

На правах рукописи

**Фомина Ксения Владимировна**

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ  
АТЕРОСКЛЕРОЗА У КРЫС, ВЫЗВАННОГО  
ИММУНИЗАЦИЕЙ НАТИВНЫМИ  
ЛИПОПРОТЕИНАМИ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ  
ЧЕЛОВЕКА**

14.03.09 –клиническая иммунология, аллергология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Екатеринбург - 2013

Работа выполнена на кафедре иммунологии и клеточной биологии ФГБОУ ВПО «Удмуртский государственный университет» Министерства образования и науки РФ

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук,  
профессор

Меньшиков Игорь Викторович

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук,  
профессор, в.н.с. лаборатории  
иммунопатофизиологии ФГБУН  
Института иммунологии и  
физиологии УрО РАН

Чучкова Наталья Николаевна

доктор биологических наук,  
профессор, профессор кафедры  
лабораторной диагностики  
Института последипломного  
образования ГБОУ ВПО  
Башкирского гос. медицинского  
университета Минздрава России

Имельбаева Эльвира Аркамовна

**Ведущая организация:** ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России.

Защита диссертации состоится « 25 » июня 2013 года в 14.00 час. на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук Д 004.027.01 при ФГБУН Институте иммунологии и физиологии УрО РАН по адресу: 620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке УрО РАН по адресу: 620049, г. Екатеринбург, ГСП-293, ул. Софьи Ковалевской /Академическая, 22/20, с авторефератом - на сайте ВАК <http://vak.ed.gov.ru>.

Автореферат диссертации разослан «18» мая 2013 г.

Ученый секретарь Совета Д 004.027.01  
д.м.н., профессор



И.А. Тузанкина

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### *Актуальность исследования*

Атеросклероз лежит в основе широкого спектра сердечно-сосудистых заболеваний. Несмотря на многочисленные исследования, этиология и патогенез этого заболевания остаются неизвестными. Выяснение механизмов индукции и развития атеросклероза у человека затруднено из-за многолетней преклинической стадии развития атеросклероза и недостатка неинвазивных форм его обнаружения (Daugherty A., 2002). Вследствие этого большинство исследований на людях проводятся после появления клинических признаков заболевания, когда оно уже хорошо развито. Изучать причины возникновения атеросклероза, его ранние, доклинические стадии позволяют экспериментальные модели (Turk J.R., 2004). Кроме того, возможность индукции атеросклероза у экспериментальных животных с помощью какого-либо воздействия является эффективным способом проверки роли тех или иных факторов в инициации и развитии атеросклероза.

Обсуждается много внешних и внутренних факторов, ведущих к атеросклерозу. Среди них - избыточное потребление холестерина, аутоиммунные реакции, воспаление, дефекты генов рецепторов липопротеинов (Климов А.Н., 1999, Galkina E., 2009, Libby P., 2010, Shah P.K., 2011, Steinberg D., 2009). Экспериментальный атеросклероз вызывают в основном при помощи гиперхолестериновой диеты и генетических манипуляций, ведущих к нарушению обмена липопротеинов. Однако, существующие экспериментальные модели не воспроизводят в полной мере типичные для человека клинические стадии и признаки развития атеросклероза. Несмотря на многочисленные исследования, проводимые на этих экспериментальных моделях, до сих пор не удалось определить ведущие этиологические факторы атеросклероза или доказать, что ими являются факторы, которыми вызывают заболевание у экспериментальных животных. Одной из наиболее привлекательных сегодня гипотез, о причинах развития

атеросклероза является гипотеза, согласно которой окисление липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) приводит к их модификации и развитию на них аутоиммунной реакции. Аутоиммунная реакция в рамках этой гипотезы рассматривается или как ведущий этиологический фактор заболевания, или как одно из основных патогенетических звеньев. Однако, имеющиеся сегодня данные об уровне аутоантител к окисленным ЛПНП у больных атеросклерозом и здоровых людей противоречивы, однозначной связи между уровнем аутоантител к ним и атеросклерозом не обнаружено (Rossi G.P., 2003, Uusitupa M.I., 1996). В то же время существуют факты, указывающие, что мишенью аутоиммунной реакции могут быть не окисленные, а нативные липопротеины низкой плотности (нЛПНП). В частности, об этом свидетельствует тот факт, что уровень аутоантител против нЛПНП при атеросклерозе выше, чем у здоровых людей (Хлюстов В.Н., 2007, Меньшиков И.В., 2010). Недавно полученные результаты исследований, указывают на то, что аутоиммунные Т-клетки, распознающие эпитопы апопротеина В100 нативных ЛПНП, способствуют развитию атеросклероза, тогда как ингибирование Т-клеточного ответа против данных эпитопов подавляет развитие атеросклероза (Hermansson A., 2010). Поэтому можно предположить, что причиной дислипотеинемии и атерогенеза является развитие аутоиммунной реакции к нативным ЛПНП. В соответствии с данной гипотезой развитие аутоиммунной реакции против нЛПНП у экспериментальных животных должно сопровождаться появлением дислипотеинемии, атеросклеротическими изменениями стенки сосудов, подобных тем, что наблюдаются при атеросклерозе человека.

Одним из способов индукции аутоиммунных заболеваний у животных является иммунизация их гетерологичным антигеном, похожим на аутоантиген (Nandakumar K.S., 2004, Sulzer B., 1994, Корепанов А.С., 2012). В настоящей работе мы попытались индуцировать аутоиммунную реакцию к нЛПНП у крыс путем иммунизации их нЛПНП человека.

**Цель работы:** проверить гипотезу о том, что экспериментально вызванная аутоиммунная реакция против нативных липопротеинов низкой плотности у крыс будет сопровождаться метаболическими и патофизиологическими изменениями, подобными изменениям при атеросклерозе у человека.

**Задачи:**

1. Разработать схему иммунизации крыс нативными липопротеинами низкой плотности человека, вызывающую против них гипериммунный ответ.
2. Исследовать кинетику антител к нативным липопротеинам низкой плотности человека, аутоантител к нативным липопротеинам низкой плотности, уровень холестерина липопротеинов низкой и высокой плотности, общего холестерина в сыворотке крыс, иммунизированных нативными липопротеинами низкой плотности человека.
3. Провести морфологический и гистологический анализ сердца и дуги аорты у крыс, иммунизированных нативными липопротеинами низкой плотности человека.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Иммунизация крыс нативными липопротеинами низкой плотности человека вызывает аутоиммунную реакцию против нативных липопротеинов низкой плотности, которая сопровождается развитием дислипидемии, увеличением объема периваскулярного, эпикардального жира и атеросклеротическими изменениями в стенке дуги аорты.
2. Атеросклероз у крыс, вызванный иммунизацией нативными липопротеинами низкой плотности человека, может являться адекватной экспериментальной моделью атеросклероза человека.

***Научная новизна исследования***

Разработана новая экспериментальная модель атеросклероза крыс, вызванного иммунизацией нативными гетерологичными ЛПНП. Экспериментальная модель атеросклероза крыс воспроизводит характерные для атеросклероза человека метаболические и патофизиологические

изменения, такие как дислипидемия, увеличение объема периваскулярного и эпикардального жира, скопление лейкоцитов и отложение липидов в стенке сосуда, дезорганизация меди, разрушение интимы и поэтому может рассматриваться как адекватная модель атеросклероза человека. Результаты исследования дают новые знания о механизмах развития атеросклероза, получены убедительные факты в пользу гипотезы о ведущей роли аутоиммунной реакции против нЛПНП в развитии дислипидемии и атеросклероза. Экспериментальная модель имеет эвристический потенциал и открывает перспективу для изучения причинно-следственных связей между процессами, вовлеченными в патогенез атеросклероза; механизмов срыва естественной толерантности к нЛПНП, ведущих к атеросклерозу.

