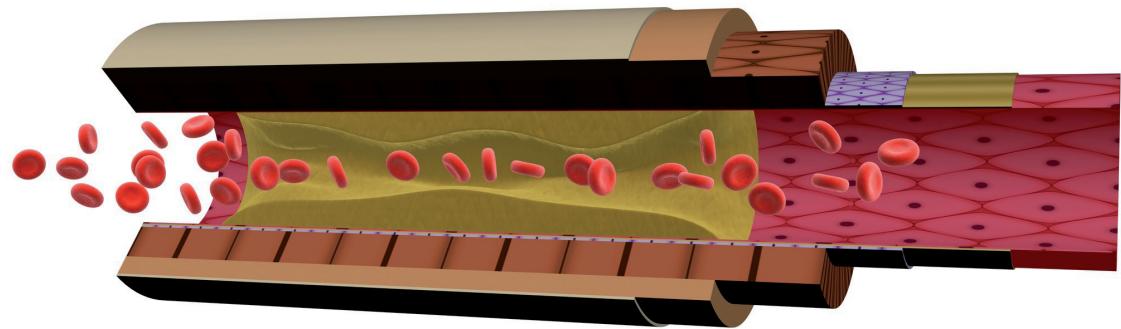


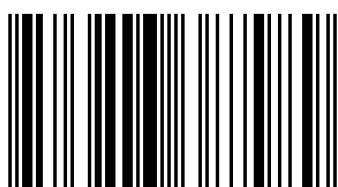
В крови людей была обнаружена подфракция липопротеидов низкой плотности (ЛНП), способная вызывать накопление липидов в клетках интимы аорты человека. Кроме того, эти ЛНП стимулируют клеточную пролиферацию и синтез компонентов соединительного тканного матрикса. Атерогенные ЛНП характеризуются многочисленными изменениями в углеводной, белковой и липидной составляющих и могут быть названы множественно-модифицированными ЛНП. Множественная модификация происходит в плазме крови человека. Модифицированные ЛНП теряют средство к ЛНП-рецептору, однако, приобретают способность взаимодействовать с рядом других мембранных рецепторов и компонентов. Нарушение клеточного метаболизма ЛНП в результате их атерогенной модификации является причиной внутриклеточного накопления липидов, что характерно для атеросклеротических клеток. Клеточный липоидоз может быть усилен формированием содержащих ЛНП крупных комплексов (агрегаты, иммунные комплексы, комплексы с компонентами матрикса), захватываемых клетками путем фагоцитоза. Таким образом, были открыты и изучены циркулирующие в крови человека множественно-модифицированные ЛНП, способные вызывать все проявления атеросклероза на клеточном уровне.

Модифицированные липопротеиды



Александр Николаевич Орехов

Профессор, доктор биологических наук организовал негосударственный Научно-исследовательский институт атеросклероза, директором которого в настоящее время является. Институт атеросклероза - резидент Инновационного центра Сколково. Деятельность Института связана с фундаментальными исследованиями и практическими разработками.



978-3-8433-8798-9

Орехов, Тертов, Собенин

Александр Николаевич Орехов
Владимир Викторович Тертов
Игорь Александрович Собенин

Модифицированные липопротеиды и атеросклероз

Обнаружение, характеристика, механизмы модификации, атерогенность

**Александр Николаевич Орехов
Владимир Викторович Тертов
Игорь Александрович Собенин**

Модифицированные липопротеиды и атеросклероз

**Александр Николаевич Орехов
Владимир Викторович Тертов
Игорь Александрович Собенин**

**Модифицированные
липопротеиды и атеросклероз**

**Обнаружение, характеристика,
механизмы модификации, атерогенность**

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: 978-3-8433-8798-9

Zugl. / Утвержд.: Москва, Кардиологический научный центр, 2001

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

Alle Rechte vorbehalten. / Все права защищены. Saarbrücken 2012

Оглавление

Введение	8
Глава 1. Материалы и методы исследования	11
1.1. Материалы исследований	11
1.1.1. Получение плазмы крови и липопротеидов	11
1.1.2. [³ H]- мечение сиаловой кислоты гликооконьюгатов, ганглиозидов, липопротеидов, белков и эритроцитов	12
1.1.3. Получение липопротеидов и белков, ковалентно–связанных с агарозой	13
1.1.4. Получение десиалированного фетуина и трансферина методом кислотного гидролиза	14
1.1.5. Получение сиалированных и десиалированных липопротеидов плазмы крови	14
1.1.6. Выделение транссиалидазы из липопротеиддефицитной плазмы крови методом афинной хроматографии	15
1.1.7. Клеточная культура	15
1.2. Методы исследований	16
1.2.1. Определение десиалирования ЛНП клетками ...	16
1.2.2. Модификация ЛНП в плазме крови	17
1.2.3. Анализ состава липопротеидов низкой плотности	17
1.2.4. Электрофоретические процедуры	21
1.2.5. Определение активности транс-сиалидазы с использованием в качестве субстрата [³ H]- меченного фетуина, трансферина, липопротеидов - ковалентно связанных с агарозой	23
1.2.6. Определение активности транс-сиалидазы с	

использованием в качестве субстрата ганглиозидов	24
1.2.7. Определение активности транс-сиалидазы с использованием в качестве субстрата биотинилированных гликоконьюгатов	24
1.2.8. Определение активности транс-сиалидазы при использовании в качестве донора сиаловой кислоты эритроцитов	25
1.2.9. Определение активности транс-сиалидазы при использовании эритроцитов в качестве акцептора сиаловой кислоты	26
1.2.10. Определение типа образуемой гликозидной связи	26
1.2.11. Определение концентрации белка	27
1.2.11. Статистическая обработка данных	28
Глава 2. Результаты исследования и их обсуждение	29
2.1. Обнаружение и выделение циркулирующих модифицированных ЛНП (цмЛНП)	29
2.1.1. Обнаружение циркулирующих атерогенных ЛНП	29
2.1.2. Разработка метода выделения цмЛНП	34
2.1.3. Определение уровня цмЛНП в крови человека ...	41
2.1.4. Обсуждение результатов	50
2.2. Влияние цмЛНП на пролиферативную активность и синтез компонентов соединительнотканного матрикса культивируемыми клетками интимы аорты человека	52
2.3. Сравнительная характеристика нативных ЛНП и цмЛНП	58
2.3.1. Химический состав	58

2.3.1.1. Углеводный состав	58
2.3.1.1.1. Углеводный состав белок-связанных гликоконъюгатов ЛНП	58
2.3.1.1.2. Углеводный состав липид-связанных гликоконъюгатов ЛНП	64
2.3.1.2. Липидный состав	67
2.3.1.3. Обсуждение результатов	69
2.3.2. Физические параметры	74
2.3.2.1. Размер частиц	74
2.3.2.2. Плотность	74
2.3.2.3. Заряд	76
2.3.2.4. Обсуждение результатов	78
2.3.3. Анализ аполипопротеида В	80
2.3.3.1. Свободные аминогруппы лизиновых остатков	80
2.3.3.2. Устойчивость к протеолизу	81
2.3.3.3. Обсуждение результатов	83
2.3.4. Степень окисленности и окисляемость липопротеидов	85
2.3.4.1. Содержание гидроперекисей и ТБК-реактивных продуктов в нативных ЛНП и цмЛНП	85
2.3.4.2. Разработка метода определения аддуктов липидов с апоВ -маркеров окисления ЛНП <i>in vivo</i>	87
2.3.4.3. Степень <i>in vivo</i> окисленности нативных ЛНП и цмЛНП	92
2.3.4.4. <i>In vitro</i> окисляемость нативных ЛНП и цмЛНП	94
2.3.4.5. Содержание жирорастворимых антиоксидантов в нативных ЛНП и цмЛНП	95
2.3.4.6. Взаимосвязь между уровнем антиоксидантов в ЛНП и их степенью <i>in vivo</i> окисленности и <i>in vitro</i>	

окисляемостью	99
2.3.4.7. Взаимосвязь между степенью окисленности ЛНП и их атерогенностью	101
2.3.4.7.1. Характеристика ЛНП, использованных в исследовании	101
2.3.4.7.2. Окисление ЛНП <i>in vitro</i> и их атерогенность	103
2.3.4.7.3. Взаимосвязь между атерогенностью и степенью окисления <i>in vivo</i>	109
2.3.4.8. Обсуждение результатов	111
2.3.5. Взаимосвязь между выраженностю различных модификаций ЛНП и атерогенностью липопротеидов	123
2.4. ЦмЛНП и другие модифицированные ЛНП, обнаруженные в плазме крови человека	124
2.4.1. Содержание сиаловой кислоты в электроотрицательных и аортальных ЛНП	124
2.4.2. Обсуждение результатов	129
2.4.3. Сравнение свойств обнаруженных <i>in vivo</i> модифицированных ЛНП	122
2.5. Множественная модификация ЛНП в плазме крови	132
2.5.1. Десиалирование ЛНП	137
2.5.1.1. Клетки	137
2.5.1.2. Плазма	138
2.5.1.3. «ЛНП-десиалирующая активность»	143
2.5.2. Изменение липидного состава	149
2.5.3. Изменение физических параметров	150
2.5.4. Перекисное окисление липидов и деградация апоВ	153
2.5.5. Появление атерогенного потенциала	159

2.5.6.	Обсуждение результатов	161
2.6.	Метаболизм цмЛНП в гладкомышечных клетках интимы аорты человека	169
2.6.1.	Захват ЛНП	169
2.6.2.	Взаимодействие ЛНП с компонентами клеточных мембран	172
2.6.3.	Интернализация ЛНП	181
2.6.4.	Внутриклеточная деградация аполипопротеида В	184
2.6.4.1.	Деградация ЛНП в клеточных гомогенатах	186
2.6.4.2.	Влияние ингибиторов протеиназ на деградацию ЛНП	189
2.6.5.	Метаболизм липидов липопротеидов	195
2.6.6.	Обсуждение результатов	197
2.7.	Механизмы усиления атерогенного потенциала цмЛНП	206
2.7.1.	Агрегация модифицированных ЛНП	206
2.7.2.	Образование циркулирующих иммунных комплексов	216
2.7.2.1.	ЛНП, входящие в состав циркулирующих иммунных комплексов	217
2.7.2.2.	Атерогенность иммунных комплексов	226
2.7.3.	Формирование комплексов ЛНП с компонентами соединительно-тканного матрикса	231
2.7.3.1.	Гликозаминогликаны	231
2.7.3.2.	Коллагеназа-резистентный дебрис	231
2.7.3.3.	Эластин	232
2.7.3.4.	Фибронектин, гепарин, коллаген	235
2.7.3.5.	Латекс	235
2.7.3.6.	Образование нерастворимых ЛНП-	

содержащих ассоциатов	240
2.7.4. Обсуждение результатов	245
Заключение	255
Выводы	257
Список литературы	260

Список используемых сокращений

ААПГ - 2,2-азобис-(2-аминопропан гидрохлорид)

АпоВ - аполипопротеин В-100

БСА - бычий сывороточный альбумин

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

ИФБ - изотонический фосфатный буфер

ЛВП - липопroteиды высокой плотности

ЛНП - липопroteиды низкой плотности

ЛОНП - липопroteиды очень низкой плотности

ЛПП - липопroteиды промежуточной плотности

МДА-ЛНП - ЛНП, модифицированные малоновым

диальдегидом

ПААГ - поликариламидный гель

РАБ - рецептор-ассоциированный белок

РКА₁₂₀- аглютинин *Ricinus communis*

ТБК - тиобарбитуровая кислота

ТХУ - трихлоруксусная кислота

ЦИК - циркулирующие иммунные комплексы

ЦИК-ЛНП - ЛНП, выделенные из циркулирующих иммунных комплексов

ЦмЛНП - циркулирующие модифицированные ЛНП

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

ЯМР - ядерный магнитный резонанс

Введение

Сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смертности и инвалидности людей в развитых индустриальных странах и России. Большинство сердечно-сосудистых заболеваний является следствием атеросклероза магистральных сосудов человека. Поэтому исследование механизмов развития атеросклероза является важнейшей задачей в борьбе с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Одним из наиболее ранних проявлений атеросклеротического поражения является вне- и внутриклеточное отложение липидов, преимущественно эфиров холестерина, в интиме сосудов [Аничков, 1947; Smith, 1974; Houst, 1978; Mahley, 1979; Fowler et al., 1979]. Образование наполненных липидными включениями пенистых клеток признается рядом авторов инициирующим моментом патогенеза атеросклероза [Alaupovic, 1971; Cookson, 1971; Simpson, 1977; Fowler et al., 1979; Gerrity, 1981; Aguel et al., 1984; Jurukova, 1989]. Однако, механизмы накопления внутриклеточных липидов изучены недостаточно. К началу данного исследования, т.е. в первой половине 80-х годов, было установлено, что источником липидов, накапливающихся в клетках сосудов являются липопротеиды низкой плотности (ЛНП), циркулирующие в крови человека [Bates et al., 1976; Ross, Harker, 1976; Wissler et al., 1976; Chen et al, 1977; StClair, Leight, 1978; Goldstein et al., 1979]. При этом, многочисленные попытки вызвать внутриклеточное накопление эфиров холестерина с помощью нативных ЛНП не увенчались успехом [Fogelman et al., 1981; Schechter et al., 1981; Van Lechten et al., 1983; Brown et al., 1983; Henriksen et al., 1983; Haberland et al., 1987, 1988]. С другой стороны, многочисленные химически

модифицированные в условиях *in vitro* ЛНП (ацетилированные, обработанные малоновым диальдегидом, окисленные ионами металлов переменной валентности и т.д.) вызывали отложения липидов в клетках, т.е. были атерогенны [Goldstein et al., 1979; Mahley et al., 1979; Fogelman et al., 1981; Steinberg et al., 1983; Henriksen et al., 1983; Haberland et al., 1982, 1987, 1988; Parthasarathy et al., 1985; Aviram et al., 1988]. В то же время, усиленный поиск в крови человека липопротеидов, сходных с *in vitro* модифицированными ЛНП, не дал результата. Таким образом, в начале настоящего исследования сложилась парадоксальная ситуация: 1) ЛНП являются источником липидов, накапливающихся в клетках сосудов; 2) нативные ЛНП не вызывают отложения внутриклеточного жира; 3) *in vitro* модифицированные ЛНП атерогенны, но их нет в кровотоке. Такая ситуация предполагала поиск *in vivo* модифицированных ЛНП, способных вызывать внутриклеточное накопление липидов.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось обнаружение и выделение циркулирующих атерогенных липопротеидов низкой плотности, изучение характера и механизмов атерогенной модификации, исследование липопротеид-опосредованного накопления липидов в гладкомышечных клетках интимы аорты человека.

В связи с этой целью необходимо было решить следующие основные задачи:

- обнаружить атерогенные модифицированные ЛНП в крови людей;
- разработать метод выделения циркулирующих модифицированных ЛНП (цмЛНП);

- изучить влияние цмЛНП на пролиферативную активность гладкомышечных клеток интимы аорты человека и на биосинтез клетками компонентов соединительнотканного матрикса;
- провести сравнительное изучение химического состава и физических характеристик нативных и цмЛНП;
- определить механизмы модификации ЛНП;
- изучить взаимодействие цмЛНП с рецепторами и другими компонентами плазматических мембран клеток;
- провести сравнительное изучение внутриклеточного метаболизма нативных и цмЛНП для выяснения механизмов внутриклеточного накопления липидов;
- определить пути увеличения атерогенного потенциала цмЛНП.

Глава 1. Материалы и методы исследований

1.1. Материалы исследований

1.1.1. Получение плазмы крови и липопротеидов

Кровь брали из локтевой вены донора с утра после двенадцатичасового голодания в пластиковую пробирку, содержащую 1% этилендиамидтетраацетат натрия (ЭДТА). Клетки крови отделяли двукратным центрифугированием по 15 минут при 2500 об/мин на центрифуге TJ-6 Beckman (Industrial Estate Mervue, Galuay, Ирландия).

Для выделения липопротеидов к полученной плазме добавляли твердую соль NaBr (до конечной концентрации 0,5 г/мл). 5 мл образцов засоленной плазмы помещали в 16x76-мм поликарбоновые центрифужные пробирки (Beckman Instruments, Palo Alto, CA), после чего насылаивали на них 5 мл раствора NaBr (1,019 г/мл). После ультрацентрифугирования в течение 2 часов при 41000 об/мин на роторе 65 Ti (Beckman) отбирали зоны флотировавших градиенте концентрации NaBr липопротеидов очень низкой, промежуточной и низкой плотности. Для очистки от примесных белков в образцы ЛНП повторно добавляли NaBr (до конечной концентрации 0,5 г/мл) и центрифугировали при тех же условиях. В образцы ЛОНП+ЛПП вносили NaBr (до конечной концентрации 0,5 г/мл). В центрифужные пробирки вносили по 5 мл препарата смеси липопротеидов и насылаивали 5 мл изотонического фосфатного буфера (ИФБ, 1,006 г/мл), после чего центрифугировали в течение 10 мин. (41000об/мин, ротор 65 Ti). Разделившиеся фракции ЛОНП и ЛПП отбирали. Полученные образцы липопротеидов (ЛОНП, ЛПП, ЛНП) диализовали при 4°C в течение ночи в темноте против 2000 объемов ИФБ, после чего стерилизовали путем фильтрации (диаметр пор 0,45 мкм).

Для выделения ЛВП к оставшейся после первого ультрацентрифугирования плазме добавляли NaBr (до конечной концентрации 0,5 г/мл). В центрифужные пробирки вносили по 5 мл плазмы и насыщали 5 мл раствора NaBr (1,063 г/мл). Пробы подвергали ультрацентрифугированию в течение 18 часов (41000 об/мин, ротор 65 Ti). ЛВП и липопротеид-дефицитную плазму диализовали при 4°C в течение ночи против 2000 объемов ИФБ (плазму диализовали с двойной сменой буфера), после чего стерилизовали фильтрацией (диаметр пор 0,45 мкм).

1.1.2. $[^3\text{H}]$ -мечение сиаловой кислоты гликоконъюгатов, ганглиозидов, липопротеидов, белков и эритроцитов

К 250 мкл раствора гликоконъюгатов, ганглиозидов, белков, липопротеидов (2мг/мл), или 250 мкл суспензии эритроцитов, добавляли равный объем 0,2 М ацетатного буфера с 0,3 М NaCl (рН 5,5) – для углеводов и ганглиозидов, 0,1 М ацетатного буфера (рН 4,0) – для липопротеидов, или ИФБ – для эритроцитов. В реакционную смесь на ледяной бане при 0°C вносили 50 мкл свежеприготовленного водного раствора 10 mM NaIO₄. Смесь инкубировали 10 минут при постоянном перемешивании. Окисление останавливали добавлением 50 мкл глицерина, после чего пробы инкубировали 10 минут при тех же условиях. Смесь диализовали против 2000 объемов ИФБ (рН 7,0) при 4°C с двойной сменой буфера в течение ночи. Для очистки препарата эритроцитов использовали 5-кратное центрифугирование в ИФБ (10 мин, 3000 об/мин)

В раствор, содержащий окисленные субстраты, при комнатной температуре вносили 10 мкл NaB[³H]₄ в 0.1 N NaOH

(1мКи). Пробы инкубировали 30 минут при 20°С при постоянном перемешивании. Затем в инкубационную смесь вносили 10 мкл 0,1 М немеченого NaBH₄ и инкубировали 30 минут при тех же условиях. Все препараты (кроме эритроцитов) диализовали в течение 48 часов против 2000 объёмов ИФБ (рН 7,0) с четырьмя сменами буфера. Полученные меченные гликоконъюгаты, ганглиозиды, белки и липопротеиды стерилизовали фильтрацией (диаметр пор 45мкм). Препараты эритроцитов промывали 5-кратным центрифугированием (10 минут, 3000 об/мин).

1.1.3. Получение липопротеидов и белков, ковалентно-связанных с агарозой

300 мкг сухой бром-цианактивированной агарозе (Sephadex G-25, Sigma) суспендировали в 15 мл 1 мМ HCl (рН 4,5) и инкубировали 1 час при постоянном перемешивании для набухания. Гель центрифугировали 10 мин при 4500 об/мин, супернатант отбирали и осадок промывали 15 мл 1 мМ HCl, после чего гель центрифугировали при тех же условиях. Осадок промывали 15 мл 0,2 М карбонатно-бикарбонатного буфера (рН 8,5), затем центрифугировали при тех же условиях. К промытой активированной агарозе добавляли растворы липопротеидов/стрептоглобина/фетуина или трансферина (1-2 мг). Пробы инкубировали 2 часа при комнатной температуре при постоянном перемешивании. После инкубации суспензию центрифугировали 10 мин при 4500 об/мин. Для блокировки непрореагировавших CN-групп к осадку прибавляли 15 мл 20 мМ глицинового буфера (рН 8.5) и смесь инкубировали 1 час при постоянном перемешивании. Полученный гель промывали по 5 раз попаременно 20 мл 0,2 М ацетатного (рН 4.5) и 0,2 М

карбонатно-бикарбонатного (рН 8,5) буферов. К осажденному гелю прибавляли 2 мл 50 mM Tris-HCl (рН 7,0) и хранили при 4⁰С.

1.1.4. Получение десиалированного фетуина и трансферина методом кислотного гидролиза

К 1-5 мг белка прибавляли 1 мл 0,1 N серной кислоты. Смесь нагревали на водяной бане (80⁰С) в течение 1 часа. По окончании инкубации рН раствора белка нейтрализовали 0,1 NaOH; пробы диализовали против воды в течение ночи с несколькими сменами буфера и стерилизовали фильтрацией (диаметр пор 0,45 мкм).

1.1.5. Получение сиалированных и десиалированных липопротеидов плазмы крови

ЛОНП, ЛПП, ЛНП и ЛВП разделяли на сиалированные и десиалированные фракции методом лектин-хроматографии на *Ricinus communis* агглютинин (RCA₁₂₀) агарозе. На колонку, содержащую 1 мл сорбента, наносили 0,5 мл раствора липопротеидов (1 мг/мл). Эллюят повторно наносили на колонку; после его прохождения вносили 3 мл ИФБ. Полученную фракцию сиалированных липопротеидов отбирали, после чего сорбент промывали 6 мл ИФБ. Десиалированные липопротеиды, связавшиеся с сорбентом, эллюировали 3 мл 50 mM раствора галактозы в ИФБ. К полученным фракциям сиалированных и десиалированных липопротеидов вносили NaBr до 0,5 мг/мл, после чего образцы подвергали ультрацентрифугированию (2 часа, 41000 об/мин), как описано выше. Полученные концентрированные препараты липопротеидов диализовали в течение ночи против 2000 объемов ИФБ.

1.1.6. Выделение транссиалидазы из липопротеиддефицитной плазмы крови методом афинной хроматографии

0,7 мл липопротеиддефицитной плазмы наносили на колонку, содержащую 2 мл сепарозы с ковалентно-связанной с ней поли-сиаловой кислотой (Neu5Ac α 2-8Neu5Ac-Sepharose FF6; Syntesome GmbH, Munich, Germany; сорбент был любезно предоставлен Н.В. Бовиным, Институт Биоорганической Химии, Москва), предварительно промытой 30 мл 50ММ Tris-HCl (рН 7,0). После прохождения плазмы колонку промывали 15 мл 50 ММ Tris-HCl (рН 7,0). Связавшийся фермент элюировали 5 мл 5 ММ раствора сиаловой кислоты. Полученный раствор фермента дialisовали против 1000 объёмов 10 ММ Tris-HCl в течение суток с тройной сменой буфера. Далее фермент концентрировали методом мембранный ультрафильтрации (Amicon systems, USA, 1000 MW cut off). Все описанные выше процедуры проводились при 4°С.

Полученный препарат фермента разделяли на аликовты (200 мкл, концентрация белка 50-200 мкг/мл) и хранили при – 70°С.

1.1.7. Клеточная культура

Гладкомышечные клетки выделяли из непораженной интимы аорты человека, обрабатывая ткань 0,1% раствором коллагеназы IV типа (Sigma). Для оценки накопления липидов, гладкомышечные клетки инкубировали 24 часа при 37°С в среде 199 (GIBCO Europe, Paisley, UK), содержащей 10% липопротеиддефицитной сыворотки и ЛНП (100 мкг апоВ/мл). Контрольные клетки инкубировали в среде, не содержащей

ЛНП. Белок клеток и липопротеидов определяли по методу Лоури.

Для получения макрофагов человека моноцитарного происхождения использовали свежеполученную кровь, которую подвергали центрифугированию (3000 об/мин, 10 мин) для осаждения клеточных компонентов. Осадок клеток супензировали в равном объеме ИФБ. Суспензию насыщали в пробирки, содержащие фикол (2 объема суспензии на 1 объем фикола), после чего центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин. Клетки белой крови, флотировавшие к границе раздела фаз, отбирали и промывали с помощью трехкратного центрифугирования в ИФБ (3000 об/мин, 10 мин). В дальнейшем клетки культивировали 14 дней при 37°C в среде 199, содержащей 5% фетальной телячьей сыворотки.

Первичные культуры гепатоцитов человека были любезно предоставлены В.А. Косыхом (Институт экспериментальной кардиологии, РКНПК, Москва). Клетки эндотелия пупочной вены культивировали в условиях, аналогичных описанным для гладкомышечных клеток человека. Для экспериментов использовали клетки после 3-5 пассажа .

1.2. Методы исследований

1.2.1. Определение десиалирования ЛНП клетками

Липопротеиды низкой плотности (200 мкг/мл) инкубировали вместе с клетками или клеточными гомогенатами в течение 24 ч при 37°C. После окончания инкубации ЛНП выделяли с помощью ультрацентрифугирования, после чего в них определяли уровень сиаловой кислоты.

1.2.2. Модификация ЛНП в плазме крови

4 мл свежеполученной липопротеиддефицитной плазмы инкубировали с 0,5 мг/мл аутологичных сиалированных ЛНП в присутствии 2 mM CaCl₂ при 37°C. Инкубацию проводили в темноте, при постоянном перемешивании. По окончании инкубации ЛНП выделяли из инкубационной смеси с помощью ультрацентрифугирования. Рецентрированные липопротеиды диялизовали ночь против 2000 объемов ИФБ, после чего стерилизовали фильтрацией.

1.2.3. Анализ состава липопротеидов низкой плотности

Содержание сиаловой кислоты определяли колориметрически. 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 M NaIO₄ в 9 M H₃PO₄, к контрольным – 10 мкл 9 M H₃PO₄. Смесь перемешивали и выдерживали 20 мин при комнатной температуре. К опытным образцам прибавляли 100 мкл 10% NaAsO₂ в 0,5 M Na₂SO₄ и 0,1 н H₂SO₄, к контрольным – 100 мкл 0,5 M Na₂SO₄, образцы тщательно перемешивали до исчезновения жёлто-коричневого окрашивания. Сразу после этого к пробам добавляли 250 мкл 0,6% раствор тиобарбитуровой кислоты в 0,5 M Na₂SO₄, перемешивали. Смесь инкубировали на кипящей водяной бане в течение 15 мин. В охлажденные пробы прибавляли 400 мкл трет-бутилола. 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 флуоресценцию (λ поглощения – 544 нм, λ испускания – 584 нм) на приборе Fluoroskan II (Labsystems, Финляндия).

Для определения уровня нейтральных сахаров к 100 мкл раствора ЛНП вносили ТХУ до концентрации 10%, после чего центрифугировали (4000 об/мин, 10 мин). Осажденные липопротеиды делипидировали в 1 мл смеси этанол-диэтиловый эфир (3:1, объем/объем). Липидный экстракт высушивали, после чего растворяли в 100 мкл изопропанола. Образцы, содержащие делипидированный апобелок (или липидный экстракт) гидролизовали в 250 мкл 5% ТХУ 1 час на кипящей водяной бане. По окончании гидролиза к пробам вносили 250 мкл 5% ТХУ и 1мл хлороформа. После тщательного перемешивания, из водной фазы отбирали аликвоты по 250 мкл. В качестве стандарта использовали 50 мкг D-маннозы. Далее ко всем пробам добавляли по 65 мкл 10% водного раствора фенола, а также 625мкл концентрированной H_2SO_4 , после чего тщательно перемешивали и оставляли на 20 минут при 20°C для развития цветного окрашивания. Оптическую плотность измеряли при λ 490 нм на спектрофотометре Multiskan Bichromatic (Labsystems OY, Helsinki, Финляндия) .

Количество десиалированных липопротеидов в суммарных фракциях ЛНП определяли методом лектин-хроматографии на *Ricinus communis* агглютинин (RCA₁₂₀) агарозе, как описано выше.

Для проведения экстракции липидов, к 100-500 мкл раствора ЛНП добавляли 2 мл изопропанола. После перемешивания и инкубации при 4°C в течение 20 минут осажденные липопротеиды отделяли центрифугированием (4000 об/мин, 10 мин); к осадку добавляли 2 мл смеси хлороформ – метанол (1:2, объем/объем) и инкубировали 2 часа при 20°C. После центрифугирования (4000 об/мин, 10 мин), супернатант отбирали, а к осадку добавляли еще 2 мл хлороформ-метанола и экстракцию повторяли. Экстракты объединяли, после чего в пробу вносили 2 мл H₂O и тщательно перемешивали. Органическую фазу, содержащую липиды, отбирали и высушивали.

Нейтральные липиды разделяли с помощью тонкослойной хроматографии, с последовательным использованием двух систем растворителей: хлороформ-ацетон (9 : 1, объем/объем) и н-гексан – диэтиловый эфир – уксусная кислота (90:10:1, объем/объем).

Количественный анализ липидов проводили методом сканирующей денситометрии при λ 560 нм на двуволновом ТСХ – сканере CS-930 (Schimadzu, Tokyo, Japan).

Содержание фосфолипидов определяли колориметрически по методу Васьковского. Для этого к сухим липидным экстрактам добавляли 100 мкл 72% HClO₄, после чего пробы гидролизовали при 180-200°C 20 минут. К гидролизатам вносили 450 мкл раствора, содержащего 0,25 N H₂SO₄ и 5,5% раствор реактива Васьковского (4 N HCl, NH₂-NH₂-HCl, молибдат Na), после чего инкубировали 15 минут на кипящей водяной бане. Интенсивность окрашивания определяли при λ 815 нм на спектрофотометре UO-2000

(Yanaco, USA), в качестве стандарта использовали 50 мкг лецитина.

Для оценки внутриклеточного содержания холестерина, клеточный монослой подвергали тройной экстракции липидов в системе гексан-изопропанол (3:2, объем/объем), 30 минут. Липидные экстракты переносили в пластиковые 96-луночные плашки для измерения флюoresценции (Fluoroplate Labsystems, Финляндия), после чего высушивали под током воздуха. В качестве стандарта использовали 2 мкг холестерина. К сухим экстрактам вносили 100 мкл раствора FeCl_3 (0,5% в ледяной уксусной кислоте). После этого в пробы добавляли 100 мкл концентрированной H_2SO_4 ; после тщательного перемешивания пробы оставляли на 1 час при 20°C. Уровень флюoresценции измеряли (λ поглощения – 544 нм, λ испускания – 584 нм) на приборе Fluoroskan II (Labsystems, Финляндия).

Интенсивность флюoresценции ЛНП (360/430 нм) определяли на спектрофотометре Hitachi F-4010 (Hitachi, Tokyo, Japan).

Для определения уровня тиобарбитуровая кислота (ТБК) реактивных продуктов, 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 малонового диальдегида. Далее из проб отбирали 200 мкл и переносили в пластиковую 96-луночную плашку для измерения флюoresценции (Fluoroplate Labsystems, Финляндия). Уровень флюoresценции определяли на приборе Fluoroskan II (λ поглощения – 544 нм, λ испускания – 584 нм) (Labsystems, Финляндия).

Содержание перекисей в липидах ЛНП оценивали с использованием иодометрического метода. К исследуемым образцам ЛНП (25 мкл, 0,2 мг/мл) добавляли 250 мкл реагента (CHOD-iodide, Merck, Germany). Реакционную смесь инкубировали 1 час при 37°C. Оптическую плотность определяли при λ 365 нм на спектрофотометре Multiskan Bichromatic (Labsystems OY, Helsinki, Финляндия).

Уровень конъюгированных диенов определяли по величине оптического поглощения при λ 234 нм на спектрофотометре UO-2000 (Yanaco, USA).

1.2.4. Электрофоретические процедуры

Для определения продуктов протеолитической деградации ЛНП разделяли на полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA), с использованием буферной системы Laemmli. Концентрирующий гель – 4% полиакриламид в 0,125 М Трис-HCl, pH 6,8, 0,1% додецилсульфат натрия. Разделяющий гель – 12,6% 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°C. При проведении электрофореза поддерживалось напряжение 60 вольт, после вхождения белков в разделяющий гель напряжение поднимали до 120 вольт. После окончания электрофореза, белки с геля были перенесены путем диффузии на нитроцеллюлозную пленку (24 часа). Далее нитроцеллюлозную пленку промывали 1,5% БСА, после чего

обрабатывали анти-апоВ антителами козы в 50мМ Трис-HCl, 200мМ NaCl, 1,5% БСА. После 5-кратной промывки по 5 минут на пленку наносили конъюгат антитела кролика против козы – пероксидаза в 50мМ Трис-HCl, 200мМ NaCl, 1,5% БСА, инкубация 1 час при 20°С. После 3-х кратной промывки по 3 минуты, на пленку наносили проявитель: 10мМ Трис-HCl, pH 7,4, раствор 3 мг/мл 2-бром(хлор)-нафтола в метаноле, 0,3% H₂O₂. Инкубацию проводили до появления устойчивого окрашивания.

Для оценки размеров липопротеидных частиц использовали неденатурирующий электрофорез в градиентном полиакриламидном геле. В отличие от описанного выше электрофореза в полиакриламидном геле, с использованием буферной системы Laemmly, в данном случае при приготовлении буферов не использовали додецилсульфат натрия, а также образцы не подвергались предварительному кипячению. В остальном методика была аналогична описанной выше. Величину пробега ЛНП от линии старта определяли после окрашивания геля с Coomassie Blue R-250 методом сканирующей денситометрии при 600 нм на двуволновом ТСХ – сканере CS-930 (Schimadzu, Tokyo, Japan). Размер ЛНП рассчитывали согласно колибровочной кривой для стандартов с известными диаметрами, с использованием графической программы SigmaPlot, версия 4.01.

Суммарный поверхностный заряд частиц ЛНП определяли с помощью электрофореза в агарозном геле. Агарозный гель – 1% агароза в 40 мМ вероналовом буфере, pH 8,5 (40 мМ 5,5-диэтибарбитуровая кислота, 4 мМ ЭДТА). Буфер для электрофореза – 10 мМ Трис-глицин, pH 8,0. Исследуемые образцы белка (5 мкг) растворяли в 10 мМ Трис-глициновом

буфере, pH 8,0, содержащем 10% глицерин. При проведении электрофореза напряжение 150 Вольт, 300 Вольт/час.

Молекулярный вес и гомогенность транссиалидазы, выделенной из крови человека, определяли с использованием электрофореза в поликариламидном геле с додецилсульфатом натрия, с использованием буферной системы Laemmliy, как описано выше. Величину пробега от линии старта определяли после окрашивания геля с Coomassie Blue R-250 методом сканирующей денситометрии при 560 нм на двуволновом TCX – сканере CS-930 (Schimadzu, Tokyo, Japan). Молекулярный вес транссиалидазы рассчитывали согласно колибровочной кривой для стандартов с известными молекулярными массами (low molecular weight calibration Kit, Pharmacia AB, Sweden), с использованием графической программы SigmaPlot, версия 4.01.

1.2.5. Определение активности транс-сиалидазы с использованием в качестве субстрата [³H]-меченного фетуина, трансферина, липопротеидов - ковалентно связанных с агарозой

5-25 мкг фермента, 10 мкл супензии [³H]-меченного субстрата, связанного с агарозой (донор сиаловой кислоты) 0,5 мг/мл акцептора сиаловой кислоты (десиалированный фетуин), 10 мкл 20 мМ раствора CaCl₂ (конечная концентрация 2 мМ), 5 мкл 20 мМ дитиотриэтола (ДТТ) (конечная концентрация 1 мМ). Объем реакционной смеси доводили до 100 мкл 50мМ Tris-HCl (pH 7,0). Инкубацию проводили при 37⁰C, в темноте, при постоянном перемешивании. По истечении времени инкубации к реакционной смеси добавляли 300 мкл воды и центрифугировали 10 мин при 4500 об/мин. После этого отбирали 200 мкл супернатанта и переносили его в флаconы

для жидкостно-сцинтилляционного счета, содержащие 5 мл сцинтилляционной жидкости (ЖС-8, Реахим, Украина) и измеряли уровень радиоактивности на жидкостно-сцинтилляционном счетчике 1215 Rack-Beta (LKB, Швеция).

1.2.6. Определение активности транс-сиалидазы с использованием в качестве субстрата ганглиозидов

Реакционная смесь содержала 3,6 нмоль [³H]-меченных ганглиозидов, 0,5 мг/мл десиалированного фетуина, 50 мМ Tris-HCl (рН 7,0), 1мМ ДТТ, 2мМ CaCl₂ и 10 мкг транс-сиалидазы плазмы крови человека. Инкубацию проводили в течение 18 часов при 37⁰С. Инкубацию останавливали, добавляя 1 мл 10% ТХУ. Реакционную смесь центрифугировали в течение 10 минут при 10000 об/мин. Осадок делипидировали, последовательно обрабатывая 2 мл изопропанола, хлороформ-метанола (1:1, объём/объём) и диэтилового эфира. Делипидированный осадок растворяли в 0,1 Н NaOH и определяли радиоактивность, как описано выше.

1.2.7. Определение активности транс-сиалидазы с использованием в качестве субстрата биотинилированных гликоконьюгатов

К 20 мкл суспензии стрептovidин-сефарозы прибавляли 10 мкл раствора [³H]-меченных по сиаловой кислоте гликоконьюгатов, связанных с полиакриламидом (ПАА). Смесь инкубировали в течение 40 минут при 37⁰С при постоянном перемешивании. После инкубации к реакционной смеси добавляли 2 мл 50 мМ Tris-HCl (рН 7,0) и центрифугировали 10 мин, 4500 об/мин. Супернатант сливали, к осадку добавляли 2

мл 50 мМ Tris-HCl (рН 7,0) и вновь центрифугировали. Процедуру повторяли три раза.

20 мкл супензии стрептovidин-сефарозы со связанным с ней меченым олигосахаридом (донор сиаловой кислоты), 10 мкг фермента, 0,5 мг/мл десиалированного фетуина (акцептор сиаловой кислоты), 10 мкл 20 мМ раствора CaCl₂ (конечная концентрация 2 мМ), 5 мкл 20 мМ дитиотреитола (ДТТ) (конечная концентрация 1 мМ); объем доводили до 100 мкл 50 мМ Tris-HCl (рН 7,0). Инкубацию проводили при 37⁰С при постоянном перемешивании. По истечении времени инкубации к реакционной смеси добавляли по 300 мкл воды и центрифугировали 10 мин при 4500 об/мин. После этого отбирали 200 мкл супернатанта и переносили во флаконы для жидкостно-сцинтилляционного счета, содержащие 5 мл сцинтилляционной жидкости (ЖС-8), после чего измеряли уровень радиоактивности, как описано выше.

1.2.8. Определение активности транс-сиалидазы при использовании в качестве донора сиаловой кислоты эритроцитов

Реакционная смесь содержала 100 мкл супензии [³H]-меченых эритроцитов, 0,5 мг/мл десиалированного фетуина и 20 мкг фермента. Инкубацию проводили при постоянном перемешивании в течение 2 часов при 37⁰С. После инкубации объем реакционной смеси доводили ИФБ до 500 мкл. Смесь центрифугировали в течении 10 мин при 3000 об/мин. После этого отбирали 200 мкл супернатанта измеряли в нем уровень радиоактивности, как описано выше.

1.2.9. Определение активности транс-сиалидазы при использовании эритроцитов в качестве акцептора сиаловой кислоты

Предварительно, эритроциты промывали ИФБ. Суспензию центрифугировали в течение 10 минут при 3000 об/мин. Супернатант отбрасывали. Процедуру повторяли 3 раза. Половину суспензии эритроцитов в течение 2 часов при 37 °C обрабатывали бактериальной нейраминидазой (0,2 мг/мл). После инкубации десиалированные эритроциты трижды промывали ИФБ (как описано выше).

