

На правах рукописи

Хильченко Алексей Валериевич

**УСИЛЕННЫЙ АТЕРОГЕННЫЙ ЭФФЕКТ МАКРОФАГОВ ИЗ МОНОЦИТОВ
КРОВИ БОЛЬНЫХ ИБС, ВЫЯВЛЕННЫЙ В АЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ И ПРИ
АНОКСИИ IN VITRO.**

03.00.04 – биохимия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук.

Москва – 2008

Работа выполнена в Государственном учреждении Научно-исследовательском институте биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича Российской академии медицинских наук

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Биленко Марианна Владимировна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Ипатова Ольга Михайлова

доктор биологических наук
Дудник Людмила Борисовна

Ведущая организация: Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Факультет Фундаментальной медицины

Защита диссертации состоится 24 апреля 2008 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета Д. 001.010.01. при ГУ НИИ БМХ РАМН по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ НИИ БМХ РАМН по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10

Автореферат разослан “ “ марта 2008г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
Кандидат химических наук

Е.А. Карпова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

В настоящее время очевидно, что ключевым фактором возникновения атеросклеротических повреждений в сосудах является функциональная активность макрофагов (МФ), в частности, их способность распознавать, связывать и поглощать липопротеины низкой плотности (ЛНП), что ведет к накоплению в макрофагах липидов и холестерина, нарушению метаболизма макрофагов, превращению их в пенистые клетки, являющиеся ранней стадией проявления атеросклероза. При этом, атеросклеротические повреждения сосудов являются основной причиной нарушений сосудистого кровообращения, причиной развития сердечно-сосудистых заболеваний, инвалидности и смерти населения крупных городов России и других развитых стран мира.

К существующим факторам «риска» развития атеросклероза, относят также гипертонию, курение, стресс, охлаждение и другие факторы [Ross R, 1986; O'Donnell CJ, Ridker PM, Glynn RJ, et al., 1997], сопровождающиеся генерализованной гипоксией, и локальной ишемией сосудистой стенки [Crawford DW and Kramsch DM, 1988; Seidel SL and Strong R, 1986]. Спазмы и локальная ишемия сосудов ведут к выделению эндотелиальными клетками (ЭК), МФ, клетками соединительной ткани, гладкомышечными клетками, элементами крови, в том числе циркулирующими моноцитами, активных форм кислорода (АФК), провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1, ИЛ-6 и др.), которые “прймируют” и “стимулируют” клетки, усиливают их способность окислять ЛНП [Клебанов ГИ, Владимирова ЮА, 1999; Ma J, 2003].

Имеются данные, согласно которым лишь активированные моноциты/макрофаги обладают способностью осуществлять свои многоплановые функции, в том числе выделять АФК, окислять и поглощать ЛНП [Ma J, et al., 2003]. Однако, дозы цитокинов, сроки инкубации, необходимые для активации ими макрофагов *in vitro*, а также способность моноцит-производных макрофагов крови человека подвергаться активации *in vivo*, приобретая способность окислительно модифицировать ЛНП *in vivo* и *in vitro*, исследованы недостаточно.

Особенно важным является вопрос об активации моноцит-производных макрофагов крови *in vivo* при различных патологиях, протекающих на фоне ишемии и воспаления. Многократно показано, что в крови больных ишемической болезнью сердца (ИБС) резко повышено содержание таких цитокинов как ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО- α и др. [Holm T, et al., 2003; Valgimigli M, et al., 2003; Mizia-Stec K, et al., 2003; Takahashi K, et al., 2002; Hojo Y, et al.,

2002; Mazzone A, et al., 2001], являющихся активными стимуляторами моноцитов/макрофагов *in vitro*. Однако, за исключением данных об изменении генных и морфологических признаков моноцит-производных макрофагов, прямых работ, указывающих на усиление функциональной активности моноцит-производных макрофагов из крови больных ИБС (МФ_{ИБС}), в литературе не выявлено, что препятствует ранней диагностике и направленному лечебному воздействию на функцию моноцитов/макрофагов у больных ИБС в целях предотвращения возникновения у них атеросклероза.

Несмотря на то, что проф. Биленко М.В. с группой сотрудников ранее отчетливо показано, что частичная и тотальная ишемия различных органов ведет к усилению продукции тканями АФК, первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ, выходу этих продуктов в кровь, усилению способности ЭК сосудов окислять ЛДЛ [Биленко М.В. и др.1990; Биленко М.В., Вахрушева Т.В.,Федосова С.В.,1998; Биленко М.В., Ладыгина В.П., Федосова С.В.,1996 и др.], исследования по влиянию ишемии на способность моноцит-производных макрофагов окислять и поглощать ЛНП практически отсутствуют.

Наряду с клеточными элементами сосудистой стенки и крови, существенная роль в атерогенезе принадлежит содержанию холестерина в крови больных и степени окисленности ЛНП. Показано, что количество окислительно модифицированных ЛНП в крови гиперхолестеринемичных людей [Cazzolato G, et al., 1991] или животных [Hodis HN, et al., 1994; Лопухин ЮМ, Владимиров ЮА, Молоденков МН, и др., 1983] выше, чем в крови людей и животных с нормальным содержанием холестерина.

Липопротейны низкой плотности, от людей с гиперхолестеринемией содержат также не только более высокое количество свободного холестерина и триглицеридов, но и продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), низкое содержание антиоксидантов (CoQ10, Vit E), обладают более высоким отрицательным зарядом, характеризующим модификацию апо-В белка, что обуславливает их способность быть распознанными и практически недозировано поглощенными МФ [Steinberg D; Lewis A, 1994; Тертов ВВ, и др., 1989; Sevanian A, et al., 1996].

Однако, способность ЛНП, полученных от людей с гиперхолестеринемией (ЛНПг) подвергаться дальнейшему *in vivo* или *in vitro* окислению по сравнению с ЛНП, полученными из крови здоровых доноров (ЛНПн), изучена недостаточно; имеющиеся работы единичны, проведены, главным образом, с использованием Cu^{2+} - опосредованного окисления и не содержат анализа показателей, характеризующих окислительную

модификацию апо-В белка и тестов на сравнительную способность МФ к поглощению ЛНПн и ЛНПг.

Цель исследования:

Изучение способности макрофагов, полученных из моноцитов крови здоровых доноров и больных ИБС, окислять и поглощать липопротеины низкой плотности, полученные от здоровых доноров и людей с гиперхолестеринемией, при их инкубации в аэробных условиях и при аноксии *in vitro*.