#### ***Практическая значимость исследования***

Экспериментальная модель атеросклероза открывает перспективу определения ранних диагностических маркеров атеросклероза, разработку новых средств диагностики, терапии и оценки их эффективности. Преимуществом модели атеросклероза крыс является воспроизводимость, экономичность, простота в исполнении. Экспериментальная модель атеросклероза может использоваться как в научных исследованиях, так и в образовательном процессе. Результаты исследования внедрены в учебный процесс в курсах «Экспериментальная иммунология», «Клиническая иммунология» магистерской программы «Иммунобиотехнология» на факультете медицинской биотехнологии ФГБОУ ВПО «Удмуртский государственный университет».

#### ***Апробация результатов исследований***

Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на VIII, X конференциях иммунологов Урала «Актуальные проблемы фундаментальной и клинической иммунологии и аллергологии», (Сыктывкар, 2010, Тюмень, 2012); XI Международной заочной научно-

практической конференции «Инновации в науке» (Новосибирск, 2012); II Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия», (Санкт-Петербург, 2012). По теме диссертации опубликовано 6 работ, из них 4 статьи в ведущих Российских рецензируемых научных журналах, входящих в Перечень изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

### ***Структура диссертационной работы***

Работа изложена на 93 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, их обсуждения, выводов, приложения. Список литературы включает 153 источника, среди которых 13 отечественных и 140 иностранных. Работа иллюстрирована 22 рисунками, 3 таблицами.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Для оценки нативности ЛПНП человека (Sigma), использованных для иммунизации и определения антител, и ЛПНП крысы, а также влияния хранения ЛПНП на их нативность, исследовали электрофоретическую подвижность ЛПНП в агарозном геле.

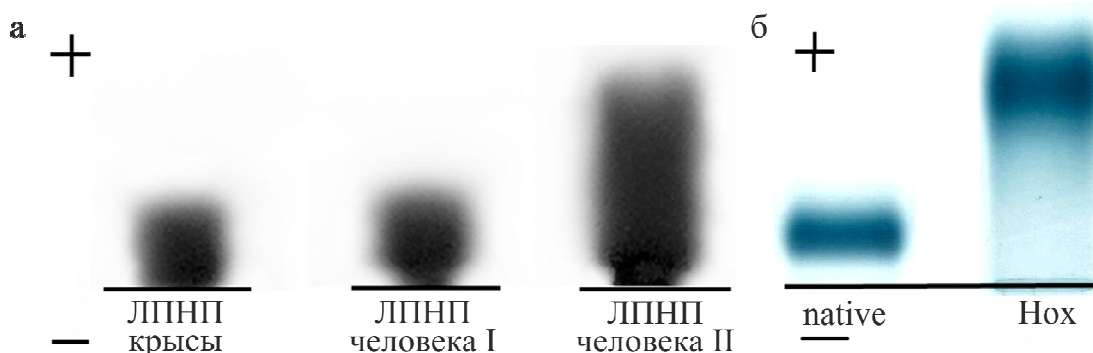


Рисунок 1 – Электрофореграмма липопротеинов низкой плотности.

Примечание: а. - Электрофоретическая подвижность ЛПНП человека (Sigma) и ЛПНП крысы в агарозном геле. ЛПНП человека I и ЛПНП крысы взяты из ампулы, вскрытой в день тестирования, ЛПНП человека II - из ампулы, вскрытой за 3 недели до тестирования; б.- Подвижность нЛПНП и окисленных ЛПНП человека (данные с сайта фирмы Kalen Biomedical: <http://www.kalenbiomed.com>). native – нативные, НОх – сильноокисленные ЛПНП.

Ампулы, содержащие человеческие ЛПНП и крысиные ЛПНП, вскрывали в день тестирования. Также анализировали подвижность

липопротеинов из ампулы, вскрытой за 3 недели до анализа (рисунок 1). ЛПНП человека и крысы (рисунок 1а), взятые из ампул, вскрытых в день тестирования, обладают низкой подвижностью, что свидетельствует о их нативности. Липопротеины человека, взятые из ампулы, вскрытой за 3 недели до анализа, неоднородны по подвижности (рисунок 1а). Поэтому для иммунизации крыс и определения антител против ЛПНП использовали липопротеины низкой плотности, взятые из ампул, открытых в день иммунизации или тестирования. Было проведено 3 серии экспериментов. В первой серии подбирали схему иммунизации, вызывающую сильный гуморальный иммунный ответ против нЛПНП и атеросклеротические изменения стенки сосудов. Для этого крыс Wistar, самок и самцов, (150-180 г), содержащихся на стандартном корме, иммунизировали нЛПНП человека. Липопротеины вводили однократно в дозе 200 мкг по белку в составе неполного или полного адъюванта Фрейнда, внутрикожно, или подкожно. Во второй и третьей серии экспериментов крыс иммунизировали нЛПНП человека в составе неполного адъюванта Фрейнда, в дозе 200 мкг, внутрикожно. Контрольным животным вводили внутрикожно эмульсию физиологического раствора в неполном адъюванте Фрейнда. После иммунизации еженедельно, в течение 13 недель, забирали кровь кардиальной пункцией под легкой анестезией, без антикоагулянта. Сыворотку крови анализировали или замораживали. Определяли кинетику антител против нЛПНП человека, нЛПНП крысы, уровень общего холестерина, холестерина липопротеинов низкой и высокой плотности в сыворотке крови в течение 13 недель после иммунизации. Титр антител к нЛПНП человека определяли по методу, описанному Хлюстовым В.Н., 1999. Для этого нЛПНП человека (Sigma) в забуференном физиологическом растворе (рН 8,6) сорбировали в течение ночи при 4<sup>0</sup>С. Исследуемые сыворотки вносили в разведениях и инкубировали в течение 3 часов при температуре 52<sup>0</sup>С. Реакцию регистрировали с помощью антивидовых антител к Ig крыс (к IgG, IgM, IgA),



меченных пероксидазой хрена (ИМТЕК, Россия). Оптическую плотность измеряли при 492 нм. Общий холестерин в сыворотке крови определяли ферментативным методом с помощью набора «Холестерин ФС» («Диакон-ДС», Россия). Холестерин липопротеинов низкой и высокой плотности определяли прямым гомогенным методом, используя коммерческие наборы «Холестерин ЛПНП», «Холестерин ЛПВП» (Human).

