

Моноциты как основная популяция клеток периферической крови, экспрессирующих С-реактивный белок

О.А. ГУСЕВА¹, И.С. МЕЛЬНИКОВ^{1,2}, Е.С. ЗУБКОВА¹, С.Г. КОЗЛОВ¹, Ю.Н. АВТАЕВА¹, З.А. ГАББАСОВ¹

¹ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, 3-я Черепковская ул., 15а, Москва, 121552, Российская Федерация,

²ИМБП РАН, Хорошевское шоссе, 76а, Москва, 123007, Российская Федерация

Резюме

Данные крупных проспективных исследований демонстрируют корреляционную связь уровня С-реактивного белка (СРБ) в крови и риска развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий. Однако остаются малоизученными уровень экспрессии СРБ клетками периферической крови и их способность синтезировать СРБ.

Цель исследования. Определение уровней экспрессии СРБ циркулирующими клетками периферической крови. Исследование экспрессии мРНК СРБ макрофагами, полученными из моноцитов периферической крови.

Материал и методы. Исследовали эритроциты, тромбоциты и лейкоциты периферической крови 6 добровольцев в возрасте от 30 до 60 лет. Для идентификации фенотипа клеток крови применяли метод проточной цитофлуориметрии с использованием панели моноклональных антител, конъюгированных с различными флуорохромами, а именно CD235a-PE-Cy7, CD41-APC, CD45-PerCP-Cy5.5 и CD14-APC-Cy-7. Уровень экспрессии клетками крови СРБ определяли по уровню флуоресценции связанных с целевыми клетками FITC-конъюгированных моноклональных антител к СРБ («ИМТЕК», Россия). Для определения мРНК СРБ применяли метод количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим анализом специфичности амплификаций с помощью электрофореза в агарозном геле. Об экспрессии СРБ макрофагами, полученными из моноцитов периферической крови, судили по количеству мРНК, выделенной после их активации липополисахаридом (ЛПС).

Результаты. Результаты исследования показали, что СРБ экспрессируют 85,0±10,5% моноцитов; лимфоциты, тромбоциты и эритроциты — 7,5±0,6, 3,0±0,3 и 4,3±0,5% соответственно. Методом количественной ПЦР в небольших количествах мРНК СРБ была зарегистрирована в макрофагах, активированных ЛПС. Ее уровень незначителен, в 0,79±0,73 раза (p=0,96, n=6), отличался относительно гена «домашнего хозяйства».

Заключение. Обнаружено, что СРБ присутствует на внешней клеточной мембране до 90% циркулирующих моноцитов и до 10% лимфоцитов, в то время как эритроциты и тромбоциты не несут на своей поверхности СРБ. Установлена возможность синтеза СРБ стимулированными ЛПС макрофагами, полученными из моноцитов периферической крови.

Ключевые слова: С-реактивный белок, внепеченочный синтез С-реактивного белка, моноциты, макрофаги.

Monocytes as a major population of peripheral blood cells expressing C-reactive protein

O.A. GUSEVA¹, I.S. MELNIKOV^{1,2}, E.S. ZUBKOVA¹, S.G. KOZLOV¹, YU.N. AVTAEVA¹, Z.A. GABBASOV¹

¹National Medical Research Centre of Cardiology of the Ministry of Health of the Russian Federation, 3rd Cherepkovskaya str., 15a, Moscow, 121552 Russian Federation,

²Institute of biomedical problems of Russian Academy of Sciences, Khoroshevskoe shosse, 76a, Moscow, 123007, Russian Federation

Summary

Data from major prospective studies demonstrate a correlation between blood C-reactive protein (CRP) levels and the risk of adverse cardiovascular events. However, the level of expression of CRP by peripheral blood cells and their ability to synthesize CRP remains poorly studied.

The purpose of the study. Determination of CRP expression levels by circulating peripheral blood cells. Investigation of expression of CRP mRNA by macrophages obtained from peripheral blood monocytes.

Material and methods. erythrocytes, platelets and leukocytes of peripheral blood were studied in 6 volunteers aged 30 to 60 years.