В соответствии с указанной целью были поставлены следующие задачи:

1. Изучить способность макрофагов, полученных из моноцитов крови здоровых доноров (МФ_н) окислять и поглощать ЛНПн и ЛНПг, в аэробных условиях и в условиях аноксии *in vitro*.
2. С помощью ФНО- α разработать метод предстимуляции и стимуляции макрофагов, полученных из моноцитов крови здоровых доноров в условиях *in vitro*. Сравнить способность нестимулированных и стимулированных *in vitro* макрофагов, полученных из моноцитов крови здоровых доноров (МФ_н) окислять ЛНПн.
3. Изучить способность макрофагов, полученных из крови больных ИБС (МФ_{ИБС}), окислять и поглощать ЛНПн и ЛНПг в аэробных условиях и в условиях аноксии *in vitro*.
4. Сравнить способность макрофагов, полученных из моноцитов крови больных ИБС и здоровых доноров окислять и поглощать ЛНПн и ЛНПг в аэробных условиях и в условиях аноксии *in vitro*.

Научная новизна работы.

Впервые доказано, что МФ_{ИБС} обладают более выраженной способностью окислять и поглощать ЛНПн и ЛНПг по сравнению с МФ_н.

Впервые доказано, что способность МФ_{ИБС} обладают более выраженной способностью окислять и поглощать ЛНПн и ЛНПг в условиях аноксии по сравнению с аэробными условиями.

Впервые доказано, что МФ_н и МФ_{ИБС} более интенсивно окисляют и поглощают ЛНПг по сравнению с ЛНПн.

Разработан метод и схема активации макрофагов, полученных из крови здоровых людей малыми повторными дозами ФНО- α .

Практическая значимость работы.

Полученные фундаментальные данные являются предпосылкой для, разработки экспресс–метода, основанного на оценке степени активации МФ_{ИБС} и другими сердечно-сосудистыми заболеваниями, и предназначенного для выявления тяжести ишемических повреждений сердца у больных ИБС, предрасположенности больных к развитию или прогрессированию атеросклероза, индивидуального подбора лекарственных препаратов противоишемического и антиатеросклеротического действия, а также контроля за эффективностью проводимой терапии.

Апробация диссертационного материала.

VI Международная конференция «Биоантиоксидант», (Москва, Россия, 2002); 22nd European Section Meeting of the International Society for Heart Research, (Szeged, Hungary, 2002); III Съезд биохимического общества, (Санкт - Петербург. Россия, 2002); European Atherosclerosis Society 73 rd EAS congress. Supplement, (Salzburg, Austria, 2002); Конгресс "Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии", (Москва, Россия, 2002); Международная конференция «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека», (Смоленск, Россия, 2003); 24 Meeting ISHR, (Dresden, Germany, 2004); XVIII World Congress of ISHR, (Brisbane, Australia, 2004); Дизрегуляторная патология органов и систем, (Москва, Россия, 2004).

Публикации.

Материалы диссертации опубликованы в 3 статьях и 11 публикациях в сборниках докладов научных конференций.

Структура и объем работы.

Диссертация выполнена на 120 страницах, включает в себя введение, литературный обзор, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, выводов и списка литературы. Диссертация содержит 7 таблиц, 2 схемы и 17 рисунков. Список литературы состоит из 200 наименований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Материалы и реактивы.

ЭДТА, натрия бикарбонат, NEPES, пируват натрия, L-глутамин, PBS, Кумасси Синий (Sigma Chemical Co., США); среда RPMI-1640 (Flow Laboratories ,США); мембранные фильтры (Serva, Германия); Ficoll Pack (Amersham Biosciences , США); культуральная посуда (Costar, Нидерланды); гентамицин (Pharmachim , Балгария); эмбриональная

сыворотка теленка (НИИ Эпидемиологии и Микробиологии РАМН, Россия); набор для определения холестерина (Boehringer Mannheim GmbH, Германия).

Получение культуры макрофагов человека

Моноциты крови человека изолировали из локтевой вены 18-ти здоровых доноров (МФ_Н) и 25 больных с ишемической болезнью сердца (МФ_{ИБС}). Кровь в количестве 10 мл брали в пробирку, содержащую 1 мл PBS и 50 ЕД гепарина; разводили в два раза раствором PBS, на каждые 5мл наслаивали 3мл Ficoll Pack ($\rho = 1,077$ г/мл) и центрифугировали при 37°C в течение 20мин при 400g. Интерфазу отсасывали и центрифугировали при 37°C в течение 15 мин при 400g. Затем надосадочную жидкость сливали и к осадку добавляли 10 мл PBS, вновь центрифугировали при 37°C в течение 10 мин при 320g (процедуру повторяли дважды). К отмытому осадку добавляли 10 мл среды «роста», пипетировали. Для подсчета клеток к 20 мкл суспензии клеток добавляли 20 мкл трипанового синего, полученный раствор помещали в камеру Горяева и подсчитывали число неокрашенных клеток в 25 квадратах. Суспензию клеток доводили средой роста до концентрации 10^6 клеток/мл. Затем 1 мл суспензии клеток (10^6 клеток/мл) разливали в чашки Петри (d=35 мм). Чашки Петри помещали в CO₂-инкубатор (воздух 95% + CO₂ 5%) при 37°C на 2 часа. Через два часа среду меняли на свежую и продолжали инкубировать еще в течение 18 часов, до превращения моноцитов в макрофаги.

Выделение ЛНП

Липопротеины низкой плотности (ЛНП, $d = 1,019 - 1,065$ g/ml) выделяли из свежей плазмы крови 16-ти здоровых доноров (ЛНП_н, общий холестерин плазмы 2,6–4,4 mM, в среднем $3,6 \pm 0,7$ mM), или из плазмы крови людей с гиперхолестеринемией (ЛНП_г, общий холестерин плазмы 7,3–13,5 mM, в среднем $9,8 \pm 2,0$ mM). В последнем случае забор крови проводили до начала лечения или не ранее, чем через 4 недели после окончания, лечения и возвращения содержания холестерина в крови к уровню, наблюдавшемуся до лечения. ЛНП были выделены из плазмы крови человеком методом ультрацентрифугирования в градиенте NaBr [Lindgren F., 1975], модифицированным [Tertov VV et al., 1995] в присутствии ЭДТА, используя центрифугу L 8-55 и ротор Ti-90 (Beckman, США). Центрифугировали при 111 000g два раза по 2 часа. Полученные ЛНП вместе с NaBr и ЭДТА хранили при $t^\circ +2 +4^\circ\text{C}$, не более 7 дней. Накануне опыта диализовали в течение 18 ч при $+4^\circ\text{C}$ против 6000 объемов PBS без добавления ЭДТА и без антиоксидантов. Для стерилизации использовали мембранные фильтры (0,45 мкм). Белок

ЛНП определяли по Лоури. Содержание холестерина в плазме крови и в ЛНП определяли на автоанализаторе АА-11 (Technikon, США).