Через 20 недель после иммунизации крыс подвергали интракардиальной перфузии. Оценивали объем эпикардального жира. Для этого сердце окрашивали на липиды суданом III (модифицированная методика Holman., 1958). Проводили гистологический анализ дуги аорты. Парафиновые срезы, толщиной 3-5 мкм, окрашивали гематоксилином-эозином, криостатные срезы, толщиной 12–14 мкм - суданом III и гематоксилином. Определяли липидный состав надпочечников. Липидный экстракт ткани надпочечников получали по методу Фолча. Общие липиды разделяли на силикагелевых пластинах Sorbfil в системе гексан:диэтиловый эфир: метанол:ледяная уксусная кислота в соотношении 9:2:0,2:0,3. Количество фракций общих липидов определяли по углероду при сжигании липидов серной кислотой (Грибанов Г.А., 1980) и вычисляли их процентное соотношение.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 5.0 для Windows. Результаты выражали как среднее $\pm$ SD, где SD – выборочное стандартное отклонение, для малых выборок как медиана  $\pm$  25 % (Гланц С., 1999). Некоторые данные представляли как разницу ( $\Delta$ ) средних значений между группой опытных и контрольных животных. Для оценки достоверности различий был использован критерий Манна-Уитни.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Разработка схемы иммунизации крыс нативными ЛПНП человека, вызывающей гипериммунный ответ против нЛПНП**

Исследование влияния дозы и способа введения нЛПНП человека, вида адъюванта, необходимости повторного введения антигена на интенсивность

иммунного ответа против нЛПНП и развитие атеросклероза у крыс показало, что интенсивный, самоусиливающийся иммунный ответ против нЛПНП и изменения в стенке дуги аорты, характерные для атеросклероза человека, наблюдаются у крыс в ответ на однократную иммунизацию ЛПНП человека независимо от типа использованного адъюванта и способа введения. Сравнительный анализ интенсивности гуморального иммунного ответа против нЛПНП у крыс, иммунизированных разными способами – внутрикожно или подкожно, а также с использованием неполного или полного адъюванта Фрейнда показал, что внутрикожная иммунизация нЛПНП человека вызывает более интенсивную продукцию антител по сравнению с подкожным предъявлением антигена, интенсивность продукции антител не зависит от типа использованных адъювантов. Так как полный адъювант Фрейнда содержит *Micobacterium tuberculosis*, иммунный ответ против которых может приводить к развитию аутоиммунных реакций (Holoshitz J., 1984), в следующих экспериментах, для исключения роли *Micobacterium tuberculosis* в индукции атеросклероза, крыс иммунизировали нЛПНП человека в составе неполного адъюванта Фрейнда, эмульсию вводили внутрикожно, однократно. Таким образом, однократная иммунизация крыс Wistar нЛПНП человека в дозе 200 мкг, как в комплексе с неполным, так и полным адъювантом Фрейнда, может вызывать самоподдерживающийся самоусиливающийся иммунный ответ против нЛПНП и изменения в стенке дуги аорты, характерные для атеросклероза человека.

### **Кинетика антител против нЛПНП человека, аутоантител против нЛПНП у крыс, иммунизированных нЛПНП человека**

Результаты исследования кинетики иммунного ответа, вызванного однократной иммунизацией нЛПНП человека в дозе 200 мкг в составе неполного адъюванта Фрейнда, показаны на рисунке 2 (эксперимент 2) и рисунке 3 (эксперимент 3). Иммунизация нЛПНП в эксперименте 2 вызвала сильный иммунный ответ против них.

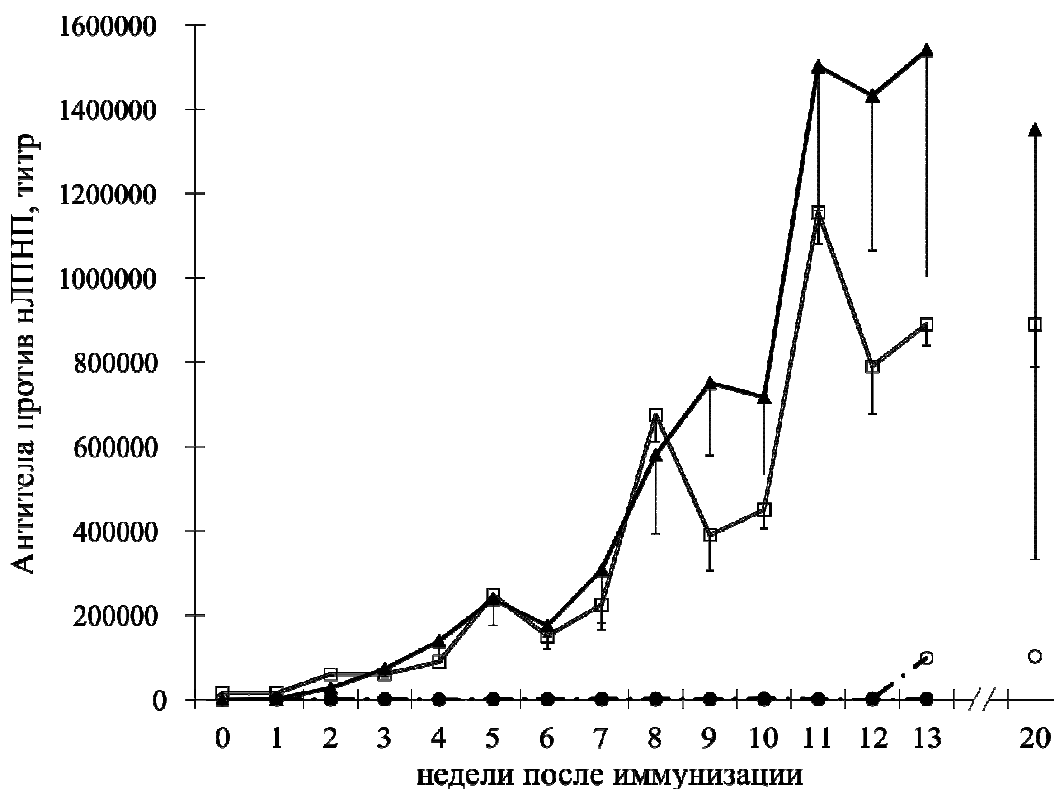


Рисунок 2 – Кинетика антител против нЛПП человека и аутоантител против нЛПП крысы у крыс, иммунизированных нЛПП и контрольных крыс. (эксперимент 2).

Примечание:  $\blacktriangle$  - антитела против нЛПП человека у крыс, иммунизированных нЛПП;  $\circ$  - антитела против нЛПП человека у контрольных крыс;  $\square$  - аутоантитела против нЛПП крысы у крыс, иммунизированных нЛПП;  $\bullet$  - аутоантитела против нЛПП крысы у контрольных крыс.

В эксперименте 3 иммунный ответ против нЛПП слабее, чем в эксперименте 2. Несмотря на различие в интенсивности иммунного ответа между экспериментами, характер иммунного ответа в обоих экспериментах отличается от нормального иммунного ответа. Рост уровня антител против нЛПП человека носит самоподдерживающийся, самоусиливающийся характер, каждое новое повышение уровня антител к нЛПП человека носит спонтанный характер и достигает максимума быстрее, чем предыдущее. Иммунный ответ против нЛПП человека не завершается в течение периода наблюдения (13 недель после иммунизации). Наиболее ярко отличия от нормального иммунного ответа проявляются в эксперименте 2, где иммунный ответ более интенсивный. Такой самоподдерживающийся и самоусиливающийся характер иммунного ответа обычно наблюдается при

аутоиммунных заболеваниях и свидетельствует о нарушении в механизмах регуляции иммунного ответа (Sulzer B., 1994, Franch A., 1994).