To identify the blood cell phenotype, the method of flow cytometry was used using a panel of monoclonal antibodies conjugated with different fluorophores, namely, CD235a-PE-Cy7, CD41-APC, CD45-PerCP-Cy5.5 and CD14-APC-Cy-7. Blood cell expression level of CRP was determined by fluorescence level of FITC-conjugated monoclonal antibodies to CRP associated with target cells (IMTEK, Russia). The method of quantitative polymerase chain reaction (PCR) with the subsequent analysis of specificity of amplifications by electrophoresis in agarose gel was used for determination of mRNA of CRP. The expression of DRR by macrophages derived from peripheral blood monocytes was judged by the amount of mRNA isolated after their activation by lipopolysaccharide (LPS).

The results. The results of the study showed that CRP express 85.0±10.5% monocytes, lymphocytes, platelets and red blood cells — 7.5±0.6, 3.0±0.3 and 4.3±0.5% respectively. The method of quantitative PCR in small amounts of CRP mRNA was registered in macrophages activated by LPS. Its level was insignificant, by 0.79±0.73 times (p=0.96, n=6), differed from the "household" gene.

Conclusion. It was found that CRP is present on the outer cell membrane up to 90% of circulating monocytes and up to 10% of lymphocytes, while red blood cells and platelets do not carry CRP on their surface. The possibility of synthesis of CRP by stimulated LPS macrophages obtained from peripheral blood monocytes has been established.

Key words: C-reactive protein, extrahepatic synthesis of C-reactive protein, monocytes, macrophages.

Сведения об авторах:

Гусева Ольга Андриановна, Guseva Olga Andrianovna, e-mail: guso@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0003-0353-8482>, научный сотрудник.

Мельников Иван Сергеевич, Melnikov Ivan Sergeevich, e-mail: ivsgm@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-5241-3091>, младший научный сотрудник.

Зубкова Екатерина Сергеевна, Zubkova Ekaterina Sergeevna, e-mail: ver-mishel@mail.ru, младший научный сотрудник.

Козлов Сергей Геннадьевич, Kozlov Sergey Gennadievich, e-mail: bestofall@inbox.ru, <http://orcid.org/0000-0001-8800-1670>, старший научный сотрудник.

Автаева Юлия Николаевна, Avtaeva Julia Nikolaevna, e-mail: julia94fs@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-3701-9747>, младший научный сотрудник.

Габбасов Зуфар Ахнафович, Gabbasov Zufar Akhnafovich, e-mail: zulfargabbasov@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0003-3878-2573>, главный научный сотрудник.

В настоящее время принято считать, что хроническое воспаление играет значимую роль в инициации и развитии атеросклеротического процесса. Данные крупных проспективных исследований демонстрируют корреляционную связь уровня С-реактивного белка (СРБ) в крови и риска развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий, в том числе инфаркта миокарда, ишемического инсульта, внезапной сердечной смерти. Анализ исследования PROVE-IT TIMI 22 показал взаимосвязь снижения концентрации СРБ в плазме крови и риска повторных коронарных событий у пациентов с острым коронарным синдромом [1]. В исследовании REVERSAL показано, что снижение концентраций СРБ на фоне интенсивной терапии статинами у пациентов с ишемической болезнью сердца коррелирует с замедлением прогрессирования атеросклеротического поражения коронарных артерий [2]. Таким образом, нативный СРБ находит все большее применение как значимый биомаркер риска развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий при атеросклерозе, сопоставимый по эффективности с холестерином и его фракциями. На основании полученных данных Центром контроля и профилактики заболеваний Американской ассоциации сердца СРБ был отнесен к независимым биомаркерам сердечно-сосудистого риска [3].

Однако уровень экспрессии СРБ клетками периферической крови и их способность синтезировать СРБ остаются малоизученными. Целью исследования было определение уровней экспрессии СРБ циркулирующими клетками периферической крови и исследование экспрессии мРНК СРБ макрофагами, полученными из моноцитов периферической крови.