Инкубация макрофагов с ЛНП

На период инкубации макрофагов с ЛНП среду «роста» в культурах заменяли безбелковой субстрат-дефицитной – «инкубационной», средой (RPMI-1640 + Na-бикарбонат+ 50 ЕД Гентамицина при отсутствии других субстратных добавок, сыворотки теленка). Аэробную инкубацию проводили в CO₂ – инкубаторе (воздух 95% + CO₂ 5%, t = 37 °С); инкубацию в условиях аноксии – в камере, продуваемой в течение 15 мин 10 кратным объемом смеси газов: N₂ 95% + CO₂ 5% (содержание O₂ < 0,001%), t = 37 °С, что, в сочетании с субстрат-дефицитной средой, близко имитировало stop-flow модель ишемии in vivo [Bilenko MV, Sevanian A, Hochstein P, 1993].

По окончании сроков инкубации среду с содержащимися в ней ЛНПн или ЛНПг отбирали и центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин, надосадочную жидкость использовали для оценки окислительной модификации ЛНП. Макрофаги, оставшиеся прикрепленными ко дну чашки, открепляли 1% трипсином + 0,2% ЭДТА.

Оценка окислительной модификации ЛНПн и ЛНПг.

Измерение продуктов реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП) проводили на спектрофотометре Beckman DU-7 (532 нм.) методом [Uchiyama M, et al., 1978]. Количество TBARS выражали через эквивалентное количество малонового диальдегида (МДА), используя коэффициент мольной экстинкции, равный 156000 M⁻¹• см⁻¹. Результаты представлены как нмоль МДА на мг белка ЛНП.

Оценка электрофоретической подвижности ЛНПн и ЛНПг.

Электрофоретическая подвижность (ЭФП) ЛНП проводили модифицированным методом [Noble RP, 1968] с помощью горизонтального 1% агарозного геля электрофореза (барбиталовый буфере, pH 8.4). Сила тока составляла 140 мА, напряжение – 100 мV. ЛНП перед нанесением на гель смешивали с бромфеноловым синим (3:1); электрофорез проводили при комнатной t° в течение 3ч. Содержание белка ЛНП в каждой лунке составляло 3-4 мкг/лунку. Гели фиксировали 20 мин смесью 25% изопропанола и 10% уксусной кислоты, просушивали, окрашивали 8 –10 мин Кумасси синим. Отмывку геля проводили в смеси: ледяная уксусная кислота (50 мл/л), изопропанол (250 мл/л), вода (700мл). Абсолютные цифры ЭФП рассчитывали путем измерения длины пробега (Rf, см). Динамику изменений ЭФП рассчитывали по отношению длины пробега в опытных лунках

к длине пробега в контрольной лунке, принятой за 100%. Контролем служили те же концентрации исходных ЛНПн и ЛНПг без инкубации.

Оценка способности макрофагов захватывать ЛНП

Захват макрофагами ЛНП оценивали по содержанию в них общего холестерина (холестерина и его эфиров) согласно методике [Chazov EI, et al., 1986]. Макрофаги, оставшиеся прикрепленными ко дну чашки Петри после их инкубации с ЛНП заливали 96% этанолом, высушивали, и замораживали при -20°C . Затем проводили экстракцию смесью гексан-изопропанола (2:3) согласно методике [Hojo Y, et al., 2002], и определяли содержания общего холестерина используя стандартный кит (Boehringer Mannheim, Germany) как рекомендовано в инструкции. Количество общего холестерина (ОХ) поглощенного макрофагами выражали как отношение $\text{мкг ОХ} \cdot 10^6$ клеток.

Оценка жизнеспособности макрофагов.

Жизнеспособность макрофагов определяли по количеству клеток, оставшихся прикрепленными ко дну чашек Петри по окончании эксперимента [Morel DW, et al., 1983]. Клетки подсчитывали в камере Горяева.

Статистический анализ

Статистическую обработку проводили, используя критерий Стьюдента для малых выборок на персональном компьютере в программе Microsoft Excel. Данные представляли как $\text{mean} \pm \text{SEM}$. Достоверность различия между группами определяли по парному t-критерию Стьюдента. Для всех проведенных измерений различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Изучение способности МФ_Н окислять и поглощать ЛНП_Н и ЛНП_Г в аэробных условиях и в условиях аноксии in vitro.

В первом разделе к МФ_Н добавляли ЛНПн или ЛНПг в количестве 200мкг белка ЛНП/мл среды, инкубировали в аэробных условиях в течение 1, 3 и 6 часов в CO₂-инкубаторе (воздух 95%+CO₂ 5%, контроль), в опытах с аноксией- в эксикаторе, продутом и наполненном смесью газов (N₂ 95% + CO₂ 5%, содержание O₂ 0,0012%). Инкубацию в аэробных условиях и условиях аноксии проводили параллельно.

1.1. Оценка способности культуры макрофагов окислять ЛНПн и ЛНПг по накоплению в них ТБК-РП.

В нашем исследовании нативные (не инкубированные) ЛНПг содержали больше ТБК-РП, чем ЛНПн ($0,7\pm 0,08$ vs $0,45\pm 0,07$; ## - $p<0,01$). Присутствие ТБК-РП в ЛНПн, по видимому, обусловлено самоокислением ЛНП в процессе их диализа, который намеренно (чтобы не препятствовать дальнейшему инициированному макрофагами окислению) проводили без добавления в диализную жидкость ЭДТА и антиоксидантов (АО). Данные исследований представлены в таблице 1.1.

Таблица 1.1. Содержание ТБК-РП в ЛНПн и ЛНПг после их инкубации с $M\Phi_H$ в аэробных условиях и условиях аноксии, нмоль МДА/мг белка ЛНП ($M\pm m$).

ЛНП	Контроль	Аэробные условия, ч			Условия аноксии, ч		
		1	3	6	1	3	6
ЛНПн	$0,45\pm 0,07$	$0,39\pm 0,13$	$0,40\pm 0,20$	$0,36\pm 0,18$	$0,48\pm 0,15$	$0,43\pm 0,19$	$0,53\pm 0,09$
ЛНПг	$0,70\pm 0,08^{##}$	$0,34\pm 0,08^*$	$0,34\pm 0,19^*$	$0,38\pm 0,18^*$	$0,73\pm 0,16^{##\wedge}$	$0,33\pm 0,06^{*\#}$	$0,39\pm 0,15^*$

Примечание:

*, ** - уровень значимости различия опытов по сравнению с контролем: * - $p<0,05$, ** - $p<0,01$

#, ## - уровень значимости различия опытов с ЛНПг по сравнению с ЛНПн в контроле или в одинаковых условиях их инкубации: # - $p<0,05$, ## - $p<0,01$

^, ^^ - уровень значимости различия опытов в условиях аноксии по сравнению с опытами в аэробными условиями в течение одинаковых сроков инкубации: ^ - $p<0,05$, ^^ - $p<0,01$

\$, \$\$ - уровень значимости различия опытов с $M\Phi_{ИБС}$ по сравнению с $M\Phi_H$ в одинаковых условиях их инкубации: \$ - $p<0,05$, \$\$ - $p<0,01$

Число независимых экспериментов – 6-8

В опытах с добавлением к культуре макрофагов ЛНПн в аэробных условиях инкубации заметных изменений в окисленности ЛНПн не наблюдалось (табл. 1.1). Эти же макрофаги, инкубированные с более окисленными ЛНПг, полученными от людей с гиперхолестеринемией, уже на ранних сроках, вызывали значительное (* - $p<0,05$) падение окисленности ЛНПг (табл. 1.1).

