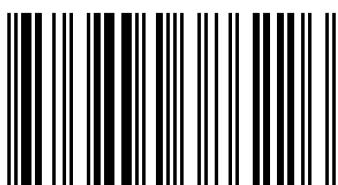


Были изучены причины атерогенности циркулирующих в крови больных модифицированных липопротеидов низкой плотности (цмЛНП). Показано, что цмЛНП склонны к образованию ассоциатов. Установлено, что между степенью ассоциации цмЛНП и их атерогенным потенциалом существует прямая зависимость. Изучены процессы захвата и деградации агрегатов цмЛНП клетками интимы. Установлено, что ассоциаты цмЛНП захватываются клетками путем неспецифического фагоцитоза. Использование панели моноклональных антител к апо-B-100 позволило обнаружить локальные изменения в белковой части цмЛНП по сравнению с нативными ЛНП, которые могут явиться причиной снижения их устойчивости к ассоциации. Исследованы особенности расположения антигенных детерминант апоB-100 в цмЛНП и ЛНП, модифицированных *in vitro* протеолитическими, липолитическими, окислительными, десалирующими ферментами, а также альдегидами эндогенного происхождения. Показано, что модификация ЛНП перечисленными выше агентами вызывает ассоциацию ЛНП. Выявлено ингибирующее действие плюроников на ассоциацию ЛНП; изучено влияние структуры и свойств плюроников на способность подавлять ассоциацию ЛНП.



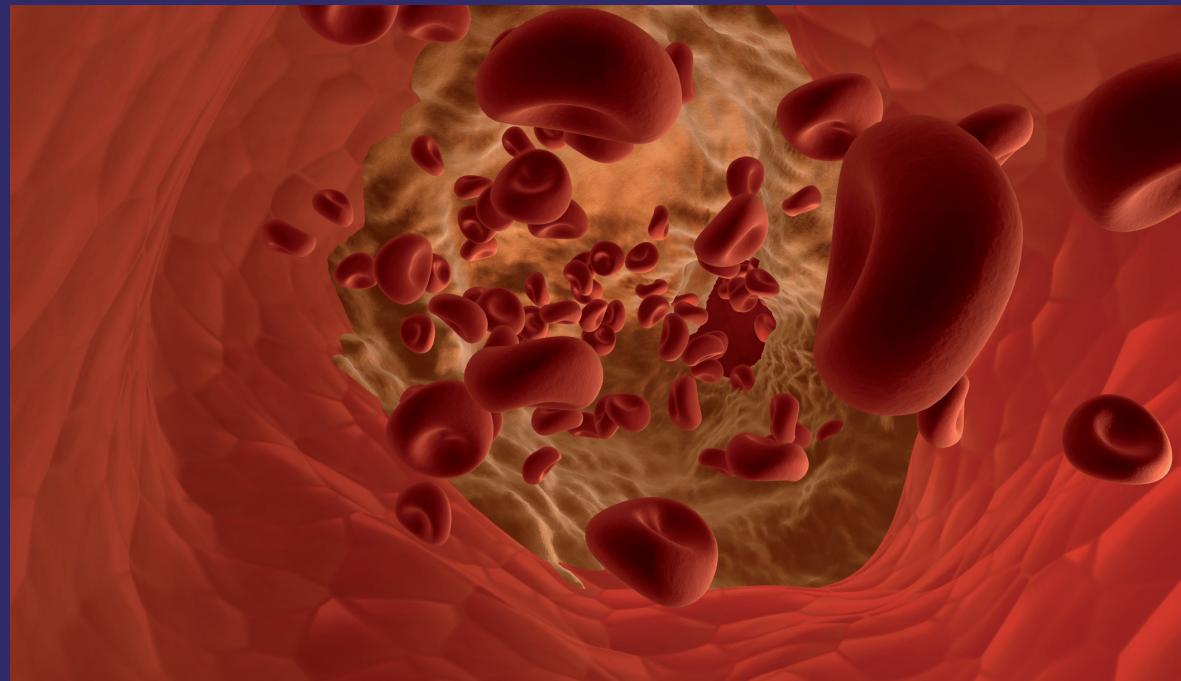
**Александра
Александровна Мельниченко**

В 2002 году закончила химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, в 2006 году защитила кандидатскую диссертацию по теме "Агрегация циркулирующих множественно модифицированных ЛНП. Роль в атерогенезе", является ведущим научным сотрудником НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН.



978-3-8443-8622-6

Атерогенность ЛНП: роль ассоциации



Александра Александровна Мельниченко
Денис Владимирович Аксенов
Александр Николаевич Орехов

Атерогенность липопротеидов

Механизмы, роль ассоциации

Мельниченко, Аксенов, Орехов

**Александра Александровна Мельниченко
Денис Владимирович Аксенов
Александр Николаевич Орехов**

Атерогенность липопротеидов

**Александра Александровна Мельниченко
Денис Владимирович Аксенов
Александр Николаевич Орехов**

Атерогенность липопротеидов

Механизмы, роль ассоциации

Impressum / Выходные данные

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek: Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Alle in diesem Buch genannten Marken und Produktnamen unterliegen warenzeichen-, marken- oder patentrechtlichem Schutz bzw. sind Warenzeichen oder eingetragene Warenzeichen der jeweiligen Inhaber. Die Wiedergabe von Marken, Produktnamen, Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen u.s.w. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutzgesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Библиографическая информация, изданная Немецкой Национальной Библиотекой. Немецкая Национальная Библиотека включает данную публикацию в Немецкий Книжный Каталог; с подробными библиографическими данными можно ознакомиться в Интернете по адресу <http://dnb.d-nb.de>.

Любые названия марок и брендов, упомянутые в этой книге, принадлежат торговой марке, бренду или запатентованы и являются брендами соответствующих правообладателей. Использование названий брендов, названий товаров, торговых марок, описаний товаров, общих имён, и т.д. даже без точного упоминания в этой работе не является основанием того, что данные названия можно считать незарегистрированными под каким-либо брендом и не защищены законом о брэндах и их можно использовать всем без ограничений.

Coverbild / Изображение на обложке предоставлено: www.ingimage.com

Verlag / Издатель:

LAP LAMBERT Academic Publishing

ist ein Imprint der / является торговой маркой

AV Akademikerverlag GmbH & Co. KG

Heinrich-Böcking-Str. 6-8, 66121 Saarbrücken, Deutschland / Германия

Email / электронная почта: info@lap-publishing.com

Herstellung: siehe letzte Seite /

Напечатано: см. последнюю страницу

ISBN: 978-3-8443-8622-6

Zugl. / Утврд.: Москва, НИИ физико-химической медицины МЗ РФ, 2006

Copyright / АВТОРСКОЕ ПРАВО © 2012 AV Akademikerverlag GmbH & Co. KG

Alle Rechte vorbehalten. / Все права защищены. Saarbrücken 2012

Содержание

| | |
|---|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 6 |
| ВВЕДЕНИЕ | 7 |
| 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 11 |
| 1.1 Строение и функции частицы ЛНП..... | 11 |
| 1.2 In vitro модифицированные ЛНП склонны к ассоциации..... | 13 |
| 1.3 Модифицированные ЛНП, циркулирующие в крови человека..... | 19 |
| 1.4 Роль ассоциации ЛНП в атерогенезе..... | 26 |
| 1.4.1 Роль ассоциации ЛНП во внутриклеточном накоплении липидов. | 26 |
| 1.4.2 Роль ассоциации ЛНП в экстраклеточном отложении липидов..... | 28 |
| 1.5 Ингибиторы ассоциации ЛНП. | 31 |
| 1.6 Характеристика и основные свойства плюроников..... | 32 |
| 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ | 34 |
| 2.1. Объекты исследования | 34 |
| 2.1.1. Выделение липопротеидов из плазмы крови человека [Tertov et al., 1995] | 34 |
| 2.1.2. Получение нативных и циркулирующих модифицированных липопротеидов из плазмы крови человека..... | 34 |
| 2.1.3. Выделение белых клеток крови человека | 35 |
| 2.1.4. Выделение и культивирование клеток интимы аорты человека | 36 |
| 2.1.5. Культура макрофагов человека | 37 |
| 2.1.6. Культивирование клеток с исследуемыми липопротеидами низкой плотности | 38 |
| 2.2. Методы исследования | 38 |
| 2.2.1. Определение содержания внутриклеточного холестерина | 38 |
| 2.2.2. Определение клеточного белка | 39 |
| 2.2.3. Приготовление ^{125}I -меченых препаратов липопротеидов | 39 |
| 2.2.4. Инкубация клеток с исследуемыми ^{125}I -меченными ЛНП в экспериментах по изучению их связывания, захвата и деградации..... | 40 |

| | |
|--|----|
| 2.2.5. Исследование деградации ^{125}I -меченных ЛНП культурами клеток | 41 |
| 2.3 Анализ ЛНП..... | 41 |
| 2.3.1 Экстракция липидов из ЛНП. | 41 |
| 2.3.2 Анализ липидов ЛНП при помощи тонкослойной хроматографии..... | 42 |
| 2.3.3 Электрофорез в поликарбамидном геле. | 42 |
| 2.3.4 Электрофорез в агарозном геле. | 43 |
| 2.3.5 Определение тиобарбитуровая кислота (ТБК)-реактивных продуктов.... | 43 |
| 2.3.6 Определение содержания сиаловой кислоты в ЛНП. | 44 |
| 2.3.7 Изучение особенностей структуры модифицированных ЛНП методом твердофазного иммуноферментного анализа | 45 |
| 2.3.8. Исследование ЛНП методом спиновых зондов..... | 47 |
| 2.3.9. Исследование ЛНП методом флуоресцентных зондов и меток | 51 |
| 2.3.10. Определение продуктов пероксидации липидов в ЛНП | 53 |
| 2.3.11. Определение содержания сиаловой кислоты в ЛНП | 53 |
| 2.3.12. Определение содержания углеводов в ЛНП | 54 |
| 2.4 Получение модифицированных ЛНП. | 55 |
| 2.4.1 Модификация ЛНП протеолитическими ферментами. | 55 |
| 2.4.2 Модификация ЛНП миелопероксидазой (МПО). | 55 |
| 2.4.3 Модификация ЛНП липополитическими ферментами..... | 56 |
| 2.4.4 Модификация ЛНП дегликозилирующими ферментами – нейраминидазой..... | 56 |
| 2.4.5 Модификация ЛНП низкомолекулярными альдегидами эндогенного происхождения. | 56 |
| 2.5 Определение степени ассоциации ЛНП и размера ассоциатов..... | 57 |
| 2.5.1 Определение относительного размера ЛНП (метод флюктуации светопропускания). | 57 |
| 2.5.2 Определение размера ассоциатов ЛНП. | 58 |
| 2.6 Основные характеристики использованных в работе плюроников..... | 58 |
| 2.7 Статистическая обработка данных | 58 |

| | |
|--|----|
| 3. РЕЗУЛЬТАТЫ | 59 |
| 3.1. Накопление холестерина гладкомышечными клетками аорты человека и макрофагами при инкубации их с агрегированными и не агрегированными ЛНП | 59 |
| 3.1.1. Спонтанная ассоциация ЛНП в условиях культивирования (37°C, CO ₂ -инкубатор) вызывает накопление эфиров холестерина в ГМК и макрофагах. Зависимость от размера агрегатов ЛНП | 59 |
| 3.1.2. Клеточный метаболизм агрегированных и не агрегированных ¹²⁵ I-ЛНП | 61 |
| 3.1.3. Изучение механизма захвата агрегатов ¹²⁵ I-ЛНП | 63 |
| 3.2. Изучение особенностей структурной организации склонных к агрегации циркулирующих множественно модифицированных ЛНП..... | 64 |
| 3.2.1. Исследование структуры нативных и цмЛНП с использованием спиновых и флуоресцентных зондов и меток | 66 |
| 3.2.2. Исследование структуры нативных и цмЛНП методом иммуноферментного анализа..... | 74 |
| 3.3 Сравнение склонности к ассоциации циркулирующих множественно модифицированных и нативных ЛНП..... | 77 |
| 3.4 Влияние различных модификаций частицы нативных ЛНП на устойчивость липопротеидов к ассоциации | 80 |
| 3.4.1 Влияние протеолитических ферментов на устойчивость нативных ЛНП к ассоциации. | 80 |
| 3.2.2 Влияние липолитических ферментов на устойчивость нативных ЛНП к ассоциации. | 84 |
| 3.2.3 Влияние миелопероксидазы на устойчивость нативных ЛНП к ассоциации. | 87 |
| 3.2.4 Влияние альдегидов эндогенного происхождения на устойчивость ЛНП к ассоциации. | 89 |
| 3.2.5 Влияние нейраминидазы на устойчивость нативных ЛНП к ассоциации. | 92 |
| 3.2.6. Изучение агрегации ЛНП при изменении их сольватной оболочки | 94 |

| | |
|--|-----|
| 3.2.7. Дегликозилирование ЛНП способствует их ассоциации | 102 |
| 3.3 Изучение конформационных изменений апоВ белка цммЛНП и ферментативно модифицированных ЛНП..... | 107 |
| 3.3.1 Изучение конформационных изменений апоВ белка цммЛНП | 107 |
| 3.3.2 Изучение конформационных изменений апоВ белка под влиянием протеолитических ферментов..... | 110 |
| 3.3.3 Изучение конформационных изменений апоВ под влиянием липополитических ферментов..... | 113 |
| 3.3.4 Изучение конформационных изменений апоВ под влиянием миелопероксидазы..... | 117 |
| 3.3.5 Изучение конформационных изменений апоВ под влиянием нейраминидазы..... | 119 |
| 3.3.6 Сопоставление результатов изучения конформационных изменений апоВ цммЛНП и ферментативно модифицированных липопротеидов..... | 121 |
| 3.4 Экзогенные ингибиторы ассоциации ЛНП..... | 122 |
| 3.4.1 Влияние плюроника Р85 на ассоциацию ЛНП. | 123 |
| 3.4.2 Влияние плюроника F68 на ассоциацию ЛНП | 126 |
| 3.4.3 Влияние плюроника L61 на ассоциацию ЛНП | 127 |
| 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ | 129 |
| 5. ВЫВОДЫ | 154 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 157 |

Список сокращений

- апоВ-100 – аполипопротеид В-100
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- ГЛБ – гидрофильно – липофильный баланс
- ИФА – иммуноферментный анализ
- ИФБ – изотонический фосфатный буфер, pH 7,4
- ККМ – критическая концентрация мицеллообразования
- ЛНП – липопротеиды низкой плотности
- ЛВП – липопротеиды высокой плотности
- МДА – малоновый диальдегид
- МПО – миелопероксидаза
- ПААГ – полиакриламидный гель
- ПЭГ – полиэтиленгликоль со средней мол. массой 6000
- ТБК – 2-тиобарбитуровая кислота
- цммЛНП – циркулирующие множественно модифицированные ЛНП
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания – наиболее распространенная причина смертности в развитых странах. Большинство сердечно-сосудистых заболеваний является следствием атеросклероза магистральных сосудов человека.

Одним из ключевых моментов патогенеза атеросклероза является внутриклеточное накопление липидов, в частности эфиров холестерина, в протеогликановом слое интимы артерий [Аничков, 1947; Smith, 1974; Houst, 1978; Mahley, 1979; Fowler et al., 1979]. Было показано, что эти липиды ведут свое происхождение от циркулирующих в крови липопротеидов низкой плотности (ЛНП) [Alaupovic, 1971; Cookson, 1971]. Однако нативные ЛНП не вызывают накопления липидов в культуре клеток [Bates et al., 1976; Ross, Harker, 1976; Goldstein et al., 1979]. С другой стороны, было продемонстрировано, что различным образом модифицированные *in vitro* ЛНП (ацетилированные, обработанные малоновым диальдегидом, окисленные, гликозилированные и т.д.) характеризуются атерогенностью - способностью вызывать накопление липидов в культивируемых клетках [Goldstein et al., 1979; Fogelman et al., 1980; Khoo et al., 1990; Lopes-Virella et al., 1988].

Было показано, что модифицированные разными способами ЛНП образуют ассоциаты, и эти ассоциаты проявляют атерогенные свойства [Tertov et al. 1989]. Этот факт был подтвержден многими исследователями, изучающими захват клетками ассоциатов ЛНП, полученных *in vitro* любыми способами: вортексирование (интенсивное встряхивание) [Buton et al., 1999; Liorente-Cortes et al., 2000; Zhang et al., 2000], окисление медью [Hoff et al., 1992], окисление азо-инициатором [Kawabe et al., 1991; Tertov et al., 1998], обработка гипохлоритом [Hazell et al., 1994; Tertov et al., 1998; Панасенко с соавт., 2004], миелопероксидазой [Панасенко с соавт., 2004], фосфолипазой С

[Zhang et al., 2000], сфингомиелиназой [Zhang et al., 2000; Marathe et al., 1999], протеазами [Piha et al, 1995], гликозидазами [Панасенко с соавт., 2006]. После установления *in vitro* факта атерогенности модифицированных липопротеидов приобрел актуальность вопрос о существовании *in vivo* модифицированных ЛНП.

В крови больных ишемической болезнью сердца были обнаружены циркулирующие множественно модифицированные ЛНП (цммЛНП) [Orehov et al., 1989; Tertov et al., 1990], значительно отличающиеся от нативных по физико-химическим свойствам. Так, они имели пониженное содержание сиаловой кислоты, маннозы и других сахаров. В крови человека были обнаружены также так называемые мелкие, плотные [Shen et al., 1981; La Belle and Krauss, 1990; Avogaro et al., 1991] и электроотрицательные [Avogaro et al., 1988] ЛНП. И мелкие, плотные, и электроотрицательные ЛНП обладают весьма сходными, если не идентичными с цммЛНП свойствами и, по-видимому, представляют собой одну и ту же подфракцию липопротеидных частиц, подвергшихся множественной модификации *in vivo* [Tertov et al 1995]. Циркулирующие в крови модифицированные ЛНП обладают двумя общими важнейшими свойствами: стимулируют липоидоз на клеточном уровне (являются атерогенными) и проявляют склонность к ассоциации, причем, их атерогенный потенциал напрямую зависит от устойчивости к ассоциации и увеличивается с ее понижением [Orehov et al., 1990; Tertov et al., 1989,1998].

Было установлено, что: без модификации ЛНП невозможна их ассоциация, а без ассоциации ЛНП не проявляют выраженные атерогенные свойства [Tertov et al 1989]. В связи с этим, представляет значительный интерес изучение механизмов ассоциации; изменений, которые происходят в частице ЛНП, склонной к ассоциации; а также поиск агентов, способствующих модификации липопротеидов и стимулирующих ассоциацию ЛНП; и, кроме того, ингибиторов ассоциации ЛНП. Учитывая это, цели и задачи настоящей работы были сформулированы следующим образом:

Целью настоящей работы явилось изучение стимуляции ассоциации ЛНП ферментами и альдегидами эндогенного происхождения, ведущей к изменению основных структурных компонентов ЛНП; характеристика происходящих под влиянием различных модификаторов изменений главного стабилизирующего компонента частицы ЛНП – апоВ-100; поиск и изучение свойств экзогенных ингибиторов ассоциации ЛНП.

Для достижения этой цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить ассоциацию ЛНП крови человека, происходящую вследствие их протеолитической, липолитической, окислительной, десиалирующей модификации, а также модификации альдегидами эндогенного происхождения, ведущую к изменению основных структурных компонентов частицы ЛНП: белка, липидов, полисахаридов.
2. Используя панель моноклональных антител к апоВ-100, сравнить особенности пространственного расположения этого белка в различным образом модифицированных *in vitro* ЛНП и в цммЛНП.
3. Изучить влияние экзогенных биодоступных амфи菲尔ных блок-сополимеров окиси пропилена и окиси этилена (плюроников) на ассоциацию ЛНП.

В работе впервые с использованием широкой панели моноклональных антител как к нативным, так и к модифицированным ЛНП исследованы особенности расположения антигенных детерминант апоВ-100 в циркулирующих модифицированных ЛНП и ЛНП, модифицированных *in vitro* протеолитическими, липолитическими, окислительными, десиалирующими ферментами, а также альдегидами эндогенного происхождения. Показано, что модификация ЛНП перечисленными выше агентами вызывает ассоциацию ЛНП. Выявлено ингибирующее действие плюроников на ассоциацию ЛНП; изучено влияние структуры и свойств плюроника на способность подавлять ассоциацию ЛНП.

В диссертации показано, что изменение физико-химических свойств частиц ЛНП, которое может происходить в организме под воздействием различных модификаций, снижает их устойчивость к ассоциации. Кроме того, показана возможность подавления ассоциации ЛНП при помощи экзогенных биодоступных полимеров – плuronиков.

Работа носит фундаментальный характер, тем не менее, полученные результаты могут иметь практическое значение. Полученные результаты открывают перспективы разработки принципиально новых подходов и средств, направленных на стабилизацию и повышение устойчивости ЛНП к ассоциации с целью профилактики, замедления или предотвращения агрегации ЛНП, а вместе с ней и торможения процессов отложения липидов в сосудистой стенке, а значит и развития ранних стадий атеросклероза.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В данном обзоре литературы обобщены наиболее важные данные о природе и структуре нативных ЛНП, модифицированных ЛНП и их свойствах, о значимости ассоциации ЛНП в атерогенезе и о подходах к модуляции ассоциации ЛНП.

1.1 Строение и функции частицы ЛНП.

Одним из наиболее ранних проявлений атеросклеротического поражения является внутриклеточное и внеклеточное отложение липидов, преимущественно эфиров холестерина, в интиме сосудов [Аничков, 1947; Smith, 1974; Houst, 1978; Mahley, 1979; Fowler et al., 1979]. Было установлено, что источником липидов, накапливающихся в клетках сосудов, являются ЛНП, циркулирующие в крови человека [Bates et al., 1976; Ross, Harker, 1976; Wissler et al., 1976; Chen et al, 1977; Goldstein et al., 1979]. Липопротеиды низкой плотности в организме человека ответственны за транспорт холестерина к клеткам. По классическим представлениям [Esterbauer et al., 1992], частица ЛНП состоит из гидрофобного ядра, которое покрыто оболочкой из фосфолипидов, холестерина и одной молекулы апоВ-100. Ядро ЛНП состоит из примерно 1600 молекул этерифицированного холестерина, и 170 молекул триглицеридов [Esterbauer et al., 1992]. Амфипатный поверхностный слой построен из 700 молекул фосфолипидов и одной молекулы апоВ-100 белка. Молекулы неэтерифицированного (свободного) холестерина присутствуют как в составе ядра частицы, так и поверхностного слоя. Фосфолипиды представлены главным образом фосфатидилхолином (500 молекул) и сфингомиелином (200 молекул) (см. рисунок 1). Установлено, что апоВ-100 связывается в основном с молекулами фосфатидилхолина [Lund-Katz and Phillips., 1986; Sommer et al., 1992; Murphy et al., 1997], в то время как холестерин в большей степени связывается со сфингомиелином [Lund-Katz et al., 1988; Mattjus et al., 1996]. Еще одна важная компонента ЛНП – углеводная, представленная полисахаридными цепями связанными как с апоВ, так и с

липидами поверхности липопротеида. В обоих случаях терминальным моносахаридным остатком выступает сиаловая кислота [Millar et al, 2001] (см рисунок 2).

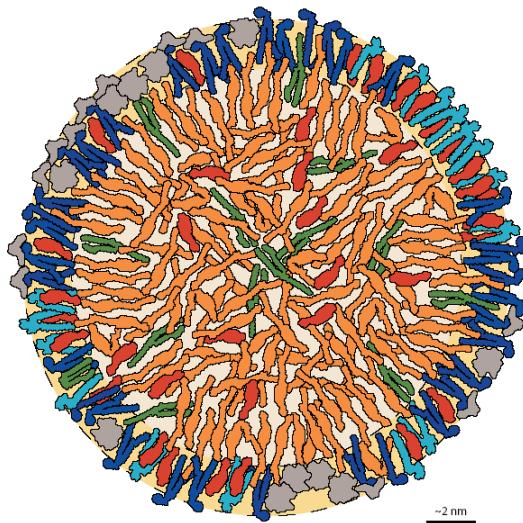
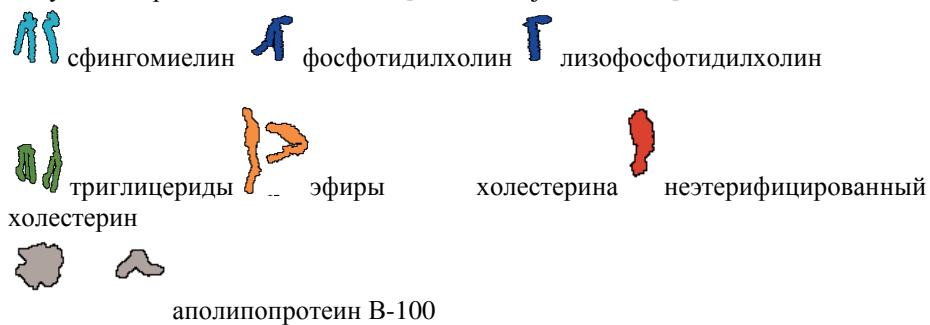


Рисунок1 Строение частицы ЛНП [по Nevonoja et al, 2000]



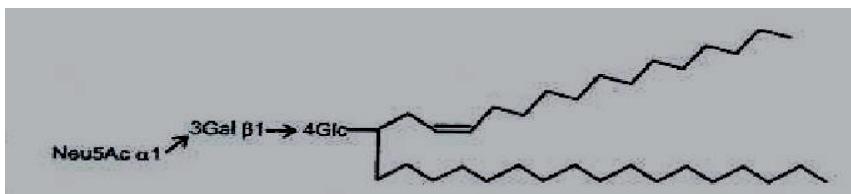
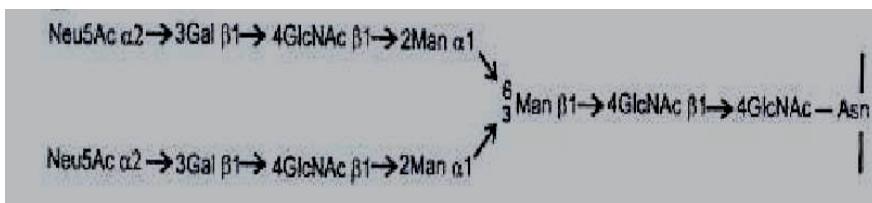


Рис. 2. Последовательность сахаров в углеводной цепи ЛНП. (Sial – сиаловая кислота, Gal – галактоза, Man – манноза, GlcNAc – N-ацетилглюкозоаминогликан).

1.2 In vitro модифицированные ЛНП склонны к ассоциации.

Данная работа посвящена главным образом изучению ассоциации ЛНП. Как уже указывалось выше, *in vitro* модифицированные ЛНП склонны к ассоциации. Ассоциация ЛНП индуцируется разнообразными химическими реагентами (Cu^{2+} , H_2O_2 , супероксид анион радикал, оксид азота, Ca^{2+}) и изменениями условий среды, содержащей липопротеиды (повышенная кислотность среды, изменения ионной силы среды) [Navab et al, 1996; Hoff et al 1992; Berliner and Heinecke, 1996; Rice-Evans and Bruckdorfer, 1992; Witztum and Steinberg, 1991]. Кроме того, ассоциацию ЛНП стимулируют различные биомолекулы – ферменты [Xu and Tabas, 1991; Chao et al, 1992; Hakala et al, 1999; Marathe et al, 1999; Belkner et al, 1993], компоненты межклеточного матрикса [Maor and Aviram, 1999; Camejo, 1982]. Также показана стимуляция ассоциации ЛНП под действием физических процессов – вортексирования, интенсивного перемешивания.

В интиме артерий и кровеносном русле существуют протеолитические и липолитические ферменты, способные модифицировать ЛНП и индуцировать ассоциацию липопротеидов. Во внеклеточном пространстве интимы были обнаружены химаза и триптаза, две нейтральные протеазы, секретируемые тучными клетками [Kaartinen et al., 1994], металлопротеиназы, секретируемые макрофагами и гладкомышечными клетками [Galis et al., 1994], плазмин [Grainger et al., 1994], тромбин [Smith et al., 1996] и лизосомальные протеазы [Lojda et al., 1984; Sukhova et al., 1998]. Химаза тучных клеток крысы может гидролизовать белковую часть ЛНП [Kokkonen et al., 1986; 1989], лизосомальные протеазы макрофагов разрушают апоВ-100 при кислых значениях pH [Leake et al., 1990]. Плазмин, калликреин, тромбин [Piha et al., 1995] и другие металлопротеиназы также способны модифицировать апобелок ЛНП.

Было показано, что протеолитическая деградация апоВ-100 приводит к агрегации и слиянию частиц липопротеидов. АпоВ-100 – важный компонент поверхности ЛНП [Baumstark et al., 1990; Kroon, 1994]. Даже частичное удаление апобелка с поверхности частицы приводит к реорганизации ее структуры и как следствие изменению структуры липидного ядра. По мнению некоторых авторов [Paananen and Kovanen, 1994], при протеолизе апоВ-100 липиды ядра перемещаются к поверхности частицы ЛНП, увеличивая ее гидрофобность. Это может служить причиной слияния частиц ЛНП. Интересно, что при низкой температуре (15°C), когда эфиры холестерина находятся в относительно упорядоченном состоянии и, вероятно, не способны передвигаться в сторону поверхности, частицы ЛНП с поврежденным белком не ассоциируют.

Во внеклеточном матриксе интимы присутствуют фосфолипаза A2 [Menschikowski et al., 1995; Hurt-Camejo et al., 1997; Romano et al., 1998] и сфингомиелиназа [Schissel et al., 1996; Marathe et al., 1999]. Фосфолипаза A2 гидролизует фосфатидилхолин ЛНП [Sartipy et al., 1996]. Сфингомиелиназа при

кислых значениях pH гидролизует молекулы сфингомиелина, особенно после гидролиза ЛНП в нейтральной среде фосфолипазой A2 [Schissel et al., 1998].

Сфингомиелиназа гидролизует молекулы сфингомиелина с образованием водорастворимых молекул фосфохолина, которые удаляются из частицы ЛНП, и молекул церамида, которые остаются в ЛНП. Было показано, что обработка ЛНП сфингомиелиназой приводит к ассоциации и слиянию ЛНП [Xu and Tabas, 1991; Pentikäinen et al., 1996; Öörni et al., 1998]. Возможно, это происходит из-за увеличения содержания церамида в частице [Schissel et al., 1996]. Известно, что церамид, в отличие от негидролизованного сфингомиелина, образует домены в частице ЛНП [Huang et al., 1996; Holopainen et al., 1998]. Сформированные домены могут играть роль неполярных плотов на поверхности частиц, гидрофобное взаимодействие которых приведет к ассоциации ЛНП. При понижении температуры до 15°C увеличивается жесткость липидного ядра, вследствие чего замедляется диффузия сфингомиелина в поверхностном монослое ЛНП [Fenske et al., 1990], что в свою очередь частично замедляет образование микродоменов церамида. Зу и Табас [Xu and Tabas., 1991] показали, что полученные ассоциаты вызывают 10-кратное увеличение уровня эфиров холестерина в макрофагах по сравнению с нативными ЛНП. При этом скорость внутриклеточной деградации ассоциатов ЛНП возрастает лишь в 4 раза.

Фосфолипаза A2 ускоряет гидролиз эфиров жирных кислот в *sn*-2 положении. Если ЛНП подвергаются действию фосфолипазы A2 в отсутствие связывающихся с липидами белков (таких как альбумин), продукты липолиза – лизофосфатидилхолин и свободные жирные кислоты – накапливаются в ЛНП. Тем не менее, при физиологических концентрациях альбумина большая часть жирных кислот и некоторое количество лизофосфатидилхолина переносится на альбумин [Kleinman et al., 1988]. Липолиз ЛНП с помощью фосфолипазы A2 в присутствии альбумина приводит к конформационным изменениям апобелка и реорганизации липидного компонента ЛНП [Kleinman et al., 1988; Gorshkova et

al., 1996], что вызывает агрегацию, но не слияние частиц ЛНП [Öörni et al., 1998]. При изучении с помощью электронной микроскопии частиц ЛНП, модифицированных фосфолипазой А2, было показано, что они более мелкие, чем нативные липопротеиды [Öörni et al., 1998; Aggerbeck et al., 1976; Sartipy et al., 1999]. В мелких частицах пропорциональное соотношение липидов в поверхностном монослое возрастает [Lottin et al., 1996], что делает поверхность липопротеидов более гидрофобной, увеличивая склонность липопротеидов к ассоциации. В то же время, увеличение липидной составляющей в поверхностном слое делает его более жестким [Gorshkova et al., 1996], что препятствует слиянию модифицированных частиц.

Интересно, что внесение гепарина до, во время или после обработки липопротеидов фосфолипазой А2, вызывает их слияние [Hakala et al., 1999]. Так как обработка гепарином до липолиза способствует слиянию ЛНП, можно предположить, что взаимодействие ЛНП с глюкозоаминогликанами приводит к необратимым изменениям конформации белка. Возможно, взаимодействие с гепарином увеличивает экспозицию лизин- и аргинин-содержащих сегментов апоB-100 [Camejo et al., 2000] и делает структуру ЛНП менее стабильной [Camejo et al., 2000; Mateu et al., 1984].

Поврежденные фосфолипазой А2 ЛНП более чувствительны к последующей модификации другими ферментами. Такие ЛНП проникают неспецифическим путем в макрофагальные клетки, что приводит к накоплению внутриклеточных липидов. К тому же лизофосфолипиды и свободные жирные кислоты, выделяемые при взаимодействии фосфолипазы с ЛНП, также проявляют атерогенные свойства [Hurt-Camejo et al., 2001].

Фосфолипаза С гидролизует фосфолипиды до фосфохолина и диацилглицерина. После обработки фосфолипазой С фосфохолин удаляется из ЛНП, а гидрофобный диацилглицерин остается как в липидном ядре, так и на поверхности частицы ЛНП. Взаимодействие с фосфолипазой С приводит к агрегации и слиянию частиц ЛНП [Suits et al., 1989; Liu et al., 1993]. По всей

вероятности, это обусловлено образованием гидрофобных доменов на поверхности ЛНП. С другой стороны было показано, ЛНП, модифицированные фосфолипазой С, вызывают накопление этерифицированных стеролов в культивируемых макрофагах [Heinecke et al., 1991]. Причем модифицированные ассоциаты ЛНП сначала локализуются в фагосомах, затем попадают во вторичные лизосомы, после чего образующийся свободный холестерин снова этерифицируется, формируя липидные капли в цитоплазме. В интиме была обнаружена рН-зависимая холестеринэстераза [Shamir et al., 1996; Li et al., 1998], которая способна гидролизовать лизофосфолипиды в окисленных ЛНП, а также в присутствии холата, эфиры холестерина. Наконец, макрофаги и пенистые клетки в стенке сосуда синтезируют лизосомальную кислую липазу [Davis et al., 1985]. Активен ли этот фермент во внеклеточном пространстве – неизвестно.

В интиме аорты есть ферменты, способные к окислению липопротеидов: 15-липоксигеназа [Ylä-Herttuala et al., 1990], миелопероксидаза [Daugherty et al., 1994], гемоксигеназа-1 [Wang et al., 1998]. Также в интиме находятся NO-синтаза [Luoma et al., 1998] и НАДФН-оксидаза [Azumi et al., 1999], которые продуцируют весьма реакционные соединения, способные окислять ЛНП. Области атеросклеротического поражения содержат также церулоплазмин [Swain et al., 1995] и ионы металлов переменной валентности [Swain et al., 1995; Smith et al., 1992; Evans et al., 1995; Lamb et al., 1995.], которые способны усугублять окисление ЛНП.

Окисленные ЛНП также имеют тенденцию к ассоциации. Это явление было изучено при взаимодействии липопротеидов с различными окислителями, такими как ионы меди [Hoff et al., 1991], 2,2'-азобис-[2-амидинопропан]-гидрохлорид [Hoff et al., 1992], гипохлорит [Cynshi et al., 1994]. В результате окисления ионами меди теряется целостность частицы ЛНП, что приводит к агрегации и слиянию липопротеидов [Hoff et al., 1991; Pentikäinen et al., 1996; Hoff et al., 1992; Cynshi et al., 1994; Vanderyse et al., 1992; Dobrian et al., 1993;

Kawabe et al., 1994; Meyer et al., 1996]. При окислении с помощью 2,2'-азобис-[2-амидинопропан]-гидрохлорида липопротеиды ассоциируют в той же степени, что и при воздействии с ионами меди [Kawabe et al., 1994]. Было проведено сравнение атерогенности ассоциатов и мономеров липопротеидов, модифицированных 2,2'-азобис-(2-амидинопропан)-гидрохлоридом. Показано, что мономеры модифицированных частиц вызывали накопление липидов в клетках в гораздо меньшей степени, чем ассоциаты.

В отличие от других типов модификаций, окисление приводит к изменениям как белковой, так и липидной частей ЛНП. Так, образующиеся при пероксидации липидов гидропероксиды разлагаются до альдегидов, которые могут реагировать с апоВ-100, что приводит к окислительной деградации аминокислотных остатков апобелка [Esterbauer et al., 1992]. Изменения, которые происходят в ЛНП при окислении, отчасти сходны с таковыми при действии липолитических ферментов. Так, при окислении атакуются непредельные жирнокислотные цепи фосфолипидов на поверхности липопротеидов, которые затем могут быть гидролизованы эндогенной фосфолипазой А2. Как было сказано ранее, лизофосфолипиды и свободные жирные кислоты переносятся на альбумин, что влечет за собой изменения в структуре поверхности ЛНП, повышая их склонность к ассоциации. При окислении снижается подвижность поверхностных фосфолипидов, что препятствует липид-белковому взаимодействию и приводит к повышению полярности липидной части ЛНП [Panasenko et al., 1991; Eichenberger et al., 1982; Barenghi et al., 1990]. Окисление апоВ-100 также способствует ассоциации и слиянию частиц ЛНП. Показано, что альдегиды, образующиеся в ходе окисления липопротеидов, также реагируют с ЛНП, вызывая ассоциацию последних [Hoff and O'Neil., 1991]. Хотя обработка гипохлоритом приводит к образованию малых количеств продуктов окислительной деградации ЛНП, она все же вызывает их ассоциацию, более того, показано, что преимущественно деградируют гидрофобные участки апобелка [Panasenko et al., 1991].

Итак, в организме человека существует множество факторов стимулирующих модификацию и ассоциацию ЛНП.

1.3 Модифицированные ЛНП, циркулирующие в крови человека

А.Н. Ореховым и В.В. Тертовым с соавт. в крови пациентов больных ишемической болезнью сердца были обнаружены ЛНП, отличающиеся от нативных ЛНП снижением содержанием сиаловой кислоты. Эти липопротеиды были выделены с помощью лектин-хроматографии на *Ricinus communis* агглютинин (RCA₁₂₀) агарозе и получили название циркулирующие множественно модифицированные ЛНП (цммЛНП) [Orehov et al., 1989; Tertov et al., 1990].

ЦммЛНП вызывали накопление липидов в клетках интимы аорты человека и в макрофагах, то есть являются атерогенными [Orehov et al., 1990; Tertov et al., 1992]. В цммЛНП, выделенных из крови больных атеросклерозом, содержание сиаловой кислоты было в среднем в 2-3 раза ниже, чем в нативных липопротеидах [Tertov et al., 1992; 1995]. Была установлена достоверная обратная корреляция между содержанием сиаловой кислоты в ЛНП и их способностью вызывать накопление липидов *in vitro* [Orehov et al., 1992]. Более того, нативные липопротеиды здоровых лиц после удаления сиаловой кислоты бактериальной нейраминидазой приобретали атерогенные свойства [Orehov et al., 1989; 1991]. Кроме измененного содержания сиаловой кислоты цммЛНП обладали целым рядом свойств, отличающих их от нативных ЛНП [Tertov et al., 1992; Тертов, 1999]. Так, диаметр частиц цммЛНП был на 10-15% меньше, чем диаметр нативных липопротеидов. Плотность цммЛНП была достоверно ниже

по сравнению с нативными ЛНП. ЦммЛНП характеризовались более высокой электрофоретической подвижностью, что говорит о повышенном поверхностном отрицательном заряде липопротеидной частицы. Дальнейшими исследованиями были продемонстрированы существенные различия в

липидном составе нативных и цммЛНП [Tertov et al., 1992; Тертов, 1999] (табл. 1).

Так, содержание свободного и этерифицированного холестерина и триглицеридов в цммЛНП здоровых лиц на 30-40% ниже, чем в нативных липопротеидах (для цммЛНП и нативных ЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом эта разница была 1,5-2 кратной). Уровень моноглицеридов и свободных жирных кислот цммЛНП здоровых лиц на 20-25% выше по сравнению с нативными липопротеидами (табл. 1).

В цммЛНП больных с ангиографически подтвержденным коронарным атеросклерозом содержание триглицеридов в 1,5-2 раза выше, а свободных жирных кислот, моно- и диглицеридов – в 3-5 раз выше, чем в нативных ЛНП. Циркулирующие модифицированные ЛНП здоровых лиц имеют сниженный уровень фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, а также увеличенное содержание лизофосфатидилхолина. цммЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом содержат в 1,5-2 раза меньше фосфатидилхолина,

Таблица 1 - Содержание основных классов липидов в нативных ЛНП и цммЛНП здоровых лиц и пациентов с коронарным атеросклерозом. [Tertov et al., 1992; Тертов, 1999]

| Липид | Содержание липидов в ЛНП, мкг/мг белка | | | |
|-------------------|--|---------|----------|---------|
| | Здоровые лица | | Пациенты | |
| | Нативные | | Нативные | |
| | ЛНП | цммЛНП | ЛНП | цммЛНП |
| Эфиры холестерина | 2055±132 | 1507±58 | 2215±74 | 1412±30 |
| Холестерин | 628±29 | 427±14 | 638±27 | 359±38 |
| Триглицериды | 268±18 | 206±7 | 301±27 | 196±12 |
| Диглицериды | 15±1 | 15±1 | 15±2 | 25±1 |
| Моноглицериды | 29±2 | 39±1 | 27±2 | 82±4 |
| Свободные жирные | 58±2 | 79±3 | 53±2 | 196±2 |

кислоты

| | | | | |
|---------------------|--------|--------|---------|--------|
| Фосфатидилхолин | 905±89 | 752±36 | 1105±96 | 673±37 |
| Лизофосфатидилхолин | 51±3 | 71±3 | 56±4 | 103±4 |

фосфатидилэтаноламина и сфингомиэлина, а также в 2 раза больше лизофосфатидилхолина по сравнению с нативными ЛНП. Содержание основных оксистеролов (7-кето-, 5,6-диен-, 7-окси- и 25-оксихолестерина) в цммЛНП как здоровых лиц, так и пациентов с коронарным атеросклерозом, в 2-4 раза выше, чем в нативных липопротеидах. Уровень жирорастворимых витаминов (А и Е) в цммЛНП здоровых лиц достоверно ниже по сравнению с нативными ЛНП. В цммЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом содержание витаминов А и Е соответственно примерно в 1,5 и 2 раза ниже по сравнению с нативными липопротеидами. Была обнаружена повышенная предрасположенность циркулирующих модифицированных ЛНП к окислению *in vitro*, которая, скорее всего, является следствием частичной потери жирорастворимых витаминов, обладающих выраженными антиокислительными свойствами [Tertov et al., 1992].

