъекции агонистом. Кроме того введение мышам агониста CD40 приводило к усилению синтеза MCP-1 макрофагами, о чем говорит повышенный уровень хемокина в супернатантах перитонеального лаважа (Рис. 14). Вероятно, макрофаги в определенной степени ответственны за повышение концентрации MCP-1 в плазме животных при активации CD40.

CD40 рецептор АПК представляет собой сильный костимулирующий сигнал [Nilsson, Hansson, 2008]. Также известно, что CD40L+ Т-клетки через CD40-CD40L контакты способны усиливать активацию тромбоцитов при этом, Т-клетки усиливают экспрессию RANTES, что способствует привлечению самих Т-клеток и их адгезии на клетках эндотелия [Danese *et al.*, 2004]. Однако Т-лимфоциты продуцируют не только лиганд, но и рецептор CD40 [Yang, Wilson, 1996]. Поэтому в следующем эксперименте мы исследовали влияние костимуляции CD40, CD3, CD28 на синтез MCP-1 Т-клетками, выделенными из селезенок мышей на ВСЖ и СК диетах (Рис. 15).

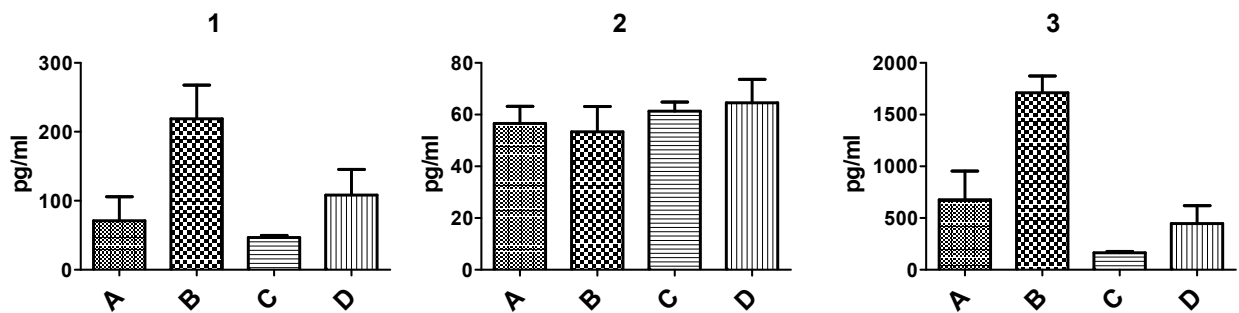


Рис. 14. Концентрации цитокинов в супернатантах перитонеальных макрофагов мышей линии C57BL/6 после инъекции TNF- α . 1 – IL-6, 2 – IL-10, 3 – MCP-1. А – Контрольная группа мышей, СК. В - Группа мышей с инъекцией агониста CD40, СК. С – Контрольная группа мышей, ВСЖ. D - Группа мышей с инъекцией агониста CD40, ВСЖ.