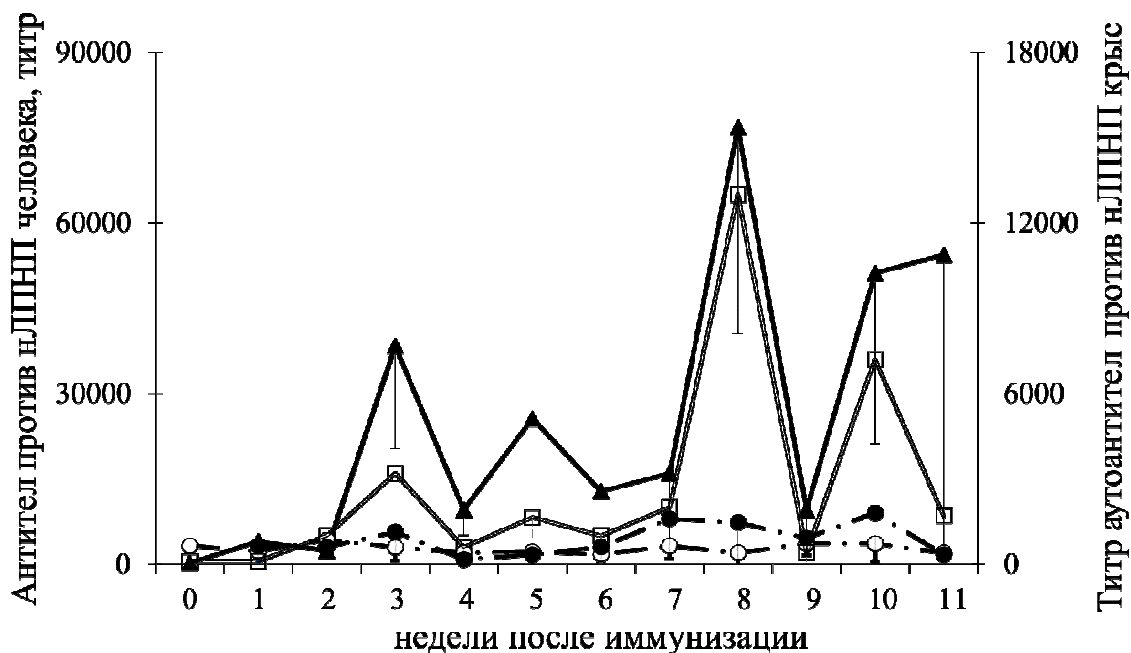


Рисунок 3 – Кинетика антител против нЛПНП человека и аутоантител против нЛПНП крысы у крыс, иммунизированных нЛПНП и контрольных крыс (эксперимент 3).

Примечание:  $\blacktriangle$  - антитела против нЛПНП человека у крыс, иммунизированных нЛПНП;  $\circ$  - антитела против нЛПНП человека у контрольных крыс;  $\square$  - аутоантитела против нЛПНП крысы у крыс, иммунизированных нЛПНП;  $\bullet$  - аутоантитела против нЛПНП крысы у контрольных крыс.

Поэтому можно предполагать, что однократная иммунизация крыс нЛПНП человека вызвала развитие аутоиммунной реакции против нЛПНП крысы. Для проверки этого предположения, было проведено исследование кинетики аутоантител к нЛПНП крысы. Обнаружено, что иммунизация крыс нЛПНП вызывает образование аутоантител против нЛПНП крысы (рисунок 2, рисунок 3). Сопоставление кинетических кривых антител против нЛПНП человека и аутоантител к нЛПНП крысы показало, что уровень антител против нЛПНП крысы и человека изменяется синхронно, наблюдается совпадение максимумов образования антител против нЛПНП крысы и нЛПНП человека во времени. В основе связи иммунного ответа на чужеродные нЛПНП и аутоиммунного ответа против нЛПНП крысы может лежать взаимодействие

аутореактивных лимфоцитов и лимфоцитов против чужеродного антигена – индуктора аутоиммунного заболевания, которое осуществляется посредством общего регуляторного клона лимфоцитов. Таким образом, однократная иммунизация крыс нЛПНП человека в неполном адьюванте Фрейнда вызывает самоподдерживающийся, самоусиливающийся аутоиммунный ответ против нЛПНП.

### Уровень холестерина липопротеинов низкой и высокой плотности у крыс, иммунизированных нативными ЛПНП человека

Рост уровня аутоантител к нЛПНП у иммунизированных крыс, отвечающих сильной продукцией антител против нЛПНП, сопровождался дислиппротеинемией: увеличением уровня холестерина липопротеинов низкой плотности, снижением уровня холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) (рисунок 4).

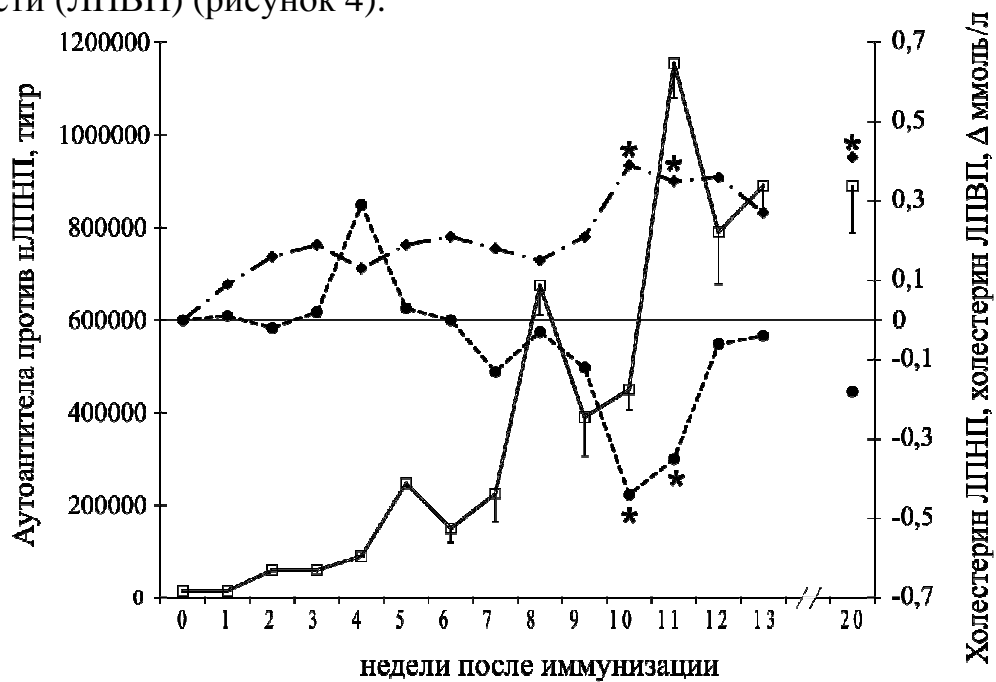


Рисунок 4 – Кинетика аутоантител против нЛПНП крысы и уровень фракций холестерина у крыс с признаками дислиппротеинемии (эксперимент 2).

Примечание:  $\square$  - аутоантитела против нЛПНП крысы у крыс, иммунизированных нЛПНП;  $\blacklozenge$  - холестерин ЛПНП;  $\bullet$  - холестерин ЛПВП; Каждая точка на кривых уровня фракций холестерина представлена в виде разницы средних между группой иммунизированных нЛПНП крыс (n=8) и группой контрольных крыс (n=6). \* - значимые различия по сравнению с контрольными животными  $p \leq 0,05$ , критерий Манна-Уитни.