Было выявлено изменение третичной структуры белка ЛНП, а также модификация лизиновых аминокислотных остатков, что являлось, по-видимому, причиной снижения связывания цммЛНП с апоВ,Е-рецептором [Тертов, 1999]. В отличие от нативных ЛНП, цммЛНП способны связываться со скэндженер-рецептором, асиалгликопротеид-рецептором и протеогликанами клеточной стенки [Orekhov et al., 1992], что было подтверждено и другими исследователями [Filipovic et al., 1989; Taniguchi et al., 1989].

Позже исследованиями в других лабораториях в крови человека были обнаружены ЛНП, характеризуемые повышенным отрицательным зарядом поверхности, впоследствии выделенные с помощью ионообменной хроматографии [Avogaro et al., 1988]. «Электроотрицательные» липопротеиды отличались от нативных ЛНП повышенной способностью к ассоциации,

увеличенным содержанием апобелка, модификацией некоторых аминокислотных остатков, сниженным содержанием эфиров холестерина, фосфолипидов, витамина Е, а также вызывали накопление липидов в перитониальных макрофагах мыши *in vitro* [Avogaro et al., 1991; Cazzolato et al., 1991]. Впоследствии эти данные были подтверждены другими исследователями [Vedie et al., 1991; Lin et al., 1995]. Также были получены данные о присутствии в крови человека фракции ЛНП, отличающейся от нативных меньшими размерами и более высокой плотностью – так называемые «мелкие/плотные» ЛНП [Shen et al., 1981]. Такие ЛНП имели пониженное содержание сиаловой кислоты [La Belle and Krauss, 1990] и вызывали накопление липидов макрофагами [Avogaro et al., 1991].

В таблице 2 приведены изменения основных физико-химических характеристик цммЛНП, «электроотрицательных» и «мелких/плотных» ЛНП по сравнению с нативными ЛНП. Можно видеть целый ряд признаков, общих как для циркулирующих модифицированных, так и для «электроотрицательных» и «мелких/плотных» ЛНП: малый размер частиц, высокая плотность, увеличенный поверхностный отрицательный заряд, измененный липидный состав и низкий уровень жирорастворимых витаминов, модификация аминокислотных остатков в составе апоB-100, повышенная склонность к окислению, способность индуцировать внутриклеточное накопление липидов (атерогенность). Кроме того, было показано, что в так называемых «электроотрицательных» липопротеидах уровень сиаловой кислоты значительно ниже, чем в нативных ЛНП [Tertov et al., 1995]. На основе полученных данных был сделан вывод о том, что все обнаруженные в крови человека модифицированные *in vivo* ЛНП: «электроотрицательные», «мелкие/плотные» и циркулирующие модифицированные ЛНП – представляют собой одну и ту же подфракцию близких по свойствам липопротеидных частиц, подвергшихся множественной модификации [Tertov et al., 1995; Тертов, 1999].

Важно отметить, что циркулирующие модифицированные, «электроотрицательные» и «мелкие/плотные» ЛНП имели повышенную склонность к ассоциации [Tertov et al., 1995]. Таким образом, ключевыми свойствами *in vivo* модифицированных ЛНП являются пониженная устойчивость к ассоциации и способность вызывать накопление липидов в культуре клеток.

Причины появления цммЛНП в крови человека не ясны до сих пор. Предположительно, модификация ЛНП может происходить под действием ферментов плазмы. Так, было показано присутствие в плазме транс-сиалидазы, фермента способного десиалировать ЛНП крови человека [Tertov et al 2001]. Не исключено участие в *in vivo* модификации ЛНП и других ферментов плазмы.

Таблица 2 - Сравнительная характеристика цммЛНП, «электроотрицательных» и «мелких/плотных» ЛНП, обнаруженных в крови человека по сравнению с нативными ЛНП [Тертов, 1999].

| Параметр | ЦММЛНП | Электроотрицательные ЛНП | Мелкие/плотные ЛНП |
|-----------------------------|--------|-----------------------------|-----------------------|
| | | | |
| Атерогенность | ↑ | ↑ | ↑ |
| Размер | ↓ | ↓ | ↓ |
| Плотность | ↑ | ? | ↑ |
| Отрицательный заряд | ↑ | ↑ | ↑ |
| Сиаловая кислота | ↓ | ↓ | ↓ |
| Эфиры холестерина | ↓ | ↓ | ↓ |
| Фосфолипиды | ↓ | ↓ | ↓ |
| Соотношение белок/липиды | ↑ | ↑ | ↑ |
| Окисляемость | ↑ | ↑ | ↑ |
| Антиоксиданты | ↓ | ↓ | ↓ |

| | | | |
|-------------|---|---|---|
| Модификация | ↑ | ↑ | ? |
| аминогрупп | | | |
| Ассоциация | ↑ | ↑ | ↑ |

Примечание: ↑ – увеличение параметра по сравнению с нативными ЛНП,

↓ – уменьшение параметра по сравнению с нативными ЛНП,

? – исследования не проводилось

1.3. Роль модифицированных ЛНП в развитии атеросклероза

Итак, в интиме артерий существует множество ферментов, способных модифицировать ЛНП. Для моделирования этого явления ЛНП подвергали химическому, ферментативному или механическому воздействию.

Так, Браун и Гольдштейн показали [Goldstein et al., 1979], что ацетилированные ЛНП попадают в клетку не через апоВ,E-, а через скэвенджер-рецепторы, что приводит к чрезмерному неконтролируемому накоплению липидов в клетках. Однако *in vivo* не существует предпосылок для ацетилирования ЛНП. Тем не менее, Браун и Гольдштейн считали, что существуют другие еще не выявленные модификации ЛНП, после которых они захватываются скэвенджер-рецептором к ацетилированным ЛНП [Goldstein et al., 1979]. Двумя годами позже Хенриксен с соавт. [Henriksen et al., 1981] обнаружили, что после инкубации с эндотелиальными клетками ЛНП приобретают способность вызывать накопление липидов в макрофагах, при этом захват клетками осуществлялся именно через скэвенджер-рецепторы к ацетилированным ЛНП.

Примерно в это же время было показано, что липопротеиды, обработанные малоновым диальдегидом (МДА) [Fogelman et al., 1980], также являются атерогенными, т.е. способными вызывать накопление внутриклеточных липидов. Причем скорость захвата и деградации клетками МДА-модифицированных ЛНП не изменялась при добавлении ацетилированных или нативных липопротеидов. Это значит, что они проникают в клетку не через апоВ,E- или скэвенджер рецепторы.

Вортексирование (интенсивное встряхивание) может служить моделью поведения липопротеидов в местах ветвления сосудов, где возникает высокое турбодинамическое напряжение. ЛНП после воздействия вортексом [Khoo et al., 1990] также вызывают накопление липидов в клетках. В процессе вортексирования образуются частицы более крупные, чем нативные липопротеиды, которые захватываются клетками путем фагоцитоза.

Кроме того, было выдвинуто предположение, что ЛНП могут быть гликозилированы *in vivo* (это особенно вероятно при заболевании диабетом). Были получены гликозилированные ЛНП [Lopes-Virella et al., 1988], которые вызывали накопление липидов в клетках в 3 раза большее, чем нативные ЛНП. Показано, что обработка липопротеидов различными ферментами, такими как липоксигеназа, миелопероксидаза, фосфолипаза А2 и С, сфингомиелиназа [Xu, Tabas., 1991; Chao et al., 1992., Major, Aviram., 1999., Hakala et al., 1999] также вызывает увеличение атерогенности ЛНП.

Наконец, в 1989 году Стайнберг с сотр. [Steinberg et al., 1989] предложили оригинальную гипотезу атерогенеза, основанную на предположении о том, что окисление представляет собой биологическую модификацию, аналогичную химической, изученной Брауном и Гольштейном, которая приводит к образованию пенистых клеток [Goldstein et al., 1979]. Было предположено, что окисление ЛНП может вносить вклад в развитие атеросклероза тем, что: 1) способствует в задержке (оседании) циркулирующих моноцитов в интимальном пространстве, 2) ингибитирует способность местных (резидентных) макрофагов покидать интиму, 3) способствует ускорению захвата ЛНП, которое приводит к образованию пенистых клеток, 4) из-за цитотоксичности окисленных ЛНП приводит к повышению проницаемости эндотелия [Quinn et al., 1985]. Однако многочисленные поиски в крови человека подфракции ЛНП, похожей на модифицированные *in vitro* ЛНП, в том числе окисленные ЛНП, не увенчались успехом.

1.4 Роль ассоциации ЛНП в атерогенезе.

Основная роль ЛНП в атерогенезе – доставка липидов в сосудистую стенку и последующее экстраклеточное и внутриклеточное накопление липидов в стенке сосуда. Ниже будут изложены данные о роли ассоциации ЛНП во внеклеточном и внутриклеточном накоплении липидов.

1.4.1 Роль ассоциации ЛНП во внутриклеточном накоплении липидов.

Внутриклеточное накопление липидов в стенке сосуда, ведущее к формированию пенистых клеток, является ключевым моментом в патогенезе атеросклероза. Результаты большинства исследований сводятся к тому, что инкубация нативных ЛНП с различными типами клеток не приводит к внутриклеточному накоплению липидов [Brown et al., 1983; Haberland et al., 1987, 1988]. Тем не менее, в отдельных работах продемонстрировано накопление липидов в предварительно активированных макрофагах в результате инкубации клеток с высокими концентрациями нативных ЛНП [Kruth et al 2002, Kruth et al 2005].

Нативные ЛНП попадают в клетку через специфические ЛНП-рецепторы, которые обладают механизмом отрицательной обратной связи [Goldstein and Brown, 1977]. Это дает возможность клетке регулировать внутриклеточное содержание холестерина. В то же время, ассоциаты модифицированных ЛНП вызывают накопление липидов в различных типах клеток.

Влияние различных модификаций, стимулирующих ассоциацию ЛНП, на накопление липидов в культуре клеток достаточно хорошо изучено. Например, было выдвинуто предположение, что ЛНП могут быть гликозилированы *in vivo* (это особенно вероятно при заболевании диабетом). Были получены гликозилированные ЛНП [Lopes-Virella et al., 1988], которые вызывали накопление липидов в клетках в 3 раза большее, чем нативные ЛНП. Показано, что обработка липопротеидов различными ферментами, такими как липоксигеназа, миелопероксидаза, фосфолипаза А2 и С, сфингомиелиназа [Xu,

Tabas., 1991; Chao et al., 1992; Major, Aviram., 1999; Hakala et al., 1999] также вызывает увеличение их атерогенности.

Причины внутриклеточного накопления липидов, по-видимому, заключаются в особенностях взаимодействия модифицированных липопротеидов с клетками. Так, Браун и Гольдштейн показали, используя культуру клеток мышиных перитонеальных макрофагов [Goldstein et al., 1979], что ацетилированные ЛНП попадают в клетку не через апоВ,Е-, а через скэвенджер-рецепторы, неконтролируемые по принципу обратной связи, что приводит к чрезмерному неконтролируемому накоплению липидов в клетках. Однако *in vivo* не существует предпосылок для ацетилирования ЛНП. Тем не менее, Браун и Гольдштейн считали, что существуют другие еще не выявленные модификации ЛНП, после которых они захватываются скэвенджер-рецептором к ацетилированным ЛНП [Goldstein et al., 1979]. Двумя годами позже Хенриксен с соавт. [Henriksen et al., 1981] обнаружили, что после инкубации с эндотелиальными клетками ЛНП приобретают способность вызывать накопление липидов в макрофагах, при этом захват клетками осуществлялся именно через скэвенджер-рецепторы к ацетилированным ЛНП. Окисленные, склонные к ассоциации ЛНП также захватываются человеческими моноцитами-макрофагами при помощи скэвенджер-рецепторов [Asmis et al 2000]. Дальнейшие исследования показали гетерогенность семейства скэвенджер-рецепторов: окисленные, агрегированные ЛНП преимущественно взаимодействуют с скэвенджер рецептором А [SRA I, SRA II], модифицированные липопротеиды, сохранившие устойчивость к ассоциации захватываются при помощи CD36 и скэвенджер рецепторов В [Endemann et al 1993; Asmis et al 2005].

Существуют и другие пути поступления в клетку различным образом модифицированных ЛНП. Так, было показано, что липопротеиды, обработанные малоновым диальдегидом (МДА) [Fogelman et al., 1980], также являются атерогенными, т.е. способными вызывать накопление

внутриклеточных липидов. Причем скорость захвата и деградации клетками МДА-модифицированных ЛНП не изменялась при добавлении ацетилированных или нативных липопротеидов. Это значит, что они проникают в клетку не через апоВ, Е- или скэвенджер рецепторы.

При изучении захвата ЛНП, модифицированных гипохлоритом, обнаружено, что окисленные липопротеиды вызывают внутриклеточное накопление липидов, частично проникая в клетку путем фагоцитоза, частично через CD36 и SR-BI рецепторы [Marsche et al., 2003].

Вортексирование (интенсивное встряхивание) может служить моделью поведения липопротеидов в местах ветвления сосудов, где возникает высокое турбодинамическое напряжение. ЛНП после воздействия вортексом также вызывают накопление липидов в клетках [Khoo et al., 1990]. В процессе вортексирования образуются частицы более крупные, чем нативные липопротеиды, которые захватываются клетками путем фагоцитоза.

Еще одним возможным путем поступления в клетку ассоциатов ЛНП, является так называемый ЛНП-рецептор родственный белок (LRP рецептор). Было показано, что этот рецептор участвует в захвате гладкомышечными клетками коронарных артерий человека ассоциатов ЛНП и липопротеидов, модифицированных версиканом [Llorente-Cortes et al 2000, 2002].

Таким образом, вне зависимости от типа модификации и механизма взаимодействия с клетками, все известные модификации ЛНП, стимулирующие ассоциацию липопротеидов индуцировали внутриклеточное накопление липидов.

1.4.2 Роль ассоциации ЛНП в экстраклеточном отложении липидов.

Внеклеточное накопление липидов в артериальной стенке также тесно связано с модификацией и последующей ассоциацией ЛНП. Так, было показано, что даже внешне непораженная интима аорты содержит внеклеточные липидные включения и везикулы [Tirziu et al 1995]. Кроме того,

при введении экспериментальным животным – новозеландским белым кроликам ЛНП человека было продемонстрировано появление в сосудистой стенке липидных включений, напоминающих ассоциаты ЛНП [Nievelstein et al 1991]. Кроме того, в ряде работ с использованием животных моделей [Mora et al 1987, Tamminen et al 1999, Nievelstein-Post et al 1994] было показано, что появление внеклеточных отложений липидов стимулирует миграцию моноцитов в стенку сосуда.

Внеклеточные отложения липидов можно разделить на четыре категории [Oorni et al 2000]: ЛНП-подобные частицы, частицы подобные липопротеидам очень низкой плотности (ЛОНП), липидные везикулы, липидные капли. ЛНП-подобные частицы отличаются от нативных липопротеидов низкой плотности увеличенным размером, сниженной гидратированной плотностью, повышенным содержанием лизофосфолипидов и сфингомиелина, пониженным уровнем фосфотидилхолина, частичной фрагментацией апоВ белка, повышенной электрофоретической подвижностью, присутствием маркеров окисления. Общей чертой всех липопротеид-подобных частиц выделяемых из сосудистой стенки является их склонность к ассоциации [Климов, Никульчева 1995]. Этот факт и значительный по сравнению с нативными ЛНП размер липопротеид - подобных частиц говорит о важной роли ассоциации ЛНП в формировании экстраклеточных липидных включений. Липидные капли характеризуются размером 40-200 нм, значительным уровнем эфиров холестерина, низким значением гидратированной плотности. Липидные везикулы не реагируют с моноклональными антителами к апоВ белку, насыщены сфингомиелином и неэтерифицированным холестерином, содержат альбумин, что говорит об их внеклеточном происхождении. ЛОНП-подобные частицы весьма сходны с липопротеидами очень низкой плотности крови, но отличаются пониженным уровнем триглицеридов [Oorni et al 2000]. По-видимому, все эти липидные включения ведут свое происхождение напрямую от липопротеидов плазмы

крови, проникших в стенку сосуда, а не являются результатом взаимодействия липопротеидов с клетками. В пользу этого предположения говорит преобладание линолеата холестерина в липидных включениях – как известно в ходе внутриклеточного метаболизма ЛНП происходит переэтерификация свойственного для ЛНП линолеата в олеат холестерина [Guyton et al 1994, Smith 1974]. Кроме того, размер экстраклеточных липидных отложений – 30 - 400 нм существенно меньше, чем размер внутриклеточных включений (400 - 6000 нм) [Guyton et al 1990, Chao et al 1990]. Одной из возможных причин формирования внеклеточных липидных включений – взаимодействие ЛНП с межклеточным матриксом сосудистой стенки. Так, было показано, что апоВ содержащие липидные капли тесно связаны с протеогликанами и коллагеновыми волокнами стенки сосуда [Frank and Fogelman 1989, Tamminen M et al 1999, Nievelstein et al 1991]. В то же время нативные ЛНП слабо взаимодействуют с протеогликанами сосудистой стенки *in vitro* при нейтральном pH и физиологических значениях ионной силы и концентрации кальция. Аффинность взаимодействия липопротеидов низкой плотности и межклеточного матрикса значительно повышается при модификации и последующей ассоциации частиц ЛНП [Iverius et al 1972, Camejo et al 1982]. Так, модификация ЛНП фосфолипазой A2, ведущая к ассоциации липопротеидных частиц, значительно повышала способность ЛНП взаимодействовать с гликозаминогликанами [Sartipy et al 1999] и протеогликанами аорты человека [Öörni K et al 1998]. Обработка ЛНП сфингомиелиназой, протеолитическими ферментами также приводит к ассоциации липопротеидов и увеличению связывания с межклеточным матриксом [Öörni K et al 1998, Paananen et al 1994, Paananen et al 1995].

Механизм связывания ЛНП межклеточным веществом, вероятно, заключается во взаимодействии положительно заряженных лизина и аргинина апоВ белка и отрицательно заряженных карбоксильных и сульфатных групп гликозаминогликанов. Увеличение количества молекул апоВ в ассоциатах и

структурные перестройки аполипопротеина, делающие доступными новые места связывания, объясняют усиление взаимодействия ассоциатов ЛНП с межклеточным веществом [Öörgni K et al 1998, Paananen et al 1995].

1.5 Ингибиторы ассоциации ЛНП.

Итак, ассоциация ЛНП играет важнейшую роль на ранних стадиях атерогенеза, связанных с внеклеточным и внутриклеточным накоплением липидов. Отсюда понятен интерес к потенциальным ингибиторам ассоциации ЛНП. Однако исследован этот вопрос недостаточно. Khoo и соавторы показали, что ассоциация ЛНП, индуцируемая вортексированием или фосфолипазой С, подавляется альбумином, липопротеидами высокой плотности [ЛВП] и аполипопротеином А-I [Khoo et al, 1990]. В то же время 2,5 М NaCl не влиял на ассоциацию ЛНП. Эти же авторы первыми предположили, что ассоциация ЛНП обусловлена гидрофобными взаимодействиями частиц. Исходя из этого способность апоA-I белка подавлять ассоциацию ЛНП объясняется его амфипатными свойствами, благодаря которым аполипопротеид взаимодействует с гидрофобными доменами на поверхности ЛНП и предотвращает, таким образом, взаимодействие частиц. Впоследствии Liu и соавторы подтвердили вышеизложенные результаты, продемонстрировав, что человеческий апоA-I и аполипофорин насекомых ингибируют ассоциацию ЛНП, вызванную обработкой фосфолипазой С [Liu et al, 1993]. Talbot и соавторы показали, что термическая обработка альбумина увеличивала его способность ингибировать ассоциацию ЛНП. По-видимому, это явление связано с увеличением гидрофобности денатурированного белка и, следовательно, увеличением способности экранировать гидрофобные домены ЛНП. Эти же авторы пытались моделировать механическое воздействие тока крови на ассоциацию ЛНП. В рамках этой модели также было показано ингибирующее действие компонентов плазмы на ассоциацию ЛНП [Talbot et al, 2003]. Таким образом, в ряде работ были описаны эндогенные ингибиторы ассоциации ЛНП:

ЛВП, апоA-I и некоторые другие аполипротеиды, альбумин. Все эти биомолекулы объединяют выраженные амфифильные свойства.

Вместе с тем почти не исследовано влияние экзогенных амфифильных агентов на ассоциацию ЛНП. Одним из гипотетических модуляторов ассоциации ЛНП могут являться биодоступные амфифильные блок-сополимеры оксида пропилена и оксида этилена, т.н. плюроники.

1.6 Характеристика и основные свойства плюроников.

Эти полимеры состоят из липофильной – образованной окисью пропилена (ОП), и гидрофильной, построенной окисью этилена (ОЭ), частей и имеют следующую структуру: $[OЭ]_N-[OП]_M-[OЭ]_N$. Такая структура определяет основные свойства плюроников, в том числе способность к образованию мицелл. Важными характеристиками плюроников являются критическая концентрация мицеллообразования (ККМ), при превышении которой происходит сборка отдельных сополимеров в мицеллы, а также гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ), отражающий соотношение гидрофильных и гидрофобных свойств вещества [Kabanov A.V. et al, 2002]. В настоящее время существует большое количество плюроников, отличающихся количеством мономеров ОЭ и ОП, и соответственно характеризующихся разными гидрофильными и липофильными свойствами, молекулярной массой и ККМ [Batracova et al, 2003]. Так, полимеры, характеризующиеся значительным количеством остатков ОП и небольшим ОЭ отличаются высокой липофильностью, относительно низкими ККМ и ГЛБ – плюроники L61, L81. Напротив, плюроники в составе которых ОЭ преобладает гидрофильны и характеризуются высокими значениями ККМ и ГЛБ (например, плюроники F68 и F108). Наконец, существует группа плюроников с промежуточными свойствами – плюроники P85, P103. Активно исследуется возможность применения плюроников в качестве переносчиков лекарственных средств, отличающихся низкой биодоступностью. Показано, что эти полимеры

стимулируют транспорт ряда веществ через гемато-энцефалический барьер [Batrakova et al., 2001].

Также известно, что плюроники тормозят выведение лекарства из раковых клеток, устойчивых к химиотерапии, по-видимому, за счет подавления эффлюкса лекарственных средств, опосредованных Р-гликопротеином. Кроме того, плюроники проявляют собственную разностороннюю биологическую активность, в том числе и способность влиять на обмен липидов. Так, при пероральном приеме плюроник L81 нарушил сборку и секрецию хиломикронов, способствовал снижению уровня холестерина ЛНП и липопротеидов очень низкой плотности (ЛОНП) и предотвращал развитие индуцированных диетой гиперхолестеринемии и атеросклероза у крыс [Manowitz NR et al, 1986].

Из вышеизложенного можно заключить, что ассоциация ЛНП играет важнейшую роль в атерогенезе и тесно связана с внутриклеточным и внеклеточным накоплением липидов. Однако возможности модуляции ассоциации ЛНП – как стимуляции, так и подавления этого процесса изучены недостаточно. В этой работе приведены результаты исследования стимулирующего действия различных модификаций на ассоциацию ЛНП и изучения потенциальных экзогенных ингибиторов ассоциации ЛНП.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Объекты исследования

2.1.1. Выделение липопротеидов из плазмы крови человека [Tertov et al., 1995]

Кровь брали из локтевой вены донора с утра после двенадцатичасового голодания в пластиковую пробирку, содержащую 1% ЭДТА. Плазму отделяли от клеток крови двукратным центрифугированием по 15 минут при 2500 об/мин на центрифуге TJ-6 (Beckman Industrial Estate Mervue, Galuay, Ирландия). К плазме добавляли твердую соль NaBr из расчета 0,5 г соли на 1 мл, разливали по 5 мл в 16x76-мм поликарбоновые центрифужные пробирки (Beckman Instruments, Palo Alto, CA) и насыщали сверху по 5 мл раствора NaBr с плотностью 1,019 г/мл. Пробы центрифугировали в течение 2 часов при 41000 об/мин на центрифуге L8-55 (ротор 65Ti; Beckman Instruments, Inc., США). После ультракентрифугирования отбирали зону, содержащую ЛНП. В образцы ЛНП снова добавляли NaBr из расчета 0,5 г соли на 1 мл пробы, повторно центрифугировали в тех же условиях и отбирали зону ЛНП. Полученные липопротеиды диализовали при 4°C в течение ночи против 2000 объемов ИФБ (изотонический фосфатный буфер) pH 7,4 и после этого стерилизовали фильтрацией (диаметр пор 0,45 мкм).

2.1.2. Получение нативных и циркулирующих модифицированных липопротеидов из плазмы крови человека

ЛНП разделяли на нативные и циркулирующие модифицированные методом лектин-хроматографии на *Ricinus communis* агглютинин (РКА₁₂₀) агарозе, как описано ранее [Tertov et al., 1990]. Для разделения липопротеидов колонки, содержащие 1 мл РКА₁₂₀-сепарозы, уравновешивали 10 мл ИФБ, pH 7,2. Наносили 0,5-1 мл препарата липопротеидов, содержащего от 0,2 до 2 мг белка. Колонку промывали 3 мл ИФБ, при этом на выходе получали фракцию

липопротеидов с нормальным содержанием сиаловой кислоты (сиалированные липопротеиды). Для удаления не специфически связавшихся с сорбентом липопротеидов колонку промывали 10 мл ИФБ. Фракцию липопротеидов с низким содержанием сиаловой кислоты (десиалированные липопротеиды) элюировали 3 мл 50 mM галактозы.

К полученным липопротеидам добавляли твердую соль NaBr из расчета 0,5 г на 1 мл образца и концентрировали методом ультрацентрифугирования, затем диализовали против 2000 объемов ИФБ, как описано выше.

2.1.3. Выделение белых клеток крови человека

Из локтевой вены здорового донора с утра натощак брали 50 мл крови в стерильную пластиковую пробирку, содержащую 5 мл стерильного 3,8%-ного цитрата натрия в ИФБ. Кровь центрифугировали 20 мин при 3000 об/мин на центрифуге TJ-6 (Beckman Industrial Estate Mervue, Galuay, Ирландия). Плазму отбрасывали, оставшуюся часть, содержащую форменные элементы крови, доводили до первоначального объема стерильным ИФБ. В стерильную пластиковую пробирку вносили фиколл из расчета 0,5 мл на 1 мл полученной суспензии форменных элементов крови. На фиколл насылаивали суспензию форменных элементов крови и центрифугировали 30 мин при 3000 об/мин. Фракцию моноцитов и лимфоцитов отбирали с границы раздела фаз в стерильных условиях. Полученную фракцию моноцитов и лимфоцитов суспендировали в 1 мл стерильного ИФБ, доводили стерильным ИФБ до 50 мл и центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Осадок моноцитов и лимфоцитов отмывали еще 2 раза стерильным ИФБ, как описано выше. Отмытый осадок моноцитов и лимфоцитов суспендировали в 1 мл среды 199. Количество полученных моноцитов и лимфоцитов подсчитывали под микроскопом (Amplival, Германия) в гемоцитометре на увеличении $\times 10$ в 5 больших квадратах. Количество моноцитов и лимфоцитов подсчитывали по формуле:

Количество клеток = $N \cdot 5 \cdot 10^5 \cdot V$, где N – количество клеток в 5 квадратах, V – объем суспензии моноцитов.

2.1.4. Выделение и культивирование клеток интимы аорты человека

Клетки были получены из аорт мужчин и женщин в возрасте 40-65 лет в течение 1,5-3 часов после внезапной смерти. Причиной смерти в подавляющем большинстве случаев была острая сердечно-сосудистая недостаточность. Субэндотелиальные гладкомышечные клетки выделяли из непораженных участков интимы путем обработки коллагеназой и культивировали в соответствии с методом Орехова с сотр. [Orehov et al., 1983; 1985; 1988]. В стерильных условиях после механического удаления адвенции аорту разрезали вдоль и промывали в среде 199, содержащей по 100 ед/мл пенициллина и стрептомицина и 2,5 мкг/мл фунгизона. Из лоскута аорты вырезали участки, не имеющие видимых атеросклеротических поражений, а также жировые полосы и атеросклеротические бляшки. Затем с помощью пинцетов интиму отделяли от медии, при этом разрыв идет по внутренней пограничной эластической мемbrane [Orehov et al., 1985]. Полученный материал пинцетами разделяли на волокна. К измельченной интиме добавляли 0,15% раствор коллагеназы II типа (Worthington Diagnostic System, США) в среде 199, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Flow, Великобритания), 2 mM L-глутамин, 100 ед/мл пенициллина, 100 ед/мл стрептомицина, 2,5 мкг/мл фунгизона (все реактивы Grand Island Biological Company - GIBCO, США), из расчета 10 мл раствора фермента на 1 г сырой ткани. Инкубация интимы с коллагеназой проводилась на водяной бане при 37°C с постоянным перемешиванием со скоростью 50 об/мин (Aquaterm, New Brunswick Scientific Company, США) до практически полного растворения ткани, что обычно занимало 2-3 часа. Полученную суспензию клеток фильтровали через нейлоновую сетку и центрифугировали при 4°C в течение 20 мин при 1000 об/мин на центрифуге Beckman TJ-6 (Beckman Industrial Estate

Mervue, Galuay, Ирландия). Осажденные клетки промывали в 10 мл ростовой среды 199, содержащей антибиотики и 10% эмбриональную телячью сыворотку, и повторно центрифугировали при тех же условиях. Осадок ресуспендировали в 10 мл ростовой среды и производили подсчет полученного количества клеток в счетной камере, как описано выше. Клетки сажали в пластиковый стерильный 48-гнездный или 24-гнездный мультивелл для тканевых культур (Nunclon, Дания) из расчета $2-4 \times 10^4$ клеток/см². В некоторых экспериментах использовали культуру клеток на покровных стеклах, для этого на дно лунки мултивелла, в который сажали клетки, клади стерильное покровное стекло. Клетки культивировали при 37°C в насыщенной водяными парами атмосфере, содержащей 95% воздуха и 5% углекислого газа, в CO₂-инкубаторе (Forma Scientific, США). Смену среды проводили через день. Для экспериментов использовали 7-10-дневную первичную культуру клеток.

2.1.5. Культура макрофагов человека

К полученным описанным выше методом белым клеткам крови человека добавляли 10 мл среды 199, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотики, как описано выше. Осадок ресуспендировали в 10 мл той же среды и производили подсчет полученного количества клеток в счетной камере, как описано выше. Клетки сажали в пластиковый стерильный 48-гнездный или 24-гнездный мультивелл для тканевых культур (Nuclon, Дания) с плотностью $1-2 \times 10^5$ клеток/см², инкубировали в CO₂-инкубаторе при 100% влажности и 37°C в течение 14 суток со сменой инкубационной среды через каждые 48 часов. В экспериментах использовали культуру на 14-й день культивирования.

2.1.6. Культивирование клеток с исследуемыми липопротеидами низкой плотности

В день эксперимента культуральную среду заменяли на свежую среду 199, содержащую 10% липопротеид-дефицитную сыворотку крови здоровых доноров, полученную ультрацентрифугированием ($d>1,215$ г/мл) [Lindgren, 1977], а также по 100 ед/мл пенициллина и стрептомицина, 2,5 мкг/мл фунгизона и 2 мМ L-глутамин, и к ней добавляли исследуемые ЛНП в конечной концентрации 100 мкг/мл по белку. Контрольные культуры клеток инкубировали в такой же среде, но без добавления ЛНП. После инкубации в течение 24 часов культуры тщательно отмывали от среды дважды ИФБ, затем дважды ИФБ, содержащим 0,2% БСА, и еще трижды ИФБ.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Определение содержания внутриклеточного холестерина

После отмычки клеток внутриклеточные липиды трижды экстрагировали смесью гексан/изопропанол (3:2 по объему) по методу Hara and Radin (1978), каждая экстракция продолжалась по 30 мин. Экстракт переносили в чистый 96-гнездный микротест и высушивали при комнатной температуре в токе воздуха. Полученный сухой осадок растворяли в 25 мкл раствора, содержащего 15 мМ холат натрия и 0,05% тритон X-100 (Sigma, США), добавляли по 25 мкл изопропанола и по 100 мкл раствора «Monotest» (Boehringer Mannheim, Германия) для определения общего холестерина, содержащего 0,2 Ед/мл холестеринэстеразы, 0,1 Ед/мл холестериноксидазы, 0,1 Ед/мл пероксидазы хрена, 1 мМ 4-аминофеназон, 3 мМ фенол и 2 мМ 3,4-дихлорфенол в 50 мМ трис-буфере, pH 7,7. В качестве стандарта использовали раствор холестерина в изопропаноле, 1 мг/мл (Boehringer Mannheim, Германия). Смесь инкубировали при 37°C в течение 30 мин, после чего измеряли оптическую плотность проб при длине волны 492 нм на Multiskan Bichromatic (Labsystems OY, Helsinki, Финляндия) и рассчитывали содержание общего холестерина в каждой пробе

[Orekhov et al., 1986].

2.2.2. Определение клеточного белка

Фиксированные на пластике клетки после экстракции липидов растворяли в 50 мкл 0,2 н NaOH при комнатной температуре в течение 12-16 часов, после чего определяли содержание клеточного белка в каждой пробе по методу Lowry et al. (1956). К пробе добавляли 200 мкл свежеприготовленного 0,2 н раствора NaOH, содержащего 0,01% тартрата калия-натрия, 0,005% сульфата меди и 0,02% карбоната натрия, затем 20 мкл 1 н реактива Фолина (Sigma, США) и выдерживали при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего измеряли оптическую плотность проб на спектрофотометре «Multiscan MCC» при длине волны 690 нм и рассчитывали содержание клеточного белка в каждой пробе [Orekhov et al., 1986]. В качестве стандарта использовали раствор БСА (1 мг/мл) в 0,2 н NaOH.

2.2.3. Приготовление ^{125}I -меченых препаратов липопротеидов

Приготовление ^{125}I -меченых препаратов ЛНП проводили по описанной ранее методике [Bilheimer et al., 1972]. К 300мкл препарата ЛНП, диализованного против 0,1М раствора дигидрофосфата калия pH 7,6, добавляли меченный йодид натрия (17мКи/моль) из расчета 100мКи/мг белка ЛНП, затем добавляли 100мкл раствора хлорамина Т (Sigma Chemical Company, США) в том же буфере 2,6 мг/мл, пробирку плотно закрывали пробкой и интенсивно встряхивали в течение 60 секунд. Затем к смеси добавляли 25 мкл 0,75% раствора сульфита натрия в том же буфере и в открытой пробирке выдерживали в течение 5 минут вытяжном шкафу. Полученный меченный препарат ЛНП диализовали против 2000 объемов изотонического фосфатного буфера в течение 24 часов при 4°C с трехкратной сменой диализующего раствора.

Около 95% связавшейся метки находилось в ТХУ-нерасторимой

фракции препарата; при экстракции липидов по Folch et al. (1957) только около 4% связавшейся метки обнаруживалось в липидной части ЛНП. Содержание метки в фракциях ЛНП контролировали с помощью автоматического гамма-счетчика «1272 Clinigamma» (LKB, Швеция).

2.2.4. Инкубация клеток с исследуемыми ^{125}I -меченными ЛНП в экспериментах по изучению их связывания, захвата и деградации

При изучении связывания радиоактивно-меченных ЛНП клеточными рецепторами за 24 часа до начала эксперимента в мультивеллах с клетками меняли среду, содержащую 10% телячьей сыворотки на среду, содержащую 10% липопротеид-дефицитной сыворотки человека. За 30 минут до начала эксперимента клетки охлаждали в течение 30 мин при 4°C, после чего среду 199 заменяли на среду 199, содержащую 10% липопротеид-дефицитной сыворотки человека и различные концентрации ^{125}I -меченных ЛНП в присутствии или отсутствие избытка конкурирующих не меченых ЛНП. В этой среде клетки инкубировали в течение 2 часов при 4°C. После инкубации клетки быстро отмывали в буфере, содержащем 150 mM NaCl, 50 mM трис-HCl (pH 7,4) и 2 мг БСА, при 4°C. Каждая инкубация длилась по 10 минут с последующей промывкой в аналогичном буфере, не содержащем БСА. После последней промывки клетки растворяли в 0,5 мл 0,1 н NaOH в течение 1 часа при комнатной температуре. Полученный раствор белка в щелочи переносили в пластиковые пробирки с крышками и просчитывали интенсивность гамма-излучения на гамма-счетчике 1272 «Clinigamma», LKB (Швеция).

В экспериментах по изучению захвата и деградации ЛНП (под захваченными ЛНП подразумевали липопротеиды, связанные поверхностно-экспрессированными рецепторами и липопротеиды, интернализированные внутрь клетки) клетки инкубировали в описанной выше среде, содержащей ^{125}I -меченные ЛНП в присутствии или отсутствие избытка не меченых ЛНП в течение 5 часов при 37°C в CO₂-инкубаторе. Инкубационную среду переносили

в стеклянные пробирки для последующего измерения деградации ЛНП протеолитическими ферментами клеток. Клетки, оставшиеся на пластике отмывали, растворяли в 0,1 н NaOH и измеряли интенсивность гамма-излучения, как описано выше.

2.2.5. Исследование деградации ^{125}I -меченых ЛНП культурами клеток

Инкубационную среду, обычно в количестве 400 мкл, переносили в стеклянные пробирки, в которые затем добавляли 100 мкл 50% трихлоруксусной кислоты для осаждения не деградировавших ^{125}I -меченых ЛНП. Полученную смесь оставляли на 30 минут при 4°C с последующим центрифугированием при 100 об/мин в течение 5 минут. К отобранному супернатанту в количестве 300 мкл добавляли 3 мкл 40% йодида калия и затем после тщательного перемешивания 12 мкл 30% пероксида водорода. Снова тщательно перемешивали и оставляли на 5-10 минут при комнатной температуре. К полученной смеси добавляли 600 мкл хлороформа, тщательно перемешивали на вортексе и оставляли на 15 минут при комнатной температуре, при этом восстановленный радиоактивный молекулярный йод экстрагировался в нижнюю хлороформную фазу. Из верхней водной фазы, содержащей ^{125}I -моноиодтирозин, отбирали аликвоту 200 мкл, переносили в пластиковые пробирки с крышками и просчитывали интенсивность гамма-излучения. В качестве контроля использовали аликвоту среды (400 мкл), инкубированной без клеток и обработанной по вышеописанной схеме.

2.3 Анализ ЛНП.

2.3.1 Экстракция липидов из ЛНП.

Суммарные липиды ЛНП экстрагировали по методу Bligh and Dyer, 1967. Для этого к 25 мкл ЛНП, содержащим 20-35 мкг белка добавляли 450 мкл смеси хлороформ-метанол 1:2 (объем-объем), встряхивали и инкубировали при

комнатной температуре 2 часа в закрытых пробирках. Далее смесь центрифугировали (4500 об/мин, 15 мин) и супернатант переносили в другую пробирку. Осадок ресуспендировали в 120 мкл дистиллированной воды и повторяли экстракцию хлороформ-метанолом, описанную выше. Супернатанты объединяли и добавляли 600мкл смеси хлороформа и воды в объемном соотношении 1:1, интенсивно встряхивали и центрифугировали 10 минут при 4500 об/мин. Затем тонкой пастеровской пипеткой отбирали хлороформную фазу, упаривали ее до сухого остатка, который растворяли в 50 мкл смеси хлороформ-метанола 2:1 (объем-объем).

2.3.2 Анализ липидов ЛНП при помощи тонкослойной хроматографии.

Изменения липидного состава ферментативно модифицированных липротеидов оценивались при помощи тонкослойной хроматографии. На пластины для тонкослойной хроматографии (Merck, Германия) наносили полученный экстракт липидов ЛНП, а также стандарты липидов. Нейтральные липиды отделяли при помощи хроматографии в системе гексан-ацетон 1:3 (объем-объем). Состав фосфолипидов анализировали при помощи тонкослойной хроматографии в системе хлороформ-метанол-уксусная кислота-вода 25:15:4:2 (объем-объем-объем-объем). Для визуализации пиков фосфолипидов пластину погружали в раствор CuSO₄(3%)/H₃PO₄(8%) и затем осуществляли нагревание пластины до 150°C. Далее пластины сканировались при помощи денситометра Shimadzu CS-930 (Shimadzu, Япония) при длине волны 200 нм.

2.3.3 Электрофорез в полиакриламидном геле.

Анализ фрагментации апоB белка ферментативно модифицированных ЛНП проводили при помощи фореза в полиакриламидном геле [ПААГ], используя буферную систему Laemmly [Laemmly et al 1970]. Гели с концентрацией полиакриламида 3 и 7% готовили на основе исходного 30% акриламида и 0,8% N,N–бис-акриламида. Концентрирующий гель – 4%

полиакриламид в 0,125 М Трис-HCl, pH 6,8, 0,1% додецилсульфат натрия. Разделяющий гель – 7% полиакриламид в 0,375 М Трис-HCl, pH 8,8, 0,1 % додецилсульфат натрия.

Электрофоретический буфер – 0,05 М Трис, 0,384 М глицин, pH 8,3, Исследуемые образцы (5-10 мкг белка) растворяли в 0,01М Трис-HCl, pH 8,0, 0,001 М ЭДТА, 1% додецилсульфат натрия и нагревали 5 минут при 100°С. При проведении электрофореза поддерживалось напряжение 60 вольт, после вхождения белков в разделяющий гель напряжение поднимали до 120 вольт. Использовали прибор для вертикального электрофореза с пластинами размером 10*10 см, толщина геля 1 мм. Окрашивание геля производили 0,1 25% раствором Coomasie Blue R-250 (Sigma, США).

2.3.4 Электрофорез в агарозном геле.

Суммарный поверхностный заряд частиц ЛНП определяли с помощью электрофореза в агарозном геле [Schalkwijk C. et al., 1998]. Агарозный гель – 1% агароза в 40 mM вероналовом буфере, pH 8,5 [40 mM 5,5-диэтибарбитуровая кислота, 4 mM ЭДТА]. Буфер для электрофореза – 10 mM Трис-глициновом буфере, pH 8,0, содержащем 10% глицерин. Электрофорез проводили в течение 45 минут при напряжении 90 В. Для анализа ЛНП использовали 1 % агарозный гель. Гель фиксировали 100 % метанолом (30 сек), окрашивали при помощи красителя Fat Red 7B. От избытка красителя избавлялись 70 % метанолом. Электрофоретическую подвижность модифицированных ЛНП сравнивали с нативными ЛНП.

2.3.5 Определение тиобарбитуровая кислота (ТБК)-реактивных продуктов.