Реакционная смесь (суммарный объем 100мкл) содержала 50 мкл суспензии эритроцитов (нативных или десиалированных), 20 мкг фермента и 30 мкг [³H]-меченного по сиаловой кислоте фетуина. Инкубацию проводили в течение 18 часов при 37 °C. После инкубации эритроциты промывали 3 мл ИФБ. Суспензию центрифугировали в течение 10 минут при 3000 об/мин. Процедуру повторяли 4 раза. Далее эритроциты разрушали добавлением 3 мл воды и тени эритроцитов центрифугировали 10 минут при 4000 об/мин. Процедуру повторяли 4 раза. Осадок растворяли в 200 мкл 0,1 Н NaOH и определяли радиоактивность, как описано ранее.

1.2.10. Определение типа образуемой гликозидной связи

В 96-луночную плашку (Nunc, Roskilde, Дания) наносили по 100 мкл раствора лактозы, ковалентно-связанной с полиакриламидом, в ИФБ (10мкг/мл, pH 7,2). Инкубацию проводили в течение 18 часов при 37 °C. Лунки 4 раза промывали 200 мкл ИФБ. После промывки в лунки вносили по 100 мкл 2% раствора БСА(бычий сывороточный альбумин) в ИФБ. Инкубацию проводили в течении 1 часа при 20 °C. Лунки

промывали ИФБ, содержащим 0,2% БСА (ИФБ/БСА) и вносили по 50 мкл фетуина (100 мкг/мл) и 50 мкл транс-сиалидазы (68 мкг/мл). Инкубацию проводили в течение 4 часов при 37 °C. Плашку промывали и наносили по 100 мкл биотин-меченных лектинов (10 мкг/мл), выделенных из семян *Maackia amurensis* (Маакия амурская) (МАЛ) или из *Elderberry* (*Sambucus nigra*) bark (бузина) (БЛ). Инкубацию проводили в течение 1 часа. После инкубации плашку промывали ИФБ/БСА. В плашку вносили по 100 мкл стрептоглобулин-пероксидазы. Инкубацию проводили в течение 1 часа при 37 °C. Плашку промывали 4 раза ИФБ/БСА. В лунки добавляли по 100 мкл субстрата (0,1 мг/мл, раствор ортофенилендиамина в цитрате натрия (рН 4,5) с 0,03% H₂O₂). Инкубацию проводили в течение 30 минут при 37 °C. Для остановки реакции в лунки добавляли по 20 мкл 50% серной кислоты. Оптическую плотность измеряли при λ 492 нм на спектрофотометре Multiskan Bichromatic (Labsystems OY, Helsinki, Финляндия).

1.2.11. Определение концентрации белка

Определение белка производили по методу Лоури. В 96-луночную плашку (Costar) вносили по 10 мкл раствора БСА (1 мг/мл), в качестве стандарта, и по 5-10 мкл исследуемых образцов. Во все лунки добавляли по 200 мкл раствора С (100 объемов 2% раствора Na₂CO₃ в 0,1 н NaOH, 1 объем 0,5% раствора CuSO₄ и 1 объем 1% раствор K-Na тартрата). Во все лунки вносили по 10 мкл 1M реактива Фолина, реакционную смесь интенсивно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Оптическую плотность измеряли при длине волны 690 нм на

спектрофотометре Multiskan Bichromatic (Labsystems OY, Helsinki, Финляндия).

1.2.11. Статистическая обработка данных

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

Глава 2. Результаты исследования и их обсуждение

2.1. Обнаружение и выделение циркулирующих атерогенных десиалированных ЛНП

2.1.1. Обнаружение циркулирующих атерогенных ЛНП.

В задачу этого раздела работы входили обнаружение атерогенных модифицированных ЛНП в крови человека и разработка методических подходов для их выделения и измерения. Мы предположили, что модифицированные ЛНП, способные вызвать накопление липидов в клетках сосудистой стенки, следует искать прежде всего в крови пациентов, сосуды которых уже подверглись атеросклеротическому поражению. Для подтверждения этого предположения мы выделили фракции суммарных липопротеидов низкой плотности из плазмы крови практически здоровых лиц и пациентов с ангиографически документированным атеросклерозом. Для оценки способности выделенных ЛНП вызывать внутриклеточное отложение липидов была использована первичная культура гладкомышечных клеток интимы аорты человека, т.е. тех клеток, которые накапливают жир при атеросклерозе. Метод выделения и культивирования гладкомышечных клеток интимы аорты был ранее разработан в нашей лаборатории [Ogakhov et al., 1985].

Семидневные культуры гладкомышечных клеток непораженной интимы аорты человека инкубировали 24 часа в среде 199, содержащей 10% липопротеид-дефицитной сыворотки здорового донора и ЛНП в концентрации 5-500 мкг аполипопротеида В (апоВ)/мл (рис.1).

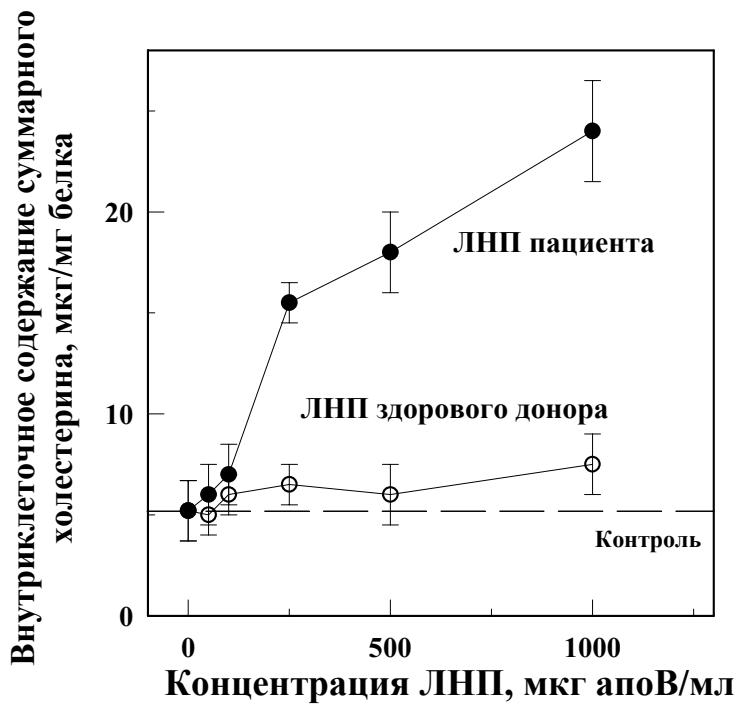


Рис. 1. Влияние ЛНП, выделенных из плазмы крови здоровых лиц и пациентов с коронарным атеросклерозом, на содержание суммарного холестерина в клетках, культивируемых из непораженной интимы аорты человека. Клетки инкубировали в среде 199, содержащей 10% липопротеид-дефицитной сыворотки и ЛНП, в течение 24 часов при 37°C. Контрольные клетки инкубировали в отсутствии ЛНП. Данные представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$.

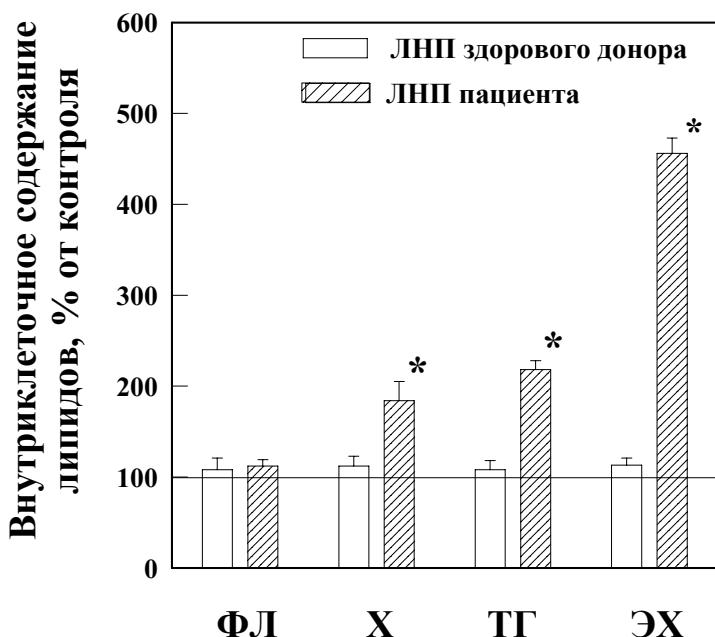


Рис. 2. Влияние суммарной фракции ЛНП, выделенных из крови здоровых лиц и пациентов с коронарным атеросклерозом, на содержание основных классов липидов в клетках, культивируемых из непораженной интимы аорты человека. ФЛ - фосфолипиды, Х - свободный холестерин, ТГ - триглицериды, ЭХ - эфиры холестерина. Данные представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p<0,05$.

В проведенных экспериментах было обнаружено, что суммарные ЛНП крови здоровых лиц в большинстве случаев ни в одной из использованных концентраций не вызывали внутриклеточного отложения суммарного холестерина. Напротив, большинство препаратов суммарных ЛНП, выделенных из плазмы крови пациентов с коронарным атеросклерозом, в концентрации 20-100 мкг/мл вызывали 2-5-кратное увеличение содержания суммарного холестерина. Дальнейшее увеличение концентрации ЛНП не приводило к увеличению внутриклеточного уровня липидов.

При изучении влияния ЛНП на основные классы липидов было показано, что ЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом вызывают 1,5-2-кратное увеличение уровня свободного холестерина и триглицеридов, а также 1,5-5-кратное накопление этерифицированного холестерина в культивируемых клетках (рис. 2). Содержание фосфолипидов при этом оставалось неизмененным. ЛНП здоровых лиц не вызывали достоверных изменений внутриклеточного содержания основных классов липидов.

Таким образом, мы обнаружили, что суммарные ЛНП большинства пациентов с коронарным атеросклерозом, но не здоровых лиц, способны вызывать накопление липидов в клетках сосудов человека. Это свойство ЛНП было названо атерогенностью.

Обнаружив атерогенные липопротеиды в крови пациентов, мы попытались выяснить, чем они отличаются от липопротеидов здоровых лиц.

Таблица 1. Содержание апоВ, липидов и сиаловой кислоты в суммарной фракции ЛНП здоровых лиц и пациентов с коронарным атеросклерозом

Компонент	Содержание, мкг/мг ЛНП	
	ЛНП здоровых лиц	ЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом
АпоВ	221±12	225±17
Свободный холестерин	109±5	112±6
Эфиры холестерина	415±21	394±30
Триглицериды	81±3	74±4
Фосфолипиды	189±13	175±11
Сиаловая кислота	4,3±0,3	2,1±0,2*

Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение.

* достоверное отличие от ЛНП здоровых лиц, $p<0,05$.

При определении химического состава суммарных препаратов ЛНП здоровых лиц и пациентов мы не обнаружили различий в содержании апобелка, а также фосфолипидов, триглицеридов, свободного и этерифицированного холестерина (таблица 1). С другой стороны, было показано, что общее содержание сиаловой кислоты (*N*-ацетилнейраминовой кислоты) в ЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом в 2-3 раза меньше, чем в ЛНП здоровых лиц. ЛНП с низким уровнем сиаловой кислоты были первоначально названы десиализованными липопротеидами. Мы решили использовать это свойство липопротеидов для разработки метода их выделения из суммарной фракции ЛНП.

2.1.2. Разработка метода выделения цмЛНП

Известно, что аполипопротеин В (апо В) ЛНП имеет два типа полисахаридных цепей, связанных *N*-гликозидной связью: олигоманнозидные и сиалированные биантенные [Vauhkonen et al., 1985; Taniguchi et al., 1989]. При этом сиаловая кислота содержится в цепях второго типа, где она является терминальным сахаром. Входящие в состав ЛНП гликосфинголипиды также содержат терминальную сиаловую кислоту [Fontaine, Malmendier, 1975]. Так как следующим за сиаловой кислотой остатком сахара в сиалированных биантенных цепях является галактоза, то десиалирование ЛНП должно экспрессировать галактозу. На основании этого мы предположили, что десиализованные ЛНП могут взаимодействовать с галактозоспецифичными лектинами. Одним из таких лектинов является агглютинин *Ricinus communis* (РКА₁₂₀), имеющий высокое сродство к терминальной бетагалактозе и низкое сродство к другим сахарным остаткам,

входящим в состав полисахаридных цепей ЛНП [Baezinger, Fiete, 1979]. В этой работе мы попытались с помощью аффинной хроматографии на РКА₁₂₀, иммобилизованном на сефарозе, выделить десорбированные липопротеиды и изучить их влияние на аккумуляцию липидов в клетках непораженной интимы аорты человека.

При нанесении ЛНП на колонку с РКА₁₂₀-сефарозой некоторая часть липопротеидов связывалась с сорбентом и не смывалась изотоническим фосфатным буфером, содержащим 0,5 М NaCl или 2% бычий сывороточный альбумин. Промывание колонки растворами галактозы приводило к элюированию связавшихся липопротеидов, причем при увеличении концентрации галактозы количество элюируемых ЛНП возрастало (рис. 3).

При использовании 25 мМ галактозы происходила полная элюция связавшихся липопротеидов с колонки. Другие сахара, входящие в состав ЛНП: сиаловая кислота, D-манноза, D-глюкоза, L-фукоза, N-ацетилглюказамин, - не обладали способностью элюировать сорбированные ЛНП (рис. 3). Эти данные свидетельствуют о том, что специфическим сайтом связывающихся на РКА₁₂₀-сефарозе ЛНП являются остатки галактозы.

На рисунке 4 приведен профиль элюции линейным градиентом галактозы ЛНП, полученных от здоровых лиц и больных ИБС. Можно видеть, что в препаратах ЛНП, полученных от больных, количество связывающихся ЛНП выше. Доля связывающихся ЛНП, выделенных из крови больных, составляла в трех исследованных случаях в среднем $28 \pm 7\%$ (вариации от 12% до 38%).

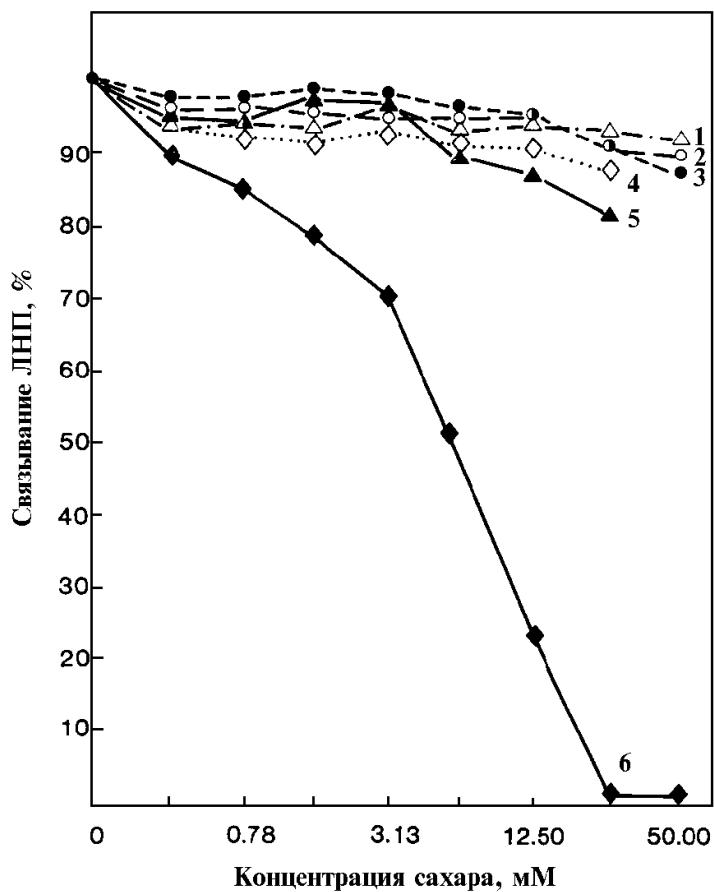


Рис. 3. Вытеснение ЛНП, связывающих РКА₁₂₀-сефарозой, галактозой (1), маннозой (2), глюкозой (3), N-ацетилглюкозамином (4), фукозой (5), сиаловой кислотой (6).

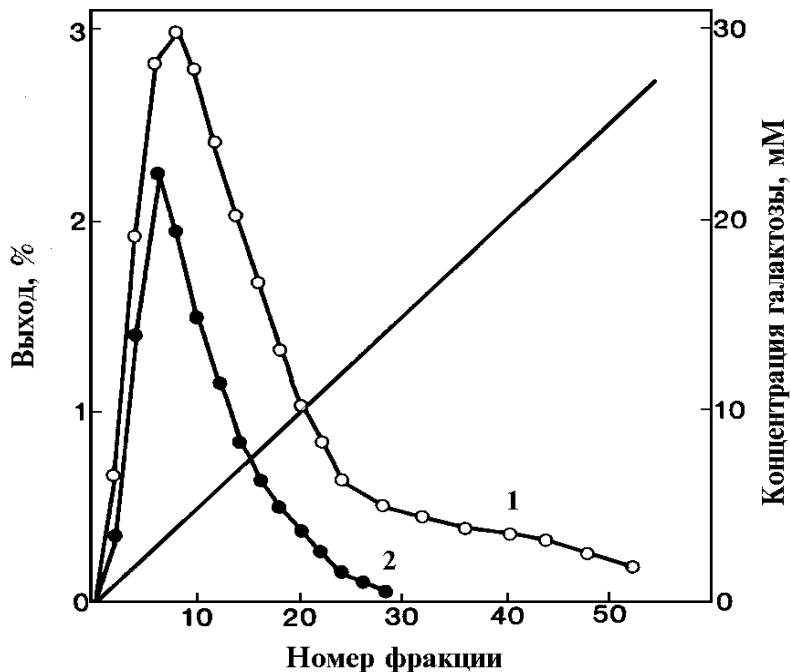


Рис. 4. Профиль элюции ЛНП здоровых лиц (2) и ЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом (1) линейным градиентом галактозы.

При этом в препаратах имелась подфракция ЛНП, элюирующихся с колонки только высокими (20-50 мМ) концентрациями галактозы (рис. 4). Доля связывающихся с РКА₁₂₀-сефарозой ЛНП, полученных от здоровых лиц, обычно не превышала 10%. В экспериментах были использованы также нативные липопротеиды здоровых лиц, десалированные *in*

vitro с помощью нейраминидазы. Около 90% ЛНП, десиалированных *in vitro*, связывалось сорбентом.

Как следует из данных, приведенных в таблице 2, содержание сиаловой кислоты в суммарном препарате ЛНП от здоровых лиц составило 24,5 мкг/мг белка. Липопротеиды, выделенные из крови здоровых лиц и не связывающиеся с РКА₁₂₀-сефарозой, имели такое же содержание сиаловой кислоты, как и исходные липопротеиды. Связывающиеся ЛНП из крови здоровых лиц имели в два раза более низкий уровень сиаловой кислоты. В то же время, суммарный препарат ЛНП, полученных от больных ИБС, содержал почти в 2 раза меньше сиаловой кислоты по сравнению с ЛНП здоровых лиц. Связывающиеся с РКА₁₂₀-сефарозой ЛНП, полученные от больных, имели в 1,8 раза более низкое содержание, тогда как несвязывающиеся в 1,3 раза более высокое содержание сиаловой кислоты по сравнению с суммарной фракцией. Содержание сиаловой кислоты в ЛНП, обработанных нейраминидазой, снижалось в 2,5 раза. Приведенные данные свидетельствуют о том, что с помощью РКА₁₂₀-сефарозы можно выделить из суммарного препарата липопротеидов человека подфракцию десиалированных ЛНП, и что появление лектин-доступной галактозы происходит, по-видимому, в результате утери сиаловой кислоты.

Внесение в культуральную среду суммарного препарата ЛНП, полученного от здоровых лиц, а также не связывающейся на сорбенте подфракции ЛНП, полученной от здоровых лиц, не вызывало изменения содержания холестерина в клетках непораженной интимы аорты человека (таблица 2). Напротив, связывающиеся десиалированные ЛНП из крови здоровых лиц вызывали накопление внутриклеточного холестерина.

Препараты ЛНП здоровых лиц, обработанные нейраминидазой, вызывали 3,5-кратное увеличение содержания клеточного холестерина. Такое же возрастание уровня холестерина наблюдалось при культивировании клеток с подфракцией связавшихся на РКА₁₂₀-сефарозе липопротеидов, десиалированных *in vitro*.

Суммарный препарат ЛНП больных ИБС увеличивал в 2,5 раза уровень холестерина в клетках (таблица 2). Подфракция связывающих ЛНП оказывала еще более выраженный (4-х-кратный) эффект. Не связывающиеся сорбентом ЛНП больных ИБС не вызывали увеличения содержания внутриклеточного холестерина.

В таблице 2 приведены данные, полученные при изучении препаратов ЛНП, выделенных из одного пула крови здоровых лиц (10 человек) и одного пула крови больных ИБС (10 человек). Сходные результаты были получены нами при изучении препаратов ЛНП, выделенных еще из 2-х пулов крови здоровых лиц и 3-х пулов крови пациентов. В исследованных препаратах ЛНП содержание сиаловой кислоты отрицательно коррелировало с их способностью накапливать внутриклеточный холестерин ($r=-0,85$, $n=21$, $p<0,05$).

Таким образом, только подфракция десиалированных ЛНП человека является атерогенной. В дальнейшем мы будем называть эти липопротеиды циркулирующими модифицированными ЛНП (цмЛНП). Сиалированные ЛНП атерогенными свойствами не обладают и могут рассматриваться как нативные немодифицированные ЛНП.

Таблица 2. Влияние подфракций ЛНП на накопление общего холестерина в клетках, культивируемых из непораженной интимы аорты человека

Фракция ЛНП	Доля от суммарных ЛНП, %	Содержание сиаловой кислоты, мкг/мг белка	Внутриклеточное накопление холестерина, % над контролем
Здоровые лица			
Суммарные	100	24,5	12±7
Связавшиеся	8	12,8	74±7*
Несвязавшиеся	92	26,9	8±8
Пациенты с коронарным атеросклерозом			
Суммарные	100	14,7	154±17*
Связавшиеся	38	8,4	302±28*
Несвязавшиеся	62	19,0	9±5
Нейраминидаза-обработанные ЛНП			
Суммарные	100	9,6	254±18*
Связавшиеся	89	9,8	249±22*

Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение.

*, достоверное отличие от контроля, $p<0,05$.

2.1.3. Определение уровня цмЛНП в крови человека

Для определения уровня цмЛНП в плазме крови человека мы разработали твердофазный лектин-иммуноферментный метод, основанный на связывании модифицированных липопротеидов с РКА₁₂₀, иммобилизованным в лунках планшет, с последующим их выявлением с помощью пероксидазамеченых анти-апоВ поликлональных антител.

На рисунке 5 приведены данные по подбору оптимальных концентраций РКА₁₂₀ для покрытия лунок. Можно видеть, что в диапазоне концентраций 30-50 мкг/мл количество связываемых обработанных нейраминидазой (десиалированных) ЛНП одинаково. Поэтому в дальнейших экспериментах была использована концентрация 30 мкг/мл.

Для определения оптимальной концентрации антител против апоВ были использованы 5 разведений. Как следует из рисунка 6, количество измеряемого апоВ не изменялось в интервале концентраций 5-20 мкг/мл. Концентрация антител 10 мкг/мл была выбрана для использования в последующих экспериментах.

На рисунке 7 приведена типичная кривая титрования обработанных нейраминидазой ЛНП, полученная с использованием оптимального количества связывающего лектина и анти-апоВ антител.

На рисунке 8 приведены концентрационные кривые для обработанных нейраминидазой ЛНП и цмЛНП, выделенных из крови пациентов с помощью лектин-хроматографии. Можно видеть, что концентрационные кривые как для *in vivo*, так и для *in vitro* десиалированных липопротеидов практически совпадают. Из приведенных данных следует, что десиалированные липопротеиды могут быть измерены в интервале концентраций

20-800 нг/мл. При этом, выделенные с помощью лектин-хроматографии нативные ЛНП практически не связываются с РКА₁₂₀ вплоть до концентраций 1 мг/мл.

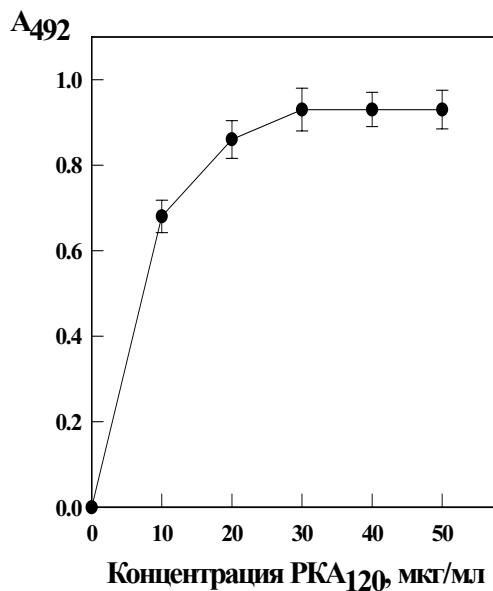


Рис. 5. Концентрационная зависимость для покрывающего раствора РКА₁₂₀.

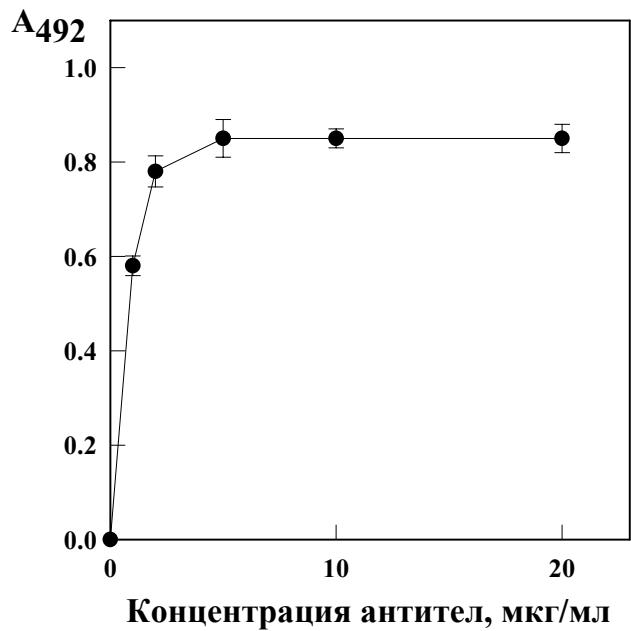


Рис. 6. Концентрационная зависимость для анти-апоВ поликлональных антител.

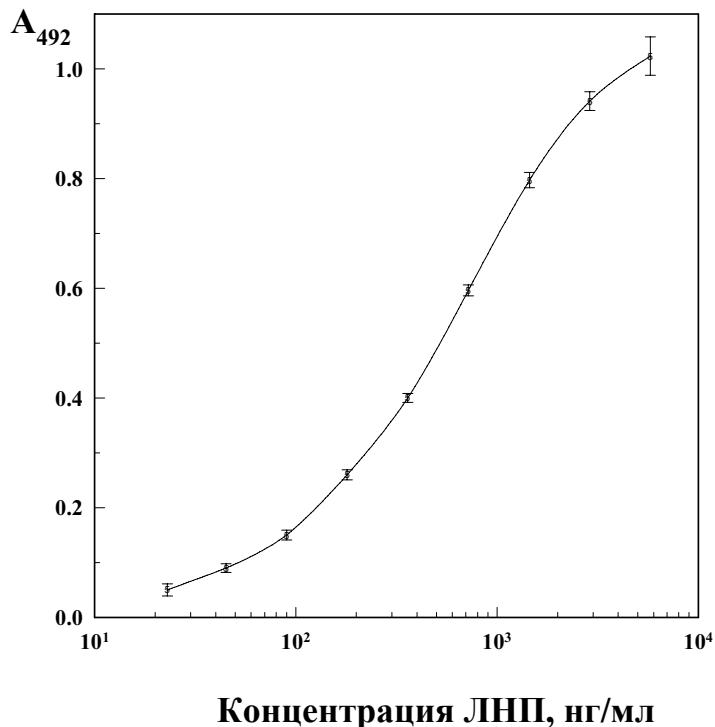


Рис. 7. Калибровочная кривая для ЛНП, обработанных нейраминидазой.

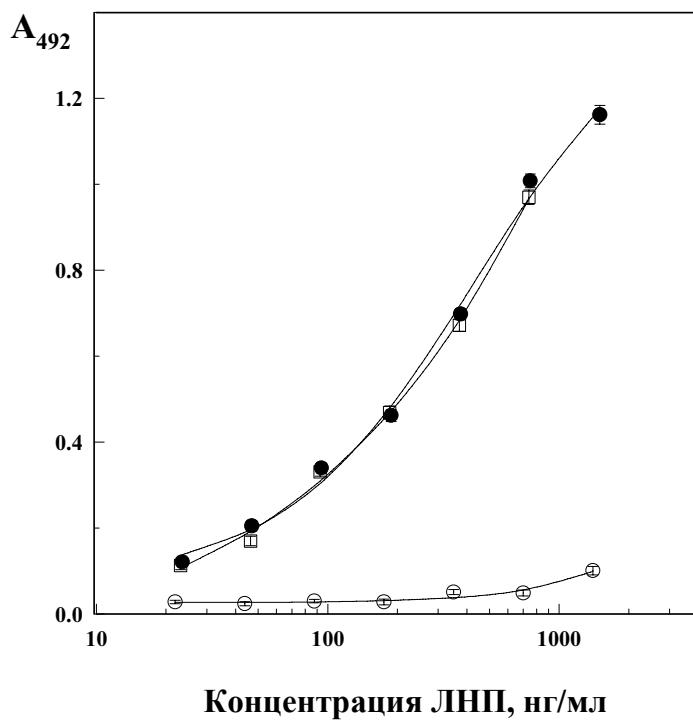


Рис. 8. Калибровочные кривые для нативных ЛНП (о), цмЛНП (●) и ЛНП, обработанных нейраминидазой ().

Для определения специфичности метода образцы десиалированных ЛНП были обработаны галактозидазой, как описано Nagai et al. [1989]. Эта процедура удаляла более 95% галактозы липопротеидов. При этом обработанные

галактозидазой ЛНП не связывались с иммобилизованным лектином и, соответственно, не выявлялись антителами.

На рисунке 9 приведены кривые титрования сыворотки крови здорового донора и пациента с коронарным атеросклерозом, а также в препаратах ЛНП, полученных из той же крови. Совпадение кривых позволяет сделать заключение, что в интервале концентраций 20-200 нг/мл другие компоненты сыворотки не влияют на определение десиалированных ЛНП.

На рисунке 10 приведена корреляционная зависимость между концентрацией цмЛНП в сыворотках здоровых лиц и пациентов, а также в препаратах ЛНП, выделенных из крови тех же доноров. Коэффициент корреляции составил 0,90 ($p<0,001$).

На рисунке 11 дана корреляционная зависимость между содержанием десиалированных ЛНП, определенных разработанным методом, и уровнем апоВ в препаратах десиалированных ЛНП, полученных с помощью колоночной лектин-хроматографии на РКА₁₂₀. Можно видеть что наблюдается тесная корреляция между содержанием десиалированных ЛНП, определенных двумя методами (коэффициент корреляции 0,96, $p<0,005$). Чувствительность метода составляет 5 нг цмЛНП на мл пробы.

Измерение уровня цмЛНП в крови 30-ти здоровых доноров показало, что их содержание варьирует от 12 до 105 мкг/мл (1,4-19,7% от общего уровня апоВ в сыворотке). Средняя концентрация составила 49 ± 10 мкг/мл ($7,1\pm1,7\%$ от уровня апоВ). Уровень цмЛНП в крови 30-ти пациентов с коронарным атеросклерозом составлял от 173 мкг/мл (14,0% от уровня апоВ в сыворотке) до 774 мкг/мл (56,5%) (в среднем 402 ± 54 мкг/мл или $35,9\pm4,3\%$). Различие средних уровней содержания

десиалированных ЛНП в крови здоровых лиц и пациентов было статистически значимым ($p<0,05$).

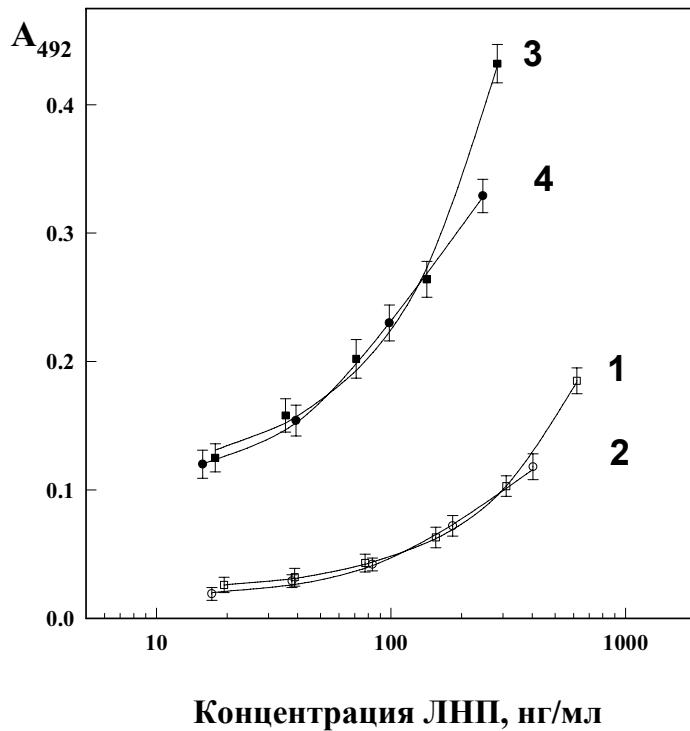


Рис. 9. Определение цмЛНП здоровых лиц (1, 2) и пациентов с коронарным атеросклерозом (3, 4) в цельной сыворотке (1, 4) и выделенных препаратах суммарных ЛНП (2, 3).

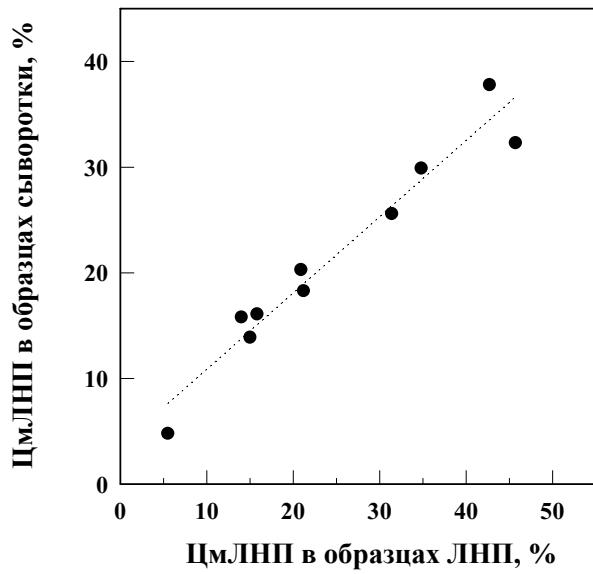


Рис. 10. Корреляция между количеством цмЛНП, определенном в цельной сыворотке, и количеством цмЛНП, измеренном в выделенном препарате суммарных липопротеидов.

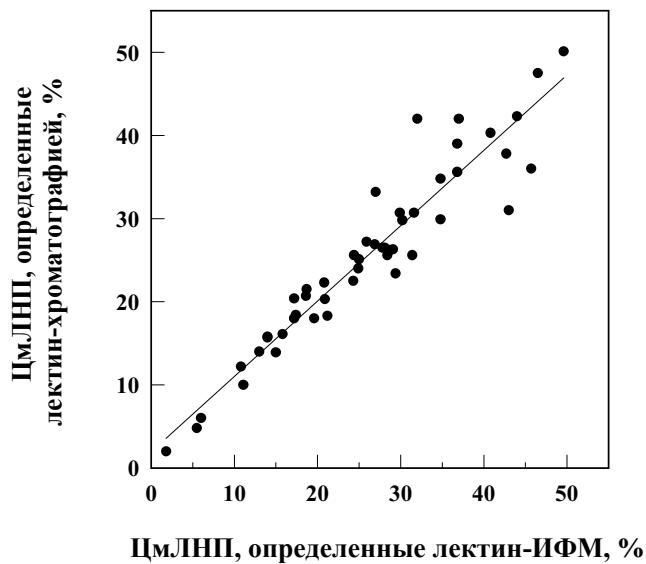


Рис. 11. Корреляция между уровнями цмЛНП, определенными твердофазным лектин-иммуноферментным методом (лектина-ИФМ) и с помощью колоночной хроматографии.

2.1.4. Обсуждение результатов

Таким образом, в настоящей работе показано, что подфракция цмЛНП, выделенных из крови больных ИБС, обладает способностью вызывать накопление холестерина в культивируемых клетках интимы аорты человека. По всей видимости, цмЛНП определяют атерогенные свойства всей фракции ЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом. В ЛНП здоровых лиц также имеются десиалированные липопротеиды, однако, они вызывают аккумуляцию внутриклеточного холестерина в меньшей степени по сравнению с десиализованными ЛНП из крови больных. Возможно, это связано с меньшей степенью десиалирования, что следует из того факта, что связывающиеся ЛНП здоровых лиц элюируются с колонки более низкими концентрациями галактозы. Суммарные препараты ЛНП здоровых лиц не обладают способностью увеличивать содержание внутриклеточного холестерина. Можно предположить, что это обусловлено более низкой степенью десиалирования и более низким содержанием десиалированных липопротеидов в суммарной фракции ЛНП.

Разработанный твердофазный лектин-иммуноферментный метод определения цмЛНП обладает высокой чувствительностью и воспроизводимостью. Сравнение результатов измерений, проведенных с помощью колоночной лектин-хроматографии и этим методом, выявило их тесную корреляцию. Таким образом, описываемый метод позволяет точно и надежно измерять концентрацию цмЛНП без предварительного выделения фракции липопротеидов.

АпоВ в сыворотке крови людей содержится, помимо ЛНП, еще в двух классах липопротеидов: очень низкой и промежуточной плотности (ЛОНП и ЛПП). Однако, содержание

апоВ в ЛОНП и ЛПП нормолипидемиков составляет от содержания апоВ в ЛНП 0,5%-1% и 1%-4%, соответственно. Более того, доля десиалированных липопротеидов во фракциях ЛОНП и ЛПП не превышает обычно 3%. Таким образом, при измерении десиалированного апоВ в сыворотках крови лиц без нарушения липидного обмена определяется практически лишь апоВ ЛНП. Предварительное субфракционирование липопротеидов для определения концентрации десиалированных частиц может оказаться необходимым только в случае гиперлипидемии. Разработанный нами метод определения уровня цмЛНП позволит оценить не только патогенетическую роль модифицированных липопротеидов в атерогенезе, но и изучить диагностическое и прогностическое значение этого фактора в оценке риска атеросклероза.

2.2. Влияние цмЛНП на пролиферативную активность и синтез компонентов матрикса соединительной ткани культивируемыми клетками интимы аорты человека

В настоящее время общепринято, что помимо накопления липидов характерными проявлениями атеросклероза на клеточном уровне являются повышенная пролиферация и усиленный синтез компонентов соединительнотканного матрикса гладкомышечными клетками интимального слоя сосудов. Мы решили проверить, как влияют цмЛНП на пролиферативную активность, а также на синтез секретируемого белка, коллагена и гликозаминогликанов клетками, культивируемыми из непораженной интимы аорты человека.

Для изучения влияния нативных и модифицированных ЛНП гладкомышечные клетки интимы аорты человека преинкубировали в течение 24 часов с липопротеидами, после чего клетки отмывали и к ним добавляли среду, содержащую меченный тимидин. Пролиферативную активность оценивали по включению меченого тимидина в кислотонерастворимую фракцию клеток. Преинкубация клеток, культивируемых из непораженной интимы аорты человека, с цмЛНП, полученных из крови пациентов с коронарным атеросклерозом, приводила к 2-5-кратному накоплению внутриклеточного холестерина (таблица 3). Напротив, нативные ЛНП не вызывали изменения содержания холестерина в клетках.

Включение ^3H -тимицина в ДНК клеток, инкубированных с цмЛНП, было в 1,5-3 раза выше, чем в контроле. Клетки, преинкубированные с нативными ЛНП, включали меченный тимицин лишь на 20-30% эффективнее по сравнению с контрольными клетками. Таким образом, цмЛНП стимулируют

пролиферативную активность культивируемых гладкомышечных клеток интимы аорты человека.