В период максимума аутоантител против нЛПНП (11 неделя после иммунизации) изменение уровней холестерина ЛПНП и ЛПВП достигало достоверных значений. Характер дислиппротеинемии, наблюдаемый у крыс, иммунизированных нЛПНП, не противоречит данным об изменении уровня холестерина липопротеинов низкой плотности, полученным в клинических исследованиях у людей. У крыс, отвечающих слабой продукцией аутоантител против нЛПНП, дислиппротеинемии не выявлено (рисунок 5).

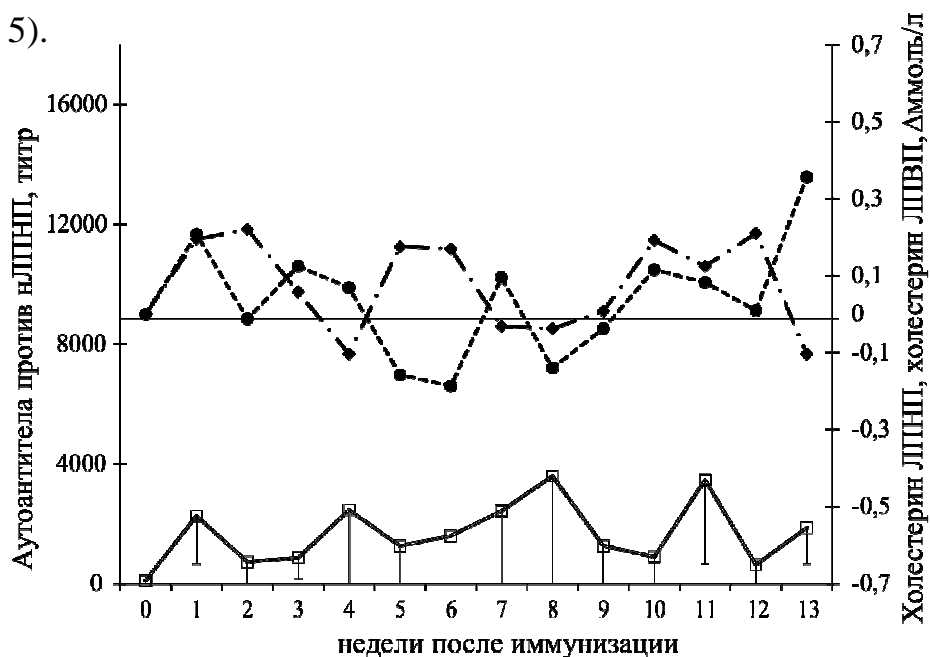


Рисунок 5 – Кинетика аутоантител против нЛПНП крысы и уровень фракций холестерина у крыс без признаков дислиппротеинемии (эксперимент 3).

Примечание:  $\square$  - аутоантитела против нЛПНП крысы у крыс, иммунизированных нЛПНП;  $\blacklozenge$  - холестерин ЛПНП;  $\blacklozenge$  - холестерин ЛПВП; Каждая точка на кривых уровня фракций холестерина представлена в виде разницы средних между группой иммунизированных нЛПНП крыс (n=6) и группой контрольных крыс (n=6).

Таким образом, выявлена ассоциация между сильным аутоиммунным ответом против нЛПНП у крыс и развитием дислиппротеинемии, и отсутствие изменений фракций холестерина в сыворотке крыс, отвечающих слабой продукцией аутоантител на иммунизацию нЛПНП. Данный факт позволяет предполагать, что причиной дислиппротеинемии у крыс, иммунизированных нЛПНП, является аутоиммунная реакция против нЛПНП.

### **Липидный состав надпочечников у крыс, иммунизированных нативными ЛПНП человека**

В исследованиях на человеке (Borkowski A.J., 1970) и на крысах (Dexter R.N., 1970) показано, что 80% и более холестерина для стероидогенеза в надпочечниках поступает из липопротеинов плазмы. У крыс источником холестерина являются преимущественно ЛПВП плазмы (Gwynne J.T., 1976). Низкий уровень ЛПВП, выявленный у крыс, иммунизированных нЛПНП человека, может вызывать недостаток холестерина в надпочечниках и, как следствие, нарушение синтеза андрогенов в органе, который отвечает за синтез андрогенов независимо от пола и возраста животного. Поэтому у крыс, иммунизированных нативными ЛПНП, а также контрольных крыс, получивших инъекцию неполного адьюванта Фрейнда, был исследован состав общих липидов в надпочечниках.

Выявлено, что у крыс, иммунизированных нЛПНП, имеющих признаки дислипидотеинемии, уровень общего холестерина в надпочечниках достоверно ниже ( $22,5 \pm 12,3\%$ ), чем у контрольных крыс ( $42,39 \pm 38,95\%$ ), главным образом, за счет этерифицированного холестерина ( $12,7 \pm 12,33\%$  – у крыс, иммунизированных нЛПНП и  $32,3 \pm 24,2\%$  – у контрольных крыс). Кроме того, по сравнению с контрольными крысами ( $11,94 \pm 8,67\%$ ) у крыс с признаками дислипидотеинемии в надпочечниках выявлен достоверно высокий уровень триглицеридов ( $31,9 \pm 31\%$ ). У крыс, отвечающих слабой продукцией аутоантител и не имеющих изменений уровня холестерина липопротеинов плазмы, достоверных отличий в липидном составе надпочечников по сравнению с контрольными крысами не выявлено. Недостаток холестерина, выявленный в надпочечниках крыс, иммунизированных нЛПНП, может вести к недостатку продукции андрогенов, которому сегодня отводят ведущую роль в каскаде метаболических изменений, ведущих к атеросклеротическому повреждению сосудов.

### **Морфологический и гистологический анализ сердца и дуги аорты у крыс, иммунизированных нативными ЛПНП человека**

У контрольных крыс, а также крыс, иммунизированных нЛПНП человека, но отвечающих слабой продукцией аутоантител и не имеющих изменений во фракциях холестерина плазмы (эксперимент 3), изменений в структуре дуги аорты не обнаружено. Интима (внутренняя оболочка) аорты крыс представлена в виде единственного эндотелиального слоя, который плотно прилегает к внутренней эластической мембране; медиа (средняя оболочка) аорты состоит из нескольких слоев мышечных клеток и экстрацеллюлярного коллагенового матрикса, разделенного эластиновыми пластинками; адвентиция (наружная оболочка) аорты представлена соединительной и жировой тканью (рисунок 6а). Гистологический анализ дуги аорты крыс, сильно отвечающих на иммунизацию нЛПНП и имеющих признаки дислипотеинемии (эксперимент 2, эксперимент 3) выявил изменения, характерные для атеросклероза.

*Скопление лейкоцитов.* В стенке дуги аорты крыс, иммунизированных нЛПНП человека, отмечено значительное скопление лейкоцитов. Лейкоциты накапливаются как в интиме, так и между медией и адвентицией (рисунок 6б, рисунок 7 а, б). Особенно обширная инфильтрация лейкоцитами наблюдается в адвентициальной оболочке сосуда (рисунок 7а).

