

# **Muokatun VLDL:n vaikutus makrofagien sytokiinieritykseen**

Elina Tonteri

Lääketieteen kandidaatti

Helsingin yliopisto

Helsinki 1.10.2021

Tutkielma

[elina.z.tonteri@helsinki.fi](mailto:elina.z.tonteri@helsinki.fi)

ohjaaja: Katariina Öörni

HELSINGIN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Lääketieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution – Department Helsingin yliopisto	
Tekijä – Författare – Author Elina Tonteri			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Muokatun VLDL:n vaikutus makrofagien sytokiinieritykseen			
Oppiaine – Läroämne – Subject Lääketiede			
Työn laji – Arbetets art – Level Syventävien opintojen tutkielma	Aika – Datum – Month and year lokakuu 2021	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 24+6	
Tiivistelmä – Referat – Abstract <p>Kohonnut veren triglyseridipitoisuus on keskeisessä osassa monissa kansantaudeissa, kuten metabolisessa oireyhtymässä, tyypin II diabeteksessa ja obesiteetissa. Hypertriglyseridemian on osoitettu olevan itsenäinen riskitekijä ateroskleroottiselle valtimotaudille ja sen komplikaatioille. Hypertriglyseridemiassa verenkierrossa on kohonnut pitoisuus triglyseridirikkaita lipoproteiineja (TGRL), kuten VLDL:a ja kylomikroneja, joiden pilkkoutuessa muodostuu kolesterolipitoisia lipoproteiinien jäänepartikkeleita. Nämä pienet partikkelit pääsevät LDL:n tavoin kertymään verisuonen seinämään, ja siten TGRL osallistuvat ateroskleroottisen plakin muodostumiseen. Hypertriglyseridemia edistää ateroskleroosia myös epäsuorasti vaikuttamalla lipoproteiinien aineenvaihduntaan sekä tulehdussolujen toimintaan elimistössä. Uusia triglyseridipitoisuutta laskevia ja tulehdusta hillitseviä lääkeaineita tutkitaan aktiivisesti sydän- ja verisuonitautien riskin pienentämiseksi.</p> <p>Verisuonen seinämässä TGRL:n jäänepartikkelit ovat alttiita erilaisille modifikaatioille, kuten hapettumiselle ja lipolyysille. Lipolyysissä TGRL:sta vapautuvien rasvahappojen on havaittu olevan tulehdusta edistäviä, ja hypertriglyseridemia on yhteydessä myös koko elimistön matala-asteiseen tulehdukseen. Aikaisemmissa tutkimuksissa modifioitujen lipoproteiinien on havaittu lisäävän makrofagien sytokiinieritystä ja vaahtosolujen muodostumista.</p> <p>Tässä tutkimuksessa tarkasteltiin muokkaamattoman, hapetetun ja lipolysoidun VLDL:n vaikutusta THP-1-soluista erilaistettujen makrofagien interleukiini 1<math>\beta</math>:n (IL-1<math>\beta</math>) eritykseen. Näistä ainoastaan fosfolipaasi A2:n (PLA2) avulla modifioitu VLDL lisäsi IL-1<math>\beta</math>:n eritystä merkittävästi. Tutkimuksessa havaittiin myös, että lipopolysakkaridin käyttö makrofagien aktivointiin lisäsi THP-1-peräisten makrofagien solukuolemaa.</p> <p>TGRL-partikkeleista vapautuvat PLA2-lipolyysin reaktiotuotteet saattavat edistää paikallista tulehdusta ateroskleroottisen plakin ympäristössä, sillä verisuonen seinämässä tiedetään esiintyvän PLA2-perheen entsyymejä. Lisää tutkimusta tarvitaan PLA2:n vapauttamista lipideistä ja niiden tulehdusta edistävästä vaikutuksista.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Triglycerides; Lipoproteins, VLDL; Inflammation; Hypertriglyceridemia			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited HELDA-julkaisuarkisto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

## Sisällysluettelo:

1 Johdanto	1
2 VLDL	2
2.1 Rakenne	2
2.2 Aineenvaihdunta	3
2.3 Kertyminen verisuonen seinämään	4
2.4 Modifikaatiot	5
3 Makrofagit	8
3.1 Yleistä	8
3.2 Toiminta	9
4 Hypertriglyseridemia	12
4.1 Yleistä	12
4.2 Vaikutus lipoproteiinien metaboliaan	13
4.3 Hypertriglyseridemia ja inflammaatio	14
5 Materiaalit ja menetelmät	15
5.1 VLDL eristys	15
5.2 VLDL modifikaatiot	15
5.3 THP-1 solujen valmistelu	16
5.4 Solukokeet	17
5.5 LDH	18
5.6 Proteiinimääritys solukaivoista	18
5.7 ELISA	19
5.8 Tilastolliset menetelmät	19
6 Tulokset	19
7 Tulosten tarkastelu	23



## 1 Johdanto

Kohonneen veren kolesterolipitoisuuden, etenkin LDL (low-density lipoprotein) -kolesterolin, on jo kauan tiedetty olevan tärkeä ateroskleroosia aiheuttava tekijä, ja LDL-kolesterolia alentavalla lääkityksellä, esimerkiksi statiineilla, pystytään vähentämään ateroskleroottista sydän- ja verisuonitautisairastuvuutta sekä -kuolleisuutta (1). Uudemmat epidemiologiset sekä geneettiset tutkimukset ovat osoittaneet myös kohonneen triglyseridipitoisuuden ja jäännöskolesterolin (triglyseridirikkaiden lipoproteiinien sisältämä kolesteroli) olevan itsenäisiä riskitekijöitä valtimotaudille (2,3).

VLDL (very-low-density lipoprotein) ja muut triglyseridirikkaat lipoproteiinit (TGRL) pääsevät LDL:n tavoin kulkeutumaan valtimon seinämän intima-kerrokseen ollessaan riittävän pieniä, ja siten aiheuttavat kolesterolin kertymistä verisuoniin. Merkittävämpi vaikutus saattaa kuitenkin olla näiden lipoproteiinien aiheuttama inflammaatio verisuonissa, sillä intimassa VLDL:n sisältämästä triglyseridistä pilkkoutuu irti rasvahappoja, jotka kykenevät aktivoimaan makrofageja ja siten edistämään niiden proinflammatoristen välittäjäaineiden eritystä. Paikallisen tulehduksen lisäksi näiden lipoproteiinien jäännöskolesterolilla vaikuttaa olevan yhteys myös matala-asteiseen tulehdukseen koko elimistössä. (3,4)

Ateroskleroosissa muodostuva plakki koostuu pääasiassa kolesterolista (5). Hypertriglyseridemia edistää aterogeneesiä usealla tavalla, sekä suorasti että epäsuorasti, sillä pienten TGRL-partikkeleiden mukana valtimon seinämään kertyy kolesterolia, ja toisaalta hypertriglyseridemia johtaa elimistössä muutoksiin lipoproteiinien metaboliassa sekä tulehdussolujen toiminnassa, millä on epäsuoria ateroskleroosia edistäviä vaikutuksia (6). Aikaisemmat kliiniset tutkimukset triglyseriditason laskemisesta esimerkiksi omega-3 rasvahappojen tai fibraattilääkityksen avulla eivät ole onnistuneet osoittamaan hyötyä sydän- ja verisuonitapahtumien vähenemisessä, mutta aihetta tutkitaan yhä aktiivisesti (7). Uudessa kansainvälisessä REDUCE-IT-tutkimuksessa puhdistetun eikosapentaeenihapon (EPA) osoitettiin vähentävän sydän- ja verisuonitautikuolleisuutta 20% statiinihoitoa saavilla hypertriglyseridemiapotilailla (7,8). EPA:n vaikutukset ovat luultavasti moniulotteisia eivätkä johdu pelkästä triglyseriditason laskusta; EPA:n on havaittu esimerkiksi laskevan tulehdusmarkkereiden ja -välittäjäaineiden määrää sekä edistävän endoteelin toimintaa ja ateroskleroottisen plakin stabiliteettia (7). Tarve uusille hoitokeinoille on kliinisesti merkittävä, sillä

hypertriglyseridemia liittyy moniin yleistymässä oleviin sairauksiin ja terveysongelmiin kuten metaboliseen oireyhtymään, diabetekseen, obesiteettiin ja insuliiniresistenssiin, ja hypertriglyseridemian yhteys kohonneeseen sydän- ja verisuonitautisairastuvuuteen vaikuttaisi säilyvän, vaikka LDL-taso olisi tehokkaasti hoidettu (6).

Tässä tekstissä keskitytään aterogeenisiin lipoproteiineihin, etenkin TGRL:in. Anti-aterogeeninen HDL (high-density lipoprotein) kuljettaa kolesterolia pois kudoksista, ja matalan HDL-pitoisuuden on aikaisemmin ajateltu lisäävän ateroskleroottista sydän- ja verisuonitautisairastuvuutta (2). Nykyisin kohonneen riskin ajatellaan johtuvan kohonneista triglyserideista ja jäännöskolesterolista (ja niihin liittyvistä TGRL-partikkeleista), jotka ovat yhteydessä matalaan HDL-kolesteroliin (2,9), ja matalan HDL-kolesteroliarvon on havaittu olevan stabiili markkeri pitkäaikaisesti kohonneelle triglyseridi- ja jäännöskolesterolitasolle (9).

Tämän tutkimuksen tavoitteena on tarkastella natiivin sekä eri tavoin modifioidun (hapetus, lipolyysi) VLDL:n vaikutusta makrofagien IL-1 $\beta$ :n eritykseen.

## 2 VLDL

### 2.1 Rakenne

VLDL muodostuu muiden lipoproteiinien tapaan lipidirikkaasta ytimestä, jota ympäröi fosfolipideistä, kolesterolista ja apolipoproteiineista muodostunut kuori. Kuorikerroksen fosfolipidien amfipaattisuus mahdollistaa ytimen rasvaliukoisten lipidien kuljettamisen verenkierrossa. VLDL:n ydin koostuu pääasiassa triglyserideistä, ja joukossa on myös kolesteroliestereitä sekä esteröitymätöntä kolesterolia (10).

Lipoproteiineja voidaan luokitella tiheyden perusteella. VLDL:n lipidien osuus on suuri (92%) kun taas apolipoproteiineja on vähän (8%), mikä tekee sen tiheydestä erittäin pienen. VLDL:n tiheydeksi on määritetty 0.950–1.006 g/ml ja sen halkaisija on 30-80 nm (11). VLDL esiintyy kahdessa muodossa, VLDL1 ja VLDL 2. VLDL1 on näistä kahdesta suurempi (50-80 nm) ja sen massasta noin 70% on triglyseridejä, kun VLDL2 on kooltaan 30-50 nm ja sisältää noin 30% triglyseridejä (6). Muita runsastriglyseridisiä, matalan tiheyden lipoproteiineja ovat ruunsulatuskanavan enterosyyteissä muodostuvat kylomikronit, kylomikronien jäänteet (eng. remnants) sekä VLDL:n jäänteet. VLDL ja

muut edellä mainitut partikkelit muodostavat joukon, josta voidaan käyttää yhteistä nimitystä triglyseridirikkaat lipoproteiinit (TGRL).