Для проверки влияния накопления внутриклеточных липидов на пролиферативную активность мы использовали также ЛНП-содержащие комплексы с природными и искусственными компонентами (таблица 4). Мы обнаружили, что комплексы ЛНП с гепарином-фибронектином-желатиной, коллагеназа-резистентным дебрисом аорты человека, декстрансульфатом, шариками латекса вызывали 2-4-кратное накопление суммарного холестерина в клетках, культивируемых из непораженной интимы аорты человека. При этом наблюдалось увеличение включения меченого тимицина в кислотонерастворимую фракцию клеток. Отдельные компоненты в отсутствии ЛНП не влияли ни на накопление холестерина, ни на включение меченого тимицина. Более того, растворимые комплексы ЛНП с гепарином, хондроитинсульфатом, гиалуроновой кислотой также не влияли на исследуемые параметры. Мы обнаружили прямую и очень тесную корреляцию между накоплением в клетках суммарного холестерина, вызванным цМЛНП и ЛНП-содержащими комплексами, и их пролиферативной активностью (коэффициенты корреляции - 0,80 и 0,92, соответственно). Следовательно, накопление внутриклеточного холестерина сопровождается усилением пролиферативной активности клеток.

Таблица 3. Влияние нативных ЛНП и цмЛНП на содержание суммарного холестерина и включение ^{3}H -тимидина в гладкомышечные клетки, культивируемые из непораженной интимы аорты человека

Аорта	ЛНП	Внутриклеточное содержание холестерина, мкг/мг белка	Включение ^{3}H -тимидина, распады/мин/мкг белка
1	Контроль	60±5	131±14
	Нативные ЛНП	67±8	140±7
	ЦмЛНП	189±15*	230±21*
2	Контроль	41±5	93±7
	Нативные ЛНП	43±4	103±8
	ЦмЛНП	254±12*	308±25*
3	Контроль	41±4	122±13
	Нативные ЛНП	47±2	134±10
	ЦмЛНП	87±6*	187±13*
4	Контроль	25±2	67±4
	Нативные ЛНП	30±2	77±3
	ЦмЛНП	75±3*	241±12*
5	Контроль	29±2	88±4
	Нативные ЛНП	33±2	96±6
	ЦмЛНП	61±2*	197±11*

Гладкомышечные клетки непораженной интимы преинкубировали 24 часа в присутствии 100 мкг/мл нативных ЛНП или цмЛНП. Клетки промывали и инкубировали еще 24 часа в среде, содержащей 1 мкКи/мл ^{3}H -тимидина. Включение меченого тимидина определяли, как описано в Материалах и Методах. Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p<0,05$.

Таблица 4. Влияние ЛНП-содержащих комплексов на содержание холестерина и включение ^{3}H -тимидина в клетки, культивируемые из непораженной интимы аорты человека

Добавки	Содержание холестерина, % от контроля	Включение ^{3}H -тимидина, % от контроля
ЛНП, 100 мкг/мл	105±8	98±7
Дебрис	120±14	100±9
ЛНП-Дебрис	221±17*	158±11*
Эластин	111±13	108±8
ЛНП-Эластин	204±15*	148±7
Фибронектин	97±6	105±5
Желатина	102±12	108±11
ЛНП-Гепарин-	414±45*	230±20*
Фибронектин-		
Желатина		
Латекс, 10 ⁹ /мл	95±7	98±11
ЛНП-Латекс	527±43*	215±17*
Декстрансульфат	118±13	107±8
ЛНП-	185±14*	170±16*
Декстрансульфат		
ЛНП-Гепарин	105±12	94±8
ЛНП-Гиалуроновая кислота	109±7	96±10
ЛНП-	117±13	85±15
Хондроитинсульфат		

Концентрация всех компонентов - 100 мкг/мл. Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p<0,05$.

Таблица 5. Влияние нативных ЛНП и цмЛНП на синтез компонентов соединительнотканного матрикса клетками, культивируемыми из непораженной интимы аорты человека

Подфракция ЛНП	Включение меченого предшественника, % от контроля		
	^{14}C -лейцин	^{14}C -пролин	^{14}C -глюкозамин
Нативные ЛНП	115±8	123±12	115±9
ЦмЛНП	215±16*	204±17*	187±14*

Концентрация ЛНП - 100 мкг/мл. Включение меченых предшественников определяли как, описано в Материалах и Методах. Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p<0,05$.

Нативные ЛНП не влияли на синтез секретируемого клетками белка, который оценивали по включению ^{14}C -лейцина в кислотонерастворимую фракцию инкубационной среды. ЦмЛНП стимулировали в 1,5-3 раза синтез секретируемого белка культивируемыми клетками. Более того, модифицированные ЛНП вызывали 2-кратное увеличение синтеза коллагена клетками, определяемого по включению ^{14}C -пролина в высвобождаемую коллагеназой фракцию инкубационной среды. Было продемонстрировано также, что цмЛНП, но не нативные ЛНП, оказывали стимулирующее воздействие на включение ^{14}C -глюкозамина в суммарную

фракцию гликозаминогликанов гладкомышечных клеток интимы аорты человека. Следовательно, в отличие от нативных ЛНП, цмЛНП способны ускорять синтез компонентов соединительнотканного матрикса.

В исследовании по выяснению механизмов усиления пролиферативной и синтетической активности клеток под действием модифицированных ЛНП были установлены следующие экспериментальные факты: 1) для стимуляции включения меченых тимицина и предшественников компонентов матрикса достаточно преинкубации клеток с модифицированными ЛНП, вызывающей отложение внутриклеточных липидов; 2) комплексы нативных ЛНП с природными (коллаген, эластин, фибронектин) и искусственными (частицы латекса, декстран сульфат) компонентами вызывают накопление липидов в клетках и возрастание пролиферативной и синтетической активности; 3) степень увеличения пролиферативной и синтетической активности коррелирует с количеством накопленных липидов. Таким образом, опосредованное липопротеидами накопление внутриклеточных липидов является, по видимому, причиной усиления пролиферативной активности и синтеза компонентов соединительнотканного матрикса. С другой стороны, нативные ЛНП и, возможно, модифицированные ЛНП могут оказывать влияние на внутриклеточный метаболизм через receptor опосредованные механизмы (Бошков и др. 1994).

2.3. Сравнительная характеристика нативных ЛНП и цмЛНП

Обнаружив подфракцию атерогенных цмЛНП в крови пациентов и разработав метод их выделения, мы приступили к сравнительному изучению липопротеидов, а также свойств и механизмов, определяющих их атерогенность. На первом этапе были исследованы химические и физические характеристики липопротеидных частиц.

2.3.1. Химический состав

Химический анализ липопротеидных частиц мы начали с определения углеводного состава апоВ- и липид-связанных гликоконъюгатов нативных ЛНП и цмЛНП здоровых лиц и пациентов с коронарным атеросклерозом.

2.3.1.1. Углеводный состав

2.3.1.1.1. Углеводный состав белок-связанных гликоконъюгатов ЛНП

Для анализа содержания моносахаридов были использованы препараты ЛНП, полученные от 8 здоровых лиц и 8 пациентов с коронарным атеросклерозом, а также липопротеиды, выделенные из пулированной плазмы 10 здоровых лиц и 10 пациентов. Как следует из данных, приведенных в таблице 6, в состав гликоконъюгатов апоВ индивидуальных суммарных препаратов ЛНП здоровых лиц входят N-ацетил-глюкозамин, галактоза, манноза и сиаловая кислота в молярном соотношении, примерно, 2:1:2,5:1. Сходные данные по содержанию моносахаридов были получены и для суммарного препарата ЛНП, выделенного из пулированной плазмы здоровых лиц (таблица 6). Содержание глюкозамина, галактозы и маннозы в белок-связанных гликоконъюгатах суммарных

препаратах ЛНП пациентов было таким же, как и у здоровых лиц. С другой стороны, уровень белок-связанной сиаловой кислоты в ЛНП пациентов был в среднем в 1,6 раза ниже, чем в липопротеидах здоровых лиц (таблица 6). Содержание сиаловой кислоты в пулированных ЛНП соответствовало среднему значению этого показателя для индивидуальных препаратов.

Уровень сиаловой кислоты в цмЛНП здоровых лиц был на 15-30% ниже, чем в нативных ЛНП (таблица 7). Содержание сиаловой кислоты в апоB нативных ЛНП пациентов было примерно таким же, что и в нативных липопротеидах здоровых лиц (таблица 7). Количество сиаловой кислоты в белок-связанных гликоконъюгатах цмЛНП было в 2-3 раза ниже, чем в нативных липопротеидах.

Содержание белок-связанных нейтральных сахаров в нативных ЛНП и цмЛНП здоровых лиц было одинаковым (таблица 7). Уровень N-ацетил-глюкозамина в апоB нативных ЛНП и цмЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом был одинаков и не отличался от уровня этого моносахарида в подфракциях липопротеидов здоровых лиц. Количество галактозы и маннозы в белок-связанных гликоконъюгатах пулированных нативных ЛНП и цмЛНП, а также в двух индивидуальных препаратах липопротеидов был схожим (таблица 7). Однако, в двух других препаратах цмЛНП пациентов содержание галактозы и маннозы было достоверно ниже, чем в нативных ЛНП.

Таблица 6. Содержание углеводов в белок-связанных конъюгатах суммарных ЛНП, выделенных из крови здоровых лиц и пациентов с коронарным атеросклерозом

Содержание углеводов, нмоль/мг белка				
	N-ацГлю	Галактоза	Манноза	Сиаловая кислота
Здоровые лица				
1	55,9±0,7	26,2±0,5	70,9±0,2	26,2±0,6
2	52,3±1,8	23,1±2,1	70,1±0,5	27,8±0,7
3	60,8±1,1	30,5±2,0	66,9±1,2	31,2±1,0
4	67,4±1,0	29,8±0,7	85,6±1,1	32,8±1,5
5	65,2±1,8	31,4±0,6	74,3±1,6	31,6±0,5
6	58,5±0,8	28,1±0,9	78,1±1,1	25,9±0,3
7	53,0±0,8	27,8±0,8	66,6±3,5	25,9±0,7
8	59,3±2,5	31,8±0,9	77,9±1,8	30,2±0,4
Среднее	59,0±1,9	28,6±1,0	73,8±2,3	29,0±1,0
Пул	60,6±1,1	28,3±1,5	78,8±1,8	26,5±0,5
Пациенты с коронарным атеросклерозом				
1	54,8±1,3	27,2±1,0	67,1±1,0	17,2±0,7
2	55,7±1,5	24,6±0,7	63,6±1,5	13,5±0,6
3	60,4±0,3	28,7±0,5	82,9±2,2	20,7±0,9
4	63,1±1,5	34,6±0,5	87,5±1,2	21,1±0,6
5	59,0±0,9	29,6±1,1	75,3±1,5	20,8±0,9
6	52,9±1,4	27,4±1,2	83,2±1,8	20,2±0,9
7	52,6±2,1	22,9±1,4	65,6±0,9	16,1±1,0
8	56,3±0,8	22,0±2,1	61,2±1,6	12,3±0,9
Среднее	56,9±1,3	27,1±2,3	73,3±3,6	17,7±1,2*
Пул	61,5±0,5	27,7±1,0	77,2±1,0	17,5±0,5*

Данные - среднее трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от нативных ЛНП, $p<0,05$. N-ацГлю, N-ацетил-глюкозамин.

Таблица 7. Содержание углеводов в апоB нативных ЛНП и цмЛНП, выделенных из крови здоровых лиц и пациентов с коронарным атеросклерозом

Содержание углеводов, нмоль/мг белка				
	N-ацГлю	Галактоза	Манноза	Сиаловая кислота
Здоровые лица				
5	НатЛНП	66,8±2,3	31,7±0,9	74,4±4,2
	ЦмЛНП	63,6±3,1	30,8±1,2	75,0±5,5
6	НатЛНП	57,8±2,4	26,5±0,5	74,9±6,3
	ЦмЛНП	60,2±3,3	27,5±1,7	74,0±7,5
7	НатЛНП	53,0±1,7	27,5±1,7	62,6±7,0
	ЦмЛНП	52,5±2,2	28,9±1,8	65,1±2,3
8	НатЛНП	57,5±1,4	29,2±2,2	75,1±2,9
	ЦмЛНП	56,5±2,7	28,5±1,9	74,0±3,7
Среднее	НатЛНП	58,8±2,9	28,7±1,1	71,8±3,1
	ЦмЛНП	58,2±2,4	28,9±0,7	72,0±2,3
пуп	НатЛНП	59,9±2,3	28,5±0,6	75,9±2,3
	ЦмЛНП	62,6±1,5	28,0±1,1	77,0±5,0

Продолжение на следующей странице.

Содержание углеводов, нмоль/мг белка				
	N-ацГлю	Галактоза	Манноза	Сиаловая кислота
Пациенты с коронарным атеросклерозом				
5	НатЛНП	65,6 \pm 2,8	33,7 \pm 0,6	75,5 \pm 2,0
	ЦмЛНП	67,2 \pm 1,5	31,7 \pm 0,5	74,9 \pm 0,9
6	НатЛНП	60,0 \pm 1,6	27,0 \pm 1,2	81,7 \pm 2,5
	ЦмЛНП	58,7 \pm 2,3	25,3 \pm 1,4	77,2 \pm 3,8
7	НатЛНП	54,9 \pm 2,1	29,4 \pm 0,5	68,0 \pm 1,8
	ЦмЛНП	52,1 \pm 1,1	20,5 \pm 0,5*	53,7 \pm 1,6*
8	НатЛНП	57,3 \pm 2,3	34,7 \pm 1,3	83,1 \pm 1,5
	ЦмЛНП	58,3 \pm 1,5	21,4 \pm 0,8*	38,8 \pm 4,7*
среднее	НатЛНП	59,5 \pm 2,3	31,2 \pm 1,8	77,1 \pm 3,4
	ЦмЛНП	59,1 \pm 3,1	24,7 \pm 2,5*	61,1 \pm 9,1
пуп	НатЛНП	63,4 \pm 1,5	26,5 \pm 1,1	85,0 \pm 2,2
	ЦмЛНП	62,1 \pm 2,4	25,0 \pm 1,3	83,6 \pm 2,7
				25,5 \pm 1,0
				15,2 \pm 1,0*
				26,9 \pm 0,8
				15,3 \pm 0,2*
				25,6 \pm 0,6
				7,6 \pm 0,2*
				17,9 \pm 0,2
				7,1 \pm 0,1*
				24,0 \pm 2,0
				11,3 \pm 2,3*
				26,8 \pm 0,8
				11,6 \pm 0,2*

Данные - среднее трех определений \pm стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от нативных ЛНП, $p<0,05$. N-ацГлю, N-ацетил-глюкозамин. НатЛНП, нативные ЛНП.

Таблица 8. Содержание углеводов в гликолипидах суммарных ЛНП, выделенных из крови здоровых лиц и пациентов с коронарным атеросклерозом

Содержание углеводов, нмоль/мг белка					
	N-ацГал	N-ацГлю	Галактоза	Глюкоза	Сиаловая кислота
Здоровые лица					
1	5,2±0,1	6,0±0,2	42,9±1,3	44,2±1,0	7,4±0,1
2	6,2±0,1	7,8±0,1	36,7±2,5	39,7±2,5	9,8±0,6
3	5,7±0,3	7,8±0,1	43,7±2,2	50,2±0,4	7,4±0,9
4	9,5±0,3	11,5±0,6	60,2±1,6	61,2±0,8	8,4±0,1
5	5,3±0,3	8,5±0,6	32,6±0,6	35,6±1,5	6,1±0,1
6	5,9±0,4	8,6±0,7	44,7±1,5	51,2±1,6	7,3±0,1
7	5,5±0,2	7,6±0,2	36,1±0,4	39,8±2,8	6,8±0,2
8	6,3±0,8	10,0±0,4	43,2±2,9	50,2±3,5	8,1±0,2
Среднее	6,2±0,5	8,7±0,6	42,5±3,0	46,5±2,9	7,7±0,4
Пул ЛНП	5,9±0,2	7,4±0,1	40,8±0,3	42,6±1,4	6,3±0,1
Пациенты с коронарным атеросклерозом					
1	2,9±0,1	4,0±0,2	25,1±1,0	27,8±2,0	4,2±0,1
2	2,9±0,1	7,2±0,2	26,4±0,5	26,4±0,4	4,9±0,1
3	2,6±0,1	5,7±0,3	35,5±1,8	36,4±2,0	4,7±0,2
4	2,5±0,1	5,5±0,3	35,5±1,8	36,4±2,0	4,1±0,1
5	2,7±0,1	3,0±0,2	30,6±0,4	38,1±1,1	5,8±0,1
6	3,0±0,1	4,2±0,1	29,4±1,1	28,8±1,1	4,2±0,2
7	1,8±0,1	1,8±0,1	22,8±1,1	25,1±1,9	2,3±0,1
8	2,0±0,1	2,1±0,1	23,6±1,7	26,1±1,7	1,9±0,1
Среднее	2,6±0,1*	4,2±0,7*	28,6±1,8*	30,6±1,9*	4,0±0,5*
Пул ЛНП	3,2±0,1*	3,9±0,2*	28,3±1,0*	32,1±1,5*	2,7±0,1*

Данные - среднее трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от нативных ЛНП, p<0,05. N-ацГлю, N-ацетил-глюкозамин; N-ацГал, N-ацетил-галактозамин.

2.3.1.1.2. Углеводный состав липид-связанных гликоконъюгатов ЛНП

Углеводный состав липидной фракции ЛНП отличается от состава белок-связанных сахарных цепей отсутствием маннозы и наличием N-ацетил-галактозамина и глюкозы (таблица 8). В некоторых препаратах обнаруживались также следовые количества фукозы. Содержание липид-связанного N-ацетил-глюкозамина было в 5-9 раз ниже, а галактозы в 1,5-2 раза выше, чем в гликоконъюгатах апоВ (таблица 8). Количество липид-связанной сиаловой кислоты в 3-5 раз ниже, чем в белок-связанных цепях.

Содержание всех нейтральных моносахаридов: N-ацетил-галактозамина, N-ацетил-глюкозамина, галактозы и глюкозы, - в липид-связанных гликоконъюгатах суммарных ЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом было в 1,5-2 раза ниже, чем в липопротеидах здоровых лиц (таблица 8). Уровень сиаловой кислоты в липидной фракции пациентов также был значительно ниже, чем у здоровых лиц.

Уровень всех липид-связанных моносахаридов в цмЛНП здоровых лиц был в 1,5-2 раза ниже, чем в нативных липопротеидах (таблица 9). Содержание N-ацетил-галактозамина и N-ацетил-глюкозамина в липид-связанных гликоконъюгатах нативных ЛНП пациентов было ниже, чем в нативных липопротеидах здоровых лиц, тогда как уровень галактозы и глюкозы был сходен. Количество как нейтральных сахаров, так и сиаловой кислоты в липидной фракции цмЛНП пациентов было в 1,5-2 раза ниже, чем в нативных ЛНП (таблица 9). При этом, уровень всех углеводов в цмЛНП пациентов, был ниже, чем в цмЛНП здоровых лиц.

Таблица 9. Содержание углеводов в гликолипидах нативных ЛНП и цмЛНП, выделенных из крови здоровых лиц и пациентов с коронарным атеросклерозом

	Содержание углеводов, нмоль/мг белка				
	N-ацГал	N-ацГлю	Галактоза	Глюкоза	Сиаловая кислота
Здоровые лица					
5					
НатЛНП	5,5 \pm 0,1	8,6 \pm 0,2	34,6 \pm 2,3	38,2 \pm 1,5	6,2 \pm 0,2
ЦмЛНП	3,5 \pm 0,3*	7,4 \pm 0,1*	28,4 \pm 0,6*	30,8 \pm 0,8*	3,9 \pm 0,1*
6					
НатЛНП	5,9 \pm 0,1	8,6 \pm 0,2	45,5 \pm 0,4	51,4 \pm 1,8	7,4 \pm 0,2
ЦмЛНП	4,7 \pm 0,1*	6,8 \pm 0,3*	34,8 \pm 1,2*	41,1 \pm 0,6*	3,0 \pm 0,1*
7					
НатЛНП	5,6 \pm 0,1	7,7 \pm 0,1	34,9 \pm 0,8	40,9 \pm 1,3	6,9 \pm 0,1
ЦмЛНП	4,1 \pm 0,1*	6,7 \pm 0,1*	27,3 \pm 0,9*	25,0 \pm 3,1*	3,7 \pm 0,3*
8					
НатЛНП	6,6 \pm 0,2	9,0 \pm 0,2	48,4 \pm 1,4	53,8 \pm 1,0	8,2 \pm 0,1
ЦмЛНП	3,8 \pm 0,4*	4,3 \pm 0,1*	27,9 \pm 0,7*	28,4 \pm 0,7*	3,1 \pm 0,2*
Среднее					
НатЛНП	5,9 \pm 0,2	8,5 \pm 0,3	40,9 \pm 3,6	46,1 \pm 3,8	7,2 \pm 0,4
ЦмЛНП	4,0 \pm 0,3*	6,3 \pm 0,7*	29,6 \pm 1,7*	31,3 \pm 3,5*	3,4 \pm 0,2*
Пул ЛНП					
НатЛНП	5,9 \pm 0,2	7,6 \pm 0,1	42,6 \pm 0,6	44,8 \pm 2,7	6,5 \pm 0,2
ЦмЛНП	5,0 \pm 0,2*	7,0 \pm 0,1*	34,6 \pm 1,3*	35,2 \pm 1,1*	2,6 \pm 0,3*

Продолжение на следующей странице

Содержание углеводов, нмоль/мг белка					
	N-ацГал	N-ацГлю	Галактоза	Глюкоза	Сиаловая кислота
Пациенты с коронарным атеросклерозом					
5					
НатЛНП	3,6±0,1	4,0±0,1	39,5±0,6	50,6±1,4	7,4±0,3
ЦмЛНП	1,5±0,1*	1,9±0,1*	21,2±0,1*	18,8±0,9*	3,3±0,2*
6					
НатЛНП	4,0±0,1	6,4±0,1	35,4±0,6	41,6±0,2	6,8±0,1
ЦмЛНП	2,1±0,1*	2,6±0,2*	19,2±0,7*	18,8±0,7*	2,0±0,1*
7					
НатЛНП	2,5±0,1	2,5±0,3	26,0±0,7	36,8±2,2	3,4±0,2
ЦмЛНП	1,0±0,1*	1,0±0,1*	15,4±0,4*	18,0±2,2*	1,5±0,1*
8					
НатЛНП	2,8±0,1	3,0±0,3	34,5±1,5	35,4±1,4	3,6±0,3
ЦмЛНП	1,4±0,1*	1,4±0,1*	14,2±1,0*	17,1±0,4*	0,5±0,1*
Среднее					
НатЛНП	3,2±0,3	4,0±0,9	33,9±2,8	41,1±3,4	5,3±1,0
ЦмЛНП	1,5±0,2*	1,7±0,3*	17,5±1,6*	18,2±0,4*	1,8±0,6*
Пул ЛНП					
НатЛНП	4,5±0,2	5,2±0,1	35,0±0,7	40,6±1,8	3,6±0,1
ЦмЛНП	2,1±0,1*	2,4±0,1*	19,9±0,7*	18,7±1,1*	1,0±0,1*

Данные - среднее трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от нативных ЛНП, p<0,05. N-ацГлю, N-ацетил-глюкозамин; N-ацГал, N-ацетил-галактозамин; НатЛНП, нативные ЛНП.

2.3.1.2. Липидный состав

Содержание основных классов нейтральных липидов в нативных ЛНП и цмЛНП здоровых лиц и пациентов с коронарным атеросклерозом приведено в таблице 10. Уровень свободного и этерифицированного холестерина и триглицеридов в цмЛНП здоровых лиц был на 30-40% ниже по сравнению с нативными ЛНП. Количество моноглицеридов и свободных жирных кислот в цмЛНП было в 1,5 раза выше, чем во фракции нативных ЛНП. Содержание свободного и этерифицированного холестерина, а также триглицеридов в цмЛНП пациентов было в 1,5-2 раза ниже, чем в нативных липопротеидах. Уровень моно- и диглицеридов, а также свободных жирных кислот в цмЛНП был в 3-4 раза выше, чем в нативных липопротеидах.

В цмЛНП здоровых лиц по сравнению с нативными ЛНП снижено содержание фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и сфингомиелина, но увеличено содержание лизофосфатидилхолина (таблица 10). Уровень основных классов фосфолипидов в нативных ЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом не отличался от нативных ЛНП здоровых лиц. Содержание фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и сфингомиелина в цмЛНП пациентов было в 1,5-2 раза ниже, чем в нативных липопротеидах. Содержание лизофосфатидилхолина в цмЛНП было в два раза выше, чем его уровень в нативных ЛНП. Содержание фосфатидилинозита и фосфатидилсерина в изученных фракциях здоровых лиц и пациентов достоверно не различалось. Полученные данные свидетельствуют, что цмЛНП существенно отличаются от нативных липопротеидов по углеводному и липидному составу.

Таблица 10. Содержание основных классов липидов в нативных ЛНП и цмЛНП здоровых лиц и пациентов с коронарным атеросклерозом

	Содержание липидов в ЛНП, мкг/мг белка			
	Здоровые лица		Пациенты	
	Нативные ЛНП	цмЛНП	Нативные ЛНП	цмЛНП
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 кислоты				
кислоты	58±2	79±3*	53±2	196±2*#
Фосфатидил-холин				
холин	905±89	752±36*	1105±96	673±37*#
Лизофосфатидилхолин				
дилхолин	51±3	71±3*	56±4	103±4*#
Сфингомиелин	408±14	402±15	407±17	308±11*#
Фосфатидилэтаноламин				
этаноламин	34±3	26±2*	41±2	19±1*#
Фосфатидилинозит				
инозит	35±2	30±3	37±3	29±3
Фосфатидилсерин				
серин	23±2	19±1	24±2	17±2

Данные представлены в виде среднего 3-х определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от нативных ЛНП, $p<0,05$. #, достоверное отличие от здоровых лиц, $p<0,05$.

2.3.1.3. Обсуждение результатов

Содержание углеводов в белковых гликоконъюгатах суммарных препаратов ЛНП человека было исследовано рядом авторов. Суммарный уровень углеводов варьировал от 30 до 130 мкг/мг белка [Lee, Breckenridge, 1976; Fontaine, Malmendier, 1975, 1978; Swaminathan, Aladjem, 1976; Kwiterovich et al., 1974; Schultze, Heide, 1960; Van der Bijl, 1974; Van der Bijl, Reman, 1975; Fless et al., 1986] (таблица 11). В нашем исследовании суммарное содержание моносахаридов составило 35-45 мкг/мг белка. При этом соотношение количеств N-ацетил-глюказамина, галактозы, маннозы и сиаловой кислоты равнялось 2:1:2,5:1, что согласуется с данными других авторов [Fontaine, Malmendier, 1975, 1978; Van der Bijl, 1974; Van der Bijl, Reman, 1975].

Как известно, белок-связанные гликоконъюгаты ЛНП представлены двумя типами цепей: биантенными сиалированными и маннозными [Swaminathan, Aladjem, 1976; Vauhkonen et al., 1985; Taniguchi et al., 1989a]. По расчетам Taniguchi et al. [1989] молекула апоВ содержит 5-6 маннозных и 8-10 биантенных сиалированных конъюгатов. Исходя из этих данных, а также соотношения различных подтипов маннозных и биантенных цепей, можно предположить, что содержание углеводов в белок-связанных цепях должно составлять - N-ацетил-глюказамин - 42-52 моль/моль апоВ, галактоза - 14-18 моль/моль, манноза - 60-73 моль/моль, сиаловая кислота - 12-15 моль/моль. По нашим данным содержание галактозы и сиаловой кислоты в апоВ здоровых лиц составляет 14 и 15 моль/моль, соответственно. Это полностью согласуется с данными Taniguchi et al. [1989a]. С другой стороны, содержание N-ацетил-глюказамина и маннозы было равно 30 и 38 моль/моль, соответственно, что в 1,5 раза меньше, чем у этих

авторов. Меньшее, чем теоретически ожидаемое, процентное содержание N-ацетил-глюкозамина и маннозы было обнаружено также другими исследователями [Swaninathan, Aladjem, 1976; Fontaine, Malmendier, 1978]. В своих расчетах Танигучи и др. исходили из предпосылки, что 13-16 остатков аспарагина апоВ гликозилированы. Исходя из полученных нами данных, можно предположить, что не все предполагаемые остатки аспарагина гликозилированы. Причем, ЛНП содержат меньшее число маннозных цепей. Однако это предположение требует экспериментального подтверждения.

Уровень сиаловой кислоты в цмЛНП здоровых лиц был на 15-30% ниже, чем в нативных ЛНП. Еще большая разница в содержании сиаловой кислоты в нативных ЛНП и цмЛНП была обнаружена для липопротеидов пациентов с коронарным атеросклерозом. При этом, содержание нейтральных сахаров в апоВ ЛНП здоровых лиц было одинаковым как для нативных, так и для модифицированных липопротеидов. Мы не обнаружили различий в количестве нейтральных сахаров в нативных ЛНП и цмЛНП из пулированной плазмы, а также в двух индивидуальных образцах липопротеидов пациентов. С другой стороны, в двух других образцах цмЛНП уровень белок-связанных галактозы и маннозы был достоверно ниже, чем в нативных липопротеидах. Таким образом, в некоторых случаях, помимо низкого содержания сиаловой кислоты цмЛНП имеют низкий уровень моносахаридов, входящих в состав биантенных цепей, и, возможно, маннозных цепей. С другой стороны, отсутствие различий в содержании N-ацетил-глюкозамина предполагает, что количество углеводных цепей в апоВ цмЛНП такое же, как и в нативных ЛНП.

Таблица 11. Содержание углеводов в апоВ ЛНП человека

N-ацетил- Глюкоз- амин	Галактоза	Манноза	Сиаловая кислота	Сумма	Ссылка
нмоль/мг апоВ					
59	29	74	29	191	Табл. 2
57	27	73	18	175	Табл. 2
37	27	46	27	137	а
100	50	150	25	325	б
52	116	276	55	499	в
50	100	205	19	374	г
112	150	150	48	460	д
82	40	68	38	228	е

а, Lee, Breckenridge, 1976

б, Fontaine, Malmendier, 1978

в, Swaminathan, Aladjem, 1976

г, Kwiterovich et al., 1974

д, Schultze, Heide, 1960

е, Van der Bijl, 1974

Углеводный состав липид-связанных гликоконъюгатов ЛНП человека представлен N-ацетил-галактоз- и глюкозамином, а также галактозой, глюкозой и сиаловой кислотой. Содержание всех индивидуальных моносахаридов в липидной фракции суммарных препаратов ЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом ниже, чем у здоровых лиц. При сравнении нативных ЛНП и цмЛНП было обнаружено, что уровень липид-

связанных нейтральных сахаров в последних в 1,5-2 раза ниже. Еще более выраженное различие было продемонстрировано в содержании сиаловой кислоты.

La Belle, Krauss [1990] опубликовали данные о содержании сиаловой кислоты и суммарных нейтральных углеводов в ЛНП субъектов, имеющих преимущественно более крупные по размерам или более мелкие подклассы липопротеидов. Ими показано, что содержание сиаловой кислоты и нейтральных сахаров в маленьких и более плотных ЛНП ниже. В наших экспериментах мы разделяли ЛНП на фракции с различным содержанием сиаловой кислоты. При этом выяснилось, что десиалированные ЛНП, содержащие при этом меньшее количество других сахаров, имеют меньшие размеры и большую плотность по сравнению с сиалированными липопротеидами (см. Главу 3.2). Таким образом, существует взаимосвязь между содержанием углеводов и размером и плотностью частиц липопротеидов.

Хотя реальный механизм изменения углеводного состава не ясен, можно предположить, что эти изменения влияют на метаболизм липопротеидов. Ранее Filipovic et al. [1979] показали, что варьирование содержания сиаловой кислоты в ЛНП изменяет захват и деградацию липопротеидов гладкомышечными клетками аорты. Taniguchi et al. [1989b] продемонстрировали, что десиалированные нейраминидазой ЛНП активнее метаболизировались мышиными макрофагами. В наших экспериментах было показано, что обработанные нейраминидазой ЛНП эффективнее захватываются клетками и вызывают отложение липидов в клетках интимы аорты человека [Orekhov et al., 1989; 1991]. Напомним, что таким же эффектом обладают цмЛНП, выделенные из плазмы крови пациентов с

коронарным атеросклерозом. Таким образом, изменение углеводного состава, и в частности, десиалирование влияют на способность ЛНП стимулировать накопление липидов в клетках интимы аорты человека.

Содержание липидов в нативных ЛНП и цмЛНП резко различается. При этом изменения в десиалированных ЛНП здоровых лиц и пациентов односторонни и отличаются лишь степенью выраженности. По сравнению с нативными ЛНП в цмЛНП низкий уровень свободного и этерифицированного холестерина и триглицеридов, однако, увеличено содержание свободных жирных кислот, а также моно- и диглицеридов. Обнаружено также малое содержание фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина в цмЛНП здоровых лиц и пациентов и сфингомиелина в цмЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом. Низкий уровень липидов, представляющих эфиры жирных кислот, и увеличенный уровень моно- и диглицеридов, а также свободных жирных кислот и лизофосфатидилхолина могут объясняться воздействием на ЛНП липопротеидлипазы, фосфолипаз А₂, А₁, В, ЛХАТ и других гидролитических ферментов плазмы крови. С другой стороны, малое содержание ряда липидов может быть обусловлено их переносом липид-транспортными белками.

2.3.2. Физические параметры

2.3.2.1. Размер частиц

Определение размеров частиц нативных ЛНП и цмЛНП здоровых лиц и пациентов было проведено двумя методами: методом квазиэластичного рассеивания лазерного излучения в суспензии липопротеидов, а также с помощью электрофореза ЛНП в градиенте полиакриламидного геля с последующей сканирующей денситометрией. Полученные с помощью первого подхода моды распределения по размерам частиц нативных ЛНП здоровых лиц и пациентов составляли 26,5 и 26,8 нм, соответственно. Моды распределения для цмЛНП здоровых лиц и пациентов были равны 24,8 и 24,5 нм, соответственно.

Сходные результаты для среднего диаметра частиц нативных (26,3 и 26,2 нм) и цмЛНП (23,5 и 22,9 нм) здоровых лиц и пациентов, соответственно, были получены с использованием электрофореза в полиакриламидном геле. Таким образом, частицы цмЛНП имеют меньшие размеры, по сравнению с нативными липопротеидами.

2.3.2.2. Плотность ЛНП

Распределение по плотности суммарных ЛНП здоровых лиц и пациентов представляет собой колоколообразную зависимость с плечом в области высоких плотностей. При этом доля липопротеидов с большей плотностью выше у пациентов с коронарным атеросклерозом по сравнению со здоровыми лицами.

Распределение нативных ЛНП здоровых лиц по плотности не отличается от суммарных ЛНП. С другой стороны, распределение цмЛНП резко сдвинуто в сторону больших плотностей. Во фракции нативных ЛНП пациентов доля ЛНП с

высокой плотностью ниже, чем в суммарных липопротеидах. Наоборот, фракция цмЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом представлена более плотными липопротеидами.

Концентрации общей сиаловой кислоты в нативных ЛНП здоровых лиц и пациентов были близки и не изменились в зависимости от плотности липопротеидов. Содержание сиаловой кислоты в подфракциях цмЛНП здоровых лиц с плотностью 1,019-1,035 г/мл было лишь на 10-15% ниже, чем в нативных липопротеидах. С другой стороны, в подфракциях с плотностью 1,035-1,063 г/мл уровень сиаловой кислоты в цмЛНП здоровых лиц был в 1,5-2 раза ниже, чем в нативных ЛНП.

Уровень сиаловой кислоты в менее плотных субфракциях цмЛНП пациентов в два раза ниже, чем в нативных ЛНП. С возрастанием плотности содержание сиаловой кислоты в цмЛНП резко снижается.

Нативные ЛНП как здоровых лиц, так и пациентов не вызывали увеличения внутриклеточного содержания холестерина за 24 часа культивирования. Подфракции менее плотных (1,019-1,035 г/мл) цмЛНП здоровых лиц также не влияли на уровень холестерина в клетках. С другой стороны, ЛНП более плотных подфракций стимулировали 1,5-2,5-кратное накопление холестерина в гладкомышечных клетках интимы аорты.

Подфракции цмЛНП пациентов с плотностью 1,035-1,063 г/мл вызывали 1,5-кратное увеличение внутриклеточного холестерина. Подфракции более плотных ЛНП стимулировали 2-6-кратную аккумуляцию суммарного холестерина в клетках.

Уровень эфиров холестерина в нативных ЛНП здоровых лиц и пациентов был схож. При этом более плотные подфракции содержали меньше этерифицированного холестерина. Содержание эфиров холестерина в подфракциях цмЛНП было ниже, чем в нативных ЛНП. Причем наибольшее различие между нативными ЛНП и цмЛНП пациентов наблюдалось в более плотных подфракциях.

Сходная картина зависимости уровня липидов от плотности нативных ЛНП и циркулирующих модифицированных липопротеидов была выявлена и для свободного холестерина, и для триглицеридов и фосфолипидов. С возрастанием плотности липопротеидов содержание триглицеридов в подфракциях нативных ЛНП здоровых лиц и пациентов снижается, а затем вновь начинает возрастать. Уровень триглицеридов в цмЛНП здоровых лиц и пациентов с возрастанием плотности снижается и, начиная с плотности 1,030 г/мл, остается постоянным вплоть до самых плотных подфракций.

3.2.3. Заряд частиц

С помощью электрофореза в агарозе было продемонстрировано, что цмЛНП здоровых лиц и особенно пациентов, имеют в 1,2-1,4 раза большую электрофоретическую подвижность по сравнению с нативными ЛНП. Это свидетельствует об увеличенном электроотрицательном заряде цмЛНП.

Мы исследовали также как зависит заряд липопротеидных частиц от их плотности и размера. В таблице 12 приведены данные об относительной электрофоретической подвижности пяти подфракций нативных ЛНП и цмЛНП, различающихся по

плотности и размеру. Можно видеть, что наиболее плотные и мелкие частицы имеют наибольшую электрофоретическую подвижность, то есть обладают наибольшим электротрицательным зарядом.

Таблица 12. Относительная электрофоретическая подвижность и диаметр частиц ЛНП в подфракциях, выделенных с помощью градиентного центрифугирования из суммарных препаратов ЛНП здоровых лиц и пациентов с коронарным атеросклерозом

Подфракция	Плотность, г/мл	Относительная электрофоретическая подвижность
Здоровые лица		
1	1,027-1,031	1,00
2	1,031-1,036	1,00
3	1,036-1,042	1,02
4	1,042-1,050	1,05
5	1,050-1,063	1,14
Пациенты с коронарным атеросклерозом		
1	1,027-1,031	1,01
2	1,031-1,036	1,03
3	1,036-1,042	1,10
4	1,042-1,050	1,25
5	1,050-1,063	1,48

Подфракции ЛНП разделяли ультрацентрифугированием в градиенте плотности KBr, как описано в Материалах и Методах. Электрофоретическую подвижность определяли с помощью электрофореза в агарозном геле. За 1 принята подвижность фракции 1 здоровых лиц.

2.3.2.4. Обсуждение результатов

Изучение физических параметров циркулирующих модифицированных ЛНП выявило их драматические отличия от нативных ЛНП. Существенное уменьшение размера частиц и, соответственно, увеличение их плотности обусловлено значительной потерей нейтральных липидов и фосфолипидов при неизменном количестве апоВ. Наличие в крови людей подфракций ЛНП, имеющих увеличенную плотность, было обнаружено в нескольких лабораториях [Shen et al., 1981; Krauss, Burke, 1982; Fisher, 1983; Chapman et al., 1988]. Была также установлена взаимосвязь между степенью развития атеросклероза и долей мелких плотных ЛНП, циркулирующих в крови пациентов [Austin et al., 1988a,b; Swinkels et al., 1989]. В этой работе мы обнаружили, что мелкие плотные ЛНП являются атерогенными липопротеидами, то есть способными вызывать накопление липидов в клетках интимы аорты человека. Таким образом, установлен один из возможных механизмов вовлечения мелких плотных ЛНП в развитие атеросклероза.

Другим резко выраженным изменением физических характеристик цмЛНП является увеличенный электроотрицательный заряд. Возникает вопрос: почему потерявшие отрицательно заряженную сиаловую кислоту липопротеиды обладают более электроотрицательным зарядом? Как было указано ранее, содержание сиаловой кислоты в цмЛНП снижено на 10-20 молекул в пересчете на одну частицу. С другой стороны, как будет показано в следующей главе, количество свободных аминогрупп лизина в цмЛНП снижено на 100 молекул по сравнению с нативными ЛНП. Таким образом, уменьшение суммарного положительного заряда лизиновых остатков намного превосходит снижение

отрицательного заряда, обусловленное потерей сиаловой кислоты. Механизмы уменьшения количества поверхностных аминогрупп лизина будут рассмотрены ниже.