Уровень ТБК-РП в ЛНПн, инкубированных с $M\Phi_H$ в условиях аноксии, аналогично аэробным условиям, практически не менялся, а в ЛНПг значительно снижался с 3 по 6 ч инкубации.

1.2. Оценка способности $M\Phi_H$ окислять ЛНПн и ЛНПг по изменению электрофоретической подвижности.

В нашем исследовании ЭФП нативных (не инкубированных) ЛНПг была выше ЭФП ЛНПн (137 ± 3 vs 120 ± 13 , # - $p<0,05$), что соответствовало литературным данным [Steinberg D and Lewis A, 1997]. Результаты ЭФП ЛНПн и ЛНПг, после их инкубации с $M\Phi_H$ представлены в таблице 1.2.

Таблица 1.2. Электрофоретическая подвижность ЛНПн и ЛНПг после их инкубации с МФ_Н в аэробных условиях и условиях аноксии, у.е. (M±m).

ЛНП	Контроль	Аэробные условия, ч			Условия аноксии, ч		
		1	3	6	1	3	6
ЛНПн	120±13	157±17*	161±14**	160±12**	142±9*	165±10*	163±15**
ЛНПг	137±3 [#]	171±22 [#]	180±11*	181±10* [#]	147±7	150±7**	157±5*

Примечание: см. Примечание к Таблице 1.1

Как видно из таблицы 1.2, ЭФП ЛНПн при их инкубации с МФ_Н в аэробных условиях значительно возростала к первому часу и продолжала расти вплоть до 6ч инкубации (* - p<0,05; ** - p<0,01). Усиление степени модификации ЛНП под воздействием МФ_Н наблюдалось и в случае с ЛНПг, однако, в отличие от ЛНПн, оно начиналось позже - с 3 часа, но носило параллельный с ЛНПн характер.

Изменение аэробных условий инкубации на условия аноксии не приводило к изменению динамики ЭФП ЛНПн, но уменьшало рост ЭФП ЛНПг. На протяжении всех сроков инкубации ЛНПг с МФ_Н, ЭФП ЛНПг была ниже чем ЛНПн, а также ниже, чем степень модификации ЛНПн и ЛНПг в аэробных условиях.

1.3. Оценка способности МФ_Н потреблять ЛНПн и ЛНПг по тесту аккумуляции в МФ_Н общего холестерина.

Оценку поглощения культурой макрофагов ЛНПн и ЛНПг мы оценивали по аккумуляции общего холестерина (ОХ, холестерина и эфиров холестерина) в МФ_Н, оставшихся прикрепленными к дну ячейки после истечения сроков совместной инкубации с ЛНП.

Таблица 1.3. Содержание общего холестерина в МФ_Н после инкубации с ЛНПн и ЛНПг в аэробных условиях и условиях аноксии, нг/10³ МФ_Н (M±m).

ЛНП	Контроль	Аэробные условия, ч			Условия аноксии, ч		
		1	3	6	1	3	6
ЛНПн	3,1±0,2	7,2±0,4**	10,4±0,9**	10,3±1,2**	11,7±2,9*	9,6±0,02**	10,2±1,5**
ЛНПг	3,1±0,2	7,7±0,3**	14,8±0,2** ^{###}	92,6±24,9* [#]	17,5±3,4** [^]	27,9±9,4*	27,6±9,5* [^]

Примечание: см. Примечание к Таблице 1.1

Из табл. 1.3 видно, что аккумуляция ОХ значительно возростала и в ЛНПн, и ЛНПг в аэробных условиях (** - p<0,01). В ЛНПг аккумуляция ОХ была еще выше, чем в ЛНПн, причем, значительные различия в способности макрофагов поглощать ЛНПг по сравнению с ЛНПн наблюдались на 3-6 часах аэробной инкубации (табл. 1.3, [#]-p<0,05; ^{###}-p<0,01).

Инкубация в условиях аноксии приводила к еще более выраженному поглощению МФ_Н ЛНПг уже на 1 часу инкубации по сравнению с аэробными условиями (табл. 1.3, [^]-p<0,05). Увеличение сроков аноксии до 6 часов приводило к росту содержания

холестерина ЛНПг в макрофагах по сравнению с 1-м часом инкубации. В отличие от ЛНПг инкубация МФ_Н в условиях аноксии не вызывала значительных изменений в способности МФ_Н накапливать ОХ, по сравнению с аэробными условиями.

1.4. Оценка жизнеспособности МФ_Н в процессе их совместной инкубации с ЛНПн или ЛНПг.

В наших опытах выраженное накопление макрофагами продуктов ПОЛ и общего холестерина в процессе их совместной инкубации с ЛНПн и ЛНПг, как в аэробных условиях, так и в условиях аноксии, сопровождалось заметной гибелью макрофагов.

Таблица 1.4. Число жизнеспособных МФ_Н в процессе их инкубации с ЛНПн и ЛНПг в аэробных условиях и условиях аноксии, 10^3 МФ_Н ($M \pm m$).

ЛНП	Контроль	Аэробные условия, ч			Условия аноксии, ч		
		1	3	6	1	3	6
ЛНПн	355±24	300±18*	252±23*	220±17**	282±26*	254±10**	242±36*
ЛНПг	355±24	233±9**#	158±2**##	104±4**##	104±20**#^^	80±27**##^^	71±24**#

Примечание: см. Примечание к Таблице 1.1

Из табл. 1.4. видно, что в аэробных условиях инкубации культуры макрофагов с ЛНПн выявлялось заметное снижение числа жизнеспособных клеток на протяжении 1-6-го часов инкубации (*- $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$). Использование ЛНПг приводило к значительно более резкому, по сравнению с ЛНПн, снижению числа жизнеспособных макрофагов (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$).

Инкубация в условиях аноксии, аналогично аэробной инкубации, также приводили к уменьшению числа жизнеспособных макрофагов. Однако в опытах с ЛНПн достоверно значимых различий с аэробными условиями не наблюдалось, а в опытах с ЛНПг, начиная с 1-го часа инкубации, наблюдалось как значительно более резкое снижение числа жизнеспособных макрофагов, по сравнению с ЛНПн (# - $p < 0,05$), так и с опытами в аэробных условиях (^^- $p < 0,05$; ^- $p < 0,05$).

Проведенная работа позволила установить, что МФ_Н, способны окислять и потреблять ЛНПн и ЛНПг как в аэробных условиях, так и в условиях аноксии *in vitro*, что не может не проявляться у больных ИБС в условиях *in vivo*, способствуя началу образования атеросклеротических бляшек и, как следствие, ухудшению качества жизни, потере трудоспособности и росту смертности населения.