К образцу ЛНП концентрацией 0,4 мг/мл по белку объемом 0,5 мл добавляли 25 мкл 20 mM ионола (для предотвращения окисления во время теста), перемешивали, добавляли 1,5 мл 1,5% H₃PO₄ и 0,5 мл 0,5% ТБК, перемешивали, неплотно прикрывали пробирки пробками, выдерживали при

100⁰С в течение 45 минут, охлаждали до комнатной температуры, добавляли по 2 мл *n*-бутанола, тщательно перемешивали и центрифугировали 20 минут при 3000 об./мин для достижения расслоения фаз. Далее отбирали верхнюю бутанольную фазу и определяли спектр ее поглощения в области от 515 нм до 550 нм относительно бутанола. Рассчитывали оптическую плотность при 532 нм относительно двух базовых длин волн - 515 нм и 550 нм.

$$D_{532/515/550}=D_{532}-0,5*[D_{515}+D_{550}]$$

Содержание ТБК-реактивных продуктов выражали через эквивалентное количество МДА, считая мольный коэффициент экстинкции МДА при 532 нм равным $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$:

$$[\text{МДА}], \text{ мкM}=6,41 * D_{532/515/550} * [2000 / [\text{объем образца в мл}]]$$

$$[\text{МДА}], \text{ нмоль/мг белка} = [[\text{МДА}], \text{ мкM} / [\text{белок, мг/мл}]] [\text{Uchiyama et al 1978}]$$

2.3.6 Определение содержания сиаловой кислоты в ЛНП.

Использовались по 4 аликовоты из каждого препарата (2 – опытные, 2- контрольные для определения поправки на содержание ТБК-реактивных продуктов). К образцу, содержащему 50-100 мкг ЛНП (по белку), добавляли равный объем трихлоруксусной кислоты, после чего перемешивали и инкубировали 20 минут при 4⁰С. Пробы центрифугировали при 4500 об./мин в течение 10 минут; к осадку добавляли 200 мкл 0,1N H₂SO₄ и перемешивали. Образцы гидролизовали при 80⁰С в течение 1 часа. После охлаждения к опытным образцам добавляли 10 мкл 0,2M NaIO₄ в 9 M H₃PO₄, к контрольным – 10 мкл 9M H₃PO₄; образцы тщательно перемешивали и инкубировали 20 минут при комнатной температуре. Далее к опытным образцам добавляли 100 мкл 10% NaAsO₂ в 0,5M Na₂SO₄ и 0,1N H₂SO₄, к контрольным 100 мкл 0,5M Na₂SO₄; образцы тщательно перемешивали до исчезновения желто-коричневого окрашивания. Сразу после этого к пробам добавляли 250 мкл 0,6% раствор тиобарбитуровой кислоты в 0,5M Na₂SO₄, перемешивали. Далее образцы инкубировали на кипящей водяной бане в течение 15 минут. В охлажденные пробы добавляли 400 мкл трет-бутанола. Образцы интенсивно

перемешивали на вортексе в течение 5 секунд дважды с интервалом 5 минут. Пробы центрифугировали при 4500 об./мин в течение 10 минут для разделения фаз. Из органической фазы отбирали 250 мкл и переносили в 96-луночную планшету и измеряли оптическую плотность при 540 нм (Multiskan Bichromatic (Labsystems OY, Helsinki, Финляндия)). Среднее значение, полученное в контрольных пробах, характеризует содержание ТБК-реактивных продуктов. Его вычитали из среднего значения, полученного в опытных образцах. В качестве стандарта использовался раствор водный сиаловой кислоты 1мг/мл.

2.3.7 Изучение особенностей структуры модифицированных ЛНП методом твердофазного иммуноферментного анализа

Моноклональные антитела мыши к апоВ-100 человека, полученные методом гибридизации, и их характеристики были любезно предоставлены лабораторией клеточной инженерии ИЭК РКНПК (зав. лаб. Т.Н. Власик) [Янушевская с соавт., 1999]. Всего в работе было использовано 7 антител, продуцируемых клонами: 2E3, 2G1, 7C2, 3C8, 5F8, 4C11 и 3G4. Основные характеристики использованных антител приведены в таблице 3.

Для определения связывания ЛНП с моноклональными антителами использовали 96-луночную плашку (Nunc, Roskilde, Дания). В лунки вносили 100 мкл поликлональных антител козы к апоВ-100 человека (ИМТЕК, Россия) в изотоническом фосфатном буфере (ИФБ; GIBCO, Paisley, Великобритания; KCl 0,2 г/л, KH₂PO₄ 0,2 г/л, NaCl 8 г/л, Na₂HPO₄ 1,15 г/л, pH 7,2) в концентрации 1 мкг/мл и инкубировали в течение 24 ч при 4°C. После каждой инкубации лунки промывали ИФБ, содержащим 0,2% БСА. Далее в лунки вносили 100 мкл ИФБ, содержащего 2% БСА и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. В лунки добавляли ЛНП и инкубировали 2 ч при комнатной температуре. Диапазоны концентраций ЛНП были подобраны для каждого моноклонального антитела в предварительных экспериментах. Затем в лунки добавляли по 100 мкл моноклональных антител мыши к апоВ-100 человека и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Оптимальная концентрация моноклональных антител

была подобрана в предварительных экспериментах и составляла то 10 до 50 мкг/мл. В лунки вносили по 100 мкл меченых пероксидазой поликлональных антител козы к иммуноглобулинам мыши (1 мкг/мл) и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Последующее проявление проводили добавлением 0,1 М цитратного буфера, pH 4,5, содержащего 0,04% ортофенилендиамина и 0,003% H₂O₂. Инкубировали 30 мин при 37°С. Реакцию останавливали добавлением 20 мкл 50% H₂SO₄. Оптическую плотность измеряли при длине волны 492 нм на многоканальном спектрофотометре Multiskan Bichromatic (Labsystems OY, Helsinki, Финляндия).

Таблица 3. Характеристика использованных в работе моноклональных антител.

| Антитело | Антиген | Эпитопная антител | специфичность |
|----------|------------------------------------|---|---------------|
| 5F8 | Апо-B-100 | 1-1297 аминокислотные остатки апо-B-100 | |
| 4C11 | Апо-B-100 | 2377-2658 аминокислотные остатки апо-B-100 | |
| 2E3 | Апо-B-100 | 3728-4306 аминокислотные остатки апо-B-100 | |
| 3C8 | Апо-B-100 | - | |
| 2G1 | Апо-B-100, модифицированный МДА | - | |
| 7C2 | Апо-B-100, модифицированный МДА | - | |
| 3G4 | Апо-B-100, модифицированный МДА | - | |

Для всех изученных моноклональных антител проводились предварительные эксперименты с целью исключения возможности их неспецифического связывания с поликлональными антителами козы к человеческому апоВ-100.

2.3.8. Исследование ЛНП методом спиновых зондов

Спектры ЭПР регистрировали при комнатной температуре на радиоспектрометре E-4 «Varian» (США). Условия записи спектров: микроволновая частота 9,1 ГГц, амплитуда высокочастотной модуляции 0,1–0,4 мТл, микроволновая мощность 10 мВт, постоянная времени фильтра 0,3 с, скорость сканирования 1,25 мТл/мин. Структурные формулы использованных в работе зондов приведены на рис. 3. Зонды вводили в ЛНП (0,8–1,0 мг белка/мл) в виде этанольного раствора. Конечная концентрация этанола при этом не превышала 1% (по объему). К записи спектра приступали спустя 10 мин после добавления к ЛНП зондов 1–4 или спустя 1 ч после добавления зонда 5.

На рис. 4 показаны для примера спектры ЭПР зондов 2 и 4 в ЛНП, а также указаны параметры, измеряемые из спектров, служащие для расчета искомых параметров τ , S и h.

Время корреляции вращений τ используется для характеристики высокочастотного вращательного движения парамагнитного центра. Чем быстрее и ближе к изотропному это движение, тем меньше значение τ . Для расчета τ мы пользовались формулой [Кузнецов АН., 1976]:

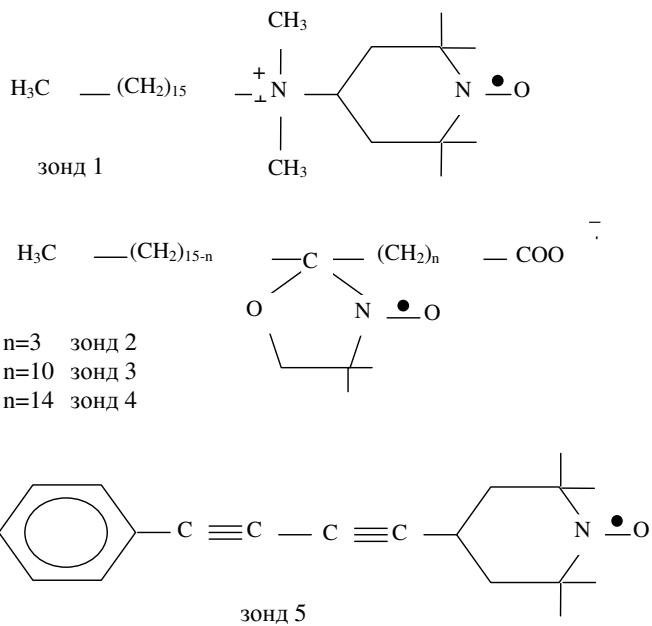


Рисунок 3 - Структурные формулы спиновых зондов, использованных в работе.

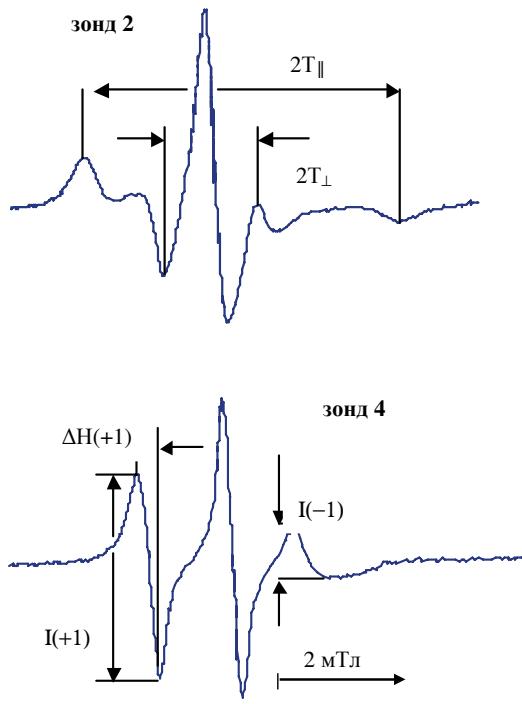


Рисунок 4 - Спектры ЭПР зондов в ЛНП: 5-доксилстеариновой кислоты (зонд 2) и 16-доксилстеариновой кислоты (зонд 4); $t^o = 22^{\circ}\text{C}$. Указаны параметры, измеряемые из спектров ЭПР.

$$\tau = 0,665 \times \Delta H(+1) \times [(I(+1)/I(-1))^{1/2} - 1], \text{ нс},$$

где $\Delta H(+1)$, Гс – ширина низкопольной линии сверхтонкой структуры спектра; $I(+1)$ и $I(-1)$ – амплитуды низкопольной и высокопольной линий, соответственно (рис. 4). Эта формула дает точную количественную оценку τ при $\tau < 1$ нс, но в целях сравнительного анализа возможно ее применение и в более широком диапазоне. Мы рассчитывали τ из спектров ЭПР зондов 1, 4 и 5.

Жирнокислотный спиновый зонд в фосфолипидном слое помимо вращательного движения вокруг своей оси испытывает отклонения самой оси от положения преимущественной ориентации. Чем более плотная, упорядоченная упаковка молекул, окружающих зонд, тем меньше средний угол таких отклонений и тем больше так называемый параметр упорядоченности S , который удобно вычислять по формуле [Gaffney BJ., 1975]:

$$S = 1,723 \times [T_{\parallel} - (T_{\perp} + C)] / [T_{\parallel} + 2 \times (T_{\perp} + C)],$$

$$C = 1,4 - 0,053 \times (T_{\parallel} - T_{\perp}), \text{ Гс},$$

где T_{\parallel} и T_{\perp} – половина расстояния (в Гс), соответственно, между внешними и внутренними экстремумами линий сверхтонкой структуры спектра (рис. 4).

Спиновая плотность на атоме азота нитроксильной группы зонда и, следовательно, форма спектра зависят от полярности среды. В ЭПР-спектроскопии нитроксильных радикалов для оценки полярности среды служит параметр гидрофобности h . Увеличение h свидетельствует об увеличении гидрофобности (уменьшении полярности) окружения нитроксильной группы зонда. Мы рассчитывали h по формуле [Кузнецов АН, 1976]:

$$h = (a_{\text{вод}} - a) / (a_{\text{вод}} - a_{\text{окт}}),$$

где a , $a_{\text{вод}}$ и $a_{\text{окт}}$ – изотропные константы сверхтонкого взаимодействия для зонда, соответственно, в исследуемом образце, воде и октаноле, вычисляемые по формуле $a = (T_{\parallel} + 2T_{\perp})/3$.

2.3.9. Исследование ЛНП методом флуоресцентных зондов и меток

Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре F-4000 «Hitachi» (Япония) в квадратных кварцевых кюветах со стороной 1 см с термостатированием при 20⁰ С.

Определение микроповязкости липидного ядра. О микроповязкости липидного ядра судили по эксимеризации пирена, как описано ранее [Добрецов ГЕ, 1989]. Чем выше соотношение интенсивностей флуоресценции эксимеров F(475 нм) и мономеров пирена F(385 нм), тем подвижнее пирен, локализованный в липиде, а значит и ниже микроповязкость липидного окружения. Пирен (Sigma, США) в виде 0,5 мМ раствора в этаноле медленно добавляли к раствору ЛНП с концентрацией белка 0,1 мг/мл при постоянном перемешивании (скорость роста концентрации пирена – 1 мкМ/мин). Флуоресценцию возбуждали при 310 нм.

Определение микроповязкости на границе липид/вода. В работе использовали зонд K-68, синтезированный и любезно предоставленный Б.М.Красовицким и Л.Ш.Афанасиади (НПО Монокристаллов, г.Харьков) в виде перхлората. Этот зонд имеет гидрофобную алифатическую цепочку, которая связывается с липидом, и положительно заряженный хромофор, который как якорь располагается на границе липид/вода [Добрецов, 1989; Курек с сотр., 1989; Dobretsov et al., 1989].

К раствору ЛНП (0,1 мг белка в мл) добавляли при перемешивании раствор K-68 в этаноле до конечной концентрации 1 мкМ и измеряли флуоресценцию при 490 нм (возбуждение 390 нм).

Поляризованную флуоресценцию K-68 измеряли при возбуждении вертикально поляризованным светом. Анизотропию поляризованной флуоресценции (*r*) рассчитывали как

$$r = (F_1 - g \cdot F_2) / (F_1 + 2g \cdot F_2),$$

где F1 и F2 – компоненты поляризации, направленные параллельно (F1) или перпендикулярно (F2) направлению поляризации возбуждающего света; g –

поправочный коэффициент. Если подвижность зонда очень высокая, то $\tau = 0$, а если он неподвижен, то $\tau = 0,4$. Промежуточные значения τ между 0 и 0,4 означают промежуточную подвижность зонда. Чем ниже τ , тем подвижнее зонд, значит тем ниже микровязкость границы липид/вода в области локализации зонда.

Микровязкость окружения белковых аминогрупп. Орто-фталевый диальдегид (ОФА) в присутствии тиолов образует с аминогруппами белка флуоресцирующий продукт [Enerbach, 1969; Chen et al., 1979]. Мечение ЛНП проводили в растворе 0,15 M NaCl, 0,01 M фосфата Na, pH 7,4. К раствору ЛНП с концентрацией белка 0,1 мг/мл добавляли смесь ОФА (Sigma, США) с 10-кратным молярным избытком 2-меркаптоэтанола (Sigma, США) до конечной концентрации ОФА 0,25 mM. В результате реакции нарастала флуоресценция продукта. Флуоресценцию возбуждали при 334 нм и регистрировали при 450 нм. Степень поляризации флуоресценции метки (τ) зависит от подвижности окружения аминогрупп и, таким образом, характеризует молекулярную динамику белка в их непосредственной близости. Измерение величины τ описано выше.

Определение расположения белка относительно липида. Принцип метода описан в работах Г.Е. Добрецова с соавт. [Добрецов, 1989; Dobretsov et al., 1982]. Флуоресценция остатков триптофана апо-B-100 может быть потушена в результате переноса энергии с триптофана на пирен, локализованный в липидном ядре. Чем меньше степень тушения флуоресценции триптофана пиреном, тем меньше степень переноса энергии, тем дальше удален белок от липидного ядра. Если исходная интенсивность флуоресценции белка равна F_0 , то по мере добавления пирена она снижается до величин F . Мерой переноса энергии может служить величина $\ln(F_0/F)$, чем она выше, тем ближе остатки триптофана к липидному ядру ЛНП.

Пирен медленно добавляли к раствору ЛНП (0,1 мг белка в мл) как описано выше. Флуоресценцию белка возбуждали при 286 нм и регистрировали при 345 нм.

2.3.10. Определение продуктов пероксидации липидов в ЛНП

Степень пероксидации липидов ЛНП оценивали по содержанию в них продуктов карбонильной природы, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [Yagi, 1984]. Для этого к образцам липопротеидов (50-100 мкл, 30-100 мкг белка) добавляли 500 мкл 0,33% ТБК в 20% ТХУ, после чего инкубировали на кипящей водяной бане 15 минут. В качестве стандарта использовали 0,5 нмоль/л малонового диальдегида. Далее из проб отбирали по 200 мкл и переносили в пластиковую 96-луночную плашку для измерения флюоресценции (Fluoroplate Labsystems, Финляндия). Уровень флюоресценции (возбуждене при 544 нм, испускание при 584 нм) определяли на флюориметре Fluoroskan II (Labsystems, Финляндия). В эксперименте были использованы препараты ЛНП с содержанием ТБК-реактивных продуктов не более 0,3 нмоль эквивалентов малонового диальдегида на мг белка ЛНП.

2.3.11. Определение содержания сиаловой кислоты в ЛНП

Содержание сиаловой кислоты определяли флюориметрически [Warren, 1959]. К исследуемым образцам растворов липопротеидов прибавляли равный объем 10% ТХУ, после чего перемешивали и инкубировали 20 мин при 4°C. Пробы центрифугировали при 4500 об/мин в течение 10 мин; к осадку добавляли 200 мкл 0,1 н H₂SO₄ и перемешивали. Образцы гидролизовали при 80°C в течение 1 часа. После охлаждения к опытным образцам вносили 10 мкл 0,2 М NaIO₄ в 9 М H₃PO₄, к контрольным – 10 мкл 9 М H₃PO₄. Смесь перемешивали и выдерживали 20 мин при комнатной температуре. К опытным образцам прибавляли 100 мкл 10% NaAsO₂ в 0,5 М Na₂SO₄ и 0,1н H₂SO₄, к

контрольным – 100 мкл 0,5 М Na₂SO₄. Образцы тщательно перемешивали до исчезновения желто-коричневого окрашивания. Сразу после этого к пробам добавляли 250 мкл 0,6% раствор ТБК в 0,5 М Na₂SO₄. Смесь перемешивали и инкубировали на кипящей водяной бане в течение 15 мин. В охлажденные пробы прибавляли 400 мкл *трем-бутанола*. Смесь интенсивно перемешивали на вортексе (в течение 5 секунд) дважды с интервалом в 5 мин. Пробы центрифугировали при 4500 об/мин в течение 10 мин для разделения фаз. Из органической фазы отбирали 250 мкл, переносили в 96-луночную плашку (Fluoroplate Labsystems, Финляндия) и измеряли флюoresценцию (возбуждение при 544 нм, испускание при 584 нм) на приборе Fluoroskan II (Labsystems, Финляндия). Количество сиаловой кислоты определяли по предварительно построенной калибровочной кривой.

2.3.12. Определение содержания углеводов в ЛНП

Анализ углеводов проводили по методу Johnson и Polta [1986], модифицированному Hardy et al. [1988] на углеводном анализаторе фирмы Dionex Co. (США). Моносахариды разделяли на ионообменной колонке Dionex CarboPack AS-6 с предколонкой AG-6 при скорости потока 1 мл/мин. Дегазационный модуль использовали для удаления воздуха из элюирующих растворов и насыщения их гелием. Разделение нейтральных сахаров осуществляли, используя 22 mM NaOH в течение 15 минут. После этого колонку промывали 200 mM NaOH и уравновешивали стартовым буфером в течение 15 минут. Сиаловую кислоту элюировали 8 mM NaOH и 80 mM CH₃COONa в течение 7 минут с последующей регенерацией колонки 200 mM NaOH и повторным ее уравновешиванием. Разделенные моносахариды определяли методом пульсовой амперометрии с помощью золотого электрода, используя 300 mM NaOH в качестве пост-колоночного раствора. Для анализа были использованы следующие потенциалы времени срабатывания E₁=0,10 В (t₁ = 360 мс) E₂ = 0,60 В (t₂ = 120 мс) E₃ = -0,76 В (t₃ = 420 мс). Используя

стандартные растворы углеводов, мы показали, что метод позволяет определять количество индивидуальных углеводов в интервале 25-1000 пмоль.

2.4 Получение модифицированных ЛНП.

2.4.1 Модификация ЛНП протеолитическими ферментами.

Нативные ЛНП подвергали протеолизу. Для этого их инкубировали в присутствии трипсина (1Ед/мл) (Serva, Германия) или химотрипсина (1 Ед/мл и 0,5 Ед/мл) (Sigma, США) в течение 3,5 часов при 37°C в среде, содержащей изотонический фосфатный буфер (ИФБ; GIBCO, Paisley, Великобритания: KCl 0,2 г/л, KH₂PO₄ 0,2 г/л, NaCl 8 г/л, Na₂HPO₄ 1,15 г/л, pH 7,2). Концентрации ферментов указаны в подписях к рисункам. Далее к ЛНП, подвергнутым протеолизу, добавляли бромид натрия из расчета 0,3 г на 1 мл образца и отделяли от фермента рецентрифугированием при 41000 об/мин (ротор Ti 50, Beckman, США) в течение 2 часов. Полученные ЛНП диализовали против ИФБ в течение 12 часов и использовали для иммуноферментного анализа.

2.4.2 Модификация ЛНП миелопероксидазой (МПО).

Нативные ЛНП обрабатывали МПО из нейтрофилов человека (Planta GmbH, Вена, Австрия). Для этого их инкубировали с ферментом (0,5 мкг/мл) в присутствии пероксида водорода (40 мкМ) в течение 3,5 часов при 37°C в среде, содержащей ИФБ. Далее к ЛНП, модифицированным МПО, добавляли бромид натрия из расчета 0,3 г на 1 мл образца и отделяли от фермента рецентрифугированием при 41000 об/мин (ротор Ti 50, Beckman, США) в течение 2 часов. Полученные ЛНП диализовали против ИФБ в течение 12 часов и использовали для иммуноферментного анализа.

2.4.3 Модификация ЛНП липолитическими ферментами.

Нативные ЛНП подвергали липолитической модификации. Для этого 0,2 мг/мл (по белку) нативных ЛНП инкубировали с фосфолипазой A₂ (Boehringer Mannheim, Германия) или фосфолипазой C (Sigma, США) в присутствии 5 мкМ CaCl₂ в течение 3,5 часов при 37°C в среде, содержащей ИФБ. В экспериментах использовались следующие концентрации ферментов фосфолипазы A₂: 0,125 мг/мл и 0,06 мг/мл; фосфолипазы C - 1,5 Ед/мл и 0,83 Ед/мл.

Далее к ЛНП, подвергнутым липолизу, добавляли бромид натрия из расчета 0,3 г на 1 мл образца отделяли от фермента рецентрифугированием при 41000 об/мин (ротор Ti 50, Beckman, США) в течение 2 часов. Полученные ЛНП диализовали против ИФБ в течение 12 часов и использовали для иммуноферментного анализа.

2.4.4 Модификация ЛНП дегликозилирующими ферментами – нейраминидазой.

Дегликозилирующая модификация ЛНП осуществлялась путем инкубации нативных ЛНП с ферментом нейраминидазой в среде, содержащей ИФБ. Далее к модифицированным ЛНП добавляли бромид натрия из расчета 0,3 г на 1 мл образца и отделяли от фермента рецентрифугированием при 41000 об/мин (ротор Ti 50, Beckman, США) в течение 2 часов. Полученные ЛНП диализовали против ИФБ в течение 12 часов и использовали для иммуноферментного анализа.

2.4.5 Модификация ЛНП низкомолекулярными альдегидами эндогенного происхождения.

ЛНП обрабатывали свежеприготовленным МДА, который получали из 1,1,3,3-тетраэтоксипропана путем кислотного гидролиза [Requena J. et al., 1997].

Липопротеиды (100 мкг апоВ) инкубировали с 1 мкмоль МДА в темноте при 37°C и pH 6.5 [Fogelman A. et al., 1980].

Другие альдегиды: глиоксаль, метилглиоксаль использовали для модификации ЛНП в количествах, эквимолярных МДА.

От избытка альдегидов, после модификации ЛНП, избавлялись при помощи диализа против 2000 объёмов ИФБ, pH=7.2 в течение 18 часов при +4°C.

2.5 Определение степени ассоциации ЛНП и размера ассоциатов.

2.5.1 Определение относительного размера ЛНП (метод флюктуации светопропускания).

Степень ассоциации ЛНП оценивали методом регистрации флюктуации светопропускания луча лазерного света длинной волны 780 нм на двухканальном агрегометре (модель LA220, НПФ БИОЛА, Россия) [Tertov et al., 1989; 1992]. Метод основан на том, что относительная дисперсия колебаний оптической плотности, вызванных случайными изменениями в количестве частиц, попадающих в оптический путь лазерного луча, отражает отклонения от их среднего размера, то есть степень их ассоциации. Увеличение флюктуации светопропускания свидетельствует об увеличении взвешенного среднего оптического радиуса частиц. Это дает возможность оценить изменения среднего размера частиц ЛНП в условных единицах. Данный метод дает качественно схожие результаты с результатами, полученными методом квази-упругого светорассеяния, позволяющего непосредственно определять размер частиц ЛНП [Tertov et al., 1992].

Для изучения агрегационной способности ЛНП их, как правило, предварительно освобождали от имеющихся ассоциатов путем фильтрования через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и инкубировали при 37°C в изотоническом фосфатном буфере (ИФБ; GIBCO, Paisley, Великобритания; KCl 0,2 г/л, KH₂PO₄ 0,2 г/л, NaCl 8 г/л, Na₂HPO₄ 1,15 г/л, pH 7,2), содержащем 1 мг/мл ЭДТА.

2.5.2 Определение размера ассоциатов ЛНП.

Размеры частиц ЛНП и ассоциатов липопротеидов определяли методом квазиупругого лазерного рассеивания на приборе Autosizer 2 (Malvern Instrument, Великобритания).

2.6 Основные характеристики использованных в работе плюроников.

В работе использованы плюроники P85, L61 и F68 [BASF, США], любезно предоставленные профессором Ярославовым А. А. (Химический факультет МГУ, Москва, Россия). Основные характеристики плюроников приведены в таблице 4.

Таблица 4 - Основные характеристики использованных в работе плюроников [Kabanov et al 2002]

| плюроник | Молекулярная масса, Да | Критическая концентрация мицеллообразования, % | Гидрофильно-липофильный баланс |
|----------|------------------------|--|--------------------------------|
| L61 | 2000 | >0,022 | 3 |
| P85 | 4600 | 0,005-0,05 | 16 |
| F68 | 8400 | >0,4 | 29 |

2.7 Статистическая обработка данных

Достоверность отличий значений определяли с помощью двустороннего t-теста Стьюдента; отличие считали достоверным при $p < 0,05$.

3. Результаты

3.1. Накопление холестерина гладкомышечными клетками аорты человека и макрофагами при инкубации их с агрегированными и не агрегированными ЛНП

3.1.1. Спонтанная ассоциация ЛНП в условиях культивирования (37°C, CO₂-инкубатор) вызывает накопление эфиров холестерина в ГМК и макрофагах. Зависимость от размера агрегатов ЛНП

Ранее было показано, что циркулирующие в крови человека множественно модифицированные ЛНП (цмЛНП) обладают склонностью к ассоциации [Orekhov et al., 1990; Tertov et al., 1992]. В настоящем разделе мы попытались ответить на вопрос, как спонтанная ассоциация ЛНП влияет на их атерогенность на клеточном уровне, и зависит ли атерогенный потенциал агрегированных ЛНП от размера агрегатов.

Из препаратов нативных ЛНП и цмЛНП удаляли образовавшиеся в процессе выделения ЛНП укрупненные частицы путем фильтрации через фильтр с диаметром пор 0,1 мкм. Затем препараты инкубировали в течение 6 часов при 37°C в CO₂-инкубаторе. Средний размер нативных ЛНП при этом достоверно не увеличивался, тогда как цмЛНП образовывали более крупные частицы, превышающие средний размер нативных ЛНП в 4,6 раза. Для получения частиц цмЛНП с разным средним размером их повторно пропускали через фильтры с диаметром пор 0,45, 0,22 или 0,10 мкм. Такая процедура приводила к удалению части крупных ассоциатов и снижению среднего размера частиц (3,2, 2,1 и 1,3 отн. ед. соответственно). Затем нативные ЛНП, а также цмЛНП, имеющие разный усредненный размер, добавляли в культуру клеток и инкубировали еще 6 часов, после чего анализировали внутриклеточное содержание эфиров холестерина.

Результаты эксперимента приведены на рисунке 5. Видно, что содержание эфиров холестерина в клетках после их инкубации с ЛНП, размер которых не превышает размера нативных ЛНП, достоверно не увеличивается. Увеличение среднего размера частиц ЛНП приводит к росту внутриклеточного холестерина. Количество накопившегося в клетках эфиров холестерина напрямую зависит от размера агрегатов ЛНП и линейно возрастает с ростом их усредненного размера. Такой эффект наблюдали как в случае инкубации ЛНП с гладкомышечными клетками интимы (рис. 5, кривая 1), так и с макрофагами (рис. 5, кривая 2).

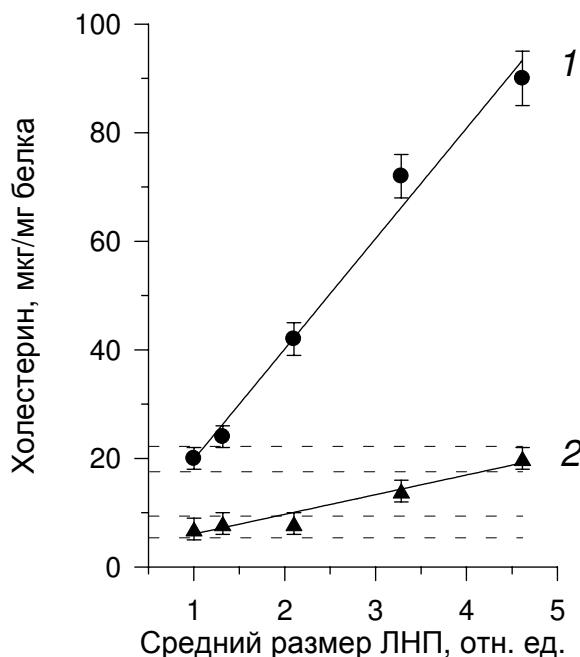


Рисунок 5 - Зависимость содержания эфиров холестерина в гладкомышечных клетках интимы (1) и макрофагах (2) через 6 часов их инкубации при 37°C в

СО₂-инкубаторе с нативными ЛНП или цмЛНП от их среднего размера. Средний размер нативных ЛНП принят за 1. Изменение среднего размера цмЛНП достигали путем их фильтрации через фильтры с размером пор 0,45, 0,22 и 0,1 мкм. Пунктиром указан интервал, соответствующий содержанию эфиров холестерина в клетках, инкубированных без ЛНП.

Таким образом, из полученных данных следует, что нативные ЛНП в условиях культивирования клеток не образуют агрегатов, в то время как цмЛНП ассоциируют в более крупные частицы. Удаление агрегатов цмЛНП путем фильтрации препятствует накоплению липидов в гладкомышечных клетках и макрофагах. Существует прямая зависимость между размером агрегатов ЛНП и их способностью накапливать холестерин в клетках.

3.1.2. Клеточный метаболизм агрегированных и не агрегированных ¹²⁵I-ЛНП

Можно предположить, что обнаруженнное в предыдущем разделе повышенное накопление липидов в клетках является следствием изменения метаболизма ЛНП, вызванного их ассоциацией. Мы изучили, чем отличается клеточный метаболизм ассоциированных ЛНП от метаболизма дисперсных, не агрегированных ЛНП. В частности, как захват и деградация ЛНП гладкомышечными клетками и макрофагами изменяется при ассоциации липопротеидов.

Получали 2 препарата цмЛНП: дисперсные частицы ЛНП (пропущенные через фильтр с размером пор 0,1 мкм) и ЛНП, содержащие ассоциаты (без фильтрации). Из табл. 5 видно, что захват и деградация гладкомышечными клетками и макрофагами как нативных, так и не агрегированных цмЛНП происходит примерно в равной степени. В случае содержащих агрегаты цмЛНП наблюдалось увеличение относительной скорости захвата частиц гладкомышечными клетками в 7 раз, а макрофагами – в 6 раз. При этом скорость деградации возросла только в 5 и 3,5 раза соответственно. Можно

предположить, что цмЛНП накапливаются в клетках, благодаря тому, что метаболизм ассоциированных цмЛНП меняется. Относительная скорость захвата ассоциированных цмЛНП возрастает в значительно большей степени по сравнению со скоростью их внутриклеточной деградации.

Таблица 5 - Захват и деградация агрегированных и неагрегированных ^{125}I -ЛНП.

| Препарат ЛНП | Захват ЛНП за 6 час, нмоль/мг белка | | Деградация ЛНП за 6 час, нмоль/мг белка | |
|-------------------------|--|------------|--|-----------|
| | ГМК | Макрофаги | ГМК* | Макрофаги |
| Нативные ЛНП | 302±25 | 210±11 | 217±34 | 225±17 |
| Не агрегированные цмЛНП | 356±41 | 276±29 | 205±27 | 198±15 |
| Агрегаты цмЛНП | 2137±284** | 1245±137** | 1083±172** | 735±74** |

Примечание: Нативные ЛНП и цмЛНП (5 мкг белка/мл) выделяли с помощью гель-фильтрации, как описано в разделе «Экспериментальная часть». Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение.

* ГМК - гладкомышечные клетки непораженной интимы аорты человека.

** Достоверное отличие от нативных ЛНП, $p<0,05$.

3.1.3. Изучение механизма захвата агрегатов ^{125}I -ЛНП

Возникает вопрос, почему так существенно изменяется скорость захвата цмЛНП в сравнении с нативными ЛНП? Существуют ли различия в механизме захвата нативных и цмЛНП?

Известно, что ЛНП захватываются клетками рецептор-опосредовано [Goldstein and Brown, 1977]. Нативные ЛНП попадают в клетку через апоВ,Е-рецептор. Модифицированные ЛНП, в частности, ацетилированные – через так называемый скэвенджер-рецептор [Goldstein et al., 1979]. Мы исследовали, каким путем агрегаты цмЛНП попадают в клетку. Конкурируют ли ^{125}I -меченные агрегаты цмЛНП с нативными и ацетилизованными ЛНП за места связывания (апоВ,Е-рецептор и скэвенджер-рецептор соответственно)? Результаты исследований приведены в таблице 6.

Видно, что добавление 20-ти кратного избытка нативных или ацетилированных ЛНП не оказывает достоверного влияния на захват и деградацию ^{125}I -меченых агрегатов цмЛНП. Этот факт свидетельствует в пользу того, что захват агрегатов цмЛНП осуществляется ни через апоВ,Е-, ни через скэвенджер-рецепторы.

Мы предположили, что агрегаты цмЛНП попадают в клетку путем неспецифического фагоцитоза. Для выяснения данного вопроса мы изучили, влияние цитохалазина В – ингибитора эндоцитоза – на захват цмЛНП клетками. Из табл. 6 следует, что цитохалазин В снижает скорость захвата и деградации ^{125}I -меченых агрегатов цмЛНП как гладкомышечными клетками, так и макрофагами.

Известно, что микросферы латекса захватываются клетками путем неспецифического фагоцитоза [Pineto, White, 1977]. Если наше предположение о неспецифическом фагоцитозе агрегированных цмЛНП верно, то микросферы должны снизить поступление ^{125}I -меченых агрегатов цмЛНП в клетку. Нам

удалось показать (см. табл. 6), что при добавлении микросфер латекса ($10^9/\text{мл}$) в среду инкубации клеток с цмЛНП относительная скорость захвата ^{125}I -меченных цмЛНП и скорость их внутриклеточной деградации снижались соответственно на 60% и 75%. Примерно в такой же степени снижался захват и деградация ^{125}I -меченных цмЛНП, если в среду инкубации ^{125}I -цмЛНП с клетками добавляли избыток немеченых агрегатов цмЛНП.

Полученные данные позволяют заключить, что захват агрегатов цмЛНП как гладкомышечными клетками непораженной интимы аорты человека, так и макрофагами происходит, по всей вероятности, путем неспецифического фагоцитоза.

3.2. Изучение особенностей структурной организации склонных к агрегации циркулирующих множественно модифицированных ЛНП

В предыдущем разделе было показано, что только циркулирующие модифицированные, но не нативные ЛНП склонны к агрегации, благодаря чему способны вызывать накопление липидов в клетках. Ранее Тертов с соавт. установили [Tertov et al., 1992a; 1992б], что цмЛНП имеют измененный липидный и углеводный состав по сравнению с нативными ЛНП. Вполне вероятно, что такие изменения химического состава влекут за собой изменения в структурной организации поверхности цмЛНП, что и является причиной их повышенной склонности к ассоциации. Для выяснения этого вопроса мы исследовали структуру цмЛНП и ннативных ЛНП с помощью спиновых и флуоресцентных зондов и меток, а также используя панель моноклональных антител к различным эпитопам апо-B-100.

Таблица 6. Влияние различных агентов на захват и деградацию ^{125}I -агрегатов цмЛНП

| Добавки | Захват, % от контроля | | Деградация, % от контроля | |
|--|-----------------------|-----------|---------------------------|-----------|
| | ГМК | Макрофаги | ГМК* | Макрофаги |
| Нативные ЛНП, 100 мкг/мл | 79±7 | 85±4 | 86±5 | 83±8 |
| Ацетилированные ЛНП, 100 мкг/мл | 93±6 | 88±8 | 92±5 | 89±7 |
| Цитохалазин В, 10 мкМ | 28±2** | 19±1** | 23±1** | 22±2** |
| Микросферы латекса, 10^9 /мл | 39±4** | 36±5** | 24±3** | 25±2** |
| Не меченные агрегаты цмЛНП, 100 мкг/мл | 32±5** | 25±3** | 24±2** | 19±2** |

Примечание: Агрегаты и не агрегированные ЛНП (5 мкг белка/мл) выделяли с помощью гель-фильтрации, как описано в разделе «Экспериментальная часть». Данные представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение.

* ГМК - гладкомышечные клетки непораженной интимы аорты человека.

** Достоверное отличие от нативных ЛНП, $p<0,05$.

3.2.1. Исследование структуры нативных и цмЛНП с использованием спиновых и флуоресцентных зондов и меток

Для исследования расположения белка на поверхности нативных и склонных к агрегации циркулирующих модифицированных ЛНП использовали флуоресцентный зонд – пирен и метку – ортофталиевый альдегид.

Перенос энергии с остатков триптофана апо-B-100 на флуоресцентный зонд пирен, расположенный в липидном ядре частицы ЛНП, характеризует расстояние апо-B-100 от липидного ядра ЛНП [Dobretsov et al., 1982]. Белок играет очень важную роль в экранировании гидрофобного липидного ядра ЛНП от водного окружения, потому что полярных фосфолипидов хватает на покрытие только половины поверхности частицы ЛНП. Сползание белка, как это происходит, например, при пероксидации липидов [Dobretsov et al., 1982], может приводить к частичному обнажению гидрофобных участков поверхности ЛНП, в результате чего частицы ЛНП теряют устойчивость к ассоциации и агрегируют.

На рис. 6 представлены результаты типичного эксперимента. По мере добавления пирена к ЛНП начинается перенос энергии с остатков триптофана апо-B-100 на пирен, поэтому интенсивность флуоресценции белка снижается до величины F. Отношение начальной флуоресценции (Fo) к конечной (F) при этом возрастает, и тем сильнее, чем легче идет перенос энергии, то есть, чем ближе располагается белок к липиду. Как видно из рис. 6, мы не обнаружили достоверной разницы между нативными и циркулирующими модифицированными ЛНП в переносе энергии с триптофана на пирен, а значит и в расположении белка относительно липидного ядра, в котором локализован зонд. Аналогичные результаты были получены при сравнительном исследовании цмЛНП с нативными ЛНП, изолированными из крови других доноров.

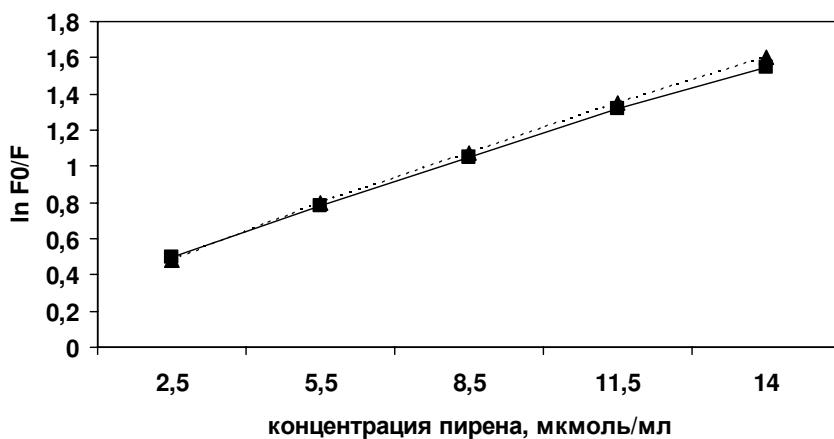


Рисунок 6 - Перенос энергии флуоресценции с остатков триптофана апо-В-100 на пирен для нативных ЛНП (\blacktriangle) и цмЛНП (\blacksquare). F и F_0 - интенсивность флуоресценции остатков триптофана апо-В-100 в присутствии и в отсутствие пирена соответственно.

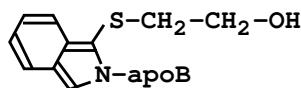


Рисунок 7 - Флуоресцирующий продукт, образованный при взаимодействии ОФА и апо-В-100 на поверхности ЛНП.

Для изучения молекулярной подвижности апо-B-100 на свободные аминогруппы белка была ковалентно присоединена флуоресцентная метка – ортофталевый диальдегид (ОФА) (рис. 7).

Степень поляризации флуоресценции метки ОФА в ЛНП составляет около 0,15 (см. табл. 7). Погрешность измерений анизотропии поляризованной флуоресценции в экспериментах с ОФА составляла $\pm 0,006$. В пределах такой погрешности не было отмечено достоверных различий между нативными ЛНП и цмЛНП. Не замечено различий и между ЛНП от разных доноров.

Таким образом, как молекулярная подвижность около аминогрупп апо-B-100, так и расположение апо-B-100 на поверхности липида, оказались практически одинаковыми в нативных и цмЛНП.