2.3.3. Анализ аполипопротеида В.

2.3.3.1. Свободные аминогруппы лизиновых остатков

В таблице 13 приведены результаты экспериментов по определению тринитробензолсульфоновая кислота (ТНБС)-реактивных аминогрупп. Так как аминогруппы фосфатидилэтаноламина и фосфатидилсерина составляют менее 10%, основная часть аминогрупп ЛНП принадлежат лизиновым остаткам аполипопротеина В. Содержание ТНБС-реактивных аминогрупп во всех исследованных фракциях необработанных ЛНП здоровых лиц достоверно не различалось. Сходное количество аминогрупп было определено в делипидированных апо В этих фракций.

Уровень ТНБС-реактивных аминогрупп в препарате суммарных ЛНП пациентов был в 1,4 раза ниже, чем в суммарных ЛНП здоровых лиц (таблица 13). При этом содержание аминогрупп в делипидированном апо В пациентов было достоверно выше, чем в интактных частицах. Уровень ТНБС-реактивных аминогрупп как в интактных, так и делипидированных нативных ЛНП пациентов был схож и близок этому показателю для ЛНП здоровых лиц. Концентрация аминогрупп в необработанных цмЛНП пациентов была в 1,5 и 2 раза ниже, чем в суммарных и нативных ЛНП, соответственно. Количество доступных ТНБС аминогрупп в делипидированных апоB цмЛНП было выше, чем в интактных частицах, но было однако, ниже, чем в делипидированных аполипопротеидах, полученных из препаратов суммарных и нативных ЛНП.

Таблица 13. Содержание ТНБС-реактивных аминогрупп в нативных ЛНП и цмЛНП

Подфракция	Содержание ТНБС-реактивных аминогрупп, нмоль/мг белка	
	Интактные ЛНП	АпоB
Здоровые лица		
Суммарные ЛНП	654±19	640±49
Нативные ЛНП	638±21	632±56
ЦмЛНП	605±19	642±16
Пациенты с коронарным атеросклерозом		
Суммарные ЛНП	456±12 ^a	569±22 ^{a,б}
Нативные ЛНП	626±12 ^b	641±26 ^b
ЦмЛНП	336±19 ^{a,b,г}	526±11 ^{a,b,г}

ЛНП делипидировали смесью хлороформ-метанол [Bligh, Dyer, 1959] и апоB растворяли в 0,2 М NaOH. Данные представлены в виде среднего трех отпределений ± стандартное математическое отклонение. ^a, достоверное отличие от соответствующей фракции здоровых доноров; ^б, достоверное отличие от интактных ЛНП; ^в, достоверное отличие от суммарных ЛНП; ^г, достоверное отличие от нативных ЛНП, $p<0,05$.

2.3.3.2. Устойчивость к протеолизу

Другим подходом для изучения изменений третичной структуры апоB нативных ЛНП и цмЛНП явилось использование протеолитической деградации. ¹²⁵I-меченные ЛНП инкубировали при 20°C в течение 1 часа с трипсином и эластазой. Как следует

из рисунка 12, скорость гидролиза цмЛНП трипсином была в 2 раза выше по сравнению с нативными ЛНП. Скорость протеолитической деградации циркулирующих модифицированных ЛНП эластазой также превосходила в два раза скорость деградации нативных липопroteидов. Эти данные также свидетельствуют об изменении конформации апоB в цмЛНП в сравнении с нативными частицами липопroteидов.

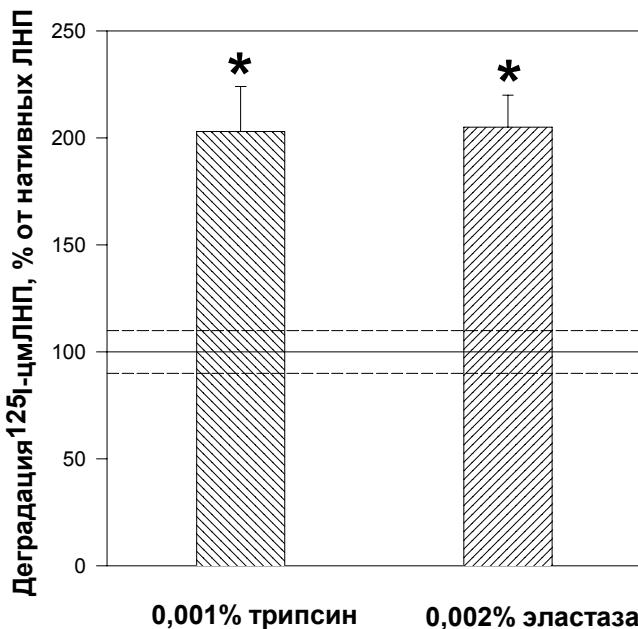


Рис. 12. Скорость протеолитической деградации трипсином и эластазой ^{125}I -меченого апоB нативных ЛНП и цмЛНП. Меченные ЛНП инкубировали с указанными количествами ферментов при 20°C в течение 1 часа. Данные представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p<0,05$.

2.3.3.3. Обсуждение результатов

Низкий уровень ТНБС-реактивных аминогрупп в цмЛНП может быть частично объяснен перекисным окислением липидов липопротеидов. Как было показано Jurgens et al. [1986] альдегиды, образующиеся при окислении ЛНП снижают уровень свободных аминогрупп. С другой стороны, снижение количества доступных для ТНБС лизиновых остатков может быть обусловлено изменением структуры аполипопротеина В. В наших экспериментах содержание ТНБС-доступных лизинов в делипидированных апобелках было выше, чем в интактных частицах. Это указывает на то, что часть аминогрупп, не взаимодействующих с ТНБС, не модифицирована, а лишь маскирована. Независимо от механизма снижения свободных аминогрупп это приводит к увеличению суммарного отрицательного заряда на поверхности частиц ЛНП и как следствие увеличению электрофоретической подвижности. Haberland et al. [1982] показали, что модификация малоновым диальдегидом 60-75 аминогрупп лизиновых остатков апоВ ведет к уменьшению связывания ЛНП с В,Е-рецептором и появлению сродства к скэвенджер-рецептору макрофагов. Мы обнаружили, что содержание ТНБС-реактивных аминогрупп в циркулирующих модифицированных ЛНП примерно на 100 аминогрупп ниже, чем в нативных липопротеидах. Это снижение может объяснять взаимодействие цмЛНП, но не нативных ЛНП, со скэвенджер-рецепторами макрофагов и гладкомышечных клеток (см. ниже).

Изменение скорости протеолитической деградации апоВ циркулирующих модифицированных ЛНП также свидетельствует об изменении конформации апобелка в этих липопротеидных частицах. Изменение конформации апобелка

было обнаружено рядом авторов в *in vitro* окисленных ЛНП [Формазюк и др. 1980; Добрецов и др., 1983; Панасенко и др. 1984; Panasenko et al., 1991]. Однако, значительная степень окисления исследованных ЛНП не позволяет сделать заключение о роли перекисного окисления липидов в изменении третичной структуры апоВ в *in vivo* модифицированных ЛНП. С другой стороны, хорошо известно, что перекисное окисление в условиях *in vitro* приводит к значительной потере липидов, и, как следствие, уменьшению размеров липидного ядра частицы [Esterbauer et al., 1992]. В этом случае, можно ожидать изменений конформации апобелка. Действительно, структурные различия апоВ были обнаружены в ЛНП с различным соотношением липид/белок [Герасимова и др. 1978; Валентинова и др., 1989; Chait et al., 1991]. Как мы продемонстрировали выше, цМЛНП имеют низкое содержание липидов и меньшие размеры. Поэтому можно предположить, что именно уменьшение размеров липидного кора липопротеидов является причиной изменения третичной структуры апоВ. Подтверждением такого предположения являются наши данные о том, что в ходе модификации ЛНП в плазме крови уменьшение размеров частиц и изменение конформации апоВ происходят одновременно и задолго до появления признаков протекания процесса перекисного окисления липидов в липопротеидах (см. ниже).

2.3.4. Степень окисленности и окисляемость липопротеидов

2.3.4.1. Содержание гидроперекисей и ТБК-реактивных продуктов в нативных ЛНП и цмЛНП

Анализ химического состава липопротеидов низкой плотности (ЛНП) позволил ряду исследователей в 50-60-х годах предположить важную роль окислительной модификации ЛНП в атерогенезе [Nishida, Kummerow, 1960; Clark et al., 1969]. Тогда же были получены экспериментальные данные о том, что ЛНП способны подвергаться перекисному окислению [Nishida, Kummerow, 1960; Bermes, McDonald, 1972; Schuh et al., 1978]. Пик развития интереса к окисленным ЛНП пришелся на 80-е годы, когда Steinberg et al. [1989] сформулировали концепцию атерогенной роли окисленных ЛНП. Тем не менее, многочисленные попытки обнаружить в крови людей ЛНП, подвергшиеся окислительной модификации, оказались безуспешными. Это может быть связано с малым временем жизни и высокой реакционной способностью большей части продуктов перекисного окисления липидов. Потеря гидрофильных продуктов липопероксидации при выделении и очистке ЛНП может быть другой причиной этого феномена. Действительно, и в наших экспериментах мы не обнаружили повышенного содержания компонентов, обычно определяемых для оценки протекания процессов перекисного окисления липидов: гидроперекисей и ТБК-реактивных продуктов (таблица 14).

С другой стороны, мы нашли повышенный уровень других более стабильных продуктов перекисного окисления липидов: оксистеролов (таблица 14). С помощью тонкослойной хроматографии было показано, что основными оксистеролами,

накапливающимися в цмЛНП являются : 7-кето-, 5,6-диен-б 7-окси-, и 25-оксистерол. Таким образом, возможность обнаружения тех или иных продуктов перекисного окисления липидов в подфракциях ЛНП, по-видимому, зависит от их стабильности.

Таблица 14. Содержание гидроперекисей ТБК-реактивных продуктов и оксистеролов в нативных ЛНП и цмЛНП

ЛНП	ТБК-		
	Гидроперекиси, мкмоль/моль апоВ	реактивные продукты, пмоль/мг белка	Суммарные оксистеролы, мкг/мг белка
Здоровые лица			
Нативные ЛНП	145±13	179±18	19±1
ЦмЛНП	125±13	215±22	34±3*
Пациенты с коронарным атеросклерозом			
Нативные ЛНП	156±10	178±19	26±3
ЦмЛНП	178±15	259±37	78±4*

Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от нативных ЛНП, $p<0,05$.

В этой связи, представляется важным обнаружение и измерение стабильных продуктов липопероксидации, образующихся и остающихся в липопротеидной частице. Мы

предположили, что такими продуктами окисления могут быть остатки липидов ковалентно связанные с аполипопротеидом В. В этой части исследования было изучено накопление белок-связанных липидов при перекисном окислении ЛНП *in vitro*, и их содержание в нативных ЛНП и цмЛНП, выделенных из крови человека.

2.3.4.2. Разработка метода определения аддуктов липидов с апоВ - маркеров окисления ЛНП *in vivo*

На рисунке 13 приведены данные о содержании продуктов перекисного окисления липидов в нативных липопротеидах низкой плотности окисленных ионами меди. Можно видеть, что уровни гидроперекисей, конъюгированных диенов и ТБК-реактивных продуктов возрастили, достигая максимальных значений через 6-8 часов инкубации. В дальнейшем содержание гидроперекисей и ТБК-реактивных продуктов монотонно падало, а содержание диеновых конъюгатов снижалось к 12 часам и возрастало спустя 24 часа инкубации (рис. 13).

В то же время, уровень аддуктов стеролов с апоВ окисляемых ЛНП, медленно возрастал вплоть до 4-х часов инкубации, затем скорость образования этих продуктов увеличивалась и оставалась постоянной в интервале от 6 до 24-х часов (рис. 13). Таким образом, окисление ЛНП ионами меди приводит к монотонному накоплению в них апоВ-связанных стеролов, в то время как содержание других продуктов перекисного окисления претерпевает сложные изменения.

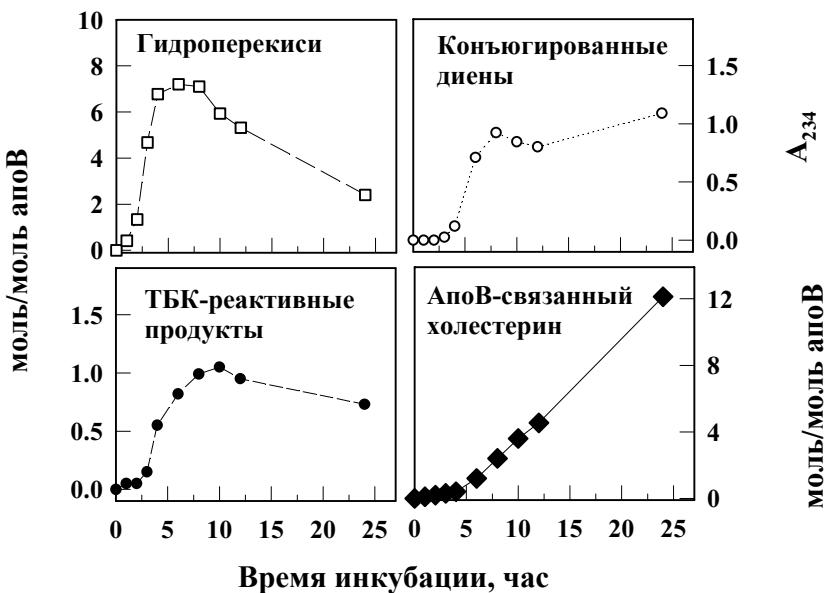


Рис. 13. Временная зависимость накопления ТБК-реактивных продуктов, гидроперекисей, конъюгированных диенов и апоВ-связанных стеролов в медь-окисленных ЛНП. Каждое значение - среднее двух определений.

ВЭЖХ анализ состава белок-связанных стеролов продемонстрировал, что холестерин является основным связанным с белком компонентом Cu^{2+} -окисленных ЛНП. Содержание основного продукта окисления холестерина ЛНП - 7-кето-холестерина, составляло менее 2%.

Наличие белок-связанного фосфора - остатков фосфолипидов - в делипидированных препаратах Cu^{2+} -окисленных ЛНП было продемонстрировано с помощью ядерного магнитного резонанса. Делипидированные препараты

апоВ неокисленных нативных ЛНП фосфора не содержали (данные не приводятся).

Накопление аддуктов стеролов и фосфора с апобелком было выявлено также при окислении ЛНП с помощью гипохлорита, пероксирадикалами, генерируемыми ААПГ, а также при инкубации с макрофагами человека (таблица 15).

Дополнительные данные об образовании аддуктов липидов с апобелком при окислении ЛНП были получены с использованием радиоактивно меченых липидов. Результаты, приведенные в таблице 16, свидетельствуют, что остатки свободного и этерифицированного холестерина, триглицериды, свободные жирные кислоты и различные классы фосфолипидов ковалентно связываются с апоВ при Cu^{2+} -опосредованном окислении. При этом, доля связанных липидов возрастает с увеличением степени ненасыщенности жирных кислот. Необходимо отметить также, что фосфолипиды, содержащие свободную аминогруппу (fosfatidилэтаноламин и фосфатидилсерин), связываются с апоВ в большей степени (таблица 16).

Таблица 15. Уровень апоВ-связанных липидов в ЛНП, окисленных ионами меди, ААПГ, гипохлоритом, и во время инкубации с перitoneальными макрофагами мышей

Тип окисления	Уровень апоВ-связанных стеролов, моль/моль апоВ	Уровень апоВ-связанного фосфора, моль/моль апоВ
Контроль	0.24±0.02	0.11±0.01
10 мкМ CuSO ₄	7.65±0.15*	4.78±0.25*
0,3 мМ ААПГ	2.43±0.12*	1.78±0.14*
2 мМ NaOCl	1.11±0.03*	4.01±0.24*
Макрофаги	2.34±0.23*	1.56±0.10*

ЛНП инкубировали в течение 24 часов при 37°C в присутствии перечисленных агентов (1.5 часа при 4°C для NaOCl). Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, p<0,05.

Таблица 16. Доля радиоактивно меченых липидов, связавшихся с апоВ во время окисления ЛНП

Липид	% апоВ-связанных липидов
Фосфатидилхолин-2-[1- ¹⁴ C]арахидонил	10.62
Фосфатидилхолин-1,2-ди[1- ¹⁴ C]олеоил	1.47
Фосфатидилхолин-1,2-ди[1- ¹⁴ C]пальмитоил	0.22
Фосфатидилэтаноламин-2-[1- ¹⁴ C]арахидонил	20.02
Фосфатидилэтаноламин-2-[1- ¹⁴ C]линоил	15.95
Фосфатидилэтаноламин-1,2-ди[1- ¹⁴ C]олеоил	13.60
Фосфатидилэтаноламин-1,2-ди[1- ¹⁴ C]пальмитоил	5.65
Фосфатидилинозит-2-[1- ¹⁴ C]арахидонил	8.77
Фосфатидил-[3- ¹⁴ C]серин, 1,2-диолеоил	6.87
[N-метил- ¹⁴ C]Сфингомиelin	0.57
Глицерин три[1- ¹⁴ C]олеат	1.34
[1- ¹⁴ C]Олеиновая кислота	2.34
[1 α ,2 α (n)- ³ H]Холестериллинолеат	2.15
[1 α ,2 α (n)- ³ H]Холестерилолеат	1.27
[1 α ,2 α (n)- ³ H]Холестерин	0.23

ЛНП метили радиоактивными липидами и окисляли в течение 24 часов в присутствии 10 мкМ CuSO₄, как описано в Материалах и Методах. Контрольные ЛНП инкубировали в присутствии 1 мМ ЭДТА и 20 мкМ ионола.

3.4.4. Степень *in vivo* окисленности нативных ЛНП и цмЛНП

В этой части работы мы исследовали степень *in vivo* окисленности ЛНП, которую определяли по уровню апоВ-связанного холестерина в нативных ЛНП и цмЛНП. В таблице 17 представлены данные об уровне апоВ-связанного холестерина в нативных ЛНП и цмЛНП, выделенных из плазмы крови здоровых лиц и пациентов с коронарным атеросклерозом. Содержание апоВ-связанного холестерина в нативных ЛНП здоровых лиц составляло 0,25 моль/моль, т.е. в среднем одна молекула холестерина на 4 липопротеидные частицы. Уровни апоВ-связанного холестерина в нативных ЛНП и цмЛНП здоровых лиц были сходными (таблица 17).

Содержание апоВ-связанного холестерина в нативных ЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом не отличалось значимо от его содержания в нативных ЛНП здоровых лиц (таблица 17). ЦмЛНП пациентов содержали в 7 раз больше апоВ-связанного холестерина, по сравнению с нативными ЛНП. Таким образом, цмЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом обнаруживают более высокую степень окисленности *in vivo*, по сравнению с нативными ЛНП.

Таблица 17. Содержание апоB-связанного холестерина и длительность периода индукции медь-зависимого окисления нативных ЛНП и цмЛНП здоровых лиц и пациентов с коронарным атеросклерозом

Подфракция ЛНП	Уровень апоB-связанного холестерина, моль/моль апоB	Длительность периода индукции окисления, мин
Здоровые лица (n=10)		
Нативные ЛНП	0,25±0,08	103±16
ЦмЛНП	0,28±0,05	34±3*
Пациенты с коронарным атеросклерозом (n=10)		
Нативные ЛНП	0,16±0,05	142±13
ЦмЛНП	1,18±0,33*#	25±2*#

Данные представлены в виде среднего 10 определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от нативных ЛНП, $p<0,05$. #, достоверное отличие от здоровых лиц, $p<0,05$.

2.3.4.4. In vitro окисляемость нативных ЛНП и цмЛНП

Предрасположенность липопротеидов к *in vitro* окислению оценивали по продолжительности периода индукции (лаг-фаза) при Cu^{2+} -стимулированном окислении. Было продемонстрировано, что средняя продолжительность периода индукции при окислении цмЛНП здоровых лиц была в среднем в три раза меньше, по сравнению с нативными липопротеидами, т.е. окисляемость модифицированных липопротеидов была значительно выше. Продолжительность периода индукции цмЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом была в среднем в 5,7 раз короче, чем у нативных ЛНП. Более того, средняя продолжительность лаг-фазы при окислении цмЛНП пациентов была в 1,4 раза меньше, чем продолжительность лаг-фазы цмЛНП здоровых лиц. Таким образом, цмЛНП как здоровых лиц, так и, особенно, пациентов проявляют повышенную, по сравнению с нативными ЛНП, предрасположенность к *in vitro* окислению. Помимо подфракций ЛНП, мы также определили предрасположенность к *in vitro* окислению суммарных препаратов ЛНП здоровых лиц и пациентов. Средняя продолжительность периода индукции при окислении суммарных ЛНП здоровых лиц и пациентов составила 82 ± 6 и 58 ± 12 мин ($n=20$, $p<0.05$), соответственно.

2.3.4.5. Содержание жирорастворимых антиоксидантов в нативных ЛНП и цмЛНП

В таблице 18 представлены данные о содержании окисленной (убихинон, CoQ₁₀) и восстановленной (убихинол, CoQ₁₀H₂) форм кофермента Q в нативных ЛНП и цмЛНП здоровых лиц и пациентов с коронарным атеросклерозом. Содержание убихинона в цмЛНП здоровых лиц было в среднем на 21% выше, чем в нативных ЛНП. Содержание убихинола в цмЛНП здоровых лиц было на 29% ниже, чем в нативных липопротеидах (таблица 18). Доля окисленной формы кофермента Q в цмЛНП была в полтора раза выше, чем в нативных ЛНП, выделенных из крови здоровых лиц.

Уровень убихинона в нативных ЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом был в среднем в 1,6 раза выше, чем в нативных липопротеидах здоровых лиц (таблица 18). Содержание убихинона в цмЛНП пациентов было в среднем на 35% выше, чем в цмЛНП здоровых лиц. Уровень убихинола в нативных ЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом был в 2,1 раза ниже, чем в нативных ЛНП здоровых лиц. Еще более низкое содержание восстановленной формы кофермента Q было обнаружено в цмЛНП пациентов (таблица 18). Доля окисленной формы кофермента Q в нативных ЛНП и цмЛНП пациентов была в 2,7 и 2,4 раза выше, чем в соответствующих подфракциях липопротеидов здоровых лиц.

В таблице 19 приведены данные о содержании α - и γ -токоферолов в нативных ЛНП и цмЛНП здоровых лиц и пациентов. Уровень как α -, так и γ -токоферолов в цмЛНП здоровых лиц был ниже в 1,5 и 1,6 раза, соответственно, чем в нативных ЛНП.

Таблица 18. Содержание убихинона-10 (CoQ_{10}) и убихинола-10 ($\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$) в нативных ЛНП и цмЛНП здоровых лиц и пациентов с коронарным атеросклерозом

Подфракция ЛНП	Содержание CoQ_{10} , ммоль/моль апоВ	Содержание $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$, ммоль/моль апоВ	$\text{CoQ}_{10}/(\text{CoQ}_{10} + \text{CoQ}_{10}\text{H}_2)$
Здоровые лица (n=30)			
Нативные ЛНП	76±5	718±45	0,10
цмЛНП	92±5*	512±41*	0,15
Пациенты с коронарным атеросклерозом (n=30)			
Нативные ЛНП	122±12#	336±31#	0,27
цмЛНП	124±11#	222±30*#	0,36

Данные представлены в виде среднего 30 определений ± стандартное математическое отклонение.

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

#, достоверное отличие от здоровых лиц, $p<0,05$.

Таблица 19. Содержание α -токоферола и γ -токоферола в нативных ЛНП и цмЛНП здоровых лиц и пациентов с коронарным атеросклерозом

Подфракция ЛНП	Содержание α -токоферола, моль/моль апоB	Содержание γ -токоферола, моль/моль апоB
Здоровые лица (n=30)		
Нативные ЛНП	$8,21 \pm 0,35$	$0,49 \pm 0,02$
ЦмЛНП	$5,43 \pm 0,31^*$	$0,31 \pm 0,02^*$
Пациенты с коронарным атеросклерозом (n=30)		
Нативные ЛНП	$7,99 \pm 0,36$	$0,43 \pm 0,02\#$
ЦмЛНП	$5,66 \pm 0,41^*$	$0,29 \pm 0,01^*$

Данные представлены в виде среднего 30 определений \pm стандартное математическое отклонение.

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

\#, достоверное отличие от здоровых лиц, $p < 0,05$.

Содержание α -токоферола в нативных ЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом было сходным с таковым для нативных ЛНП здоровых лиц (таблица 19). Содержание γ -токоферола в нативных ЛНП пациентов было значимо ниже (на 12%), чем в нативных ЛНП здоровых лиц. В цмЛНП пациентов содержание α - и γ -токоферолов было в 1,4 и 1,5 раза, соответственно, ниже, чем в нативных ЛНП.

Уровни β -каротина и ликопина в подфракциях ЛНП здоровых лиц и пациентов представлены в таблице 20.

Содержание β -каротина в нативных ЛНП здоровых лиц и пациентов с коронарным атеросклерозом достоверно не различалось. Уровни β -каротина в цмЛНП здоровых лиц и пациентов были в 1,3 раза ниже, чем в нативных ЛНП (таблица 20).

Содержание ликопина в нативных ЛНП здоровых лиц и пациентов составило 201 и 186 ммол/моль апоВ, соответственно, и достоверно не различалось (таблица 20). Уровни ликопина в цмЛНП здоровых лиц и пациентов были ниже в 1,4 и 1,3 раза, соответственно, по сравнению с нативными липопротеидами.

Таблица 20. Содержание β -каротина и ликопина в нативных ЛНП и цмЛНП здоровых лиц и пациентов с коронарным атеросклерозом

Подфракция ЛНП	Содержание β -каротина, ммоль/моль апоВ	Содержание ликопина, ммоль/моль апоВ
Здоровые лица (n=30)		
Нативные ЛНП	345 \pm 16	201 \pm 15
ЦмЛНП	263 \pm 13*	145 \pm 9*
Пациенты с коронарным атеросклерозом (n=30)		
Нативные ЛНП	318 \pm 23	186 \pm 16
ЦмЛНП	238 \pm 16*	140 \pm 11*

Данные представлены в виде среднего 30 определений \pm стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от нативных ЛНП, $p<0,05$.

2.3.4.6. Взаимосвязь между уровнем антиоксидантов в ЛНП, степенью *in vivo* окисленности и *in vitro* окисляемостью

В таблице 21 приведены коэффициенты корреляции между уровнем антиоксидантов в ЛНП и содержанием апоВ-связанного холестерина, определяющим степень *in vivo* окисленности липопротеидов. Кроме того, даны коэффициенты корреляции между содержанием антиоксидантов и длительностью периода индукции, отражающей предрасположенность липопротеидов к окислению *in vitro*. Содержание апоВ-связанного холестерина в нативных ЛНП здоровых лиц и пациентов с коронарным атеросклерозом достоверно коррелировало с содержанием убихинола и с суммарным уровнем убихинола и убихинона. С другой стороны, содержание апоВ-связанного холестерина в цмЛНП прямо коррелировало с абсолютным содержанием убихинона и его процентным содержанием и обратно коррелировало с уровнем убихинола (таблица 21). Обратная корреляция была также обнаружена между уровнем апоВ-связанного холестерина и содержанием β-каротина в цмЛНП.

Уровень апоВ-связанного холестерина в цмЛНП обратно коррелировал с длительностью периода индукции при *in vitro* окислении липопротеидов.

Продолжительность периода индукции при медь-зависимом окислении нативных ЛНП прямо коррелировала с количеством окисленной формы кофермента Q и ее процентным содержанием (таблица 21). Напротив, длительность периода индукции окисления цмЛНП имела достоверную обратную связь с двумя этими параметрами. Достоверная корреляция между длительностью периода индукции окисления цмЛНП была выявлена для уровня α-

токоферола и β -каротина (таблица 21).

Уровни γ -токоферола и ликопина в нативных и цмЛНП не коррелировали ни с уровнем апоВ-связанного холестерина, ни с продолжительностью периода индукции окисления липопротеидов (таблица 21).

Таблица 21. Коэффициенты корреляции между содержанием апоВ-связанного холестерина, длительностью периода индукции окисления *in vitro* и уровнем антиоксидантов в нативных ЛНП и цмЛНП

Антиоксидант	АпоВ-связанный холестерин		Длительность периода индукции	
	Нативные ЛНП	ЦмЛНП	Нативные ЛНП	ЦмЛНП
α -Токоферол	0,32	-0,23	0,20	0,55*
γ -Токоферол	0,20	-0,04	0,26	0,31
CoQ ₁₀	-0,14	0,55*	0,63*	-0,46*
CoQ ₁₀ H ₂	0,50*	-0,40*	-0,32	0,18
CoQ ₁₀ +CoQ ₁₀ H ₂	0,49*	-0,31	-0,23	0,11
CoQ ₁₀ /(CoQ ₁₀ + CoQ ₁₀ H ₂)	-0,32	0,63*	0,41*	-0,50*
β -Каротин	0,28	-0,51*	-0,09	0,60*
Ликопин	-0,03	-0,19	-0,06	0,07
Длительность периода индукции	-0,26	-0,61*	1,00	1,00

*, p<0,05.

Длительность периода индукции медь-зависимого окисления суммарных препаратов ЛНП, полученных из крови здоровых лиц и пациентов, обратно коррелировала с процентным содержанием в них цмЛНП ($r=0.68$, $n=20$, $p<0.05$).

2.3.4.7. Взаимосвязь между степенью окисленности ЛНП и их атерогенностью

В этой части работы мы попытались выявить взаимосвязь между атерогенностью ЛНП и степенью их окисленности. Для этого были использованы два подхода. Во-первых, было изучено, как окисление *in vitro* влияет на уровень апоВ-связанного холестерина в ЛНП и на способность этих липопротеидов накапливать липиды в клетках, культивируемых из непораженной интимы аорты человека. Во-вторых, была исследована взаимосвязь между содержанием апоВ-связанного холестерина в свежевыделенных ЛНП здоровых лиц и пациентов и атерогенностью этих липопротеидов, выявляемой в культуре клеток.

2.3.4.7.1. Характеристика ЛНП, использованных в исследовании

Были использованы препараты ЛНП, полученные из крови здоровых лиц, а также пациентов с коронарным атеросклерозом с гиперхолестеринемией или без нее. Как следует из данных, приведенных в таблице 22, ЛНП здоровых лиц не вызывали в среднем достоверного увеличения содержания холестерина в гладкомышечных клетках, культивируемых из непораженной интимы аорты человека. Лишь 6 из 30 препаратов ЛНП здоровых лиц были атерогенны, вызывая увеличение холестерина на 121-175% от контроля. Напротив, большая

часть ЛНП пациентов (23 из 30 в группе нормолипидемиков и 22 из 30 в группе гиперхолестеринемиков) стимулировали внутриклеточное накопление холестерина. Эти данные хорошо согласуются с ранее опубликованными данными о распространенности атерогенных ЛНП в крови здоровых лиц и пациентов [Orehkov et al., 1988; Tertov et al., 1988].

Таблица 22. Содержание апоB-связанного холестерина и атерогенность ЛНП, выделенных из крови здоровых лиц и пациентов

	Внутриклеточное содержание холестерина, % от контроля	АпоB-связанный холестерин, моль/моль апоB
Контроль	100±5	-
Здоровые лица	113±4	1,38±0,19
Пациенты с коронарным атеросклерозом	167±11*	1,77±0,18
Пациенты с коронарным атероскллерозом и гиперхолестеринемией	204±18*	2,20±0,35#

Данные представлены в виде среднего ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, p<0,05. #, достоверное отличие от здоровых лиц, p<0,05.

Помимо атерогенных свойств ЛНП в препаратах липопротеидов было определено содержание апоВ-связанного холестерина - показателя, отражающего степень окисленности выделенных ЛНП. В ЛНП здоровых лиц содержание белок-связанного холестерина составило в среднем 1,38 моль/моль апоВ (таблица 22). Средний уровень апоВ-связанного холестерина в группе пациентов с коронарным атеросклерозом с нормальным уровнем липидов крови был в среднем несколько выше, чем у здоровых доноров (таблица 22). Однако, данные различия не были статистически значимы. Среднее содержание апоВ-связанного холестерина в группе пациентов с гиперхолестеринемией было достоверно выше на 59% по сравнению со здоровыми донорами.

В дальнейшем мы исследовали, как окисление *in vitro* влияет на атерогенность ЛНП, а также как коррелирует степень *in vivo* окисленности ЛНП с их способностью аккумулировать липиды в клетках.

2.3.4.7.2. Окисление ЛНП *in vitro* и их атерогенность

На рисунке 14 представлены кинетики изменения ряда параметров ЛНП, выделенных из крови здорового донора, при их окислении ионами меди. Уровни конъюгированных диенов, гидроперекисей и ТБК-реактивных продуктов были максимальны в интервале 2-4 часов окисления. Далее содержание гидроперекисей в ЛНП снижалось, а содержание конъюгированных диенов и ТБК-реактивных продуктов не претерпевало существенных изменений (рис. 14).

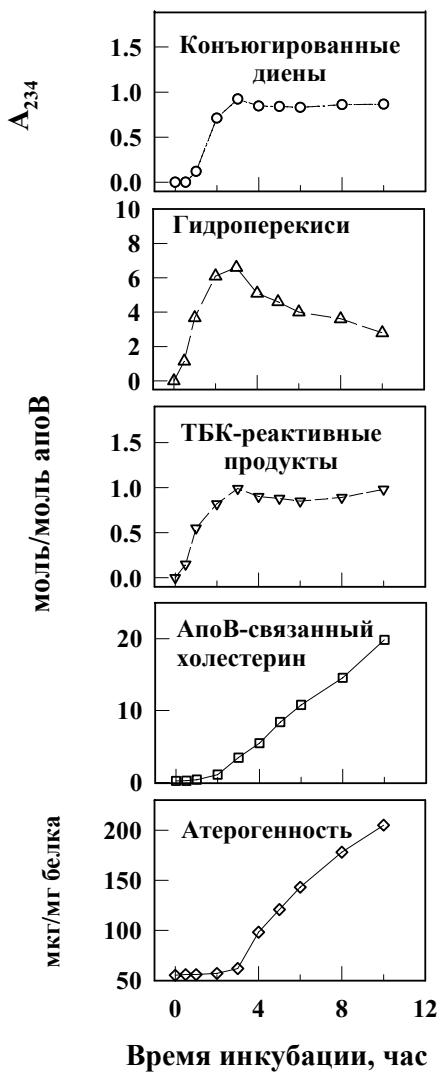


Рис. 14. Временная зависимость образования конъюгированных диенов, гидроперекисей, ТБК-реактивных продуктов, апоВ-связанного холестерина и атерогенности при медь-зависимом окислении. Каждая точка - результат двух определений.

Содержание апоВ-связанного холестерина медленно возрастало вплоть до 2-х часов окисления (рис. 14). В дальнейшем скорость образования аддуктов холестерина и белка увеличивалась и была близка к линейной вплоть до 10 часов инкубации.

Добавление неокисленных ЛНП здорового донора к гладкомышечным клеткам интимы аорты человека не вызывало в них накопления общего холестерина (рис. 14). Окисление ЛНП ионами меди в течение 3-х часов не влияло на их способность вызывать внутриклеточную аккумуляцию холестерина. ЛНП, окисленные в течение 4-10 часов, вызывали 1,5-5-кратное увеличение внутриклеточного содержания холестерина (рис. 14).

Необходимо отметить, что к моменту появления атерогенности у окисляемых ЛНП, уровень апоВ-связанного холестерина составил 6,7 моль/моль. Это значение намного превосходит средний уровень апоВ-связанного холестерина как для здоровых лиц, так и для пациентов с коронарным атеросклерозом с и без гиперхолестеринемией (таблица 22).

Хорошо известно, что *in vitro* окисление ЛНП сопровождается образованием агрегатов липопротеидных частиц [Tertov et al., 1989, 1992b; Hoff, O'Neil, 1991; Hazel, Stocker, 1993; Kawabe et al., 1994; Maebe et al., 1994]. Мы показали, что именно агрегаты ЛНП, но не отдельные липопротеидные частицы, вызывают накопление холестерина в гладкомышечных клетках интимы аорты и моноцит-производных макрофагах человека [Tertov et al., 1989, 1992b]. В этой части исследования мы оценили уровень апоВ-связанного холестерина в агрегатах и неагрегированных частицах окисляемых ЛНП. Как следует из данных, приведенных на

рисунке 25, содержание апоВ-связанного холестерина как в отдельных частицах (рис. 15.1), так и в агрегатах (рис. 15.2) ЛНП, окисляемых ионами меди было сходным. Агрегаты, полученные центрифугированием из препарата ЛНП, окисляемого в течение 1-го часа, вызывали накопление холестерина в клетках. При этом уровень апоВ-связанного холестерина в агрегатах составлял 0,58 моль/моль. В ходе дальнейшего окисления уровень белок-связанного холестерина достигал 20 моль/моль, а атерогенность увеличивалась с 35 до 480% (рис. 15.2 и 15.4). Неагрегированные ЛНП проявляли способность накапливать холестерин в клетках лишь спустя 8 и 10 часов инкубации с ионами меди (на 43 и 65%, соответственно) (рис. 15.3). Содержание апоВ-связанного холестерина в этих двух препаратах составляло 12,7 и 17,5 моль/моль. Суммируя полученные данные, можно заключить, что атерогенность Cu^{2+} -окисленных ЛНП связана, в первую очередь, с образованием агрегатов, а не со степенью окисленности липопротеидов.

Сходные данные были получены нами при окислении ЛНП в течение 10 часов с помощью ААПГ и гипохлорита натрия. Как следует из таблицы 23 при обоих способах окисления агрегированные и неагрегированные ЛНП имели одинаковую и очень высокую степень окисленности. Однако, в отличие от агрегатов ЛНП, неагрегированные частицы, в той же концентрации не вызывали достоверного увеличения уровня холестерина в гладкомышечных клетках непораженной интимы аорты человека (таблица 23). Таким образом, причиной атерогенности *in vitro* окисленных ЛНП является образование агрегатов окисленных частиц.

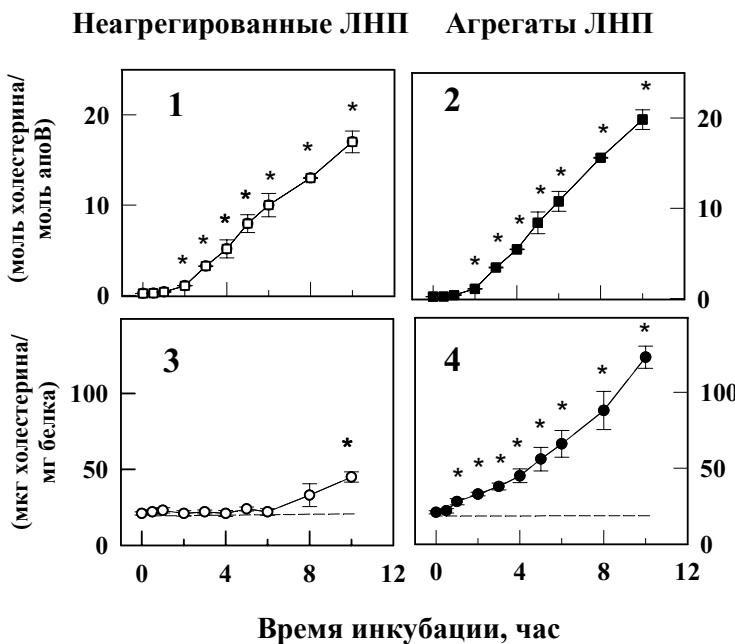


Рис. 15. Временная зависимость содержания апоВ-связанного холестерина и атерогенности агрегированных и неагрегированных медь-окисленных ЛНП. Данные представлены в виде среднего двух (апоВ-связанный холестерин) или трех (атерогенность) определений.

Таблица 23. Содержание апоB-связанного холестерина и атерогенность ЛНП, окисленных ААПГ и гипохлоритом

	Внутриклеточное содержание холестерина, мкг/мг белка	АпоB-связанный холестерин, моль/моль апоB
Контроль	24.4±1.3	-
Необработанные ЛНП	24.8±1.5	0.49
ААПГ-окисленные ЛНП		
Суммарные	56.2±2.7*	7.9
Агрегированные	78.3±5.4*	8.1
Неагрегированные	28.5±2.4	7.3
НОCl-окисленные ЛНП		
Суммарные	50.7±1.4*	6.5
Агрегированные	62.5±3.8*	6.5
Неагрегированные	25.5±0.9	5.8

Препараты ЛНП (5 мг/мл) инкубировали 10 часов при 37°C с 0.2 mM ААПГ или при 4°C с 0.1 mM NaOCl. Данные представлены в виде среднего 30 определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, p<0.05. Уровень апоB-связанного холестерина - среднее двух определений.