2. Разработка метода предстимуляции и стимуляции МФН с помощью ФНО- α , и сравнение их способности окислять ЛНПн *in vitro*.

Для разработки метода и схемы активации макрофагов *in vitro*, нами был использован ФНО- α . В работе использованы МФН и ЛНПн.

Проведены 2 серии исследований.

В 1-ой серии исследований к МФН добавляли ФНО- α в дозе от 0,01 до 10 нг/мл среды, содержащей 10^6 клеток. МФН с ФНО- α инкубировали в течение 10, 30, 60 мин и 3ч. По окончании заданного срока, среду инкубации вместе с ФНО- α меняли на свежую, без ФНО- α и добавляли ЛНПн в дозе 150 мкг/мл и ячейки повторно инкубировали в аэробных условиях (СО₂ 5% + воздух 95%) в течение 3ч. После 3 часов инкубации среду совместно с ЛНПн отбирали в пробирку, центрифугировали, отделяли ЛНПн со средой от осадка на дне пробирки. Окисление ЛНПн определяли по величине ЭФП.

Полученные результаты представлены в табл. 2.1.

Таблица 2.1. Электрофоретическая подвижность ЛНПн после их 3-х часовой инкубации с МФН предварительно активированных различными концентрациями и временем инкубации с ФНО- α (% к нативным ЛНП, $M \pm m$).

Время инкубации МФ с ФНО- α	Нативные ЛНП	Концентрации ФНО- α , нг/мл				
		0, Контроль	0,5	1,0	5,0	10,0
10 мин	100 \pm 3	108 \pm 3	109 \pm 6	109 \pm 7	109 \pm 4*	110 \pm 3**
30 мин	100 \pm 2	103 \pm 5	113 \pm 4*	104 \pm 2	105 \pm 7	100 \pm 7
60 мин	100 \pm 5	106 \pm 8	112 \pm 5*	104 \pm 4	104 \pm 12	101 \pm 8
180 мин	100 \pm 3	96 \pm 7	104 \pm 7	100 \pm 4	92 \pm 5	98 \pm 8

Примечание:

*, ** - уровень значимости различия опытов по сравнению с нативными ЛНП: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$;

Число независимых экспериментов равно 4

Как видно из табл. 2.1 добавление ФНО- α к культуре макрофагов и их инкубация в течение 10, 30, 60 и 180 мин в большинстве использованных концентраций ФНО- α вела к умеренному (а в отдельных случаях к значительному) росту ЭФП ЛНП, по сравнению с нативными ЛНП. Однако значимых различий с макрофагами, инкубированными в те же сроки без ФНО- α (контроль), выявлено не было. Наиболее активной была доза 0,5 нг/мл, особенно при инкубации в течение 30 и 60 мин. Инкубация МФ с ФНО- α в течение 3ч, независимо от концентрации ФНО- α , не оказывала стимулирующего или оказывала слабый цитотоксический эффект.

Во 2-ой серии исследований для стимуляции макрофагов, наряду с использованием наиболее эффективной концентрации (0,5 нг/мл), применяли еще более низкую концентрацию ФНО- α , а именно 0,1 нг/мл среды, а также проводили не только однократное, но и двукратное инкубирование культуры макрофагов с ФНО- α , сравнивая влияние на ЛНП_Н однократной инкубации с двукратной, и оценивая роль возрастающих концентраций ФНО- α . (0,1 и 0,5 или 0,5 и 5,0 нг/мл). Инкубацию после однократного введения ФНО- α проводили в течение 10 или 30 мин, а после повторного введения - в течение 10 мин, всегда в аэробных условиях.

Критерием активации культуры макрофагов являлся рост ЭФП ЛНП и накопление в ЛНП ТБК-РП.

Из таблицы 2.2 видно, что двукратная инкубация с более высокой, чем при однократной инкубации дозой ФНО- α , ведет к усилению способности макрофагов окислять ЛНП_Н после их последующей 3 часовой инкубации.

Таблица 2.2. Электрофоретическая подвижность ЛНП после 3ч инкубации с МФ_Н, предварительно однократно или двукратно инкубировано, с ФНО- α (% к нативным ЛНП, $M \pm m$).

Время инкубации МФ с ФНО- α	Нативные ЛНП	Концентрации ФНО- α , нг/мл						
		0, Контроль	Схема 1			Схема 2		
			0,1	0,5	0,1 + 0,5	0,5	5,0	0,5+5,0
10 мин	100	116 \pm 1**	117 \pm 4**	120 \pm 2**	129 \pm 3** #^	118 \pm 5**	116 \pm 4**	116 \pm 5*
30 мин	100	110 \pm 4*	110 \pm 1**	110 \pm 3**	108 \pm 1**	109 \pm 6	109 \pm 4	109 \pm 3*

Примечание:

*, ** - уровень значимости различия опытов по сравнению с нативными ЛНП: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$;

- уровень значимости различия опытов с контролем: # - $p < 0,05$

^ - уровень значимости различий между опытами с двукратной и однократной инкубацией макрофагов с ФНО- α (схема 1): ^ - $p < 0,05$.

Число независимых экспериментов равно 4

Видно, что статистически значимый активирующий эффект был получен лишь после 10 мин инкубации с применением концентраций ФНО- α , равных 0,1 нг/мл – первичное введение и 0,5 нг/мл (повторное введение) (таб. 2.2, схема 1 - 0,1+0,5, # - $p < 0,05$), т.е. при применении коротких сроков и более низких, как первичной, так и повторной концентраций ФНО- α .

Наряду с ростом ЭФП ЛНП под воздействием дважды инкубированной с ФНО- α культурой макрофагов (схема 1), также наблюдался значительный рост и ТБК-РП в ЛНП.

Макрофаги, однократно инкубированные с ФНО- α в концентрации 0,1 нг/мл в течение 10 мин, заметного увеличения содержания ТБК-РП в ЛНП не вызывали.

Полученные данные, позволяют предполагать, что повторное воздействие низких доз ФНО- α на макрофаги не только в условиях *in vitro*, но и в условиях *in vivo*, способно предстимулировать или стимулировать клетки, которые вследствие этого, могут более активно, чем нестимулированные макрофаги, окислять и поглощать ЛНП, способствуя началу образования атеросклеротических бляшек. Проверке данного предположения посвящен следующий раздел исследования.

3. Изучение способности МФ_{ИБС} окислять и поглощать ЛНП_н и ЛНП_г в аэробных условиях и в условиях аноксии *in vitro*.

Нами была использована культура МФ_{ИБС}. МФ_{ИБС} были инкубированы с ЛНП_н или ЛНП_г в количестве 200мкг/мл среды. По аналогии с ранее приведенными данными об инкубации МФ_н, инкубацию МФ_{ИБС} проводили течение 1, 3 и 6 часов в аэробных условиях (воздух 95% + CO₂ 5%) и условиях аноксии (N₂ 95% + CO₂ 5%, содержание O₂ в смеси газов < 0,0012%). Исследования с (ЛНП_н) и (ЛНП_г) проводили параллельно.