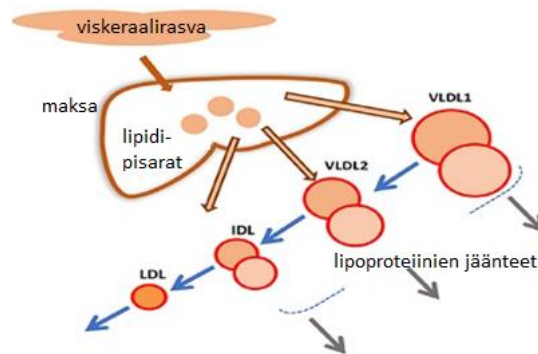
VLDL kuuluu apolipoproteiini-B:tä eli apoB:tä sisältäviin lipoproteiineihin, jotka ovat aterogeenisiä eli ateroskleroosia aiheuttavia (5,12). ApoB-molekyylin lyhyt muoto apoB-48 esiintyy kylomikroneissa, kun taas pidempi muoto apoB-100 esiintyy lipoproteiineissa VLDL, IDL, LDL ja lipoproteiini (a) (13). Maksassa ApoB-100 liitetään maksasta erittyvään VLDL-partikkelin, ja jokaista erittyvää partikkelia kohden on vain yksi apoB, joka säilyy partikkelin mukana sen kuljettaessa lipidejä muualle elimistöön. Korkea apoB-pitoisuus verenkierrossa on liitetty kohonneeseen riskiin saada sydäninfarkti, ja apoB ennustaa riskiä jopa perinteistä LDL-kolesterolitasoa paremmin (14). VLDL:n pinnalla on myös muita apolipoproteiineja, kuten apoC1-C3 ja apoE, jotka toimivat muun muassa entsyymiaktivaattorina tai lipoproteiinireseptorin ligandina (10).

## 2.2 Aineenvaihdunta

Maksa tuottaa VLDL:a, jonka tehtävä on kuljettaa endogeenisiä lipidejä, triglyserideja ja kolesterolia, perifeerisiin kudoksiin. Kapillaarien endoteelisolujen pinnalla oleva entsyymi lipoproteiinilipaasi (LPL) hydrolysoi VLDL:n kuljettamia triglyseridejä vapaiksi rasvahapoiksi, jotka siirtyvät solujen käyttöön energiaksi tai varastoitavaksi. ApoCII toimii LPL:n aktivaattorina. LPL:n vaikutuksesta VLDL:n koko pienenee ja sen tiheys kasvaa asteittain, jolloin VLDL muuttuu verenkierrossa IDL:n kautta LDL:ksi. ApoB-100:a lukuunottamatta VLDL luovuttaa verenkierrossa muut apolipoproteiininsa muuttuessaan LDL:ksi. ApoB:n avulla LDL ja osa IDL:stä pääsevät takaisin maksasoluihin, kun solukalvon LDL-reseptori tunnistaa apoB:n lipoproteiinin pinnalta. LDL-reseptoreita sijaitsee maksan lisäksi myös ekstrahepaattisissa soluissa, jotka saavat tätä kautta tarvitsemaansa LDL:n kuljettamaa kolesterolia solukalvon tai steroidihormonien rakennusaineeksi. (15)

Maksa pystyy säätelemään sen erittämiin lipoproteiineihin pakattujen lipidien määrää. Maksa voi erittää kaikkia eri kokoisia partikkeleita VLDL1-VLDL2-IDL-LDL asteikolla riippuen saatavilla olevien triglyseridien määrästä. Useat tekijät kuten hormonien pitoisuudet, solunsisäinen lipidien käsittely ja erilaiset proteiinit vaikuttavat apoB100-proteiinia sisältävien lipoproteiinien kokoamiseen ja erityksen tasoon maksassa. Plasman kohonnut triglyseridien pitoisuus lisää VLDL1 ja VLDL2 määrää

verenkierrassa ja aiheuttaa myös niiden metaboliaan poikkeavuuksia, joita käsitellään tarkemmin kappaleessa 4.2. (6)



Kuva 1. VLDL:n aineenvaihdunta. Maksan erittämä VLDL1 käy läpi sarjan, jossa sen sisältämiä lipidejä pilkkotaan ja muodostuu pienempiä partikkeleita sekä lipoproteiinien jäänteitä (remnantteja). Rinnakkaiset pallot kuvastavat lipoproteiinien metabolista heterogeenisyyttä tapahtumasarjan aikana (6). Kuva Packard et al., teksti suomennettu (6).

### 2.3 Kertyminen verisuonen seinämään

Osa verenkierrassa kiertävistä lipoproteiineista pääsee kertymään verisuonen endoteelikerroksen alaiseen intimaan, ja lipidikertymä (etenkin kolesteroli) intimassa johtaa ateroskleroottisten muutosten kehittymiseen. Lipoproteiinien tulee olla tarpeeksi pieniä päästäkseen transsytoosilla endoteelisolun läpi intimaan – halkaisijaltaan 75-80 nm suuremmat partikkelit eivät pääse läpäisemään ehjää endoteelia (16). VLDL:n triglyseridien hydrolyysi pienentää partikkelin kokoa, ja näin syntyneet VLDL-jäänteet ovat riittävän pieniä päästäkseen tunkeutumaan intimaan kuten LDL. Pienimmissä VLDL-jäänteissä kolesterolin määrä on suurempi kuin triglyseridien (17), joten VLDL saattaa olla merkittävä tekijä intimaan kertyvän kolesterolikuorman kannalta. Myös muut triglyseridirikkaat lipoproteiinit, kuten suolistosta peräisin olevat apoB48-proteiinia sisältävät kylomikronit, voivat kertyä intimaan sen jälkeen, kun niiden koko on pienentynyt LPL:n hydrolyysin vaikutuksesta (18).

Endoteelin alla intimassa on soluväliaineen muodostama tiheä verkosto, joka koostuu muun muassa proteoglykaaneista ja kollageenista. Intimaan kulkeutuneet



lipoproteiinipartikkelit voivat jäädä jumiin intimaan. Proteoglykaanien negatiivisesti varautuneet glykosaminoglykaanit (GAG) kykenevät sitomaan TGRL-partikkelien apoB-100 -osaa ja sitoutumisella on merkittävä rooli ateroskleroosin patogeneesissä (19). GAG:t voivat sitoa myös VLDL:n apoE-osaa ja siten edistää VLDL:n kertymistä intimaan (20). Hydrolyyttisten vaikutusten lisäksi LPL edistää lipoproteiinien pääsyä ja kertymistä intimaan, mahdollisesti toimimalla sitovana molekyylinä lipoproteiinien ja proteoglykaanien välillä (21). Lipideistä triglyseridien on havaittu kertyvän pääasiassa endoteelikerroksen läheisyyteen, kun taas kolesterolia esiintyy kauttaaltaan myös intiman syvemmissä osissa (22). Kehittyneissä ateroskleroottisissa plakeissa triglyseridejä esiintyy myös intiman hypoksisiin osiin kehittyneiden uudissuonten läheisyydessä, eli uudissuonilla on luultavasti merkitystä TGRL:n kulkureittinä ateroskleroottisen verisuonen seinämään (22).

## 2.4 Modifikaatiot

### 2.4.1 Lipolyysi

Endoteelisolujen pinnan LPL-entsyymien toimintaa on kuvattu osiossa 2.2. VLDL:n sisältämät lipidit ovat kohteena myös monien muiden entsyymien lipolyysille. Nämä modifikaatiot vaikuttavat muun muassa VLDL-jäänteiden aggregaatiotaipumukseen ja kykyyn aiheuttaa tulehdusta valtimon seinämän intimassa. VLDL:n kannalta keskeisimpiä lipolyyttisiä entsyymeitä ovat LPL, sfingomyelinaasi (Smase), fosfolipaasi A2 (PLA2) ja lysosomaalinen hapan lipaasi (LAL). Seuraavaksi esitellään edellä mainittujen entsyymien ominaisuuksia ja niiden tärkeimpiä vaikutuksia VLDL:in.

LPL:a sijaitsee endoteelisolujen lisäksi intimassa. Intiman makrofagit erittävät LPL:a, ja myös ateroskleroottista leesiota ympäröivien sileälihassolujen on havaittu tuottavan tätä entsyymiä (23). Triglyseridien hydrolyysin lisäksi LPL edistää triglyseridirikkkaiden VLDL ja LDL sisäänottoa makrofageihin, joista kehittyy tulehdusta kiihdyttäviä vaahtosoluja (24). Vaahtosoluista kerrotaan tarkemmin lisää kohdassa 3.2. Hiirimallilla on osoitettu, että ateroskleroottisissa leesioissa LPL ohjaa ja vahvistaa LDL:n sitoutumista soluväliaineen proteoglykaaneihin (25), ja luultavasti myös VLDL:n kohdalla LPL edistää lipoproteiinin sitoutumista soluväliaineeseen.

Sfingomyeliini on sfingolipidi, jota esiintyy muun muassa solukalvoilla sekä lipoproteiinien kuorikerroksen lipidivaipassa. VLDL-partikkeleiden sfingomyeliinin määrän on havaittu eläinkokeissa olevan tavallista suurempi silloin, kun ravinnon kolesterolipitoisuus on suuri (26). Plasman korkean sfingomyeliinitason on havaittu olevan itsenäinen riskitekijä ateroskleroosille (27). Smase puolestaan on endoteelisolujen ja makrofagien erittämä entsyymi, joka hydrolysoi VLDL:n sfingomyeliinia irrottamalla siitä fosforyylkoliiniryhmän, jolloin muodostuu keramidiksi kutsuttu sfingolipidi. Smase edistää modifioitujen VLDL-partikkeleiden aggregaatiota ja sitoutumista intiman proteoglykaaneihin (28) sekä vaahtosolujen muodostumista (29), joten sen vaikutuksilla on merkitystä myös ateroskleroosin patogeneesissä.

PLA2:n hydrolyysin kohteena on glyserofosfolipidi, josta entsyymi irrottaa vapaan rasvahapon jättäen jäljelle lysofosfolipidin. Erilaisia PLA2-entsyymityyppejä on useita (30). Muutamaa tyyppiä on havaittu ateroskleroottisissa leesioissa, joissa muun muassa verisuonen seinämän makrofagit erittävät entsyymiä (31). PLA2 lisää VLDL:n sitoutumista intiman proteoglykaaneihin, ja etenkin happamassa extrasellulaarisessa ympäristössä PLA2:n lipolyysiaktiivisuus sekä VLDL:n sitoutuminen lisääntyvät merkittävästi (32). Ihmisillä ateroskleroottisista plakeista on mitattua happamia pH-arvoja, joista lipidirikkaissa kohdissa happamuus on voimakkainta (33).

LAL on solujen lysosomeissa sijaitseva entsyymi, joka osallistuu lysosomiin siirtyneiden kolesteroliestereiden ja triasyyliglyserolien pilkkomiseen (34). Hajoamistuotteina vapautuu vapaata kolesterolia sekä rasvahappoja. Makrofageissa LAL pilkkoo makrofageihin VLDL:n mukana tulevia lipidejä, kun solut puhdistavat intimaa lipoproteiineista. Ateroskleroottisten valtimoiden aktiiviset makrofagit erittävät myös LAL:a extrasellulaariseen tilaan luoden paikallisesti happaman ympäristön, mutta terveissä valtimoissa näin ei tapahdu (35). LAL:n vapauttamilla rasvahapoilla on havaittu olevan monia sääteleviä vaikutuksia muun muassa makrofagien vaihtoehtoiseen aktivaatioon, lipidiperäisten välittäjäaineiden synteesiin, T-solujen toiminnan uudelleenohjelmointiin ja maksan VLDL:n tuotantoon (34).