2.3.4.7.3. Взаимосвязь между атерогенностью и степенью окисления *in vivo*

На рисунке 16 приведены данные о взаимосвязи между содержанием апоВ-связанного холестерина в свежевыделенных ЛНП здоровых лиц и пациентов с коронарным атеросклерозом и способностью этих липопротеидов увеличивать содержание общего холестерина в клетках, культивируемых из нормальной интимы. Можно видеть, что корреляция между степенью окисленности всех исследованных препаратов ЛНП и их атерогенностью отсутствует ($r=0,12$, $n=90$). Нам не удалось также выявить эту взаимосвязь отдельно в группе здоровых лиц и группах пациентов с коронарным атеросклерозом с гиперхолестеринемией и без нее (коэффициенты корреляции равны 0,33, -0,01, 0,01, соответственно, $p>0,1$). Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что атерогенность ЛНП людей не коррелирует со степенью окисленности этих липопротеидов.

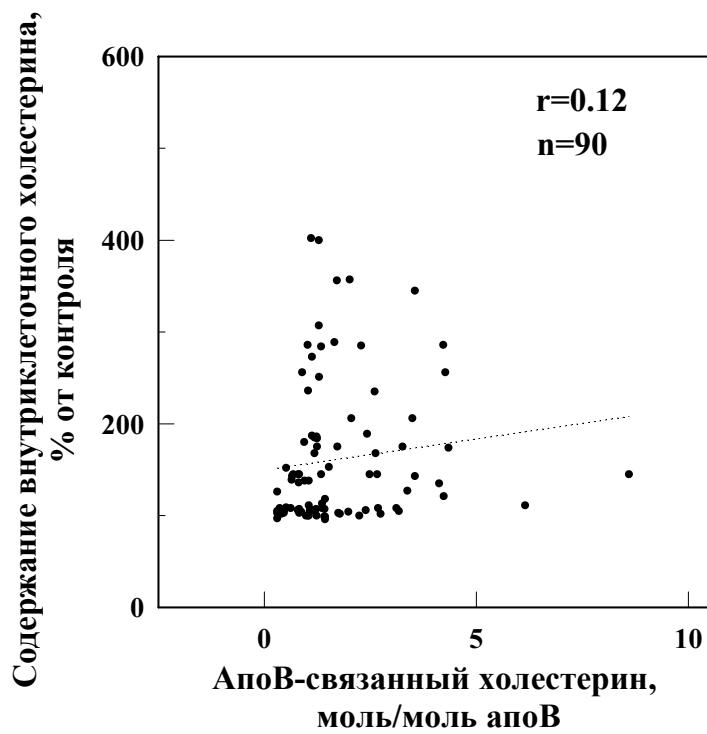


Рис. 16. Взаимосвязь между содержанием апоВ-связанного холестерина в ЛНП и их атерогенностью.

2.3.4.8. Обсуждение результатов

В настоящем исследовании продемонстрировано, что протекание окислительных процессов в липопротеидах низкой плотности приводит к образованию аддуктов липидов с апоВ. Эти липиды не могут быть удалены из препарата белка с помощью экстракции органическими растворителями. Однако, после мягкого щелочного гидролиза наличие стеролов (холестерина) в делипидированных препаратах апоВ было обнаружено колориметрической реакцией с ионами железа в кислой среде и жидкостной хроматографией высокого разрешения. Присутствие белок-связанного фосфора также было обнаружено в окисленных, но не нативных ЛНП. Окисление ЛНП, меченых радиоактивными липидами, продемонстрировало, что способность связываться с апоВ зависит от степени ненасыщенности жирных кислот, входящих в состав эфиров холестерина и фосфолипидов. Связывание последних наиболее выражено при наличии свободных аминогрупп в "голове" фосфолипида. Помимо остатков свободного и этерифицированного холестерина и фосфолипидов, способностью связываться с апоВ обладают также и остатки триглицеридов и свободных жирных кислот.

Сопоставление кинетики образования продуктов перекисного окисления липидов выявило, что в отличие от гидроперекисей и ТБК-реактивных продуктов содержание белок-связанных липидов монотонно возрастает. Это может объясняться тем, что в отличие от карбонильных соединений и гидроперекисей, белок-связанные липиды обладают большей стабильностью и, будучи ковалентно связанными, не покидают липопротеидную частицу. Таким образом, накопление апоВ-связанных липидов может быть маркером протекания

окислительных процессов в липопротеидах.

В этой работе мы нашли, что содержание апоВ-связанного холестерина во цмЛНП превышает его содержание в нативных ЛНП. Мы обнаружили, что цмЛНП имеют низкое содержание жирорастворимых антиоксидантов и повышенную способность к окислению *in vitro* (см. ниже). Было показано также, что время жизни десиалированных ЛНП в кровотоке больше, чем у нативных ЛНП [Orehov, Tertov, 1991]. Эти данные позволяют предположить, что длительное циркулирование липопротеидов в кровотоке увеличивает вероятность протекания процессов окисления липидов, сопровождающихся и ускоряющихся потерей антиоксидантов, о чем и свидетельствует накопление в частицах стабильных апоВ-связанных липидных остатков.

Таким образом, в настоящем исследовании обнаружено, что при протекании *in vitro* перекисного окисления липидов в липопротеидах низкой плотности накапливаются стабильные продукты - аддукты липидов с апоВ. Эти продукты были найдены также в ЛНП, выделенных из крови человека. Можно предположить, что дальнейшее изучение механизмов образования связанных с белками липидных остатков, исследование их локализации и кинетики накопления в стенке сосуда позволит расширить наши представления о патогенезе атеросклероза. Дальнейшие исследования позволят оценить диагностическую и прогностическую значимость определения уровня апоВ-связанных липидов как показателя окисленности ЛНП.

Полученные в этом исследовании данные свидетельствуют о том, что содержание апоВ-связанного холестерина в цмЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом в среднем в несколько раз выше, чем в нативных ЛНП. Как

указывалось ранее, образовавшиеся в результате липопероксидации аддукты липидов с апобелком не могут покинуть липопротеидную частицу и их уровень отражает интенсивность процессов перекисного окисления липидов, имевших место в частицах *in vivo*. Таким образом, результаты настоящей работы являются, по-видимому, первым строгим доказательством протекания липопероксидации в одной из подфракций липопротеидов низкой плотности, циркулирующих в крови человека. Из наших данных вытекает, что цмЛНП более окисленные, чем нативные ЛНП.

Другим доказательством усиленного протекания процессов перекисного окисления липидов в цмЛНП является увеличенная доля окисленной формы убихинона по сравнению с нативными липопротеидами. При этом следует отметить, что суммарное содержание убихинона и убихинола в нативных ЛНП здоровых лиц близко к 1 молекуле на частицу липопротеида, и лишь 10% антиоксиданта окисленно. Суммарное содержание убихинона и убихинола в цмЛНП как здоровых лиц, так и пациентов достоверно меньше, чем в нативных ЛНП, что, по-видимому, отражает потерю липидов частицами модифицированных ЛНП [Tertov et al., 1992]. Однако, доля окисленной формы убихинона в цмЛНП как у здоровых лиц (15%), так и у пациентов (36%) выше, чем в нативных ЛНП.

Оба обнаруженных факта, указывающих на возможное протекание процессов перекисного окисления липидов в цмЛНП *in vivo*, по всей видимости, не являются независимыми событиями. Действительно, наши результаты показывают, что содержание апоВ-связанного холестерина в цмЛНП прямо коррелирует с абсолютным и относительным содержанием убихинона и имеет отрицательную корреляцию с содержанием

восстановленной формы антиоксиданта. Можно предположить, что протекание процессов перекисного окисления в модифицированных ЛНП сопровождается как снижением уровня восстановленной и накоплением окисленной форм кофермента Q, так и возрастанием содержания апоВ-связанного холестерина.

Противоположная картина соотношения между уровнем апоВ-связанного холестерина и содержанием убихинона и убихинола была обнаружена для нативных ЛНП. Абсолютным сюрпризом для нас явилось наличие прямой и тесной корреляции между содержанием апоВ-связанного холестерина в нативных ЛНП и уровнем в них убихинола и суммарного уровня убихинона и убихинола. Этот факт противоречит представлению об антиоксидантной роли убихинола в нативных ЛНП. Более того, наличие прямой корреляции между длительностью периода индукции медь-зависимого окисления нативных ЛНП и абсолютным и относительным содержанием в них убихинона также позволяет предположить прооксидантную функцию кофермента Q в изолированных нативных ЛНП.

Несколько лет назад Стокер и др. предложили интересную гипотезу о прооксидантной роли α -токоферола в инициированном радикалами окислении изолированных ЛНП [Bowry, Stocker, 1992]. Было показано, что инициированное водо- и жиро-растворимыми азо-инициаторами и ионами переменной валентности окисление ЛНП усиливается с возрастанием концентрации α -токоферола в липопротеидах [Bowry et al., 1992]. Авторы предполагают, что окисление ЛНП инициируется реакцией ROO[·]-радикалов с α -токоферолом, приводящей к образованию α -токофероксил-радикала, реагирующего далее с полиненасыщенными жирными кислотами

липидов. Одним из механизмов, препятствующих токоферол-опосредованной пероксидацiiи, как предполагается, является восстановление радикала α -токоферола убихинолом с образованием семиубихинон-радикала [Kagan et al., 1990]. Последний, в свою очередь, взаимодействует с молекулой кислорода, образуя убихинон и генерируя O_2^- [Stoker et al., 1991, Mohr et al., 1992].

В связи с этой гипотезой необходимо сделать несколько замечаний. Во-первых, константа скорости реакции пероксил-радикалов с убихинолом по разным данным близка или больше, чем константа для α -токоферола [Mellors, Tappel, 1966; Petrushevich, Slavinsky, 1969]. Более того, Sato et al. [1990] показали, что при окислении ЛНП убихинол первым подвергается разрушению. Таким образом, при инициации липопероксидацiiи в ЛНП образуются семиубихинон-радикалы, способные вступать в реакцию и полиненасыщенными жирными кислотами. Во-вторых, константа скорости реакции токофероксил-радикала с α -токоферолом в 2,5 раза выше, по сравнению с константой скорости реакции для убихинола [Mukai et al., 1992]. Принимая во внимание 10-20-кратное концентрационное превосходство в ЛНП α -токоферола по сравнению с убихинолом, можно предположить, что убихинол не является основным тушителем токофероксил-радикала в липидной фазе липопротеидов. В-третьих, Lee и Trush [1993] обнаружили, что гидрохинон способен восстанавливать ионы Cu^{2+} до Cu^{1+} , необходимые для инициации перекисного окисления липидов, и продуцировать гидроперекиси. В-четвертых, образующийся при взаимодействии семиубихинон-радикала с молекулой кислорода супероксиданион-радикал, может усиливать процесс пероксидацiiи в ЛНП. Так, было

показано, что стимуляция клеток к генерации супероксидион-радикала усиливала окисление ЛНП, а супероксиддисмутаза ингибировала этот процесс [Hiramatsu et al., 1987; Steinbrecher, 1988; Cathcart et al., 1989]. С другой стороны, Garner et al. [1994] показали, что активация макрофагов к генерации супероксидион-радикала не сопровождалась усилением окисления ЛНП на начальных этапах. Используя генерацию супероксидион-радикала с помощью системы ксантин-ксантиноксидазы- Fe^{2+} , Lynch и Frei [1993] продемонстрировали окисление ЛНП. Изложенные факты позволяют предположить, что в определенных условиях (нативные ЛНП, высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот и жирорастворимых антиоксидантов) кофермент Q может служить прооксидантом и иметь аддитивный или даже синергический эффект на токоферол-опосредованную пероксидацию.

При исследовании роли кофермента Q в процессах перекисного окисления липидов в ЛНП Линч и Фрей, а также Контуш и др. не обнаружили корреляции между длительностью лаг-фазы при медь-зависимом окислении суммарных препаратов ЛНП и содержанием в них кофермента Q [Lynch, Frei, 1993; Kontush et al., 1994]. С другой стороны, Kontush et al. [1996] показали, что нагрузка ЛНП высокими концентрациями кофермента Q приводит к большей устойчивости липопротеидов по отношению к *in vitro* окислению. Сходные данные были получены ранее Mohr et al. [1992]. Однако, эти исследования проводились на суммарных препаратах ЛНП и роль кофермента Q во фракции нативных липопротеидов не изучалась. Tribble et al. [1994] обнаружили прямую корреляцию между содержанием убихинола и длительностью лаг-фазы окисления средних и плотных ЛНП, выделенных из крови

здоровых лиц. Однако, как указывают сами авторы, экстремально низкий уровень убихинола предполагает окисление ЛНП во время их выделения и хранения. Таким образом, данные других авторов не исключают того, что кофермент Q может играть прооксидантную роль в нативных ЛНП, обогащенных убихинолом и имеющих высокое содержание ненасыщенных жирных кислот в качестве субстрата для окисления. Однако для подтверждения или опровержения такого предположения необходимы дополнительные исследования, проведенные на препаратах нативных ЛНП, очищенных от модифицированных ЛНП.

Длительность лаг-фазы медь-зависимого окисления цмЛНП прямо коррелировала с содержанием в них α -токоферола и β -каротина, что свидетельствует о защитной роли этих антиоксидантов при перекисном окислении липидов в условиях *in vitro*. Важная роль α -токоферола в ингибировании перекисного окисления липидов ЛНП хорошо документирована [Steibrecher et al., 1984; Ignold et al., 1987; Esterbauer et al., 1987]. Esterbauer et al. [1992] показали, что длительность лаг-фазы медь- зависимого окисления суммарных ЛНП пациентов, не подвергавшихся нагрузке витамином Е, не коррелировала с содержанием α -токоферола в липопротеидах . Отсутствие корреляции между уровнем α -токоферола в ЛНП и их способностью к окислению, вызванному гамма-облучением или инкубацией с макрофагами, была продемонстрирована и другими авторами [Babiy et al., 1990; Jessup et al., 1990]. Отсутствие корреляции между уровнем β -каротина и окисляемостью суммарных ЛНП пациентов без нагрузки этим агентом продемонстрирована также рядом авторов [Croft et al., 1995; Cominacini et al., 1991]. В наших экспериментах мы также

не обнаружили взаимосвязи между уровнями α -токоферола и β -каротина и окисляемостью суммарных ЛНП, выделенных из плазмы крови здоровых лиц и пациентов с коронарным атеросклерозом. Наличие обратной корреляции между содержанием экзогенных антиоксидантов и окисляемостью цмЛНП позволяет предположить, что после окисления убихинола до убихинона в модифицированных липопротеидных частицах эти агенты являются основной защитой от липопероксидации.

Механизм антиоксидантного действия β -каротина в ЛНП до конца не выяснен. Предполагается, что β -каротин способен тушить синглетный кислород [Foote, Denny, 1968] и действовать как обрывающий цепь антиоксидант [Burton, Ignold, 1984]. По данным Wagner et al. [1993] β -каротин ЛНП является одним из наиболее эффективных тушителей синглетного кислорода. Тот факт, что содержание апоВ-связанного холестерина в цмЛНП имело обратную корреляцию с уровнем β -каротина в этих липопротеидах, предполагает важную роль синглетного кислорода в образовании аддуктов липидов с апоВ. Содержание других каротиноидов (α -каротина, лютеина, зеаксантина, криптоксантина) составляло менее 100 ммоль/моль апоВ (т.е. менее одной молекулы на 10 частиц), не коррелировало ни со степенью окисленности, ни с окисляемостью ЛНП и в данной работе не приводится.

В настоящем исследовании мы обнаружили обратную корреляцию между продолжительностью периода индукции медицинского окисления цмЛНП и содержанием в них апоВ-связанного холестерина. Эти данные свидетельствуют о том, что протекание процессов перекисного окисления липидов *in vivo* делает липопротеиды более предрасположенными к

окислению *in vitro*.

Результаты нашей работы свидетельствуют, что нативные ЛНП и цмЛНП, разделенные лектин-хроматографией, представляют собой частицы, различающиеся по степени *in vivo* окисленности и устойчивости к окислению *in vitro*. При этом, предрасположенность суммарных ЛНП к *in vitro* окислению прямо коррелирует с долей цмЛНП в изолированных препаратах.

Различие в устойчивости к *in vitro* окислению отличающихся по плотности подфракций ЛНП здоровых лиц было продемонстрировано Trible et al. [1994]. Было показано также сниженное содержание α -токоферола и убихинола-10 во фракции плотных ЛНП. Высокая восприимчивость плотных ЛНП к *in vitro* окислению была выявлена также и другими авторами [De Graaf et al., 1991; Tribble et al., 1992; Dejager et al., 1993]. Avogaro et al. [1991] показали, что подфракция электроотрицательных ЛНП, выделенная с помощью ионообменной хроматографии, содержит в два раза меньше α -токоферола по сравнению с нативными липопротеидами. Было продемонстрировано также, что электроотрицательные ЛНП имеют большую предрасположенность к *in vitro* окислению [Sevanian et al., 1996]. Более того, предрасположенность суммарных ЛНП к *in vitro* окислению прямо коррелировала с процентным содержанием в них электроотрицательных ЛНП. Большую окисляемость подфракции электроотрицательных ЛНП обнаружили также Shimano et al. [1991]. В этой работе мы показали, что цмЛНП, мелкие плотные ЛНП и электроотрицательные ЛНП обладают близкими физическими характеристиками, имеют сходный химический состав и представляют собой одни и те же липопротеидные частицы,

подвергшиеся множественной модификации. Результаты, полученные в этой работе, а также данные других исследователей являются дополнительным подтверждением этой гипотезы. С другой стороны, анализ данных этой работы приводит к заключению о том, что ввиду резких различий в степени окисленности, *in vitro* окисляемости и содержании антиоксидантов в нативных и модифицированных ЛНП, исследование процессов перекисного окисления липидов и механизмов действия антиоксидантов необходимо проводить с использованием изолированных подфракций липопротеидов, но не суммарных образцов ЛНП.

Имея стабильный маркер липопероксидации - апоВ-связанный холестерин, мы изучили взаимосвязь между *in vitro* окислением ЛНП и их атерогенностью, т.е. способностью накапливать общий холестерин в клетках интимы аорты человека. Первый факт, который мы обнаружили, свидетельствует о том, что способность ЛНП накапливать внутриклеточные липиды проявлялась только тогда, когда содержание апоВ-связанного холестерина значительно превосходило его средний уровень в свежевыделенных ЛНП не только здоровых лиц, но и пациентов, свидетельствуют о несоответствии между степенью окисления *in vivo* и атерогенными свойствами ЛНП.

Одним из следствий протекания процессов перекисного окисления липидов ЛНП является образование агрегатов липопротеидов [Tertov et al., 1989, 1992b; Hoff, O'Neil, 1991; Hazel, Stocker, 1993; Kawabe et al., 1994; Maebe et al., 1994; см также Главу 7.1]. Мы обнаружили, что удаление агрегатов окисленных ЛНП из культуральной среды методом фильтрации полностью предотвращает накопление липидов в

гладкомышечных клетках интимы аорты и моноцит-производных макрофагах человека [Tertov et al., 1989, 1992b]. Позднее Kawabe et al. [1994] показали, что именно агрегаты окисленных ЛНП вызывают, в отличие от нативных ЛНП, накопление липидов в макрофагах мыши. Maebe et al. [1994] продемонстрировали, что агрегаты, но не индивидуальные частицы, окисленных ЛНП ответственны за усиление синтеза эфиров холестерина в мышиных макрофагах. Результаты этого исследования согласуются с полученными ранее данными. Обращает на себя внимание тот факт, что агрегированные ЛНП, окисленные в течение 1-2 часов, имеют относительно низкое содержание белок-липидных аддуктов, т.е. имеют низкую степень окисления, однако, вызывают накопление холестерина в клетках. Напротив, неагрегированные высокоокисленные частицы ЛНП, окисленных в течение 4-8 часов, хотя и содержат большое количество белок-связанного холестерина, не проявляют атерогенных свойств. Приведенные данные прямо свидетельствуют о том, что именно образование агрегатов определяет атерогенность препаратов ЛНП, окисленных *in vitro* с помощью различных агентов. Неагрегированные частицы ЛНП, окисленные в той же степени, были неатерогенны.

Мы также исследовали, как коррелирует степень окисленности свежевыделенных ЛНП здоровых лиц и пациентов с коронарным атеросклерозом с их способностью накапливать внутриклеточные липиды. Мы показали, что ЛНП являются атерогенными у 15-25% здоровых доноров и у 80-85% пациентов [Orekhov et al., 1988; Tertov et al., 1988]. В настоящем исследовании 28% ЛНП здоровых лиц, а также 68% ЛНП пациентов без гиперхолестеринемии и 85% пациентов с гиперхолестеринемией вызывали отложение внутриклеточного

жира. Мы не обнаружили корреляции между степенью *in vivo* окисленности ЛНП и способностью этих липопротеидов вызывать накопление внутриклеточных липидов.

Таким образом, результаты настоящей работы демонстрируют, что атерогенные свойства ЛНП, циркулирующих в крови человека, по видимому, не связаны с протеканием в них процессов перекисного окисления липидов, а являются отражением других произошедших с липопротеидами модификаций.

2.3.5. Взаимосвязь между выраженностью различных модификаций ЛНП и атерогенностью липопротеидов

Данные, приведенные в этой главе, показывают, что подфракция атерогенных цмЛНП представляет собой мелкие, плотные, более отрицательно заряженные частицы, имеющие по сравнению с нативными липопротеидами, изменения в липидной, белковой и углеводной составляющих. Все это позволяет определить их как МНОЖЕСТВЕННО-МОДИФИЦИРОВАННЫЕ липопротеиды низкой плотности. Для решения вопроса о том, какие именно изменения могут определять атерогенный потенциал ЛНП, мы провели корреляционный анализ между выраженностью изменений некоторых параметров ЛНП и способностью липопротеидов вызывать накопление липидов в гладкомышечных клетках интимы аорты человека. Была обнаружена достоверная обратная корреляция между атерогенностью ЛНП и содержанием в них сиаловой кислоты ($r=-0,66$, $p<0,05$). Другие исследованные параметры: размер и заряд частиц ЛНП, содержание нейтральных липидов и фосфолипидов, уровни жирорастворимых антиоксидантов, концентрации продуктов перекисного окисления липидов, количество свободных аминогрупп лизина, степень окисленности и окисляемость ЛНП, с атерогенностью липопротеидов не коррелировали. Таким образом, десиалирование липопротеидов является, по-видимому, одной из наиболее важных модификаций, способствующих проявлению атерогенных свойств.

2.4. ЦмЛНП и другие модифицированные ЛНП, обнаруженные *in vivo*

2.4.1. Содержание сиаловой кислоты в электроотрицательных и аортальных ЛНП

Помимо циркулирующих множественно-модифицированных ЛНП у человека были найдены также другие *in vivo* модифицированные ЛНП, а именно: электроотрицательные ЛНП [Avogaro et al., 1988], мелкие/плотные ЛНП [Schen et al., 1981], а также ЛНП, выделенные из аорты человека (аортальные ЛНП) [Hoff et al., 1979]. Как и цмЛНП, перечисленные липопротеиды вызывали накопление липидов в макрофагах [Avogaro et al., 1991; Tertov et al., 1992; Hoff, O'Neil, 1991]. La Belle and Krauss [1990] показали, что мелкие/плотные ЛНП имеют низкий уровень сиаловой кислоты. Нами также было обнаружено, что наиболее плотные подфракции ЛНП содержат наименьшее количество сиаловой кислоты (см. Главу 3.2.2.). Таким образом, мелкие/плотные ЛНП являются десиализованными липопротеидами. В настоящей работе мы определили содержание сиаловой кислоты в двух других природных модифицированных липопротеидах: электроотрицательных ЛНП и аортальных ЛНП. Помимо этого была изучена способность электроотрицательных и аортальных ЛНП стимулировать накопление липидов в клетках непораженной интимы аорты человека.

В таблице 24 приведены данные о содержании сиаловой кислоты в нативных и электроотрицательных ЛНП. Уровень сиаловой кислоты в элэтроотрицательных ЛНП (ЛНП⁻) всех исследованных здоровых доноров был на 18-60% ниже, чем в подфракции нативных ЛНП. Содержание сиаловой кислоты в подфракции нативных ЛНП пациентов с коронарным

атеросклерозом было таким же? как и в подфракции нативных ЛНП здоровых лиц (таблица 24). Во всех исследованных случаях содержание сиаловой кислоты в подфракции электроотрицательных ЛНП пациентов было на 32-63% ниже, чем в подфракции нативных ЛНП. Необходимо отметить, что средний уровень сиаловой кислоты во фракции электроотрицательных ЛНП пациентов был значительно ниже, чем уровень сиаловой кислоты в подфракции электроотрицательных ЛНП здоровых лиц (таблица 24).

Содержание сиаловой кислоты в ЛНП, выделенных из непораженной интимы аорты, было на 20-35% ниже, чем в ЛНП, полученных из плазмы того же субъекта (таблица 25). Сниженный по сравнению с липопротеидами плазмы на 22-56% уровень сиаловой кислоты был обнаружен и в ЛНП, полученных из липидных полос. Содержание сиаловой кислоты в ЛНП из липидных полос было ниже, чем в ЛНП из непораженной интимы (таблица 25).

Способность ЛНП вызывать накопление липидов была исследована в первичной культуре клеток непораженной интимы аорты человека. Подфракции нативных ЛНП, выделенные из плазмы крови как здоровых лиц, так и пациентов с коронарным атеросклерозом, не стимулировали накопления суммарного холестерина в интимальных клетках (таблица 26). Подфракция электроотрицательных ЛНП здоровых лиц увеличивала содержание внутриклеточного холестерина в 1,6 раза. Еще более выраженную атерогенность проявляла подфракция электроотрицательных ЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом (таблица 26). Аортальные ЛНП, полученные из жировых полос, стимулировали 2,5-кратное накопление холестерина в клетках (таблица 26).

Таблица 24. Содержание сиаловой кислоты в электроотрицательных ЛНП

Донор	Содержание сиаловой кислоты, нмоль/мг апоB	
	Нативные ЛНП	Электроотрицательные ЛНП
Здоровые лица		
1	42,5±3,4	34,8±2,3*
2	42,0±2,8	23,5±1,4*
3	41,6±3,3	16,4±1,1*
4	37,2±2,3	19,4±1,2*
5	35,5±1,4	21,2±1,4*
Среднее	39,8±1,4	23,1±3,2*
Пациенты с коронарным атеросклерозом		
1	42,7±2,3	11,5±2,2*
2	40,7±1,7	18,7±2,0*
3	38,7±1,5	19,4±2,3*
4	38,6±1,1	10,5±1,4*
5	31,3±1,0	8,6±0,6*
Среднее	38,4±1,9	13,7±2,2*#

Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от нативных ЛНП, $p<0,05$. #, достоверное отличие от здоровых лиц, $p<0,05$.

Таблица 25. Содержание сиаловой кислоты в нативных ЛНП плазмы и аортальных ЛНП

Пациент	Содержание сиаловой кислоты, нмоль/мг апов		
	Нативные ЛНП		Аортальные ЛНП
	Непораженная интима	Жировая полоса	
1	32,4±2,6	20,9±0,2	н.и.
2	15,3±0,5	н.и.	12,0±0,2*
3	29,2±2,7	н.и.	15,1±2,1*
4	33,0±1,0	21,3±2,0*	14,5±0,3*#
5	43,6±2,6	31,3±1,5*	25,6±1,3*#
6	37,3±2,3	27,5±1,4*	21,4±1,0*#

Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от нативных ЛНП, $p<0,05$. #, достоверное отличие от непораженной интимы, $p<0,05$. Н.и., не исследовали.

Таблица 26. Влияние препаратов ЛНП на содержание суммарного холестерина в клетках, культивируемых из непораженной интимы аорты человека

ЛНП	Внутриклеточное содержание холестерина, % от контроля
Контроль	100±5
Здоровые лица	
Нативные ЛНП (5)	105±4
Электроотрицательные ЛНП (5)	164±16*
Пациенты с коронарным атеросклерозом	
Нативные ЛНП (5)	110±10
Электроотрицательные ЛНП (5)	216±26*
Аортальные ЛНП	
Жировая полоса (5)	186±15*

*, достоверное отличие от контроля, $p<0,05$.

Мы определили взаимосвязь между содержанием сиаловой кислоты в электроотрицательных ЛНП и в аортальных ЛНП и способностью этих липопротеидов стимулировать накопление холестерина в клетках непораженной интимы аорты человека. Обнаружена отрицательная зависимость между атерогенностью ЛНП и содержанием в них сиаловой кислоты ($r=0,90$, $n=15$, $p<0,05$). При этом мы не обнаружили достоверной корреляции между атерогенностью электроотрицательных ЛНП и аортальных ЛНП и содержанием в них ТБК-реактивных продуктов ($r=0,07$) и гидроперекисей ($r=0,05$).

2.4.2. Обсуждение результатов

Полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что подфракция модифицированных электроотрицательных ЛНП имеет низкое содержание сиаловой кислоты, по сравнению с нативными ЛНП. Обнаружено также, что в ЛНП, выделенных из интимы аорты человека, уровень сиаловой кислоты ниже, чем в ЛНП плазмы. Таким образом, электроотрицательные и аортальные ЛНП являются десиализованными формами липопротеидов так же, как и мелкие/плотные и цмЛНП.

Мы показали, что десиализованные ЛНП вызывают накопление нейтральных липидов и, в первую очередь, эфиров холестерина в клетках непораженной интимы аорты человека. Было продемонстрировано также, что подфракция мелких/плотных ЛНП также стимулирует отложение внутриклеточного жира. В этом исследовании обнаружено, что два других типа модифицированных липопротеидов: электроотрицательные и аортальные ЛНП - способны накапливать холестерин в клетках интимы аорты человека.

Таким образом, все известные на сегодняшний день модифицированные *in vivo* ЛНП вызывают накопление липидов в интимальных клетках и являются десиализованными.

Механизмы, обеспечивающие отложение внутриклеточных липидов, опосредованное модифицированными ЛНП, на сегодня не ясны. Тот факт, что самые разнообразные химические и физико-химические изменения в частице ЛНП приводят к универсальному ответу - накоплению липидов в клетках, заставляет предполагать наличие общего(их) этапа(ов) процессинга липопротеидов. Возможно, что такими стадиями являются агрегация ЛНП и последующий захват агрегатов с помощью фагоцитоза. Ранее мы показали, что десиализование, гликозилирование, окисление ЛНП приводят к их агрегации и ускоренному захвату интимальными клетками [Tertov et al., 1989; 1992б]. К агрегации ЛНП приводят также деградация апоВ, модификация фосфолипидов и др. процессы [Kokkonen, Kovanan, 1989; Aviram. Maor, 1992]. По-видимому, изменение распределения поверхностного заряда частицы является основной причиной агрегации ЛНП. Таким образом, любая модификация ЛНП, затрагивающая его поверхностный заряд, способна придать липопротеиду атерогенные свойства. Удаление из частицы отрицательно заряженной сиаловой кислоты приводит к изменению поверхностного заряда ЛНП и должно придавать ему дополнительные атерогенные свойства. Действительно, мы обнаружили тесную взаимосвязь между уровнем сиаловой кислоты и атерогенностью липопротеида. С другой стороны, нам не удалось выявить корреляции между способностью электроотрицательных ЛНП и аортальных ЛНП вызывать накопление холестерина в клетках и содержанием в них продуктов перекисного окисления липидов: ТБК-реактивных

продуктов и гидроперекисей. Этот факт может иметь два объяснения: 1) ЛНП, выделенные из липидных полос (но не атеросклеротических бляшек), а также электроотрицательные ЛНП не являются окисленными липопротеидами; 2) исследованные продукты перекисного окисления липидов были удалены из частицы во время процедуры выделения ЛНП. Для подтверждения или опровержения обоих предположений необходимо дальнейшее изучение содержания стабильных продуктов окисления как в электроотрицательных ЛНП, так и в аортальных ЛНП.

2.4.3. Сравнение свойств обнаруженных *in vivo* модифицированных ЛНП

Общепринятым является мнение, что основной тип модифицированных ЛНП, встречающийся *in vivo*, - это окисленные ЛНП. Тем не менее, до сих пор, окисленные ЛНП не были обнаружены в крови человека. С другой стороны, было выявлено несколько типов природных модификаций ЛНП, циркулирующих в крови, а именно: мелкие/плотные ЛНП, электроотрицательные ЛНП, цмЛНП и аортальные ЛНП [Yla-Herttula et al., 1989; Hoff, O'Neil, 1991]. Обнаруженные *in vivo* типы модифицированных ЛНП, обладающих атерогенными свойствами, имеют много сходных и частично перекрывающих друг друга свойств, которые обсуждены ниже.

1. Атерогенные свойства циркулирующих модифицированных ЛНП проявляются в их способности потенцировать накопление холестерина в клетках, что было продемонстрировано на культивируемых гладкомышечных клетках и макрофагах. Мелкие/плотные ЛНП имеют непосредственное отношение к атеросклерозу [Austin et al., 1991; Kwiterovich, 1988] и вызывают накопление холестерина в культивируемых гладкомышечных клетках [Tertov et al., 1992a; Jaakkola et al., 1993]. Подфракция электроотрицательных ЛНП, выделенная из крови здоровых лиц, индуцирует накопление внутриклеточного холестерина в макрофагах [Avogaro et al., 1988]. Аортальные ЛНП стимулируют накопление холестерина в макрофагах [Parthasarathy et al., 1985; Clevidence et al., 1983].

2. Низкое содержание сиаловой кислоты характерно не только для десиалированных ЛНП, но и для мелких/плотных ЛНП [La Belle, Krauss, 1990]. Кроме того, мы обнаружили в этой работе, что циркулирующие электроотрицательные ЛНП и аортальные

ЛНП также имеют сниженный уровень сиаловой кислоты (см. предыдущий раздел).

3. Модифицированные *in vivo* ЛНП, в отличие от нативных ЛНП, имеют более высокий поверхностный отрицательный заряд. Подфракция электроотрицательных ЛНП была выделена непосредственно из крови человека ионообменной хроматографией [Avogaro et al., 1988]. Детальное изучение цмЛНП и мелких/плотных ЛНП показало, что, в отличие от нативных ЛНП, эти липопротеиды имеют более высокую электрофоретическую подвижность, то есть, имеют более высокий отрицательный заряд (см. Главу 3.2.3.). Аортальные ЛНП, выделенные из пораженной стенки сосуда, также демонстрируют повышенную электрофоретическую подвижность [Hoff et al., 1979].

4. ЦмЛНП имеют значительно меньший размер и более высокую плотность по сравнению с нативными ЛНП (см. Главу 3.2.1. и 3.2.2.). Таким образом, имеет место сходство между цмЛНП и мелкими/плотными ЛНП. В настоящий момент времени отсутствуют данные по размеру электроотрицательных ЛНП и аортальных ЛНП, что связано с трудностями экспериментального измерения диаметра частиц, ввиду их агрегации [Hoff, O'Neal, 1991; Hoff et al., 1979]. Тем не менее, известно, что при *in vitro* окислении плотность липопротеидов повышается [Steinbrecher et al., 1984]. Кроме того, аортальные ЛНП, выделенные из сосудистой стенки, также имеют повышенную, по сравнению с нативными ЛНП, плотность [Morton et al., 1986].

5. Широко известно, что модифицированные ЛНП, циркулирующие в крови, высоко чувствительны к окислению. Это справедливо как для ЛНП (см. Главу 3.4.), так и для

мелких/плотных [De Graaf et al., 1991], и для электроотрицательных ЛНП [Avogaro et al., 1991]. Высокая чувствительность ЛНП к окислению может быть следствием сниженного содержания эндогенных антиоксидантов, в частности витамина Е, в модифицированных липопротеидных частицах. Сниженный уровень витамина Е обнаружен в десиалированных (см. Главу 3.4.5.), мелких/плотных [Dejager et al., 1993] и электроотрицательных ЛНП [Avogaro et al., 1991].

6. ЦмЛНП демонстрируют большую степень окисленности *in vivo* по сравнению с нативными ЛНП (см. Главу 3.4.). Электроотрицательные ЛНП [Avogaro et al., 1991], аортальные ЛНП [Daugherty et al., 1988; Steinbrecher, Lougheed, 1992], как и *in vitro* окисленные ЛНП [Steinbrecher et al., 1984; Steinbrecher, Lougheed, 1992], имеют высокое содержание лизофосфолипидов и оксистеролов, которые могут представлять собой продукты окисления. Данные по содержанию лизофосфолипидов и оксистеролов в мелких/плотных ЛНП отсутствуют.

7. Все типы модифицированных ЛНП, выделенных *in vivo*, имеют сниженное содержание фосфолипидов и эфиров холестерина [Avogaro et al., 1988; Steinbrecher et al., 1984; Shaikh et al., 1988; см. Главу 3.1.2.].

8. ЦмЛНП [Tertov et al., 1989, 1992b], мелкие/плотные [Tertov et al., 1992a; Jaakkola et al., 1993], электроотрицательные [Avogaro et al., 1988], аортальные ЛНП [Hoff, O'Neal, 1991] имеют склонность к агрегации.

9. В крови человека были обнаружены аутоантитела к цмЛНП [Orekhov et al., 1991]. Кроме того, были идентифицированы аутоантитела, взаимодействующие с аортальными ЛНП [Yla-

Herttuala et al., 1989]. Нет данных о наличие аутоантител к мелким/плотным и электроотрицательным ЛНП.

10. ЦмЛНП (см. Главу 6.2.) и аортальные ЛНП [Shaikh et al., 1988] захватываются скэвежер-рецептором макрофагов. При этом, наблюдается снижение связывания модифицированных ЛНП с ЛНП-рецептором [Avogaro et al., 1988; Orekhov et al., 1992; Kleinman et al., 1985; Teng et al., 1985].

Вышеизложенные данные позволяют сделать вывод, что все известные в настоящий момент типы модифицированных ЛНП, выделенных непосредственно из крови человека, имеют сходные свойства и могут быть представлены как одни и те же частицы, подвергшиеся множественным модификациям. Нельзя отрицать, что наличие множественных модификаций вполне допустимо. Примером могут служить подфракции гликозилированных ЛНП, выделенных из крови больных сахарным диабетом, и электроотрицательные ЛНП, выделенные из крови здоровых лиц, которые представляют собой модифицированные атерогенные ЛНП. Липопротеиды больных сахарным диабетом не только гликозилированы, но имеют также сниженное содержание сиаловой кислоты [Sobenin et al., 1993]. С другой стороны, десиалированные ЛНП, выделенные из крови больных диабетом, более гликозилированы, чем нативные сиалированные ЛНП тех же пациентов. Кроме того, гликозилированные ЛНП больных диабетом имеют сходство со всеми, известными к настоящему моменту *in vivo* выделенными модифицированными ЛНП [Sobenin et al., 1993], в частности, имеют повышенную чувствительность к окислению [Bowie et al., 1993]. В этой работе мы показали, что содержание сиаловой кислоты в подфракции электроотрицательных ЛНП в 6 раз превышало содержание

сиаловой кислоты в нативных ЛНП (см. пункт 2). Эти факты указывают на то, что множественные модификации липопротеидных частиц принципиально возможны.

Обращая внимание на сходство между различными типами модифицированных ЛНП, мы не обсуждаем существующих различий между ними, так как они не противоречат теории множественной модификации липопротеидных частиц. До сих пор не было выделено достаточно гомогенной фракции таких модифицированных ЛНП. Таким образом, несоответствие показателей, имеющее место между различными типами модифицированных ЛНП, можно объяснить наличием немодифицированных ЛНП в получаемых препаратах.

2.5. Множественная модификация ЛНП в плазме крови

2.5.1. Десиалирование ЛНП

Десиалирование ЛНП, циркулирующих в крови, может происходить в органах или плазме крови человека. Мы исследовали обе возможности.

Таблица 27. Содержание сиаловой кислоты в ЛНП, инкубированных в течение 24 часов при 37°C с культивируемыми клетками и клеточными гомогенатами

Тип клеток	Содержание сиаловой кислоты, % от контроля	
	Интактные клетки	Гомогенаты клеток
Эндотелиоциты	95±5	95±6
Гепатоциты	103±7	92±8
Макрофаги	98±6	98±5
Гладкомышечные клетки	102±4	93±5

Клетки выделяли и культивировали, как описано в Материалах и Методах. Двести мкг нативных ЛНП инкубировали в течение 24 часов с культивируемыми клетками или клеточными гомогенатами. Контрольные ЛНП инкубировали в отсутствии клеток или клеточных гомогенатов. Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение.