Материал и методы

Образцы крови. Исследовали эритроциты, тромбоциты и лейкоциты периферической крови добровольцев в возрасте от 30 до 60 лет. Для изучения фенотипа циркулирующих клеточных элементов кровь

отбирали из локтевой вены в пробирки с цитратом натрия. Определение уровней экспрессии форм СРБ и анализ фенотипа циркулирующих клеток крови проводили в образцах крови с помощью проточного цитофлуориметра FACSCanto™ II (Becton Dickinson, США). Для идентификации различных популяций клеточных микровезикул применяли следующие панели моноклональных антител, конъюгированных с различными флуорохромами: CD235a-PE-Cy7 для выявления эритроцитов; CD41-APC для выявления тромбоцитов, CD45-PerCP-Cy5.5 для выявления лейкоцитов и CD14-APC-Cy-7 для выявления моноцитов (Becton Dickinson, США). Уровень экспрессии клетками крови СРБ определяли по уровню флуоресценции связанных с целевыми клетками моноклональных антител к СРБ (МОН CRP клон 372, «ИМТЕК», Россия). В качестве контроля использовали неиммуногенные иммуноглобулины мыши (IgG1), конъюгированные с аналогичными флуорохромами (IgG1-FITC и IgG1-PE). В каждой пробе анализировали не менее 10 000 событий. Обработку данных проводили при помощи программного пакета FACSDiva™ (Becton Dickinson, США).

Исследование соответствует стандартам надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципам Хельсинкской декларации. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом. Все добровольцы были ознакомлены с целями и основными положениями исследования, дали информированное согласие на участие в исследовании.

Полимеразная цепная реакция. Для выявления потенциальной способности макрофагов к самостоятельному синтезу СРБ определяли уровень мРНК, выделенной из липополисахаридов (ЛПС) — стимулированных макрофагов, полученных из моноцитов периферической крови, и клеток линии гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Реакцию проводили с использованием интеркалирующего красителя SYBR™ Green (Thermo Fischer,

Таблица 1. Праймеры для количественной ПЦР.

Ген	Сенс-праймер	Антисенс-праймер	Ампликон (пар нуклеотидов)	Матрица
ActB	5'-CCTGGCAGCCAGCACAAT-3'	5'-GGGCCGGACTCGTCATAC-3'	144	1149-292
СРБ-1	5'- TCAAAGCCTTCACTGTGTGC-3'	5'- TACCCAGAACTCCACGATCC-3'	245	247-491
СРБ-2	5'- GTCTTGACCAGCCTCTCTCA-3	5'- GTCGAGGACAGTCCCGTGA-3'	167	129-295

Примечание. ActB — бета-актин.

США) в усилителе системы ПЦР в реальном времени Step One Plus™ (Applied Biosystems, США). В качестве праймеров были применены уникальные пары комплементарных олигонуклеотидов, комплементарных анализируемой мРНК / кДНК (таблица 1). Реакционная смесь (25 мкл) содержала 5–8 нг кДНК и 10 пмоль праймера в соответствии со стандартным протоколом («Синтол», Россия). Контрольная смесь содержала все компоненты, за исключением матрицы, замененной деионизированной водой. После начальной стадии денатурации было выполнено 40 циклов амплификации для всех пар праймеров с отжигом и удлинением при 60 °С в течение 60 секунд. Специфичность амплификации анализировали путем плавления продуктов после завершения ПЦР, а также с помощью электрофореза ампликонов в 1,5%-ном агарозном геле, забуференным трис-ацетат-ЭДТА (ТАЕ) (Thermo Fischer, США).

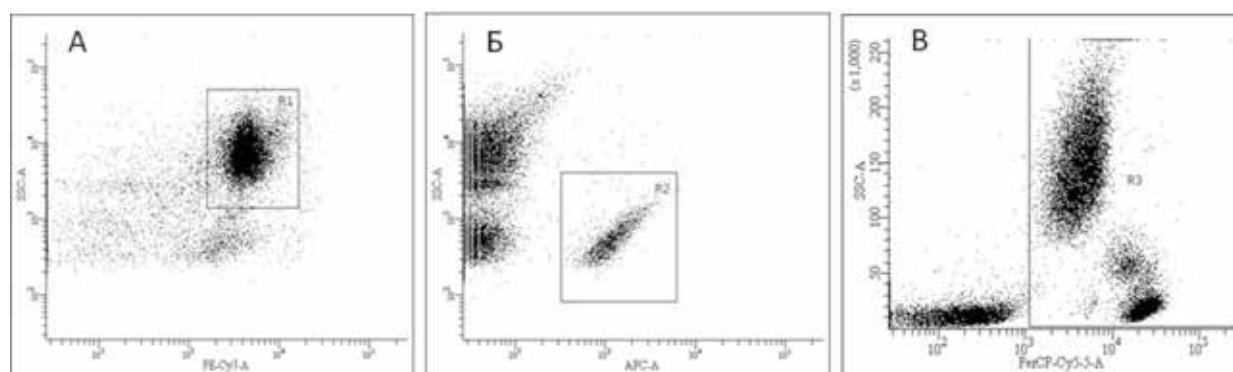
Для выделения РНК из клеток линии HepG2 применяли метод культивирования в среде Игла — DMEM (Thermo Fischer, США), модифицированной по Дульбекко с содержанием глюкозы 1 г/л, 10% FBS (Thermo Fischer, США) и 100 мкМ раствора аминокислот MEM (Thermo Fischer, США). Через 2 пассажа клетки стимулировали добавлением в культуральную среду 20 нг/мл рекомбинантного IL-6 (SCI-Store, Россия). Через 18 часов клетки промывали фосфатно-солевым буферным раствором («Диа-М», Россия) и лизировали для последующего выделения РНК.