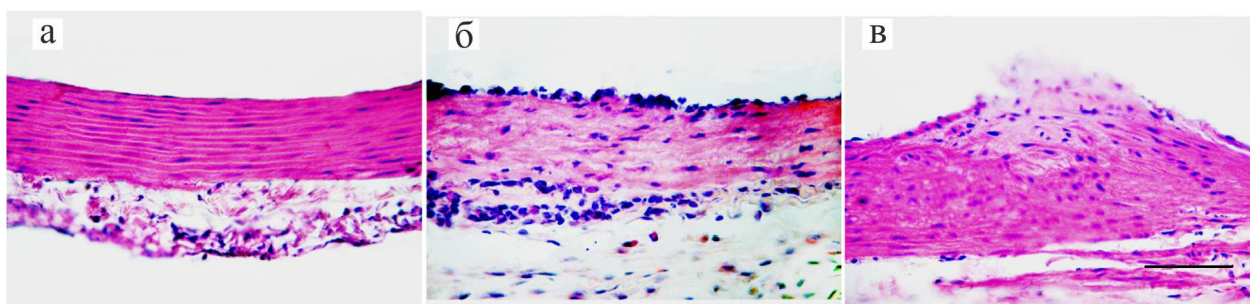


Рисунок 6 – Стенка дуги аорты крыс.

Примечание: а. - Стенка дуги аорты контрольных крыс; б, в. - Стенка дуги аорты крыс, иммунизированных нЛПНП. Окраска гематоксилином-эозином. Длина линии = 180мкм.



В стенке сосуда обнаруживаются лимфоциты, гранулоциты, макрофаги (рисунок 7а, рисунок 7б). Принимая во внимание факт, что накопление лейкоцитов в тканях наблюдается при хроническом воспалении (Buckley C.D., 2003), наличие лейкоцитов в стенке дуги аорты крыс, иммунизированных нЛПНП, свидетельствует о том, что иммунный ответ против нЛПНП вызывает хроническое воспаление в дуге аорты.

*Структурные изменения стенки сосуда.* На рисунках 6в и 7в видна дезорганизация меди, не просматривается *elastic lamina*. На рисунке 6в и рисунках 7в и 7г представлены участки дуги аорты с более глубокими нарушениями интима-медия комплекса, наблюдаются участки полного разрушения интимы, утолщения и обнажения меди.

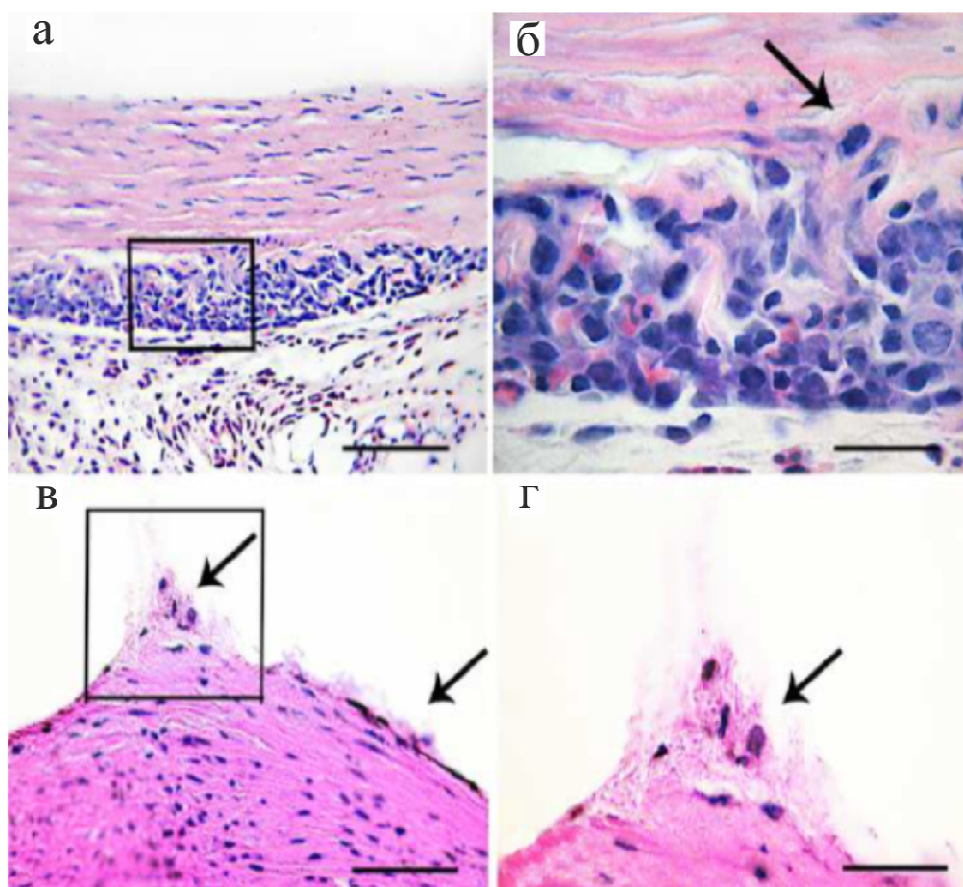


Рисунок 7 – Изменения в стенке дуги аорты крыс, иммунизированных нативными ЛПНП человека.

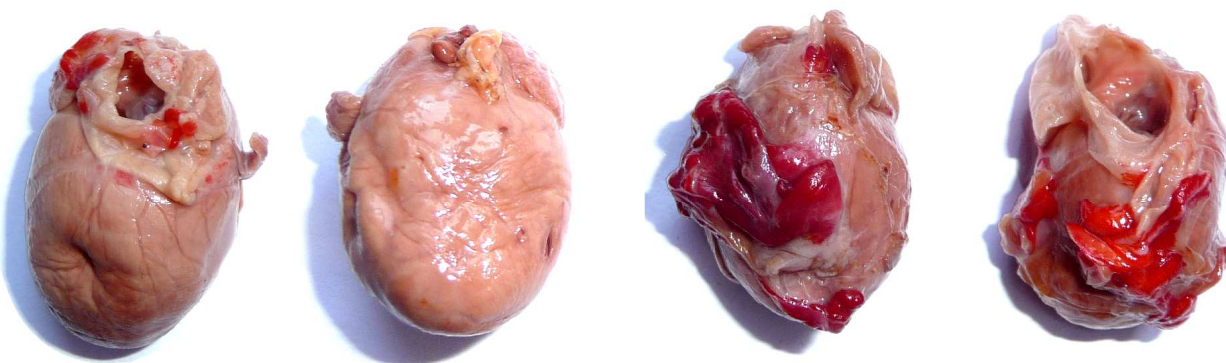
Примечание: а, б. - Накопление лейкоцитов в стенке аорты; в, г. - Участок полной деградации интимы, наблюдается утолщение и обнажение меди. Окраска гематоксилином-эозином. Длина линии = 200 мкм (а, в), 45мкм (б, г).

*Отложение липидов (липоидоз).* В стенке дуги аорты крыс, иммунизированных нативными ЛПНП, выявлены очаговые отложения липидов. Липиды преимущественно накапливаются внутри гладкомышечных клеток. В стенке дуги аорты контрольных крыс липидов не обнаружено.

Таким образом, аутоиммунный ответ против нЛПНП у крыс сопровождается повреждениями стенки дуги аорты, типичными для атеросклероза человека.

### **Эпикардиальный и периваскулярный жир у крыс, иммунизированных нативными ЛПНП человека**

У крыс, у которых аутоиммунная реакция, вызванная иммунизацией нЛПНП, сопровождалась дислипотеинемией, выявлен экстремальный объем эпикардиального жира (рисунок 8 в, г) и увеличение по сравнению с контрольными крысами, количества и размеров адипоцитов белой жировой ткани в адвентициальной оболочке дуги аорты (рисунок 9). Сердце контрольных животных (рисунок 8а) и крыс со слабой продукцией аутоантител к нЛПНП без признаков дислипотеинемии (рисунок 8б) почти не имеет эпикардиального жира. В настоящее время роли эпикардиальной и периваскулярной жировой ткани в патогенезе атеросклероза уделяется большое внимание (Djaberi R., 2008, Verhagen S.N., Visseren F.L., 2011).