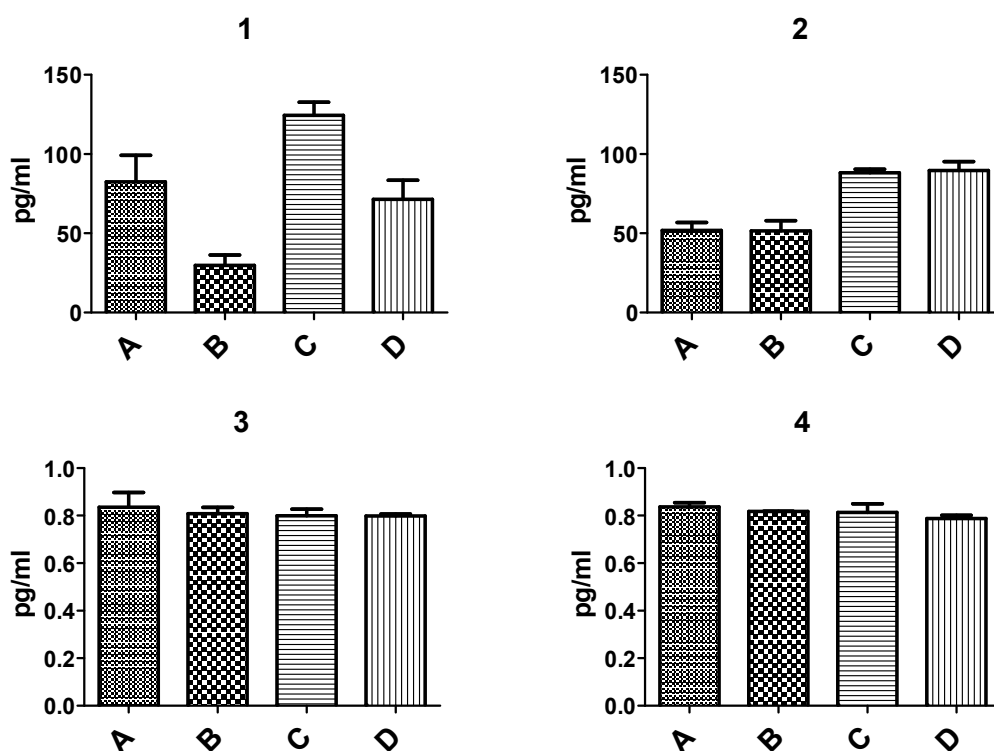


Рис. 15. Концентрации цитокинов в культуральной жидкости после семидневной инкубации Т-лимфоцитов. 1 – IFN- γ , 3 – MCP-1, Т-лимфоциты, активированные анти-CD3 и анти-CD28 активирующими антителами. 2 – IFN- γ , 4 – MCP-1, Т-лимфоциты, контроль. А - Т-лимфоциты выделены из мышей на СК. В - Т-лимфоциты выделены из мышей на СК и активированы агонистом CD40. С - Т-лимфоциты выделены из мышей на ВСЖ. D - Т-лимфоциты выделены из мышей на ВСЖи активированы агонистом CD40.

Результат эксперимента показал, что совместная стимуляция Т-клеток агонистом CD40, анти-CD3 и анти-CD 28 активирующими антителами привела вне зависимости от диеты к противовоспалительному сигналу, который проявлялся в снижении синтеза IFN- γ , вероятно были активированы Т-регуляторные клетки. Однако никакой модуляции синтеза MCP-1 активирующими антителами обнаружено не было. Вероятно, экспрессия MCP-1 Т-лимфоцитами связана с активацией CD40L.

Итак, полученные нами данные позволяют сделать заключение, что генерация АФК в атеросклеротических бляшках значительно превышает таковую в стенке интактного сосуда, а формирование окислительного стресса, присутствующего в атеросклеротических бляшках, связано не только с ферментативными механизмами, но и со свободнорадикальными реакциями с участием металлов с переменной валентностью.

Проведенные нами исследования показали статистически значимое снижение содержания марганца, сопряженное с ростом степени кальцификации, при этом были выявлены косвенные свидетельства попадания ионов двухвалентного марганца в минерализованный матрикс. На основании представленных результатов можно выдвинуть гипотезу о наличии взаимосвязи между процессом кальцификации стенки сосуда и распределением марганца в тканях, подверженных атеросклеротическим повреждениям. Полученные данные также позволяют рассматривать ЭПР-детектируемый марганец как потенциальный маркер атерогенеза. Однако, необходимо обратить внимание на то, что стенка сосуда с атеросклеротическим повреждением отличается от здоровой низким содержанием общего марганца и наличием Mn^{2+} , четко детектируемым методом ЭПР. Мы полагаем, что эти приоритетные данные, не имеющие на сегодняшний день аналогов в современной литературе, могут внести вклад в понимание механизмов кальцификации и найти практическое применение в медицине.

Мы установили, что концентрация инсулина в плазме подопытных животных не зависела от CD40, в то время, как получены дискуссионные данные относительно влияния CD40 на синтез лептина. В данной работе не обнаружено зависимости синтеза КС от состояния рецептора CD40, неоднозначные данные получены относительно RANTES. Однако мы наглядно продемонстрировали, что концентрация MCP-1, хемокина, которому наиболее часто приписывается проатерогенная функция, в том числе связанная с активацией генерации АФК моноцитами, находится в зависимости от состояния рецептора CD40. Так, в плазме геннонокаутированных животных, не способных к экспрессии рецептора, обнаруживалась сниженная по сравнению с контрольной группой животных концентрация данного хемокина. Активация же рецептора приводила к фосфорилированию провоспалительной киназы p38 макрофагов и увеличению концентрации MCP-1 в плазме животных и супернатанте перитонеальных макрофагов. Полученные нами данные позволяют предположить, что сигнальный путь CD40-CD40L может влиять на состояние окислительного стресса в стенке сосуда посредством усиления синтеза цитокина MCP-1.

Таким образом, результаты наших исследований позволяют охарактеризовать формирование окислительного стресса в стенке сосуда, сопряженного с атерогенезом, как комплексный многостадийный процесс, включающий ряд как биохимических, так и иммунологических факторов.