Для выделения РНК из активированных макрофагов использовали культуру клеток, приготовленную следующим образом. Мононуклеарные клетки выделяли из цельной крови центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографин DIACOLL («Диа-М», Россия), плотность — 1,077 г/мл. Выделенные клетки высеивали в лунки 24-луночного планшета в концентрации 2x10⁶/мл в среде 1640 Roswell Park Memorial Institute — RPMI (Thermo Fischer, США), с добавлением 10%-ной фетальной бычьей сыворотки FBS (Thermo Fischer, США), 2 мМ L-глутамин (Thermo Fischer, США), 50 ед./мл пенициллина и стрептомицина (Thermo Fischer, США). Через 1 час неприкрепленные клетки удаляли, а прикрепленные клетки культивировали в той же среде с добавлением 10 нг/мл GM-CSF (Mytenyi Biotech, Германия) при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Через двое суток часть использованной среды заменяли свежей средой с добавлением GM-CSF. Через трое суток среду заменяли на X — VIVO-15 (Lonza, Швейцария) с добавлением 1 мМ пирувата натрия, 2 мМ L — глутамин (Thermo Fischer, США) и раствора минимальных незаменимых сред — MEM (Thermo Fischer, США), в соотношении 1:100. Через 48 часов добавляли ЛПС в концентрации 100 нг/мл (Sigma-Aldrich, США) и продолжали культивирование в течение 24 часов.

Выделенные РНК в количестве 3 мкг использовали для синтеза кодирующей ДНК (кДНК) с олиго(dT)праймером с помощью коммерческого набора

Рисунок 1. Определение областей гейтирования на диаграммах зависимости интенсивности бокового рассеяния света (SSC-A) от интенсивности флуоресценции различных антител к специфическим маркерам для выявления различных типов клеток крови.

а — антитела к CD235a-PE-Cy7, гейт R1-эритроциты; б — антитела к CD41-APC, гейт R2-тромбоциты; в — антитела к CD45-PerCP-Cy5.5, гейт R3-лейкоциты.



Maxima™ First Strand (Thermo Fischer, США). Реакцию проводили в соответствии с протоколом производителя.

Статистический анализ. Значения нормального распределения были выражены как среднее $\pm$ стандартное отклонение (Mean $\pm$ SD). Для проверки гипотез, связанных с видом распределения, был применен критерий Шапиро — Уилка W. Сравнение групп данных проводили непараметрическим критерием U-критерием Манна — Уитни для сравнения двух групп и критерием Краскела — Уоллиса ANOVA для сравнения трех групп данных и более. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Статистический анализ выполнен с помощью программного пакета SPSS Statistics™ версии 23.0 (SPSS Inc., USA).

Результаты

Экспрессия СРБ на поверхности эритроцитов, тромбоцитов и клеток лейкоцитарного ряда. Провели исследование уровней связывания антител к СРБ циркулирующими эритроцитами, тромбоцитами и лейкоцитами. Для определения фенотипа циркулирующих клеток крови использовали антитела к CD235a для выявления эритроцитов, антитела к CD41 для выявления тромбоцитов и антитела к CD45 для выявления клеток лейкоцитарного происхождения. Для этого на диаграммах зависимости интенсивности бокового рассеяния света (SSC-A) от интенсивности флуоресценции различных антител к специфическим маркерам выделяли области (гейты), которые характеризуют различные типы клеток крови, а именно: для выявления эритроцитов выделяли клетки из гейта R1, которые были положительны по связыванию антител к CD235a-PE-Cy7 (рисунок 1а); для выявления тромбоцитов выделяли клетки из гейта R2, которые были положительны по связыванию антител к CD41-APC (рисунок 1б); для выявления клеток лейкоцитарного ряда выделяли клетки из гейта R3, которые были положительны по связыванию антител к CD45-PerCP-Cy5.5 (рисунок 1в).