На следующем этапе была исследована структура липидного ядра и поверхностной фосфолипидной части нативных и склонных к агрегации циркулирующих модифицированных ЛНП. Для этого мы использовали несколько спиновых и флуоресцентных зондов, характеризующих изменения в структуре липидной части ЛНП на различном расстоянии от поверхности частицы.

У спиновых зондов, находящихся в липидном окружении в липопротеидах, форма спектров ЭПР определяется вращательной диффузией зондов, которая, в свою очередь, напрямую зависит от молекулярной упаковки и подвижности окружающих липидов [Смит, Бутлер, 1979]. При встраивании каждого из использованных зондов в липопротеидную частицу его «информационные» парамагнитные группы (нитроксильные группы N–O) оказываются в определенной области, различной для разных зондов. Нитроксильная группа зонда 1 (см. рис. 8, а также рис. 3 в разделе «Экспериментальная часть») располагается на поверхности частицы. Зонды 2, 3 и 4 представляют собой спинмеченую жирную кислоту: 5-, 12- и 16-доксилстеариновую кислоту соответственно. Их нитроксильные группы оказываются в поверхностном липидном монослое примерно на той же

глубине, что и 5-я (в случае зонда 2), 12-я (в случае зонда 3) или 16-я (в случае зонда 4) метиленовая группа ацильной цепи фосфолипида. Гидрофобный зонд 5 погружается во внутреннее липидное ядро. Таким образом, использование данного набора зондов позволило получать информацию с разной глубины липидного домена липопротеидов.

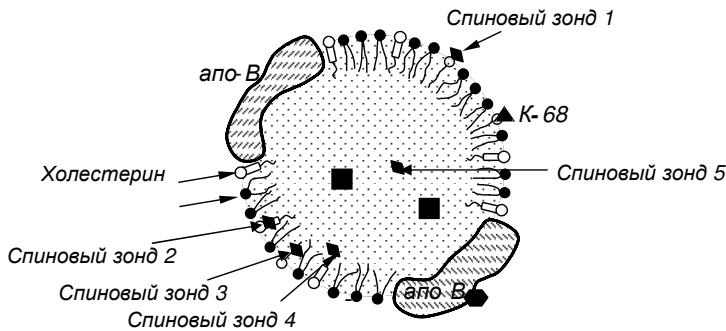


Рисунок 8 - Схема расположения флуоресцентных и спиновых зондов в ЛНП.

Таблица 7 - Степень поляризации флуоресценции ОФА в нативных ЛНП и цмЛНП, изолированных из крови 3-х доноров.

| Донор | ЛНП | Анизотропия флуоресценции ОФА | |
|---------|-------|-------------------------------|-------|
| Донор 1 | нЛНП | 0,150 | |
| | цмЛНП | | 0,144 |
| Донор 2 | нЛНП | 0,150 | |
| | цмЛНП | | 0,158 |
| Донор 3 | нЛНП | 0,149 | |
| | цмЛНП | | 0,157 |

Вязкость нейтральных липидов в глубине липидного ядра исследовали с помощью флуоресцентного зонда пирена и спинового зонда 5. Схема расположения флуоресцентных и спиновых зондов в ЛНП приведена на рис. 8. Пирен нековалентно связывается с нейтральными липидами и неполярными цепочками фосфолипидов, распределяясь по ним сравнительно равномерно [Dobretsov et al., 1982; Добрецов, 1989]. При возбуждении молекулы пирена светом она диффундирует в липиде, сталкивается с невозбужденными молекулами пирена и образует с ними возбужденный димер («эксимер»). Чем меньше вязкость липида, тем чаще столкновения, а значит, тем больше образуется эксимеров. Так мономеры пирена превращаются в эксимеры. Контролировать долю образовавшихся эксимеров и оставшихся мономеров можно по их флуоресценции: мономеры флуоресцируют при 385 нм, а эксимеры – при 475 нм. Это удобно делать по соотношению интенсивностей флуоресценции при этих двух длинах волн, которое обозначено ниже как $F(475)/F(385)$.

Таблица 8 - Степень эксимеризации пирена (обратно пропорциональна вязкости липидной части) в нативных ЛНП и цмЛНП на поверхности частицы (возбуждение при 286 нм) и по всей частице (возбуждение при 310 нм).

| Донор | ЛНП | Флуоресценция $F(475)/F(385)$ | |
|---------|-------|-------------------------------|---------------------------|
| | | Возбуждение при 310 нм | Возбуждение при 286 нм |
| Донор 1 | нЛНП | 0,48 | 0,43 |
| | цмЛНП | 0,41 | 0,36 |
| Донор 2 | нЛНП | 0,45 | 0,40 |
| | цмЛНП | 0,46 | 0,41 |

Таблица 9 - Время корреляции вращений τ , параметр упорядоченности S и параметр гидрофобности h, измеренные из спектров ЭПР спиновых зондов в нативных ЛНП и цмЛНП.

| ЛНП | τ , нс | S | h | Зонд № |
|-------|-------------|-------------|-----------|--------|
| нЛНП | 3,91±0,08 | | | 1 |
| цмЛНП | 3,84±0,04 | | | |
| нЛНП | | 0,747±0,002 | 0,30±0,03 | 2 |
| цмЛНП | | 0,746±0,003 | 0,32±0,01 | |
| нЛНП | | 0,679±0,004 | 0,51±0,04 | 3 |
| цмЛНП | | 0,681±0,002 | 0,50±0,03 | |
| нЛНП | 2,08±0,03 | 0,204±0,003 | 1,91±0,03 | 4 |
| цмЛНП | 2,07±0,02 | 0,202±0,004 | 1,93±0,02 | |
| нЛНП | 2,76±0,02 | | | 5 |
| цмЛНП | 2,78±0,06 | | | |

Примечание: Представлены средние значения параметров, рассчитанных для трех повторных образцов ЛНП ± стандартное квадратическое отклонение.

В табл. 8 показано соотношение F(475)/F(385), полученное двумя способами: если возбуждать флуоресценцию при 310 нм, то можно следить за основной массой пирена. Если же возбуждать ее при 286 нм, то в результате переноса энергии с белка на пирен будут флуоресцировать не все молекулы пирена, а преимущественно те, которые расположены в поверхностном слое частицы, ближе к белку.

Данные табл. 8 показывают, однако, что заметных различий между нативными ЛНП и цмЛНП нет. Эксимеризация пирена идет примерно одинаково в нативных и циркулирующих модифицированных ЛНП. Различий между разными донорами не обнаружено. Нет достоверных различий в флуоресценции эксимеров пирена, локализованных в поверхностном слое частицы или по всей частице.

Спиновый зонд 5 также характеризует микровязкость в липидном ядре, но как видно из табл. 9, время его корреляции вращения в нативных и циркулирующих модифицированных ЛНП не различается.

На основании приведенных выше данных можно сделать вывод о том, что структурная организация липидного ядра в нативных ЛНП и цмЛНП сходна.

Далее мы изучили микровязкость липидной части ЛНП на различном расстоянии от границы раздела фаз фосфолипид/вода, то есть на различном удалении от поверхности частицы липопротеида. Для этого были использованы спиновые зонды 1-4, флуоресцентная метка К-68 и флуоресцентный зонд пирен.

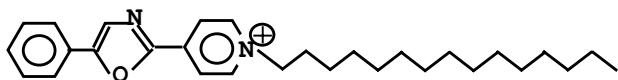


Рисунок 9 - Структурная формула флуоресцентного зонда К-68.

Таблица 10 - Анизотропия флуоресценции зонда К-68 в нативных ЛНП и цмЛНП.

| Донор | ЛНП | Анизотропия флуоресценции К-68 |
|---------|-------|--------------------------------|
| Донор 1 | нЛНП | 0,22 |
| | цмЛНП | 0,19 |
| Донор 2 | нЛНП | 0,22 |
| | цмЛНП | 0,23 |
| Донор 3 | нЛНП | 0,24 |
| | цмЛНП | 0,24 |
| Донор 4 | нЛНП | 0,25 |
| | цмЛНП | 0,25 |
| Донор 5 | нЛНП | 0,24 |
| | цмЛНП | 0,25 |

Зонд K-68 имеет гидрофобную алифатическую цепочку из 15 звеньев CH_2 , погруженную в липид, и положительно заряженный четвертичный азот, который служит якорем для флуоресцентного хромофора, расположенного на поверхности раздела липид/вода (см. рис. 9).

Регистрируя поляризованную флуоресценцию K-68 в липидах, можно определять скорость вращательной диффузии хромофора K-68 на поверхности раздела липид/вода, или, другими словами, микровязкость на поверхности фосфолипидного монослоя ЛНП. Поляризацию выражают в виде параметра, называемого анизотропией, который изменяется от 0 при очень быстром вращении зонда до 0,4 в очень вязкой среде, когда зонд практически не вращается.

Данные по пяти донорам приведены в табл. 10. Как видно, флуоресценция K-68 в ЛНП довольно сильно поляризована, и вращение зонда происходит значительно медленнее, чем, например, в фосфолипидном бислое, где поляризация равна 0,146 [Добрецов, 1989].

Приведенные данные указывают на отсутствие какой-либо разницы в подвижности молекул фосфолипидов на поверхности частиц нативных ЛНП и цмЛНП. Степень поляризации флуоресценции одинакова (в пределах ошибки эксперимента) во всех ЛНП разных доноров.

В таблице 9 представлены времена корреляции вращений τ , параметр упорядоченности S и параметр гидрофобности h , рассчитанные из спектров ЭПР зондов, встроенных в нативные ЛНП и цмЛНП. Видно, что среди серии гомологичных зондов 2, 3 и 4 наиболее заторможенное и анизотропное движение парамагнитного фрагмента наблюдается в случае зонда 2, а наиболее быстрое и хаотичное - в случае зонда 4. Это говорит о том, что в поверхностном липидном монослое ЛНП внутримолекулярная подвижность сегментов жирнокислотных цепей, окружающих зонды, возрастает в

направлении от 5-ого атома углерода к 16-ому атому углерода, т.е. к концевой CH_3 -группе. Значения параметра гидрофобности h возрастают, когда доксильная группа перемещается от C-5 к C-12 и, наконец, в положение C-16 на углеводородной цепи молекулы зонда. Следовательно, окружение группы N-O, находящейся в положении C-5 липидного монослоя, наиболее полярно, а по мере увеличения расстояния от поверхности липопротеидной частицы полярность в поверхностном липидном монослое уменьшается. Эти результаты совпадают с данными, полученными ранее для нефракционированных ЛНП. [Панасенко с сотр., 1988].

Что касается сравнения нативных ЛНП и цмЛНП, то нам не удалось выявить достоверного различия между ними в параметрах S , τ и h . В табл. 7 приведены данные, полученные для липопротеидов из крови одного донора. Такая же картина наблюдалась в случае липопротеидов, выделенных из крови других доноров ($n = 6$). Значения параметров S , τ или h различались от донора к донору, но для каждого из доноров не было различия в этих параметрах между нативными ЛНП и цмЛНП.

Итак, результаты, полученные тремя независимыми методическими подходами, показали, что тепловое движение трех уровней – в глубине частицы, в поверхностном липидном монослое, на границе раздела липид/вода и на поверхности белка apo-B-100 – оказалось примерно одинаковым в нативных ЛНП и цмЛНП. Другими словами, мы не обнаружили различий в структуре как липидной, так и белковой составляющей нативных и склонных к агрегации циркулирующих модифицированных ЛНП.

3.2.2. Исследование структуры нативных и цмЛНП методом иммуноферментного анализа

Использованные спиновые и флуоресцентные зонды согласно своим физико-химическим свойствам равномерно распределяются в определенных частях ЛНП (липидная фаза на поверхности частицы, гидрофобное липидное

ядро, апо-B-100 на поверхности). Такой методический подход позволяет регистрировать лишь усредненные характеристики свойств соответствующих сравнительно больших участков ЛНП и не дает возможности выявить локальные различия в физико-химических свойствах нативных ЛНП и цмЛНП. На следующем этапе работы мы применили более чувствительный метод иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием панели моноклональных антител к апо-B-100 для исследования возможных локальных изменений в структуре этого белка на поверхности цмЛНП.

Было изучено связывание девяти моноклональных антител к апо-B-100 с нативными и циркулирующими модифицированными ЛНП (характеристика антител представлена в табл. 3) По различиям в связывании антител с нативными ЛНП и цмЛНП судили об изменении в поверхности изучаемых липопротеидов, предполагая, что именно эти изменения в структуре поверхности являются причиной дестабилизации частиц цмЛНП, которая вызывает их ассоциацию.

На рисунке 10 представлены данные по связыванию моноклональных антител с нативными и циркулирующими модифицированными ЛНП. Видно, что 2G8, 5F8, 4C11 (антитела против нативных ЛНП) а также 3G4 (антитело против ЛНП, модифицированных МДА) в равной степени взаимодействуют с нативными и цмЛНП. Это свидетельствует о том, что поверхность нЛНП и цмЛНП имеет общие участки, т.е. изменения в структуре поверхности цмЛНП не носят драматический характер.

Клоны 2G8 и 2E3 являются антителами к одному и тому же участку апоB100 (с 3728 по 4306 аминокислотный остаток). Поскольку мы наблюдали различие в связывании нЛНП и цмЛНП с этими антителами (2E3 лучше связывается с цмЛНП, а 2G8 одинаково связывается с нЛНП и цмЛНП), можно сделать вывод о том, что в этом участке апоB100 цмЛНП наряду с одинаковыми участками существуют участки белка, различные у цмЛНП и нЛНП.

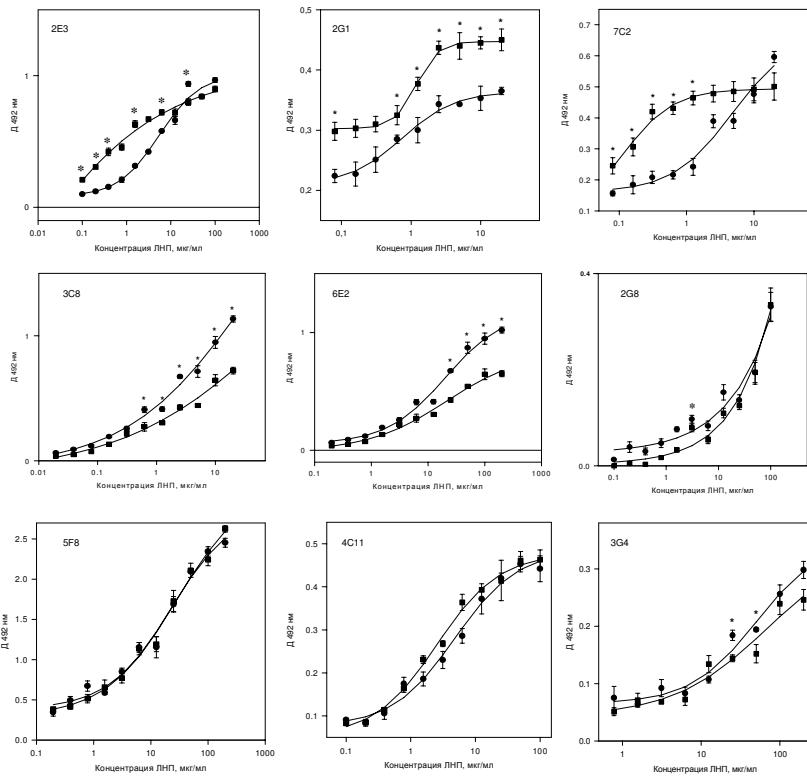


Рисунок 10 - Взаимодействие нЛНП (-●-) и цмЛНП (-■-) с моноклональными антителами к апо-В человека

По горизонтальной оси отложена концентрация белка ЛНП, исходно добавленного в лунку, по вертикальной – оптическая плотность (при 492 нм) продуктов реакции с пероксидазой, пропорциональная количеству связанных с ЛНП моноклональных антител. Показаны данные типичного эксперимента с антителами клонов 2E3, 2G3, 7C2, 3C8, 6E2, 2G8, 5F6, 4C11 и 3G4, результаты которого представлены как среднее трех определений \pm стандартное квадратическое отклонение.

*, достоверное отличие нЛНП и цмЛНП ($p < 0,05$).

Антитела клонов 2G1 и 7C2 получены против ЛНП, модифицированных МДА. Эти антитела показали лучшее связывание с цмЛНП, что свидетельствует о том, что цмЛНП и ЛНП, модифицированные МДА имеют общие участки белка, отличные от нативных ЛНП. Антитела клонов 3C8 и 6E2, напротив, интенсивнее взаимодействовали с апо-В нЛНП.

Видно, что цмЛНП связываются как с антителами против ЛНП, модифицированных МДА, так и с антителами против нативных ЛНП. Следовательно, изменения в структуре поверхности цмЛНП по сравнению с нЛНП имеют место, но в то же время, очевидно, что они носят локальный характер.

Таким образом, результаты данного исследования позволяют сделать вывод о том, что в цмЛНП, наряду с установленными ранее [Tertov 1992] изменениями углеводного и липидного состава, происходят нарушения конформации определенных фрагментов апо-В. Такая локальная модификация апо-В может явиться причиной повышенной склонности к ассоциации цмЛНП приобретения ими способности вызывать накопление липидов в клеточной культуре.

3.3 Сравнение склонности к ассоциации циркулирующих множественно модифицированных и нативных ЛНП.

Для исследования склонности к ассоциации циркулирующих множественно модифицированных и нативных ЛНП был проведен следующий эксперимент. Общую фракцию ЛНП выделяли ультрацентрифугированием, подфракции нативных и циркулирующих множественно модифицированных липопротеидов получали методом лектин-хроматографии на *Ricinus Communis* агглютинин (RCA₁₂₀) агарозе. Далее липопротеиды инкубировались в течении 6 часов при 37°C в среде, содержащей изотонический фосфатный буфер. Через определенные промежутки времени регистрировалась флукутация светопропускания образца ЛНП, которая отражает средний размер частиц в растворе.

На рисунке 11 приведены типичные кинетические кривые спонтанной ассоциации нЛНП и цммЛНП. Видно, что цммЛНП сами по себе в процессе инкубации при 37°C хотя и медленно, но ассоциируют в отличие от нЛНП (кривые 1 и 4 на рис. 11).

Особенно отчетливо это становится видно в том случае, если инкубацию ЛНП проводили в присутствии индуктора агрегации – полиэтиленгликоля молекулярной массы 6000 (ПЭГ) (кривые 2, 3, 5 и 6 на рисунке 11). Известно, что ПЭГ - синтетический водорастворимый полимер, изменяя физико-химические свойства водной фазы на поверхности природных белок-липидных комплексов, в том числе и ЛНП, способствует их агрегации с возможным последующим слиянием. Причем, процесс ассоциации ЛНП в значительной степени определяется состоянием поверхности частиц, модификация которой под действием различных факторов изменяет их агрегационную устойчивость. Это давало основание предполагать, что цммЛНП, физико-химические свойства которых заметно отличаются от таковых у нЛНП, могут обладать отличной от нЛНП устойчивостью к ПЭГ-индукционной ассоциации. Действительно, за 6 ч инкубации в присутствии 2% ПЭГ флуктуация светопропускания эмульсии цммЛНП увеличивалась в 2,5 раза, тогда как для нЛНП она достоверно не изменялась (кривые 2 и 5 , рис. 11). С ростом концентрации ПЭГ (до 6%) увеличивалась и скорость ассоциации ЛНП. Так флуктуация светопропускания за 6 ч инкубации в случае цммЛНП возрастала в 4,5 раза, тогда как в случае нЛНП – лишь в 3,4 раза (кривые 3 и 6 , рис. 11).

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что цммЛНП нестабильны и склонны к спонтанной и индуцированной ассоциации.

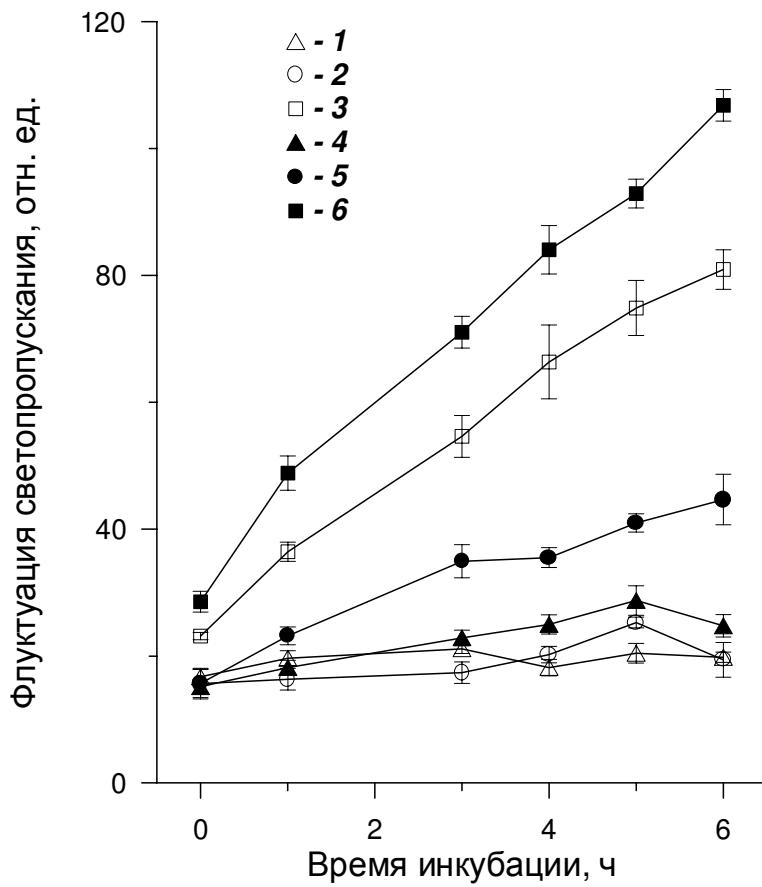


Рисунок 11 - Кинетические кривые изменения флюктуации светопропускания супензии нативных ЛНП (1, 2, 3) и цмЛНП (4, 5, 6) в отсутствие (1, 4) и в присутствии 2% (2, 5) или 6% ПЭГ (3, 6). Концентрация ЛНП 0,2 мг белка/мл, температура инкубации 37°С.

3.4 Влияние различных модификаций частицы нативных ЛНП на устойчивость липопротеидов к ассоциации

3.4.1 Влияние протеолитических ферментов на устойчивость нативных ЛНП к ассоциации.

В качестве протеолитических ферментов использовались сериновые протеиназы: трипсин и химотрипсин. Известно, что трипсин специфически гидролизует пептидные связи, образованные карбоксильными группами остатков аргинина и лизина, несущих при физиологических значениях рН положительно заряженную группу. Химотрипсин, напротив специфически гидролизует пептидные связи, образованные карбоксильными группами гидрофобных ароматических аминокислот – фенилаланина, тирозина и триптофана, а также и лейцина, имеющего сравнимую с ними гидрофобность. Таким образом, используя трипсин и химотрипсин, мы имели возможность гидролизовать апо B-100 в составе ЛНП преимущественно по положению гидрофильных и гидрофобных аминокислотных остатков соответственно.

Методом электрофореза в поликариламидном геле было показано, что использованные концентрации ферментов вызывают протеолитическую деградацию апо B-100 в составе ЛНП (см. рис. 12). С другой стороны присутствие в среде инкубации фенилметансульфонилфторида (ФМСФ) – неспецифического ингибитора протеиназ, предохраняло основной белок ЛНП от протеолиза.

Для изучения влияния протеолитических ферментов на ассоциацию ЛНП липопротеиды инкубировались в присутствии трипсина или химотрипсина в течение 6 часов при 37°C в среде содержащей изотонический фосфатный буфер.

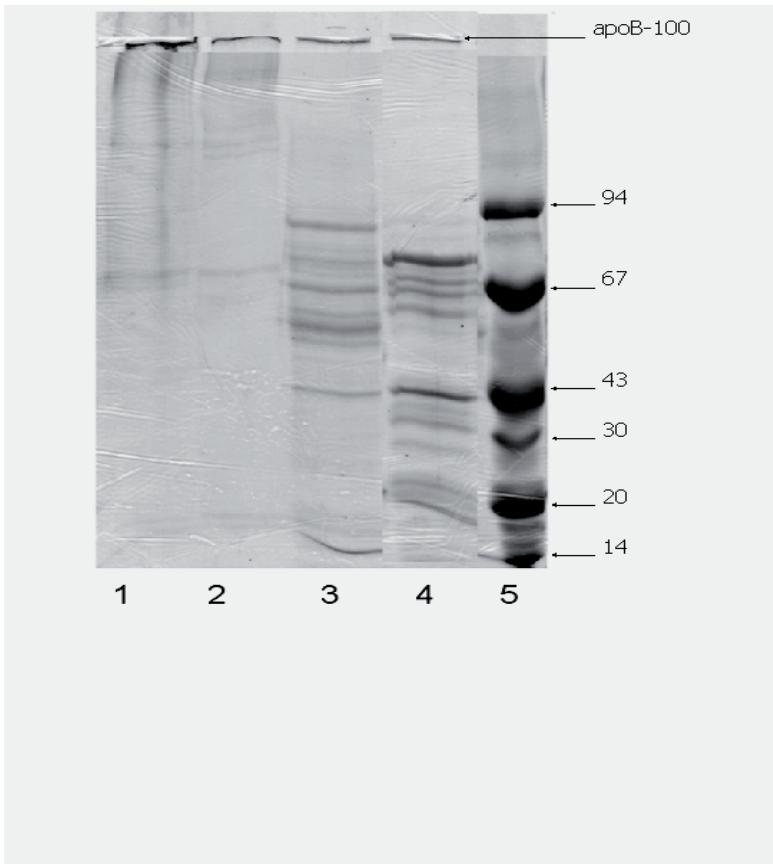


Рисунок 12 - Электрофорез в полиакриламидном геле (3-7%) apoB белка ЛНП, обработанных протеолитическими ферментами.

1 – нативные ЛНП

2 – нативные ЛНП + химотрипсин 1 Ед/мл

+ 10 мМ ФМСФ

3 – нативные ЛНП + химотрипсин 1 Ед/мл – 4 часа

4 – нативные ЛНП + трипсин 1 Ед/мл – 4 часа

5 – маркер молекулярного веса

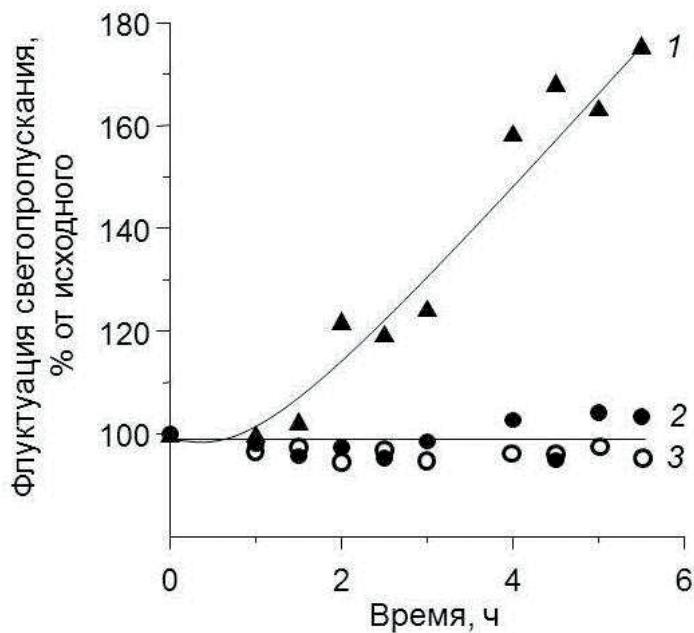


Рисунок 13 - Кинетические кривые изменения флюктуации светопропускания суспензии ЛНП в присутствии (1) и в отсутствие (2) трипсина (1 Ед/мл). Кривая 3 – то же самое, что и 1, но в присутствии 0,5 мМ ФМСФ. Концентрация ЛНП 0,2 мг белка/мл, температура инкубации 37°C.
Среда инкубации - ИФБ

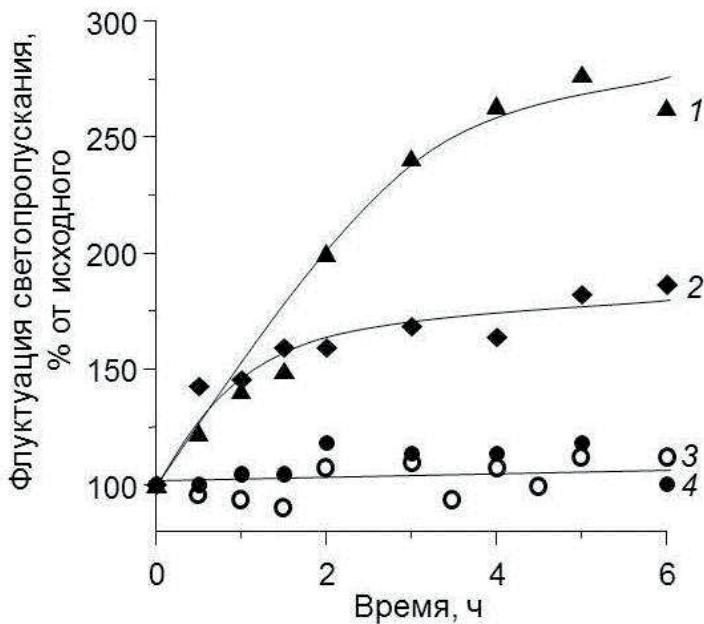


Рисунок 14 - Кинетические кривые изменения флюктуации светопропускания супензии ЛНП в присутствии (1,2,3) и в отсутствие (4) химотрипсина. Концентрация химотрипсина: 1 и 3 – 1 Ед/мл, 2 – 0,5 Ед/мл; ЛНП 0,2 мг белка/мл, температура инкубации 37°C. Среда инкубации - ИФБ.

Кривая 3 – то же, что и 1, но в присутствии 0,5 мМ ФМСФ

Типичные кинетические кривые изменения флюктуация светопропускания эмульсии ЛНП в присутствии протеолитических ферментов приведены на рисунках 13 и 14. В отсутствие ферментов за 6 часов инкубации флюктуация светопропускания эмульсии нативных ЛНП практически не изменяется, что свидетельствует об отсутствии ассоциации ЛНП (кривые 2 и 4 на рис. 13 и 14 соответственно). Добавление к ЛНП трипсина или химотрипсина приводит к увеличению флюктуации светопропускания, что указывает на стимуляцию образования ассоциатов ЛНП. В случае

химотрипсина повышение концентрации фермента, как показано на рис. 13, увеличивает флуктуацию светопропускания эмульсии ЛНП, а значит, повышает степень ассоциации частиц ЛНП.

В то же время, если в среду инкубации ферментов с ЛНП добавляли ФМСФ, то рост флуктуации светопропускания эмульсии ЛНП не наблюдался (кривые 3 на рис. 13 и 14). Это позволяет предположить, что наблюдаемое увеличение ассоциации частиц ЛНП является следствием протеолиза апоВ-100 и, возможно, изменения его конформации. Результаты экспериментов указывают на то, что протеолитические ферменты являются стимуляторами ассоциации ЛНП.

3.2.2 Влияние липолитических ферментов на устойчивость нативных ЛНП к ассоциации.

В работе использовались такие липолитические ферменты как фосфолипаза А₂ и фосфолипаза С. Известно, что фосфолипаза А₂, являясь карбоксил-эстеразой, гидролизует сложноэфирную связь в sn-2 положении фосфолипидов. При обработке липопротеидных частиц ферментом происходит расщепление фосфолипидов (главным образом фосфатидилхолина) с образованием лизофосфолипидов и свободных жирных кислот. Фосфолипаза С является фосфогидролазой и в свою очередь гидролизует эфирную связь между диглицеридом и замещенной фосфорной кислотой в фосфолипидах с образованием диацилглицерола и фосфохолина (в случае фосфатидилхолина).

Липолиз фосфолипидов ЛНП под влиянием использованных фосфолипаз был подтвержден при помощи тонкослойной хроматографии (рис. 15). В случае липопротеидов, обработанных фосфолипазой А2, был повышен уровень лизофосфатидилхолина, а при обработке фосфолипазой С повышенлся уровень диацилглицерола.

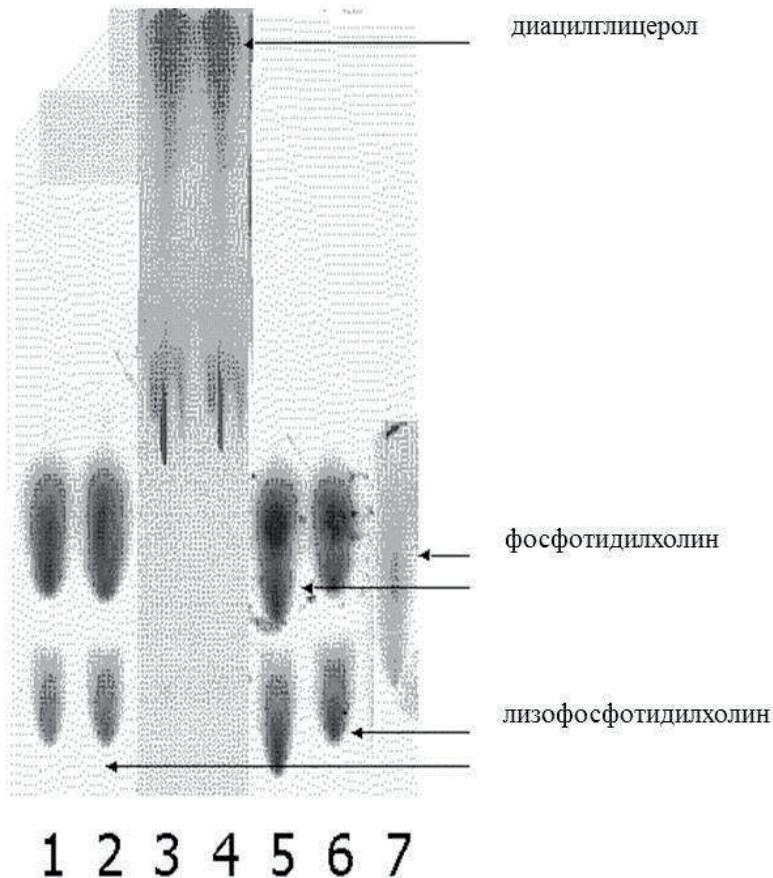


Рисунок 15 - Тонкослойная хроматография фосфолипидов ЛНП, обработанных фосфолипазой А2 и фосфолипазой С 1-2 - нативные ЛНП 3-4 - нативные ЛНП + фосфолипаза С 1 Ед/мл 5-6 - нативные ЛНП + фосфолипаза А2 7 - стандарт фосфатидилхолина

Типичные кинетические кривые изменения флюктуации светопропускания эмульсии ЛНП в присутствии липолитических ферментов приведены на рис. 16 и 1. Видно, что в отсутствие ферментов за 6 часов инкубации флюктуация светопропускания эмульсии нативных ЛНП

практически не изменяется, что свидетельствует об отсутствии ассоциации ЛНП (кривые 3 на рис. 16 и 17). Добавление к ЛНП фосфолипазы А₂ или фосфолипазы С приводит к увеличению флуктуации светопропускания, что указывает на ассоциацию частиц ЛНП. Повышение концентрации фермента, как показано на рис. 16 и 17 (кривые 1 и 2), увеличивает флуктуацию светопропускания эмульсии ЛНП, следовательно, повышает степень ассоциации частиц ЛНП. Если в среду инкубации ЛНП с ферментом добавляли ЭДТА – ингибитор работы кальций–зависимых фосфолипаз, то ассоциация частиц ЛНП не наблюдалась (кривые 4 на рис. 16 и 17).

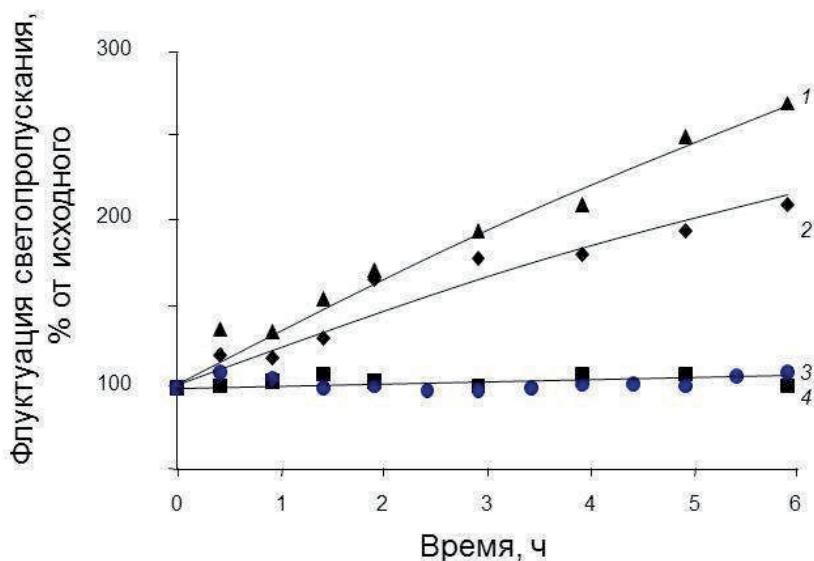


Рисунок 16 - Кинетические кривые изменения флуктуации светопропускания супензии ЛНП в присутствии (1,2,4) и в отсутствие (3) фосфолипазы А₂. Концентрация фосфолипазы А₂: 1 - 0,125 мг/мл, 2 - 0,06

мг/мл; ЛНП 0,2 мг белка/мл, температура инкубации 37°С. Среда инкубации: ИФБ, pH 7,2. Кривая 4 - то же самое, что и 1, но в присутствии 15 мМ ЭДТА

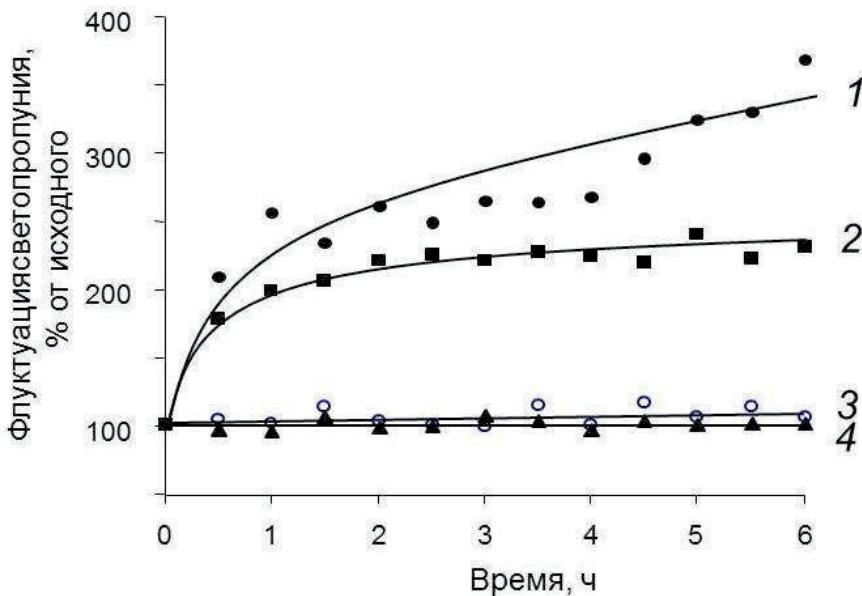


Рисунок 17 - Кинетические кривые изменения флюктуации светопропускания супензии ЛНП в присутствии (1,2,4) и в отсутствие (3) фосфолипазы С. Концентрация фосфолипазы С: 1 – 1,5 Ед/мл, 2 – 0,83 Ед/мл; ЛНП 0,2 мг белка/мл, температура инкубации 37°С. Среда инкубации: ИФБ, pH 7,2. Кривая 4 – то же, что и 1, но в присутствии 15 мМ ЭДТА

3.2.3 Влияние миелопероксидазы на устойчивость нативных ЛНП к ассоциации.

Как известно, миелопероксидаза катализирует образование гипохлорита, используя в качестве субстрата пероксид водорода. Гипохлорит – сильный окислитель и хлорирующий агент. Он способен реагировать со всеми

компонентами ЛНП, но особенно эффективно он окисляет SH- и хлорирует NH₂-группы белков.

Таблица 13 - Содержание ТБК-реактивных продуктов в ЛНП после их инкубации с миелопероксидазой.

| Миелопероксидаза, мкг/мл | ТБК-реактивные продукты, мкмоль/мг белка |
|--------------------------|--|
| 0 | 0,09 ± 0,02 |
| 0,6 | 1,52 ± 0,20 |
| 0,9 | 2,54 ± 0,12 |

Результаты исследования ассоциации ЛНП под влиянием миелопероксидазы приведены на рис 16. Видно, что инкубация нативных ЛНП при 37°C в течение 6 часов не приводит к увеличению флюктуации светопропускания эмульсии липопротеидов, а значит и не стимулирует ассоциацию частиц. В присутствии же миелопероксидазы наблюдается заметное увеличение флюктуации светопропускания, что свидетельствует об ассоциации частиц ЛНП. Такая потеря устойчивости ЛНП к ассоциации обусловлена активностью миелопероксидазы, поскольку, как видно из рис. 18 (кривая 3), в отсутствие одного из субстратов миелопероксидазы, а именно пероксида водорода, заметных изменений во флюктуации светопропускания, а значит и в размере частиц ЛНП не наблюдается.

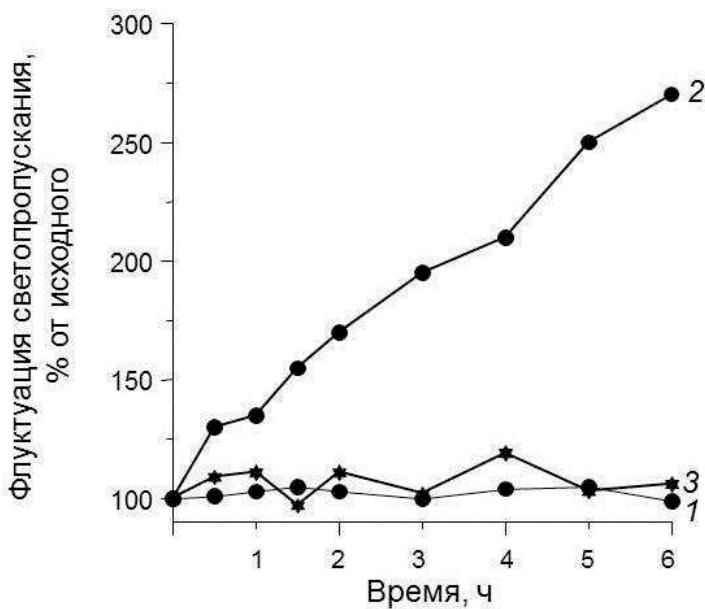


Рисунок 18 - Кинетические кривые изменения флюктуации светопропускания суспензии ЛНП в отсутствие (1) и в присутствии МПО (2). Среда инкубации: ИФБ, ЛНП – 200 мкг белка/мл, МПО – 0,5 мкг/мл, H_2O_2 – 40 мкМ. Температура 37°C. Кривая 3 – то же, что 2, но в отсутствие H_2O_2 .

3.2.4 Влияние альдегидов эндогенного происхождения на устойчивость ЛНП к ассоциации.