#### 2.4.2 Hapettuminen

Lipoproteiinien rakenteessa hapettumisen kohteena voivat olla sekä lipidirakenteet että kuorikerroksen proteiinit. Triglyseridirikkaissa lipoproteiineissa etenkin kuori- ja

ydinkerroksen lipidimolekyyleissä (fosfolipideissä ja kolesteroliestereissä) esiintyvät monityydyttymättömät rasvahapot (polyunsaturated fatty acid, PUFA) ovat herkkiä hapettumaan, ja nämä hapettuneet lipidit vaikuttavat ateroskleroosin kehittymiseen ja makrofagien toimintaan intimassa (36). Hapettunut VLDL (oxVLDL) on epästabiiimpi ja siten alttiimpi sekä partikkelifuusiolle että hajoamiselle (37). LPL:n aikaansaaman lipolyysin sekä ApoE-proteiinin on huomattu vähentävän oxVLDL:n päätymistä makrofagien hajotettavaksi (38). Intimassa tapahtuva TGRL:n lipolyysi vapauttaa runsaasti rasvahappoja, jotka kykenevät esiaktivoimaan makrofagit valmiiksi tulehdusreaktion käynnistymiselle (inflammasomiaktivaatio, kts. kohta 3.2.2), ja nämä rasvahapot ovat merkittävä TGRL:n tulehdusta aiheuttava komponentti (4).

Hapettavia tekijöitä on useita, kuten entsyymit (esimerkiksi syklo-oksigenaasi ja sytokromi P450), reaktiiviset happiradikaalit, tupakan savu ja UV-säteily. PUFA:n entsyymaattisessa hapettumisessa syntyy erilaisia bioaktiivisia lipidejä, jotka toimivat monissa viesti- ja säätelytehtävissä elimistössä, ja esimerkiksi sydän- ja verisuonisairauksiin liittyviä hapettumisessa syntyviä molekyylejä on tunnistettu jo satoja. Reaktiiviset happiradikaalit ja entsyymit aiheuttavat myös lipidien peroksidaatiota, jossa oksidatiivisten ketjureaktioiden kautta syntyy voimakkaasti hapettuneita lipidiperoksideja. (36)

Lipidien peroksidaatio voi johtaa oksidatiiviseen stressiin, kun antioksidatiivinen eli hapettumista estävä järjestelmä ylikuormittuu (39). Verisuonissa oksidatiivinen stressi aiheuttaa vauriota soluille, johtaa endoteelin dysfunktiioon, hapettaa intimaan kulkeutuneita lipoproteiineja ja näin edistää ateroskleroottisen plakin komplikaatioita (40). Intiman tulehduksen hillitsemistä vähentämällä lipoproteiini (a):n ja siihen liittyvien hapettuneiden lipidien määrää tutkitaan mahdollisena hoitokeinona kardiovaskulaarisiin sairauksiin (36). Lipoproteiini (a) (lp(a)) on apoB:ta sisältävä aterogeeninen lipoproteiini, jossa LDL:n apoB-100-proteiiniin on kiinnittynyt apoproteiini (a), ja kohonnut lp(a):n määrä on yksi ateroskleroottisen valtimotaudin riskitekijöistä (41).

## 3 Makrofagit

### 3.1 Yleistä

Makrofagit ovat monimuotoinen joukko luontaisen eli synnynnäisen immuunipuolustuksen syöjäsoluja. Niiden tärkeimmät tehtävät ovat mikrobien, vieraiden partikkeleiden, kuolleiden solujen ja muiden jätteiden siivoaminen fagosytoosilla, sekä osallistuminen elimistön tulehdusreaktioiden säätelyyn erittämiensä sytokiinien ja muiden signaalien avulla. Makrofagit esimerkiksi viestivät fagosytoimastaan sisällöstä esittelemällä niistä peräisin olevia antigeenejä, kuten vieraita proteiineja, solukalvon MCH-II kompleksin välityksellä T-soluille (42). Makrofagit kykenevät liikkumaan tulehdusalueilla ja niitä sijaitsee etenkin maksassa, pernassa, keuhkoissa, ruuansulatuskanavassa ja sidekudoksessa, mutta myös muualla elimistössä pysyvinä kudismakrofageina.

Eri kudosten makrofageilla on toisistaan poikkeavia alkuperiä sekä tehtäviä. Yksilönkehityksen alkuvaiheissa muodostuu ruskuaispussissa ja maksassa makrofagien esimuotoja, jotka hakeutuvat kudoksiin ja muodostavat pysyviä kudismakrofageja (43). Tällaisia kudismakrofageja ovat muun muassa ihon Langerhansin solut, maksan Kupfferin solut ja aivojen mikroglia-solut (44). Kudismakrofagit toimivat itsenäisesti, ja ne pystyvät uusiutumaan ja jakautumaan paikallisesti soluvauriotilanteiden yhteydessä (45).

Kudoksiin, kuten verisuonen seinämään, saapuu vierailevia makrofageja myös verenkierron kautta, jossa makrofagien esimuodot monosyytit kiertävät. Monosyyttejä muodostuu jatkuvasti luuytimen kantasolujen myeloidisen linjan esisoluista, ja ne ovat makrofagien tavoin toiminnaltaan heterogeeninen valkosolujoukko (46). Tulehtuneet kudokset välittävät monosyyttejä houkuttelevia signaaleja, ja kudoksiin tunkeutuvat monosyytit erilaistuvat makrofageiksi, joilla on kudismakrofageista poikkeavia ominaisuuksia (27). Monosyyttien kudoksiin hakeutumista ja erilaistumista ohjaavat erilaiset kasvutekijät, kuten M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) ja GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), joista ensiksi mainittua erityy jatkuvasti kudosten useista eri soluista, kun taas jälkimmäisen erityy kiihtyy ja muuttuu merkittävämmäksi etenkin vasteena tulehdusreaktioille (47). Näillä kasvutekijöillä on

lukuisia ja merkittäviä vaikutuksia useiden eri verisolujen tuotantoon luuytimessä, erilaistumiseen ja toimintaan niin normaalitilanteessa kuin tulehdusympäristössä.

Makrofagit voidaan jakaa toiminnaltaan kahteen eri tyyppiin, M1 ja M2 makrofageihin. M2-tyyppi viittaa lähinnä kaikkiin muihin fenotyyppeihin paitsi M1, ja M2-makrofagit voidaan jakaa edelleen M2a-c ryhmiin. M1 makrofagit muodostuvat klassisen aktivaation ja M2 makrofagit vaihtohtoisen aktivaation kautta, ja aktivaation suunta riippuu siitä, mille viestiaineille makrofagit altistuvat (48). Tärkeimpiä makrofagin fenotyyppiin vaikuttavia sytokiinejä ovat klassisessa aktivaatiossa interferoni- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) ja vaihtohtoisesa aktivaatiossa interleukiinit 4 ja 13 (IL-4 ja IL-13), mutta fenotyyppien erilaistuminen ja toiminta ei ole yksiselitteistä, fenotyyppien sisällä on erilaisia makrofagien alaluokkia, ja myös kudosten mikroympäristö voi myöhemmin muokata jo erilaistuneen makrofagin ominaisuuksia (49).

Ateroskleroosissa verisuonen seinämässä esiintyy molempia makrofagien fenotyyppisiä, jotka vaikuttavat plakin syntymiseen, kehittymiseen ja stabiliteettiin intimassa (48). M1 makrofagien toimintaa pidetään tulehdusta edistävänä, sillä ne tuottavat runsaasti pro-inflammatorisia sytokiinejä IL-6 ja tuumorinekroositekijä alfa (TNF- $\alpha$ ), ja osallistuvat kudosta hajottaviin prosesseihin (48,50). M1 makrofagit ovat vallitseva muoto etenkin edenneissä ateroskleroottisissa plakeissa, joissa inflammaatio on runsasta (36). Ne sijaitsevat plakin repeämisaaltilla alueella ja heikentävät plakkia ympäröivän kuoren kestävyyttä tehden plakista epästabiilimman (51). M2 makrofagit puolestaan edistävät kudosten korjaantumista ja vaimentavat tulehdusreaktioita (49). Niiden erittämiä anti-inflammatorisia sytokiinejä ovat muun muassa IL-10 ja transformoiva kasvutekijä beta (TGF- $\beta$ ) (52).

## 3.2 Toiminta

### 3.2.1 Fagosytoosi

Fagosytoosi eli solusyönti on makrofagien ja muiden syöjäsolujen mekanismi, jossa kiinteä parikkeli, esimerkiksi bakteeri tai pakkautuneita lipoproteiineja, otetaan solun sisälle hajotettavaksi. Sopivan kohteen tunnistamisen jälkeen partikkeli otetaan solun sisälle solukalvosta peräisin olevan kalvorakenteen ympäröimänä, jota kutsutaan fagosomiksi (53). Fagosomin sisältö ja kalvon koostumus muokkaantuvat solunsisäisten

kalvorakenteiden kuten endosomien ja lysosomien fuusioituessa fagosomiin, jolloin fagosomi happamoituu, ja sitä kutsutaan fagolysosomiksi (54). Hapan ympäristö vaaditaan, jotta happamat proteaasit voisivat aktivoitua pilkkomaan fagosomin sisältöä (32).

Makrofagit tunnistavat fagosytoitavaksi tarkoitettuja soluja ja partikkeleita niiden pinnalla olevien molekyyliarakenteiden avulla. Patogeenien pinnalla on tiettyjä elimistölle vieraita molekyyliä, joista käytetään nimitystä PAMP (pathogen-associated molecular patterns), ja vastaavasti makrofageilla on näiden molekyylien tunnistamiseen erikoistuneita reseptoreita (PRR, pathogen recognition receptors). PRR:ta on useita erilaisia solukalvolla ja solun sisällä, ja ne voivat tunnistaa vieraita hiilihydraatteja, proteiineja, lipidejä tai nukleiinihappoja. (55)

Myös elimistön omat rakenteet väärässä paikassa voivat aktivoita makrofagien toimintaa. Solukalvojen hajotessa esimerkiksi nekroosin tai pitkittyneen apoptoosin yhteydessä intrasellulaarisia molekyyliä paljastuu ekstrasellulaaritilaan, jolloin niistä käytetään nimitystä DAMP (damage-associated molecular patterns). Makrofageilla on useita reseptoreita erilaisten DAMP-rakenteiden tunnistamiseen. Apoptoottiset solut kutsuvat paikalle syöjäsoluja, kuten kudismakrofageja, myös erittämällä kemotaktisia viestiaineita, esimerkiksi nukleotidejä ATP ja UTP. Normaalissa fysiologisessa tilassa apoptoottisten solujen fagosytoosi ei käynnistä inflammaatiota edistäviä prosesseja toisin kuin bakteerien fagosytoosi. (56)