Функциональную активность МФ_{ИБС}, как и МФ_н, исследовали по критериям содержания ТБК-РП, ЭФП ЛНП, накоплению в МФ общего холестерина и жизнеспособности МФ.

Данные исследований представлены в таблице 3.1- 3.4.

3.1. Оценка способности МФ_{ИБС} окислять ЛНП_н и ЛНП_г по накоплению в них ТБК-РП.

Таблица 3.1. Содержание ТБК-РП в ЛНП_н и ЛНП_г после их инкубации с МФ_{ИБС} в аэробных условиях и условиях аноксии, нмоль МДА/мг белка ЛНП (M \pm m).

ЛНП	Контроль	Аэробные условия, ч			Условия аноксии, ч		
		1	3	6	1	3	6
ЛНП _н	0,45 \pm 0,07	0,79 \pm 0,03** \$	0,44 \pm 0,08	0,34 \pm 0,15\$	0,78 \pm 0,17* \$\$	0,75 \pm 0,15*\$^	0,4 \pm 0,05
ЛНП _г	0,7 \pm 0,08##	1,18 \pm 0,05** ## \$\$	0,48 \pm 0,12	0,35 \pm 0,14**	0,67 \pm 0,11 ^^	0,5 \pm 0,18* #	0,69 \pm 0,23^^

Примечание: см. Примечание к Таблице 1.1

Совместная инкубация МФ_{ИБС} с ЛНП_н или ЛНП_г в аэробных условиях вызывала значительное увеличение содержания ТБК-РП как в ЛНП_н, так и ЛНП_г, по сравнению с контролем только на первом часе их совместной инкубации (табл. 3.1, ** - p<0,01).

К третьему часу совместной инкубации уровень ТБК-РП как в ЛНП_н, так и в ЛНП_г значительно снижался по сравнению с первым часом; снижение продолжалось вплоть до 6 часа инкубации (особенно в ЛНП_г, табл. 3.1, ** - p<0,01).

В условиях аноксии уровень ТБК-РП в ЛНПн, инкубированных с МФ_{ИБС} на 1-3 часах, достоверно возрастал, но снижался почти до исходного уровня к 6 часу их совместной инкубации с МФ_{ИБС}.

При инкубации ЛНПг с МФ_{ИБС} в условиях аноксии ТБК-РП существенно не менялись, за исключением снижения на 3 часах инкубации.

3.2. Оценка способности МФ_{ИБС} окислять ЛНПн и ЛНПг по изменению электрофоретической подвижности.

Таблица 3.2. Электрофоретическая подвижность ЛНПн и ЛНПг после их инкубации с МФ_{ИБС} в аэробных условиях и условиях аноксии, у.е. ($M \pm m$).

ЛНП	Контроль	Аэробные условия, ч			Условия аноксии, ч		
		1	3	6	1	3	6
ЛНПн	120±13	156±16**	160,5±18**	163±17**	140±13*	145±9*	146±15*
ЛНПг	137±3#	170±13*	178±16*	177±16*	147±7	150±7**	157±5*\$

Примечание: см. Примечание к Таблице 1.1

Как видно из табл. 3.2, величина ЭФП ЛНПн в процессе их совместной инкубации с МФ_{ИБС} и в аэробных условиях, и в условиях аноксии значительно возрастала к первому часу и продолжала постепенно расти вплоть до 6 часов инкубации. Рост ЭФП в условиях аноксии, особенно в опытах с ЛНПг, был выражен слабее, чем в аэробных условиях, однако достоверных различий выявлено не было.

3.3. Оценка способности МФ_{ИБС} потреблять ЛНПн и ЛНПг по тесту аккумуляции МФИБС общего холестерина.

Таблица 3.3. Содержание общего холестерина в МФ_{ИБС} после инкубации с ЛНПн и ЛНПг в аэробных условиях и условиях аноксии, $нг/10^3$ МФ_Н ($M \pm m$).

ЛНП	Контроль	Аэробные условия, ч			Условия аноксии, ч		
		1	3	6	1	3	6
ЛНПн	2,3±0,3	5,7±0,2**	11,1±0,9**	13,3±0,1** \$	11,8±2,9*	23,64±3,7**\$\$^	23,39±2,9**\$\$^
ЛНПг	2,3±0,3	11,6±1**##\$\$	21,1±2**##\$\$	14,9±2,9**##\$\$	12,1±3,1*	14,5±3,5*	17,5±5,2*

Примечание: см. Примечание к Таблице 1.1

Из табл. 3.3. видно, что аккумуляция общего холестерина в аэробных условиях значительно возрастала и в ЛНПн, и ЛНПг (** - $p < 0,01$). В ЛНПг в первые 1-6 часов она была значимо выше, чем в ЛНПн (табл. 3.3, ## - $p < 0,01$).

Инкубация в условиях аноксии также приводила к значительному увеличению аккумуляции общего холестерина на всех сроках инкубации МФ_{ИБС}, причем рост поглощения ОХ ЛНПн на 3-6 часах инкубации существенно превышал аккумуляцию ОХ в аэробных условиях (табл. 3.3, ^- $p < 0,05$). В отличие от ЛНПн, инкубация МФ_{ИБС} с ЛНПг в

условиях аноксии значительных различий в способности $M\Phi_{ИБС}$ накапливать ОХ, по сравнению с аэробными условиями, не выявила.

3.4. Оценка жизнеспособности $M\Phi_{ИБС}$ в процессе их совместной инкубации с ЛНПн или ЛНПг.

Таблица 3.4. Таблица 1.4. Число жизнеспособных $M\Phi_{ИБС}$ в процессе их инкубации с ЛНПн и ЛНПг в аэробных условиях и условиях аноксии, $10^3 M\Phi_H (M \pm m)$.

ЛНП	Контроль	Аэробные условия, ч			Условия аноксии, ч		
		1	3	6	1	3	6
ЛНПн	379±42	233±7**	192±15**\$\$	179±2**\$\$	186±47**^	133±35**\$^	91±17**\$\$^
ЛНПг	379±42	155±5**##	115±3**#\$	113±22**	145±37**	99±23**	91±27**

Примечание: см. Примечание к Таблице 1.1

Из табл. 3.4 видно, что инкубация $M\Phi_{ИБС}$ с ЛНПн и ЛНПг приводила к значительному снижению числа оставшихся прикрепленными ко дну ячейки (т.е. жизнеспособных) макрофагов. В аэробных условиях снижение жизнеспособных $M\Phi_{ИБС}$ было более выраженным при инкубации с ЛНПг, по сравнению с ЛНПн (#- $p < 0,05$, ##- $p < 0,01$). В условиях аноксии снижение числа жизнеспособных $M\Phi_{ИБС}$, инкубированных с ЛНПн, было выражено резче, чем в аэробных условиях; при инкубации $M\Phi_{ИБС}$ с ЛНПг различия между числом жизнеспособных клеток при аноксии и в аэробных условиях, а также различия между макрофагами, инкубированными с ЛНПг и ЛНПн, были недостоверны.