Для регистрации СРБ на поверхности клеток крови использовали конъюгат антител к СРБ с FITC. В качестве негативного контроля использовали неиммуногенный иммуноглобулин (IgG1-FITC) мыши, конъюгированный тем же флуорохромом. На рисунке 2б приведена типичная картина связывания антител к СРБ-FITC популяцией CD45-положительных лейкоцитов в сравнении с неиммуногенными иммуноглобулинами IgG1-FITC (рисунок 2а). Измерение уровня экспрессии СРБ разными популяциями клеток крови показало, что только небольшая часть эритроцитов экспрессирует на своей поверхности СРБ. Около $4,3 \pm 0,5\%$ от общего количества CD235a-положительных эритроцитов оказываются СРБ-положительными. Только $3,0 \pm 0,3\%$ от CD41-положительных тромбоцитов экспрессируют на своей поверхности СРБ, тогда как СРБ в значительных количествах, на поверхности

Таблица 2. Количество клеток, несущих на своей поверхности СРБ.

	Клетки крови	СРБ-положительные клетки, %
1	CD235a-положительные эритроциты	$4,3 \pm 0,5$
2	CD41-положительные тромбоциты	$3,0 \pm 0,3$
3	CD45-положительные лейкоциты	$20,2 \pm 1,8$

Примечание. Указано содержание клеток в целевой популяции, %.

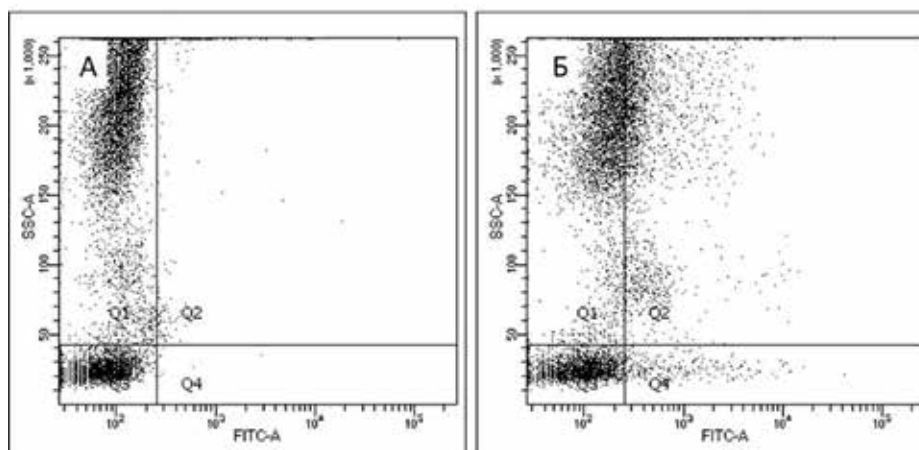
$20,2 \pm 1,8\%$ клеток от общей популяции, обнаруживается на CD45-положительных клетках лейкоцитарного ряда (таблица 2).

Экспрессия СРБ на поверхности моноцитов. На следующем этапе работ мы более подробно исследовали моноцитарную популяцию CD45-положительных лейкоцитов, которые были помечены антителами к CD14. Применяв гейтирование по двум флуорохромам, CD45-PerCP-Cy5.5 и CD14-APC-Cy-7, мы выделили зону клеток с фенотипом CD45+/CD14+ (гейт R3, рисунок 3). После обработки лейкоцитов антителами к СРБ-FITC и IgG1-FITC стало понятным, что $85,0 \pm 10,5\%$ клеток моноцитарного ряда связывают на своей мембране СРБ (рисунок 4б, квадрант Q4). В то же время данные клетки не обнаруживали неспецифического связывания с IgG1 ($0,1\%$; рисунок 4а, квадрант Q4).