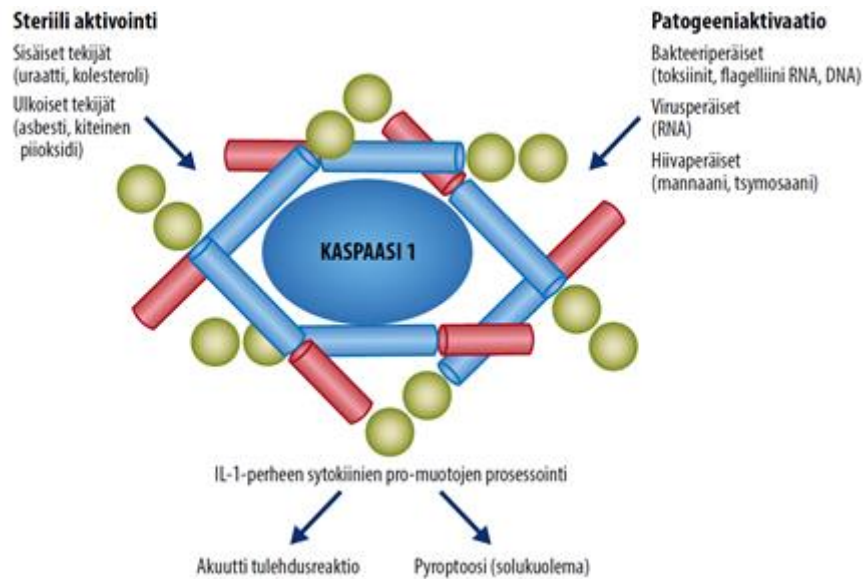
Valtimoiden intimassa makrofagit osallistuvat ekstrasellulaaritilaan tarttuneiden lipoproteiinien siivoamiseen fagosytoosilla. Makrofagien solukalvolla on scavenger-reseptoreiksi (suom. jätereseptori) kutsuttuja reseptoreita, jotka tunnistavat muokattuja lipoproteiineja, esimerkiksi hapettunut LDL (oxLDL), sekä myös natiiveja eli muokkaamattomia lipoproteiineja, kuten LDL ja triglyseridirikkaat kylomikroni- ja VLDL-jäänteet (2,57,58). Näiden lipoproteiinien mukana makrofageihin siirtyy kolesterolia. Jos kolesterolin sisäänotto, varastointi kolesteroliestereinä (CE) ja erityisesti ovat epätasapainossa, makrofagit täyttyvät CE-pitoisilla lipidipisaroilla ja muuttuvat vaahtosoluiksi (36). Vaahtosolut ovat keskeinen solutyyppejä varhaisissa ateroskleroottisissa leesioissa, ja niiden muodostumiseen osallistuvat myös intiman sileälihassolut omien scavenger-reseptoreidensa avulla (59).

### 3.2.2 Inflammaatio

Makrofagit voivat aktivoida elimistössä tulehdusreaktion erittämällä pro-inflammatorisia sytokiinejä vasteena haitalliseksi tunnistetuille rakenteille. Tärkeä tulehdusreaktion käynnistäjä on sytokiini IL-1 $\beta$ , joka muun muassa osallistuu lämmönsäätelyyn nostamalla kuumeen, aktivoi synnynnäisen immuunipuolustuksen soluja kuten makrofageja, lisää valkosolujen tarttumista verisuonten seinämiin ja lisää monien muiden sytokiinien tuotantoa soluissa (60). IL-1 $\beta$  on keskeisessä roolissa myös monissa sairauksissa, joihin liittyy inflammaatio, kuten nivelreumassa ja ateroskleroosissa, ja IL-1 $\beta$ :n toiminnan estämistä on tutkittu uutena ateroskleroosin hoitokeinona perinteisen kolesteroliin vaikuttavan hoidon rinnalle lupaavin tuloksin (61). Myös toista pro-inflammatorista sytokiinia, IL-18, esiintyy ateroskleroottisessa plakissa, ja sillä on plakin stabiliteettia heikentäviä vaikutuksia (62).

Yksi makrofagien keino tulehdusreaktion käynnistämiseksi on inflammasomiaktivaatio, joka tapahtuu solunsisäisen inflammasomi-proteiinikompleksin avulla. Erilaisia inflammasomeja on tunnistettu muutamia, joista verisuonen seinämän makrofagien toiminnassa keskeinen on NLRP3-inflammasomi (nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing (NLR) -proteiini 3) ja sen aktivoimat IL-1-perheen sytokiinit (63). NLR-proteiinit muodostavat inflammasomin keskuksen ja tunnistavat erilaisia PAMP- ja DAMP-signaaleja (64). Inflammasomin aktivaatio johtaa sytokiinien IL-1 $\beta$  ja IL-18 inaktiivisten esimuotojen pilkkoutumiseen ja aktivaatioon kaspasi 1-proteaasin välityksellä (kuva 2) (63).

Inflammasomin aktivaatiossa on kaksi vaihetta. NLRP3-inflammasomin muodostuminen solulimassa edellyttää, että makrofagi on ensin saanut pro-inflammatorisen stimuluksen esimerkiksi mikrobirakenteen kuten lipopolysakkaridin (LPS) tai sytokiinin välityksellä. Tämä aktivaation ensimmäinen vaihe (eng. priming) johtaa inflammasomin osien ja sytokiinien esimuotojen proteiinisynteesin käynnistymiseen makrofagissa, ja toisessa vaiheessa inflammasomikompleksi muodostuu ja aktivoituu solulimassa, mikä johtaa IL-1 $\beta$  ja IL-18 eritykseen. Kuvassa 2 on esitetty inflammasomia aktivoivia tekijöitä. (65)



Kuva 2. Inflammasomin (kuvassa NLRP3) aktivoituessa kaspasi 1-proteaasi liittyy solulimassa muodostuvaan proteiinikompleksiin, mikä johtaa IL-1 $\beta$  ja IL-18 sytokiinien proteolyyttiseen aktivaatioon (64).

Aktivaation toisen vaiheen käynnistävä tekijä voi olla esimerkiksi makrofagin fagoositoima kolesterolikide, joka lisää IL-1 $\beta$ :n eritystä annosriippuvaisesti (66,67). Myös hapettuneen LDL:n (oxLDL) on havaittu aiheuttavan inflammasomiaktivaatiota, ja se vaikuttaisi riittävän stimuloimaan sekä aktivaation ensimmäistä että toista vaihetta ilman muita aktivoivia tekijöitä (67). Ateroskleroottisen valtimon seinämässä LDL sekä VLDL ovat alttiita lipolyysille, ja entsyymien (LAL ja PLA2) avulla modifioitujen lipoproteiinien on havaittu lisäävän makrofagien IL-1 $\beta$  tuotantoa sekä vaahtosolujen muodostumista in vitro (68).

## 4 Hypertriglyseridemia

### 4.1 Yleistä

Hypertriglyseridemiällä tarkoitetaan tilaa, jossa veren triglyseridipitoisuus on paastotilassa kohonnut yli 1,7 mmol/l tasolle. Optimaalisen tason on havaittu olevan alle 1,2 mmol/l alueella, jolloin veressä esiintyy suunnilleen sama määrä VLDL1 ja VLDL2



partikkeleita (6). Hypertriglyseridemiaa esiintyy monissa tautitiloissa, kuten tyypin II diabeteksessa, metabolisessa oireyhtymässä, alkoholismissa, perinnöllisissä dyslipidemioissa kuten familiaalinen hypertriglyseridemia sekä ylipainon yhteydessä. Lihavuudella on vahva yhteys lisääntyneeseen maksan triglyseridien tuotantoon sekä VLDL:n eritykseen, ja laihduttamalla voidaan madaltaa veren triglyseridipitoisuutta (6).

Kohonnut triglyseridipitoisuus lisää sydäninfarktin sekä kokonaiskuoleisuuden riskiä, ja naisilla kohonneen triglyseriditason on havaittu olevan jopa parempi ennustetekijä sydäninfarktille kuin kolesterolitaso (69). Laajassa The Copenhagen City Heart Study -seurantatutkimuksessa havaittiin sydäninfarktin, iskeemisen sydänsairauden ja kuoleman riskien suurentuvan jo alkaen triglyseriditasolta 1-1.99 mmol/l verrattuna alle 1 mmol/l pitoisuuteen (70).

Metabolinen oireyhtymä on usean eri tekijän summa, jolloin havaitaan aineenvaihdunnan häiriintyminen ja kohonnut riski sairastua sydän- ja verisuonisairauksiin sekä tyypin II diabetekseen (71). Hypertriglyseridemian lisäksi metabolisen oireyhtymän tekijöihin kuuluvat keskivartalolihavuus, kohonnut verenpaine, kohonnut paastoglukoositaso (tai diabetes) ja matala HDL-kolesterolitaso – näistä tekijöistä vähintään kolmea havaitaan yhtä aikaa. Suomessa yli kolmasosa aikuisista miehistä ja neljäsosa naisista täyttää metabolisen oireyhtymän kriteerit (72). Noin 4500 henkilöä kattavassa pohjoismaisessa tutkimuksessa valtaosa tyypin II diabeetikoista sairasti myös metabolista oireyhtymää, ja sydän- ja verisuonisairauksiin kuoleminen oli yli viisi kertaa yleisempää metabolista oireyhtymää sairastavilla henkilöillä (73).

## 4.2 Vaikutus lipoproteiinien metaboliaan

VLDL:n pitoisuus verenkierrossa vähenee kahdella tavalla, ensin nopeasti lipolyysin välityksellä ja sen jälkeen hitaammalla vaiheella, jossa jäännöspartikkeleita eli remnantteja poistetaan verenkierrosta. Plasman triglyseridipitoisuuden ollessa ihanteellisella tasolla hitaan vaiheen osuus VLDL:n kataboliassa on pieni, mutta triglyseridipitoisuuden noustessa VLDL:n poistuminen verenkierrosta ei ole riittävän tehokasta ja hitaan vaiheen osuus korostuu. Tällöin verenkierrossa esiintyy hitaasti metaboloituvia VLDL1 ja VLDL2 tyyppisiä eli remnantteja, joilla uskotaan olevan vaikutusta ateroskleroosin kehittämisessä. (74)

Osa elimistössä kiertävistä VLDL-remnanteista on peräisin myös suolistosta, jossa ravinnon triglyseridejä pakataan kylomikronien lisäksi myös ApoB48:a sisältäviin VLDL-partikkeleihin. Näistä ApoB48:a sisältävistä partikkeleista kylomikronit poistuvat ruokailun jälkeen verenkierrosta nopeammin kuin VLDL. Kaikista hitainta VLDL-remnanttien poistuminen näyttäisi olevan etenkin henkilöillä, joilla on hypertriglyseridemia. Maksa- ja suolistoperäisten VLDL-remnanttien lisääntynyt pitoisuus verenkierrossa voi osaltaan selittää hypertriglyseridemiaan liittyvää kohonnutta kardiovaskulaarisairauksien riskiä, sillä pienet remnantit kulkeutuvat verenkierrosta intimaan ja kerryttävät sinne kolesterolia. (74)

Kooltaan suuremman VLDL1:n pitoisuus nousee hypertriglyseridemiassa. VLDL:n tyyppi (1 tai 2) vaikuttaa sen metaboliaan sekä myös siitä muodostuvan LDL:n rakenteeseen ja metaboliaan. LDL, joka on peräisin VLDL2:sta, poistuu verenkierrosta sekä nopean että hitaan vaiheen kautta, mutta VLDL1:sta peräisin oleva LDL:n poistuminen on vain hidastunut. Ero johtuu luultavasti siitä, että LDL:n apoB100-proteiini sitoutuu heikommin solujen LDL-reseptoriin ja siten partikkeli poistuu heikommin verenkierrosta, jos apoB100 on peräisin VLDL1-partikkelista. Tällainen pitkittyneesti verenkierrossa kiertävä LDL ehtii käydä läpi muutoksia, jotka johtavat pienien, tiheiden LDL-partikkeleiden (small dense LDL, sdLDL) syntymiseen. Kun veren triglyseridipitoisuus ylittää noin 1,5 mmol/l, sdLDL määrä kohoaa huomattavasti. Hypertriglyseridemian ja sdLDL:n yhteys saattaa olla yksi merkittävin selittävä tekijä hypertriglyseridemian ja kardiovaskulaaristen sairauksien yhteydelle, koska sdLDL on hyvin aterogeeninen partikkeli. (6)

### 4.3 Hypertriglyseridemia ja inflammaatio

Hypertriglyseridemiaan on havaittu liittyvän veren kohonnut CRP (C-reaktiivinen proteiini) sekä leukosyyttipitoisuus, mikä viittaa elimistössä vallitsevaan matala-asteiseen tulehdukseen (75). Hypertriglyseridemia lisää myös akuutin pankreatiitin riskiä, ja matala-asteinen tulehdus saattaa olla eräs selittävä tekijä näiden kahden väliselle yhteydelle (75). Myös TGRL-partikkeleihin sisältyvän jäännöskolesterolin (kokonaiskolesteroli, josta on vähennetty LDL- ja HDL-kolesteroli) on havaittu olevan yhteydessä matala-asteiseen tulehdukseen, kun taas kohonneella LDL-kolesterolilla yhteyttä ei yllättäen ollut (76). TGRL:n proinflammatoriset vaikutukset ovat aktiivisen

tutkimuksen kohteena, koska inflammaation tiedetään vaikuttavan ateroskleroottisen plakin muutoksiin ja mahdollisiin komplikaatioihin, kuten repeämiseen (5).