Альдегидные группы могут вступать в реакцию с ϵ -аминогруппами лизиновых остатков молекул апоВ с образованием прочных внутри- и межмолекулярных сшивок, в том числе и ковалентных связей типа оснований Шиффа. Далее, относительно нестабильные связанные с белком основания Шиффа подвергаются перегруппировке по реакции Амадори с образованием более стабильных производных, которые в свою очередь преобразуются через

дикарбонильные интермедиаты в конечные продукты гликозилирования. Таким образом, альдегиды могут вызывать модификацию ЛНП. Известно, что в ходе окислительного и карбонильного стресса, сопровождающего многие патологические процессы в организме человека, могут формироваться эндогенные низкомолекулярные альдегиды, такие, например, как глиоксаль и метилглиоксаль. Кроме того, модифицирующее действие на ЛНП способен оказывать МДА, образующийся в результате окислительной деструкции липидных гидропероксидов

Степень модификации ЛНП под действием альдегидов оценивали по изменению электрофоретической подвижности частиц. Известно, что обработка ЛНП альдегидами приводит к увеличению отрицательного заряда частиц ЛНП за счет уменьшения количества свободных аминогрупп и, следовательно, к увеличению электрофоретической подвижности. Из рис. 19 видно, что частицы ЛНП, модифицированные МДА, метилглиоксалем и глиоксалем, обладают значительной электрофоретической подвижностью по сравнению с нативными ЛНП.

Совместно с лабораторией биохимии свободнорадикальных процессов ИКК РКНПК Росздрава (зав. лаб. профессор В.З. Ланкин) было изучено влияние малонового диальдегида (МДА), глиоксала и метилглиоксала на процесс ассоциации ЛНП. Результаты эксперимента приведены на рис 20. Видно, что инкубация нативных ЛНП при 37°C в течение 6 часов не вызывает изменений флюктуации светопропускания эмульсии (рис.20, кривая 1), а значит не приводит к изменению и среднего размера частицы. В присутствии же альдегидов наблюдается заметное увеличение флюктуации светопропускания, что свидетельствует об увеличении среднего размера частиц ЛНП. При этом ЛНП, модифицированные МДА (рис.20, кривая 2), агрегируют в 2 раза медленнее, чем ЛНП, модифицированные глиоксалем и метилглиоксалем (рис.20 кривая 3 и 4).



1 2 3 4

Рисунок 19 - Электрофореграмма нативных ЛНП и ЛНП, модифицированных альдегидами эндогенного происхождения в 1 % агарозном геле. (1) – ЛНП, модифицированные МДА; (2) – ЛНП, модифицированные метилглиоксалем; (3) – ЛНП, модифицированные глиоксалем; (4) –нативные ЛНП

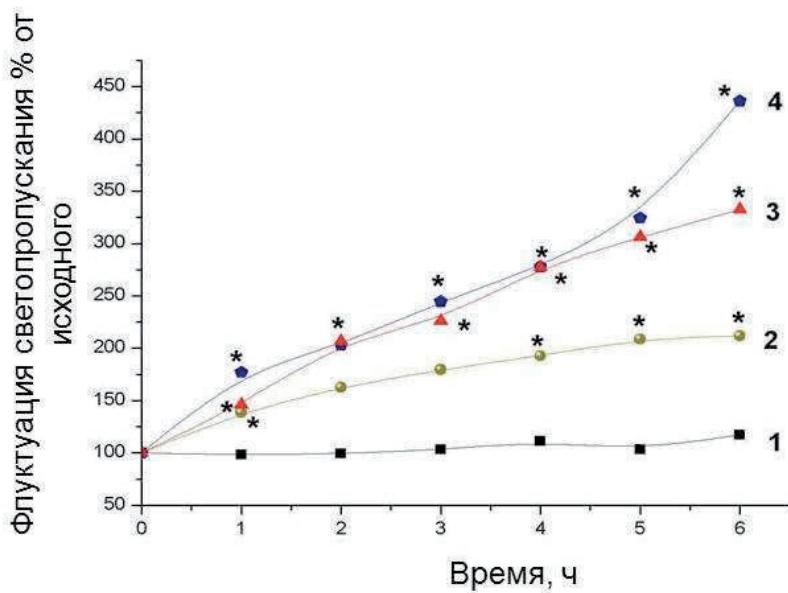


Рисунок 20 - Кинетические кривые изменения флюктуации светопропускания ЛНП в присутствии и отсутствии альдегидов (1) нативные ЛНП; (2) ЛНП модифицированные МДА; (3) ЛНП модифицированные глиоксалем; (4) ЛНП модифицированные метилглиоксалем; (* - достоверность отличий от контроля $p \leq 0.05$)

3.2.5 Влияние нейраминидазы на устойчивость нативных ЛНП к ассоциации.

Десиалирующий фермент бактериального происхождения нейраминидаза отщепляет α -2-6 связанный сиаловую кислоту, занимающую терминальное положение в гликопротеине апоВ-100.

Резкое снижение содержания сиаловой кислоты в ЛНП, обработанных нейраминидазой, было подтверждено при помощи модифицированного метода

Воррена. Так, содержание сиаловой кислоты в ЛНП, инкубированных с 0,02 Ед нейраминидазы в течении 6 часов, снизилось на 73+/-2% по сравнению с контролем.

Влияние нейраминидазы на ассоциацию частиц ЛНП отражено на рисунке 21. Как и в предшествующих экспериментах нативные ЛНП, не обработанные нейраминидазой, сохраняли устойчивость к ассоциации на протяжении 6 часов инкубации. В то же время, флюктуация светопропускания эмульсии ЛНП, обработанных нейраминидазой, неуклонно возрастала, что свидетельствует об ассоциации липопротеидов.

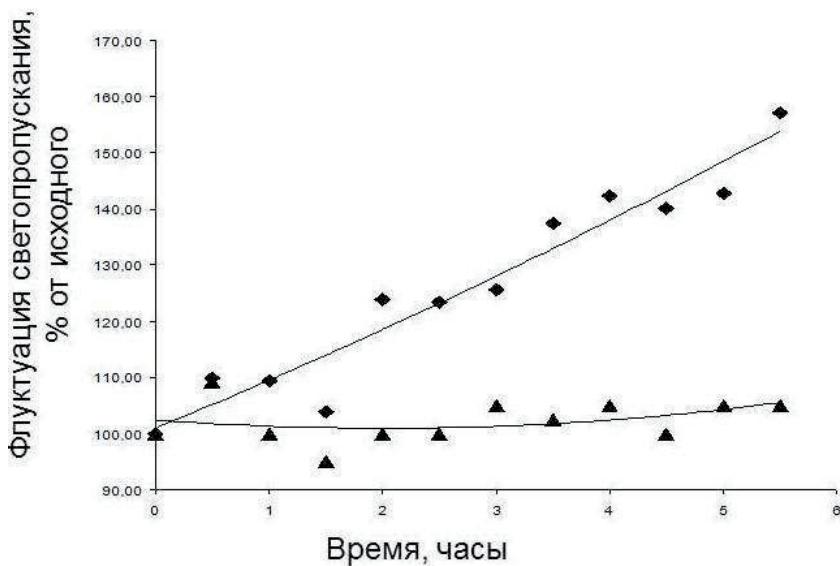


Рисунок 21 - Кинетические кривые изменения флюктуации светопропускания суспензии нативных ЛНП в отсутствие (1) и в присутствии 0,125 Ед нейраминидазы (2). Среда инкубации: ИФБ, ЛНП – 200 мкг белка/мл, Температура 37°C

3.2.6. Изучение агрегации ЛНП при изменении их сольватной оболочки

Тенденция ЛНП к агрегации может объясняться не только изменениями в структуре их липидной или белковой части, но и нарушением их гидратно-сольватной оболочки. Формирование сольватной оболочки зависит от физико-химических свойств поверхности частицы. Это дает основание предполагать, что цмЛНП могут обладать отличной от нативных ЛНП устойчивостью к ассоциации в условиях нарушения сольватной оболочки при изменении ионной силы среды или воздействии полиэтиленгликоля (ПЭГ).

3.2.6.1. Изучение полиэтиленгликоль-индуцированной агрегации

Известно, что ПЭГ - синтетический водорастворимый полимер, изменяет физико-химические свойства сольватной оболочки природных белок-липидных комплексов, в том числе и ЛНП, способствует их агрегации с последующим слиянием. [Arnold et al., 1987; 1988; 1989; Ohki and Arnold, 1990]. Причем, процесс ассоциации ЛНП в значительной степени определяется состоянием поверхности частицы, модификация которой под действием различных факторов изменяет их агрегационную устойчивость. Это дает основание предполагать, что цмЛНП, физико-химические свойства которых заметно отличаются от таковых для нЛНП [Tertov et al., 1992; 1995], могут обладать отличной от нЛНП устойчивостью к ПЭГ-индуцированной ассоциации.

Мы изучили различия в характере ассоциации нативных и склонных к агрегации циркулирующих модифицированных ЛНП при изменении сольватной оболочки под действием ПЭГ.

Была исследована динамика изменения флюктуации светопропускания суспензии ЛНП при различных концентрациях ПЭГ. На рис. 11 приведены типичные кинетические кривые спонтанной и ПЭГ-индуцированной ассоциации нативных ЛНП и цмЛНП. Видно, что в процессе инкубации при 37°C цмЛНП в отличие от нативных ЛНП ассоциируют (кривые 1 и 4 на рис.

10). За 6 ч инкубации в присутствии 2% ПЭГ флуктуация светопропускания суспензии цмЛНП (прямопропорциональна относительному размеру частиц) увеличивалась в 2,5 раза, тогда как для нативных ЛНП она достоверно не изменялась (кривые 2 и 5, рис. 11). С ростом концентрации ПЭГ (до 6%) увеличивалась скорость ассоциации ЛНП. Так флуктуация светопропускания за 6 ч инкубации в случае цмЛНП возрастала в 4,5 раза, тогда как в случае нативных ЛНП – лишь в 3,4 раза (кривые 3 и 6, рис. 11).

Мы задались вопросом, является ли ПЭГ-индуцированная агрегация нативных и циркулирующих модифицированных ЛНП обратимым процессом. Нативные ЛНП или цмЛНП, предварительно профильтрованные через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм (фильтрация необходима для удаления возможных центров ассоциации), инкубировали в присутствии ПЭГ. После инкубации ЛНП диализовали с целью освобождения инкубационной среды от ПЭГ. Если ПЭГ-индуцированная ассоциация ЛНП является обратимой, то удаление ПЭГ должно приводить хотя бы к частичной дезагрегации образовавшихся ассоциатов ЛНП. Результаты экспериментов приведены в табл. 14.

Как и следовало ожидать, по мере инкубации в присутствии ПЭГ нативные ЛНП и цмЛНП ассоциируют, что проявляется в достоверном увеличении флуктуации светопропускания уже через 3 часа инкубации. Удаление ПЭГ путем диализа не приводило к снижению флуктуации светопропускания, а значит и к уменьшению среднего размера ассоциатов. Напротив, после 12-часового диализа намечалась тенденция к увеличению флуктуации светопропускания. После диализа, продолжавшегося в течение 24 ч, флуктуация светопропускания, как правило, достоверно возрастала по сравнению с этим показателем, измеренным перед процедурой диализа. Это указывает на необратимость ПЭГ-индуцированной ассоциации как нативных ЛНП, так и цмЛНП.

Таблица 14 - Влияние диализа ассоциатов нЛНП и цмЛНП, образованных в результате предварительной инкубации нЛНП и цмЛНП в присутствии 5% ПЭГ, на флюктуацию светопропускания.

| Время инкубации с ПЭГ, ч | До диализа | нЛНП | | цмЛНП | |
|--------------------------------|---------------------|-------------------------------------|----------------------|------------------------|-------------------------------------|
| | | После диализа продолжительностью | | До диализа | После диализа продолжительностью |
| | | 12 ч | 24 ч | | |
| 0 (контроль) | 27 ± 2 | - | - | 44 ± 3 | - |
| 0,5 | 31 ± 4 | - | - | 49 ± 8 | - |
| 3 | 44 ± 9 ¹ | 61 ± 12 | 96 ± 20 ³ | 85 ± 11 ^{1,2} | 109 ± 21 |
| 6 | 48 ± | 68 ± 14 | 80 ± 12 ³ | 122 ± | 111 ± 18 |
| | 11 ¹ | | | 13 ^{1,2} | 101 ± 14 |

Примечание: нЛНП или цмЛНП (0,2 мг белка/мл), предварительно профильтрованные через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, инкубировали при 37°C в присутствии 5% ПЭГ в ИФБ, содержащем 1 мг/мл ЭДТА. После 3 или 6 ч инкубации ЛНП диализовали против ИФБ, содержащего 1 мг/мл ЭДТА в течение 12 или 24 ч при 4°C. Через 0,5; 3 и 6 ч инкубации с ПЭГ, а также по завершении диализа в образцах ЛНП регистрировали флюктуацию светопропускания. В таблице в относительных единицах приведены средние арифметические измерений пяти параллельных опытов ± стандартное математическое отклонение. ¹Достоверное ($p<0,05$) отличие от контроля (до инкубации). ²Достоверное ($p<0,05$) отличие от соответствующих показателей для нЛНП. ³Достоверное ($p<0,05$) отличие от показаний до диализа.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что ЛНП ассоциируют при инкубации с ПЭГ. цмЛНП менее устойчивы к ассоциации в условиях нарушения сольватной оболочки по сравнению с нативными ЛНП, причем процесс ассоциации как нативных, так и циркулирующих модифицированных ЛНП носит необратимый характер.

3.2.6.2. Агрегация ЛНП при понижении ионной силы

Как указывалось выше, устойчивость дисперсных систем в водных средах во многом определяется наличием сольватной оболочки, стабильность которой, в свою очередь, зависит от ионной силы среды [Зонтаг, Штренге, 1973]. Используя этот факт, мы в данной работе попытались сравнить устойчивость нативных ЛНП и циркулирующих модифицированных ЛНП к образованию ассоциатов при понижении ионной силы среды, а также выяснить, является ли этот процесс обратимым.

Мы исследовали агрегацию ЛНП при различных значениях ионной силы (от 2 мМ до 160 мМ). На рис. 22 *а* и *б* приведены типичные примеры кинетических кривых изменения флюктуации светопропускания суспензий нативных ЛНП и цмЛНП при разных ионных силах инкубационной среды. Видно, что ни нативные ЛНП, ни цмЛНП, находясь в изотонической среде (ИФБ, pH 7,4), не подвергались заметной ассоциации в течение 6 ч инкубации (рис. 22 *б*, кривая 5). Однако снижение ионной силы среды приводило к тому, что флюктуация светопропускания, а значит и средний размер частиц начинали возрастать по мере инкубации как нативных ЛНП, так и цмЛНП. Причем, при одних и тех же значениях ионной силы среды цмЛНП ассоциировали быстрее нативных. Так при ионной силе 1,1 мМ за первый час инкубации размер цмЛНП возрастал в среднем в 1,8 раза (рис. 22 *б*, кривая 1), тогда как нативные ЛНП в этих же условиях увеличивались в размере только в 1,4 раза (рис. 22 *а*, кривая 1).

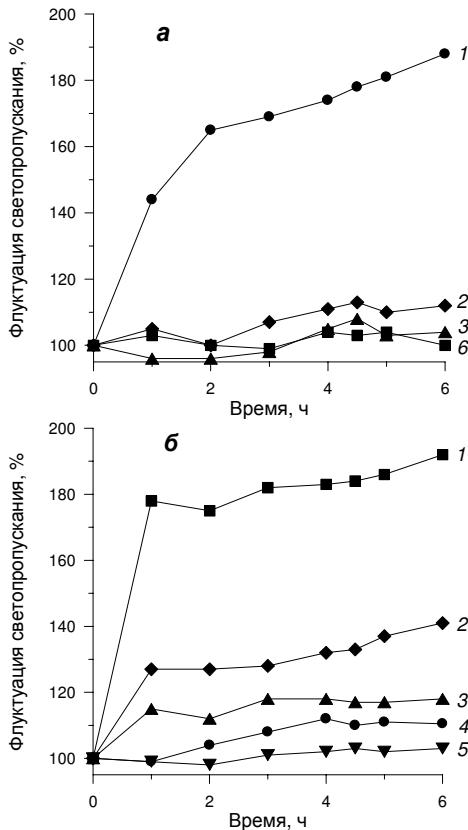


Рисунок 22 - Кинетические кривые изменения флюктуации светопропускания суспензии нативных ЛНП (а) и цмЛНП (б) при разной ионной силе инкубационной среды. Среда инкубации – ИФБ, разбавленный дистиллированной водой до необходимого значения ионной силы, pH 7,4, концентрация ЛНП 0,2 мг белка/мл, температура инкубации 37°С. Ионная сила (мМ): 1 – 1,1; 2 – 4; 3 – 20; 4 – 80; 5 – 160. Кривая 6 – контроль в отсутствие ЛНП. По оси ординат – флюктуация светопропускания в % от исходного значения

На рис. 23 приведена зависимость от ионной силы среды флюктуации светопропускания супензии нативных ЛНП (кривая 1) и цмЛНП (кривая 2), измеренной через 6 ч инкубации. Видно, что во всем диапазоне ионной силы среды кривая 2 лежит выше кривой 1, свидетельствуя о том, что средний размер частиц цмЛНП через 6 ч инкубации при любой ионной силе среды становится несколько больше по сравнению со средним размером нативных ЛНП. Видно, что снижение ионной силы среды со 160 мМ до 2 мМ не приводило к заметному увеличению среднего размера нативных ЛНП за 6 ч инкубации. В супензии нативных ЛНП регистрировали более крупные частицы (крупнее в 1,9 раза) только в том случае, когда ионная сила среды

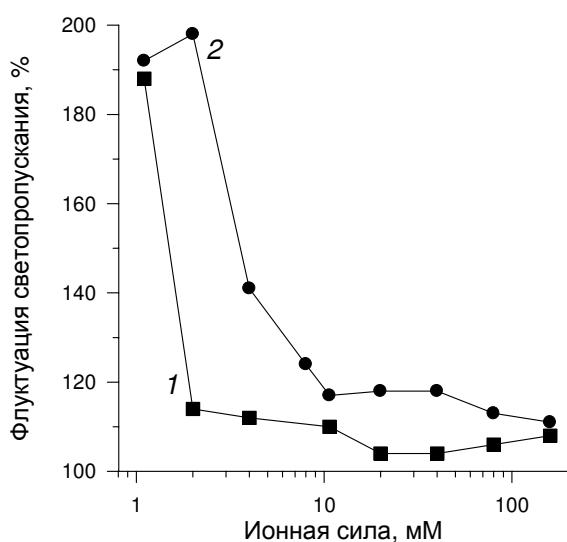


Рисунок 23 - Зависимость флюктуации светопропускания супензии нативных ЛНП (1) и цмЛНП (2) через 6 ч инкубации при 37°C от ионной силы среды. Концентрация ЛНП 0,2 мг белка/мл. По оси ординат – флюктуация светопропускания в % от исходного значения

была снижена до 1,1 мМ (рис. 23, кривая 1). цмЛНП были явно менее устойчивы к ассоциации при понижении ионной силы раствора. Так уже при ионной силе 4 мМ их средний размер за 6 ч инкубации увеличивался в 1,4 раза, а при ионной силе 2 мМ – в 1,9 раза (рис. 23, кривая 2).

Итак, снижение ионной силы (нарушение сольватной оболочки) приводит к агрегации липопротеидов, причем цмЛНП обладают повышенной склонностью к образованию ассоциатов по сравнению с нативными ЛНП. Для того чтобы выяснить, является ли этот процесс обратимым, нативные ЛНП или цмЛНП, предварительно профильтрованные через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, диализовали в течение 6 или 24 ч при 4°C против дистиллированной воды. Затем диализат заменяли свежим ИФБ, содержащим 1 мг/мл ЭДТА, и вновь диализовали в течение 24 ч при 4°C. Таким образом мы сначала уменьшали ионную силу среды, а затем возвращались к исходным параметрам. До и после завершения диализа в образцах ЛНП регистрировали флуктуацию светопропускания. Результаты исследований приведены в табл. 15. Как и следовало ожидать, в период диализа против дистиллированной воды снижение ионной силы среды инициировало ассоциацию ЛНП. Так, через 6 и 24 ч диализа нативные ЛНП увеличивались в размере в среднем соответственно в 2,9 и 5 раз. В тех же условиях средний размер цмЛНП увеличивался в большей степени, а именно, в 3,4 и 5,6 раза соответственно.

Таблица 15- Влияние понижения ионной силы среды в результате диализа против дистиллированной воды и последующего ее восстановления путем диализа против ИФБ на флуктуацию светопропускания суспензии нативных ЛНП и цмЛНП

| Момент измерения флуктуации светопропускания ЛНП | Флуктуация светопропускания, отн. ед. | |
|--|---------------------------------------|--------|
| | нЛНП | цмЛНП |
| До диализа (контроль) | 33 ± 5 | 39 ± 4 |

| | | |
|--|----------------------|----------------------|
| Эксперимент №1 | | |
| После диализа против дистиллированной воды (6 ч) | 97 ± 10^1 | $133 \pm 19^{1,2}$ |
| После диализа против ИФБ (24 ч) | $121 \pm 21^{1,3}$ | $188 \pm 33^{1,3}$ |
| Эксперимент №2 | | |
| После диализа против дистиллированной воды (24 ч) | $165 \pm 8^{1,4}$ | $217 \pm 12^{1,2,4}$ |
| После диализа против ИФБ (24 ч) | $425 \pm 23^{1,3,4}$ | $517 \pm 3^{1,4}$ |

Примечание: Нативные ЛНП или цмЛНП (0,2 мг белка/мл), предварительно профильтрованные через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, диализовали в течение 6 или 24 ч при 4°C против дистиллированной воды. Затем диализат заменяли на свежий ИФБ, содержащий 1 мг/мл ЭДТА, и вновь диализовали в течение 24 ч при 4°C. До и после завершения диализа в образцах ЛНП регистрировали флуктуацию светопропускания. В таблице в относительных единицах приведены средние арифметические измерений трех параллельных опытов \pm стандартное математическое отклонение. ¹Достоверное ($p<0,05$) отличие от контроля. ²Достоверное ($p<0,05$) отличие от соответствующих показаний для нативных ЛНП. ³Достоверное ($p<0,05$) отличие от соответствующих показаний до диализа против ИФБ. ⁴Достоверное ($p<0,05$) отличие от соответствующих показаний эксперимента №1.

Увеличение ионной силы среды до исходного значения путем диализа против ИФБ не приводило к снижению флуктуации светопропускания, а значит и к уменьшению среднего размера ассоциатов как нативных ЛНП, так и цмЛНП. Напротив, после 24-часового диализа против ИФБ флуктуация светопропускания во всех случаях достоверно возрастила. Особенно это было заметно для цмЛНП (см. табл. 15). Данный факт указывает на необратимость ассоциации как нативных ЛНП, так и цмЛНП в условиях пониженной ионной силы среды.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что цмЛНП менее устойчивы к ассоциации по сравнению с нативными ЛНП в условиях нарушения их гидратно-сольватной оболочки путем снижения ионной силы среды или инкубации с ПЭГ, причем процесс ассоциации, по крайней мере, в условиях нашего эксперимента является необратимым.

3.2.7. Дегликозилирование ЛНП способствует их ассоциации

Ранее было показано, что различие в структуре нативных ЛНП и склонных к ассоциации цмЛНП локально и выражается в изменении белковой части цмЛНП. С другой стороны Тертовым с соавт. [Tertov et al., 1992; Тертов с соавт., 1996а] было показано, что цмЛНП характеризуются сниженным содержанием сиаловой кислоты, маннозы и других сахаров. Нельзя исключить, что именно потеря различных гликозидных остатков вызывает повышенную склонность ЛНП к агрегации. Мы изменили углеводный состав ЛНП с помощью гликозидаз и изучили склонность к ассоциации полученных дегликозилированных ЛНП, а также их способность вызывать накопление липидов в клетках.

В табл. 16 представлено изменение содержания сиаловой кислоты в липидной и белковой части ЛНП, которое произошло после обработки их в течение 2-х часов при 37°C α 2-3-сиалидазой из *Newcastle Disease virus*, специфичной к 2-3 связанный сиаловой кислоте и α 2-6-сиалидазой из *Arthrobacter ureafaciens*, специфичной к 2-6-связи. Видно, что 2-3-сиалидаза вызывала достоверное снижение сиаловой кислоты в липидной части, а 2-6-сиалидаза – в белковой части ЛНП до уровня, сопоставимого с содержанием сиаловой кислоты в цмЛНП. Был измерен относительный размер частиц ЛНП до и после шести часов инкубации с сиалидазами. Видно, что средний размер ЛНП, обработанных 2-3-сиалидазой вырос в 8 раз, а обработанных 2-6-сиалидазой – в 6 раз. При этом цмЛНП (также имеющие сниженное

содержание сиаловой кислоты) после 6 часов инкубации при 37°C были крупнее, чем нативные ЛНП в 10 раз.

Таблица 16 - Содержание сиаловой кислоты в липопротеидах, обработанных сиалидазами.

| Липопротеиды | Содержание сиаловой кислоты | | Относительный размер частиц |
|--|-----------------------------|------------------------|-----------------------------|
| | В белке, нмоль/мг | В липидах, нмоль/мг | |
| | | | |
| Нативные ЛНП | 60±4 | 16±1 | 1** |
| цмЛНП | 48±4* | 8±1* | 9,8* |
| ЛНП, обработанные α 2-3-сиалидазой | 54±6 | 9±1* | 8* |
| ЛНП, обработанные α 2-6-сиалидазой | 46±2* | 18±1 | 6,4* |

* Достоверное отличие от нативных ЛНП, p<0,05.

** Размер цЛНП принят за 1

Помимо влияния на агрегацию удаления терминальной сиаловой кислоты из белковой и липидной составляющих липопротеидов, было исследовано также влияние удаления маннозы на склонность деманнозилированных ЛНП к ассоциации. Как следует из результатов, приведенных в табл. 17, обработка нативных ЛНП маннозидазой из *Jack bean* приводила к 30% снижению содержания маннозы в ЛНП. Деманнозилированные ЛНП, как и десиалированные проявляли повышенную склонность к агрегации. Образованные ими ассоциаты были крупнее нативных ЛНП в 9 раз.

Таблица 17 - Влияние деманнозилирования ЛНП на их способность аккумулировать холестерин в гладкомышечных клетках непораженной интимы аорты человека.

| Липопротеид | Содержание маннозы в ЛНП, нмоль/мг белка | Размер ЛНП, отн. ед. |
|-----------------------------------|--|-------------------------|
| Нативные ЛНП | 81±6 | 1** |
| ЛНП, обработанные маннозидазой | 57±4* | 9* |

*Достоверное отличие от нативных ЛНП, $p<0,05$.

** Размер нЛНП принят за 1

Далее мы исследовали влияние удаления целых N-связанных цепей апобелка липопротеидов на их способность вызывать отложение внутриклеточного холестерина. В экспериментах были использованы три фермента: эндогликозидаза F₁, эндогликозидаза F₂ и пептид-N-гликаназа F. Обработка нативных ЛНП эндогликозидазой F₁, гидролизующей β 1-4 связь между двумя N-ацетилглюкозаминами преимущественно полиманнозных аспарагин-связанных цепей, приводила к удалению 57% суммарных углеводов в ЛНП и 58% маннозы (см. табл. 18). Эндогликозидаза F₂, гидролизующая предпочтительно биантенные углеводные цепи комплексного типа, удаляла 55% суммарных углеводов и 46% сиаловой кислоты в нативных ЛНП. В то же время, как и следовало ожидать, не было обнаружено заметного снижения содержания маннозы в ЛНП. Пептид-N-гликаназа F, гидролизующая связь аспарагина с N-ацетилглюкозамином, удаляла большую часть нейтральных сахаров, в том числе и маннозы. Этот фермент, снижал содержание сиаловой кислоты в ЛНП на 54%, маннозы – на 45%, а общее содержание углеводов снизилось на 55%. Относительный размер частиц ЛНП, обработанных

эндогликозидазой F₁ и пептид-N-гликаназой F, увеличился в 9 раз, а ЛНП, обработанных эндогликозидазой F₂ – в 8 раз (см. табл. 18).

Таблица 18 - Содержание общих углеводов, маннозы и сиаловой кислоты в ЛНП после обработки эндогликозидазами.

| | Общие углеводы, % | Манноза, % | Сиаловая кислота, % | Размер частиц, отн. ед. |
|--|-------------------------|---------------|---------------------------|-------------------------------|
| Нативные ЛНП | 100±6 | 100±6 | 100±8 | 5 |
| ЛНП, обработанные эндогликозидазой F ₁ | 43±2* | 58±3* | 85±9 | 45* |
| ЛНП, обработанные эндогликозидазой F ₂ | 45±4* | 87±6 | 54±3* | 42* |
| ЛНП, обработанные пептид-N-гликаназой F | 45±5* | 55±4* | 46±4* | 45* |

* Достоверное отличие от нативных ЛНП, p<0,05.

Нами было изучено, в какой степени дегликозилирование ЛНП влияет на их способность вызывать накопление липидов в клетках. Агрегаты дегликозилированных различным образом ЛНП инкубировали с клетками, выделенными из интимы аорты человека, после чего измеряли накопление внутриклеточного холестерина.

На рис. 23 видно, что нативные ЛНП (1) не вызывают накопления липидов, в то время как цмЛНП (2) и дегликозилированные ЛНП (3-7) проявляют атерогенные свойства. Причем существует прямая зависимость между атерогенностью липопротеидов (способностью накапливать холестерин в клетках) и их средним размером ($r = 0,93$, $p<0,05$).

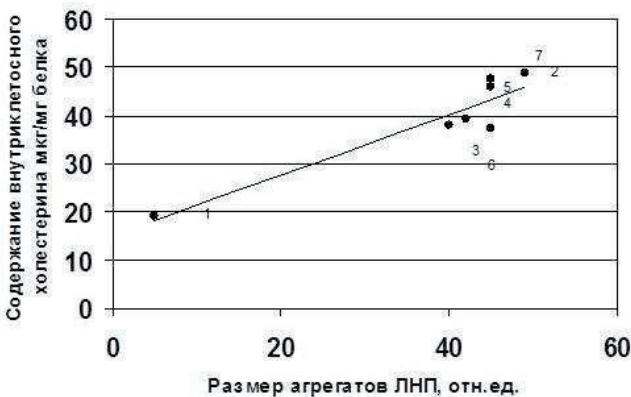


Рисунок 24 - Зависимость содержания внутриклеточного холестерина после инкубации гладкомышечных клеток с нативными ЛНП (1), цмЛНП (2), ЛНП, обработанными α 2-3-сиалидазой (3), маннозидазой (4), эндогликозидазой F₁ (5), эндогликозидазой F₂ (6), пептид-N-гликаназой F (7) или α 2-6-сиалидазой (8), от размера частиц липопротеидов. Содержание холестерина в клетках, инкубированных в отсутствие ЛНП составило $20,7 \pm 1,8$ мкг/мг белка

Таким образом, нами показано, что липопротеиды, поверхность которых обеднена углеводами *in vitro* (удаление как сиаловой кислоты и маннозы, так и целых гликозидных остатков), теряют устойчивость к ассоциации и агрегируют подобно циркулирующим в крови множественно модифицированным ЛНП. Образующиеся агрегаты крупнее нативных частиц в 6-9 раз. Между размером агрегатов ЛНП и их способностью вызывать накопление липидов в клетках существует прямая зависимость.

3.3 Изучение конформационных изменений апоВ белка цммЛНП и ферментативно модифицированных ЛНП.

Все типы модификаций, которые мы использовали: протеолитическая, липолитическая, окислительная и десиалирующая – имеют место в циркулирующих модифицированных ЛНП [Tertov et al., 1992; Тертов, 1999]. В данной работе было показано, что любая из этих модификаций приводит к ассоциации ЛНП. Остается неясным какая модификация изменяет частицу липопротеида *in vivo*, делая ее атерогенной. Для ответа на этот вопрос мы сопоставили изменения в цммЛНП с изменениями, вызываемыми различными модификациями в нативных липопротеидах. В качестве показателя изменений, имеющих принципиальное значение, была выбрано **поверхностное расположение аполипопротеида В**, которое оценивали при помощи моноклональных антител. Известно, что именно молекула апоВ играет особую роль в стабилизации частицы ЛНП (Hevonoja et al., 2000). Существенные нарушения структуры апобелка В неизбежно ведут к ассоциации липопротеидных частиц.

3.3.1 Изучение конформационных изменений апоВ белка цммЛНП

Результаты исследования взаимодействия нативных и цммЛНП с моноклональными антителами различных клонов представлены на рис. 25. По различиям в связывании антител с нативными ЛНП и цммЛНП можно судить об изменениях в структуре множественно модифицированных липопротеидов. Так, было обнаружено, что антитело 3С8 лучше взаимодействует с нативными ЛНП, чем с множественно модифицированными. Можно предположить, что соответствующий эпитоп в составе апоВ цммЛНП подвергается маскированию в результате модификаций и перестройки апоВ белка. С другой стороны, цммЛНП эффективнее, чем нЛНП взаимодействуют с антителами клонов 2Е3, 2G1 и 7С2. По-видимому, эпитоп, ответственный за связывание 2Е3 антитела (аминокислотные остатки апоВ100 3728-4306) становится более доступным для

взаимодействия с антителом в цммЛНП. Повышенная способность цммЛНП связываться с антителами 2G1 и 7C2 может свидетельствовать о некоторой гомологии цммЛНП и МДА-модифицированных липопротеидов, к которым получены эти антитела (см. табл. 3). С другой стороны, в экспериментах с антителом 3G4, также распознающим МДА-модифицированные ЛНП, не было выявлено достоверных различий во взаимодействии нативных и цммЛНП с этим антителом. Следовательно, нельзя говорить о полном совпадении поверхностных структур МДА-модифицированных ЛНП и *in vivo* модифицированных липопротеидов.

Также не было выявлено изменений в структуре апоВ цммЛНП при использовании антител 5F8 и 4C11. Эти антитела получены к участкам апоВ белка с 1 по 1297 аминокислотный остаток и с 2377 по 2658 аминокислотный остаток соответственно. Вероятно, изменения структуры апоВ происходящие в цммЛНП не затрагивают соответствующие фрагменты N концевого участка макромолекулы апоВ.

Таким образом, при использовании четырех моноклональных антител к из семи были обнаружены различия во взаимодействии антител с цммЛНП и нативными липопротеидами.

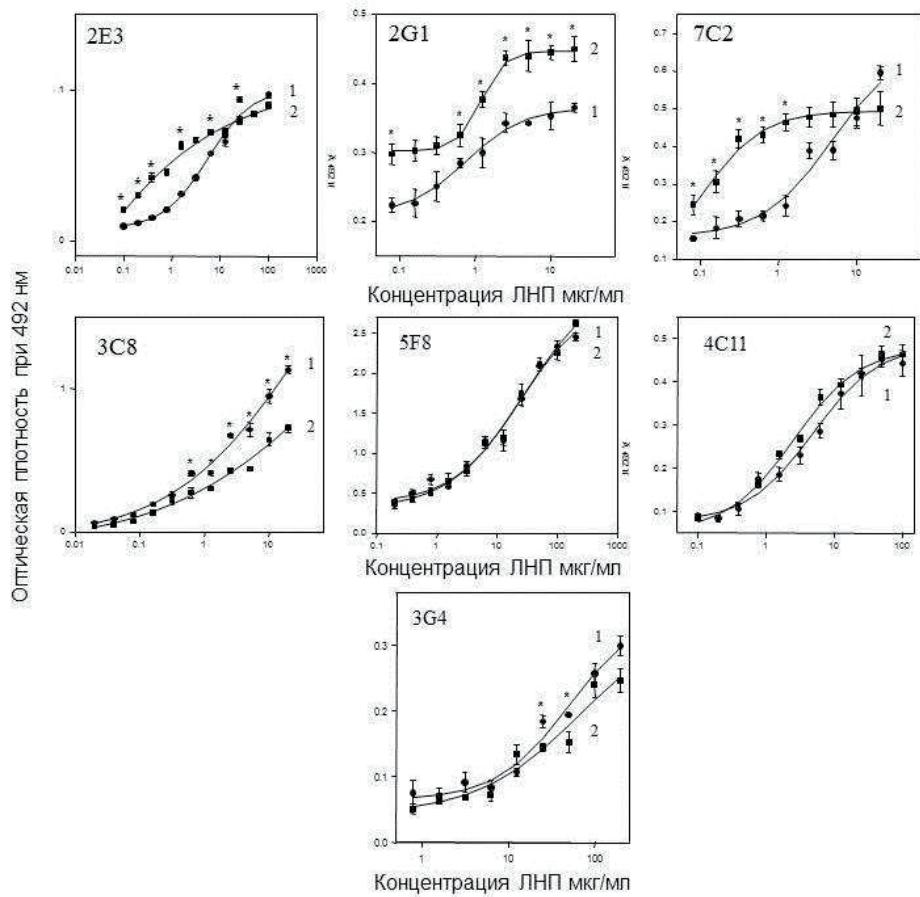


Рисунок 25 - Концентрационные зависимости взаимодействия нативных (1) и циркулирующих модифицированных ЛНП (2) с моноклональными антителами к апо-В человека. На графиках показаны данные типичного эксперимента, результаты которого представлены как среднее трех определений \pm стандартное математическое отклонение. Звездочкой отмечено достоверное отличие от нативных ЛНП, $p < 0.05$.

3.3.2 Изучение конформационных изменений апоB белка под влиянием протеолитических ферментов.

Результаты исследования взаимодействия нативных и модифицированных протеолитическими ферментами ЛНП с моноклональными антителами различных клонов представлены на рис. 26и 27. Было обнаружено, что ЛНП, предварительно обработанные химотрипсином, эффективнее, чем нативные ЛНП взаимодействуют с антителами клонов 3C8 и 2E3 (рис. 26). С другой стороны, нативные ЛНП лучше, чем ферментативно-модифицированные, связывались с антителами клона 4C11 (рис. 26). Использование других клонов не выявило достоверных различий в их связывании с нативными и обработанными химотрипсином ЛНП. В качестве примера на рис. 26 приведены результаты, полученные для клона 5F8. В таблице 19 приведены результаты исследования антигенных профилей апоB цммЛНП и протеолитически модифицированных ЛНП. Видно, что только антитело 2E3 в обоих случаях предпочтительно распознает модифицированные липопротеиды. Возможно, в структуре цммЛНП и модифицированных химотрипсином ЛНП происходят сходные изменения в результате которых соответствующий участок апоB, с 3728 по 4306 аминокислотные остатки, становится более доступным для взаимодействия с антителом. Кроме того, антитела 5F8 и 3G4, также как в случае циркулирующих модифицированных ЛНП, одинаково взаимодействовали с нативными и модифицированными липопротеидами. Видимо, соответствующие участки апоB белка не изменены как в составе цммЛНП, так и в структуре модифицированных химотрипсином ЛНП. Приведенные факты могут говорить об определенном сходстве структур цммЛНП и модифицированных химотрипсином липопротеидов.

Таблица 19 - Антигенные различия апо B-100 нативных, цммЛНП и обработанных протеолитическими ферментами ЛНП. М – антитело достоверно лучше связывается с ЛНП, модифицированными ферментом; Н – антитело

лучше связывается с нативными ЛНП; 0 – различия в связывании антитела с нативными и модифицированными ферментом ЛНП не достоверны.

| клон | цММЛНП | химотрипсин | трипсин |
|------|--------|-------------|---------|
| 3C8 | H | M | H |
| 4C11 | 0 | H | H |
| 2E3 | M | M | 0 |
| 5F8 | 0 | 0 | 0 |
| 2G1 | M | 0 | 0 |
| 7C2 | M | 0 | 0 |
| 3G4 | 0 | 0 | 0 |

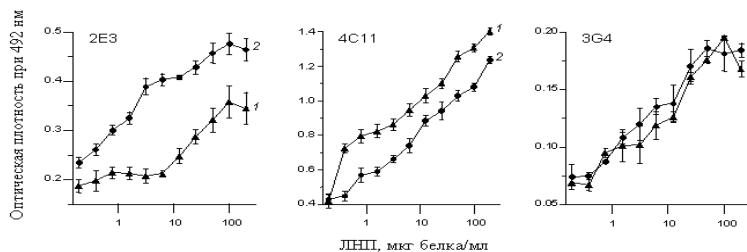


Рисунок 26 - Концентрационные зависимости взаимодействия нативных (1) и обработанных химотрипсином ЛНП (2) с моноклональными антителами к апо B-100 человека. На графиках показаны данные типичного эксперимента, результата которого представлены как среднее трех определений \pm стандартное математическое отклонение

Изучение связывания моноклональных к апо B-100 антител с модифицированными трипсином ЛНП показало, что клоны 3C8 и 4C11 лучше взаимодействовали с нативными, чем с модифицированными трипсином ЛНП. Клоны 5F8, 2G1, 7C2 и 3G4 не выявили достоверной разницы в связывании с нативными и модифицированными химотрипсином ЛНП. В качестве примера на рис. 27 приведены результаты, полученные в случае использования клонов

4C11 и 5F8. Сопоставляя результаты взаимодействия моноклональных антител с цммЛНП и липопротеидами, модифицированными трипсином необходимо отметить, что только антитело 3C8 в обоих случаях сильней связывалось с нативными липопротеидами чем с модифицированными (таблица 19). Еще два антитела не выявили различий как между нативными и цммЛНП, так и между ферментативно модифицированными и нативными липопротеидами. Как и в случае ЛНП модифицированных химотрипсином это антитела 5F8 и 3G4 (таблица 19). Вообще, как видно из таблицы 19 антигенные профили ЛНП, модифицированных трипсином и химотрипсином отличаются значительной гомологией – пять из семи использованных антител одинаково реагируют с модифицированными трипсином и химотрипсином ЛНП. В то же время, и в случае модификации трипсином, и при обработке химотрипсином, только три антитела реагировали с протеолитически модифицированными липопротеидами также как с цммЛНП. Итак, сравнивая антигенные профили протеолитически модифицированных липопротеидов и цммЛНП можно сделать вывод о некотором, но далеко неполном сходстве поверхностного расположения апоB белка в циркулирующих модифицированных и ферментативно модифицированных ЛНП.

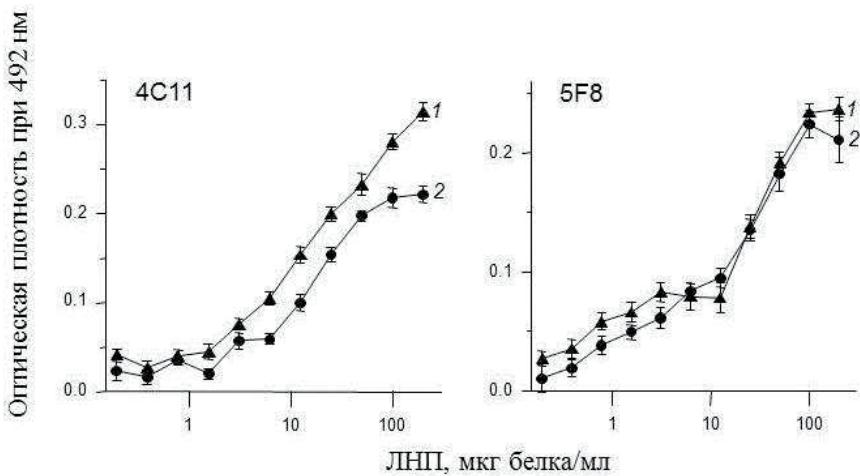


Рисунок 27 - Концентрационные зависимости взаимодействия нативных (1) и обработанных трипсином ЛНП (2) с моноклональными антителами к апо В-100 человека. На графиках показаны данные типичного эксперимента, результаты которого представлены как среднее трех определений \pm стандартное математическое отклонение.