Экспрессия мРНК СРБ в макрофагах. Для выявления потенциальной способности активированных макрофагов к самостоятельному синтезу СРБ мы определяли уровень мРНК, выделенной из ЛПС-стимулированных макрофагов, полученных из моноцитов периферической крови, методом количественной ПЦР. В качестве положительного контроля использовали мРНК СРБ гепатоцитов (линия HepG2), как интактных, так и стимулированных IL-6. Результаты исследования отражены на рисунке 5 (данные электрофореза в агарозном геле).

Было обнаружено, что экспрессия мРНК СРБ в ЛПС-стимулированных макрофагах отличалась от экспрессии мРНК конститутивного гена в $0,79 \pm 0,73$ раза, в HepG2 — в $1,0 \pm 0,6$ раза, а в HepG2, стимулированных IL-6, — в $4,9 \pm 1,52$ раза ($p < 0,05$, критерий Крускала — Уоллиса ANOVA). Кроме того, экспрессия СРБ была подтверждена электрофорезом ампликонов в 1,5%-ном агарозном геле. Размеры продуктов ПЦР, которые соответствовали СРБ, составляли 167 и 245 пар нуклеотидов. Продукт ПЦР конститутивного гена, ActB, составил 144 пары нуклеотидов. Оба транскрипта мРНК СРБ (245 пар нуклеотидов и 167 пар нуклеотидов) были обнаружены в низких концентрациях в полученных из моноцитов крови макрофагах. Транскрипты мРНК СРБ в HepG2 и HepG2, стимулированных IL6, были взяты в качестве положительного контроля. Таким образом выяснено, что стимулированные ЛПС-макрофаги, полученные из моноцитов, экспрессируют низкие уровни транскриптов СРБ.

Рисунок 2. Связывание неиммуногенных иммуноглобулинов IgG1-FITC (а) и антител к СРБ-FITC (б) с CD45-положительными лейкоцитами.



Эти эксперименты показывают, что ЛПС-стимулированные макрофаги экспрессируют невысокие уровни транскриптов СРБ.

Обсуждение

Согласно устоявшейся концепции, СРБ синтезируется гепатоцитами и секретируется в кровоток, в котором циркулирует в свободном состоянии. Тем не менее к настоящему времени накоплены данные о том, что СРБ (в особенности его мономерная форма) может связываться в кровотоке с клеточными элементами крови. Так, J. Habersberger и соавт. выявили мономерный СРБ на циркулирующих в крови микрочастицах у пациентов с острым инфарктом миокарда [4]. СРБ также выявляли на циркулирующих эндотелиальных

микрочастицах [5]. В ряде исследований показано, что СРБ может связываться с мембранами тромбоцитов [6–8].

Целью нашего исследования было выявление СРБ на поверхности циркулирующих клеток крови: эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов. Мы использовали панель конъюгированных с цитофлюорохромами антител, позволяющую одновременно определять исследуемые клетки крови и выявлять наличие на их поверхности СРБ. Было показано, что из циркулирующих клеток крови преимущественно моноциты несут на своей поверхности СРБ. Наличие СРБ на моноцитах может быть объяснено связыванием свободно циркулирующего СРБ с моноцитарными мембранами. Известно, что связывание СРБ с отрицательно заряженными фосфолипидами на мембранах активированных клеток является необходимым условием для диссоциации СРБ [6]. Также описано сродство СРБ с присутствующими на неактивированных клетках липидными рафтами — особыми участками плазматической мембраны, обогащенными фосфолипидами и холестерином. Сложная структурная композиция липидных рафтов, включающая в себя не только основной лиганд СРБ (фосфатидилхолин), но также холестерин и иные фосфолипиды, может создавать условия, необходимые для связывания СРБ с клеточной мембраной [9].

Другим объяснением наличия СРБ на моноцитах может быть внепеченочный синтез СРБ. Q. Dong и соавт. выявили экспрессию СРБ альвеолярными макрофагами [10]. Была описана экспрессия СРБ циркулирующими моноцитами [11], а также линией макрофагов U937 [12].

Методом количественной ПЦР мы исследовали экспрессию мРНК СРБ макрофагами, дифференцированными из циркулирующих в крови моноцитов и стимулированных ЛПС, и сравнили с экспрессией мРНК СРБ в нестимулированных и стимулированных IL-6 гепатоцитах. По полученным данным,

Рисунок 3. Идентификация субпопуляции моноцитов.