## 5 Materiaalit ja menetelmät

### 5.1 VLDL eristys

Plasma saatiin Suomen Punaisen Ristin Veripalvelusta vapaaehtoisilta luovuttajilta. Plasman joukkoon lisättiin gentamysiiniä (Sigma, G1272) pitoisuudessa 100 µg/ml ja EDTA:ta (Ethylenediaminetetraacetic acid, Sigma) pitoisuudessa 3 mM. VLDL eristettiin yhdessä IDL:n kanssa säätämällä plasman tiheys arvoon 1,019 kaliumbromidin avulla. Tämän tutkimuksen myöhemmissä osissa puhuttaessa VLDL:sta tarkoitetaan VLDL ja IDL sisältävää osuutta plasmasta. Plasma sentrifugoitiin Beckman Coulter Optima TM XL-90 ultrasentrifugilla (roottori Ti50.2, 40 000 rpm, 18 h, +4°C). VLDL kerättiin ruiskun ja neulan avulla putkeen, ja joukkoon lisättiin kaliumbromidia (0,05 x VLDL tilavuus (ml), grammaa) konsentroidintia varten. VLDL sentrifugoitiin uudestaan (30 000 rpm, 18 h, +4°C). Konsentroidinnan jälkeen VLDL kerättiin neulan ja ruiskun avulla ja laitettiin dialyysiin kaliumbromidin poistamiseksi. Osa dialysoitiin PBS:ssa (phosphate buffered saline, Medicago, 09-9400) ja osa dialysoitiin 1 mM EDTA, 150 mM NaCl liuoksessa, pH 7,4, +4°C. Dialyysin jälkeen VLDL steriilisuodatettiin ja säilytettiin jääkaapissa. Proteiinien pitoisuus määritettiin Pierce BCA protein assay -kitillä valmistajan ohjeen mukaan, ja käytettynä standardina oli naudan seerumin albumiini.

### 5.2 VLDL:n modifikaatiot

#### 5.2.1 Menetelmä

Kaikki työvaiheet toteutettiin steriilisti laminaari-ilmavirtauskaapissa. Dialysoitu ja steriilisuodatettu VLDL pipetoitiin eppendorf-putkiin pitoisuudessa 0,5 mg/ml. Pitoisuus säädettiin PBS:n avulla sopivaksi. Putkiin lisättiin myös entsyymiä (LAL, Smase tai PLA2) tai kuparisulfaattia. Kontrollinäytteet sisälsivät vain VLDL:a ja ne käsiteltiin samalla tavalla kuin modifikaationäytteet. Liuoksia inkuboitiin 3 tuntia +37°C, jonka jälkeen 1,5 ml pipetoitiin ultrasentrifugiputkiin, joissa oli 750 µl tislattua vettä ja 750 µl PBS:a. Liuokset sentrifugoitiin Beckman Coulter Optima TM TLX ultrasentrifugilla

(roottori TLA-100.3, 100 000 rpm, 3 h, +4°C) ja VLDL kerättiin putken pinnalta neulan ja ruiskun avulla eppendorf-putkiin. Näytteiden proteiinien pitoisuus määritettiin Pierce BCA protein assay -kitillä valmistajan ohjeen mukaan ja näytteitä säilytettiin jääkaapissa.

### 5.2.2 LAL

Käytetty entsyymi oli saatu lahjaksi professori Gregory Grabowskilta. Entsyymien pitoisuus oli 3,3 mg/ml ja 8,11 U/mg (Lot RDLAL046). Entsyymiä käytettiin modifikaatioissa laimennettuna pitoisuuteen 22 µg/ml.

### 5.2.3 Smase

Käytetty entsyymi oli Sphingomyelinase from *Bacillus cereus* (Sigma, S9396). Entsyymien pitoisuus oli 544 mU/µl. Entsyymiä käytettiin modifikaatioissa laimennettuna pitoisuuteen 363 mU/ml.

### 5.2.4 PLA2

Käytetty entsyymi oli Phospholipase A2 from honey bee venom (*Apis mellifera*) (Sigma, P9279). Entsyymien pitoisuus oli 1000 U/ml. Entsyymiä käytettiin modifikaatioissa laimennettuna pitoisuuteen 67 mU/ml. Liuokseen lisättiin kalsiumkloridia pitoisuudessa 10 mM, koska käytetyn entsyymien toiminta on kalsiumista riippuvaista.

### 5.2.5 Oksidaatio

VLDL:n hapettamiseen käytettiin kuparisulfaattia pitoisuudessa 20 µM. Hapetettava VLDL oli muista modifikaatioista poiketen dialysoitu PBS:ssä, jotta liuoksessa ei olisi hapettumista estävää EDTA:a. Inkuboinnin jälkeen hapetusmodifikaatio pysäytettiin EDTA:lla pitoisuudessa 50 µM ennen kuin näyte pipetoitiin ultrasentrifugiputkeen.

## 5.3 THP-1 solujen valmistelu

### 5.3.1 Viljely

Tutkimuksessa käytetyt solut olivat akuuttia monosyyttistä leukemiaa sairastavan potilaan THP-1 soluja (THP-1, ATCC® TIB-202™), joita voidaan käyttää in vitro

solumallina tutkittaessa makrofagien toimintaa (24). Nestetyössä jäädytetyt solut sulatettiin nopeasti +37°C vesihauteessa ja suspensoitiin kasvatusliuokseen (RPMI-1640 Medium, johon lisätty 10% FBS, 2 mM Glutamax, 100 U/ml penisiliini, 100 µg/ml streptomysiini ja 25 mM HEPES). Solut sentrifugoitiin välittömästi pohjaan (200 G, 5 min), jonka jälkeen kasvatusliuos kerättiin pois pakastusaine DMSO:n (dimetyylisulfoksidi) poistamiseksi, ja solut suspensoitiin uudelleen 15 ml kasvatusliuokseen. Soluja kasvatettiin pitoisuudessa 300 000 solua/ml soluviljelykaapissa (+37°C, 95% ilmankosteus, 5% CO<sub>2</sub>). Kasvatusliuos vaihdettiin maanantaisin ja keskiviikkoisin lisäämällä uutta liuosta 1:1, ja perjantaisin koko kasvatusliuos ja soluviljelypullo vaihdettiin uuteen.

### 5.3.2 Monosyytti-makrofagi erilaistaminen

Ennen solukokeita THP-1 solut erilaistettiin makrofageiksi lisäämällä kasvatusliuokseen PMA:ta (Phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma, P1585, 1mM liuotettuna DMSO:in) pitoisuudessa 100 nM. Solut pipetoitiin 24-kuoppalevyille (300 000 solua, 1 ml erilaistamisliuosta) ja soluja säilytettiin soluviljelykaapissa 72 tuntia. Makrofageiksi erilaistuessaan THP-1 solut muuttuvat kiinnittyvään muotoon ja tarttuvat kuoppalevyn pohjaan.

### 5.3.3 Makrofagien aktivointi

Osassa solukokeita erilaistetut makrofagit aktivoitiin ennen altistamista VLDL:lle (priming, kts. kappale 3.2) pipetoimalla kuoppalevyille LPS:a (Lipopolysaccharides from Escherichia coli O111:B4, Sigma, L2630) pitoisuudessa 1 µg/ml. Solujen annettiin reagoida soluviljelykaapissa 4,5 tunnin ajan.

## 5.4 Solukokeet

### 5.4.1 Solujen käsittely modifioiduilla lipoproteiineilla

Solut pestiin ensin kahdesti PBS-liuoksella (DPBS, no calcium, no magnesium, Gibco™, kataloginro. 14190094) ennen reaktioliuosten antamista soluille. Kuoppalevyille pipetoitiin modifioimatonta tai modifioitua VLDL:a eri pitoisuuksissa (20-100 µg/ml). Tilavuudeksi säädettiin 500 µl käyttämällä reaktioliuosta (RPMI-1640 Medium, johon

lisätty 2 mM Glutamax, 100 U/ml penisiliini, 100 µg/ml streptomysiini ja 25 mM HEPES). Yhtä näytettä pipetoitiin aina kahteen peräkkäiseen kuoppaan. Kuoppalevyille pipetoitiin myös positiivisena kontrollina curdlania (2 mg/ml, lopullinen pitoisuus 0,03 mg/ml), joka on NLRP3-inflammasomia aktivoiva beta-glukaani (77). Soluja pidettiin soluviljelykaapissa yön yli (18h).

#### 5.4.2 Solunäytteiden kerääminen

Reaktioliuos kerättiin pipetillä putkiin, ja näytteitä sentrifugoitiin irtosolujen poistamiseksi (200 G, 5 min, +4°C). Neste kerättiin pipetillä talteen eppendorf-putkiin varoen pohjalle painuneita soluja. Osa näytteiden tilavuudesta eroteltiin käytettäväksi heti tehtävää LDH-sytotoksisuusmäärittystä varten, ja loppuosa näytteistä säilytettiin pakastimessa (-80°C) myöhemmin tehtävää ELISA-määrittystä varten.

#### 5.5 LDH

Solukokeiden makrofageille aiheuttama sytotoksisuusvaikutus määritettiin käyttämällä laktaattidehydrogenaasin (LDH) aktiivisuutta mittaavaa tutkimuspakettia (Cytotoxicity Detection Kit (LDH), Roche, kataloginro. 11644793001) valmistajan ohjeiden mukaan. LDH vapautuu solusta solukalvon hajotessa. Solukokeen kuoppalevyn yhteen kuoppaan lisättiin reaktioliuoksen pois keräämisen jälkeen Triton X-100 detergenttiä (1%, sekoitettuna tuoreeseen reaktioliuokseen, 10 min vaikutusaika) solujen hajottamiseksi, ja tästä kuopasta kerättiin sytotoksisuusmäärittelyyn solukuoleman positiivinen kontrolli (high control).