4. Сравнение способности культуры $M\Phi_{ИБС}$ и $M\Phi_H$ окислять и поглощать ЛНПн и ЛНПг в аэробных условиях и условиях аноксии *in vitro*.

Сравнение $M\Phi_H$ с $M\Phi_{ИБС}$ в разных условиях их инкубации проводилось на основе ранее использованных критериев, а именно накопления в ЛНП ТБК-РП, аккумуляции общего холестерина в макрофагах, снижения числа жизнеспособных макрофагов.

Данные представлены в таблицах 4.1 – 4.3

Таблица 4.1. Сравнение ТБК-РП в ЛНПн и ЛНПг в процессе их инкубации с $M\Phi_{ИБС}$ и $M\Phi_H$ в аэробных условиях и условиях аноксии, нмоль МДА/мг белка ЛНП ($M \pm m$).

ЛНП	Контроль	Аэробные условия, ч			Условия аноксии, ч		
		1	3	6	1	3	6
ЛНПн+ $M\Phi_H$	0,45±0,07	0,39±0,13	0,40±0,20	0,36±0,18	0,48±0,15	0,43±0,19	0,53±0,09
ЛНПн+ $M\Phi_{ИБС}$	0,45±0,07	0,79±0,03** \$	0,44±0,08	0,34±0,1\$\$	0,78±0,17* \$\$	0,75±0,15*\$^	0,4±0,05
ЛНПг+ $M\Phi_H$	0,70±0,08##	0,34±0,08*	0,34±0,19*	0,38±0,18*	0,73±0,16##^	0,33±0,06*#	0,39±0,15*
ЛНПг+ $M\Phi_{ИБС}$	0,7±0,08##	1,18±0,05** ## \$\$	0,48±0,12	0,35±0,14**	0,67±0,11 ^^	0,5±0,18* #	0,69±0,23^^

Примечание: см. Примечание к Таблице 1.1

Из табл. 4.1 видно, что рост содержания ТБК-РП в ЛНПн и в ЛНПг как в аэробных условиях, а в опытах с ЛНПн и в условиях аноксии, в ранние сроки (1-2 часы инкубации, $^{\$}p < 0,05$; $^{\$\$}p < 0,01$) наблюдался только в опытах инкубации ЛНП с МФ_{ИБС} и отсутствовал в опытах с МФ_Н.

Таблица 4.2. Сравнение содержания общего холестерина в МФ_{ИБС} и МФ_Н в процессе их инкубации с ЛНПн и ЛНПг в аэробных условиях и условиях аноксии, $нг/10^3$ МФ ($M \pm m$).

ЛНП	Контроль	Аэробные условия, ч			Условия аноксии, ч		
		1	3	6	1	3	6
ЛНПн+МФ _Н	0,45±0,07	0,39±0,13	0,40±0,20	0,36±0,18	0,48±0,15	0,43±0,19	0,53±0,09
ЛНПн+МФ _{ИБС}	3,1±0,2	7,2±0,4**	10,4±0,9**	10,3±1,2**	11,7±2,9*	9,6±0,02**	10,2±1,5**
ЛНПг+МФ _Н	0,70±0,08 [#]	0,34±0,08*	0,34±0,19*	0,38±0,18*	0,73±0,16 ^{##^}	0,33±0,06* [#]	0,39±0,15*
ЛНПг+МФ _{ИБС}	3,1±0,2	7,2±0,4**	10,4±0,9**	10,3±1,2**	11,7±2,9*	9,6±0,02**	10,2±1,5**

Примечание: см. Примечание к Таблице 1.1

Из табл. 4.2 видно, что аккумуляция ОХ на 3-6 часах инкубации ЛНПн как в аэробных условиях, так и при аноксии была значительно больше, чем при инкубации ЛНПн с МФ_Н ($^{\$}P < 0,05$; $^{\$\$}P < 0,001$), а также чем при инкубации МФ_{ИБС} с ЛНПг. Последнее может быть объяснено более выраженным распадом переполненных ОХ МФ_{ИБС}, что и подтверждается данными, представленными в следующей таблице.

Таблица 4.3. Сравнение числа жизнеспособных МФ_{ИБС} и МФ_Н в процессе их инкубации с ЛНПн и ЛНПг в аэробных условиях и условиях аноксии, 10^3 МФ ($M \pm m$).

ЛНП	Контроль	Аэробные условия, ч			Условия аноксии, ч		
		1	3	6	1	3	6
ЛНПн+МФ _Н	355±24	300±18*	252±23*	220±17**	282±26*	254±10**	242±36*
ЛНПн+МФ _{ИБС}	379±42	233±7**	192±15**\$\$	179±2**\$\$	186±47**^^	133±35**\$^	91±17**\$\$^^
ЛНПг+МФ _Н	355±24	233±9** [#]	158±2*** [#]	104±4*** [#]	104±20*** ^{#^}	80±27*** ^{#^}	71±24** [#]
ЛНПг+МФ _{ИБС}	379±42	155±5*** ^{##}	115±3*** ^{##}	113±22**	145±37**	99±23**	91±27**

Примечание: см. Примечание к Таблице 1.1

Из табл. 4.3 видно, что жизнеспособность МФ_{ИБС}, инкубированных с ЛНПн и, особенно, с ЛНПг, снижалась во время первых 3 – 6 часов сильнее, чем жизнеспособность МФ_Н, ($^{\$}P < 0,05$; $^{\$\$}P < 0,01$).

Приведенные данные свидетельствуют о том, что МФ_{ИБС} обладают более сильным окислительным эффектом на ЛНПн и ЛНПг, более ранней и более сильной способностью аккумулировать общий холестерин, поглощая ЛНПн и ЛНПг, более ранней и более выраженной потерей жизнеспособности, по сравнению с МФ_Н.

Из приведенных в данной работе результатов так же очевидно, что усилению функциональной активности в условиях аноксии больше подвергались МФ_{ИБС}, чем МФ_Н, последние лишь при условии их инкубации с ЛНПг.

Важно подчеркнуть, что условия аноксии, моделируемые в процессе инкубация культуры МФ+ЛНП *in vitro*, были близки к условиям, возникающим в сосудистой стенке в процессе сосудистого спазма, частичного тромбирования или стенозирования просвета сосуда, то есть они имитировали состояние локальной ишемии, реально возникающей в условиях ИБС и сердечной недостаточности.