3.3.3 Изучение конформационных изменений апоB под влиянием липополитических ферментов.

С целью исследования влияния гидролиза фосфолипидов на конформацию апо B-100 изучалось связывание моноклональных антител с нативными ЛНП и ЛНП, модифицированными фосфолипазами С или А₂. Было показано, что клон 2E3 и 5F8 эффективнее связывались с ЛНП, подвергнутыми липолизу под действием фосфолипазы А₂. Клоны 4C11 и 3C8 напротив лучше взаимодействовали с нативными ЛНП, чем с ЛНП, модифицированными фосфолипазой А₂. Клоны 7C2, 2G1 и 3G4 не выявили достоверной разницы в связывании с нативными и модифицированными фосфолипазой А₂ ЛНП. На рисунке 28 приведены результаты типичных

экспериментов для клонов 7C2, 3C8, 5F8. Из таблицы 16 видна гомология антигенных профилей цммЛНП и липопротеидов модифицированных фосфолипазой A₂ – в обоих случаях антитело 3C8 предпочтительно реагирует с нативными липопротеидами, а антитело 2E3 лучше связывается с модифицированными ЛНП. В то же время, антитело 3G4 не выявило различий как между цммЛНП и нативными липопротеидами, так и между нативными ЛНП и липопротеидами, модифицированными фосфолипазой A₂ и ЛНП, модифицированные фосфолипазой С, лучше чем нативные связывались с антителами 7C2 и 3G4, для остальных антител достоверной разницы между взаимодействием с модифицированными фосфолипазой С и нативными ЛНП не обнаружено.

Таблица 20 - Антигенные различия апо В-100 нативных, цммЛНП и обработанных липолитическими ферментами ЛНП. М – антитело достоверно лучше связывается с ЛНП, модифицированными ферментом; Н - антитело лучше связывается с нативными ЛНП; 0 – различия в связывании антитела с нативными и модифицированными ферментом ЛНП не достоверны.

| клон | цммЛНП | фосфолипаза А2 | фосфолипаза С |
|------|--------|----------------|---------------|
| 3C8 | Н | Н | 0 |
| 4C11 | 0 | Н | 0 |
| 2E3 | М | М | 0 |
| 5F8 | 0 | М | 0 |
| 2G1 | М | 0 | 0 |
| 7C2 | М | 0 | М |
| 3G4 | 0 | 0 | М |

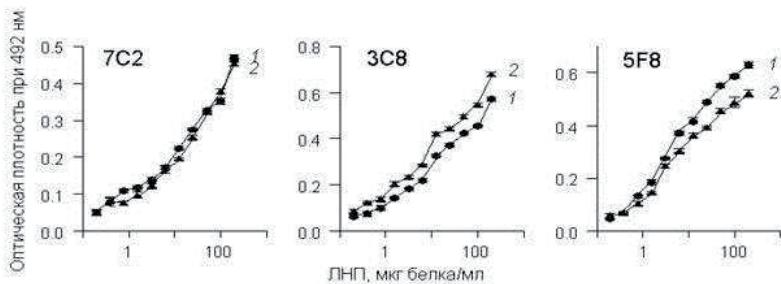


Рисунок 28 - Концентрационные зависимости взаимодействия нативных (1) и обработанных фосфолипазой А2 ЛНП (2) с моноклональными антителами к апо В-100 человека. На графиках показаны данные типичного эксперимента, результаты которого представлены как среднее трех определений \pm стандартное математическое отклонение.

В качестве примера на рис. 29 приведены концентрационные зависимости связывания клонов 3G4 и 7C2 с нативными и обработанными фосфолипазой С ЛНП. Необходимо отметить очевидную разницу между взаимодействием использованных клонов антител с ЛНП, обработанными фосфолипазой С и цмм ЛНП. Только антитело 7C2 предпочтительно распознавало как цммЛНП, так и липопротеиды, модифицированные фосфолипазой С. Кроме того, для антител 4C11 и 5F8 не было выявлено достоверной разницы в связывании с модифицированными и нативными липопротеидами как в случае цммЛНП, так и в случае ферментативно модифицированных липопротеидов (см. таблицу 20). Таким образом, можно заключить, что липолитическая модификация ЛНП фосфолипазой С или фосфолипазой А₂ не приводят к формированию антигенной структуры апоВ, идентичной таковой у цммЛНП. При сравнении антигенных профилей ЛНП, модифицированных двумя разными фосфолипазами выявлено только одно совпадение – антитело 2G1 в обоих случаях одинаково взаимодействовало с нативными и ферментативно модифицированными ЛНП.

Интересно, что антитела 2G1, 7C2 и 3G4 специфичные к апо B-100, модифицированному МДА не выявили антигенных различий между нативными ЛНП и ЛНП, обработанными фосфолипазой A₂. В то же время два антитела (7C2 и 3G4) лучше связывались с ЛНП, обработанными фосфолипазой С, по сравнению с нативными ЛНП (см. таблицу 7). По-видимому, это значит, что фосфолипаза С в отличие от фосфолипазы A₂ вызывает конформационные изменения апо B-100 на поверхности ЛНП отчасти аналогичные тем, которые происходят под действием известного продукта пероксидации липидов – МДА.

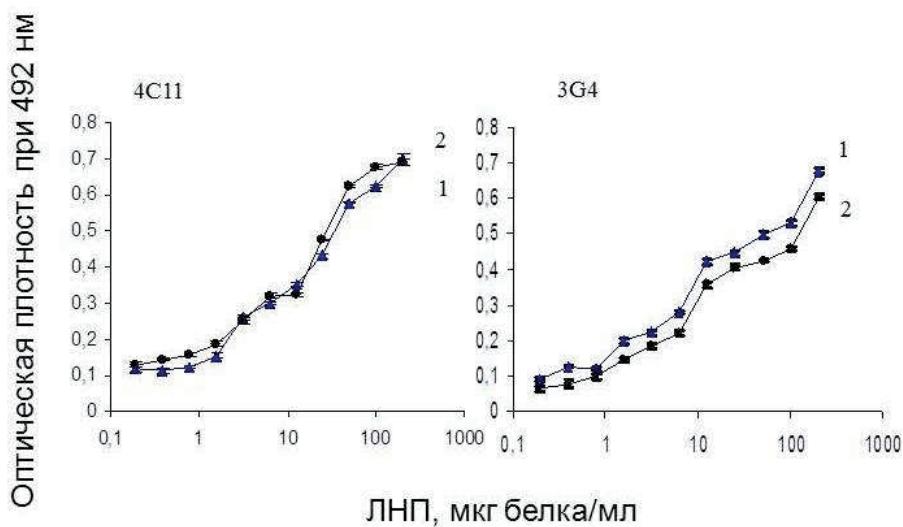


Рисунок 29 - Концентрационные зависимости взаимодействия нативных (1) и обработанных фосфолипазой С ЛНП (2) с моноклональными антителами к апо B-100 человека. На графиках показаны данные типичного эксперимента, результаты которого представлены как среднее трех определений ± стандартное математическое отклонение

3.3.4 Изучение конформационных изменений апоВ под влиянием миелопероксидазы.

При сравнении антигенных различий апоВ белка нативных ЛНП и обработанных миелопероксидазой липопротеидов было продемонстрировано, что нет достоверных различий во взаимодействии антител клонов 2G1, 5F8, 7C2 с нативными и ферментативно модифицированными ЛНП. С другой стороны, антитела клонов 2E3 и 3C8 достоверно эффективнее связывались с апоВ на поверхности модифицированных миелопероксидазой нативных ЛНП в сравнении с нативных ЛНП, тогда как антитела клонов 3G4 и 4C11, напротив, интенсивнее взаимодействовали с апоВ нативных ЛНП. Результаты экспериментов суммированы в таблице 21.

На рисунке 30 приведены 3 типичных примера для случаев, когда антитела обладают более высоким сродством к нативным ЛНП, модифицированным миелопероксидазой (клон 3C8), к нативных ЛНП (клон 3G4) или когда достоверные различия в связывании с апоВ на поверхности модифицированных миелопероксидазой и нативных ЛНП отсутствуют (клон 7C2).

Таблица 21 - Антигенные различия апо В-100 нативных, цммЛНП и обработанных миелопероксидазой ЛНП. М – антитело достоверно лучше связывается с ЛНП, модифицированными ферментом; Н - антитело лучше связывается с нативными ЛНП; 0 – различия в связывании антитела с нативными и модифицированными ферментом ЛНП не достоверны.

| клон | цммЛНП | миелопероксидаза |
|------|--------|------------------|
| 3C8 | Н | М |
| 4C11 | 0 | Н |
| 2E3 | М | М |
| 5F8 | 0 | 0 |
| 2G1 | М | 0 |
| 7C2 | М | 0 |
| 3G4 | 0 | Н |

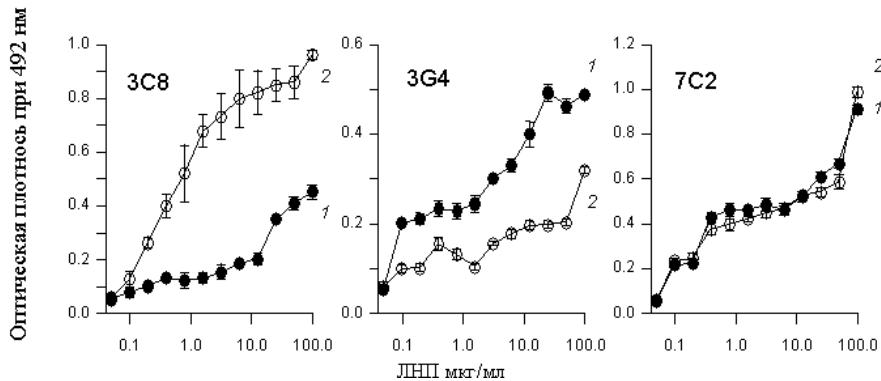


Рисунок 30 - Концентрационные зависимости взаимодействия нативных (1) и обработанных миелопероксидазой ЛНП (2) с моноклональными антителами к апо В-100 человека. На графиках показаны данные типичного эксперимента, результаты которого представлены как среднее трех определений \pm стандартное математическое отклонение.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что инкубация нативных ЛНП с миелопероксидазой в присутствии субстратов фермента (H_2O_2 , Cl^-) приводит к изменению конформации макромолекулы апоB на поверхности частицы нативных ЛНП. Эти изменения отчасти сходны с теми, которые происходят на поверхности цммЛНП – выявлено два антитела одинаково взаимодействующих с циркулирующими множественно модифицированными липопротеидами и нативными ЛНП. Так, антитело 2E3 предпочтительно взаимодействует с модифицированными миелопероксидазой липопротеидами и цммЛНП чем с нативными (таблица 21). В то же время, антитело 5F8 одинаково взаимодействовало с нативными, цммЛНП и модифицированными миелопероксидазой липопротеидами. Таким образом, при сравнении антигенных профилей цммЛНП и липопротеидов, модифицированных миелопероксидазой выявлено только два совпадения.

Видимо, модификация ЛНП миелопероксидазой не может привести к появлению цммЛНП.

3.3.5 Изучение конформационных изменений апоB под влиянием нейраминидазы.

При сравнении способности моноклональных антител к апоB-100 белку взаимодействовать с нативными и обработанными нейраминидазой липопротеидами было показано, что антитела 3C8, 2E3, 5F8 и 7C2 предпочтительно связывались с ферментативно-модифицированными ЛНП. Другие клоны: 4C11, 2G1 и 3G4 одинаково взаимодействовали с нативными и ферментативно модифицированными ЛНП. Результаты типичных экспериментов с моноклональными антителами 2E3 и 3G4 приведены на рисунке 31. Из четырех клонов, показавших лучшее связывание с цммЛНП по сравнению с нативными ЛНП, два антитела 2E3 и 7C2 также предпочтительно распознавали модифицированные нейраминидазой ЛНП (таблица 22). Другое антитело 4C11 не выявило различий как между нативными и цммЛНП, так и между нативными и модифицированными нейраминидазой липопротеидами. Только три из семи антител одинаково взаимодействовало с цммЛНП и липопротеидами, модифицированными нейраминидазой. Это говорит о незначительном сходстве поверхностных структур цммЛНП и обработанных нейраминидазой липопротеидов.

Таблица 22 - Антигенные различия апо B-100 нативных, цммЛНП и обработанных нейраминидазой ЛНП. М – антитело достоверно лучше связывается с ЛНП, модифицированными ферментом; Н - антитело лучше связывается с нативными ЛНП; 0 – различия в связывании антитела с нативными и модифицированными ферментом ЛНП не достоверны.

| клон | ЦММЛНП | нейраминидаза |
|------|--------|---------------|
| 3C8 | H | M |
| 4C11 | 0 | 0 |
| 2E3 | M | M |
| 5F8 | 0 | M |
| 2G1 | M | 0 |
| 7C2 | M | M |
| 3G4 | 0 | 0 |

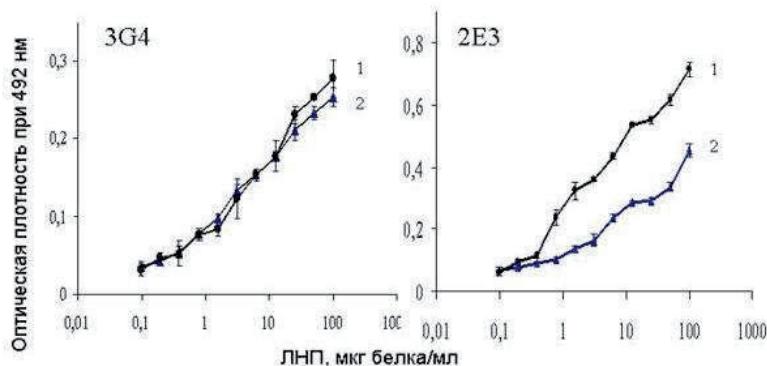


Рисунок 31 - Концентрационные зависимости взаимодействия нативных ЛНП (1) и нативных ЛНП, предварительно модифицированных нейраминидазой (2) с моноклональными антителами к апо-В человека (клоны 2E3, 3G4). На графиках показаны данные типичного эксперимента, результаты которого представлены как среднее трех определений \pm стандартное математическое отклонение

3.3.6 Сопоставление результатов изучения конформационных изменений апоВ цммЛНП и ферментативно модифицированных липопротеидов.

Описанные выше результаты изучения взаимодействия моноклональных антител с цммЛНП и ферментативно модифицированными липопротеидами

обобщены в таблице 23. Из данных таблицы 23 видно можно сделать вывод, что ни одна из использованных ферментативных модификаций не воспроизводит антигенный профиль, свойственный для цммЛНП. Для большинства ферментативных модификаций количество антител одинаково распознающих цммЛНП и ферментативно модифицированные липопротеиды составляет три из семи использованных в работе. В случае модификации ЛНП миелопероксидазой выявлено два совпадения с антигенным профилем цммЛНП. Можно также отметить некоторые общие закономерности взаимодействия моноклональных антител к апоВ белку с модифицированными различным образом липопротеидами. Так, антитело 2Е3 лучше реагирует с цммЛНП, липопротеидами модифицированными химотрипсином, фосфолипазой А2, миелопероксидазой, нейраминидазой чем с нативными липопротеидами.

Таблица 23 - Антигенные различия апо В-100 нативных и обработанных различными ферментами ЛНП. М – антитело достоверно лучше связывается с ЛНП, модифицированными ферментом; Н - антитело лучше связывается с нативными ЛНП; 0 – различия в связывании антитела с нативными и модифицированными ферментом ЛНП не достоверны.

| | 3C8 | 4C11 | 2E3 | 5F8 | 2G1 | 7C2 | 3G4 |
|----------------------------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| цммЛНП | H | 0 | M | 0 | M | M | 0 |
| химотрипсин | M | H | M | 0 | 0 | 0 | 0 |
| трипсин | H | H | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| фосфолипаза A ₂ | H | H | M | M | 0 | 0 | 0 |
| фосфолипаза С | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | M | M |
| миелопероксидаза | M | H | M | 0 | 0 | 0 | H |
| нейраминидаза | M | 0 | M | M | 0 | M | 0 |

Вероятно, распознаваемый этим антителом фрагмент апоВ белка с 3728 по 4306 аминокислотный остаток, становится более доступным для взаимодействия с антителом в результате большинства исследованных модификаций ЛНП. С другой стороны, антитело 5F8 выявило различия между модифицированными и нативными ЛНП, только в случае модификаций фосфолипазой А2 и нейраминидазой. Возможно, соответствующий фрагмент апоВ (1-1297 аминокислотные остатки) устойчив к большинству исследованных модификаций.

3.4 Экзогенные ингибиторы ассоциации ЛНП.

На роль ингибиторов ассоциации могут претендовать так называемые плюроники - амфи菲尔ные блок-сополимеры окиси пропилена (ОП) и окиси этилена (ОЭ). Из литературных данных известно, что амфи菲尔ные биомолекулы такие как аполипротеин А-I, альбумин способны подавлять ассоциацию ЛНП. Было высказано предположение, что экзогенные биодоступные амфи菲尔ные полимеры также способны влиять на ассоциацию ЛНП. Для оценки ассоциации ЛНП и влияния плюроников на ассоциацию ЛНП было использовано два метода – метод флюктуации светопропускания и метод квазиупругого лазерного рассеивания. Во всех случаях результаты, полученные при помощи двух методов оценки ассоциации ЛНП, были сходными. Ассоциация ЛНП индуцировалась путем инкубации эмульсии ЛНП при 37°C при постоянном перемешивании. В данных экспериментах использовалась общая фракция ЛНП, выделенных из крови больных сердечно-сосудистыми заболеваниями. Было проведено сравнительное исследование действия плюроников с различными гидрофильно-липофильными свойствами на процесс ассоциации ЛНП. Так, использовались плюроник F68, обладающий высоким значением ГЛБ 29 и выраженными гидрофильными свойствами, плюроник L61, характеризующийся значительной

гидрофобностью (ГЛБ 3), и плюроник Р85 с умеренными гидрофильными и липофильными свойствами (ГЛБ 16). В экспериментах были использованы концентрации плюроников кратные ККМ амфи菲尔ных блок-сополимеров. Эта часть работы была проведена в сотрудничестве с кафедрой ВМС Химического факультета МГУ, (зав. лабораторией - профессор А.А.Ярославов).

3.4.1 Влияние плюроника Р85 на ассоциацию ЛНП.

На рисунке 32 приведены типичные кинетические кривые изменения размера ассоциатов ЛНП в случае спонтанной ассоциации и в присутствии плюроника Р85. Видно, что при спонтанной ассоциации происходит образование ассоциатов ЛНП и увеличение их размера в зависимости от времени инкубации (Рис. 32, кривая 1). В то же время в случае присутствия в инкубационной среде различных концентраций плюроника Р85 формирование ассоциатов заметно ингибировалось. Так, добавление к эмульсии ЛНП до начала инкубации плюроника Р85 в концентрации 0,1% (в/в %) ингибировало процесс ассоциации после 4,5 часов инкубации на 93%, а применение концентрации 0,01% вызывало подавление процесса ассоциации после 4,5 часов инкубации на 79 % (Рис. 32, кривые 2 и 3).

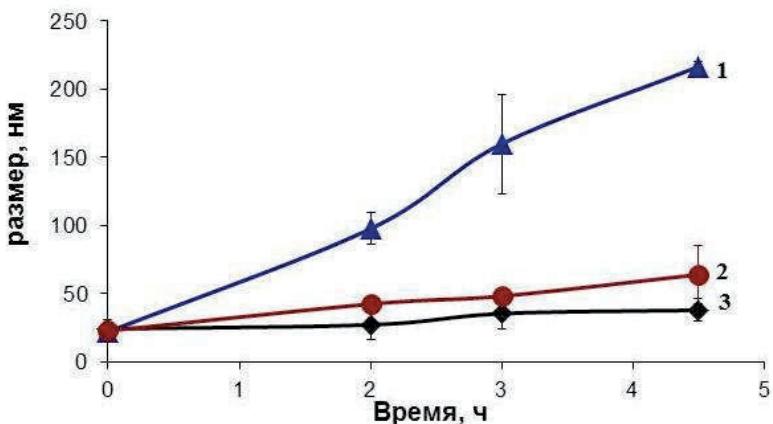


Рисунок 32 - Кинетические кривые изменения среднего размера частиц ЛНП под влиянием плюроника Р85. Среда инкубации – ИФБ, рН 7,4, концентрация ЛНП 2,5 мг белка/мл, температура инкубации 37°C, скорость перемешивания 1000 об/мин. Кривая (1) – супензия ЛНП в отсутствие плюроника Р85, кривые (2) и (3) в присутствии, соответственно, 0,1% и 0,01% плюроника Р85

Аналогичные данные были получены другим методом. На рисунке 33 представлены типичные кривые изменения флюктуации светопропускания эмульсии ЛНП в присутствии различных концентраций плюроника в инкубационной среде. Как видно из рисунка 31, наименьшая концентрация плюроника Р85 – 0.001% не оказывала влияния на процесс ассоциации ЛНП.

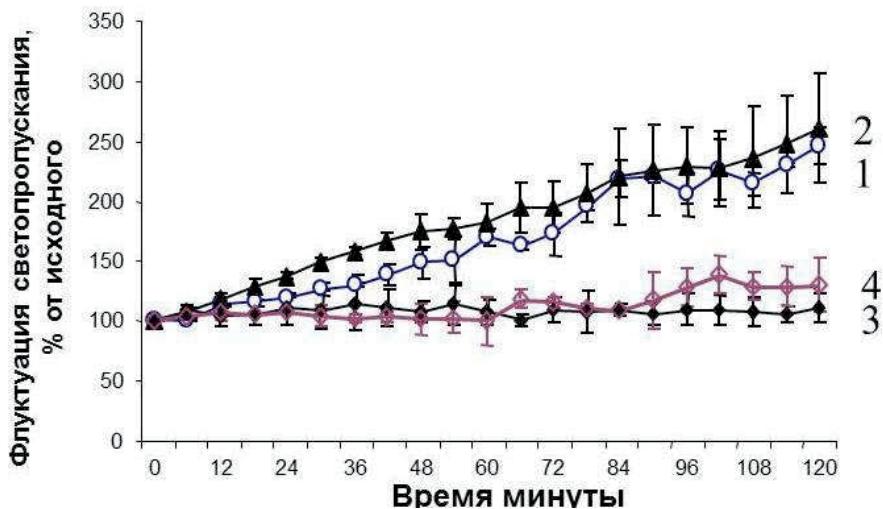


Рисунок 33 - Кинетические кривые изменения флюктуации светопропускания супензии под влиянием плюроника P85. Среда инкубации – ИФБ, pH 7,4, концентрация ЛНП 0,5 мг белка/мл, температура инкубации 37°C, скорость перемешивания 100 об/мин. Кривая (1) – супензия ЛНП в отсутствие плюроника P85, кривые (2),(3) и (4) в присутствии, соответственно, 0,001%, 0,1% и 0,01% плюроника P85

Когда плюроник P85 добавлялся в эмульсию ЛНП в ходе инкубации, то есть когда процесс ассоциации частиц уже был инициирован, также наблюдалось предотвращение ассоциации липопротеидов (Рис. 34). Плюроник P85 в концентрации 0,1% добавлялся к эмульсии ЛНП после первого и после второго часа инкубации, в обоих случаях не происходило дальнейшего увеличения среднего размера частиц, т.е. ассоциация полностью подавлялась. Необходимо отметить, что добавление плюроника не вызывало уменьшение среднего размера ассоциатов, можно предположить, что под действием плюроника не происходило диссоциации образовавшихся ассоциатов ЛНП.

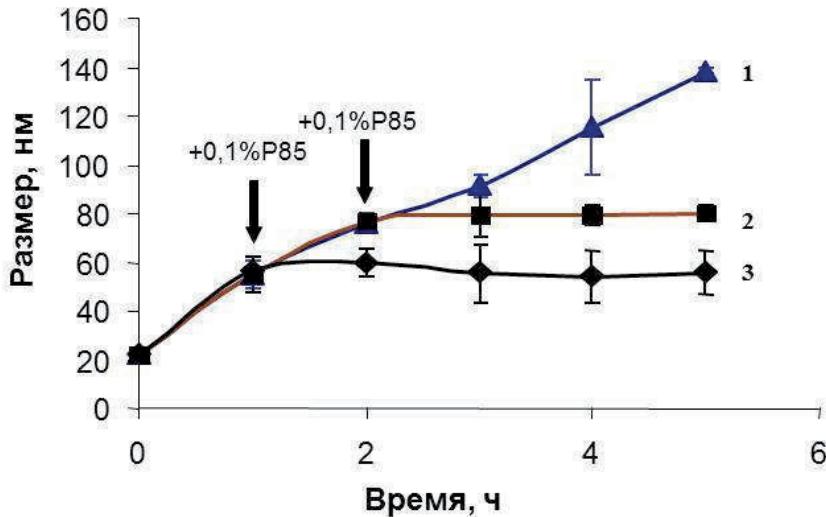


Рисунок 34 - Кинетические кривые изменения среднего размера частиц ЛНП под влиянием плюроника P85. Среда инкубации – ИФБ, pH 7,4, концентрация ЛНП 2,5 мг белка/мл, температура инкубации 37°C, скорость перемешивания 1000 об/мин. Кривая (1) – суспензия ЛНП в отсутствие плюроника P85, кривая (2) – в присутствии 0,1 % плюроника P85, добавленного после 2 часов инкубации, кривая (3) – в присутствии 0,1 % плюроника P85, добавленного после 1 часа инкубации.

3.4.2 Влияние плюроника F68 на ассоциацию ЛНП

Было показано, что другой плюроник – F68, характеризующийся выраженным гидрофильными свойствами и высоким значением ГЛБ, не оказывает влияния на процесс ассоциации частиц ЛНП. На рисунке 35 приведены типичные кинетические кривые изменения флюктуации светопропускания в присутствии плюроника F68 в концентрации 0,4% и в отсутствие плюроника (Рис. 35, кривые 1 и 2). Использование большей

концентрации плюроника F68 (4%) также не приводило к угнетению процесса ассоциации ЛНП (Рис. 35, кривая 3).

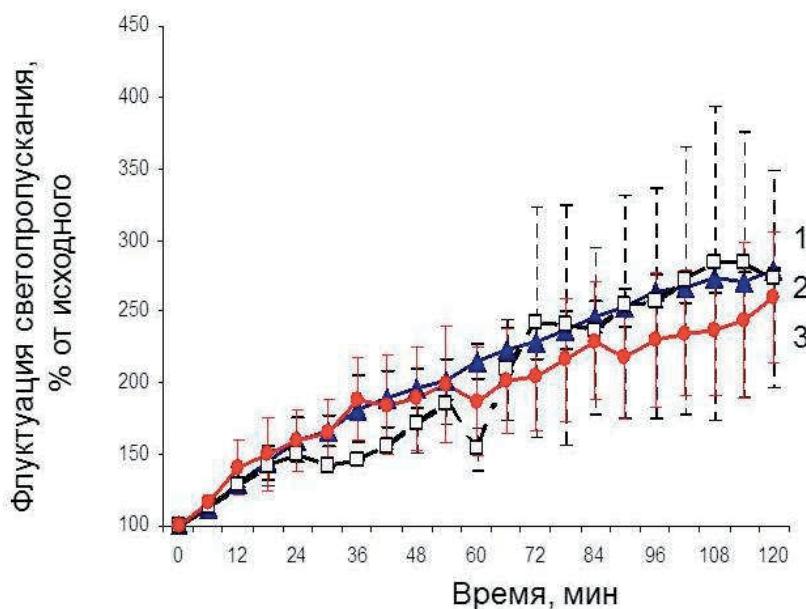


Рисунок 35 - Кинетические кривые изменения флюктуации светопропускания супензии ЛНП под влиянием плюроника F68. Среда инкубации – ИФБ, рН 7,4, концентрация ЛНП 0,5 мг белка/мл, температура инкубации 37оС, скорость перемешивания 100 об/мин. Кривая (1) – супензия ЛНП в отсутствие плюроника F68, кривая (2) в присутствии 0,4% плюроника F68.

3.4.3 Влияние плюроника L61 на ассоциацию ЛНП

Применение плюроника L61, обладающего выраженным гидрофобными свойствами и низким значением ГЛБ, приводило к подавлению ассоциации ЛНП. Так, в концентрации 0,022% плюроник L61 на 78% ингибировал рост флюктуации светопропускания эмульсии ЛНП после 2 часов инкубации (Рис. 36, кривая 2). Использование большей концентрации плюроника L61 - 0,22% приводило к почти полному подавлению ассоциации

ЛНП, а применение меньшей концентрации – 0,0022% не влияло на ассоциацию частиц ЛНП (рис. 36 кривая 3). Представляется интересным тот факт, что как в случае плюроника P85, так и в случае плюроника L61 подавление процесса ассоциации вызывалось только в концентрациях превышающих или близких к ККМ. Так, ККМ для P85 составляет 0,01-0,03% и в концентрациях больших, чем 0,01% наблюдалось значительное угнетение ассоциации, а при уменьшении концентрации плюроника до 0,001% ингибирующее действие не развивалось. ККМ плюроника L61 равна 0,022% и использование концентраций больших, чем 0,022% эффективно ингибирировало ассоциацию ЛНП, в то время как меньшие концентрации - 0,0022% не оказывали влияние на процесс ассоциации.

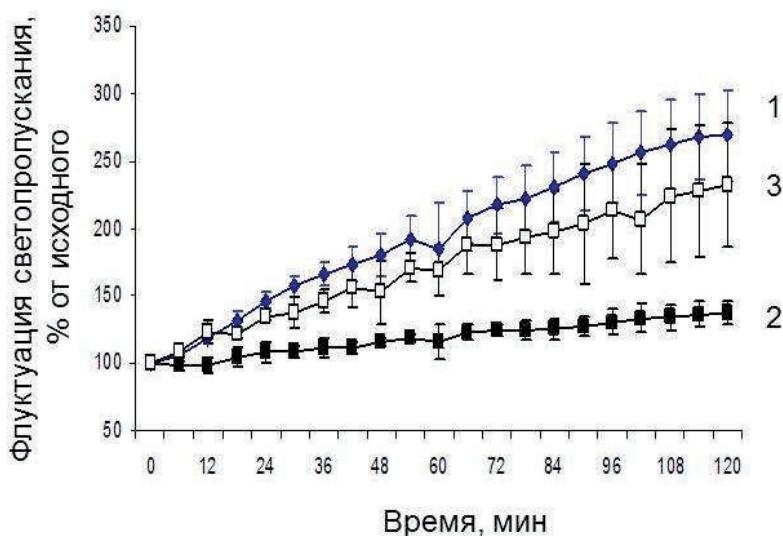


Рисунок 36 - Кинетические кривые изменения флюктуации светопропускания супензии ЛНП под влиянием плюроника L61. Среда инкубации – ИФБ, рН 7,4, концентрация ЛНП 0,5 мг белка/мл, температура инкубации 37оС, скорость перемешивания 100 об/мин. Кривая (1) – супензия ЛНП в отсутствие плюроника L61, кривая (2) в присутствии 0,022% плюроника L61, кривая (3) в присутствии 0,0022% плюроника L61

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что способность амфи菲尔ных сополимеров окиси пропилена и окиси этилена ингибировать ассоциацию ЛНП прямо зависит от выраженности гидрофобных свойств плюроника. Плюроники с выраженным и умеренным гидрофобными свойствами способны значительно ингибировать ассоциацию ЛНП. Необходимо отметить, что степень подавления ассоциации прямо зависит от концентрации плюроника. Очевидно, именно мицеллярная форма плюроника способна вызывать ингибирование ассоциации частиц ЛНП, а унимеры плюроников ингибирующими свойствами не обладают.

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Атеросклероз – патологический процесс, который на начальных стадиях характеризуется накоплением липидов, в частности эфиров холестерина, в интиме артерий человека. Это приводит к образованию жировых включений и полос на поверхности сосуда, которые трансформируются в атеросклеротические бляшки. Транспорт липидов в организме во многом осуществляется с помощью липопротеидов низкой плотности (ЛНП). Липопротеиды естественным образом попадают в большинство клеток организма через апоВ, Е-рецепторы, снабжая их холестерином, необходимым для строительства клеточных мембран. При насыщении клеток холестерином срабатывает механизм обратной связи, после чего специфические рецепторы к ЛНП перестают синтезироваться и экспонироваться клеткой на поверхность, и ЛНП не попадают более в клетку. При атеросклерозе макрофаги интимального слоя сосудов захватывают избыточное количество ЛНП, образуя так называемые пенистые клетки – переполненные липидами макрофаги – компоненты жировых включений.

При изучении процесса захвата ЛНП на клеточной модели было показано, что нативные (немодифицированные) ЛНП не накапливаются макрофагами из-за того, что попадают в клетку через специфические апоВ, Е-

рецепторы [Bates et al., 1976; Ross, Harker, 1976; Goldstein et al., 1979]. С другой стороны, было продемонстрировано, что *in vitro* модифицированные липопротеиды [Goldstein et al., 1979; Fogelman et al., 1980; Khoo et al., 1990; Lopes-Virella et al., 1988] обладают способностью вызывать накопление липидов в клетках, то есть являются атерогенными. При этом было продемонстрировано, что модификация ЛНП приводит к их ассоциации-агрегации, а полученные ассоциаты захватываются клетками в несколько раз быстрее, чем нативные липопротеиды [Xu, Tabas, 1991; Khoo et al., 1988; Suits 1988].

Многочисленные попытки обнаружить в кровотоке липопротеиды, аналогичные модифицированным *in vitro*, не увенчались успехом. С другой стороны, в крови больных ишемической болезнью сердца были обнаружены циркулирующие множественно-модифицированные липопротеиды низкой плотности (цмЛНП) [Orehov et al., 1989; Tertov et al., 1990], которые отличались от нативных по ряду признаков, таких как сниженное содержание липидов, уменьшенный размер, увеличенная электроотрицательность поверхности и т.д. (табл. 3). Позднее были найдены так называемые «электроотрицательные» [Avogaro et al., 1988] и «мелкие, плотные» [Shen et al., 1981; La Belle and Krauss, 1990; Avogaro et al., 1991] ЛНП, которые были практически идентичны по составу цмЛНП. Показано, что цмЛНП обладают способностью вызывать накопление холестерина в культивируемых макрофагах, то есть являются атерогенными. С другой стороны, было установлено, что цмЛНП образуют агрегаты-ассоциаты.

В нашей работе мы попытались ответить на несколько вопросов: какие изменения в структуре цмЛНП по сравнению с нативными ЛНП приводят к их агрегации; каким образом агрегаты ЛНП захватываются макрофагами; какие изменения должны произойти в липопротеидах, чтобы они потеряли стабильность и начали агрегировать; зависит ли накопление внутриклеточного холестерина от размеров частиц ЛНП?

В поиске ответов на эти вопросы мы изучили агрегацию цмЛНП при инкубации при 37°C в СО₂-инкубаторе. Полученные результаты свидетельствуют о том, что нативные липопротеиды не агрегируют в таких условиях. Это хорошо согласуется с данными, полученными в других исследованиях [Fogelman et al., 1981; Brown et al., 1983; Haberland et al., 1987, 1988]. цмЛНП в условиях культивирования (37°C в СО₂-инкубатор) образуют ассоциаты, которые частично удаляются путем фильтрации через фильтры с размером пор 220 или 450 нм, и полностью удаляются только после пропускания препарата цмЛНП через фильтр с размером пор 100 нм. Частичное или полное удаление агрегатов путем фильтрации препятствует накоплению липидов в макрофагах и гладкомышечных клетках. Была продемонстрирована прямая зависимость между размером полученных агрегатов ЛНП и их способностью накапливаться в клетках.

Ранее уже было показано [Xu, Tabas, 1991; Khoo et al., 1988; Suits 1988; Fogelman et al., 1980], что модифицированные *in vitro* ЛНП агрегируют в условиях культивирования (37°C в СО₂-инкубатор), но не было выявлено никакой зависимости между размером агрегатов ЛНП и их атерогенностью.

Можно предположить, что накопление липидов является следствием изменения метаболизма ЛНП, вызванного их ассоциацией. Мы изучили, чем отличается клеточный метаболизм ассоциированных цмЛНП от метаболизма дисперсных, в частности, как захват и деградация ЛНП гладкомышечными клетками и макрофагами изменяется при ассоциации липопротеидов.

В случае агрегатов цмЛНП наблюдалось увеличение относительной скорости захвата частиц гладкомышечными клетками (ГМК) в 7 раз, а макрофагами – в 6 раз. При этом скорость деградации возросла только в 5 и 3,5 раза соответственно. Это показывает, что деградация цмЛНП происходит медленнее, чем их захват, и поэтому цмЛНП накапливаются в клетках вследствие измененного метаболизма.

Возникает вопрос, почему так существенно изменяется скорость захвата цмЛНП в сравнении с нативными ЛНП? Существуют ли различия в механизме захвата нативных ЛНП и цмЛНП?

Как уже было сказано, ЛНП захватываются клетками рецептор-опосредованно [Goldstein and Brown, 1977]. Нативные ЛНП попадают в клетку через апоВ,Е-рецептор, модифицированные ЛНП, в частности, ацетилированные – через так называемый скэвенджер-рецептор [Goldstein et al., 1979]. Мы исследовали, каким путем агрегаты цмЛНП попадают в клетку. Установлено, что ^{125}I -меченные агрегаты цмЛНП конкурируют за места связывания с нативными и ацетилизованными ЛНП, что свидетельствует в пользу того, что захват агрегатов цмЛНП осуществляется ни через апоВ,Е-, ни через скэвенджер-рецептор. Мы рассмотрели возможность того, что агрегаты цмЛНП попадают в клетку путем фагоцитоза. Установлено, что цитохалазин В (ингибитор эндоцитоза макрофагов) снижает скорость захвата и деградации ^{125}I -меченых агрегатов цмЛНП. При добавлении микросфер латекса, которые захватываются клетками путем фагоцитоза, мы наблюдали снижение относительной скорости захвата и деградации цмЛНП. Суммируя полученные данные, можно сказать, что наиболее вероятным механизмом захвата агрегатов цмЛНП является фагоцитоз.

Это хорошо согласуется с данными [Suits et al., 1989], полученными на другой модели модификации липопротеидов. При изучении ЛНП, обработанных фосфолипазой С, были получены агрегаты липопротеидов, которые захватывались макрофагами в 12 раз быстрее, чем нативные липопротеиды. Было показано, что наиболее вероятным механизмом захвата модифицированных таким образом ЛНП является фагоцитоз. С другой стороны было установлено, что захват липопротеидов, обработанных фосфолипазой С, ингибируется при добавлении антител С7 (IgG2b), которые связываются с апоВ,Е-рецептором. Этот факт свидетельствует о том что процесс фагоцитоза ЛНП, обработанных фосфолипазой С, рецептор-

опосредованный. В нашем случае было показано, что на скорость захвата агрегатов цмЛНП никак не влияет внесение 20-тикратного избытка нативных липопротеидов, которые также связываются с апоВ,Е-рецептором. Это значит, что апоВ,Е-рецептор не участвует в фагоцитозе агрегатов цмЛНП.

В другой работе [Fogelman et al., 1980] на примере ЛНП, обработанных малоновым диальдегидом (МДА), было продемонстрировано, что 1) нативные липопротеиды не агрегируют в условиях культивирования; 2) ни нативные, ни ацетилированные не ингибируют процесс захвата и деградации цмЛНП, следовательно агрегаты МДА-модифицированных ЛНП попадают в клетку не через апоВ,Е- или скэвенджер-рецепторы; 3) гепарин ингибирует захват нативных ЛНП, но не ингибирует захват МДА-модифицированных ЛНП. Подобные результаты были получены и нами.

При исследовании ЛНП, интенсивно перемешенных на вортексе в течение 30 секунд [Khoo et al., 1988], было продемонстрировано, что они образуют атерогенные агрегаты, которые захватываются макрофагами путем фагоцитоза. Причем, процесс захвата агрегатов зависит от апоВ,Е-, а не от скэвенджер-рецептора, так как нативные ЛНП и ЛОНП, но не ацетилированные ЛНП ингибируют захват и деградацию агрегатов ЛНП; метилирование ЛНП перед вортексированием снижает скорость захвата и деградации ЛНП; гепарин, который ингибирует связывание нативных ЛНП с апоВ,Е-рецептором, таким же образом влияет на захват вортексированных ЛНП.

Также был исследован процесс агрегации и накопления липопротеидов низкой плотности, обработанных сфингомиелиназой [Xu, Tabas, 1991]. После обработки сфингомиелиназой ЛНП образуют ассоциаты размером 100 нм, которые вызывают накопление липидов в макрофагах в 3-6 раз сильнее, чем нативные ЛНП. Это вполне согласуется с данными, полученными в нашем исследовании. При изучении механизма захвата и деградации полученных ассоциатов было продемонстрировано, что ассоциаты конкурируют за места связывания с нативными ЛНП и ЛОНП, но не с ацетилированными ЛНП.

Данный факт свидетельствует о том, что в захвате ассоциатов участвует апоВ,Е-, но не сквэнджер-рецептор. В то же время было показано, что цитохалазин D – ингибитор фагоцитоза макрофагов – не уменьшает скорость захвата и деградации ассоциатов ЛНП, полученных при обработке липопротеидов сфингомиелиназой. Суммируя данные, полученные Xu и Tabas (1991), можно сказать, что после обработки сфингомиелигазой ЛНП теряют устойчивость и образуют атерогенные ассоциаты, которые захватываются макрофагами через апоВ,Е-рецептор. В то время как агрегаты цмЛНП также агрегируют в условиях культивирования и проявляют атерогенные свойства, но их захват происходит вероятнее всего путем фагоцитоза.

Механизм захвата агрегированных ЛНП был также изучен на примере вортексированных и обработанных фосфолипазой С липопротеидов [Zhang, 1997]. С помощью биохимических методов и электронной микроскопии было продемонстрировано, что агрегаты ЛНП попадают в макрофаги через связанные с поверхностью компартменты (СПК) (surface connected compartments). Этот процесс отличается от фагоцитоза, зависит от температуры (происходит в 10 раз интенсивнее при 37°C, чем при 4°C), ингибируется цитохалазином D, но не нокадозолом. Из-за того, что СПК связаны с поверхностью, трипсин может высвобождать агрегаты ЛНП из них. Деградация вортексированных ¹²⁵I-меченных агрегатов ЛНП через СПК происходит медленнее, чем деградация ацетилированных ЛНП через сквэнджер-рецептор. Метилирование ЛНП, которое препятствует связыванию ЛНП со специфическим рецептором, не ингибирует связывание полученных вортексированием агрегатов с СПК, свидетельствуя о том, что этот процесс не рецептор-опосредован.