#### 5.6 Proteiinimäärittely solukaivoista

Reaktioliuoksen pois keräämisen jälkeen kuoppalevyn solukaivot huuhdeltiin kerran PBS:n avulla, jonka jälkeen kaivoihin lisättiin NaOH:a pohjalle tarttuneiden makrofagien hajottamiseksi. Solukaivojen proteiinien pitoisuus, joka kuvaa solujen määrää, määritettiin Pierce BCA protein assay -kitillä valmistajan ohjeen mukaan.

## 5.7 ELISA

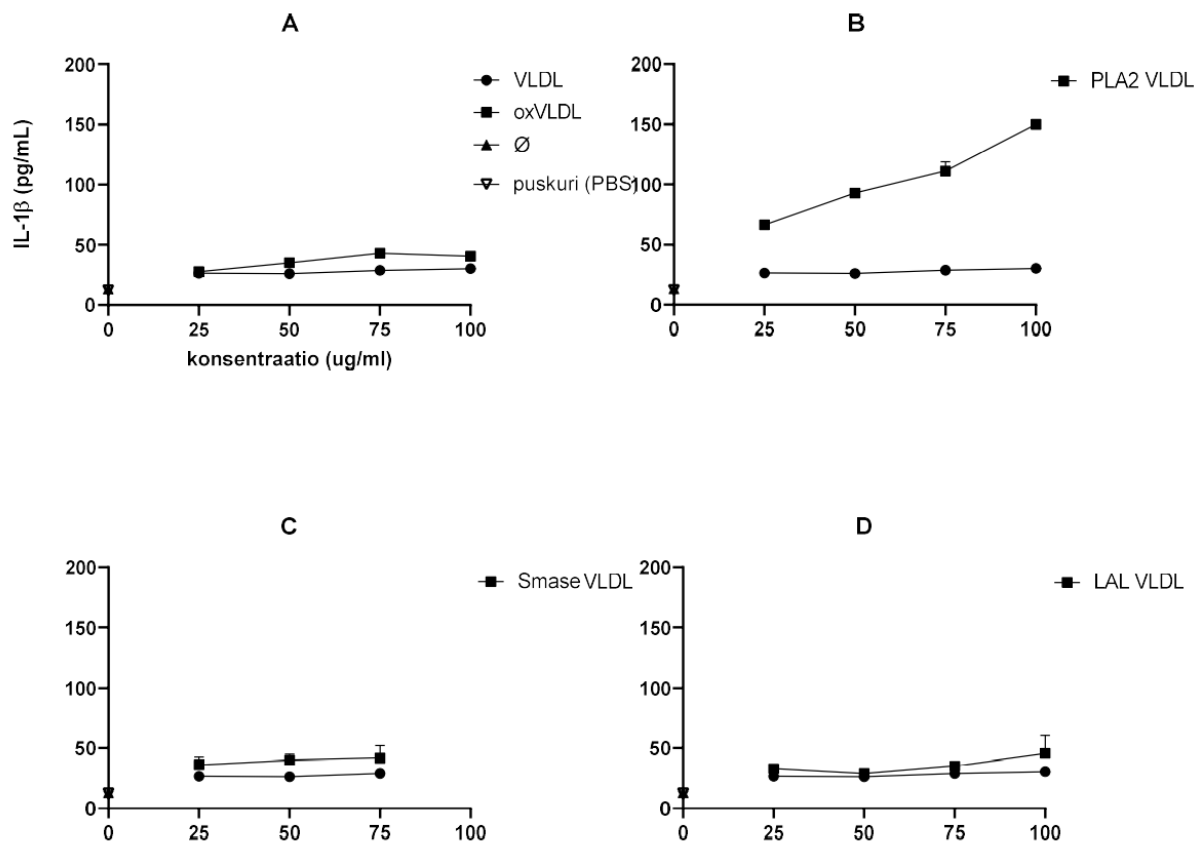
Kerättyjen reaktioliuosten IL-1 $\beta$  pitoisuudet määritettiin käyttämällä DuoSet® ELISA Human Total IL-18/Human total IL-1 $\beta$  Kit -tutkimuspakettia (R&D Systems) valmistajan ohjeiden mukaisesti.

## 5.8 Tilastolliset menetelmät

Kokeiden tulokset käsiteltiin käyttämällä GraphPad Prism 9.1.2-ohjelmaa. Tulosten tilastollisessa käsittelyssä käytettiin kaksisuuntaista varianssianalyysiä (2-way ANOVA) ja Dunnettin testiä kuvassa 4 ja Studentin t-testiä kuvassa 5A. Merkitsevyyden rajana pidettiin  $p < 0,05$ .

## 6 Tulokset

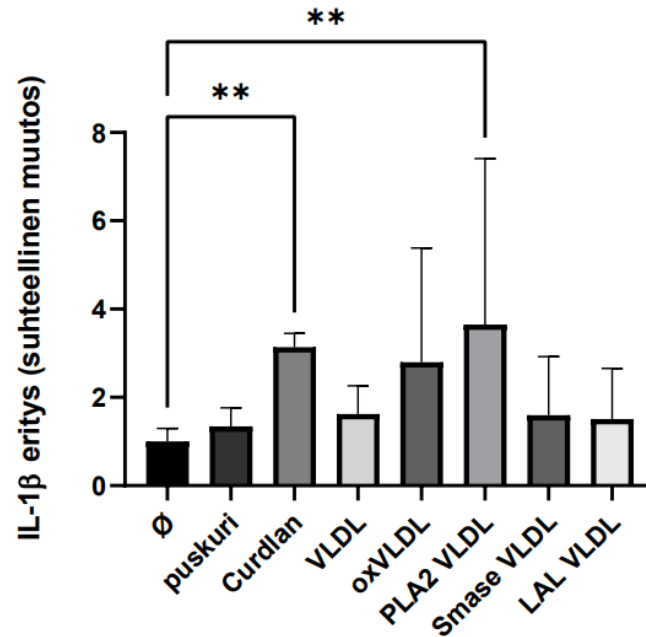
Makrofageja altistettiin natiiveille ja muokatuille VLDL-partikkeleille eri pitoisuuksissa yön yli, jonka jälkeen niiden tuottaman IL-1 $\beta$ :n määrä mitattiin reaktioliuoksesta. Kuvassa 3 on esitetty eri modifikaatioiden aiheuttama IL-1 $\beta$ :n erityys yhdessä solukokeista. Kuva edustaa tehtyjä solukokeita, joita oli useita, mutta selkeyden vuoksi kaikkia solukokeiden tuloksia ei esitetä samassa kuvassa, sillä modifikaatioliuosten pitoisuudet vaihtelivat solukokeesta riippuen. Kuvassa 3 esitettyssä solukokeessa on käytetty pitoisuuksia, joilla suurin osa altistuksista tehtiin. Kuvassa 4 eri solukokeiden tulokset on esitetty yhdistettynä.



Kuva 3. Natiivin ja modifioidun VLDL:n vaikutus makrofagien IL-1 $\beta$ :n eritykseen. Soluja altistettiin lipoproteiineille eri pitoisuuksissa (25-100  $\mu$ g/ml). Tässä altistuksessa soluja ei ensin aktivoitu LPS:n avulla. Virhepalkit havainnollistavat keskivirhettä arvojen välillä. Ø=kontrolli (pelkkä reaktioliuos).

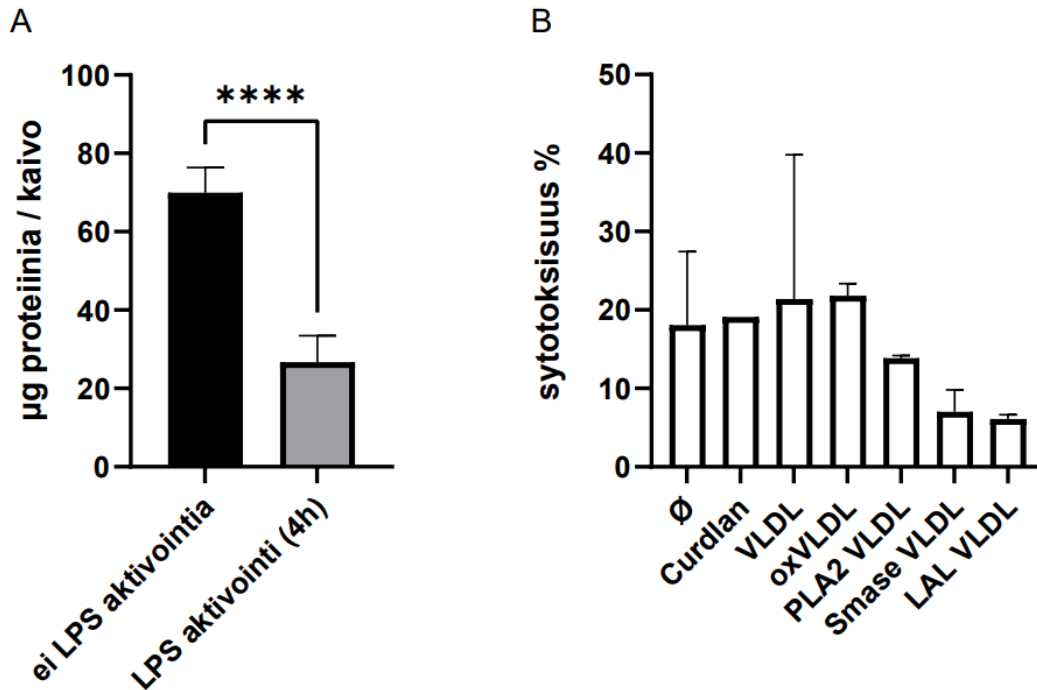
Natiivi VLDL ei merkittävästi lisännyt IL-1 $\beta$ :n eritystä kontrolliin verrattuna (3A). Hapetettu sekä Smase- tai LAL-modifioitu VLDL eivät myöskään näyttäneet merkittävästi lisäävän IL-1 $\beta$ :n eritystä natiiviin VLDL:in verrattuna, mutta PLA2-modifioidun VLDL:n aiheuttama vaste (3B) oli modifikaatioista selvästi voimakkain ja vaikutti tuloksien perusteella olevan annosriippuvaista. Kaikista suurinta IL-1 $\beta$ :n eritystä oli PLA2-modifioidulla VLDL:lla pitoisuudessa 100  $\mu$ g/ml, jolloin eritystä lähes viisinkertaistui natiiviin VLDL:n verrattuna.





Kuva 4. Eri modifikaatioiden aiheuttama suhteellinen muutos makrofagien IL-1 $\beta$ :n erityksessä. Kuvassa on esitetty IL-1 $\beta$ :n erityksen määrän muutos suhteutettuna kontrolliin ( $\emptyset$ ). Kaikki lipoproteiinit annettiin soluille pitoisuudessa 75  $\mu$ g/ml. Kuvassa on esitetty kolmen kokeen keskiarvot modifikaatioille PLA2, Smase ja LAL, ja neljän kokeen keskiarvot natiiville ja hapetetulle VLDL:lle. Curdlan (pitoisuus 0,03 mg/ml) toimi positiivisena kontrollina. Virhepalkit havainnollistavat keskivirheen arvojen välillä. \*\* $p < 0,01$ .