2.5.1.1. Клетки

Первоначально, мы исследовали возможность десиалирования ЛНП при взаимодействии с клетками человека, предполагая, что десиалирование происходит в органах. В

наших экспериментах были использованы следующие клетки человека: эндотелиальные клетки пупочной вены, гепатоциты, макрофаги и интимальные гладкомышечные клетки. 24-часовая инкубация ЛНП с клетками не вызывала достоверного изменения содержания сиаловой кислоты в липопротеидах (таблица 27).

Помимо интактных клеток, ЛНП инкубировали также с клеточными гомогенатами. Как следует из данных, приведенных в таблице 27, инкубация ЛНП с гомогенатами клеток не приводила к изменению в них уровня сиаловой кислоты.

2.5.1.2. Плазма

Отсутствие изменения содержания сиаловой кислоты в ЛНП, инкубуемых с клетками или клеточными ферментативными системами, заставило нас предположить, что десиалирование ЛНП происходит не в органах, но может осуществляться в плазме крови человека. Факт потери в плазме липопротеидами низкой плотности сиаловой кислоты был установлен в следующем эксперименте. Препараты цельной крови, а также препараты плазмы крови с различными антикоагулянтами инкубировали в течение 24 часов при 37°C в атмосфере воздуха при постоянном перемешивании. По окончании инкубации из препаратов цельной крови удаляли клетки низко-скоростным центрифугированием, и ЛНП выделяли из препаратов плазмы ультрацентрифугированием. Контрольные ЛНП выделяли ультрацентрифугированием из свежеполученных препаратов плазмы. Как следует из данных, приведенных в таблице 28, содержание сиаловой кислоты в ЛНП из гепарин-содержащих препаратов как крови, так и плазмы было таким же, как в контроле. Содержание сиаловой

кислоты в ЛНП, полученных из ЭДТА- и цитрат-содержащих препаратов плазмы и цельной крови, инкубированных при 37°C, было на 40-49% ниже, чем в контрольных ЛНП (таблица 28). Таким образом, при инкубировании препаратов плазмы и цельной крови при 37°C происходит десиалирование липопротеидов низкой плотности.

Таблица 28. Содержание сиаловой кислоты в ЛНП, выделенных из препаратов цельной крови или плазмы крови, инкубированных в течение 24 часов при 37°C

Антикоагулянт	Содержание сиаловой кислоты, нмоль/мг белка		
	Контроль	24-часовая инкубация	
	Цельная кровь	Плазма	
ЭДТА, натриевая соль, 1 мг/мл	33.2±1.7	19.1±0.5*	19.9±0.9*
Цитрат натрия, 0.38%	34.2±2.1	18.5±0.9*	17.6±3.0*
Гепарин, натриевая соль, 100 единиц/мл	34.3±1.3	36.5±1.5	30.4±1.8

Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p<0,05$.

Необходимо отметить, что уменьшение уровня сиаловой кислоты в ЛНП было одинаковым в препаратах цельной крови и плазмы. Это указывает на то, что клетки крови не вносят

заметного вклада в десиалирование ЛНП.

Мы обнаружили уменьшение содержания сиаловой кислоты не только в ЛНП, но и в липопротеидах очень низкой плотности (ЛОНП) и липопротеидах промежуточной плотности (ЛПП) на 31-36%. При этом, концентрации ЛОНП и ЛПП в препаратах плазмы и цельной крови, подвергнутых 24-часовой инкубации при 37°C, снижались в 4-5 раз, тогда как концентрация ЛНП увеличивалась. Таким образом, при *in vitro* инкубации ЛОНП и ЛПП переходят во фракцию ЛНП. Учитывая это, для исследования изменений, происходящих именно с ЛНП, был использован другой методический подход. Свежевыделенные лектин-хроматографией нативные ЛНП инкубировали с аутологичной сывороткой, из которой предварительно были удалены ультрацентрифугированием все апоВ-содержащие липопротеиды: ЛОНП, ЛПП, и ЛНП.

На рисунке 17 представлена кинетика изменения уровня сиаловой кислоты в ЛНП, инкубированных с сывороткой при 37°C. Можно видеть, что достоверное снижение содержания сиаловой кислоты происходит уже спустя 1 час инкубации. Уровень сиаловой кислоты продолжал падать вплоть до 24 часов и составлял к этому моменту 60% от исходного. Спустя 48 часов инкубации содержание сиаловой кислоты в ЛНП резко снижалось и составляло 31% от исходного уровня (рис. 17).

Как было указано выше, в этих экспериментах были использованы сиалированные ЛНП, отделенные от десиалированных ЛНП с помощью лектин-хроматографии. На рисунке 18 показана кинетическая кривая появления десиалированных ЛНП в препаратах сиалированных ЛНП, инкубуемых с сывороткой. В исходном препарате ЛНП десиалированные липопротеиды отсутствовали. Как и уровень

сиаловой кислоты, процентное содержание десиалированных ЛНП достоверно увеличивается уже через 1 час инкубации. В интервале 3-36 часов доля десиалированных ЛНП заметно не изменялась. Спустя 48 часов инкубации происходило резкое увеличение доли десиалированных ЛНП до 28%. Таким образом, при инкубации ЛНП с сывороткой наблюдается потеря липопротеидами сиаловой кислоты, и, как результат, появление подфракции десиалированных ЛНП.

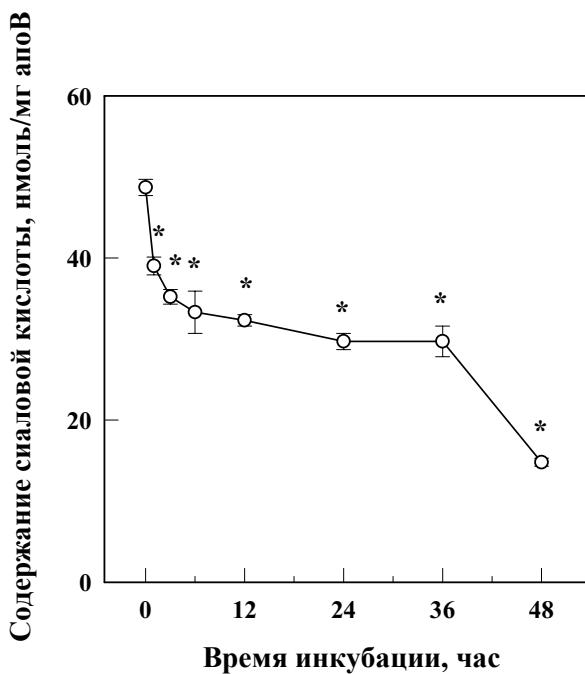


Рис. 17. Содержание сиаловой кислоты в ЛНП, инкубированных с аутологичной сывороткой при 37°C. Данные представлены в виде среднего из трех определений \pm стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контрольных ЛНП, $p < 0,05$.

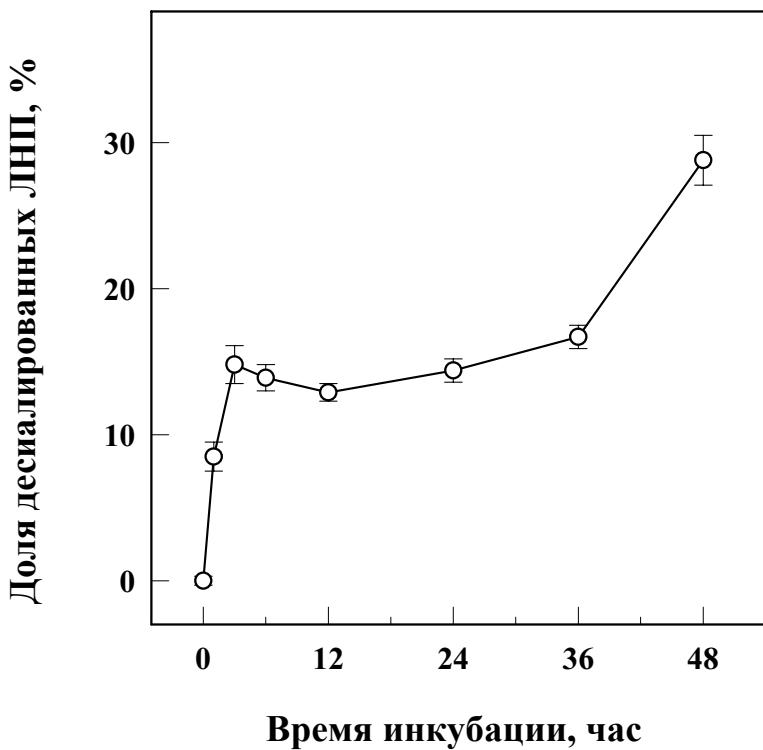


Рис. 18. Доля десиалированных ЛНП в препаратах липопротеидов, инкубированных с аутологичной сывороткой при 37°С. Данные представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение.

Если использовать суммарную фракцию ЛНП, содержащую как сиалированные ЛНП, так и десиалированные липопротеиды, то характер кинетики изменения содержания сиаловой кислоты и доли десиалированных ЛНП сходен с таковым для препаратов, содержащих только сиалированные ЛНП.

2.5.1.3. «ЛНП-десиалирующая активность»

Для детального изучения процессов десиалирования ЛНП мы разработали новый метод определения "десиалирующей активности" сыворотки крови. Детально описанный в Материалах и Методах, метод основан на определении с помощью биотинилированного RCA_{120} количества терминальной галактозы, появляющейся в результате десиалирования углеводных цепей ЛНП. Данные, приведенные на рисунке 19, свидетельствуют, что "ЛНП-десиалирующая активность" в сыворотке крови, определяемая этим методом, линейна в течение 30 минут при разведениях сыворотки от 1:80 до 1:10.

На рисунке 20 приведен pH-профиль "ЛНП-десиалирующей активности" сыворотки крови. Наибольший по величине пик активности обнаруживается при pH 3.5. Другой пик активности наблюдался при pH 6.0. Заметная "ЛНП-десиалирующая активность" определяется в интервале pH 7-8 (рис. 20). Эти данные позволяют предположить, что десиалирование ЛНП может осуществляться в сыворотке различными ферментами или группами ферментов при различных значениях pH.

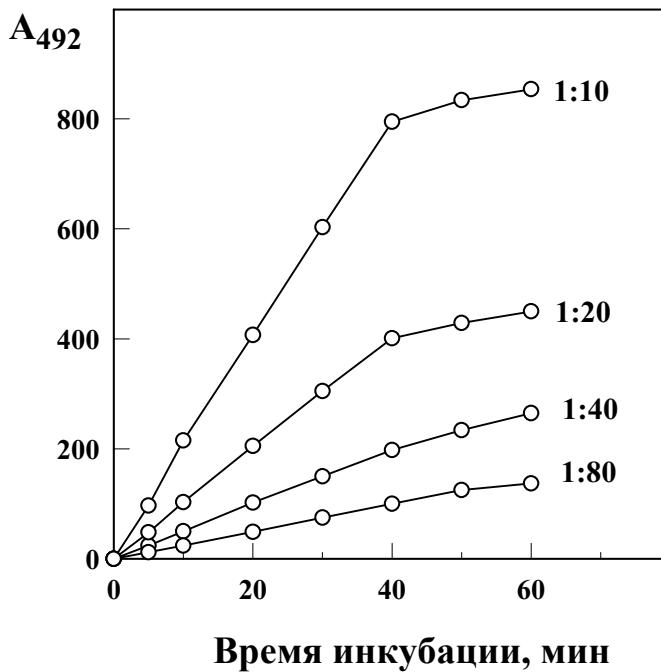


Рис. 19. Временная зависимость «ЛНП-десиалирующей активности» различных разведений сыворотки крови человека.

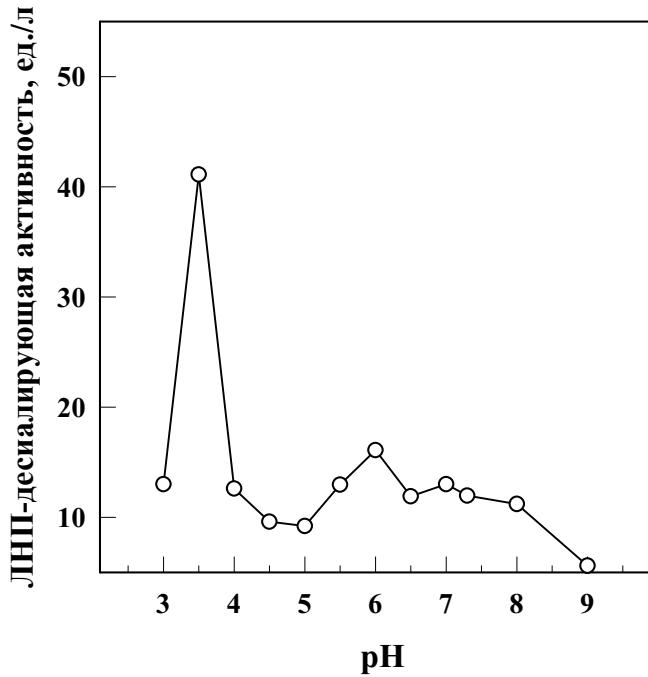


Рис. 20. pH-зависимость «ЛНП-десиалирующей активности» сыворотки крови человека. Каждое значение - среднее двух определений.

Таблица 29. Влияние агентов на «ЛНП-десиалирующую активность» сыворотки человека

Агент	"ЛНП-десиалирующая активность", %
Контроль	100±4
ДД-НАНК, 10 mM	98±6
Сиаловая кислота, 10 mM	96±5
ЦМФ, 10 mM	70±4*
ЦТФ, 10 mM	48±4*

«ЛНП-десиалирующую активность» измеряли как описано в Материалах и Методах. ДД-НАНК, 2,3-дегидро-2-дезокси-N-ацетилнейраминовая кислота; ЦМФ, цитидин-5'-монофосфат; ЦТФ, цитидин-5'-трифосфат. Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p<0,05$.

В таблице 29 приведены данные о влиянии ряда агентов на "ЛНП-десиалирующую активность", измеряемую при pH 7,2, соответствующему нормальному водородному показателю сыворотки крови. 2,3-дегидро-2-дезокси-N-ацетилнейраминовая кислота, ингибитор лизосомальной сиалидазы клеток, не влияла на "ЛНП-десиалирующую активность" сыворотки крови. Свободная сиаловая кислота не влияла на скорость десиалирования ЛНП (таблица 29). С другой стороны, гепарин в концентрации, обычно используемой для получения плазмы крови, ингибировал на 50% "ЛНП-десиалирующую активность". Цитидин-5'-монофосфат и цитидин-5'-трифосфат, ингибиторы

сиалилтрансфераз, подавляли "десиалирующую активность" сыворотки на 50% (таблица 29). Суммируя эти данные, можно предположить, что десиалирование ЛНП при нейтральном рН сыворотки осуществляется ферментами, сходными по свойствам с сиалилтрансферазами, переносящими сиаловую кислоту с цитидин-5'-монофосфат-N-ацетилнейраминовой кислоты на терминальную галактозу углеводных цепей белков и ганглиозидов.

Возможность переноса сиаловой кислоты с ЛНП на другие белки сыворотки была продемонстрирована в следующем эксперименте (рис. 21). Сиалированные ЛНП были выделены с помощью лектин-хроматографии из суммарной фракции ЛНП. Их сиаловая кислота была помечена радиоактивным тритием. Меченные липопротеиды инкубировали с сывороткой при 37°C. По окончании инкубации ЛНП и сыворотку разделяли ультрацентрифугированием, осаждали 10% трихлоруксусной кислотой и определяли радиоактивность преципитата. Данные, приведенные на рисунке 21, показывают, что в ходе инкубации радиоактивность, а, следовательно, и содержание сиаловой кислоты в ЛНП прогрессивно снижается. При этом возрастает радиоактивность в кислото-нерасторимой фракции сыворотки. Отсутствие радиоактивности в кислото-расторимой фракции свидетельствует о том, что удаление сиаловой кислоты из ЛНП не сопровождается появлением свободной сиаловой кислоты (рис. 21).

Мы исследовали влияние инкубации с сывороткой на содержание нейтральных сахаров в липопротеидах. Было обнаружено, что 24-часовая инкубация приводит к потере 36% суммарных нейтральных сахаров ($54,2 \pm 2,1$ против $84,6 \pm 6,0$ нмоль/мг белка, $p < 0,05$).

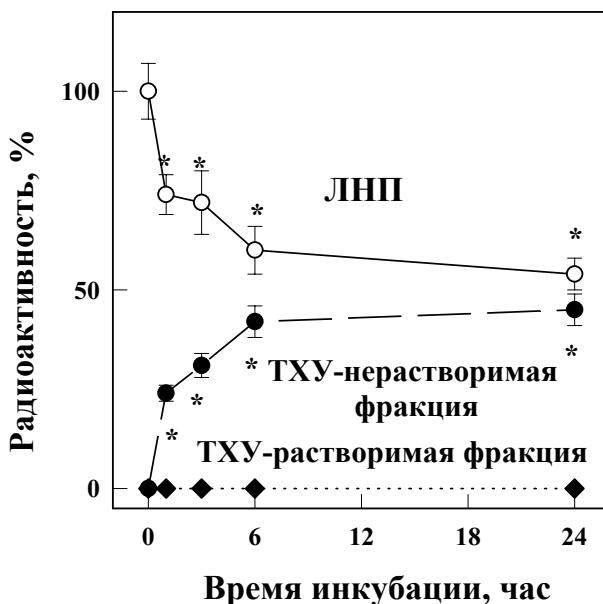


Рис. 21. Временная зависимость изменений радиоактивности фракции ЛНП, ТХУ-растворимой и ТХУ-нерасторовимой фракций сыворотки в ходе инкубации ^3H -сиаловая кислота-меченых ЛНП с аутологичной сывороткой при 37°C. Двести мкг ^3H -сиаловая кислота-меченых ЛНП инкубировали в течение указанного времени с 2 мл аутологичной сыворотки. Аликовты по 200 мкл обрабатывали 10% ТХУ для определения белок-связанной радиоактивности. ЛНП и ЛНП-дефицитную сыворотку разделяли ультрацентрифугированием и преципитировали 10% ТХУ. Радиоактивность преципитатов измеряли на жидкостно-сцинтилляционном счетчике 1215-Rack-Beta, как описано в Материалах и Методах. Данные представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контрольных ЛНП, $p < 0,05$.

2.5.2. Изменения липидного состава

Данные о содержании основных классов нейтральных липидов и фосфолипидов в ЛНП, инкубированных с сывороткой, приведены на рисунке 22.

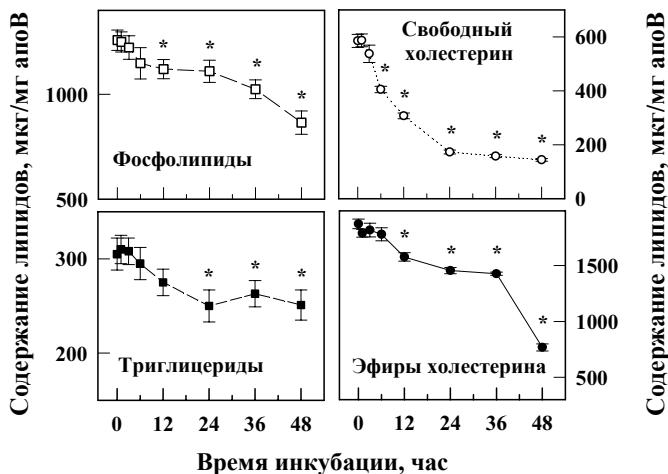


Рис. 22. Содержание фосфолипидов, триглицеридов, свободного и этерифицированного холестерина в ЛНП, инкубированных с аутологичной сывороткой при 37°C. Данные представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контрольных ЛНП, $p < 0,05$.

Наиболее ранние изменения обнаружены в уровне свободного холестерина, который достоверно снижается уже через 6 часов инкубации. Достоверное уменьшение содержания эфиров холестерина и фосфолипидов в ЛНП было выявлено спустя 12 часов инкубации. При более длительных сроках

инкубации наблюдалось монотонное снижение уровня свободного и этерифицированного холестерина, а также фосфолипидов (рис. 22). Снижение уровня триглицеридов имело место в интервале 24-48 часов инкубации. Таким образом, в ходе инкубации ЛНП с сывороткой происходит потеря липопротеидной частицей всех основных классов липидов.

5.3. Изменение физических параметров

Для определения размеров ЛНП препараты липопротеидов подвергали градиентному электрофорезу и окрашенные Кумасси синим R-250 гели денситометрировали. На рисунке 23 представлена кинетика изменения среднего диаметра ЛНП при инкубации с сывороткой при 37°C. Начиная с 12 часов инкубации наблюдается уменьшение диаметра липопротеидных частиц. Спустя 24 часа инкубации средний размер частиц уменьшился более, чем на 2 нм (рис. 23). При этом, как показывают электрофореграммы, приведенные на рисунке 24, изменение распределения частиц по размерам имеет сложный характер. Распределение контрольных ЛНП представляет собой единственный пик с плечом в области частиц большого диаметра (рис. 24). После 12 часов инкубации распределение представлено тремя пиками - ввиду резкого снижения количества частиц основного пика становится отчетливо видимым пик крупных частиц и появляется пик более мелких липопротеидов. Через 24 часа инкубации пики крупных и средних частиц уменьшаются и происходит смещение пика мелких частиц в сторону уменьшения диаметра (рис. 24). После 36 часов инкубации ЛНП представлены лишь одним пиком мелких частиц. Представленное изменение распределения ЛНП

по размерам наблюдалось во всех препаратах липопротеидов, однако, характер распределения у индивидуальных доноров может несколько варьировать в зависимости от изначального соотношения мелких, средних и крупных частиц и скорости уменьшения диаметра липопротеидов.

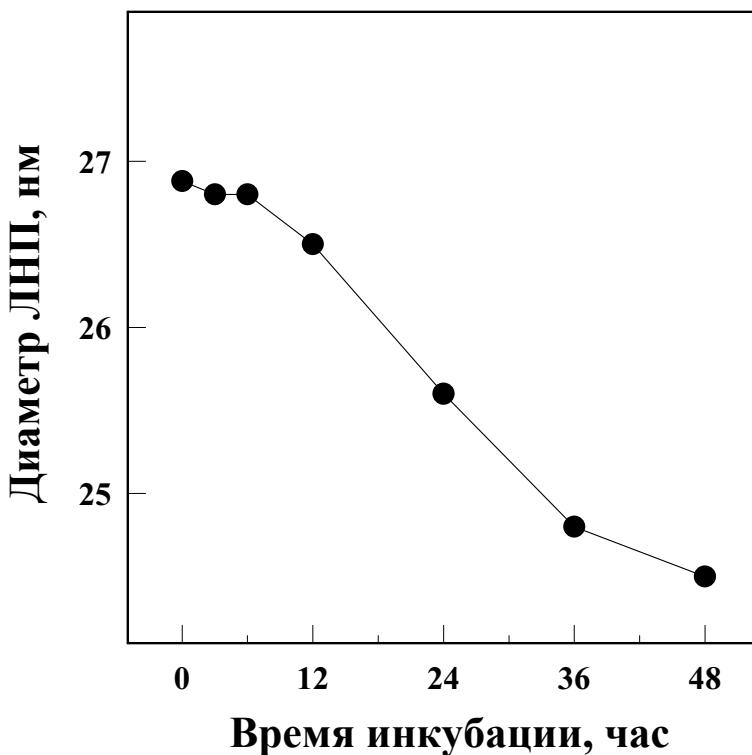
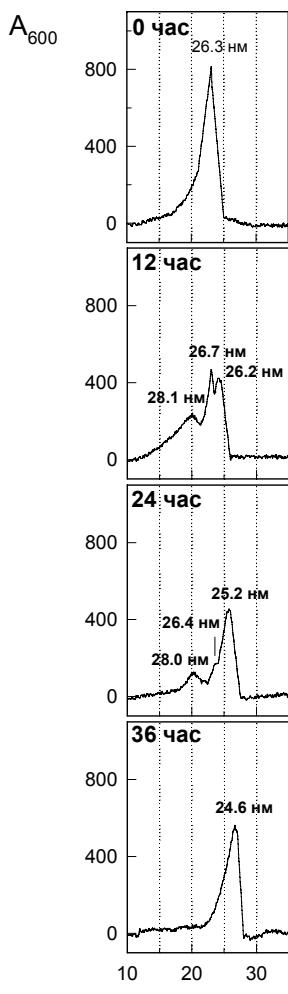


Рис. 23. Средний размер частиц ЛНП, инкубированных с аутологичной сывороткой при 37°C.



Расстояние от старта, мм

Рис. 24. Денситограммы распределения размеров частиц ЛНП, инкубированных с аутологичной сывороткой при 37°C. ЛНП были разделены электрофорезом в полиакриламидном геле в неденатурирующих условиях. Гель окрашивали Кумасси синим R250 и сканировали, как описано в Материалах и Методах.

Об изменениях суммарного поверхностного заряда ЛНП при инкубации с сывороткой судили по изменению электрофоретической подвижности липопротеидов в агарозном геле. Электрофоретическая подвижность ЛНП существенно не изменялась в первые 24 часа инкубации. Через 36 и 48 часов инкубации зафиксировано резкое возрастание подвижности ЛНП, что указывает на увеличение отрицательного заряда липопротеидных частиц (рис. 25).

На рисунке 26 представлены данные о содержании ТНБС-доступных аминогрупп в ЛНП. Спустя 24 часа происходит достоверное снижение уровня поверхностных аминогрупп в ЛНП. Еще более выраженное снижение уровня ТНБС-доступных аминогрупп происходит через 36 часов инкубации с сывороткой. При этом обнаружено, что уровень свободных аминогрупп в ЛНП, растворенных в NaOH, достоверно не изменяется в эти сроки (рис. 26). Эти данные указывают, что в инкубированных с сывороткой ЛНП снижение свободных аминогрупп - это результат их маскирования, но не химической модификации.

2.5.4. Перекисное окисление липидов и деградация апоВ

Инкубирование ЛНП с сывороткой не приводит к достоверному изменению уровня ТБК-реактивных продуктов и гидроперекисей вплоть до 48 часов инкубации (рис. 27). Через 48 часов инкубации в ЛНП достоверно возрастал уровень апоВ-связанного холестерина и увеличивалась интенсивность флуоресценции, обусловленной продуктами липопероксидации. 48-часовая инкубация приводит к снижению уровня витамина Е в ЛНП (рис. 27). После 48 часов инкубации было обнаружено увеличение *in vitro* окисляемости ЛНП. Эти результаты

свидетельствуют о том, что первые признаки протекания процессов перекисного окисления липидов в ЛНП обнаружаются лишь спустя 48 часов инкубации.

Для выявления деградации аполипопротеида В в процессе инкубации проводили гель-электрофорез препаратов ЛНП. Белки переносили на нитроцеллюлозу и окрашивали поликлональными анти-апоВ антителами. Нам не удалось обнаружить пептидов, окрашиваемых анти-апоВ, в препаратах, инкубированных 1-36 часов с сывороткой (данные не приводятся). Спустя 48 часов выявлялись лишь следовые количества продуктов деградации апоВ.

Деградацию апоВ в процессе инкубации изучали также с помощью ^{125}I -меченых ЛНП. На рисунке 28 приведена временная зависимость появления моноиод-тироэина в ТХУ-растворимой фракции плазмы. Деградация апоВ была выявлена лишь спустя 48 часов инкубации.

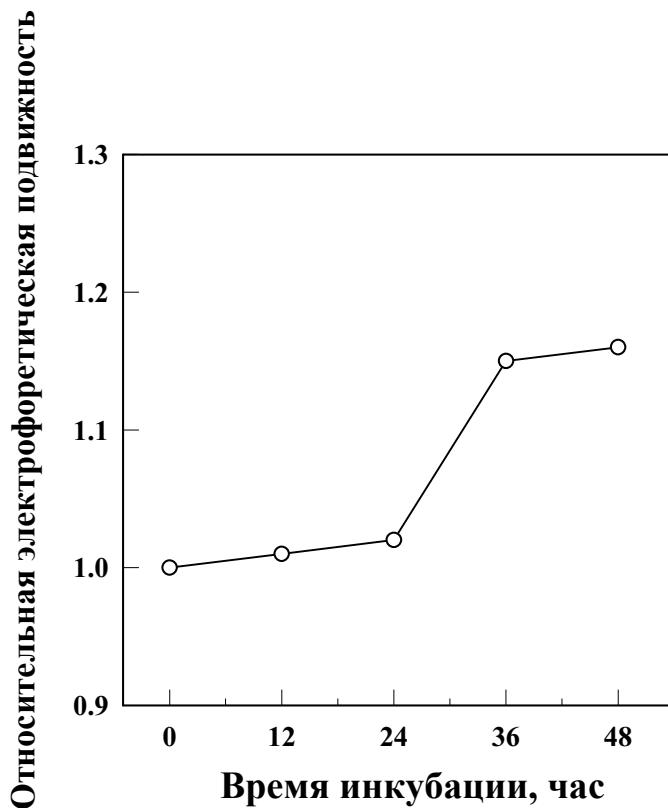


Рис. 25. Относительная электрофоретическая подвижность ЛНП, инкубированных с аутологичной сывороткой при 37°C. Электрофорез в агарозном геле проводили в течение 40 минут. Электрофоретическую подвижность каждого препарата ЛНП определяли, измеряя расстояние от старта до верхнего края полосы ЛНП.

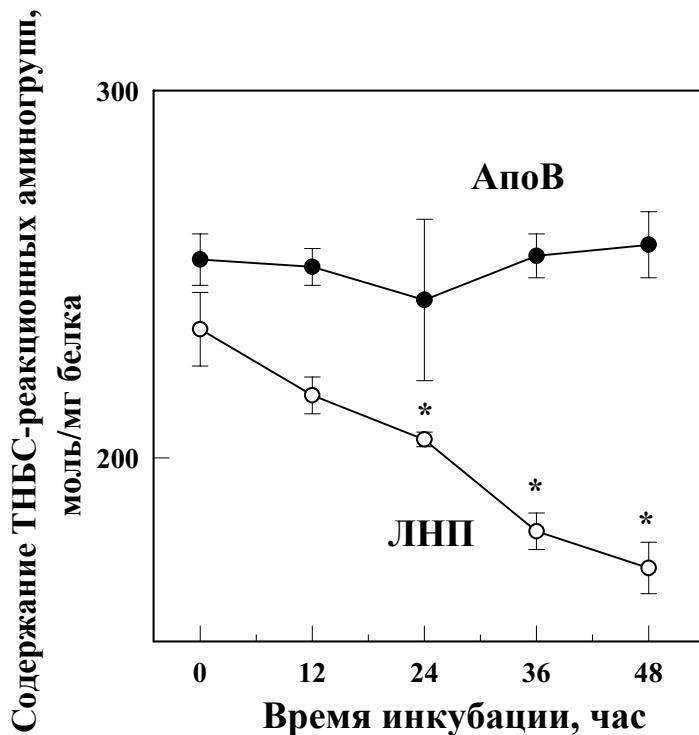


Рис. 26. Содержание ТНБС-реактивных аминогрупп в цельных ЛНП и препаратах апоB, полученных из ЛНП, инкубированных с аутологичной сывороткой при 37°C. ЛНП делипидировали смесью хлороформ-метанол согласно Bligh, Dyer [1959], и апоB растворяли в 0,1 N NaOH. Данные представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контрольных ЛНП, $p < 0,05$.

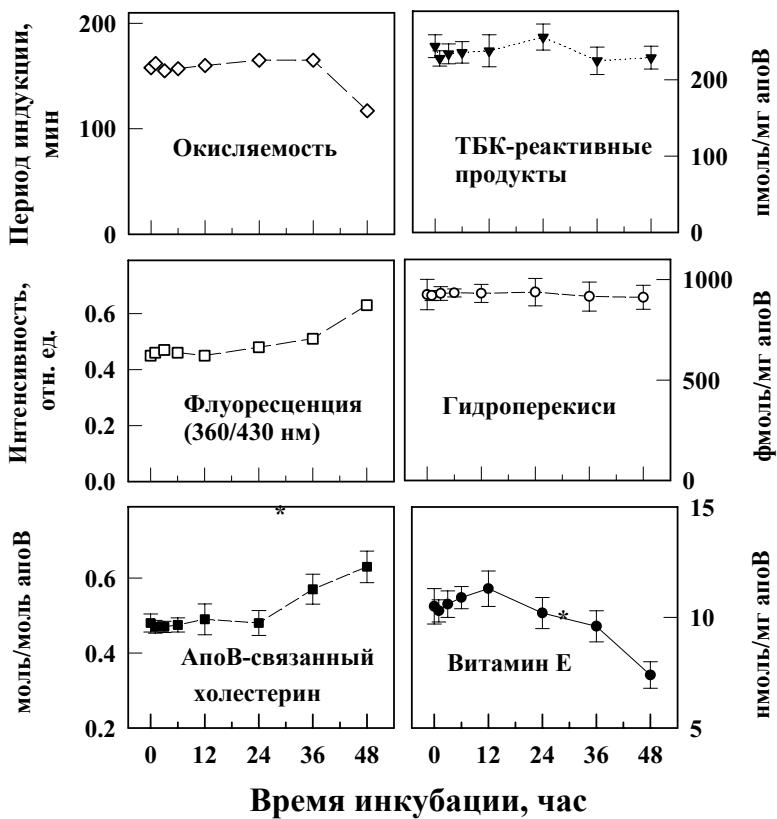


Рис. 27. Кинетика изменений окисляемости и интенсивности аутофлуоресценции (360/430 нм) липопротеидов, а также содержания апоB-связанного холестерина, ТБК-реактивных продуктов, гидроперекисей и витамина Е в ЛНП, инкубированных с аутологичной сывороткой при 37°C. Данные представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контрольных ЛНП, $p < 0,05$.

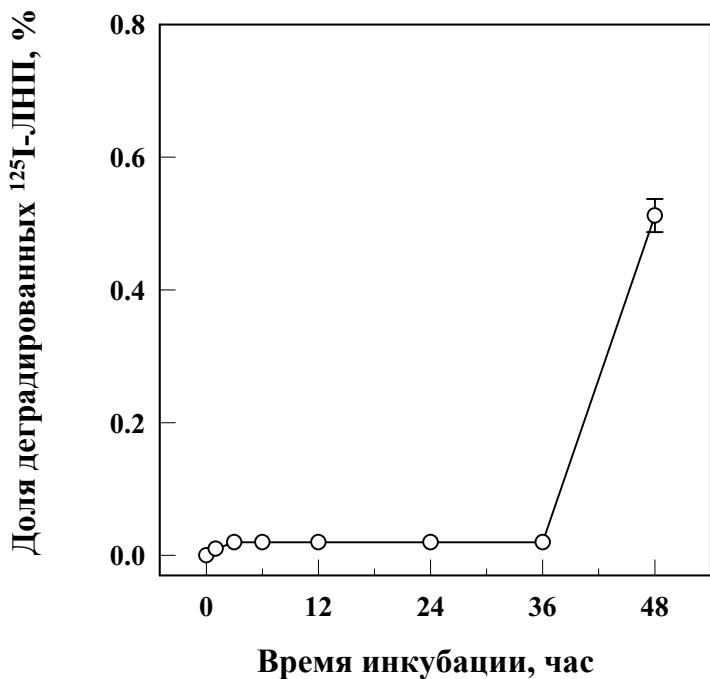


Рис. 28. Деградация ^{125}I -ЛНП, инкубированных с аутологичной сывороткой при 37°C. Данные представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение.

2.5.5. Появление атерогенного потенциала

Выделенные после инкубации с сывороткой ЛНП были добавлены в первичную культуру гладкомышечных клеток, изолированных из интимального слоя непораженных участков аорты человека. Контрольные ЛНП и ЛНП, инкубированные с сывороткой в течение 1 часа, не влияли на внутриклеточное содержание суммарного холестерина (рис. 29). Способность ЛНП накапливать холестерин в гладкомышечных клетках интимы появлялась после 3-х часов инкубации. В интервале 6-36 часов инкубации атерогенность ЛНП возрастала (рис. 29). Последующие 12 часов инкубации не приводили к усилению способности ЛНП вызывать накопление внутриклеточного холестерина. Таким образом, инкубация ЛНП с сывороткой, лишенной апоВ-содержащих липопротеидов, ведет к появлению у ЛНП способности вызывать увеличение содержания холестерина в гладкомышечных клетках интимы аорты человека.

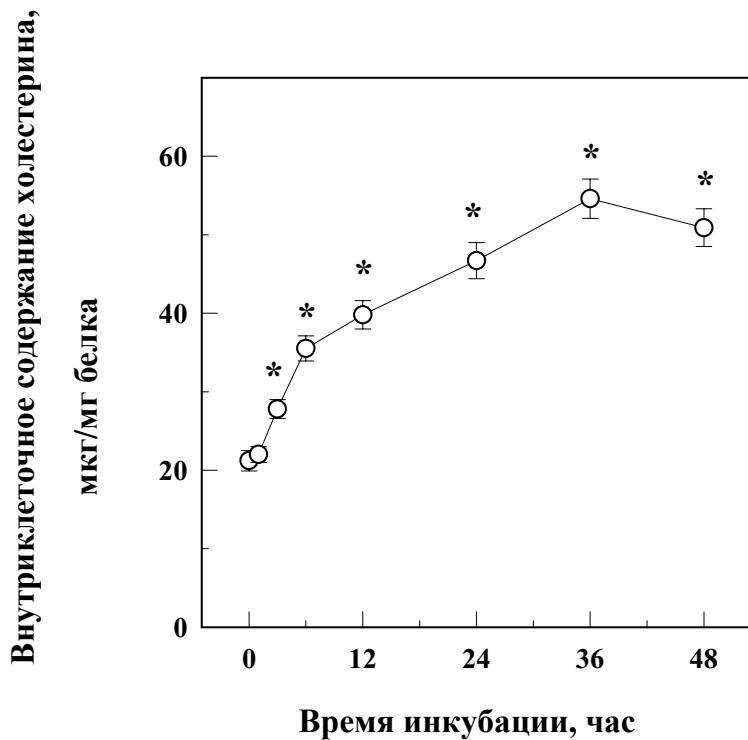


Рис. 29. Влияние ЛНП, инкубированных с аутологичной сывороткой, на содержание суммарного холестерина в гладкомышечных клетках, культивируемых из непораженной интимы аорты человека. Данные представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контрольных ЛНП, $p<0,05$.

2.5.6. Обсуждение результатов

Приступая к исследованию механизмов модификации липопротеидов, мы предполагали, что модификация может осуществляться либо клетками органов, либо в крови человека. Для проверки первого предположения мы инкубировали нативные ЛНП с эндотелиальными клетками, макрофагами, гепатоцитами и гладкомышечными клетками. Мы не обнаружили признаков десиалирования или других модификаций за 24 часа инкубации с интактными клетками. Более того, инкубация ЛНП с гомогенатами клеток также не приводила к модификации липопротеидов. Использованные в нашем исследовании клетки, а также клетки крови, являются основными типами клеток, с которыми липопротеиды взаимодействуют в организме человека. Поэтому отсутствие модификации ЛНП при взаимодействии с клетками заставило нас предположить, что она может происходить в плазме крови человека.

Данные, полученные в этом исследовании, свидетельствуют о том, что, находясь *in vitro* в плазме крови, ЛНП модифицируются, теряя сиаловую кислоту и нейтральные сахара, а также все основные классы липидов, становясь мелкими и отрицательно заряженными, и, наконец, подвергаются окислению и протеолитической деградации. Модифицированные *in vitro* в плазме ЛНП обладали способностью аккумулировать холестерин в клетках, т.е. становились атерогенными. Как мы показали в этой работе, цмЛНП обладают перечисленными характеристиками: десиалированные, имеющие низкое содержание нейтральных сахаров и липидов, мелкие, плотные, электроотрицательные, вызывающие отложение внутриклеточных липидов.

Следовательно, плазма крови способна вызывать все изменения, характерные для множественной модификации ЛНП, циркулирующих *in vivo*. При этом, клетки крови, по-видимому, не вносили заметного вклада в модификацию ЛНП.