Суммируя все описанные выше данные, можно сказать, что полученные нами результаты во многом согласуются с описанными в литературе. Нами продемонстрировано, что цмЛНП (модифицированные *in vivo* липопротеиды) образуют атерогенные агрегаты в процессе культивирования. Другими

авторами также показано [Xu, Tabas, 1991; Khoo et al., 1988; Suits, 1988], что модифицированные *in vitro* различными способами ЛНП образуют агрегаты и вызывают накопление липидов в макрофагах. Изучение метаболизма агрегированных цмЛНП показало, что они захватываются макрофагами в 6 раз быстрее, чем нативные ЛНП, а деградируют лишь в 3,5 раза быстрее. Этот факт позволяет предположить, что агрегаты цмЛНП накапливаются макрофагами именно потому, что захват агрегатов происходит быстрее, чем их деградация. Другими авторами также изучался процесс захвата и деградации ЛНП, показано, что ЛНП, обработанные фосфолипазой С захватываются макрофагами в 12 раз, обработанные малоновым диальдегидом – в 7 раз, вортексированные – в 6-10 раз, а обработанные сфингомиелиназой – в 2-6 раз быстрее, чем нативные ЛНП.

В чем же может быть причина агрегации циркулирующих множественно-модифицированных ЛНП? Ранее группой В.В. Тертова и А.Н. Орехова [Tertov et al., 1992; Tertov et al., 1995] был продемонстрирован ряд различий между нативными и цмЛНП, в частности, измененный липидный состав, размер, плотность, заряд частиц. Мы предположили, что существуют особенности структурной организации поверхности частиц цмЛНП, которые делают их менее стабильными, что приводит к их ассоциации. При изучении различий в структуре нЛНП и цмЛНП были использованы 3 различных подхода: метод ЭПР спиновых зондов, метод флуоресцентных зондов и меток и твердофазный иммуноферментный анализ с применением моноклональных антител к апо-В-100.

Для исследования расположения белка на поверхности нативных и склонных к агрегации циркулирующих модифицированных ЛНП использовали два флуоресцентный зонд пирен и флуоресцентную метку – ортофталевый альдегид. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что нет достоверной разницы между нативными и циркулирующими модифицированными ЛНП в расположении белка относительно липида. Было

продемонстрировано, что как молекулярная подвижность около аминогрупп апо-B-100, так и расположение апо-B-100 на поверхности липида, практически одинаковы в нативных и цмЛНП.

На следующем этапе была исследована структура гидрофобного липидного ядра и фосфолилипидного монослоя на поверхности нативных и склонных к агрегации цмЛНП. Для этого мы использовали несколько спиновых и флуоресцентных зондов, характеризующих изменения в структуре липидной части ЛНП на различном расстоянии от поверхности частицы.

Спиновые зонды и, в частности, спин-меченные производные стеариновой кислоты являются подходящим инструментом для исследования структурных аспектов фосфолипидного слоя. Использованный нами набор зондов позволил получить информацию о молекулярных движениях на разной глубине липидного домена липопротеидов, а именно, у самой поверхности и на расстояниях от поверхности, соответствующих глубине расположения 5-, 12- и 16-го атома углерода ацильной цепи фосфолипидов, а также в центральном гидрофобном ядре. Согласно результатам по измерению параметра упорядоченности S и времени корреляции вращений τ для зондов, встроенных в липопротеидную частицу, нет различий между нативными ЛНП и цмЛНП в молекулярной подвижности в липидной фазе, как на поверхности частицы, так и в ее гидрофобном ядре.

Измерение параметра гидрофобности h для 5-, 12- и 16-доксилстеариновой кислот (зонды 2–4) (рис. 4) не внесло нового в этот вывод. Гидрофобность, или можно сказать наоборот – полярность, в микроокружении нитроксильных групп этих зондов не различалась между нативными ЛНП и цмЛНП. Исследование гидрофобных свойств поверхностного липидного монослоя мы продолжили с помощью экспериментов с флуоресцентным зондом K-68, регистрируя его поляризованную флуоресценцию, которая характеризует микровязкость фосфолипидного слоя поверхности ЛНП.

Различий между нативными ЛНП и цмЛНП в этих экспериментах также не наблюдалось.

Таким образом, используя разнообразные по физико-химическим свойствам спиновые и флуоресцентные зонды и метки, локализованные как на поверхности частицы ЛНП, так и на разном удалении от границы раздела липид/вода, нам удалось получить информацию о подвижности липидной и белковой составляющих нативных и цмЛНП. Сравнение физико-химических свойств этих двух подфракций ЛНП не показало заметных различий между ними. Однако следует иметь в виду, что использованные нами подходы дают лишь усредненные характеристики частицы ЛНП в целом и не способны выявлять локальные изменения, которые вполне могут иметь место в определенных участках липидной фазы или апо-B-100 липопротеидов.

Напротив, эксперименты по связыванию моноклональных антител с апо-B-100 на поверхности нативных ЛНП и цмЛНП показали, что в ряде случаев имеется достоверная разница между этими подфракциями ЛНП.

Какова природа различий, выявляемых антителами? Поскольку антитело связывается только с одним (или несколькими) маленькими локусами на сравнительно большой поверхности ЛНП, то можно предполагать, что разница между двумя подфракциями ЛНП носит сугубо локальный характер и не затрагивает всю макромолекулу апо-B-100 в целом.

Конечно, взаимодействие антител с ЛНП носит довольно сложный характер. Так, для проведения эксперимента требуется посадить ЛНП на подложку с помощью других антител и только после этого добавить специфические моноклональные антитела. Если бы, например, подфракции нативных ЛНП и цмЛНП по-разному садились на подложку, это автоматически повлекло бы различия в связывании моноклональных антител. Поэтому эксперименты были проведены с антителами нескольких видов. Четыре антитела из девяти использованных нами связывались с подфракциями нативных ЛНП и цмЛНП совершенно одинаково. Это позволяет думать, что

количество ЛНП обеих подфракций, севших на подложку, одинаково. Следовательно, различия в связывании антител 2Е3 и 3С8, как следует из рис. 9., можно считать специфическими, отражающими разницу в структуре поверхностных антигенов нативных ЛНП и цмЛНП. Тот факт, что с различными антителами были получены различные по направленности эффекты (увеличение, уменьшение связывания, а также отсутствие различий в связывании с апо-B-100 на поверхности частиц ЛНП), лишний раз подтверждает наше предположение о том, что изменение расположения апо-B-100 на поверхности цмЛНП по сравнению с нативными ЛНП носит локальный характер.

В табл. 3 приведена характеристика использованных в работе антител. Из полученных нами данных следует, что в нативных и цмЛНП существуют одинаковые участки апобелка, а именно 1-1297, 2377-2658, 3728-4306, а также участок апобелка связывающийся с антителом 3G4 (против ЛНП, модифицированных МДА). Это хорошо согласуется с данными, полученными Galeano с соавт. [Galeano et al., 1998]. В этой работе было продемонстрировано отсутствие различий между так называемыми «мелкими, плотными» ЛНП и нативными ЛНП на следующих участках апо-B-100: 474-539, 1022-1031, 1438-1480, 2980-3084 и 3221-3569.

Клоны 2G8 и 2Е3 являются антителами к одному и тому же участку апо-B-100 (с 3728 по 4306 аминокислотный остаток). Поскольку мы наблюдали различие в связывании нативных ЛНП и цмЛНП с этими антителами (2Е3 лучше связывается с цмЛНП, а 2G8 одинаково связывается с нативными ЛНП и цмЛНП), можно сделать вывод о том, что в этом участке апо-B-100 наряду с одинаковыми фрагментами существуют фрагменты белка, различные у цмЛНП и нативных ЛНП.

Антитела клонов 2G1 и 7С2 получены против ЛНП, модифицированных МДА. Эти антитела показали лучшее связывание с цмЛНП по сравнению с нативными ЛНП. Это значит, что цмЛНП и ЛНП, модифицированные МДА

имеют общие участки белка, отличные от нативных ЛНП. Антитела клонов 3С8 и 6Е2, напротив, интенсивнее взаимодействовали с апо-B-100 нативных ЛНП, нежели цмЛНП.

К сожалению, структура апо-B-100 цмЛНП недостаточно изучена. Различия в экспонировании различных эпитопов цмЛНП по сравнению с нативными продемонстрированы только в одной работе [Galeano et al., 1994]. Авторы показали, что антитела клонов 3F5(с 2835 по 2922 аминокислотный остаток апо-B-100) и 3A10 (против эпитопа в апо-B-100, находящегося в центре связывания с апоБ,Е-рецептором) хуже связываются с циркулирующими модифицированными ЛНП, чем с нативными липопротеидами.

Суммируя приведенные выше данные можно сказать, что между цмЛНП и нативными ЛНП все же существует разница в структурной организации поверхности. Однако эти различия носят локальный характер, так как выявляются методом иммуноферментного анализа и не могут быть выявлены при изучении ЛНП с использованием флуоресцентных и спиновых зондов и меток, которые дают усредненные характеристики частиц ЛНП.

При использовании панели моноклональных антител к апо-B-100 нами были получены данные, свидетельствующие о том, что апобелок цмЛНП изменен по сравнению с апо-B-100 нативных липопротеидов. При этом есть основания предполагать, что в цмЛНП есть изменения апобелка, сходные с изменениями, наблюдаемыми в ЛНП, модифицированных МДА. В то же время очень большая часть апо-B-100 цмЛНП не имеет изменений. Продемонстрированные результаты согласуются с данными, полученными другими группами исследователей.

С физико-химической точки зрения ЛНП представляют собой мелкодисперсную липидную эмульсию в водной среде. Устойчивость такой коллоидной системы обусловлена тем обстоятельством, что неполярные липиды ядра ЛНП экранированы от гидрофильного окружения полярными

группами фосфолипидов и апо-B-100, экспонированными в сторону водной среды. Поверхность ЛНП в целом заряжена отрицательно [Панасенко с соавт., 1985]. Как и любая заряженная частица ЛНП в водной среде окружены сольватно-гидратной оболочкой, целостность которой определяет устойчивость частиц ЛНП к ассоциации и стабильность коллоидной системы в целом [Зонтаг, Штренге, 1973]. Поскольку формирование сольватно-гидратной оболочки напрямую зависит от физико-химических свойств поверхности частицы, то можно ожидать, что любое изменение структурной организации поверхности ЛНП приведет к нарушению сольватно-гидратной оболочки, а значит, повлияет на устойчивость частиц ЛНП к ассоциации.

Для проверки этого предположения мы изучили, как изменяется способность нативных и цмЛНП к ассоциации при изменении их сольватной оболочки. Нарушения сольватной оболочки добивались изменением ионной силы среды. Гидратную оболочку разрушали путем добавления в среду инкубации ЛНП полиэтиленгликоля (ПЭГ). Оказалось, что любое нарушение гидратной оболочки ЛНП (путем снижения ионной силы среды или при добавлении ПЭГ) приводило к их ассоциации, причем цмЛНП агрегировали быстрее нативных. Диализ полученных агрегатов против изофосфатного буфера с целью избавления от ПЭГ или восстановления ионной силы среды не приводил к их дезагрегации. Напротив, их размер продолжал увеличиваться. Это значит, что процесс агрегации липопротеидов в условиях нарушения сольватно-гидратной оболочки необратим.

Ранее было показано [La Belle, Krauss, 1990], что циркулирующие множественно модифицированные или мелкие, плотные ЛНП содержат на 30% меньше углеводов, чем нативные ЛНП. С другой стороны было продемонстрировано [Tertov et al., 1992; Jaakkola et al, 1993], что цмЛНП десиалированы по сравнению с нативными ЛНП. Возможно, что липопротеиды теряют часть сиаловых кислот апо-B-100 при секреции из печени [Tertov et al., 1998; Bartlett et al., 2000]. В настоящей работе мы сделали предположение, что

именно потеря гликозидных остатков приводит к снижению устойчивости частиц ЛНП, способствуя их агрегации.

Для подтверждения данной гипотезы мы провели десалирование, деманнозилирование и удаление целых полиманнозных и гликозидных цепей из ЛНП путем их обработки соответствующими ферментами. После чего мы проанализировали содержание сахаров в полученных модифицированных ЛНП и изучили их устойчивость к агрегации. Помимо этого исследовали зависимость способности всех полученных агрегатов модифицированных ЛНП накапливать внутриклеточный холестерин в гладкомышечных клетках от их размера.

Мы показали, что модификация различных углеводных цепей ЛНП ведет к агрегации липопротеидных частиц и вызывает липопротеид-опосредованное накопление суммарного холестерина в гладкомышечных клетках интимы аорты человека. Углеводные цепи апоВ-100, основного аполипопротеида исследованных липопротеидов, представлены N-связанными биантенными сиализованными цепями и N-связанными полиманнозными цепями [Vauhkonen et al., 1985; Taniguchi et al., 1989]. Было обнаружено, что «укорочение» полиманнозных цепей с помощью маннозидазы вызывало агрегацию ЛНП. При этом все исследованные липопротеиды становились атерогенными. Более того, удаление целых полиманнозных цепей с помощью эндогликозидазы F₁ приводило к тем же последствиям. Таким образом, укорочение полиманнозных цепей или их удаление из липопротеидной частицы вызывает атерогенную модификацию липопротеидов, то есть увеличивает их способность накапливать холестерин в интимальных клетках.

Удаление N-связанных биантенных цепей с помощью эндогликозидазы F₂, также приводило к появлению у ЛНП атерогенного потенциала. Гидролиз эндогликозидазой F₂ сопровождался агрегацией липопротеидных частиц. Ранее было продемонстрировано, что частичное удаление сиаловой кислоты с помощью нейраминидазы холеры сопровождалось агрегацией ЛНП и

появлением у них способности накапливать внутриклеточные липиды [Tertov et al., 1989; 1992]. В данном исследовании с помощью сиалидаз специфичных к 2-6 и 2-3 связанным сиаловым кислотам, было выявлено, что десиалирование как биантенных цепей (2-6 связь), так и углеводных цепей ганглиозидов (2-3 связь) ведет к таким же последствиям. Таким образом, десиалирование или удаление биантенных цепей апобелка, а также десиалирование гликанов ганглиозидов являются атерогенными модификациями ЛНП.

Необходимо отметить, что использованные эндогликозидазы F_1 и F_2 гидролизуют связь между двумя N-ацетилглюкозаминами, оставляя один из них связанным с остатком аспарагина. При использовании другого фермента пептид-N-гликаназы F, которая гидролизует связь между N-ацетилглюкозамином и аспарагиновым остатком, мы также обнаружили агрегацию липопротеидов и появление у них атерогенных свойств.

Возникает вопрос, а происходят ли подобные изменения углеводных цепей ЛНП *in vivo*? Ранее было показано, что фракция цмЛНП, выделенных из плазмы крови, имеет значительные отличия в содержании различных моносахаридов от нативных ЛНП [Tertov et al., 1993]. В цмЛНП содержание белок-связанной маннозы, галактозы и сиаловой кислоты достоверно ниже, чем в нативных ЛНП. Уровень всех липид-связанных нейтральных сахаров и сиаловой кислоты в десиалированных липопротеидах также был снижен по сравнению с нативными ЛНП. La Belle и Krauss обнаружили сниженный уровень нейтральных сахаров и сиаловой кислоты в ЛНП пациентов, имеющих измененное распределение липопротеидов по размерам частиц [La Belle, Krauss, 1990]. Следовательно, обнаруженные нами в экспериментах *in vitro* изменения вполне можно ожидать в живом организме.

Другим косвенным подтверждением возможности модификации углеводных цепей липопротеидов является наличие в плазме крови соответствующих гидролитических ферментов. Так Rodriguez-Iturbe с соавторами обнаружили сиалидазную активность у пациентов с

гломерулонефритом [Rodriguez-Iturbe et al., 1981]. Roggentin с соавт. выявили низкую сиалидазную активность у 95% обследованных доноров, но не смогли найти корреляцию активности с какой-либо патологией [Roggentin et al., 1993]. Hanson с соавт. нашли трехкратное увеличение сиалидазной активности в крови пациентов с инфарктом миокарда по сравнению со здоровыми донорами [Hanson et al., 1987]. Shannon с соавт. выявили увеличенную сиалидазную активность плазмы у больных с хронической почечной недостаточностью [Shannon et al., 1985]. Помимо плазмы в ряде исследований было показано наличие сиалидазы на поверхности ряда клеток крови [Cross, Wright, 1991; Venerando et al., 1997]. Тертов с соавт. установили, что десиалирование ЛНП осуществляется в плазме крови человека ферментом транс-сиалидазой, переносящим сиаловую кислоту на другие углеводные цепи компонентов плазмы [Tertov et al., 1998].

α -Маннозидазная активность была обнаружена в плазме крови человека рядом исследователей [Lombardo et al., 1996; Prence et al., 1992]. Было показано, что маннозидазная активность плазмы увеличена у больных с вирусными инфекциями [Busch et al., 1995]. Hirani и Winchester выявили в плазме крови человека 4 изоформы α -маннозидазы, различающихся по молекулярному весу и ряду других свойств [Hirani et al., 1979]. Помимо α -маннозидазы в крови людей обнаружены и другие гликозилитические ферменты: β -маннозидаза, α - и β -глюказидазы, β -галактозидаза, β -N-ацетилглюкоз-, галактозаминидазы и др. [Willcox et al., 1977]. Наконец, в ряде клеток млекопитающих была обнаружена пептид-N-гликаназная активность [Suzuki et al., 1994].

Таким образом, в плазме крови человека обнаружены многочисленные гликозидазы, способные модифицировать как белок-, так и липид-связанные углеводные цепи. Это дает основание полагать, что обнаруженное в нашей работе дегликозилирование липопротеидов, приводящее к их атерогенной модификации, может иметь место *in vivo*, в частности, в крови человека.

Суммируя полученные в работе данные, можно сказать, что снижение устойчивости модифицированных ЛНП к ассоциации и образование агрегатов ЛНП является если не обязательным, то, по крайней мере, важным звеном в приобретении ЛНП атерогенных свойств, то есть способности накапливать в клетках интимы холестерин. Атерогенность ассоциатов ЛНП напрямую зависит от степени их агрегации и возрастает с увеличением среднего размера частиц ЛНП. Причина снижения устойчивости ЛНП к ассоциации кроется в локальных нарушениях топографии апо-B-100 на поверхности частиц ЛНП. В свою очередь, это приводит к нарушению сольватной оболочки, окружающей заряженную частицу ЛНП и выполняющую роль ее стабилизатора. Одна из вероятных модификаций ЛНП *in vivo* – дегликозилирование углеводных остатков апо-B-100 и/или гликолипидов. Захват агрегатов ЛНП клеткой происходит путем неспецифического фагоцитоза, причем, скорость захвата достоверно превосходит скорость деградации, что и приводит к накоплению холестерина в клетках, перерождению их в пенистые клетки и способствует развитию ранних стадий атеросклероза.

Влияние различных модификаций частицы нативных ЛНП на устойчивость липопротеидов к ассоциации

Ранее в нашей лаборатории было установлено существование в плазме крови больных атеросклерозом циркулирующих модифицированных ЛНП (Orekhov et al., 1989; Tertov et al., 1990) В ходе изучения цммЛНП было показано, что помимо измененных физико-химических свойств они отличаются от нативных липопротеидов атерогенностью и повышенной склонностью к ассоциации. Эти два свойства цммЛНП тесно связаны: степень ассоциации прямо коррелирует со способностью вызвать накопление липидов в культуре клеток. В данной работе была предпринята попытка получить ответ на ряд вопросов: какие изменения в структуре частиц нативных ЛНП должны произойти для того чтобы у липопротеидов появилась склонность к ассоциации, какая *in vitro*

модификация наиболее близка к той, что происходит *in vivo* и ведет к появлению цММЛНП?

Чтобы ответить на эти вопросы мы подвергали ЛНП различным модификациям, затрагивающим основные компоненты частицы липопротеида. Из полученных нами результатов можно заключить, что модификация любого из компонентов частицы нативных ЛНП: белковой ее части, липидной, полисахаридной ведет к снижению устойчивости липопротеидов к ассоциации и к значительным изменениям конформации апоВ белка. Так, использованные нами протеолитические ферменты стимулировали ассоциацию ЛНП и вызывали расщепление апоВ белка. По-видимому, такое нарушение структуры поверхности частицы ЛНП дестабилизирует ее и вызывает структурные перестройки в частице, снижая устойчивость к ассоциации. Кроме того, в отсутствии ферментов или в присутствии ингибитора протеолитических ферментов ассоциации не наблюдалась. Это доказывает, что описанная нами ассоциация ЛНП связана именно с протеолитической модификацией липопротеидов.

Поскольку различные протеолитические агенты, такие как химаза, триптаза, металлопротеиназы, калликреин, лизосмальные протеазы обнаруживаются в участках сосудов, пораженных атеросклерозом (Öörni K et al, 2000), то можно полагать, что ассоциация ЛНП, инициированная протеолизом, может иметь место *in vivo*. В пользу данного предположения свидетельствуют следующие факты. Фрагментированный апо В-100 неоднократно обнаруживался в ЛНП, выделенных из участков артерий, пораженных атеросклерозом (Lojda Z et al, 1984; Steinbrecher U.P et al, 1992) в то время как в артерии без заметных очагов поражения фрагменты апо В-100 не обнаруживались (Ylä-Herttuala S et al, 1988). ЛНП, изолированные из сосудов, подвергнутых атеросклерозу, имели пониженную плотность, что свидетельствует о частичной потере белка в результате его протеолиза (Chao et al, 1990). Полученные нами результаты, в целом, не противоречат работам,

посвященных изучению влияния различных протеолитических ферментов на ассоциацию ЛНП. Так, было показано, что использование протеаз с высокой субстратной специфичностью (калликреин, тромбин, плазмин) не приводит к ассоциации частиц ЛНП (Piha M et al, 1995). В то же время такие протеолитические ферменты как химотрипсин, отличающиеся низкой субстратной специфичностью и отщепляющие от апоВ значительные пептидные фрагменты, вызывали слияние частиц ЛНП (Pentikiinen et al, 1996, Piha M et al, 1995). Значительная протеолитическая деградация апоВ под действием трипсина и химотрипсина продемонстрирована и в данной работе.

Другой модификацией стимулирующей ассоциацию ЛНП является липолиз фосфолипидов поверхности ЛНП. Липополитическая модификация в данной работе моделировалась при помощи фосфолипазы А2 и фосфолипазы С. В обоих случаях наблюдалась стимуляция ассоциации ЛНП. В случае увеличения концентрации фермента повышалась и степень ассоциации модифицированных ЛНП. В то же время при использовании ингибитора фосфолипаз или в отсутствие фермента ассоциации ЛНП не наблюдалось. Эти результаты согласуются с данными, полученными Hakala (Hakala et al 1999, Hakala et al 2003). В этих работах было показано, что фосфолипаза А2 стимулирует агрегацию частиц ЛНП, а в присутствии гепарина и протеогликанов вызывает слияние частиц липопротеидов. Ассоциация ЛНП под влиянием фосфолипазы С была продемонстрирована в работе Liu (Liu et al 1993).

Причины наблюдаемой ассоциации заключаются, по-видимому, в увеличении гидрофобности частицы ЛНП под действием фосфолипаз. Так, в нашей работе было продемонстрировано повышение уровня лизофосфотидилхолина и диацилглицерола под действием, соответственно, фосфолипазы А2 и фосфолипазы С. Известно, что лизофосфотидилхолин и диацилглицерол способствуют формированию гидрофобных микродоменов на поверхности частицы ЛНП (Hevonoja et al 2000). Таким образом, можно

предположить, что гидролиз фосфолипидов, инициированный фосфолипазами A₂ и C приводит к модификации физико-химических свойств поверхности частиц ЛНП. Так как рядом авторов было установлено присутствие ряда липополитических ферментов, в том числе фосфолипазы A₂, в очаге атеросклеротического поражения (Hevonoja et al 2000, Öögri K et al, 2000), то продемонстрированная нами ассоциация ЛНП под воздействием фосфолипаз вполне возможно имеет место и *in vivo*. Это предположение также косвенно подтверждает факт повышения уровня фософлипазы A₂ в плазме больных сердечно-сосудистыми заболеваниями (Hurt-Camejo E et al 2001). В то же время, попытки обнаружить присутствие внеклеточной фосфолипазы C в стенке сосуда успехом не увенчались. Уровень диацилглицерола в ЛНП выделенных из участков атеросклеротических поражений также не был повышен.

Еще одним ферментом, который предположительно вызывает модификацию ЛНП *in vivo* является миелопероксидаза. Этот фермент отсутствует в непораженных участках аорты, но обнаружен в активном состоянии в интиме аорты с характерными атеросклеротическими повреждениями. В данной работе миелопероксидаза использовалась для моделирования окислительной модификации. Присутствие МПО в среде инкубации ЛНП приводило к уменьшению устойчивости липопротеидов к ассоциации. В отсутствие фермента или его субстрата – перекиси водорода ассоциации не наблюдалось. Это значит, что фермент, вероятно, через образование гипохлорита снижает устойчивость частиц ЛНП к ассоциации.

Рассуждая о механизмах ассоциации ЛНП под действием миелопероксидазы, можно предположить, что гипохлорит действует на аминокислотные остатки или углеводную компоненту апоВ (Jerlich et al 1998). Помимо этого, возможно и опосредованное нарушение конформации апоВ через воздействие HOCl/OCI⁻ на фосфолипиды или холестерин (Carr et al, 2000, Hazen et al 1996), расположенные в непосредственной близости от апоВ. Гипохлорит также

разрушает липидорастворимые антиоксиданты в ЛНП, снижая их резистентность к окислительной модификации. Подобные химические реакции приводят к значительным изменениям физико-химических свойств поверхности ЛНП. Увеличивается полярность липидной фазы, снижается подвижность ацильных цепей фосфолипидов, увеличивается отрицательный потенциал поверхности частицы ЛНП. Такие значительные нарушения физико-химических свойств поверхности ЛНП, по всей вероятности, приводят к потере устойчивости ЛНП, как коллоидной системы. Результатом является усиление ассоциации ЛНП, продемонстрированное также Jerlich (Jerlich et al 2000). Таким образом, результаты работы позволяют заключить, что миелопероксидаза способна модифицировать физико-химические свойства поверхности ЛНП таким образом, что они теряют устойчивость к ассоциации.

В литературе широко обсуждается возможность модификации ЛНП *in vivo* при окислительном и карбонильном стрессе. Предполагается, что в возникновении повреждений частиц ЛНП и стенки сосуда при атеросклерозе важную роль играют вторичные продукты свободнорадикального окисления липидов альдегидной природы, накапливающиеся в процессе окислительной деструкции липидных гидропероксидов. Типичным примером таких альдегидов является МДА. Было показано, что альдегиды, генерируемые при деструкции липопероксидов в окисленных ЛНП, образуют аддукты с ε-аминогруппами лизиновых остатков молекул апоВ, вызывая изменение структуры молекулы белка и модификации частиц ЛНП (Uchida K., 2003). Кроме того, большое количество низкомолекулярных альдегидов, способных модифицировать ЛНП накапливается в процессе автоокисления глюкозы. Свободная, а также связанная с белками глюкоза подвергается неферментативным и ферментативным модификациям, в результате которых образуются низкомолекулярные альдегиды, такие как глиоксаль, метилглиоксаль, 3-деоксиглюкозон и гликольальдегид (Thornalley P. et al., 1999; Knott H. et al., 2003; Beisswenger P. et al., 2003). В данной работе было

проведено исследование влияния альдегидов эндогенного происхождения – глиоксала, метилглиоксала и МДА на ассоциацию ЛНП. Было установлено, что все использованные альдегиды стимулировали ассоциацию ЛНП. Параллельно, было показано, что частицы ЛНП, обработанные МДА, метилглиоксалем и глиоксалем, обладают значительной электрофоретической подвижностью по сравнению с нативными ЛНП. При сравнении этих данных с данными по ассоциации ЛНП ясно видно, что наиболее сильную агрегацию вызывают именно те альдегиды (метилглиоксаль>глиоксаль>МДА), при модификации которыми отмечены изменения в степени электрофоретической подвижности ЛНП. Эти результаты не противоречат данным полученным ранее (Schalkwijk et al, 1998; Knott et al 2003).

Для моделирования десиалирующей модификации в данной работе использовалась бактериальная нейраминидаза. Было продемонстрировано значительное снижение устойчивости к ассоциации нативных ЛНП, обработанных нейраминидазой. Эти результаты дополняют ранее полученные данные, свидетельствующие о значительной роли десиалирующей модификации липопротеидов низкой плотности в атерогенезе. Так, было показано, что цммЛНП отличаются от нативных ЛНП сниженным содержанием сиаловой кислоты. (Orekhov et al., 1990; Tertov et al., 1992). В цммЛНП, выделенных из крови больных атеросклерозом, содержание сиаловой кислоты было в среднем в 2-3 раза ниже, чем в нативных липопротеидах (Tertov et al., 1992; 1995). Была установлена достоверная обратная корреляция между содержанием сиаловой кислоты в ЛНП и способностью липопротеидов вызывать накопление липидов *in vitro* (Orekhov et al., 1992). Кроме того, нативные липопротеиды здоровых лиц после удаления сиаловой кислоты бактериальной нейраминидазой приобретали атерогенные свойства (Orekhov et al., 1989; 1991). Наконец, было продемонстрировано достоверное снижение уровня сиаловой кислоты в результате инкубации липопротеидов с аутологичной плазмой (Tertov et al, 1998).

В зависимости от характера модификации были продемонстрированы разноплановые изменения, происходившие в структуре частицы ЛНП: расщепление апоВ белка в результате протеолитической модификации, изменение липидного состава липопротеидов, обработанных фосфолипазами, накопление ТБК-реактивных продуктов вследствие окисления миелопероксидазой. Все эти различные по своей природе изменения различных компонентов частицы ЛНП дестабилизируют частицу ЛНП и приводят к потере устойчивости к ассоциации.

С физико-химической точки зрения ЛНП представляют собой мелкодисперсную липидную эмульсию в водной среде. Устойчивость такой коллоидной системы обусловлена тем обстоятельством, что неполярные липиды ядра ЛНП экранированы от гидрофильного окружения полярными группами фосфолипидов и апоВ-100, экспонированными в сторону водной среды. В результате любой из использованных нами модификаций происходит нарушение поверхностной структуры ЛНП, обнажение неполярных гидрофобных участков и, благодаря этому, возникает возможность взаимодействия частиц между собой. В настоящей работе мы подтвердили, что модификация любого компонента частицы ЛНП приводит к ассоциации липопротеидов. Помимо ферментативной модификации разнообразные физические факторы, такие, например, как изменение сольватной оболочки частицы ЛНП, стимулируют ассоциацию частиц ЛНП. Поверхность ЛНП в целом заряжена отрицательно [Панасенко с соавт., 1985]. Как и любая заряженная частица ЛНП в водной среде окружены сольватной оболочкой, целостность которой определяет устойчивость частиц ЛНП к ассоциации и стабильность коллоидной системы в целом [Зонтаг, Штренге, 1973]. Поскольку формирование сольватной оболочки напрямую зависит от физико-химических свойств поверхности частицы, то можно ожидать, что любое изменение структурной организации поверхности ЛНП приведет к нарушению сольватной оболочки, а значит, повлияет на устойчивость частиц ЛНП к ассоциации.

Нарушения сольватной оболочки в данной работе добивались путем добавления в среду инкубации ЛНП полиэтиленгликоля (ПЭГ). Оказалось, что любое из указанных нарушений сольватной оболочки ЛНП приводило к их ассоциации, причем цммЛНП агрегировали быстрее нативных. Этот факт еще раз подтверждают высокую склонность цммЛНП к ассоциации.

Изучение конформационных изменений апоВ белка цммЛНП и ферментативно модифицированных ЛНП

Повышенная склонность к ассоциации является общим свойством всех исследованных типов модифицированных ЛНП.

Этот вывод позволил сформулировать другой вопрос на который мы пытались ответить в данной работе: какая из использованных нами модификаций наиболее близка к той, что происходит *in vivo* и ведет к появлению цммЛНП? Ответ на этот вопрос мог пролить свет на причины возникновения цммЛНП. Специфичность изменений, происходящих в частице ЛНП в результате той или иной модификации, подтверждает сравнительное исследование изменений конформации апоВ белка модифицированных различным образом липопротеидов. При любой использованной модификации наблюдалось значительное изменение конформации апоВ. Не только протеолитическая модификация способствует изменению структуры аполипопротеина В-100, но также липолитическая, дегликозилирующая, окислительная модификации также приводят к перестройкам апоВ. Ранее конформационные перестройки апоВ-100 индуцированные липолизом и выражавшиеся в изменении иммунореактивности моноклональных антител, сокращении доли α -спирали и увеличение содержания β -складчатого слоя в структуре белка были продемонстрированы в ряде работ (Asatryan et al, 2004; Chauhan et al, 1997).

Довольно сложно отметить общие закономерности при сравнении профилей антигенных изменений апоВ под действием различных ферментов.

Сравнение антигенных профилей цммЛНП и ферментативно модифицированных ЛНП приводит к выводу, что ни одна ферментативная модификация не воспроизводит изменений структуры апоB, происходящих в цммЛНП. В то же время известно, что цммЛНП характеризуются модификацией всех известных компонентов липопротеидной частицы. Полученные данные подтверждают предположение о том, что формирование структуры цммЛНП является следствием множественной модификации липопротеидной частицы и невозможно указать конкретную модификацию, ответственную за появление цммЛНП.

Экзогенные ингибиторы ассоциации ЛНП

Таким образом, склонность к ассоциации является общим и важнейшим свойством как *in vitro*, так и *in vivo* модифицированных ЛНП. Возможности модуляции ассоциации ЛНП изучены недостаточно. С целью поиска ингибиторов ассоциации было проведено сравнительное исследование влияния различных амфифильных блок сополимеров оксида пропилена и оксида этилена – пллюроников на ассоциацию ЛНП. В работе использовалось три пллюроника отличающихся по выраженности гидрофильно-липофильных свойств. Удалось показать, что пллюроники P85 и L61, характеризующиеся выраженным или умеренным лиофильными свойствами, способны значительно ингибировать ассоциацию ЛНП. В то же время гидрофильный пллюроник не оказывал влияния на ассоциацию липопротеидных частиц. Полученные данные косвенно подтверждают предположение, впервые выдвиннутое Khoo и соавторами (Khoo et al, 1990) о роли гидрофобных взаимодействий в процессе ассоциации ЛНП. Предположительно, в ходе инкубации при постоянном перемешивании происходят конформационные изменения структуры ЛНП, приводящие к экспозиции гидрофобных участков на поверхности частиц. Далее начинает происходить взаимодействие гидрофобных участков разных частиц, приводящее к ассоциации ЛНП. В

случае присутствия в эмульсии ЛНП амфифильных веществ, липофильная часть амфифильной молекулы может взаимодействовать с гидрофобными доменами на поверхности частицы ЛНП экранировать их и, таким образом, предотвращать процесс ассоциации ЛНП. По-видимому, плюроники образуют с ЛНП комплекс и стабилизируют, таким образом, частицы липопротеидов. Это предположение подтверждается в работе Morita и соавторов (Morita et al 2003), показавших, что плюроник L81, сходный по свойствам с использованным нами L61, образует при инкубации с ЛНП комплекс диаметром 30 нм. Также нам удалось показать, что плюроники не вызывают диссоциации уже образовавшихся ассоциатов ЛНП, но предотвращают дальнейшую ассоциацию частиц. Вероятно, это может означать, что амфифильные полимеры способны стабилизировать не только нативные частицы ЛНП, но и образующиеся ассоциаты, однако не способны обратить процесс ассоциации вспять.

Примечательно, что минимальная ингибирующая концентрация плюроника тесно связана с критической концентрации мицеллообразования (ККМ). Как для плюроника P85, так и в случае плюроника L61 концентрации меньшие ККМ не оказывали влияния на процесс ассоциации. Эта закономерность, состоящая в проявлении биологической активности плюроника только в концентрациях превышающих ККМ, отмечается в большинстве работ, посвященных изучению свойств плюроников.

Учитывая большое значение ассоциации ЛНП в патогенезе атеросклероза, полученные данные о возможности подавления ассоциации с помощью плюроников могут стимулировать разработку новых подходов к терапии и профилактике атеросклероза. С другой стороны, получены новые данные о разносторонней биологической активности плюроников. Причины влияния плюроников на ассоциацию ЛНП, закономерности взаимодействия полимеров с частицами липопротеидов заслуживают дальнейшего изучения.

Решение этих вопросов позволит окончательно раскрыть механизмы ассоциации ЛНП.

5. ВЫВОДЫ

1. Нативные ЛНП в условиях культивирования клеток не образуют агрегатов (37°C, CO₂-инкубатор), в то время как цмЛНП в аналогичных условиях ассоциируют в более крупные частицы. Удаление агрегатов цмЛНП путем фильтрации препятствует накоплению липидов в гладкомышечных клетках или макрофагах. Способность клеток накапливать холестерин зависит от степени агрегации цмЛНП и возрастает с увеличением среднего размера частиц цмЛНП.
2. Установлено, что относительная скорость захвата и внутриклеточной деградации агрегатов цмЛНП гладкомышечными клетками непораженной интимы аорты человека или макрофагами возрастает по сравнению с захватом и деградацией неагрегированных нЛНП и цмЛНП. Однако скорость захвата достоверно превосходит скорость деградации, что приводит к накоплению холестерина в клетках. Полученные данные позволяют заключить, что захват агрегатов цмЛНП клетками происходит путем неспецифического фагоцитоза.
3. Использование спиновых и флуоресцентных зондов и меток, дающих усредненные характеристики частицы ЛНП, не позволило выявить достоверных различий в физико-химических свойствах нативных ЛНП и цмЛНП.
4. Связывание моноклональных антител к апоВ100 с поверхностью частиц липопротеидов показало существование локальных различий в расположении отдельных фрагментов апоВ100 на поверхности цмЛНП в сравнении с нативными ЛНП.

5. Циркулирующие модифицированные ЛНП менее устойчивы к ассоциации по сравнению с нативными ЛНП в условиях нарушения их сольватной оболочки путем снижения ионной силы среды или инкубации с полиэтиленгликолем, причем процесс ассоциации является необратимым.
6. Липопротеиды, поверхность которых обеднена углеводами в результате ферментативного дегликозилирования (удаление как сиаловой кислоты и маннозы, так и целых гликозидных остатков), теряют устойчивость к ассоциации и агрегируют. Между размером агрегатов ЛНП и их способностью вызывать накопление липидов в интимальных клетках существует прямая зависимость.
7. Обработка нативных ЛНП протеолитическими, липолитическими, десиалирующими, индуцирующим окисление ферментами, альдегидами эндогенного происхождения приводит к существенным изменениям белковой, липидной и полисахаридной компонентов липопротеидной частицы и стимулирует ассоциацию модифицированных ЛНП.
8. Пространственное расположение апоВ-100 белка, ответственного за стабилизацию частиц ЛНП, в цммЛНП и модифицированных *in vitro* ЛНП отличается от расположения апоВ белка в нативных ЛНП.
9. Ни одна из модификаций: протеолитическая, липолитическая, десиалирующая, окислительная, модификация эндогенными альдегидами не вызывает изменений пространственного расположения апоВ белка сходных с изменениями, происходящими в цммЛНП, что свидетельствует о множественном характере модификаций, приводящих к формированию цммЛНП в крови.
10. Амфифильные блок-сополимеры окиси пропилена и окиси этилена, т.н. плюроники способны подавлять ассоциацию ЛНП, но не вызывают диссоциацию ассоциатов ЛНП.

11. Способность плюроников ингибировать ассоциацию ЛНП и минимальная ингибирующая концентрация зависит от гидрофильно-липофильного баланса и критической концентрации мицеллообразования, что свидетельствует о значительной роли гидрофобных взаимодействий в ассоциации ЛНП

Работа поддержана Министерством образования и науки России и Российской фондом фундаментальных исследований

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aggerbeck LP, Kezdy FJ and Scanu AM. Enzymatic probes of lipoprotein structure. Hydrolysis of human serum low density lipoprotein-2 by phospholipase A2 // J. Biol. Chem. -1976. -V. 251. - P. 823–3830.
2. Alaupovic P. Apolipoproteins and lipoproteins. // Atherosclerosis –1971.
3. Arnold K, Arnhold J, Zschornig O, Wiegel D, Krumbiegel M. Characterization of chemical modifications of surface properties of low density lipoproteins // Biomed. Biochim. Acta. -1989. -V. 48. - P. 735-742.
4. Arnold K, Herrmann A, Gawrisch K, Pratsch L.In: Molecular Mechanisms of Membrane Fusion. // New York. -1987. - P. 118-137.
5. Arnold K, Zschornig O. Aggregation of human plasma low density lipoproteins by means of poly(ethylene glycol). // Biomed. Biochim. Acta. -1988. - V. 47. - P. 949-954.
6. Asatryan Liana, Ryan T. Hamilton, J. Mario Isas, Juliana Hwang, Rakez Kayed, and Alex Sevanian LDL phospholipid hydrolysis produces modified electronegative particles with an unfolded apoB-100 protein // Journal of Lipid Research -2005. -V. 46. - P. 116-122
7. Asmis R and Jelk J, Large variations in human foam cell formation in individuals: a fully autologous in vitro assay based on the quantitative analysis of cellular neutral lipids. // Atherosclerosis. -2000. -V. 148. - P. 243-253
8. Asmis R, Begley JG, Jelk J, and Everson WV, Lipoprotein aggregation protects human monocyte-derived macrophages from OxLDL-induced cytotoxicity. // J.Lipid Res. -2005. -V. 46. - P. 1124-1132
9. Avogaro P, Bon GB and Cazzolato G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. -1988. -V. 8. - P. 79-87.
10. Avogaro P, Cazzolato G and Bittolo-Bon G. Some questions concerning a small, more electronegative LDL circulating in human plasma. // Atherosclerosis. - 1991.

11. Azumi HN, Takeshita IS, Rikitake Y, Kawashima S, Hayashi Y, Itoh H and Yokoyama M. Expression of NADH/NADPH oxidase p22phox in human coronary arteries. *Circulation* 1999; 100, 1494–1498.
12. Barenghi L, Bradamante S., Giudici GA and Vergani C. NMR analysis of low-density lipoprotein oxidatively-modified in vitro. *Free Radic. Res. Commun.* 1990; 8, 175–183.
13. Bates SR, Wissler RW. Effect of hyperlipemic serum on cholesterol accumulation in monkey aortic medial cells. // *Biochim Biophys Acta.* -1976. -V. 450(1). - P. 78-88.
14. Batrakova EV, Li S, Alakhov VY, Miller DW, Kabanov AV. Optimal structure requirements for pluronic block copolymers in modifying P-glycoprotein drug efflux transporter activity in bovine brain microvessel endothelial cells // *Farmacol. Exp. Ther.* -2003. -V. 304. - P.845-854
15. Baumstark MW, Kreutz W, Berg A, Frey I and Keul J. Structure of human low-density lipoprotein subfractions, determined by X-ray small-angle scattering. // *Biochim. Biophys. Acta.* -1990. -V. 1037. - P. 48–57.
16. Beisswenger P., Ruggiero-Lopez D. Metformin inhibition of glycation processes. // *Diabetes Metab.* -2003. -V. 29. - P. 6S95-103.
17. Belkner, J., R. Wiesner, J. Rathman, J. Barnett, E. Sigal, and H.Kuhn.Oxygenation of lipoproteins by mammalian lipoxygenases. // *Eur.J. Biochem.* -1993. -V. 213. - P. 251–261
18. Berliner, J. A., and J. W. Heinecke. 1996. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. // *Free Radic Biol Med.* -1996. -V. 20(5). - P. 707-27.
19. Bilheimer DW, Eisenberg S, Levy RI. The metabolism of very low density lipoprotein proteins. I. Preliminary in vitro and in vivo observations. *Biochim Biphys Acta* 1972; 260, 212.
20. Brown MS and Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. // *Annu. Rev. Biochem.* - 1983. -V. 52. - P. 223-261.