Eri modifikaatioista PLA2-modifioitu VLDL lisäsi IL-1 $\beta$ :n eritystä tilastollisesti merkitsevästi ( $p = 0,0034$ ). Kontrolliin verrattuna erityys lisääntyi keskimäärin 3,65-kertaisesti, mutta vaihtelu eri solukokeiden välillä oli huomattavaa. Natiivi VLDL tai muut modifikaatiot eivät aiheuttaneet tilastollisesti merkittävää vastetta kontrolliin verrattuna. Positiivisena kontrollina käytetty curdlan lisäsi IL-1 $\beta$ :n eritystä merkitsevästi.



Kuva 5. Solukokeiden aiheuttama sytotoksisuus. Kuvassa 5A on esitetty LPS:lla tehdyn aktivoinnin vaikutus kuoppalevyn kaivon pohjalta mitattuun proteiinimäärään.

Proteiinimäärä kuvaa kaivon pohjalla olevien solujen määrää. Kuvassa on esitetty proteiinimäärien keskiarvot yhdessä solukokeessa, ja virhepalkit kuvaavat kaivojen välistä vaihtelua. Kuvassa 5B samasta solukokeesta on esitetty LDH-määrityksellä (kappale 5.5) mitattu sytotoksisuus prosentteina, kun positiivisen kontrollikaivon mittaustulos on 100%. Soluja ei oltu aktivoitu LPS:lla. \*\*\*\*p<0,0001

Tutkittaessa solukokeiden aiheuttamaa sytotoksisuutta huomattiin, että ne makrofagit, jotka oli ensin aktivoitu LPS:n avulla, eivät selvinneet yhtä hyvin elossa kuoppalevyn kaivoissa. Kaivoissa, johon LPS-aktivointi tehtiin, oli vähemmän proteiinia (soluja) jäljellä kuin ei-aktivoituissa kaivoissa (kuva 5A), eli pohjalta irronneet, kuolleet solut olivat todennäköisesti huuhtoutuneet pois kaivoista solujen pesun yhteydessä ennen reaktioliuosten pipetoimista. Tämän takia kuvassa 5B on esitetty sytotoksisuusprosentit vain ei-aktivoituille soluille, koska LDH-määrityksestä saadut mittauserot jäivät vähäisen solumäärän takia valheellisen pieniksi kaivoista, joiden soluille oli tehty LPS-aktivointi.

## 7 Tulosten tarkastelu

Solukokeiden tulosten perusteella PLA2-modifioitu VLDL lisäsi makrofagien IL-1 $\beta$ :n eritystä merkittävästi. Tulos saatiin soluilla, joita ei ensin aktivoitu LPS:n avulla. Aiemmin on osoitettu, että samanaikaisesti PLA2:n ja LAL:n avulla modifioidut LDL sekä VLDL lisäävät LPS-aktivoitujen makrofagien IL-1 $\beta$ :n eritystä, mutta vain PLA2:n avulla modifioitu LDL ei samassa tutkimuksessa aiheuttanut merkittävää reaktiota, ja primaareista monosyyteistä peräisin olevat makrofagit eivät reagoineet lipoproteiineille ilman LPS-aktivaatiota (68).

Tässä tutkimuksessa LPS-aktivaatiota käytettiin aluksi solukokeissa, mutta korkean sytotoksisuuden takia päädyttiin myöhemmät solukokeet tekemään ilman LPS-aktivaatiota. Yksi mahdollisuus olisi ollut lyhentää solujen altistusaikaa modifioiduille lipoproteiineille, sillä pitkä altistus etenkin yhdessä aktivoinnin kanssa saattoi aiheuttaa liian voimakkaan tulehdusreaktion, jota solut eivät kestäneet. Inflammasomiaktivaation tiedetään indusoivan solukuolemaan johtavaa apoptoosia ja pyroptoosia (78). Tulosten perusteella vaikuttaisi, että THP-1 soluista peräisin olevissa makrofageissa PLA2-modifioitu VLDL saa aikaan merkittävän IL-1 $\beta$ :n erityksen ilman LPS-aktivointia, mutta onnistunut aktivointi olisi mahdollisesti auttanut havaitsemaan reaktioita myös muille modifikaatioille. THP-1 solujen IL-1 $\beta$ :n erityksen on aikaisemmissakin tutkimuksissa havaittu olevan riippumaton LPS-aktivoinnista, toisin kuin primaareilla monosyyteillä ja makrofageilla (66). THP-1 solujen erilaistuessa monosyyteistä makrofageiksi solut valmistautuvat reagoimaan voimakkaasti LPS-stimulaatioon, ja erilaistamisprosessi *in vitro* saattaa johtaa epätoivottuun hyperreaktiivisuuteen (79,80). Tällainen voimakas inflammaatiovaste voisi osaltaan selittää tämän tutkimuksen havaintoja siitä, että THP-1 peräiset makrofagit eivät näytä sietävän voimakasta LPS-aktivointia.

Eri solukokeissa makrofagien IL-1 $\beta$ :n erityksessä esiintyi vaihtelua, vaikka modifikaatiot ja solukokeet pyrittiin toistamaan joka kerta samalla tavalla. Jokaiseen solukokeeseen valmistettiin uudet modifikaatioliuokset, koska jääkaapissa säilytyksen aikana entsyymitoiminta ja lipoproteiinien aggregaatio saattaisi yhä jatkua, joten modifikaatioerien pitoisuuksissa on voinut olla pieniä eroja. Etenkin PLA2- ja hapetusmodifikaatiot aiheuttivat sekä voimakkaita että vaimeampia reaktioita. PLA2:n ja LAL:n osalta vaihtelua voisivat selittää lipolyysissä syntyvät vapaat rasvahapot, jotka

tarttuvat helposti eppendorf-putkien muoviseinämiin, jolloin soluille pipetoiduissa määrissä on voinut olla vaihtelua. Tämän tutkimuksen puutteena voidaan pitää sitä, että valmiiden modifikaatioliuosten lipidikoostumuksia ei analysoitu, mikä osaltaan hankaloittaa tulosten tulkintaa.

Modifikaatioissa käytetyistä lipaaseista sekä PLA2 että LAL vapauttavat VLDL:n lipolyysissä vapaita rasvahappoja, joista etenkin tyydyttyneiden rasvahappojen on havaittu olevan proinflammatorisia (81). Kuitenkin vain PLA2 aiheutti tässä tutkimuksessa inflammatorisen vasteen, joten on mahdollista, että havaittu vaste aiheutui muusta PLA2:n lipolyysin reaktiotuotteesta kuin rasvahapoista, esimerkiksi lysofosfatidyylikoliinista (LPC). LPC on fosfatidyylikoliinista vapautuva lipidi, joka osallistuu elimistössä solusignaalointiin, ja runsas LPC:n määrä hapettuneissa LDL-partikkeleissa on mahdollisesti merkittävä syy oxLDL:n aterogeenisyyteen (82). LPC:n on aiemmin osoitettu aiheuttavan monosyyteissä ja endoteelisoluissa inflammasomivälitteistä vaahtosolujen muodostumista (83) sekä indusoivan monosyyttien IL-1 $\beta$ :n eritystä (83,84). Jatkossa asiaa voisi tutkia lisäämällä VLDL:n modifikaatioliuoksiin LAL:n tai PLA2:n lisäksi albumiinia, joka sitoisi lipolyysissä vapautuvia rasvahappoja, jolloin mahdollinen LPC:n vaikutus voitaisiin erottaa rasvahappojen vaikutuksesta.

Yhteenvetona voidaan todeta, että tämän tutkimuksen perusteella PLA2-modifioitu VLDL näyttäisi aiheuttavan makrofageissa lisääntyntä IL-1 $\beta$ :n eritystä. THP-1-peräiset makrofagit reagoivat lipoproteiineihin ilman LPS-aktivointia, ja LPS-aktivointi aiheutti tutkimuksessa epätoivottua solukuolemaa. Lisätutkimusta tarvitaan PLA2:n lipolyysin reaktiotuotteista ja niiden vaikutusmekanismeista makrofagien tulehdusreaktion edistämiseksi. Ateroskleroottisten valtimoiden intimassa tiedetään esiintyvän PLA2-perheen entsyymeitä, jotka mahdollisesti edistävät ateroskleroosin patogeneesiä esimerkiksi vapauttamalla pro-inflammatorisia välittäjäaineita ja muokkaamalla LDL:a aterogeenisempään muotoon (31). Intimaan kulkeutuneihin TGRL-partikkeleihin kohdistuva PLA2:n lipolyysi ja siinä vapautuvat reaktiotuotteet saattavat edistää inflammaatiota intimassa, ja siten vaikuttaa ateroskleroottisen verisuonisairauden komplikaatioihin.

## Lähdeluettelo:

- (1) Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, ym. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J* 2017;38(32):2459-2472.
- (2) Nordestgaard BG, Varbo A. Triglycerides and Cardiovascular Disease. *Lancet* 2014;384(9943):626-635.
- (3) Ginsberg HN, Packard CJ, Chapman MJ, ym. Triglyceride-rich lipoproteins and their remnants: metabolic insights, role in atherosclerotic cardiovascular disease, and emerging therapeutic strategies-a consensus statement from the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J* 2021; ehab551.
- (4) Öörni K, Lehti S, Sjövall P, ym. Triglyceride-Rich Lipoproteins as a Source of Proinflammatory Lipids in the Arterial Wall. *Curr Med Chem* 2019;26(9):1701-1710.
- (5) Borén J, Chapman MJ, Krauss RM, ym. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J* 2020 Feb 13;:1-28.
- (6) Packard CJ, Boren J, Taskinen M. Causes and Consequences of Hypertriglyceridemia. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11:252.
- (7) Toth PP, Shah PK, Lepor NE. Targeting hypertriglyceridemia to mitigate cardiovascular risk: A review. *Am J Prev Cardiol* 2020;3:100086.
- (8) Bhatt DL, Steg PG, Miller M, ym. Cardiovascular Risk Reduction with Icosapent Ethyl for Hypertriglyceridemia. *N Engl J Med* 2019;380(1):11-22.
- (9) Langsted A, Jensen AMR, Varbo A, ym. Low High-Density Lipoprotein Cholesterol to Monitor Long-Term Average Increased Triglycerides. *J Clin Endocrinol Metab* 2020;105(4):dgz265.
- (10) Arai H. Oxidative modification of lipoproteins. *Subcell Biochem* 2014;77:103-114.
- (11) Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 7th ed. New York: W. H. Freeman and Company; 2010.
- (12) Nordestgaard BG. Triglyceride-Rich Lipoproteins and Atherosclerotic Cardiovascular Disease: New Insights From Epidemiology, Genetics, and Biology. *Circ Res* 2016;118(4):547-563.
- (13) Carmena R, Duriez P, Fruchart J. Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis. *Circulation* 2004;109(23 Suppl 1):III2-7.
- (14) Walldius G, Jungner I, Holme I, ym. High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): a prospective study. *Lancet* 2001;358(9298):2026-2033.