ВЫВОДЫ

1. Установлено протекание реакции Фентона и ее вклад в окислительный стресс в клинических образцах стенок сосудов человека с атеросклеротическими повреждениями.
2. Определено количественное содержание Ca, P, Cu, Fe, Zn, Mn в образцах атеросклеротических бляшек, и показано, что из исследованных элементов только содержание марганца имеет обратную корреляцию со степенью кальцификации.
3. Спектры ЭПР двухвалентно гомарганца исследованных кальцифицированных образцов и образцов без минеральных отложений имеют выраженные различия, при этом в образцах интактной аорты спектр двухвалентного марганца не наблюдается.
4. Дефицит рецептора CD40 не влияет на синтез инсулина и приводит к увеличению концентрации лептина в плазме животных, содержащихся на диете с высоким содержанием жиров, и снижению его концентрации у животных на стандартной диете; активация рецептора не влияла на продукцию лептина в плазме и снижала его синтез в жировой ткани.
5. Нокаут гена рецептора CD40 приводит к снижению, а активация рецептора - к увеличению концентрации MCP-1 в плазме мышей. Дефицит рецептора и его активация не изменяют синтез КС и увеличивают уровень RANTES.
6. Активация рецептора CD40 сопровождается фосфорилированием киназы p38 и усилением синтеза MCP-1 перитонеальными макрофагами и не влияет на синтез MCP-1 Т-клетками, выделенными из селезенки мышей.

Публикации по теме диссертации в изданиях, рекомендованных ВАК

1. **Lozhkin, A.** Manganese as a potential marker of atherogenesis / A. Lozhkin, T. Biktagirov, V. Abdul'yanov, A. Voloshin, N. Silkin, R. Khairullin, M. Salakhov, O. Ilinskaya // Dokl. Biochem. Biophys. – 2010. – V.434. – P.254-256.
2. **Lozhkin, A.** Manganese in atherogenesis: detection, origin, and a role / A. Lozhkin, T. Biktagirov, V. Abdul'yanov, O. Gorshkov, E. Timonina, G. Mamin, S. Orlinskii, N. Silkin, V. Chernov, R. Khairullin, M. Salakhov, O. Ilinskaya // Biomed. Chem. (Moscow). – 2011. – V. 5. – P. 158-162.
3. Hilgendorf, I. The oral spleen tyrosine kinase inhibitor fostamatinib attenuates inflammation and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice / I. Hilgendorf, S. Eisele, I. Remer, J. Schmitz, K. Zeschky, C. Colberg, P. Stachon, D. Wolf, F. Willecke, M. Buchner, K. Zirlik, A. Ortiz-Rodriguez, **A. Lozhkin**, N. Hoppe, C. von zur Muhlen, A. zur Hausen, C. Bode, A. Zirlik // Atheroscler. Thromb Vasc Biol. – 2011. – V.31. – P.1991-1999.
4. Willecke, F. Cannabinoid receptor 2 signaling does not modulate atherogenesis in mice / F. Willecke, K. Zeschky, A. Ortiz Rodriguez, C. Colberg,

V. Auwarter, S. Kneisel, M. Hutter, **A. Lozhkin**, N. Hoppe, D. Wolf, C. von zur Muhlen, M. Moser, I. Hilgendorf, C. Bode, A. Zirlik // Plos One – 2011. – V.6. – e19405.

Другие публикации по теме диссертации

5. **Lozhkin, A.** The presence of manganese cations in the sample of human atheromatous plaque / A.P. Lozhkin, N.I. Silkin, O.N. Ilinskaya, R.P. Naumova // Abstracts of the XIV International Conference Devoted to the 20th Anniversary of partnership between Kazan State University and Justus-Liebig Giessen university «Microbial enzymes in biotechnology and medicine».- Kazan, 2009.- P. 42.

6. **Ложкин, А.П.** Анализ содержания марганца в атеросклеротической бляшке как основа определения стадий атерогенеза / А.П. Ложкин, Т.Б. Биктагиров, Е.В. Тимонина, В.А. Абдульянов, А.В. Волошин, Н.И. Силкин, Р.Н. Хайруллин, М.Х. Салахов, О.Н. Ильинская // Материалы ежегодной научно-практической конференции “Инновации РАН 2010”. – Казань, 2010 – С.227-230.

Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю д.б.н., проф. Ильинской Ольге Николаевне за ценные идеи и советы в процессе выполнения диссертационной работы, а также д.ф.-м.н., проф. Силкину Николаю Ивановичу за проведение экспериментов по ЭПР-спектроскопии, обсуждение и интерпретацию результатов.

Благодарность выражается докторам Андреасу Цирлику и Деннису Вульффу (Universitäts klinikum, Albert-Ludwig-Universität Freiburg, Deutschland), за предоставление экспериментального оборудования для выполнения научно-исследовательской работы в рамках проекта «Михаил Ломоносов II». Автор выражает благодарность д.б.н, проф. Наумовой Римме Павловне за пробуждение интереса к науке; к.ф.-м.н. Волошину Александру Викторовичу за проведение масс-спектрометрических экспериментов, а также Биктагирову Тимуру Булатовичу, Тимониной Елене Владимировне и Родионову Александру Александровичу за помощь в работе над диссертацией.

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу: Казань, 420008, ул. Кремлевская, 18, Казанский университет, отдел аспирантуры, Ученому секретарю Диссертационного совета Д 212.081.08 Абрамовой Зинаиде Ивановне.