Таблица 30. Модификация ЛНП

0-1 час	1-3 час	3-6 час	6-12	12-24	24-36	36-48
			час	час	час	час
↓Сиаловая кислота	↑Атерогенность	↓Свободный холестерин	↓Размер	↓Триглицериды	↑Отрицательный заряд	↑АпоB-связанный холестерин
↑%	десиалированных ЛНП		↓Эфиры холестери- на			↑Токисляе- мость
			↓Фосфолипиды			↑Авто- флуоресценция ↓Витамин Е

В таблице 30 отражена последовательность событий, происходящих с ЛНП в плазме. Уже через 1 час инкубации снижается содержание сиаловой кислоты и увеличивается доля десиалированных ЛНП. Через 3 часа инкубации ЛНП начинают проявлять атерогенные свойства. В интервале 6-24 часа происходит снижение содержания всех основных классов липидов и, по-видимому, как следствие этого, уменьшение размера частиц. Более электроотрицательными ЛНП становятся через 36 часов инкубации. Лишь спустя 48 часов инкубации появляются первые признаки протекания процессов

перекисного окисления липидов и деградации апобелка.

Анализируя эти данные, можно заключить, что появление атерогенности ЛНП может быть связано с десиалированием липопротеидов. Это соответствует нашим ранее полученным данным о том, что снижение содержания сиаловой кислоты в ЛНП с помощью нейраминидазы приводит к появлению у ЛНП способности вызывать накопление внутриклеточные липиды [Orekhover et al., 1989, 1991]. Эта способность десиалированных ЛНП, названная атерогенностью, является результатом ряда событий. Во-первых, десиалированные ЛНП усиленно захватываются через асиалогликопротеин-рецептор клеток [Tertov et al., 1989]. Во-вторых, десиалированные цмЛНП способны связываться протеогликанами клеточной поверхности, что также усиливает их захват внутрь клетки [Tertov et al., 1998]. В-третьих, десиалированные цмЛНП способны формировать агрегаты липопротеидов, захватываемые гладкомышечными клетками аорты человека и макрофагами путем фагоцитоза [Tertov et al., 1989]. Усиленный захват и меньшая скорость деградации агрегатов ЛНП обусловливают накопление липидов в клетках [Tertov et al., 1992b]. Мы показали, что удаление агрегатов из препаратов десиалированных ЛНП приводит к полному исчезновению атерогенности [Tertov et al., 1989]. Позднее наши данные были подтверждены в нескольких лабораториях [Kawabe et al., 1994; Maeba et al., 1994]. Мы обнаружили тесную отрицательную корреляцию между содержанием сиаловой кислоты и атерогенностью ЛНП, полученных из плазмы крови здоровых лиц и пациентов с коронарным атеросклерозом [Tertov et al., 1989]. Все эти данные позволяют предположить, что десиалирование - одна из первых по времени появления модификаций, происходящая в плазме

крови, - является самодостаточной для проявления атерогенных свойств ЛНП.

С другой стороны, обращает на себя внимание тот факт, что потеря сиаловой кислоты происходит через 1 час, а появление атерогенности через 3 часа инкубации. Это расхождение может объясняться тем, что для проявления атерогенности необходимо удаление определенной доли сиаловой кислоты (в наших экспериментах >25%) или сиаловых кислот, локализующихся в определенных эпитопах аполипопротеида В. Наконец, можно предположить, что наряду с десиалированием происходит другая неизвестная модификация (или модификации), которая сама является атерогенной или необходима для потенцирования атерогенности, вызванной десиалированием. В последнем случае, на эту роль может также претендовать начинающаяся потеря частицей липидов, которая достоверно определяется спустя 6 часов инкубации. Изучение механизмов появления у липопротеидов атерогенных свойств безусловно требует дальнейшего тщательного изучения.

Продемонстрировав модификацию липопротеидов низкой плотности в плазме крови человека, мы решили основную задачу этого этапа исследования. Однако, полученные в ходе исследования данные позволяют сделать некоторые предположения о механизмах обнаруженных модификаций. Так, десиалирование в плазме, проходящее при нейтральных значениях pH, обусловлено, по всей видимости, не сиалидазами, имеющими pH оптимум при 3,5-4,5. Это подтверждается также тем, что ни свободная сиаловая кислота, ни 2,3-дегидро-2-дезокси-N-ацетилнейраминовая кислота, ингибитор сиалидаз [Meindl et al., 1974], не ингибировали

"десиалирующую активность" плазмы. В результате десиалирования сиаловая кислота не образует свободного пула, а оказывается связанной с гликопротеидами и, возможно, гликолипидами плазмы. Это возможно в двух случаях: 1) высвобождающаяся сиаловая кислота переносится ферментами плазмы крови на углеводные цепи белков и гликолипидов, либо 2) сиалилтрансферазы используют сиаловую кислоту с углеводных цепей ЛНП и переносят ее на сахарные последовательности акцепторов в плазме. Однако, основным субстратом для наиболее распространенных 2,6-, 2,3- и 2,8-сиалилтрансфераз служит цитидин-5'-монофосфатнейраминовая кислота. Вопрос о возможности использовать свободную или N-связанную сиаловую кислоту является невыясненным до конца. "Десиалирующая активность" плазмы подавляется ЦТФ и ЦМФ, что указывает на возможность участия сиалилтрансфераз в десиалировании ЛНП. Однако, для окончательного доказательства десиалирования ЛНП сиалилтрансферазами необходимо, по-видимому, проведение экспериментов с выделенными из плазмы крови человека чистыми препаратами этих ферментов.

Исследование "ЛНП-десиалирующей активности" плазмы мы проводили, в основном, при pH 7,2, соответствующем физиологическому значению водородного показателя. С другой стороны, высокая десиалирующая активность была обнаружена при pH 3-4. По-видимому, эта активность не проявляется в нормальных условиях. С другой стороны, известно снижение водородного показателя в очагах воспаления [Silver et al., 1988]. Таким образом, можно предположить, что снижение pH плазмы, возникающее при ряде патологических состояний, может влиять на десиалирование и другие модификации ЛНП. Однако, этот

вопрос требует специальных исследований.

После резкого снижения уровня сиаловой кислоты ЛНП в первые 3 часа инкубации в последующем интервале 6-36 часов содержание сиаловой кислоты в липопротеидах менялось незначительно. Доля десиалированных ЛНП также не претерпевала заметных изменений в период 6-36 часов инкубации. Напротив, атерогенность ЛНП продолжала линейно возрастать в эти сроки. По-видимому, этот феномен может быть объяснен дополнительными атерогенными модификациями, такими как уменьшение размера частиц, вызванное потерей липидов. Уменьшение размеров липидного ядра приводит к изменению третичной структуры аполипопротеида В. В свою очередь, изменение третичной структуры апобелка приводит к усилению их способности образовывать агрегаты. Нами ранее было продемонстрировано, что мелкие плотные ЛНП образуют агрегаты с большей скоростью по сравнению с ЛНП частицами большего размера [Tertov et al., 1992a]. Можно предположить, что обнаруженное в настоящей работе уменьшение размера липопротеидных частиц при инкубации в плазме усиливает атерогенный потенциал десиалированных ЛНП.

Спустя 36 часов инкубации в плазме изменяется заряд липопротеидной частицы, о чем свидетельствует изменение электрофоретической подвижности. Мы показали, что содержание свободных аминогрупп, способных ко взаимодействию с тринитробензойной кислотой в ЛНП снижается. Это происходит не за счет химической модификации аминогрупп, а в результате их маскирования при изменении третичной структуры апоВ. Отсутствие окислительной модификации аминогрупп подтверждается отсутствием признаков протекания процессов перекисного окисления

липидов в эти сроки. Мы предполагаем, увеличение электроотрицательности ЛНП обусловлено преимущественно изменением структуры апоВ в уменьшившейся липопротеидной частице. Avogaro et al. (1988) продемонстрировали, что, в отличие от нативных ЛНП, более электроотрицательные ЛНП способны формировать агрегаты. Следовательно, увеличение поверхностного отрицательного заряда стимулирует агрегацию липопротеидов и может вносить дополнительный вклад в увеличение атерогенности ЛНП в указанный период времени.

Последующие 12 часов инкубации ЛНП в плазме не приводили к изменению их атерогенных свойств. С другой стороны, на 48 час инкубации отмечено снижение содержания витамина Е, увеличение восприимчивости ЛНП к окислению ионами меди, увеличение уровня апоВ-связанного холестерина и усиление флуоресценции продуктов липопероксидации. Таким образом, окисление протекающее на заключительной стадии инкубации не вносит дополнительного вклада в атерогенность ЛНП. Эти результаты согласуются с полученными недавно данными о том, что атерогенность ЛНП здоровых лиц и пациентов с коронарным атеросклерозом не коррелирует с уровнем окисленности ЛНП, оцененным по содержанию апоВ-связанного холестерина, который является "отпечатком пальцев" процесса липопероксидации (см. Главу 3.4).

Необходимо также отметить, что через 48 часов инкубации наблюдалось резкое падение уровня сиаловой кислоты в ЛНП и увеличение доли десиалированных ЛНП. Причины, обуславливающие вторую стадию десиалирования ЛНП в плазме, точно не известны, но могут быть связаны с отмеченной в этот момент деградацией апоВ. Однако, по

нашим данным, этот этап десиалирования не приводит к дальнейшему росту атерогенности липопротеидов.

Суммируя полученные результаты можно заключить, что десиалирование ЛНП - вероятно самое раннее событие в цепи множественной модификации. Этого события, по-видимому, достаточно для появления атерогенных свойств у липопротеидов. Цепь последующих событий: потеря липидов - уменьшение размеров частиц - изменение третичной структуры apo B - увеличение электроотрицательного заряда липопротеидов, - увеличивает атерогенность ЛНП. Такие процессы, как перекисное окисление липидов и протеолиз аполипопротеида B, по-видимому, не вносят существенного вклада в атерогенный потенциал ЛНП. Мы предполагаем, что множественная модификация ЛНП, приводящая к появлению подфракций десиалированных, мелких/плотных, электроотрицательных ЛНП, может протекать в плазме крови человека не только *in vitro*, но и *in vivo*.

2.6. Метаболизм цмЛНП в гладкомышечных клетках интимы аорты человека

Для выяснения механизмов ЛНП-опосредованного отложения холестерина мы изучили процессы связывания, интернализации, деградации липопротеидных частиц, а также скорости гидролиза и этерификации холестерина в клетках непораженной и атеросклеротической интимы аорты человека.

2.6.1. Захват нативных ЛНП и цмЛНП.

На рисунке 30 приведены данные о захвате ^{125}I -меченых нативных ЛНП и цмЛНП клетками, культивируемыми из непораженной и атеросклеротической интимы аорты человека. Количество нативных ЛНП, захваченных клетками нормальной интимы, увеличивается вплоть до 6 часа инкубации. С 6 до 24 часа инкубации внутриклеточный уровень нативных ЛНП был постоянным (рис. 30). Захват иод-меченых цмЛНП клетками нормальной интимы превосходил захват нативных ЛНП в 3,5-4,5 раза во все исследованные сроки инкубации.

Захват нативных ЛНП клетками, культивируемыми из липидных полос, был таким же, как и захват липопротеидов клетками непораженной интимы (рис. 30). Захват цмЛНП клетками, полученными из жировых полос, в 6 раз превышал захват нативных ЛНП. Захват нативных ЛНП клетками, культивируемыми из атеросклеротических бляшек, был также значительно ниже, чем цмЛНП.

Таким образом, захват цмЛНП в несколько раз превышает захват нативных липопротеидов, особенно существенные различия были получены в случае клеток, культивируемых из атеросклеротической интимы. Этот эффект может быть обусловлен тремя причинами: 1) более высоким связыванием

цмЛНП клеточной поверхностью, 2) ускоренной интернализацией связанных липопротеидов, 3) сниженной деградацией белковой фракции липопротеидной частицы. В дальнейшем мы исследовали протекание этих процессов в клетках аорты человека.

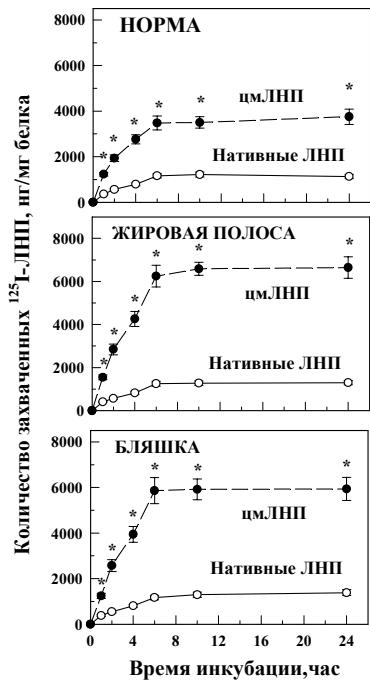


Рис. 30. Захват нативных ЛНП (о) и цмЛНП (●) клетками, культивируемыми из непораженной интимы, жировых полос и атеросклеротических бляшек аорты человека. 125 I-меченные ЛНП (10 мкг/мл) инкубировали с клетками аорты в течение 24 часов при 37°C. Количество захваченных ЛНП определяли, как описано в Материалах и Методах. Данные представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от нативных ЛНП, $p<0,05$.

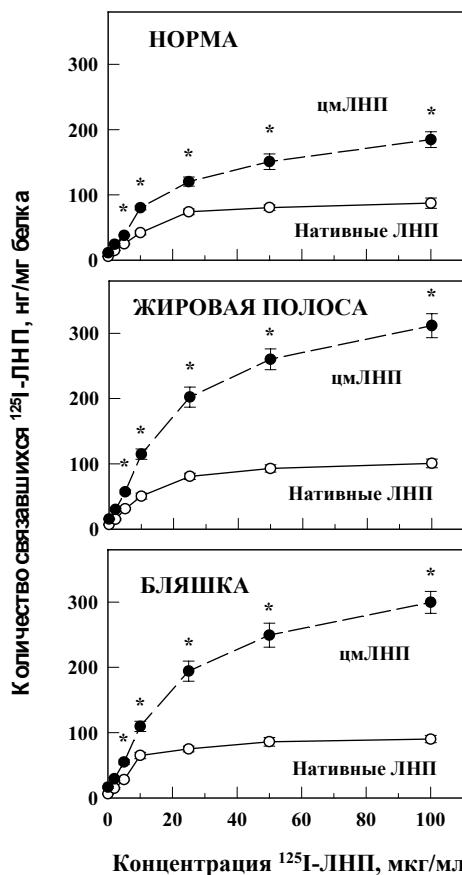


Рис. 31. Связывание нативных ЛНП (○) и цмЛНП (●) клетками, культивируемыми из непораженной интимы, жировых полос и атеросклеротических бляшек аорты человека. ^{125}I -меченные ЛНП в указанных концентрациях инкубировали с клетками в течение 2 часов при 4°C . Количество ^{125}I -ЛНП, связавшихся с клеточной поверхностью, определяли, как описано в Материалах и Методах. Данные представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от нативных ЛНП, $p<0,05$.

2.6.2. Взаимодействие ЛНП с компонентами клеточных мембран

На рис. 31 приведены концентрационные зависимости связывания ЛНП клетками, культивируемыми из непораженной интимы, а также из липидных полос и атеросклеротических бляшек. Связывание нативных ЛНП всеми исследованными клетками было сходным и имело насыщение при концентрации 50 мкг/мл. Связывание нормальными клетками цмЛНП в концентрациях 5-100% превосходило связывание нативных ЛНП в 1,5-3 раза (рис. 31). Связывание цмЛНП клетками из липидных полос и атеросклеротических бляшек было в 2-4 раза выше по сравнению со связыванием нативных ЛНП. При этом не было обнаружено насыщения связывания модифицированных липопротеидов для всех исследованных типов клеток. Концентрационные зависимости связывания нативных ^{125}I -ЛНП клетками, представленные в координатах Скэтчарда, представляют собой линейные зависимости (рис. 32). При этом константы диссоциации для нормальных и атеросклеротических клеток составляли 1,2 и 1,4 мкг/мл, соответственно. С другой стороны, график Скэтчарда для цмЛНП вогнут книзу и может быть аппроксимирован ломаной линией. Константы диссоциации для участка низкого связывания составляли для нормальных клеток и клеток жировой полосы 1,3 и 1,6 мкг/мл, соответственно, т.е. были близки к таковым у нативных ЛНП. Константы диссоциации участка высокого связывания были низки и составляли 13,4 и 18,6 (для нормальных и атеросклеротических клеток, соответственно), что может указывать на наличие дополнительных мест связывания с низкой аффинностью. Таким образом, как нормальные, так и атеросклеротические

клетки связывают большее по сравнению с нативными ЛНП количество модифицированных ЛНП. Для выяснения причин увеличенного связывания было использовано несколько подходов.

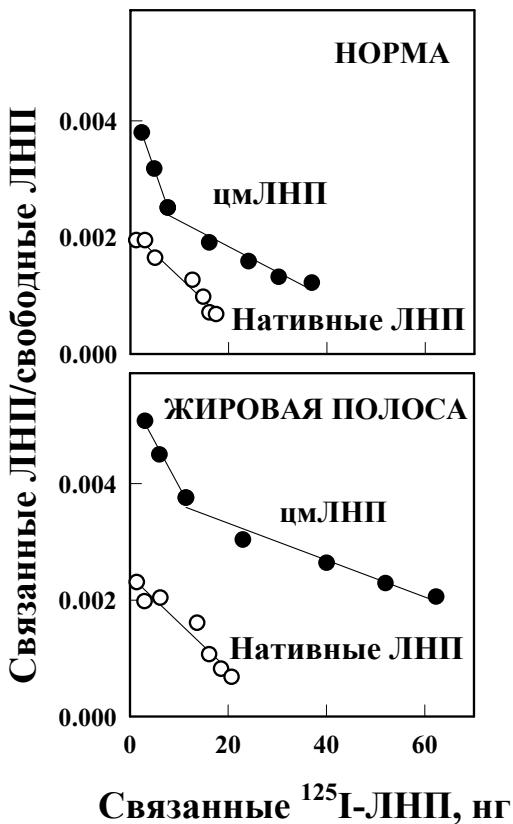


Рис. 32. Связывание нативных ЛНП (○) и цмЛНП (●) клетками в координатах Скэтчарда. Концентрация ^{125}I -ЛНП составляла 1-100 мкг/мл.

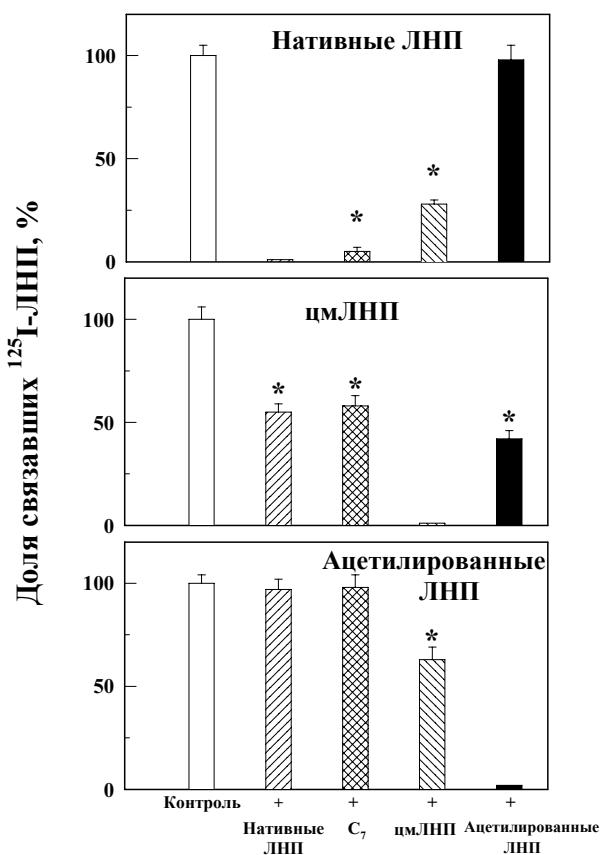


Рис. 33. Конкурентное ингибиование связывания нативных и модифицированных ЛНП гладкомышечными клетками непораженной интимы аорты человека. Клетки инкубировали с 10 мкг/мл ^{125}I -ЛНП в течение 2 часов при 4°C в отсутствии или присутствии 20-кратного избытка немеченых липопротеидов или антител С₇ против ЛНП-рецептора. Данные, выраженные в % от контроля, представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от нативных ЛНП, $p<0,05$.

Как следует из рисунка 33, 20-кратный избыток цмЛНП ингибирал связывание нативных ^{125}I -ЛНП на 72%. В свою очередь, избыток нативных липопротеидов также не полностью подавлял связывание ^{125}I -цмЛНП. Эти результаты свидетельствуют, что сродство цмЛНП к ЛНП-рецептору ниже, чем у нативных ЛНП. Более того, цмЛНП могут связываться не только с ЛНП-рецептором. Это было продемонстрировано с помощью антител против ЛНП-рецептора С₇. Антитела С₇ практически полностью подавляли связывание нативных ЛНП (рис. 33). Связывание цмЛНП подавлялось антителами на 48%. Эти данные, как и Скэтчард анализ кривых связывания, предполагают наличие дополнительных мест связывания для цмЛНП. Помимо ЛНП-рецептора другие компоненты плазматической мембраны могут участвовать в связывании липопротеидов: скэвенджер-рецептор, асиалогликопротеид-рецептор, родственный ЛНП-рецептору белок, протеогликаны клеточной поверхности.

Для проверки возможности связывания цмЛНП со скэвенджер-рецептором гладкомышечных клеток интимы аорты ^{125}I -меченные ЛНП инкубировали с избытком немеченых ацетилированных ЛНП. Избыток ацетилированных ЛНП подавлял на 35% связывание меченых цмЛНП, но не влиял на связывание нативных ЛНП (рис. 33). В свою очередь, 20-кратный избыток цмЛНП ингибирал на 37% связывание ацетилированных ^{125}I -ЛНП. Таким образом, цмЛНП способны конкурировать с ацетилированными ЛНП за связывание со скэвенджер-рецептором.

Для выявления возможного связывания ЛНП с клеточными протеогликанами, клетки обрабатывали гиалуронидазой, смесью гепариназы и гепаритиназы, а также хондроитиназой.

Обработка гиалуронидазой не влияла на связывание нативных ЛНП как нормальными, так и атеросклеротическими клетками (рис. 34). С другой стороны, связывание цмЛНП клетками, обработанными гиалуронидазой, было ниже, чем в случае интактных клеток. Обработка клеток смесью гепариназы и гепаритиназы вызывала увеличение связывания нативных ЛНП и уменьшение связывания цмЛНП (рис. 34). Клетки, обработанные хондроитиназой, обнаруживали пониженное связывание цмЛНП, тогда как связывание нативных ЛНП достоверно не изменялось. Полученные данные свидетельствуют, что цмЛНП, в отличие от нативных липопротеидов, связываются с поверхностными протеогликанами нормальных и атеросклеротических клеток.

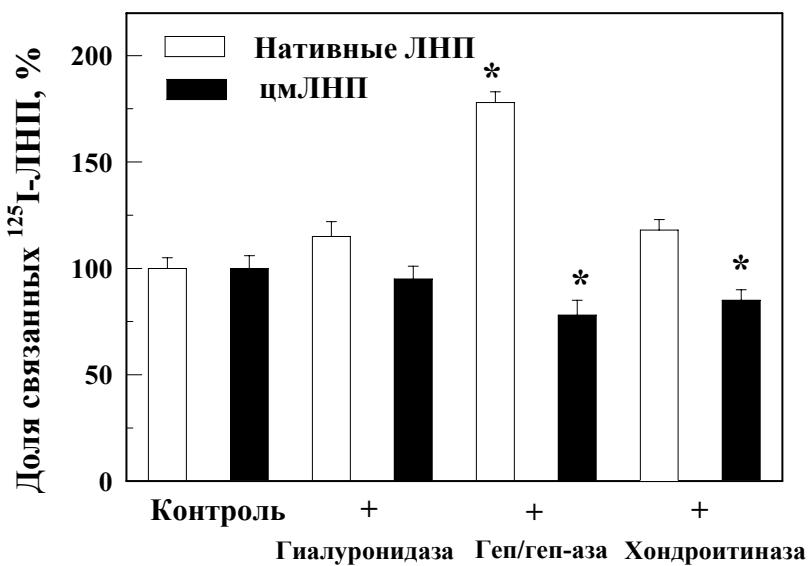


Рис. 34. Влияние гиалуронидазы (10 единиц/мл), хондроитиназы ABC (5 единиц/мл) и смеси гепариназа/гепаритиназа (5 единиц/мл каждой) на связывание нативных ЛНП и цмЛНП гладкомышечными клетками непораженной интимы аорты человека. Клетки преинкубировали в течение 40 мин при 37°C с ферментами, интенсивно отмывали, охлаждали до 4°C и инкубировали 2 часа с 10 мкг/мл ^{125}I -ЛНП. Количество ^{125}I -ЛНП, связавшихся с клеточной поверхностью определяли, как описано в Материалах и Методах. Данные представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p<0,05$.

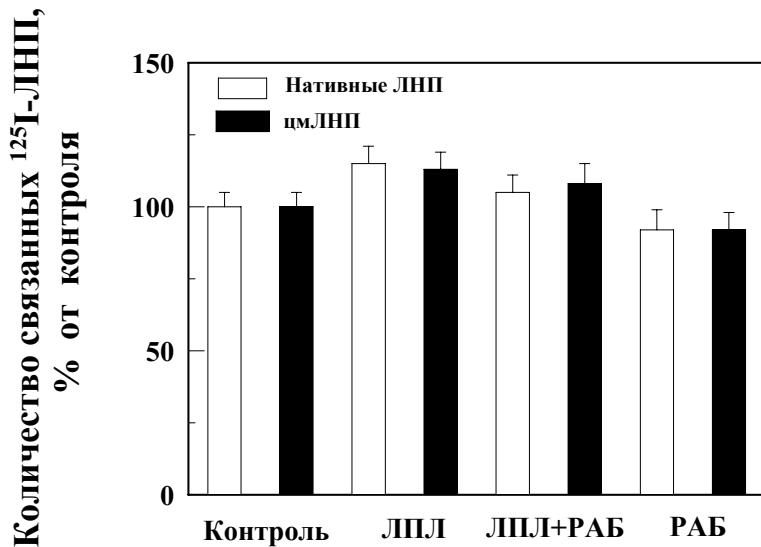


Рис. 35. Влияние липопротеидлипазы и рецептор-ассоциированного белка на связывание нативных ЛНП (○) и цмЛНП (●) гладкомышечными клетками непораженной интимы аорты человека. Клетки инкубировали с 10 мкг/мл ^{125}I -ЛНП в отсутствии или присутствии 20 мкг/мл липопротеидлипазы и/или 10 мкг/мл РАБ в течение 2 часов при 4°C. Данные, выраженные в % от контроля, представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение.

Липопротеидлипаза, образующая комплексы с ЛНП, не вызывала достоверного увеличения связывания как нативных ЛНП, так и цмЛНП нормальными и атеросклеротическими клетками (рис. 35). Рецептор-ассоциированный белок (РАБ), ингибитор связывания комплексов ЛНП-липопротеидлипаза с

родственным ЛНП-рецептору белком, не влиял на связывание нативных ЛНП и цмЛНП клетками. Совместное добавление липопротеидлипазы и РАБ не приводило к изменению связывания липопротеидов (рис. 35). Эти данные указывают на отсутствие как связывания нативных и модифицированных ЛНП с родственным ЛНП-рецептору белком, так и липопротеидлипаза-зависимого связывания с протеогликанами клеток.

Связывание цмЛНП клетками непораженной и атеросклеротической интимы аорты человека подавлялось 50 мМ галактозой (таблица 31). Десиалированный с помощью нейраминидазы, но не интактный фетуин, также подавлял связывание цмЛНП клетками. Ни галактоза, ни десиалированный фетуин не влияли на связывание нативных ЛНП клетками, культивируемыми из нормальной интимы и липидных полос (таблица 31). Полученные данные указывают на возможность связывания цмЛНП с галактозным рецептором гладкомышечных клеток интимы аорты человека.

Таким образом, увеличенное связывание цмЛНП с клетками объясняется, по-видимому, их дополнительным связыванием со скэвенджер-рецептором, асиалогликопротеид-рецептором, а также клеточными протеогликанами.

Таблица 31. Влияние галактозы и десиалированного фетуина на связывание нативных ЛНП и цмЛНП гладкомышечными клетками интимы аорты человека

Агент	^{125}I -Нативные ЛНП	^{125}I -ЦмЛНП
	нг/мг белка	
Контроль	107.9 \pm 1.5	171.7 \pm 6.1
Галактоза, 50 мМ	102.9 \pm 9.9	138.5 \pm 6.4*
Фетuin, 100 мкг/мл	116.0 \pm 6.4	165.6 \pm 12.5
Десиалированный фетuin, 100 мкг/мл	112.7 \pm 8.6	138.2 \pm 1.8*

Клетки непораженной интимы аорты человека инкубировали 2 часа при 0°C в среде 199 (10% липопротеид-дефицитной сыворотки), содержащей иодинированные нативные ЛНП и цмЛНП, в отсутствии и присутствии указанных агентов. Данные представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p<0,05$.

2.6.3. Интернализация ЛНП

Для изучения скоростей интернализации липопротеидов клетками были проведены эксперименты с предварительным связыванием ^{125}I -меченых липопротеидов с клеточной поверхностью (2 часа при 4°C) с последующей инкубацией клеток при 37°C и определением количества связанных, интернализованных и деградированных ЛНП. В начале эксперимента (после инкубации при 4°C) различные количества нативных ЛНП и цмЛНП были связаны нормальными и атеросклеротическими клетками. Поэтому данные в каждой временной точке на рисунке 36 представлены в виде % от исходной суммарной радиоактивности. Как следует из рисунка 36, относительная скорость интернализации цмЛНП, предварительно связанных с поверхностью клеток нормальной интимы, в первые 4 часа инкубации при 37°C в 1,5-2 раза ниже, чем относительная скорость интернализации нативных ЛНП (количество исходно связанных нативных ЛНП и цмЛНП составляло 154 и 246 нг/мг белка, соответственно). Относительная скорость интернализации цмЛНП в случае клеток, культивируемых из липидных полос, было в 1,5-2 раза ниже, чем у нативных липопротеидов (количество исходно связанных нативных ЛНП и цмЛНП было 158 и 355 нг/мг белка, соответственно) (рис. 36).

Несмотря на низкую относительную скорость поступления цмЛНП в клетки, внутриклеточное содержание нативных ЛНП и цмЛНП было приблизительно одинаковым в течение первых двух часов инкубации при 37°C (рис. 36). Примерное равенство внутриклеточных уровней нативных и модифицированных ЛНП объясняется отсутствием деградации цмЛНП в этот период времени. В дальнейшем интернализованные цмЛНП начинали

подвергаться гидролизу. При этом концентрация цмЛНП оставалась постоянной вплоть до 24 часов инкубации (рис. 36). Внутриклеточное содержание нативных ЛНП снижалось в два раза к 4 часам инкубации, а затем медленно уменьшалось вплоть до 24 часов инкубации. Таким образом, скорость внутриклеточной деградации липопротеидов является одним из ведущих факторов, определяющих их внутриклеточное содержание.

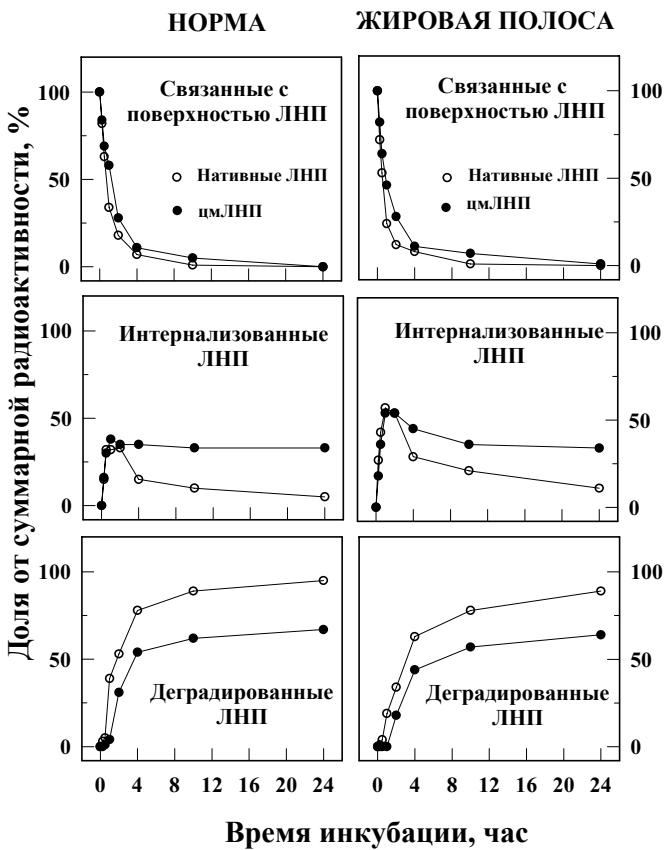


Рис. 36. Интернализация связанных с клеточной поверхностью нативных ЛНП (○) и цмЛНП (●). 10 мкг/мл ^{125}I -ЛНП инкубировали с клетками непораженной интимы и жировых полос аорты человека в течение 2 часов при 4°C. Несвязавшиеся ЛНП отмывали и клетки инкубировали указанное время при 37°C. Количество деградированных, связанных с клеточной поверхностью (удаляемых трипсином при 4°C) и внутриклеточных ЛНП определяли, как описано в Материалах и Методах.

2.6.4. Внутриклеточная деградация аполипопротеида В

На рисунке 37 представлены кинетики внутриклеточной деградации нативных и модифицированных ЛНП. Можно видеть, что продукты деградации клетками непораженной интимы апоВ нативных ЛНП обнаруживаются в культуральной среде уже спустя 1 час после начала инкубации клеток с липопротеидами. Деградация нативных ЛНП нормальными клетками медленно увеличивалась вплоть до 4-х часов инкубации. В дальнейшем наблюдалось значительное увеличение уровня деградации нативных ЛНП (рис. 37). Сходные кинетики деградации нативных ЛНП были обнаружены и для клеток, культивируемых из липидных полос и атеросклеротических бляшек. Однако, уровень деградации нативных ЛНП был в 1,5 раза ниже, чем у нормальных клеток (рис. 37).

В отличие от нативных ЛНП, мы не обнаружили продуктов деградации апоВ цмЛНП в первые 2 часа инкубации как с нормальными, так и с атеросклеротическими клетками (рис. 37). Накопление продуктов деградации апоВ отмечено спустя 4 часа инкубации. При этом уровень деградации цмЛНП нормальными клетками был на 20-30% ниже, чем уровень деградации нативных ЛНП. Уровень деградации цмЛНП атеросклеротическими клетками был в 3-4 раза ниже, чем для нативных липопротеидов (рис. 37).

Для выяснения возможных причин сниженной деградации цмЛНП мы исследовали деградацию липопротеидов в бесклеточной системе, позволяющей использовать ингибиторы лизосомальных протеиназ.

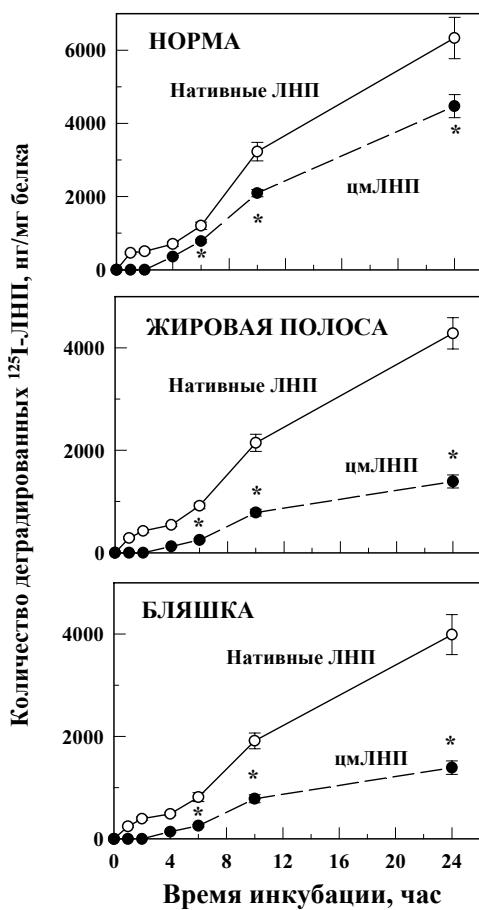


Рис. 37. Деградация нативных ЛНП (○) и цмЛНП (●) клетками, культивируемыми из непораженной интимы, жировых полос и атеросклеротических бляшек аорты человека. ^{125}I -меченные ЛНП (10 мкг/мл) инкубировали с клетками аорты в течение 24 часов при 37°C. Количество деградированных ЛНП определяли, как описано в Материалах и Методах. Данные представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от нативных ЛНП, $p<0,05$.

2.6.4.1. Деградация ЛНП в клеточных гомогенатах

На первом этапе мы исследовали pH-зависимость деградации апоВ в гомогенатах клеток интимы аорты человека. Главный pH-оптимум деградации апоВ нативных ЛНП в гомогенатах клеток непораженной интимы был равен 4,0 (рис. 38). Оптимальный pH для деградации цмЛНП также был равен 4,0. При этом наблюдался второй оптимум pH, равный 5,5. Мы не обнаружили деградации нативных и модифицированных ЛНП при pH>7,0 (рис. 38). Сходные pH-зависимости деградации нативных ЛНП и цмЛНП были обнаружены и для клеток, культивируемых из липидных полос и атеросклеротических бляшек (рис. 38).

На рисунке 39 показаны кинетики деградации нативных ЛНП и цмЛНП в гомогенатах клеток нормальной интимы и атеросклеротических бляшек. Деградация нативных ЛНП при pH 4,0 была линейна вплоть до 6 часов как в гомогенатах нормальных клеток, так и в гомогенатах атеросклеротических клеток. Деградация цмЛНП в клеточных гомогенатах была в 1,5 раз ниже, чем деградация нативных ЛНП (рис. 39).

Линейность деградации липопротеидов в гомогенатах интимальных клеток при pH 5,5 сохранялась лишь до 2-х часов инкубации (рис. 39). С 2-х до 6 часов скорость деградации ЛНП была нелинейной. При pH 5,5 деградация цмЛНП в гомогенатах нормальных и атеросклеротических клеток была в 1,3-1,5 раза выше, чем деградация нативных ЛНП. Необходимо отметить, что деградация цмЛНП при pH 5,5 была в 3 и 2 раза ниже, чем деградация при pH 4,0 для нормальных и атеросклеротических клеток, соответственно (рис. 39).

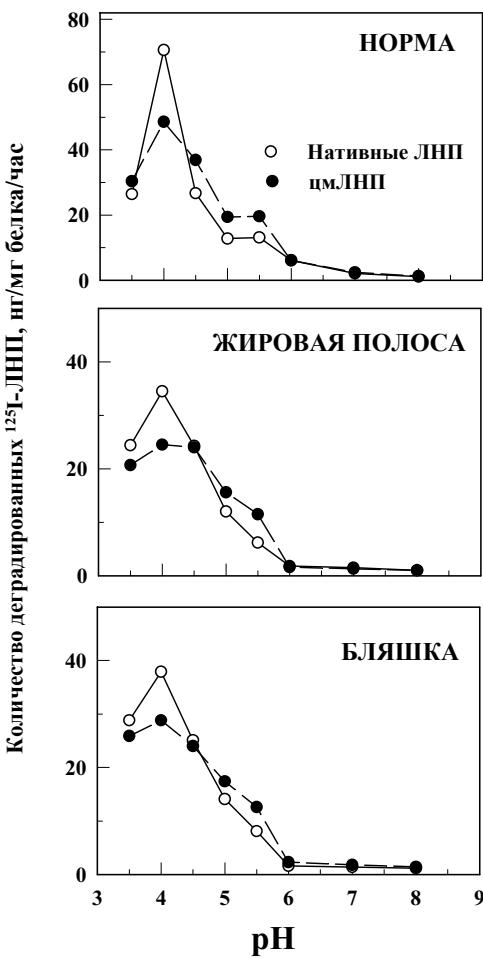


Рис. 38. Влияние pH на деградацию нативных ЛНП и цмЛНП в гомогенатах клеток, культивируемых из непораженной и атеросклеротической интимы аорты человека. Клеточные гомогенаты (40-100 мкг белка/мл) инкубировали с 10 мкг/мл ^{125}I -ЛНП в течение 1 часа при 37°C. Количество деградированных ЛНП определяли, как описано в Материалах и Методах. Данные представлены в виде среднего двух определений.