а б в г  
Рисунок 8 – Эпикардиальный жир.

Примечание: а. - Сердце контрольных крыс; б. - Сердце крыс, иммунизированных нЛПНП, не имеющих дислипотеинемии; в, г. - Сердце крыс, у которых иммунизация нЛПНП вызвала дислипотеинемию. Окраска суданом III. Темные области – эпикардиальный жир.

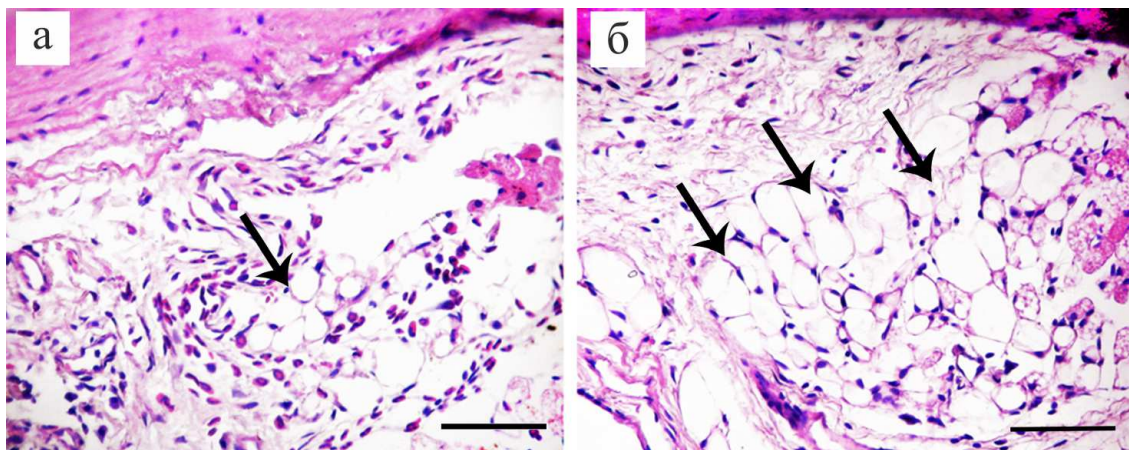


Рисунок 9 – Периваскулярная жировая ткань.

Примечание: а. - Адипоциты дуги аорты контрольных крыс; б. - Адипоциты дуги аорты крыс, иммунизированных нЛПНП. Окраска гематоксилином-эозином. Длина линии 270 мкм.

Увеличение объема эпикардальной жировой ткани сегодня рассматривают как маркер коронарного атеросклероза и прогностический показатель его развития (Yorgun H., 2011). Результаты исследований *in vitro* и *in vivo* показали, что периваскулярная жировая ткань обладает провоспалительными свойствами и способна вызывать атеросклеротический процесс в стенке сосуда, инициируя его с внешней стороны (Verhagen S.N., Visserren F.L., 2011). Поэтому, выявленные у крыс повреждения внутренней стенки дуги аорты могут быть вызваны реакцией периваскулярной жировой ткани на иммунизацию крыс нЛПНП человека.

Таким образом, аутоиммунный ответ против нЛПНП у крыс сопровождается увеличением объема эпикардальной и периваскулярной жировой ткани.

### **Адекватность модели атеросклероза крыс, вызванного иммунизацией нативными ЛПНП, и гипотеза о роли аутоантител против нЛПНП в индукции атеросклероза**

У крыс, у которых иммунизация нЛПНП человека вызвала развитие сильного аутоиммунного ответа против нативных ЛПНП, выявлены изменение уровня фракций холестерина в сыворотке, дефицит эфиров холестерина в надпочечниках, изменения стенки дуги аорты, такие как накопление лейкоцитов, дезорганизация меди и разрушение интима-медия

комплекса, отложение липидов. Кроме того, у крыс с сильной продукцией аутоантител против нЛПНП, выявлено экстремальное увеличение объема эпикардальной и периваскулярной жировой ткани, которой сегодня отводится ведущая роль в патогенезе атеросклероза человека (Djaberi R., 2008, Verhagen S.N., Visseren F.L., 2011).

Таким образом, у крыс, иммунизированных нативными ЛПНП человека и развивших сильный аутоиммунный ответ против нЛПНП, выявлены метаболические и патофизиологические изменения, подобные изменениям, наблюдаемым у больных атеросклерозом людей. Сходство изменений, наблюдаемых у крыс, иммунизированных нЛПНП, изменениям при атеросклерозе человека, указывает на адекватность экспериментальной модели атеросклероза крыс, вызванного иммунизацией нативными ЛПНП человека.

При проведении эксперимента 3 было обнаружено, что признаки атеросклероза (дислипотеинемия, изменения стенки дуги аорты, увеличение объема эпикардального жира) возникают не у всех крыс, иммунизированных нЛПНП. Некоторые животные оказались устойчивы к развитию атеросклероза в ответ на иммунизацию нЛПНП человека. Данный факт также указывает на адекватность экспериментальной модели, так как в человеческой популяции атеросклероз возникает не у всех ее представителей.

Сравнительный анализ уровня аутоантител против нЛПНП у крыс без метаболических и патофизиологических изменений, подобных атеросклерозу, и крыс, развивших эти изменения, выявил ассоциацию между силой аутоиммунного ответа и выраженностью признаков атеросклероза. Данный факт свидетельствует в пользу гипотезы, что причиной атеросклероза у крыс является аутоиммунная реакция против нЛПНП.

Для объяснения роли аутоиммунной реакции против нЛПНП в развитии атеросклероза мы предлагаем следующую гипотезу о причинно-следственной связи между аутоиммунной реакцией против нЛПНП и атеросклеротическими поражениями сосудов.

**Гипотеза.** Аутоантитела против нЛПНП нарушают нормальный обмен холестерином между липопротеинами плазмы крови и клетками (рисунок 10). Вследствие этого возникает дефицит холестерина в клетках и тканях, которые получают его преимущественно из липопротеинов плазмы, такие как клетки коры надпочечников, мононуклеары крови и др. (рисунок 10).