- (15) Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science* 1981;212(4495):628-635.
- (16) Nordestgaard BG, Zilversmit DB. Large lipoproteins are excluded from the arterial wall in diabetic cholesterol-fed rabbits. *J Lipid Res* 1988;29(11):1491-1500.
- (17) Kumpula LS, Kumpula JM, Taskinen M, ym. Reconsideration of hydrophobic lipid distributions in lipoprotein particles. *Chem Phys Lipids* 2008;155(1):57-62.
- (18) Proctor SD, Vine DF, Mamo JCL. Arterial retention of apolipoprotein B(48)- and B(100)-containing lipoproteins in atherogenesis. *Curr Opin Lipidol* 2002;13(5):461-470.
- (19) Skåln K, Gustafsson M, Rydberg EK, ym. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* 2002;417(6890):750-754.
- (20) Saito H, Dhanasekaran P, Baldwin F, ym. Lipid binding-induced conformational change in human apolipoprotein E. Evidence for two lipid-bound states on spherical particles. *J Biol Chem* 2001;276(44):40949-40954.
- (21) Pentikäinen MO, Oksjoki R, Öörni K, ym. Lipoprotein lipase in the arterial wall: linking LDL to the arterial extracellular matrix and much more. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(2):211-217.
- (22) Lehti S, Sjövall P, Käkelä R, ym. Spatial distributions of lipids in atherosclerosis of human coronary arteries studied by time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Am J Pathol* 2015;185(5):1216-1233.
- (23) Ylä-Herttua S, Lipton BA, Rosenfeld ME, ym. Macrophages and smooth muscle cells express lipoprotein lipase in human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88(22):10143-10147.
- (24) Olivier M, Tanck MW, Out R, ym. Human ATP-binding cassette G1 controls macrophage lipoprotein lipase bioavailability and promotes foam cell formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32(9):2223-2231.
- (25) Gustafsson M, Levin M, Skåln K, ym. Retention of low-density lipoprotein in atherosclerotic lesions of the mouse: evidence for a role of lipoprotein lipase. *Circ Res* 2007;101(8):777-783.
- (26) Rodriguez JL, Ghiselli GC, Torreggiani D, ym. Very low density lipoproteins in normal and cholesterol-fed rabbits: lipid and protein composition and metabolism. Part 1. Chemical composition of very low density lipoproteins in rabbits. *Atherosclerosis* 1976;23(1):73-83.
- (27) Jiang XC, Paultre F, Pearson TA, ym. Plasma sphingomyelin level as a risk factor for coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(12):2614-2618.
- (28) Öörni K, Posio P, Ala-Korpela M, ym. Sphingomyelinase induces aggregation and fusion of small very low-density lipoprotein and intermediate-density lipoprotein particles and increases their retention to human arterial proteoglycans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(8):1678-1683.

- (29) Marathe S, Choi Y, Leventhal AR, ym. Sphingomyelinase converts lipoproteins from apolipoprotein E knockout mice into potent inducers of macrophage foam cell formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(12):2607-2613.
- (30) Sato H, Taketomi Y, Murakami M. Metabolic regulation by secreted phospholipase A2. *Inflamm Regen* 2016;36:7.
- (31) Webb NR. Secretory phospholipase A2 enzymes in atherogenesis. *Curr Opin Lipidol* 2005;16(3):341-344.
- (32) Lähdesmäki K, Öörni K, Alanne-Kinnunen M, ym. Acidity and lipolysis by group V secreted phospholipase A(2) strongly increase the binding of apoB-100-containing lipoproteins to human aortic proteoglycans. *Biochim Biophys Acta* 2012;1821(2):257-267.
- (33) Naghavi M, John R, Naguib S, ym. pH Heterogeneity of human and rabbit atherosclerotic plaques; a new insight into detection of vulnerable plaque. *Atherosclerosis* 2002;164(1):27-35.
- (34) Zhang H. Lysosomal acid lipase and lipid metabolism: new mechanisms, new questions, and new therapies. *Curr Opin Lipidol* 2018;29(3):218-223.
- (35) Hakala JK, Oksjoki R, Laine P, ym. Lysosomal enzymes are released from cultured human macrophages, hydrolyze LDL in vitro, and are present extracellularly in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(8):1430-1436.
- (36) Zhong S, Li L, Shen X, ym. An update on lipid oxidation and inflammation in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* 2019;144:266-278.
- (37) Guha M, Gursky O. Effects of oxidation on structural stability and remodeling of human very low density lipoprotein. *Biochemistry* 2010;49(44):9584-9593.
- (38) Keidar S, Kaplan M, Rosenblat M, ym. Apolipoprotein E and lipoprotein lipase reduce macrophage degradation of oxidized very-low-density lipoprotein (VLDL), but increase cellular degradation of native VLDL. *Metabolism* 1992;41(11):1185-1192.
- (39) Davies KJ. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 2000;50(4-5):279-289.
- (40) Loscalzo J. Oxidant stress: a key determinant of atherothrombosis. *Biochemical Society Transactions* 2003;31(5):1059-1061.
- (41) Schmidt K, Noureen A, Kronenberg F, ym. Structure, function, and genetics of lipoprotein (a). *J Lipid Res* 2016;57(8):1339-1359.
- (42) Roche PA, Furuta K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol* 2015;15(4):203-216.
- (43) Bonnardel J, Guilliams M. Developmental control of macrophage function. *Curr Opin Immunol* 2018;50:64-74.

- (44) Tamoutounour S, Guilliams M, Montanana Sanchis F, ym. Origins and Functional Specialization of Macrophages and of Conventional and Monocyte-Derived Dendritic Cells in Mouse Skin. *Immunity* 2013;39(5):925-938.
- (45) Hashimoto D, Chow A, Noizat C, ym. Tissue-Resident Macrophages Self-Maintain Locally throughout Adult Life with Minimal Contribution from Circulating Monocytes. *Immunity* 2013;38(4):792-804.
- (46) Guilliams M, Mildner A, Yona S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity* 2018;49(4):595-613.
- (47) Ushach I, Zlotnik A. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *J Leukoc Biol* 2016;100(3):481-489.
- (48) Medbury HJ, Williams H, Fletcher JP. Clinical significance of macrophage phenotypes in cardiovascular disease. *Clin Transl Med* 2014;3:42.
- (49) Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 2010;32(5):593-604.
- (50) Xue J, Schmidt SV, Sander J, ym. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* 2014;40(2):274-288.
- (51) Lendon CL, Davies MJ, Born GV, ym. Atherosclerotic plaque caps are locally weakened when macrophages density is increased. *Atherosclerosis* 1991;87(1):87-90.
- (52) Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, ym. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol* 2018;233(9):6425-6440.
- (53) Rosales C, Uribe-Querol E. Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *Biomed Res Int* 2017;2017:9042851.
- (54) Kinchen JM, Ravichandran KS. Phagosome maturation: going through the acid test. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9(10):781-795.
- (55) Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 2011;30(1):16-34.
- (56) Poon IKH, Lucas CD, Rossi AG, ym. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat Rev Immunol* 2014;14(3):166-180.
- (57) Yu X, Fu Y, Zhang D, ym. Foam cells in atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2013;424:245-252.
- (58) Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, ym. Lipoproteins of special significance in atherosclerosis. Insights provided by studies of type III hyperlipoproteinemia. *Ann N Y Acad Sci* 1985;454:209-221.
- (59) Pryma CS, Ortega C, Dubland JA, ym. Pathways of smooth muscle foam cell formation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2019;30(2):117-124.



- (60) Libby P. Interleukin-1 Beta as a Target for Atherosclerosis Therapy: Biological Basis of CANTOS and Beyond. *J Am Coll Cardiol* 2017;70(18):2278-2289.
- (61) Ridker PM, Everett BM, Thuren T, ym. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med* 2017;377(12):1119-1131.
- (62) Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, ym. Expression of interleukin-18 in human atherosclerotic plaques and relation to plaque instability. *Circulation* 2001;104(14):1598-1603.
- (63) Grebe A, Hoss F, Latz E. NLRP3 Inflammasome and the IL-1 Pathway in Atherosclerosis. *Circ Res* 2018;122(12):1722-1740.
- (64) Junttila I, Meri S, Rämetsä M. Inflammasomi - tulehdusreaktion keskeinen säätelijä. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 2013;129(7):705-11.
- (65) Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, ym. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* 2009;183(2):787-791.
- (66) Rajamäki K, Lappalainen J, Öörni K, ym. Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS One* 2010;5(7):e11765.
- (67) Duewell P, Kono H, Rayner KJ, ym. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 2010;464(7293):1357-1361.
- (68) Lehti S, Nguyen SD, Belevich I, ym. Extracellular Lipids Accumulate in Human Carotid Arteries as Distinct Three-Dimensional Structures and Have Proinflammatory Properties. *Am J Pathol* 2018;188(2):525-538.
- (69) Langsted A, Freiberg JJ, Tybjaerg-Hansen A, ym. Nonfasting cholesterol and triglycerides and association with risk of myocardial infarction and total mortality: the Copenhagen City Heart Study with 31 years of follow-up. *J Intern Med* 2011;270(1):65-75.
- (70) Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, ym. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA* 2007;298(3):299-308.
- (71) Ginsberg HN, MacCallum PR. The obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus pandemic: Part I. Increased cardiovascular disease risk and the importance of atherogenic dyslipidemia in persons with the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *J Cardiometab Syndr* 2009;4(2):113-119.
- (72) Mustajoki P. Metabolinen oireyhtymä (MBO). 2019; Available at: [https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk00045](https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00045). Accessed 8.1.2021, 2021.
- (73) Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, ym. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2001;24(4):683-689.

- (74) Björnson E, Packard CJ, Adiels M, ym. Apolipoprotein B48 metabolism in chylomicrons and very low-density lipoproteins and its role in triglyceride transport in normo- and hypertriglyceridemic human subjects. *J Intern Med* 2020;288(4):422-438.
- (75) Hansen SEJ, Madsen CM, Varbo A, ym. Low-Grade Inflammation in the Association between Mild-to-Moderate Hypertriglyceridemia and Risk of Acute Pancreatitis: A Study of More Than 115000 Individuals from the General Population. *Clin Chem* 2019;65(2):321-332.
- (76) Varbo A, Benn M, Tybjærg-Hansen A, ym. Elevated remnant cholesterol causes both low-grade inflammation and ischemic heart disease, whereas elevated low-density lipoprotein cholesterol causes ischemic heart disease without inflammation. *Circulation* 2013;128(12):1298-1309.
- (77) Kankkunen P, Teirilä L, Rintahaka J, ym. (1,3)-beta-glucans activate both dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages. *J Immunol* 2010;184(11):6335-6342.
- (78) Sagulenko V, Thygesen SJ, Sester DP, ym. AIM2 and NLRP3 inflammasomes activate both apoptotic and pyroptotic death pathways via ASC. *Cell Death Differ* 2013;20(9):1149-1160.
- (79) Takashiba S, Van Dyke TE, Amar S, ym. Differentiation of monocytes to macrophages primes cells for lipopolysaccharide stimulation via accumulation of cytoplasmic nuclear factor kappaB. *Infect Immun* 1999;67(11):5573-5578.
- (80) Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology* 2014;23(1):37-45.
- (81) Schwartz EA, Reaven PD. Lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins, vascular inflammation, and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2012;1821(5):858-866.
- (82) Schmitz G, Ruebsaamen K. Metabolism and atherogenic disease association of lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis* 2010;208(1):10-18.
- (83) Corrêa R, Silva LFF, Ribeiro DJS, ym. Lysophosphatidylcholine Induces NLRP3 Inflammasome-Mediated Foam Cell Formation and Pyroptosis in Human Monocytes and Endothelial Cells. *Front Immunol* 2019;10:2927.
- (84) Liu-Wu Y, Hurt-Camejo E, Wiklund O. Lysophosphatidylcholine induces the production of IL-1beta by human monocytes. *Atherosclerosis* 1998;137(2):351-357.