Связывание антител CD14-APC-Cy-7 с CD45-положительными лейкоцитами; гейт R3 — CD45+/CD14-положительные моноциты.

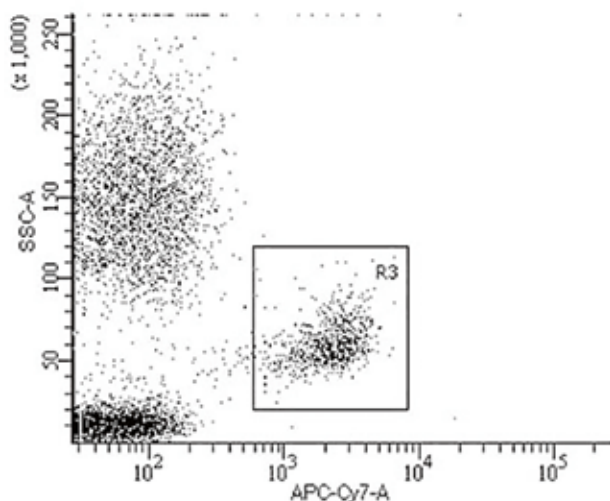
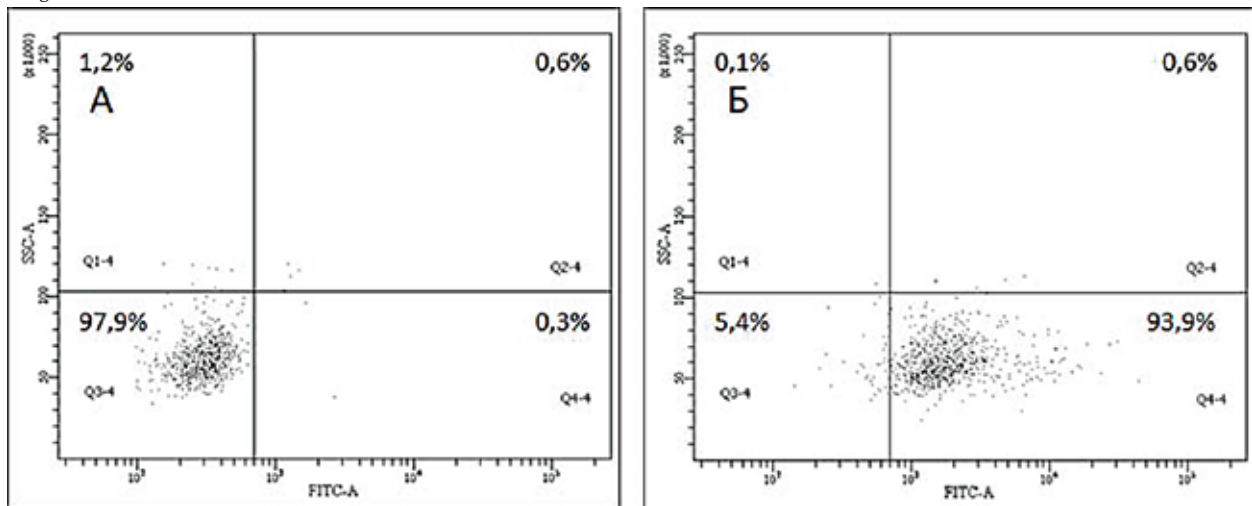


Рисунок 4. Связывание СРБ с CD45+/CD14+ моноцитами периферической крови.

а — IgG1-FITC; б — антитела к СРБ-FITC



уровень экспрессии мРНК СРБ в стимулированных макрофагах, полученных из моноцитов периферической крови, незначительно отличался от нестимулированных гепатоцитов. Это может говорить о том, что активированные ЛПС макрофаги способны синтезировать СРБ.