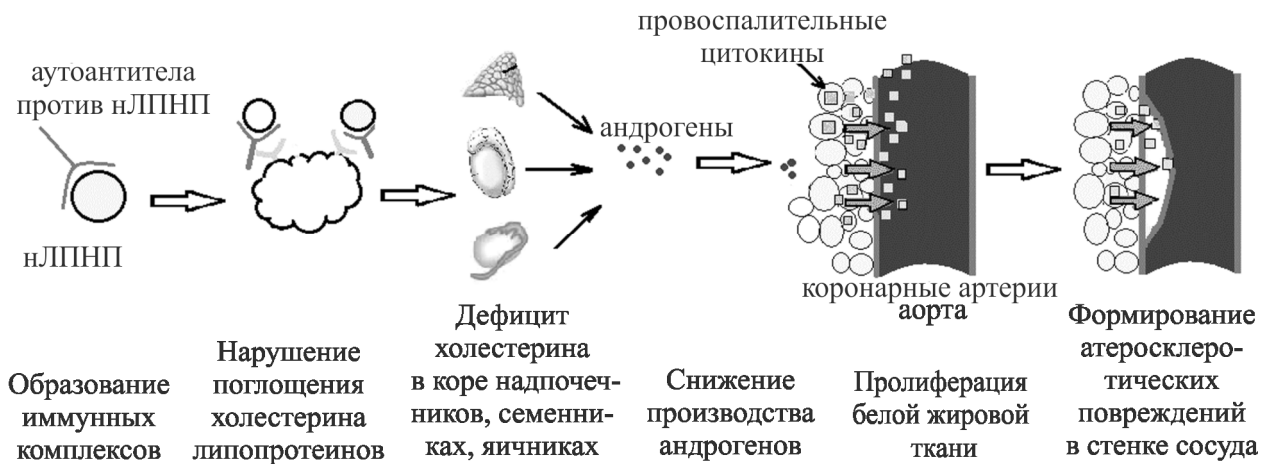


Рисунок 10 – Гипотетическая схема причинно-следственных связей между аутоиммунной реакцией против нЛПНП и атеросклеротическими повреждениями сосудов.

Ранее мы обнаружили, низкий уровень холестерина в мононуклеарах крови пациентов с атеросклерозом (Меньшиков И.В., 2010). Исследовав состав общих липидов в надпочечниках крыс с атеросклерозом, возникшим в ответ на иммунизацию нЛПНП, мы обнаружили низкий уровень эфиров холестерина по сравнению с контрольными животными. Известно, что надпочечники у большинства видов животных и человека используют холестерин липопротеинов плазмы для стероидогенеза (Grummer R.R., 1988). Поэтому нарушение нормального поглощения холестерина из липопротеинов плазмы может привести к снижению производства андрогенов в коре надпочечников. Клинические и эпидемиологические исследования показали, что низкий уровень дегидроэпиандростерона – одного из основных андрогенов, выделяемых надпочечниками, ассоциирован с ишемической болезнью сердца, эндотелиальной дисфункцией, атеросклерозом (Traish A.M., 2011). В свою

очередь андрогенная недостаточность индуцирует пролиферацию белой жировой ткани (Mammi С., 2011) (рисунок 10).

Вызванная дефицитом андрогенов пролиферация белой жировой ткани усиливается под действием выделяемого ею лептина, который подавляет производство андрогенов и замыкает патологический круг, приводя к еще более интенсивному росту белой жировой ткани. Обнаруженный у крыс, иммунизированных нЛПНП, низкий уровень холестерина в надпочечниках и увеличенный объем эпикардальной и периваскулярной жировой ткани является подтверждением роли андрогенов в пролиферации белой жировой ткани. Согласно недавно проведенным исследованиям Verhagen S.N., Visseren F.L., белая жировая ткань, непосредственно окружающая артерии, имеет провоспалительные свойства и стимулирует атерогенез в сосудистой стенке «снаружи внутрь». В частности, аргументом в пользу причинной связи между жировой периваскулярной тканью и атеросклерозом является то, что сегменты коронарных артерий, свободные от эпикардального жира или отделенные от него тканью миокарда, защищены от развития атеросклероза.

Таким образом, ассоциация между развитием аутоиммунной реакции против нЛПНП и формированием типичных для атеросклероза человека метаболических и патофизиологических изменений, выявленная у крыс, иммунизированных нЛПНП, является доказательством в пользу гипотезы о том, что аутоиммунная реакция против нативных ЛПНП может являться причиной развития атеросклероза.

## **ВЫВОДЫ**

1. Однократная иммунизация крыс Wistar нативными липопротеинами низкой плотности человека в дозе 200 мкг в неполном адъюванте Фрейнда вызывает у крыс продукцию аутоантител против нативных липопротеинов низкой плотности крысы.
2. Аутоиммунная реакция против нативных липопротеинов низкой плотности у крыс сопровождается развитием дислипотеинемии, степень

дислиппротеинемии зависит от уровня продукции аутоантител против нативных липопротеинов низкой плотности.

3. Дислиппротеинемия у крыс, вызванная иммунизацией нативными липопротеинами низкой плотности человека, сопровождается снижением уровня эфиров холестерина в тканях надпочечников, увеличением объема периваскулярной и эпикардальной белой жировой ткани, скоплением лейкоцитов и отложением липидов в стенке дуги аорты, разрушением интимы, утолщением и обнажением меди.

4. Метаболические и патофизиологические изменения, вызванные у крыс иммунизацией нативными липопротеинами низкой плотности, подобны ранним признакам развития атеросклероза у человека.

#### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЛПВП - липопротеины высокой плотности    нЛПНП - нативные липопротеины низкой плотности

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

##### Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК

1. Бедулева Л.В. Липидный состав и функциональная активность иммунных клеток, уровень аутоантител к нативной ДНК у людей, больных атеросклерозом / Л.В. Бедулева, Н.И. Булатова, М.И. Макарова, И.В. Меньшиков, Н.Н. Лекомцева, М.Г. Поздеева, К.В. Фомина, А.А. Санникова // Вестник Уральской медицинской академической науки. - 2008. - № 1. - С. 20-21.
2. Фомина К.В. Изменение уровня липопротеинов у крыс, иммунизированных гетерологичными нативными липопротеинами низкой плотности / К.В. Фомина, С.В. Цыпленкова, Л.В. Бедулева, И.В. Меньшиков // Вестник Уральской медицинской академической науки. - 2010. - № 2/1: тематический сборник по аллергологии и иммунологии. - С. 219-220.
3. Меньшиков И.В. Экспериментальная модель атеросклероза у крыс, вызванного иммунизацией нативными липопротеинами человека / И.В. Меньшиков, К.В. Фомина, Л.В. Бедулева, В.Г. Сергеев // Вестник

Удмуртского университета. - 2012. - Серия 6 . Биология. Науки о земле. - № 1.– С.80-86.

4. Фомина К.В. Новая экспериментальная модель атеросклероза у крыс / К.В. Фомина, И.В. Меньшиков, Е.И. Кузнецова // Вестник Уральской медицинской академической науки. - 2012. - Вып.4 (41) - С. 175.

Публикации в других периодических изданиях, учебных пособиях, сборниках статей и т.п.

5. Фомина К.В. Иммунный ответ против нативных липопротеинов низкой плотности вызывает атеросклероз у крыс / К.В. Фомина, Л.В. Бедулева, О.Н. Мальцева, И.В. Меньшиков // Инновации в науке: материалы XI международной заочной научно-практической конференции. - 2012. - Ч.1. - С. 23-31.

6. Столярова Е.Ю. Популяции ревматоидного фактора в предотвращении развития атеросклероза крыс, вызванного иммунизацией нативными ЛПНП / Е.Ю. Столярова, К.В. Фомина, Л.В. Бедулева // Медицинский академический журнал: материалы II всерос. науч. конф. молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия». – 2012. – С. 403-404.

Исследование выполнено при поддержке ФЦП Минобрнауки РФ, соглашение № 14.В37.21.0211; АВЦП Минобрнауки РФ «РНПВШ (2009-2011 годы)», № 2.1.1/2157; государственного заказа Минобрнауки РФ на проведение НИР по теме «Аутоиммунные механизмы атеросклероза. Новая экспериментальная модель атеросклероза у крыс» № 4.5505.2011.