21. Busch H, Hasilik A, Domschke W. Elevated level of b-hexosaminidase and a-mannosidase in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis.* 1995;17, 683-686.
22. Buton X, Mamdouh Z, Ghosh R, Du H, Kuriakose G, Beatini N, Grabowski GA, Maxfield FR and Tabas I. Unique Cellular Events Occurring during the Initial Interaction of Macrophages with Matrix-retained or Methylated Aggregated Low Density Lipoprotein (LDL). // *J. Biol. Chem.*-1999. -V. 274. - P. 32112 - 32121.
23. Camejo G, The interaction of lipids and lipoproteins with the intercellular matrix of arterial tissue: its possible role in atherogenesis. // *Adv.Lipid Res.* -1982. -V. 19. - P. 1-53.
24. Carr A, McCall M, Frei B // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* -2000. -V. 20. - P. 1716-1723
25. Cazzolato G, Avogaro P and Bittolo-Bon G. Characterization of a more electronegatively charged LDL subfraction by ion exchange HPLC. *Free Radic Biol Med.* 1991; 11(3), 247-53.
26. Chao F.F., Blanchette-Mackie E.J., Chen Y.J., Dickens B.F., Berlin E., Amende L.M., Skarlatos S.I., Gamble W., Resau J.H., Mergner W.T., Kruth H.S. // *Am. J. Pathol.* -1990. -V. 136. - P. 169-179.
27. Chauhan Vinita, Xingyu Wang, Tanya Ramsamy, Ross W. Milne, and Daniel L. Sparks Evidence for Lipid-Dependent Structural Changes in Specific Domains of Apolipoprotein B100 // *Biochemistry* -1998. -V. 37. - P. 3735-3742
28. Chen RM, Fisher-Dzoga K. Effect of hyperlipemic serum lipoproteins on the lipid accumulation and cholesterol flux of rabbit aorticmedial cells. // *Atherosclerosis.*-1977. -V. 28. - P. 339-353.
29. Cookson FB. The origin of foam cells in atherosclerosis. // *Br J Exp Pathol.* 1971. -V.52(1). - P. 62-9.
30. Cross AS, Wright DG. Mobilization of sialidase from intracellular stores to the surface of human neutrophils and its role in stimulated adhesion responses of these cells. *J Clin Invest.* 1991;88, 2067-2076.

31. Cynshi O, Takashima Y, Suzuki T, Kawabe Y, Ohba Y and Kodama T. Characterization of aggregated low density lipoproteins induced by copper-catalyzed oxidation. *J. Atheroscler. Thromb.* 1994; 1, 87–97.
32. Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL and Heinecke JW. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.* 1994; 94, 437–444.
33. Davis HR, Glagov S and Zarins CK. Role of acid lipase in cholesterol ester accumulation during atherogenesis. Correlation of enzyme activity with acid lipase-containing macrophages in rabbit and human lesions. *Atherosclerosis*. 1985; 55, 205–215.
34. Deckelbaum RJ. Apoprotein B Structure and Receptor Recognition of Triglyceride-rich Low Density Lipoprotein (LDL) Is Modified in Small LDL but Not in Triglyceride-rich LDL of Normal Size. *J. Biol. Chem.* 1994; 269, 511-519.
35. Dobretsov GE, Kurek NK, Machov VN, Syrejshchikova TI, Yakimenko MN. Determination of fluorescent probes localization in membranes by nonradiative energy transfer. *Journal of Biochem. and Biophys. Methods.* 1989; 19, 259-274.
36. Dobretsov GE, Spirin MM, Chekrygin OV, Karmansky IM, Dmitriev VM and Vladimirov YuA. A fluorescence study of apolipoprotein localization in relation to lipids in serum low density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*, 1982; 710(2), 172-80.
37. Dobrian A, Mora R, Simionescu M and Simionescu N. In vitro formation of oxidatively-modified and reassembled human low-density lipoproteins: antioxidant effect of albumin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1993; 1169, 12–24.
38. Eichenberger K, Bohni P, Winterhalter KH, Kawato S and Richter C. Microsomal lipid peroxidation causes an increase in the order of the membrane lipid domain. *FEBS Lett.* 1982; 142, 59–62.
39. Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, and Protter AA, CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein // *J.Biol.Chem.* -1993. – V. 268. – P. 11811-11816,

40. Enerbach L. Detection of histamine in mast cells by o-phthalaldehyde reaction after liquid fixation. *J. Histochem. Cytochem.* 1969; 17, 757-759.
41. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H and Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. // *Free Radic. Biol. Med.* -1992. – V.13. - P. 341–390.
42. Fenske DB, Chana RS, Parmar YI, Treleaven WD and Cushley RJ. Structure and motion of phospholipids in human plasma lipoproteins. A ³¹P NMR study. // *Biochemistry.* 1990. – V. 29. – P. 3973–3981.
43. Filipovic I. Effect of inhibiting N-glycosylation on the stability and binding activity of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.*, 1989; 264, 8815 - 8820.
44. Fogelman AM, Shechter I, Seager J, Hokom M, Child JS and Edwards PA. Malondialdehyde Alteration of Low Density Lipoproteins Leads to Cholestryl Ester Accumulation in Human Monocyte-Macrophages. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* -1980. – V. 77. – P. 2214 - 2218.
45. Fowler SM, Scio MA, Haley NJ. Characterization of lipid-laden aortic cells from cholesterol rabbits. IV. Investigation of macrophage-like proteins of aortic cell populations. // *Lab Invest.* -1979. – V. 41. – P. 372-378.
46. Frank JS and Fogelman AM, Ultrastructure of the intima in WHHL and cholesterol-ultra-rapid freezing and freeze-etching. // *J.Lipid Res.* -1989. – V. 30. – P. 967-978.
47. Gaffney BJ. Fatty Acid Chain Flexibility in the Membranes of Normal and Transformed Fibroblasts Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1975; 72, 664-668.
48. Galeano NF, Al-Haideri M, Keyserman F, Rumsey SC and Deckelbaum RJ. Small dense low density lipoprotein has increased affinity for LDL receptor-independent cell surface binding sites: a potential mechanism for increased atherogenicity Journal of Lipid Research 1998; 39, 1263-1273.
49. Galeano NF, Milne R, Marcel YL, Walsh MT, Levy E, Ngu'yen T, Gleeson A, Arad Y, Witte L, Al-Haideri M, Rumsey SC and Deckelbaum RJ. Apoprotein B

Structure and Receptor Recognition of Triglyceride-rich Low Density Lipoprotein (LDL) Is Modified in Small LDL but Not in Triglyceride-rich LDL of Normal Size. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269, 511-519.

50. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW and Libby. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. // *J. Clin. Invest.* -1994. –V. 94. – P. 2493–2503.
51. Goldstein JL and Brown MS. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. // *Annu Rev Biochem.* -1977. – V. 46. – P. 897–930.
52. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, and Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. // *Proc Natl Acad Sci USA* -1979. – V. 76. – P. 333–337.
53. Gorshkova IN, Menschikowski M and Jaross W. Alterations in the physicochemical characteristics of low and high density lipoproteins after lipolysis with phospholipase A2. A spinlabel study. *Biochim. Biophys. Acta.* -1996. – V. 1300. – P. 103–113.
54. Gotto AM Plasma Lipoproteins. *New Comprehensive Biochem.*, 14. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford.1987.
55. Grainger DJ, Kemp PR, Liu AC, Lawn RM and Metcalfe JC. Activation of transforming growth factor-beta is inhibited in transgenic apolipoprotein(a) mice. // *Nature.* -1994. –V. 370. – P. 460–462.
56. Guyton JR and Klemp KF Development of the atherosclerotic core region. Chemical and ultrastructural analysis of microdissected atherosclerotic lesions from human aorta. // *Arterioscler.Thromb.* -1994. – V. 14. – P. 1305-1314.
57. Guyton JR, Klemp KF, Black BL, and Bocan TM, Extracellular lipid deposition in atherosclerosis. // *Eur.Heart J.* -1990. – V. 11. - Suppl E: P. 20-28,
58. Haberland ME, Fogelman AM. The role of altered lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. // *Amer. Heart J.* -1987. – V. 259. – P. 11305-11311.

59. Haberland ME, Fong D, Chen L. Maalondialdehyde-altered protein in atheroma of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. // Science. -1988. – V. 241. – P. 215-218.
60. Hakala J, Öörni K, Ala-Korpela M, Kovanen P. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. -1999. – V. 19. – P. 1276-1283.
61. Hakala J, Öörni K, Pentikäinen M, Hurt-Camejo E, Kovanen P. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. -2001. – V. 21. - P.1053-1058.
62. Hakala, J. K., K. Oorni, K., M. Ala-Korpela, and P. T. Kovanen..Lipolytic modification of LDL by phospholipase A2 induces particleaggregation in the absence and function in the presence of heparin.// Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. -1999. – V. 19. – P. 1276 –1283
63. Hanson VA, Schettinger UR, Loungani RR, Nadijcka MA. Plasma sialidase activity in acute myocardial infarction. Am Heart J. 1987;114, 59-63.
64. Haust MD. Light and electron microscopyof human atherosclerosis lesions. Adv Exp Med Biol. 1978; 10, 33-59.
65. Hazell LJ, van den Berg JJ and Stocker R.Oxidation of low-density lipoprotein by hypochlorite causes aggregation that is mediated by modification of lysine residues rather than lipid oxidation. // Biochem J. -1994. – V. 302 (Pt 1). – P. 297-304.
66. Hazen SW, Fu Hsu F, Duffin K, Heineske JW // Journal of Biochemistry. - 1996. – V. 271. – P. 23080-23088
67. Heinecke JW, Suits AG, Aviram M, and Chait A Phagocytosis of lipase-aggregated low density lipoprotein promotes macrophage foam cell formation. Sequential morphological and biochemical events Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1991; 11, 1643 - 1651.
68. Henriksen T, Mahoney EM, and Steinberg D. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78, 6499-6503.

69. Hevonenja T., Pentikäinen M.O., Hyvönen M.T., Kovanen P.T., Ala-Korpela M. // Biochim. Biophys. Acta. -2000. - V. 1488. - P. 189-210.
70. Hirani S, Winchester B. The multiple forms of α-D-mannosidase in human plasma. Biochem J. 1979;179, 583-592.
71. Hoff HF and O'Neil J. Lesion-derived low density lipoprotein and oxidized low density lipoprotein share a lability for aggregation, leading to enhanced macrophage degradation. Arterioscler. Thromb. 1991; 11, 1209–1222.
72. Hoff HF, Whitaker TE and O'Neil J. Oxidation of low density lipoprotein leads to particle aggregation and altered macrophage recognition. // J. Biol. Chem. - 1992. – V. 267. – P. 602–609.
73. Holopainen JM, Subramanian M Kinnunen KJ. Sphingomyelinase induces lipid microdomain formation in a fluid phosphatidylcholine/sphingomyelin membrane. // Biochemistry. -1998. – V. 37. – P. 17562–17570.
74. Howard GC, Pizzo SV. Lipoprotein(a) and its role in atherothrombotic disease. Lab. Invest., 1993; 69, 373-386.
75. Huang H-W, Goldberg EM, and Zidovetzki R. Ceramide induces structural defects into phosphatidylcholine bilayers and activates phospholipase A2. // Biochem. Biophys. Res. Commun. -1996. – V. 220. – P. 834–838.
76. Hurt-Camejo, E., S. Andersen, R. Standahl, B. Rosengren, P. Sartipy, E. Stadberg, and B. Johansen. Localization of nonpancreatic secretory phospholipase A2 in normal and atherosclerotic arteries. Activity of the isolated enzyme on low-density lipoproteins. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. -1997. – V. 17. – P. 300–309.
77. Hurt-Camejo E., Camejo G., Peilot H., Öörni K., Kovanen P.T. // Circ. Res. - 2001. - V. 89. - P. 298-304.
78. Iverius PH, The interaction between human plasma lipoproteins and connective tissue glycosaminoglycans. // J.Biol.Chem. -1972. – V. 247 – P. 2607-2613.

79. Jerlich A., Fabian J, Tschabuschnig S, Smirnova A, Horakova L, Hayn M, Auer H, Guttenberger H, Leis HJ, Tatzber F, Waeg G, Schaur RJ // Free Radical Biology & Medicine -1998. – V. 24. – P. 1139-1148.
80. Jerlish A, Fritz G, Kharrazi H, Hammel M, Tschabuschnig S, Glatter S, Schaur RJ // Biochimica et Biophysica Acta -2000. – V. 1481. – P. 109-118.
81. Kaartinen M, Penttilä A and Kovanen PT. Mast cells of two types differing in neutral protease composition in the human aortic intima. Demonstration of tryptase- and tryptase hymasecontaining mast cells in normal intimas, fatty streaks, and the shoulder regions of atheromas. // Arterioscler. Thromb. -1994. – V. 14. – P. 966–972.
82. Kabanov A.V., Batrakova E. V., Alakhov V. Y. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery // Journal of Controlled Release. -2002. – V. 82. – P. 189–212
83. Kawabe Y, Cynshi O, Takashima Y, Suzuki T, Ohba Y and Kodama T. Oxidation-induced aggregation of rabbit low-density lipoprotein by azo initiator. // Arch Biochem Biophys. -1994. – V. 310(2). – P. 489-96.
84. Khoo JC, Miller E, McLoughlin P and Steinberg B. Prevention of low-density lipoprotein aggregation by high density lipoprotein or apolipoprotein A-I. // J. Lipid Res. -1990. – V. 31. – P. 645-652.
85. Kleinman Y, Krul ES, Burnes M, Aronson W, Pfleger B and Schonfeld G. Lipolysis of LDL with phospholipase A2 alters the expression of selected apoB-100 epitopes and the interaction of LDL with cells. // J. Lipid Res. -1988. – V. 29. – P. 729–743.
86. Klimov AN. Atherosclerosis Rev., 1988; 17, 75-86.
87. Knott H.M., Brown B.E., Davies M.J., Deant R.T. Glycation and glycoxidation of low-density lipoprotein by glucose and low-molecular mass aldehydes. // Eur. J. Biochem. -2003. – V. 270. – P. 3572-3582.

88. Kodama T, Freeman M, Rohrer L, Zabrecky J, Matsudaira P, and Krieger M. Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature*. 1990; 343: 531–535.
89. Kokkonen JO and Kovanen PT. Proteolytic enzymes of mast cell granules degrade low density lipoproteins and promote their granule-mediated uptake by macrophages in vitro. // *J. Biol. Chem.* -1989. – V. 264. – P. 10749–10755.
90. Kokkonen JO, Vartiainen M and Kovanen PT. Low density lipoprotein degradation by secretory granules of rat mast cells. Sequential degradation of apolipoprotein B by granule chymase and carboxypeptidase A. // *J. Biol. Chem.* - 1986. – V. 261. – P. 16067–16072.
91. Krieger M, Acton S, Ashkenas J, Pearson A, Penman M, and Resnick D. Molecular flypaper, host defense, and atherosclerosis. Structure, binding properties, and functions of macrophage scavenger receptors. *J. Biol. Chem.* 1993; 268, 4569–4572.
92. Krieger M. The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. *Curr. Opin. Lipidol.* 1997; 8, 275–280.
93. Kroon PA. Fluorescence study of the motional states of core and surface lipids in native and reconstituted low density lipoproteins. // *Biochemistry*. -1994. – V. 33. – P. 4879–4884.
94. Kruth HS, Huang W, Ishii I, and Zhang WY. Macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein. // *J.Biol.Chem.* 2002. – V. 277. – P. 34573-34.
95. Kruth HS, Jones NL, Huang W, Zhao B, Ishii I, Chang J, Combs CA, Malide D, and Zhang WY. Macropinocytosis is the endocytic pathway that mediates macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein. // *J.Biol.Chem.* 2005. – V. 280. – P. 2352-2360,
96. La Belle M, Krauss RM. Differences in carbohydrate content of low density lipoproteins associated with low density lipoprotein subclass patterns. // *J Lipid Res.* -1990. V.31. –P.1577-1588.

97. Lamb DJ, Mitchinson MJ and Leake DS. Transition metal ions within human atherosclerotic lesions can catalyse the oxidation of low density lipoprotein by macrophages. *FEBS Lett.* 1995; 37, 12–16.
98. Leake DS, Rankin SM and Collard J. Macrophage proteases can modify low density lipoproteins to increase their uptake by macrophages. // *FEBS Lett.* –1990. –V.269. –P.209–212.
99. Li F and Hui DY. Synthesis and secretion of the pancreatic-type carboxyl ester lipase by human endothelial cells. *Biochem. J.* 1998; 329, 675–679.
100. Lin RC, Dai J, Lumeng L and Zhang MY. Serum low density lipoprotein of alcoholic patients is chemically modified in vivo and induces apolipoprotein E synthesis by macrophages. *J. Clin. Invest.*, May 1995; 95(5): 1979-86.
101. Liu H, Scraba DG, and Ryan RO // *FEBS Lett.* -1993. -V.316. –P. 27-33
102. Llorente-Cortes V, Martinez-Gonzalez J, and Badimon L, LDL receptor-related protein mediates uptake of aggregated LDL in human vascular smooth muscle cells. // *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* -2000. –V. 20. –P. 1572-1579,
103. Lojda Z, Ruzickova M, Havrankova E and Synkova V. Lysosomal proteases in the normal and atherosclerotic arterial wall. // *J. Histochem.* –1984. –V.16. – P.399–405.
104. Lombardo A, Bairati C, Goi G, Roggi C, Maccarini L, Bollini D, Burlina A. Plasma lysosomal glycohydrolases in a general population. *Clin Chim Acta.* 1996;247, 39-4.
105. Lopes-Virella MF, Klein RL, Lyons TJ, Stevenson HC and Witztum JL. Glycosylation of low-density lipoprotein enhances cholesteryl ester synthesis in human monocyte-derived macrophages. // *Diabetes.* –1988. -V.37. –P.550-555
106. Lottin H, Motta C and Simard G. Differential effects of glycero- and sphingo-phospholipolysis on human high-density lipoprotein fluidity. // *Biochim. Biophys. Acta.* –1996. –V.1301. –P.127–132.

107. Lougheed M, Steinbrecher UP. Mechanism of uptake of copper-oxidized low density lipoprotein in macrophages is dependent on its extent of oxidation J. Biol. Chem. 1996; 271, 11798-11805.
108. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein mesurement with the Folin reagent. J. Biol. Chem. 1951, 193, 265-275.
109. Lund-Katz S and Phillips MC. Packing of cholesterol molecules in human low-density lipoprotein. // Biochemistry. -1986. -V.25. -P.1562-1568.
110. Lund-Katz S and Phillips MC. Packing of cholesterol molecules in human low-density lipoprotein. Biochemistry. 1986; 25, 1562-1568.
111. Lund-Katz S, Laboda HM, McLean LR and Phillips MC. Influence of molecular packing and phospholipid type on rates of cholesterol exchange. // Biochemistry. -1988. -V.27. -P.3416-3423.
112. Luoma JS, Stralin P, Marklund SL, Hiltunen TP, Särkioja T and Ylä-Herttuala S. Expression of extracellular SOD and iNOS in macrophages and smooth muscle cells in human and rabbit atherosclerotic lesions—Colocalization with epitopes characteristic of oxidized LDL and peroxynitrite-modified proteins. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1998; 18, 157-167.
113. Mahley RW, Innerarity TL, Weisgraber KH, Oh SY. Altered metabolism (in vivo and in vitro) of plasma lipoproteins after selective modification of lysine residues of apoproteins. // J Clin Invest. -1979. -V.64. -P.743-750.
114. Major I and Aviram M. Macrophage released proteoglycans are involved in cell-mediated aggregation of LDL. Atherosclerosis, Jan 1999; 142(1), 57-66.
115. Manowitz NR, Tso P, Drake DS, Frase S, Sabesin SM. Dietary supplementation with Pluronic L-81 modifies hepatic secretion of very low density lipoproteins in the rat. // J Lipid Res. -1986. -V.27(2). -P.196-207.
116. Marathe S, Kuriakose G, Williams KJ and Tabas I. Sphingomyelinase, an enzyme implicated in atherogenesis, is present in atherosclerotic lesions and binds to specific components of the subendothelial extracellular matrix. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. -1999. -V.19. -P. 2648-2658.

117. Marsche G, Zimmermann R, Horiuchi S, Tandon NN, Sattler W and Malle E. Class B Scavenger Receptors CD36 and SR-BI Are Receptors for Hypochlorite-modified Low Density Lipoprotein J. Biol. Chem. 2003; 278, 47562 - 47570.
118. Mateu L, Ávila EM, Camejo G, León V and Liscano N. The structural stability of low-density lipoprotein. A kinetic X-ray scattering study of its interaction with arterial proteoglycans. // Biochim. Biophys. Acta.-1984. -V.795. -P.525-534.
119. Mattjus P and Slotte JP. Does cholesterol discriminate between sphingomyelin and phosphatidylcholine in mixed monolayers containing both phospholipids? // Chem. Phys. Lipids. -1996. -V. 81. -P.69-80.
120. Menschikowski M, Kasper M, Lattke P, Schiering A, Schiefer S, Stockinger H and Jaross W. Secretory group II phospholipase A2 in human atherosclerotic plaques. // Atherosclerosis. -1995. -V.118. -P.173-181.
121. Meyer DF, Nealis AS, MacPhee CH, Groot PH, Suckling KE, Bruckdorfer KR and Perkins SJ. Time-course studies by synchrotron X-ray solution scattering of the structure of human low-density lipoprotein during Cu(2+)-induced oxidation in relation to changes in lipid composition. Biochem. J. 1996; 319, 217-227.
122. Mora R, Lupu F, and Simionescu N, Prelesional events in atherogenesis. Colocalization of apolipoprotein B, unesterified cholesterol and extracellular phospholipid liposomes in the aorta of hyperlipidemic rabbit. // Atherosclerosis - 1987. -V. 67. -P. 143-154
123. Morita S, Kawabe M, Nakano M, Handa T Pluronic L81 affects the lipid particle size and apolipoprotein B conformation // Chemistry and Physics of Lipids -2003. -V. 126. -P. 39-498
124. Murphy HC, Ala-Korpela M, White JJ, Raoof A, Bell JD, Barnard ML, Burns SP and Iles RA. Evidence for distinct behaviour of phosphatidylcholine and sphingomyelin at the low density lipoprotein surface. // Biochem. Biophys. Res. Commun.-1997. -V. 234. -P. 733-737.
125. Navab M., Berliner J.A., Watson A.D., Hama S. Y., Terrio M.C., Lusis A. J. S.Hama,M. C. Territo, A. J.Lusis, D. M. Shih, B. J. Van Lenten, J. S. Frank, L. L.

- Demer, P. A. Edwards, and A. M. Fogelman. The yin and yang of oxidation in the development of the fatty streak. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. -1996. -V.16. -P.831– 842
126. Nievelstein PFEM, Fogelman AM, Mottino G, and Frank JS, Lipid accumulation in rabbit aortic intima 2 hours after bolus infusion of low density lipoprotein. A deep-etch and immunolocalization study of ultrarapidly frozen tissue. // Arterioscler.Thromb. -1991. -V.11. -P. 1795-1805
127. Nievelstein-Post P, Mottino G, Fogelman AM, and Frank J, An ultrastructural study of lipoprotein accumulation in cardiac valves of the rabbit. // Arterioscler.Thromb. -1994. -V.14. -P. 1151-1161
128. Ohki S, Arnold K. Surface dielectric constant, surface hydrophobicity and membrane fusion. // J. Membr. Biol. -1990. -V.114. -P.195-203.
129. Öörni K, Hakala JK, Annila A, Ala-Korpela M, and Kovanen PT, Sphingomyelinase induces aggregation and fusion, but phospholipase A2 only aggregation, of low density lipoprotein (LDL) particles. Two distinct mechanisms leading to increased binding strength of LDL to human aortic proteoglycans. // J.Biol.Chem. -1998. -V.273. -P. 29127-29134
130. Öörni K., Pentikäinen M.O., Ala-Korpela M., Kovanen P.T. // J. Lipid Res. - 2000. -V41. -P. 1703-1714.
131. Orekhov AN, Tertov VV and Mukhin DN. Desialylated low density lipoprotein--naturally occurring modified lipoprotein with atherogenic potency. Atherosclerosis, 1991; 86(2-3), 153-61.
132. Orekhov AN, Tertov VV, Sobenin IA, Smirnov VN, Via DP, Guevara J, Jr, Gotto AM, Jr and Morrisett JD. Sialic acid content of human low density lipoproteins affects their interaction with cell receptors and intracellular lipid accumulation. J. Lipid Res., 1992; 33, 805.
133. Orekhov AN, Tertov VV, Kudryashov SA and Smirnov VN. Triggerlike stimulation of cholesterol accumulation and DNA and extracellular matrix

- synthesis induced by atherogenic serum or low density lipoprotein in cultured cells. Circ. Res., 1990; 66, 311.
134. Orekhov AN, Tertov VV, Mukhin DN, Koteliansky VE, Glukhova MA, Frid MG, Sukhova GK, Khashimov KA and Smirnov VN. Insolubilization of low density lipoprotein induces cholesterol accumulation in cultured subendothelial cells of human aorta. Atherosclerosis, 1989; 79(1), 59-70.
135. Paaninen K and Kovanen PT, Proteolysis and fusion of low density lipoprotein particles independently strengthen their binding to exocytosed mast cell granules. // J.Biol.Chem. -1994. -V.269. -P. 2023-2031
136. Paaninen K, Saarinen J, Annila A, and Kovanen PT, Proteolysis and fusion of low density lipoprotein particles strengthen their binding to human aortic proteoglycans. // J.Biol.Chem. 270: 12257-12262, 1995.
137. Panasenko OM, Vol'nova TV, Azizova OA and Vladimirov YA. Free radical modification of lipoproteins and cholesterol accumulation in cells upon atherosclerosis. Free Radic. Biol. Med. 1991; 10, 137-148.
138. Pentikiiinen M., Lehtonen M, Kovanen P. // J. Lipid Res. -1996. -V.37. -P. 2638-2649
139. Piha M, Lindstedt L, and Kovanen PT, // Biochemistry -1995 -V.34. -P. 10120-1012
140. Pineto GJ, White RR Phagocytosis of latex beads by a human gingival epithelial-like cell line in tissue culture. J. Dent. Res. 1977; 56, 1119.
141. Prence EM, Natowicz MR. Diagnosis of a-mannosidosis by measuring a-mannosidase in plasma. Clin Chem. 1992;38, 501-503.
142. Quinn MT, Parthasarathy S, and Steinberg D. Endothelial cell-derived chemotactic activity for mouse peritoneal macrophages and the effects of modified forms of low density lipoprotein. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82, 5949-5953.
143. Rice-Evans C, and K. R. Bruckdorfer. Free radicals, lipoproteins and cardiovascular dysfunction. // Mol Aspects Med. -1992. -V.13(1). -P.1-111

144. Rodriguez-Iturbe B, Katiyar VN, Coello J. Neuraminidase activity and free sialic acid levels inthe serum of patients with acute poststreptococcal glomerulonephritis. *N Engl J Med.* 1981; 304,1506-1510.
145. Roggentin P, Schauer R, Heyer LL, Vimr ER. Micro review: The sialidase superfamily and its spread by horisontal gene transfer. *Mol Microbiol.* 1993; 9, 915-921.
146. Romano M, Romano E, Björkerud D and Hurt-Camejo E. Ultrastructural localization of secretory type II phospholipase A2 in atherosclerotic and nonatherosclerotic regions of human arteries. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 1998. –V.18. –P. 519–525.
147. Ross R., Harker L. Hyperlipidemia and atherosclerosis. // *Science.* –1976. – V.193. –P.1094-1100.
148. Ross R.The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993; 362(6423), 801-9.
149. Sartipy P, Camejo G, Svensson L and Hurt-Camejo E. Phospholipase A(2) modification of low density lipoprotein forms small high density particles with increased affinity for proteoglycans and glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* 1999; 274, 25913–25920.
150. Sartipy P, Johansen B, Camejo G, Rosengren B, Bondjers G and Hurt-Camejo E. Binding of human phospholipase A2 type II to proteoglycans. Differential effect of glycosaminoglycans on enzyme activity. // *J. Biol. Chem.* –1996. –V.271. – P.26307–26314.
151. Schalkwijk CG, Vermeer MA, Stehouwer CD, te Koppele J, Princen HM, van Hinsbergh VW Effect of methylglyoxal on the physico-chemical and biological properties of low-density lipoprotein. // *Biochim Biophys Acta* –1998. –V.1394. - P.187–198
152. Schissel SL, Jiang XC, Tweedie-Hardman J, Jeong T-S, Hurt-Camejo E, Najib J, Rapp JH, Williams KJ and Tabas I. Secretory sphingomyelinase, a product of the acid sphingomyelinase gene, can hydrolyze atherogenic lipoproteins at neutral

- pH. Implications for atherosclerotic lesion development. *J. Biol. Chem.* –1998. –V.273. –P. 2738–2746.
153. Schissel SL, Tweedie-Hardman J, Rapp JH, Graham G, Williams KJ and Tabas I. Rabbit aorta and human atherosclerotic lesions hydrolyze the sphingomyelin of retained low-density lipoprotein. Proposed role for arterial-wall sphingomyelinase in subendothelial retention and aggregation. *J. Clin. Invest.* –1996. –V.98. –P.1455–1464.
154. Shamir R, Johnson WJ, Morlock-Fitzpatrick K, Zolfaghari R, Li L, Mas E, Lombardo D, Morel DW and Fisher EA. Pancreatic carboxyl ester lipase: a circulating enzyme that modifies normal and oxidized lipoproteins in vitro. *J. Clin. Invest.* 1996; 97, 1696–1704.
155. Shannon JS, Lappin TR, Elder GE, Roberts GM, McGeown MG, Bridges JM. Increase plasma glycosidase and protease acitivity in uraemia: possible role in the aetiology of the anaemia of chronic renal failure. *Clin Chim Acta*. 1985;153, 203-207.
156. Shen MM, Krauss RM, Lindgren FT and Forte TM. Heterogeneity of serum low density lipoproteins in normal human subjects. // *J. Lipid Res.* -1981. –V. 22. –P. 236-244
157. Smith E, Crosbie L and Carey S. Prothrombin-related antigens in human aortic intima. // *Semin. Thromb. Hemost.* –1996. –V.22. –P.347–350.
158. Smith EB The relationship between plasma and tissue lipids in human atherosclerosis. // *Adv.Lipid Res.* –1974. –V.12. –P.1-49,
159. Sommer A, Prenner E, Gorges R, Stütz H, Grillhofer H, Kostner GM, Paltauf F and Hermetter A. Organization of phosphatidylcholine and sphingomyelin in the surface monolayer of low density lipoprotein and lipoprotein(a) as determined by time-resolved fluorometry. // *J. Biol. Chem.* –1992. –V.267. –P.24217–24222.
160. Steinbrecher U.P., Lougheed M. // *Arterioscler. Thromb.* -1992. -Vol. 12. -P. 608-625.

161. Suits AG, Chait A, Aviram M and Heinecke JW. Phagocytosis of aggregated lipoprotein by macrophages: low density lipoprotein receptor-dependent foam-cell formation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989; 86, 2713–2717.
162. Sukhova GK, Shi GP, Simon DI, Chapman HA and Libby P. Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. // J. Clin. Invest. –1998. –V.102. –P. 576–583.
163. Suzuki T, Kitajima K, Inoue S, Inoue Y. Occurrence and biological roles of «proximal glycanases» in animal cells. Glycobiology. 1994;4, 777-789.
164. Swain J and Gutteridge JM. Prooxidant iron and copper, with ferroxidase and xanthine oxidase activities in human atherosclerotic material. FEBS Lett. 1995; 368, 513–515.
165. Tamminen M, Mottino G, Qiao JH, Breslow JL, and Frank JS, Ultrastructure of early lipid accumulation in ApoE-deficient mice. //Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol. –1999. –V. 19. –P. 847-853
166. Taniguchi T, Ishikawa Y, Tsunemitsu M, Fukuzaki H. The structures of asparagine-linked sugar chains of human apolipoprotein B-100. Arch Biochem Biophys. 1989;273, 197-205.
167. Tertov V.V., Sobenin I.A., Gabbasov Z.A., Popov E.G., Jakkola O., Solakivi T., Nikkari T., Smirnov V.N., Orekhov A.N. // Laboratory Investigations. 1992. V.67. P. 665-675; Tertov V.V., Orekhov A.N., Sobenin I.A., Gabbasov Z.A., Popov E.G., Yaroslavov A.A., Smirnov V.N. // Circulation Research. 1992. V.71. P.218-228
168. Tertov VV, Bittolo-Bon G, Sobenin IA, Cazzolato G, Orekhov AN and Avogaro P. Naturally occurring modified low density lipoproteins are similar if not identical: more electronegative and desialylated lipoprotein subfractions. // Exp Mol Pathol -1995. –V. 62(3). –P. 166-172.
169. Tertov VV, Kaplun VV, Sobenin IA, Orekhov AN. Low-density lipoprotein modification occurring in human plasma. Possible mechanism of in vivo

lipoprotein desialylation as a primary step of atherogenic modification. // Atherosclerosis –1998. –V.138. –P. 183-195.

170. Tertov VV, Orekhov AN, Martsenyuk ON, Perova NV and Smirnov VN. Low-density lipoproteins isolated from the blood of patients with coronary heart disease induce the accumulation of lipids in human aortic cells. // Exp Mol Pathol – 1989. –V.50(3). –P.337-347.
171. Tertov VV, Orekhov AN, Sobenin IA, Gabbasov ZA, Popov EG, Yaroslavov AA, Smirnov VN. Three types of naturally occurring modified lipoproteins induce intracellular lipid accumulation due to lipoprotein aggregation. Circ.Res.1992;71, 218-228.
172. Tertov VV, Orekhov AN, Sobenin IA, Morrisett JD, Gotto AM, Jr, Guevara JG, Jr. Carbohydrate content of protein and lipid components in sialic acid-rich and -poor low density lipoproteins from subjects with and without coronary artery disease. J Lipid Res. 1993; 34, 365-375.
173. Tertov VV, Sobenin IA, Gabbasov ZA, Popov EG, Jakkola O, Solakivi T, Nikkari T, Smirnov VN, Orekhov AN. Multiple-modified desialylated low-density lipoproteins that cause intracellular lipid accumulation. Isolation, fractionation and characterization. Laboratory Investigations. 1992; 67, 665-675.
174. Tertov VV, Sobenin IA, Gabbasov ZA, Popov EG, Orekhov AN. Lipoprotein aggregation as an essential condition of intracellular lipid caused by modified low density lipoproteins. Biochem Biophys Res Commun 1989;163, 489.
175. Tertov VV, Sobenin IA, Tonevitsky AG, Orekhov AN and Smirnov VN. Isolation of atherogenic modified (desialylated) low density lipoprotein from blood of atherosclerotic patients: separation from native lipoprotein by affinity chromatography. // Biochem Biophys Res Commun. –1990. –V.167(3). –P.1122-1127.
176. Tertov VV, VV Kaplun, and AN Orekhov In vivo oxidized low density lipoprotein: degree of lipoprotein oxidation does not correlate with its atherogenic properties. Mol Cell Biochem, Jun 1998; 183(1-2), 141-6.

177. Thornalley P.J., Langborg A., Minhas H.S. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the degradation of proteins by glucose. // Biochem. J. -1999. -V.344. -P.109-116.
178. Tirziu D, Dobrian A, Tasca C, Simionescu M, and Simionescu N, Intimal thickenings of human aorta contain modified reassembled lipoproteins. // Atherosclerosis -1995. -V.112. -P.101-114
179. Uchiyama M, Mishara M Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test // Analytical Biochemistry -1978. -V. 86. -P. 271-278
180. Vanderyse L, Devreese AM, Baert J, Vanloo B, Lins L, Ruysschaert JM and Rosseneu M. Structural and functional properties of apolipoprotein B in chemically modified low density lipoproteins. Atherosclerosis. 1992; 97, 187–199.
181. Vauhkonen M, Viitala J, Parkkinen J, Rauvala H. High-mannose structures of apolipoprotein-B from low density lipoproteins of human plasma. Eur J Biochem. 1985;15, 43-50.
182. Vedie B, Myara I, Pech MA, Maziere JC, Maziere C, Caprani A, Moatti N. Fractionation of charge-modified low density lipoproteins by fast protein liquid chromatography. J. Lipid Res., 1991; 32, 1359.
183. Venerando B, Fiorilli A, Croci GL, Tettamanti G. Presence in human erythrocyte membranes of a novel form of sialidase acting optimall at neutral pH. Blood. 1997; 90, 2047-2056.
184. Wang LJ, Lee TS, Lee FY, Pai RC and Chau LY. Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions. Am. J. Pathol.1998; 152, 711–720.
185. Warren L. The Thiobarbituric Acid Assay of Sialic Acids J. Biol. Chem. 1959; 234, 1971 - 1975
186. Willcox P, Renwick GC. Effect of neuraminidase on the chromatographic behavior of eleven acid hydrolases from human liver and plasma. Eur J Biochem. 1977; 73, 579-590.
187. Wissler RW, Vesselinovitch D, Getz GS. Abnormalities of arthererial wall and its metabolism in atherogenesis. Prog Cardiovasc Dis. 1976; 18, 341-352.

188. Xu XX and Tabas I. Sphingomyelinase enhances low density lipoprotein uptake and ability to induce cholestryler ester accumulation in macrophages. J. Biol. Chem., 1991; 266, 24849 - 24858.
189. Xu, X. X., and I. Tablas. Sphingomyelinase enhances low densitylipoprotein uptake and ability to induce cholesterol ester accumulation in macrophages. // J. Biol. Chem. –1991. –V. 266. –P.24849 –24858
190. Yagi K. Assay for blood plasma or serum. Methods Enzymol. 1984; 105, 328-31
191. Ylä-Herttuala S, Palinski W, Butler SW Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL. Arterioscl. Thrombosis. 1994; 14, 32-40.
192. Ylä-Herttuala S, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Glass CK, Sigal E and Steinberg D. Colocalization of 15-lipoxygenase mRNA and protein with epitopes of oxidized low density lipoprotein in macrophage-rich areas of atherosclerotic lesions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990; 87, 6959–6963.
193. Ylä-Herttuala S., Jaakkola O., Ehnholm C., Tikkanen M.J., Solakivi T., Nikkari T. // J. Lipid Res. -1988. –V. 29. -P. 563-572.
194. Zhang W-Y, Gaynor PM and Kruth HS. Aggregated low density lipoprotein induces and enters surface-connected compartments of human monocyte-macrophages. Uptake occurs independently of the low density lipoprotein receptor. // J. Biol. Chem.-1997 –V. 272. –P. 31700 – 31706.
195. Аничков НН. Частная патологическая анатомия. Сердце и сосуды // Второе издание. Москва-Ленинград, Медгиз, 1947.
196. Гриффит О, Джост П. Метод спиновых меток. Теория и применение Ред. Л. Берлиннер. М.: Мир, 1979. С. 489-569
197. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. Москва: Наука, 1989.
198. Зонтаг Г., Штренге К. Коагуляция и устойчивость дисперстных систем. Л., Химия, 1973. 451c.

199. Климов А. Н., Никульчева Н. Г. Липиды, липопротеиды и атеросклероз // Изд-во «Питер», Санкт-Петербург.1995.
200. Кузнецов А.Н. Метод спинового зонда. М.: Наука, 1976.
201. Курек НК, Лапшин ЕН, Добрецов ГЕ, Тур ИН, Афанасиади ЛШ. 4-[5-(фенилоксазолил-2)-1-пентадецил]пиридиний – флуоресцентный зонд для определения площади поверхности мембран и липопротеинов. Биологические мембранны, 1989; 6, 725-732.
202. Панасенко ОМ, Мельниченко АА, Аксенов ДВ, Вахрушева ТВ, Супрун ИВ, Янушевская ЕВ, Власик ТН, Собенин ИА, Орехов АН. Миелопероксидаза, модифицируя поверхность и снижая устойчивость к ассоциации липопротеинов низкой плотности крови человека, повышает их атерогенный потенциал. // Биол. мембранны. –2004. –Т.21. - С. 498-505.
203. Панасенко ОМ, Тертов ВВ, Мельниченко АА, Аксенов ДВ, Собенин ИА, Каплун ВВ, Супрун ИВ, Орехов АН. Связь размера дегликозилированных различными ферментами апоB-содержащих липопротеинов с их атерогенным потенциалом. // Биол. мембранны. –2006. –Т.23. - С. 43-52.
204. Панасенко ОМ, Борин МЛ, Азизова ОА, Арнольд К. Определение поверхностного заряда липопротеидов и его изменения при перекисном окислении липидов. Биофизика, 1985; 30, 822-827.
205. Панасенко ОМ, Вольнова (Вахрушева) ТВ, Азизова ОА, Владимиров ЮА. Биол. мембранны. 1988; 5, 1186–1191.
206. Смит Я, Бутлер К. Метод спиновых меток. Теория и применение Ред. Л. Берлиннер. М.: Мир, 1979. С. 444-488.
207. Тертов ВВ. Множественно-модифицированные липопротеиды низкой плотности, циркулирующие в крови человека // Ангиология и сосудистая хирургия –1999. –Т.5. - С. 218-236.
208. Томпсон Г. Р. Руководство по гиперлипидемии. Изд-во Gorenjski Tisk, Югославия.1992.

209. Янушевская ЕВ, Валентинова НВ, Медведева НВ, Морозкин АД, Власик ТН. Иммунохимическая гетерогенность липопротеинов низкой плотности человека. // Ангиология и сосудистая хирургия. –1999. –Т.5. - С. 241-255.



MoreBooks!
publishing



yes i want morebooks!

Покупайте Ваши книги быстро и без посредников он-лайн – в одном из самых быстрорастущих книжных он-лайн магазинов! окружающей среде благодаря технологии Печати-на-Заказ.

Покупайте Ваши книги на
www.more-books.ru

Buy your books fast and straightforward online - at one of world's fastest growing online book stores! Environmentally sound due to Print-on-Demand technologies.

Buy your books online at
www.get-morebooks.com



VDM Verlagsservicegesellschaft mbH

Heinrich-Böcking-Str. 6-8
D - 66121 Saarbrücken

Telefon: +49 681 3720 174
Telefax: +49 681 3720 1749

info@vdm-vsg.de
www.vdm-vsg.de