Закключение

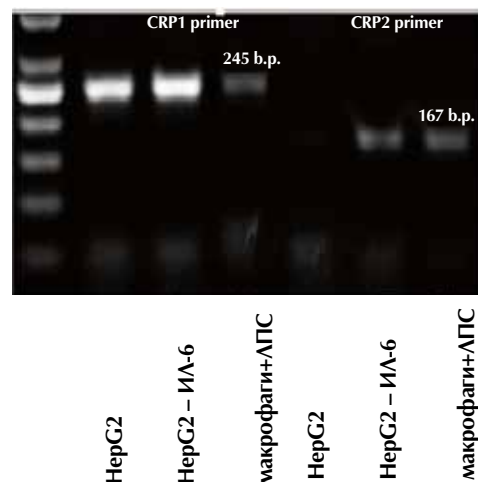
Обнаружено, что СРБ присутствует на внешней клеточной мембране до 90% циркулирующих моноцитов и до 10% лимфоцитов, в то время как эритроциты и тромбоциты не несут на своей поверхности СРБ. Установлена возможность синтеза СРБ стимулированными ЛПС макрофагами, полученными из моноцитов периферической крови.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ridker P.M., Cannon C.P., Morrow D., Rifai N., Rose L.M., McCabe C.H. et al. C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N. Engl. J. Med.* 2005; 352: 20–28. doi: 10.1056/NEJMoa042378.
2. Nissen S.E., Tuzcu E.M., Schoenhagen P., Crowe T., Sasiela W.J., Tsai J. et al. Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 2005; 352: 29–38. doi: 10.1056/NEJMoa042000.
3. Pearson T.A., Mensah G.A., Alexander R.W., Anderson J.L., Cannon R.O. 3rd, Criqui M. et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation.* 2003; 107: 499–511. doi: 10.1161/01.cir.0000052939.59093.45.
4. Habersberger J., Strang F., Scheichl A., Htun N., Bassler N., Merivirta R.M. et al. Circulating microparticles generate and transport monomeric C-reactive protein in patients with myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 2012 Oct 1; 96 (1): 64–72. doi: 10.1093/cvr/cvs237.
5. Crawford J.R., Trial J., Nambi V., Hoogeveen R.C., Taffet G.E., Entman M.L. Plasma Levels of Endothelial Microparticles Bearing Monomeric C-reactive Protein are Increased in Peripheral Artery Disease. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 2016 Jun; 9 (3): 184–93. doi: 10.1007/s12265-016-9678-0.
6. Eisenhardt S.U., Habersberger J., Murphy A., Chen Y.C., Woollard K.J., Bassler N. et al. Dissociation of pentameric to monomeric C-reactive protein

Рисунок 5. Электрофореграмма ампликонов ПЦР различных клеток: нестимулированных наивных гепатоцитов (HepG2), стимулированных IL-6 гепатоцитов (HepG2-IL-6) и макрофагов, стимулированных ЛПС.



- on activated platelets localizes inflammation to atherosclerotic plaques. *Circ. Res.* 2009 Jul 17; 105 (2): 128–37. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.190611.
7. Molins B., Peña E., de la Torre R., Badimon L. Monomeric C-reactive protein is prothrombotic and dissociates from circulating pentameric C-reactive protein on adhered activated platelets under flow. *Cardiovasc. Res.* 2011 Nov 1; 92 (2): 328–37. doi: 10.1093/cvr/cvr226.
8. Eisenhardt S.U., Habersberger J., Peter K. Monomeric C-reactive protein generation on activated platelets: the missing link between inflammation and atherothrombotic risk. *Trends Cardiovasc Med.* 2009 Oct; 19 (7): 232–7. doi: 10.1016/j.tcm.2010.02.002.
9. Ji S.R., Wu Y., Zhu L., Potempa L.A., Sheng F.L., Lu W. et al. Cell membranes and liposomes dissociate C-reactive protein (CRP) to form a new, biologically active structural intermediate: mCRP(m). *FASEB J.* 2007 Jan; 21 (1): 284–94.
10. Dong Q., Wright J.R. Expression of C-reactive protein by alveolar macrophages. *J. Immunol.* 1996 Jun 15; 156 (12): 4815–20.
11. Kolb-Bachofen V., Puchta-Teudt N., Egenhofer C. Expression of membrane-associated C-reactive protein by human monocytes: indications for a selectin-like activity participating in adhesion. *Glycoconj. J.* 1995 Apr; 12 (2): 122–7.
12. Ciubotaru I., Potempa L.A., Wander R.C. Production of modified C-reactive protein in U937-derived macrophages. *Exp. Biol. Med. (Maywood).* 2005 Nov; 230 (10): 762–70.