Выводы

1. Показано, что МФ_Н, способны окислять и потреблять ЛНП_Н и ЛНП_Г как в аэробных условиях, так и в условиях аноксии, причем способность к потреблению ЛНП и потеря жизнеспособности макрофагов в процессе инкубации значительно резче выражены в опытах с ЛНП_Г, чем с ЛНП_Н.
2. Разработан метод предстимуляции и стимуляции МФ_Н, *in vitro* с помощью однократного (предстимуляция) и двукратного (стимуляция) введений низких доз ФНО- α (0,1 и 0,5 нг/мл) в среду инкубации и доказано, что стимулированные *in vitro* макрофаги окисляют ЛНП_Н значительно сильнее, чем нестимулированные.
3. Показано, что МФ_{ИБС}, обладают выраженной способностью окислять и потреблять ЛНП_Н и, особенно, ЛНП_Г, как в аэробных условиях, так и при аноксии, а также подвергаться резкой и ранней гибели в процессе инкубации с ЛНП_Н и ЛНП_Г *in vitro*.
4. МФ_Н и МФ_{ИБС} вызывали более сильное окисление и потребление ЛНП_Н и ЛНП_Г, причем оба процесса, а также гибель МФ_{ИБС} были резче выражены при их инкубации с ЛНП_Г, чем с ЛНП_Н и при инкубации в условиях аноксии, чем в аэробных условиях.
5. Полученные данные свидетельствуют о том, что у больных ИБС возникает предстимуляции или стимуляции моноцитов-макрофагов в условиях *in vivo*, что делает больных ИБС предрасположенными к раннему возникновению или прогрессированию локального или генерализованного атеросклероза.
6. На основе культуры МФ_{ИБС} разработана экспресс-модель для прогнозирования тяжести ишемических повреждений, выявления предрасположенности больного к атеросклерозу, индивидуального подбора антиатеросклеротической терапии, скринингу и предклиническим испытаниям новых лекарственных средств.

Основные результаты диссертационной работы изложены в следующих

публикациях:

1. Биленко М.В., Хильченко А.В., Павлова А.С., Анфалова И.А. Защитный эффект антиоксидантов на повреждение эндотелиальных клеток и окисление липопротеинов низкой плотности при их совместной инкубации в аэробных условиях, условиях ишемии или ишемии с добавлением макрофагов в реперфузионном периоде. // Материалы VI Международная конференция «Биоантиоксидант», Москва, 16 -19 апреля, 2002- с. 668-669.
2. Хильченко А.В., Павлова А.С., Биленко М.В. Способность макрофагов, взятых от здоровых доноров и больных ишемической болезнью сердца, окислительно модифицировать липопротеины низкой плотности и защитный эффект антиоксидантов и антигипоксантов. // Материалы VI Международная конференция «Биоантиоксидант», Москва, 16 - 19 апреля, 2002.- с. 597-599.
3. Павлова А.С., Хильченко А.В., Биленко М.В. Устойчивость макрофагов, взятых от здоровых доноров и больных ишемической болезнью сердца, к цитотоксическому действию липопротеинов низкой плотности и защитный эффект антиоксидантов и антигипоксантов. // Материалы VI Международная конференция «Биоантиоксидант», Москва, 16 - 19 апреля, 2002. - с. 439-440.
4. Bilenko M.V., Khilchenko A.V. Free radical inhibitors (FRI) can prevent cell-mediated LDL oxidation under ischaemia and reperfusion of vascular wall in situ. // Abstract. 22nd European Section Meeting of the International Society for Heart Research ,Szeged Hungary, 3 – 6 July, 2002.- J.Mol.Cell Cardiol.- 2002- V 34, 6.- P. A10.
5. Биленко М.В., Хильченко А.В. Роль эндотелиальных клеток и макрофагов в окислительной модификации липопротеидов? низкой плотности в условиях ишемии и реперфузии сосудистой стенки и защитный эффект антиоксидантов. // Материалы III-го Съезда биохимического общества, Санкт – Петербург, 26 июня – 1июля, 2002.-с. 139 - 140.
6. Bilenko M.V., Khilchenko A.V. Ischemia- and TNF- α -induced priming of blood macrophages increases their ability to oxidatively modify circulating LDL in aerobic and ischemic conditions // Abstract. European Atherosclerosis Society 73 rd EAS congress. Supplement, Salzburg, Austria, July 7-10, 2002. -049- P. 75.
7. Биленко М.В., Хильченко А.В., Шмицько Н.А. Свободно-радикальный механизм участия макрофагов (МФ) в окислении липопротеинов низкой плотности (ЛНП) в

- условиях ишемии (И) и реперфузии (Р) сосудистой стенки; защитный эффект антиоксидантов (АО). // Материалы 5-го Конгресса "Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии", Москва, 12-14 ноября, 2002-Т.2.-С.21.
8. Биленко М.В., Хильченко А.В. Участие неактивированных, преактивированных и активированных макрофагов (МФ) в окислении ЛНП; роль антиоксидантов (АО) в профилактике и лечении атеросклероза. // Материалы международной конференции «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека». Смоленск, 22-25 сентября, 2003.- с. 55;
 9. Биленко М.В., Хильченко А.В., Шмицько Н.А. Способность низких доз ФНО- α преактивировать и активировать макрофаги, повышая их способность к продукции активных форм кислорода и окислению липопротеинов низкой плотности. // Бюл.Экс.Биол.Мед.-2003.- Т.135, №4. - с. 410-413.
 10. Биленко М.В., Хильченко А.В., Коновалова Г.Г., Ланкин В.З. Влияние антиоксиданта пробукола на клеточно-опосредованное окисление липопротеидов низкой плотности *in vitro* и *in vivo*. // Бюл.Экс.Биол.Мед.- 2003.- Т.136, №8. - с. 142-145.
 11. M. V. Bilenko, A. V. Khilchenko. The role of TNF- α – and ischaemia – induced priming and activation of macrophages in their ability to oxidatively modify LDL. // Abstract. 24 Meeting ISHR, Dresden, Germany, 2004.- J.Mol.Cell Cardiol.-2004.- 36(5). - p. 715-716.
 12. Bilenko M.V., Khilchenko A.V., Nikitina N.A. The ability of macrophages from the blood of patients with ischemic heart disease and healthy donors for LDL oxidation and uptake. // Abstract. XVIII World Congress of ISHR, Brisbane, Australia, 2004- J.Mol.Cell Cardiol.- 2004.- 37(1), B105. - p. 242-243.
 13. Биленко М.В., Хильченко А.В., Никитина Н.А. Активация макрофагов в крови больных ишемической болезнью сердца (ИБС) и их способность более активно окислять и поглощать липопротеины низкой плотности (ЛНП), по сравнению с макрофагами из крови здоровых доноров. //Материалы конференции «Дизрегуляторная патология органов и систем, Москва, 9– 12 октября, 2004.-с.135.
 14. Биленко М.В., Хильченко А.В., Павлова С.А. Применение антиоксидантов и антигипоксантов для снижения окисления ЛНП под влиянием макрофагов и эндотелиальных клеток в условиях ишемии и реперфузии сосудистой стенки. // Биомедицинская Химия.- 2004.- т.49 № 6. - с. 554-565.