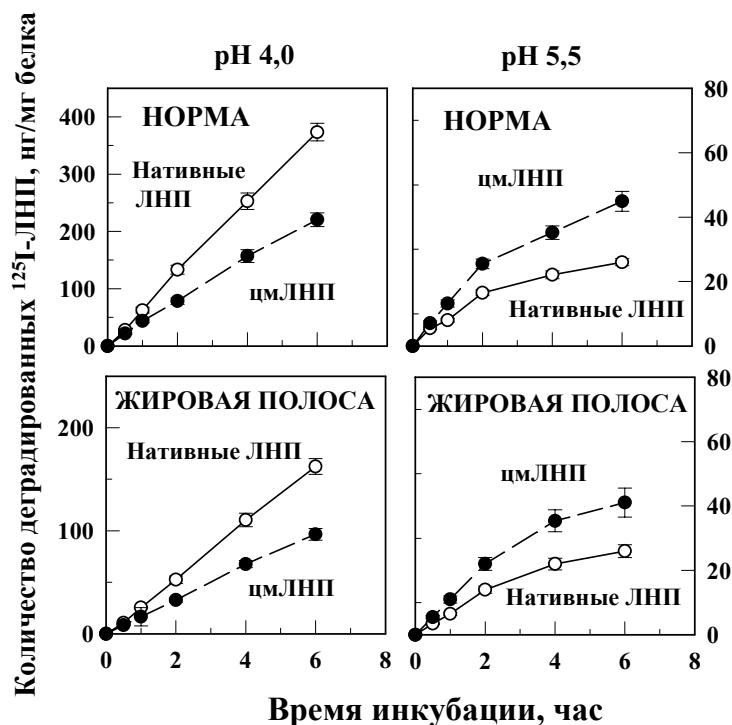


Рис. 39. Кинетики деградации нативных ЛНП и цмЛНП в гомогенатах клеток, культивируемых из непораженной интимы и жировых полос при рН 4,0 и рН 5,5. Данные представлены в виде среднего двух определений.

Отношение скоростей деградации нативных ЛНП при рН 4,0 и рН 5,5 составляло для нормальных и атеросклеротических клеток 12 и 8 раз, соответственно.

Таким образом, в бесклеточной системе также наблюдается пониженный уровень деградации модифицированных ЛНП. Особенно низкая деградация была

обнаружена в гомогенатах атеросклеротических клеток. Различия в скоростях деградации нативных ЛНП и цмЛНП при pH 4,0 и 5,5 предполагают, что разные протеиназы вовлечены в деградацию белка нативных и модифицированных липопротеидов.

2.6.4.2. Влияние ингибиторов протеиназ на деградацию ЛНП

Для выяснения вопроса о том, какие протеиназы принимают участие в деградации белковой части нативных и модифицированных липопротеидов, были использованы ингибиторы основных лизосомальных протеиназ.

Идоацетамид, ингибитор тиольных протеиназ, ингибировал на 75 и 78% (pH 4,0 и pH 5,5) деградацию нативных ЛНП в гомогенатах нормальных клеток (таблица 32). Деградация десалированных ЛНП в гомогенатах клеток нормальной интимы подавлялась этим агентом на 49 и 54% при pH 4,0 и pH 5,5, соответственно. Деградация нативных и модифицированных ЛНП в гомогенатах клеток, культивируемых из атеросклеротических бляшек, ингибировалась иodoацетамидом также, как и в случае нормальных клеток (таблица 32).

Соевый ингибитор трипсина, ингибитор сериновых протеиназ, подавлял деградацию нативных ЛНП на 53 и 50% в гомогенатах нормальных клеток для pH 4,0 и pH 5,5, соответственно (таблица 32). Деградация цмЛНП протеиназами клеток непораженной интимы снижалась под действием соевого ингибитора трипсина на 32% (pH 4,0) и 28% (pH 5,5). Сходная степень ингибирования соевым ингибитором трипсина протеолитической деградации нативных и модифицированных ЛНП наблюдалась и для гомогенатов атеросклеротических

клеток (таблица 32).

Таблица 32. Влияние ингибиторов протеиназ на деградацию апоВ нативных ЛНП и цмЛНП

Ингибитор	¹²⁵ I-Нативные ЛНП		¹²⁵ I-ЦмЛНП	
	pH 4,0	pH 5,5	pH 4,0	pH 5,5
Клетки непораженной интимы				
Контроль	100±4	100±6	100±4	100±5
Иodoацетамид, 0,1 мМ	25±1	12±1	51±3	46±5
Соевый ингибитор трипсина, 100 мкг/мл	46±3	50±3	68±3	72±5
Леупептин, 0,01 мМ	25±1	19±2	78±4	73±5
Антапайн, 0,01 мМ	27±1	17±1	61±4	60±3
1,10- Фенантролин, 0,1мМ	26±2	29±1	30±2	35±3
Пепстатин А, 0,01 мМ	2±1	6±1	1±1	5±1

Продолжение на следующей странице.

Ингибитор	¹²⁵ I-Нативные ЛНП		¹²⁵ I-ЦмЛНП	
	pH 4,0	pH 5,5	pH 4,0	pH 5,5
Клетки жировой полосы				
Контроль	100±5	100±4	100±5	100±6
Идоацетамид, 0,1 мМ	29±2	14±1	73±6	66±2
Соевый ингибитор трипсина, 100 мкг/мл	52±3	50±4	73±5	78±3
Леупептин, 0,01 мМ	55±3	51±3	59±3	59±4
Антапайн, 0,01 мМ	54±4	48±4	45±2	47±1
1,10- Фенантролин, 0,1 мМ	30±4	28±5	36±2	28±1
Пепстатин А, 0,01 мМ	2±1	5±1	1±1	7±2

Двадцать пять мкл гомогенатов нормальных и атеросклеротических клеток инкубировали 2 часа при 37°C с 25 мкл меченых нативных ЛНП и цмЛНП (100 мкг/мл), 40 мкл ацетатного буфера (pH 4,0 или 5,5) и 10 мкл раствора ингибитора протеиназ. Контрольные образцы инкубировали без гомогената клеток. Деградацию апоВ определяли, как описано в Материалах и Методах. Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, p<0,05.

Леупептин, ингибитор мажорной лизосомальной протеиназы катепсина В (EC 3.4.22.1) [Ikezava et al., 1971] и антипаин, ингибитор катепсинов В и А (EC 3.4.12A.1) [Ikezava et al., 1972], в одинаковой степени ингибировали гидролиз нативных ЛНП при обоих исследованных рН. Однако, ингибирующая активность антипаина была выше в отношении цмЛНП. Эти данные указывают, что катепсин А, экзопептидаза, может быть частично вовлечен в деградацию модифицированных, но не нативных ЛНП. Лизосомальный катепсин В деградирует как нативные ЛНП, так и цмЛНП.

1,10-фенантролин, ингибитор металло-протеиназ, ингибировал деградацию как нативных ЛНП, так и цмЛНП в гомогенатах клеток нормальной и атеросклеротической аорты человека на 64-74% (таблица 32).

Пепстатин А, ингибитор карбонильной протеиназы - катепсина Д (EC 3.4.23.5), практически полностью подавлял деградацию нативных ЛНП и цмЛНП в гомогенатах нормальных и атеросклеротических клеток, определенную при различных значениях рН (таблица 32). На рисунке 40 приведены данные о влиянии пепстатина А на кинетику деградации нативных ЛНП и цмЛНП в клеточном гомогенате. В отсутствии пепстатина А кинетика деградации апоВ липопротеидов была линейна в течение 6 часов инкубации. Ингибитор катепсина Д был добавлен в различные сроки инкубации: 0, 15 и 30 мин. Можно видеть, что исходное добавление пепстатина А полностью ингибировало деградацию апоВ (рис. 40). Добавление пепстатина А через 15 и 30 минут после начала инкубации приводило к снижению скорости деградации с выходом на плато в интервале 4-6 часов. Такой вид кинетики может объясняться тем, что гидролиз катепсином Д пептидной цепи в

определенном(ых) месте(ах) необходим для дальнейшей деградации апоВ другими протеиназами.

Полученные данные указывают, что в деградации аполипопротеина В липопротеидов участвуют ферменты, принадлежащие к классам тиольных, сериновых, карбоксильных и металло-протеиназ. Различная степень ингибирования деградации нативных и цмЛНП использованными ингибиторами протеиназ свидетельствует о том, что апобелки этих липопротеидов в различной степени удобны для клеточных протеиназ. При этом начальным этапом деградации апоВ, по-видимому, является гидролиз пептидной цепи катепсином Д.

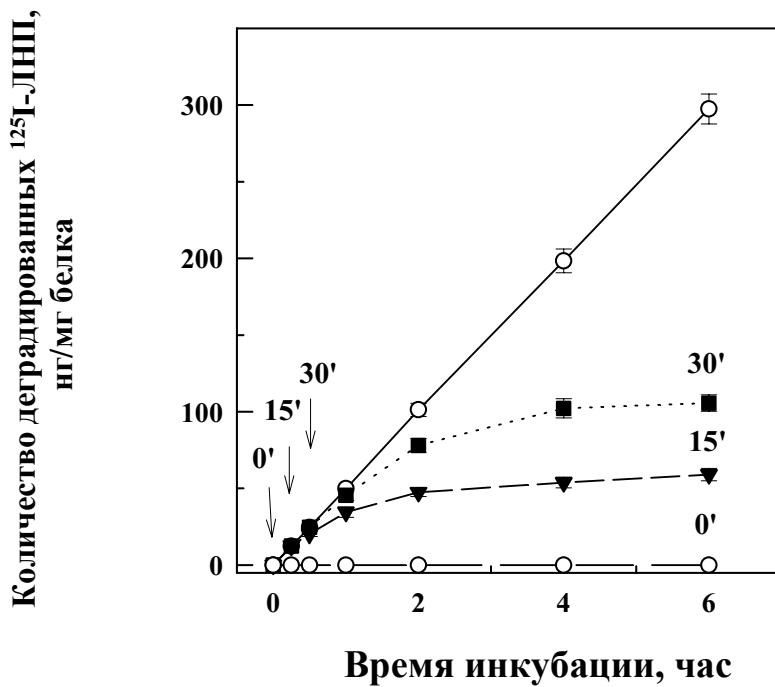


Рис. 40. Влияние пепстатина А на деградацию нативных ЛНП в гомогенатах клеток непораженной интимы аорты человека. ^{125}I -ЛНП инкубировали с клеточными гомогенатами в присутствии и отсутствии 10 мкМ пепстатина А. Стрелками указано время внесения пепстатина А. Данные представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение.

6.5. Метаболизм липидов липопротеидов

Для изучения кatabолизма эфиров холестерина липопротеидов в состав нативных ЛНП и цмЛНП был введен ^3H -холестерил линолеат. За время 24-часовой инкубации с меченными цмЛНП клетки нормальной интимы захватывали в 2 раза больше ^3H -холестерил линолеата, чем при инкубации с нативными ЛНП (таблица 33). В случае атеросклеротических клеток эта разница достигала 3-5 раз. При этом доля гидролизованного эфира холестерина нативных ЛНП составляла около 80% как для нормальных, так и для атеросклеротических клеток (таблица 34). Доля гидролизованного ^3H -холестерил линолеата цмЛНП составляла 41% для нормальных клеток и 24% для атеросклеротических клеток. Следовательно, скорость гидролиза эфиров холестерина цмЛНП в гладкомышечных клетках нормальной и атеросклеротической интимы аорты человека существенно ниже по сравнению с нативными липопротеидами.

Таблица 33. Содержание ^3H -холестерил линолеата в клетках, культивируемых с нативными ЛНП и цмЛНП, меченными радиоактивным липидом

Подфракция ЛНП	Содержание ^3H -холестерил линолеата в клетках, распад/мин/мкг белка	
	НОРМА	ЖИРОВАЯ ПОЛОСА
Нативные ЛНП	145±15	165±13
ЦмЛНП	305±21*	556±24*#

Клетки инкубировали с ЛНП, меченными ^3H -холестерил линолеатом, в течение 24 часов. Данные представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от нативных ЛНП, $p<0,05$. #, достоверное отличие от нормы, $p<0,05$.

Для измерения скорости этерификации холестерина интимальные клетки инкубировали в присутствии ^{14}C -меченой олеиновой кислоты (таблица 35). Было показано, что скорость этерификации холестерина как в нормальных, так и в атеросклеротических клетках, инкубируемых с цмЛНП, в 2-3 раза выше, чем в случае нативных ЛНП.

Таблица 34. Доля гидролизованного ^3H -холестерил линолеата в клетках, культивируемых с нативными ЛНП и цмЛНП, меченными радиоактивным липидом

Подфракция ЛНП	Доля гидролизованного ^3H -холестерил линолеата в клетках, %	
	НОРМА	ЖИРОВАЯ ПОЛОСА
Нативные ЛНП	81±5	78±7
ЦмЛНП	41±5*	24±2*#

Клетки инкубировали с ЛНП, меченными ^3H -холестерил линолеатом, в течение 24 часов. Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от нативных ЛНП, $p<0,05$. #, достоверное отличие от нормы, $p<0,05$.

Таблица 35. Включение ^{14}C -олеата в эфиры холестерина клеток, культивируемых с нативными ЛНП и цмЛНП

Подфракция ЛНП	Включение ^{14}C -олеата, распад/мин/мкг белка	
	НОРМА	ЖИРОВАЯ ПОЛОСА
Нативные ЛНП	48±3	87±6#
ЦмЛНП	99±8*	217±20*#

Клетки инкубировали с ЛНП в присутствии 5 мкКи/мл ^{14}C -олеата в течение 24 часов. Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от нативных ЛНП, $p<0,05$. #, достоверное отличие от нормы, $p<0,05$.

2.6.6. Обсуждение результатов

Полученные в этой работе данные свидетельствуют о том, что взаимодействие цмЛНП с клетками интимы аорты человека принципиально отличается от взаимодействия нативных ЛНП. Действительно, все исследованные процессы: связывание, интернализация и деградация цмЛНП, - значительно различаются для нативных и модифицированных ЛНП.

Связывание *in vivo* модифицированных ЛНП клетками было существенно выше, чем связывание нативных липопротеидов. Каковы же причины более высокого связывания цмЛНП клетками аорты человека? В наших экспериментах было обнаружено снижение аффинности связывания при увеличении концентрации цмЛНП, чему соответствует выпуклый характер зависимости в координатах Скэтчарда. Мы полагаем, что

наличие мест связывания цмЛНП с низким сродством может быть причиной увеличенного связывания этих липопротеидов.

В этой работе мы обнаружили несколько компонентов клеточной мембраны, способных связывать цмЛНП. Так было показано, что цмЛНП конкурируют с ацетилированными ЛНП за связывание с клетками, что предполагает связывание со скэвенджер-рецептором. В этой связи, необходимо отметить, что не только макрофаги, но и гладкомышечные клетки интимы аорты человека экспрессируют скэвенджер-рецептор *in situ* и *in vitro* в первичной культуре, что было выявлено с помощью антискэвенджер-рецептор антител, любезно предоставленных д-ром T. Kodama [Назарова и др. 1995].

Помимо скэвенджер-рецептора, была исследована способность цмЛНП связываться с асиалогликопротеид-рецептором. Наличие этого рецептора, взаимодействующего с терминальной галактозой углеводных цепей, было продемонстрировано, помимо печени, в перитонеальных макрофагах [Namagura, Kolb, 1980] и в ряде других тканей [Mi et al., 1993]. В наших экспериментах свободная галактоза и *in vitro* десиалированный фетуин ингибировали связывание цмЛНП, но не нативных ЛНП, клетками аорты. Эти данные подтверждают способность цмЛНП связываться с асиалогликопротеид-рецептором.

В последние несколько лет большое внимание уделяется липопротеидлипаза-опосредованному пути метаболизма липопротеидов и, в частности, ЛНП. Показано, что, связываясь с ЛНП, липопротеидлипаза увеличивает их связывание с родственным ЛНП-рецептору белком и сульфатированными протеогликанами фибробластов и гепатоцитов [Saxena et al., 1992; Eisenberg et al., 1992]. В наших экспериментах

липопротеидлипаза не вызывала достоверного увеличения связывания нативных ЛНП и цмЛНП клетками интимы аорты человека. При этом рецептор-ассоциированный белок не влиял сам по себе или в присутствии липопротеидлипазы на связывание липопротеидов. На основании этих данных мы пришли к заключению, что липопротеидлипаза не играет существенной роли в связывании ЛНП гладкомышечными клетками интимы аорты человека.

При изучении эффекта смеси ферментов гепариназа/гепаритиназа на связывание липопротеидов клетками мы обнаружили, что связывание нативных ЛНП возрастает в результате удаления поверхностных глюкозаминогликанов. Эти экспериментальные наблюдения не согласуются с данными ряда авторов о ингибирующем эффекте этих ферментов на связывание ЛНП фибробластами и гепатоцитами [Mulder et al., 1992, Obunike et al., 1994]. Эти данные могут быть объяснены облегчением взаимодействия липопротеидов с ЛНП рецептором, затрудненного стерическим эффектом окружающих рецептор углеводных цепей протеогликанов.

В противоположность нативным ЛНП, связывание цмЛНП клетками, обработанными смесью гепариназы/гепаритиназы, снижается. Это свидетельствует о способности цмЛНП взаимодействовать с протеогликанами клеток интимы аорты человека. Ранее большая авидность связывания ЛНП с низким содержанием сиаловой кислоты с протеогликанами аорты была продемонстрирована Camejo et al. [1985]. Таким образом, в связывании цмЛНП клетками принимают участие и протеогликаны плазматической мембранны.

В настоящем исследовании мы обнаружили несколько

клеточных компонентов, связывающих цмЛНП, но не нативные липопротеиды, что, по-видимому, и объясняет выпуклый вид графика в координатах Скэтчарда. Сходный характер связывания ЛНП был получен Chappell et al. [1991] для мелких ЛНП. Chappell с сотр., исследуя связывание подфракций ЛНП в высоких концентрациях (>40 мкг/мл) с ЛНП рецептором, показали, что количество связываемых фибробластами мелких ЛНП больше, чем количество крупных частиц. При этом, авторы также обнаружили более низкое сродство мелких частиц к ЛНП рецептору. Они предположили, что достаточно большие частицы ЛНП, связавшиеся с ЛНП рецептором, создают стерические затруднения для связывания ЛНП с соседними рецепторами, тогда как мелкие частицы таким эффектом обладают в меньшей степени. Косвенным подтверждением наличия стерических затруднений при связывании крупных частиц ЛНП являются наши данные об увеличении связывания нативных ЛНП клетками, поверхностные сульфатированные протеогликаны которых были удалены обработкой клеток смесью гепариназы и гепаритиназы. С другой стороны, можно предположить, что высокое связывание мелких ЛНП в экспериментах Chappell et al. было обусловлено дополнительным связыванием мелких частиц, которые отличаются по многим параметрам от более крупных частиц [Nigon et al., 1991; Orehov et al., 1992; Galeano et al., 1994; Chen et al., 1994], с асиалогликопротеид-рецептором, протеогликанами и т.п.

Суммируя полученные данные, можно заключить, что основные черты *in vivo* модифицированных ЛНП: малый размер, повышенный электроотрицательный заряд, наличие терминальной галактозы - являются причиной дополнительного

(помимо ЛНП рецептора) связывания этих частиц со скэвенджер-рецептором, асиалогликопротеид-рецептором, поверхностными протеогликанами и, возможно, другими неизвестными компонентами клеточной мембраны. Множественное взаимодействие цмЛНП со многими компонентами клеточной поверхности определяет высокий уровень ненасыщаемого связывания липопротеидов клетками.

Следующим за связыванием этапом процессинга ЛНП является интернализация липопротеидных частиц внутрь клетки. Как следует из полученных данных, относительная скорость интернализации цмЛНП в 2-3 раза ниже, чем у нативных ЛНП. Причины низкой скорости интернализации цмЛНП не ясны. Можно предположить несколько объяснений этого феномена: 1) меньшее сродство цмЛНП к ЛНП-рецептору снижает скорость интернализации этих частиц; 2) комплексы цмЛНП со скэвенджер рецептором и асиалогликопротеид-рецептором интернализуются медленнее, чем комплекс нативный ЛНП-ЛНП-рецептор; 3) скорость интернализации комплекса цмЛНП-протеогликаны ниже, чем скорость интернализации нативных ЛНП, опосредованной ЛНП-рецептором.

Хотя относительная скорость интернализации цмЛНП ниже, чем у нативных ЛНП, заметные количества обоих типов липопротеидов обнаружаются внутри клеток уже через 15 минут инкубации при 37°C. И в это же время в культуральной среде обнаружаются продукты протеолиза нативных ЛНП. Напротив, продукты деградации ^{125}I -цмЛНП появляются в среде лишь через 2 часа. Причина столь резких различий кинетики деградации нативных и модифицированных ЛНП не ясна. Время, необходимое для слияния эндосом, содержащих

липопротеиды, с лизосомами, составляет для многих типов клеток 2-4 часа. Это совпадает по времени с началом деградации цмЛНП. Так как деградация нативных ЛНП начинается раньше, можно предположить, что она осуществляется в других клеточных компартментах. Прелизосомальные компартменты, содержащие катепсин, были описаны Diment et al. [1988].

Другим объяснением задержки деградации может являться наличие клеточных компартментов, которые осуществляют первичное депонирование модифицированных ЛНП. Так, Tabas et al. [1990] показали, что модифицированные липопротеиды могут частично захватываться через поверхностные впячивания плазматической мембраны, где их деградация низка. Kruth et al. [1995] обнаружили, что ацетилированные ЛНП и кристаллы холестерина первоначально попадают в компартменты, сохраняющие связь с внеклеточным пространством. Этот путь отличен от фагоцитоза, где эндоплазматические вакуоли быстро отшнуровываются от плазматической мембраны. Связанные с поверхностью компартменты не содержат катепсин Д.

Дополнительным фактором задержки появления продуктов деградации цмЛНП является, безусловно, низкая активность клеточных протеиназ в отношении этих модифицированных ЛНП. Тот факт, что низкая протеолитическая активность была продемонстрирована на интактных клетках и в клеточных гомогенатах, указывает на то, что причиной этого является модификация белковой части липопротеидной частицы. Деградация как нативных, так и модифицированных ЛНП начинается с протеолиза гидрофобных участков катепсином Д. После этого гидролиз

осуществляется дополнительно тиольными, сериновыми и металло-протеиназами. Ингибиторный анализ показал, что деградация апоВ осуществляется помимо катепсина Д, катепсином В и, возможно, миорными катепсинами Н (ЕС 3.4.22.-) и L (ЕС 3.4.22.15), которые также ингибируются леупептином [Kirschke et al., 1977]. В деградации апоВ цмЛНП дополнительно принимает участие экзопептидаза - катепсин А. Наши результаты сходны с данными ряда авторов, исследовавших деградацию апоВ ЛНП. Так, Van der Westhuizen et al. [1980] обнаружили, что катепсин Д осуществляет начальные этапы деградации нативных ЛНП в гладкомышечных клетках аорты быка. Ведущую роль катепсина Д в инициации деградации нативных ЛНП подтвердили также Rankin et al. [1989]. Они показали, что катепсин В, но не катепсин А, вовлечен в последующие этапы деградации нативных ЛНП. Интересно, что химическая модификация апоВ ЛНП *in vitro* может приводить к изменению скорости его деградации. Так, окисление тормозит, а ацетилирование ускоряет гидролиз белка ЛНП [Jessup et al., 1992].

Хотя качественный состав протеиназ, вовлеченных в деградацию апоВ липопротеидов, в нормальных и атеросклеротических клетках сходен, суммарная протеолитическая активность в последних существенно ниже. Механизм снижения протеолитической активности в атеросклеротических клетках еще предстоит исследовать, однако, уже сейчас очевидно, что этот феномен играет существенную роль во внутриклеточном метаболизме нативных, и, особенно, модифицированных ЛНП. Действительно, несмотря на невысокую скорость интернализации, нормальные и, в большей степени, атеросклеротические клетки захватывают

большое количество цмЛНП. Однако, деградация захваченных цмЛНП существенно ниже, чем деградация нативных липопротеидов. Как следует из рисунка 41 до 85% эндоцитированных нормальными и атеросклеротическими клетками нативных ЛНП деградируется ими за 24 часа. В то же время, доля деградированных нормальными клетками цмЛНП составляет 45%. Доля же модифицированных ЛНП, деградированных атеросклеротическими клетками не превышает 20%.

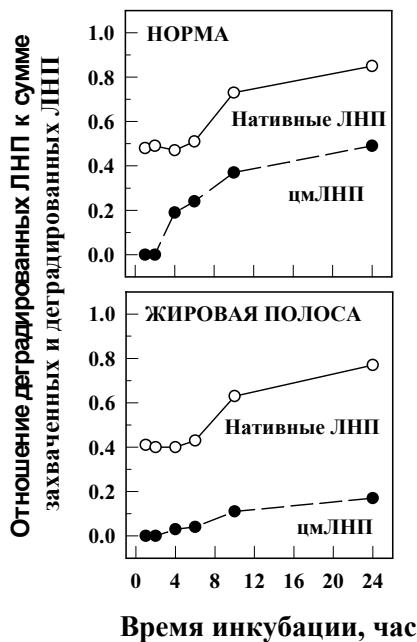


Рис. 41. Отношение деградированных нативных ЛНП и цмЛНП к общему количеству эндоцитированных ЛНП. Количество эндоцитированных ЛНП рассчитывали как сумму деградированных ЛНП и внутриклеточных ЛНП.

Таким образом, высокий уровень захвата цмЛНП и низкая скорость их деградации приводят к ситуации, когда в клетках накапливаются недеградированные и/или частично деградированные липопротеиды. Очевидно, что эти липопротеиды и являются источником липидов, откладывающихся в атеросклеротических клетках.

Что же происходит с липидами, и, в частности, с эфирами холестерина, входящими в состав цмЛНП. Мы обнаружили, что скорость гидролиза эфиров холестерина цмЛНП в гладкомышечных клетках нормальной и атеросклеротической интимы аорты человека существенно ниже по сравнению с нативными липопротеидами. Более того, цмЛНП стимулируют внутриклеточную этерификацию свободного холестерина. Следовательно, цмЛНП не только доставляют большое количество липидов в клетки, но также изменяют внутриклеточный метаболизм липидов таким образом, что это вызывает внутриклеточное отложение эфиров холестерина в гладкомышечных клетках интимы аорты человека.

2.7. Механизмы усиления атерогенного потенциала цмЛНП

2.7.1. Агрегация модифицированных ЛНП

Как указывалось ранее, нативные ЛНП не способны вызвать накопление липидов в культивируемых клетках. Аккумуляция внутриклеточных липидов наблюдалась лишь в случае использования ЛНП, химически модифицированных обработкой малоновым или глутаровым альдегидами [Fogelman et al., 1980], окислением [Steinbrecher et al., 1985], гликозилированием [Kim, Kurup, 1982] и т.д., или *in vivo* модифицированных ЛНП. Интригующим в данном случае является то, что широкий круг разнообразных химических модификаций ЛНП вызывает один и тот же ответ на клеточном уровне: накопление липидов. Это наблюдение заставило нас предположить, что во всех описанных случаях в основе увеличения внутриклеточного уровня липидов лежит один и тот же процесс. Возможно, этим процессом является образование агрегатов, вызывающих накопление липидов. Например, полученные в ходе механического разрушения ЛНП агрегаты способствуют внутриклеточному отложению липидов в моноцит-макрофагах [Khoo et al., 1988]. В этой части работы мы попытались представить экспериментальные подтверждения высказанной гипотезе о решающей роли спонтанно образующихся агрегатов модифицированных ЛНП в процессе внутриклеточной аккумуляции липидов в клетках интимы аорты человека.

На первом этапе мы попытались обнаружить агрегацию ЛНП в условиях культивирования. Характеристики использованных нативных ЛНП и цмЛНП приведены в таблицах 36 и 37. Нативные ЛНП здоровых лиц в условиях культивирования практически не агрегируют вплоть до 6 часов

инкубации. В то же время наблюдается выраженная агрегация ЛНП пациентов. Образование агрегатов было обнаружено также в препаратах липопротеидов, подвергнутых ряду химических модификаций. В частности, в условиях культивирования наблюдалась агрегация гликозилированных, десиалированных, окисленных ЛНП. Способность модифицированных липопротеидов низкой плотности к самопроизвольной агрегации продемонстрирована также при гель-фильтрации. Основному пику ЛНП предшествовал малый пик липопротеидов со значительно большей молекулярной массой частиц; этот пик не определялся при исследовании предварительно профильтрованных (0,1 мкм) цмЛНП и вновь возникал при исследовании липопротеидов, инкубированных после фильтрации при 37°C в течение 6 часов. В дальнейшем была изучена способность нативных и модифицированных липопротеидов вызывать накопление эфиров холестерина в клетках непораженной интимы аорты человека. Нативные ЛНП здоровых лиц не вызывали достоверного увеличения внутриклеточного содержания эфиров холестерина. С другой стороны, наблюдалось увеличение уровня эфиров холестерина в гладкомышечных клетках и макрофагах, инкубированных с цмЛНП (таблица 37). При этом была обнаружена прямая и тесная корреляция между степенью агрегации ЛНП и аккумуляцией эфиров холестерина в клетках непораженной интимы аорты человека ($r=0,86$, $p<0,001$, $n=21$).

Таблица 36. Характеристика препаратов ЛНП

ЛНП	Состав, %					Сиаловая кислота, нмоль/мг апоВ
	АпоВ	ФЛ	X	ТГ	ЭХ	
Нативные ЛНП	20,5	23,1	12,5	5,5	38,3	30,8
ЦмЛНП	38,3	19,5	7,8	4,4	30,0	12,5

ФЛ, фосфолипиды; X, свободный холестерин; ТГ, триглицериды; ЭХ, эфиры холестерина.

Таблица 37. Влияние нативных ЛНП и цмЛНП на содержание эфиров холестерина в гладкомышечных клетках интимы аорты и макрофагах человека

	Содержание эфиров холестерина, мкг/мг белка	
	Интимальные	Макрофаги
	гладко-мышечные	
	клетки	
Контроль	12±1	6±1
Нативные ЛНП	12±1	7±1
ЦмЛНП	56±3*	26±2*

Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p<0,05$.

Выделенные с помощью гель-фильтрации неагрегированные и агрегированные ЛНП по разному влияли на внутриклеточное содержание эфиров холестерина (таблицы 38, 39). Неагрегированные ЛНП не влияли на накопление этерифицированного холестерина в клетках, тогда как агрегаты вызывали накопление этих липидов в гладкомышечных клетках интимы аорты человека и макрофагах.

Как следует из данных приведенных в таблице 40, скорость захвата агрегатов гладкомышечными клетками и макрофагами в несколько раз превосходит скорость захвата неагрегированных частиц. При этом относительная скорость деградации агрегатов ниже, чем у неагрегированных ЛНП.

Микросферы латекса, агрегаты ЛНП, цитохалазин В ингибировали захват иод-меченых агрегатов ЛНП макрофагами и гладкомышечными клетками интимы аорты человека (таблица 41). Эти данные свидетельствуют о том, что агрегаты ЛНП захватываются клетками путем фагоцитоза.

Таблица 38. Влияние фильтрации препаратов ЛНП на их способность вызывать накопление эфиров холестерина в гладкомышечных клетках непораженной интимы аорты и макрофагах человека

Размер пор, мкм	Средний размер частиц, отн. единицы	Содержание эфиров холестерина, мкг/мг белка	
		Интимальные клетки	Макрофаги
Нативные ЛНП	6,0	20±2	7±1
ЦмЛНП	27,7	93±5*	20±1*
0,45	19,7	72±4*	14±1*
0,22	12,6	42±3*	8±1
0,10	7,9	24±2	8±1

Препараты ЛНП фильтровали через фильтры с указанным диаметром пор и инкубировали с клетками в течение 6 часов. Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p<0,05$.

Таблица 39. Влияние агрегированных и неагрегированных ЛНП на содержание эфиров холестерина в гладкомышечных клетках непораженной интимы аорты человека

	Содержание эфиров холестерина, % над контролем		
	Суммарные ЛНП	Неагрегирован- ные ЛНП	Агрегаты
			-
Нативные ЛНП	7±5	6±8	
ЦмЛНП	179±15*	6±7	308±25*

Агрегаты и неагрегированные ЛНП выделяли с помощью гель-фильтрации, как описано в Материалах и Методах. Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p<0,05$.

Таблица 40. Влияние агрегатов цмЛНП на содержание эфиров холестерина в макрофагах человека

Содержание эфиров холестерина, мкг/мг белка	
Контроль	7±1
Агрегаты цмЛНП	30±2*

Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p<0,05$.

Таблица 41. Захват и деградация агрегированных и неагрегированных ^{125}I -ЛНП

Препарат ЛНП	Захват ЛНП, нмоль/мг белка/6 час		Деградация ЛНП, нмоль/мг белка/6 час	
	ГМК	Макрофаги	ГМК	Макрофаги
Здоровые лица				
Суммарные ЛНП	302 \pm 25	210 \pm 11	217 \pm 34	225 \pm 17
Пациенты с коронарным атеросклерозом				
Суммарные ЛНП	627 \pm 32*	407 \pm 39*	486 \pm 41*	486 \pm 27*
Неагрегиро- ванные ЛНП	356 \pm 41	276 \pm 29	205 \pm 27	198 \pm 15
Агрегаты ЛНП	2137 \pm 284*	1245 \pm 137*	1083 \pm 172*	735 \pm 74*

Агрегаты и неагрегированные ЛНП (5 мкг белка/мл) выделяли с помощью гель-фильтрации, как описано в Материалах и Методах. Данные представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от здоровых лиц, $p<0,05$. ГМК, гладкомышечные клетки непораженной интимы аорты человека.

Таблица 42. Влияние 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
Ацетилиро- ванные ЛНП, 100 мкг/мл	93±6	88±8	92±5	89±7
Цитохалазин В, 10 мкМ	28±2*	19±1*	23±1*	22±2*
Микросфераы латекса, $10^9/\text{мл}$	39±4*	36±5*	24±3*	25±2*
Немеченные агрегаты цимЛНП, 100 мкг/мл	32±5*	25±3*	24±2*	19±2*

Агрегаты и неагрегированные ЛНП (5 мкг белка/мл) выделяли с помощью гель-фильтрации, как описано в Материалах и Методах. Данные представлены в виде среднего трех определений \pm стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p<0,05$. ГМК, гладкомышечные клетки непораженной интимы аорты человека.

Суммируя полученные в этой работе данные, можно заключить, что в условиях культивирования *in vitro* имеет место агрегация модифицированных ЛНП. Именно модифицированные, но не нативные ЛНП способны вызывать накопление эфиров холестерина в клетках интимы аорты человека. При этом существует тесная корреляция между степенью агрегации и количеством накопленных эфиров холестерина. Агрегаты ЛНП захватываются путем фагоцитоза. Наконец, удаление агрегатов ЛНП из среды препятствует накоплению этерифицированного холестерина в клетках. Все эти данные указывают на важную, если не определяющую, роль агрегации ЛНП в процессах аккумуляции липидов клетками *in vitro*.

2.7.2. Образование циркулирующих иммунных комплексов

Циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК), содержащие липопротеиды низкой плотности (ЛНП), играют важную роль в развитии атеросклероза. Отложение компонентов иммунных комплексов обнаружено в атеросклеротических поражениях кровеносных сосудов [Климов, 1977-1995; Hanson et al., 1979, 1980; Parums, Hutchinson, 1981; Vlaicu et al., 1985]. Продемонстрировано, что ЛНП-содержащие иммунные комплексы являются маркером атеросклероза [Szondy et al., 1983; Beaumont et al., 1968, 1988; Klimov et al., 1985; Lopez-Virella, Virela, 1991; Orekhov et al., 1991а,б; Kacharava et al., 1993а,б]. Иммунные комплексы, содержащие липопротеиды низкой плотности, являются комплексами аутоантител к ЛНП и липопротеидам. Можно предположить, что появление анти-ЛНП аутоантител крови является результатом иммунного ответа, вызванного модификацией липопротеида. В настоящее время вопрос о том, какие модификации ЛНП являются иммуногенными, остается неясным. Недавно было продемонстрировано, что антитела против ЛНП, модифицированных малоновым диальдегидом (МДА), обнаружены в крови животных с экспериментальным атеросклерозом, а также в атеросклеротических сосудах человека [Haberland et al., 1988; Boyd et al., 1989; Palinski et al., 1989]. Salonen et al. [1992] сообщили, что количество антител против МДА-ЛНП связано с развитием коронарного атеросклероза. Однако, ЛНП, содержащие заметные количества продуктов перекисного окисления липидов, включая МДА, не были обнаружены в кровотоке.

Мы в своей работе обнаружили два экспериментальных факта, подтверждающих важную роль циркулирующих

иммунных комплексов в развитии атеросклероза. Во-первых, в крови пациентов ЛНП-содержащие иммунные комплексы и показано, что содержание холестерина и апоВ в циркулирующих иммунных комплексах тесно коррелирует со степенью развития коронарного атеросклероза и атеросклеротических поражений других локализаций [Tertov et al., 1990а,б; Orekhov et al., 1991а,б; Kacharava et al., 1993]. Во-вторых, из крови пациентов были выделены и детально охарактеризованы аутоантитела против модифицированных ЛНП [Orekhov et al., 1991в,г; Orekhov et al., 1992]. Так как большая часть результатов этих исследований не связана прямо с задачами этой работы, мы приведем лишь основные характеристики аутоантител. Однако, детально опишем свойства ЛНП, входящих в состав ЦИК, и приведем данные об атерогенности ЛНП-содержащих иммунных комплексов.

Итак, основные характеристики аутоантител: 1) представлены иммуноглобулинами класса G; 2) представляют собой несколько подфракций с изоэлектрическими точками 8,1-8,9; 3) имеют различные константы сродства к нативным и модифицированным ЛНП; 4) связываются с апобелком ЛНП; 5) после связывания с ЛНП, способны взаимодействовать с С1q-компонентом комплемента; 6) вызывают появление атерогенных свойств нативных ЛНП; 7) усиливают атерогенность цмЛНП.

2.7.2.1 ЛНП, входящие в состав циркулирующих иммунных комплексов

Для изучения характеристик нативных, модифицированных и ЦИК-ЛНП и их влияния на содержание липидов в клетках были получены три пула сыворотки крови

десяти здоровых лиц и три пула сыворотки крови пациентов. Каждый пул содержал по 10 сывороток. Выделенные из пулированных сывороток ЛНП были разделены с помощью лектин-хроматографии на РКА₁₂₀-agarose на подфракцию нативных или сиалированных липопротеидов и подфракцию десиалированных ЛНП. Ниже приводятся данные, полученные с использованием ЛНП, выделенных из одного пула сывороток крови здоровых лиц и одного пула сывороток крови пациентов. 24-часовое культивирование клеток непораженной интимы аорты в среде, содержащей 100 мкг/мл сиалированных ЛНП, полученных от здоровых лиц, не вызывало изменений внутриклеточного содержания фосфолипидов и нейтральных липидов (таблица 43). Такие же результаты были получены в случае сиалированных ЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом. Напротив, 100 мкг/мл десиалированных ЛНП пациентов вызывали увеличение внутриклеточного уровня свободного и этерифицированного холестерина в 1,5 и 2,3 раза, соответственно, а также возрастание уровня триглицеридов на 40% (таблица 43). ЛНП, входящие в состав циркулирующих иммунных комплексов, стимулировали накопление триглицеридов, а также свободного и этерифицированного холестерина на 180%, 166% и 300%, соответственно. При этом содержание фосфолипидов в интимальных клетках достоверно не изменялось (таблица 43).

Уровень сиаловой кислоты в сиалированных ЛНП здоровых лиц и пациентов с коронарным атеросклерозом было сходным и составляло 44,2 и 41,3 нмоль/мг апоВ (таблица 44). Содержание сиаловой кислоты в десиалированных ЛНП пациентов было в 1,3 раза ниже, чем в сиалированных ЛНП, полученных от тех же пациентов. Еще более низкое содержание

сиаловой кислоты было обнаружено в ЛНП, входящих в состав циркулирующих иммунных комплексов (таблица 44).

Таблица 43. Влияние нативных ЛНП, цмЛНП и ЦИК-ЛНП на содержание липидов в клетках непораженной интимы аорты человека

ЛНП	Внутриклеточное содержание липидов, мкг/мг белка			
	ФЛ	ТГ	СХ	ЭХ
Контроль	78,3±5,4	15,4±1,3	8,9±0,6	12,8±0,3
Здоровые лица				
Нативные ЛНП	79,5±3,8	14,9±0,8	9,1±0,7	13,1±1,1
ЦмЛНП	86,2±7,5	17,4±1,0	10,5±0,9	20,9±1,2*
Пациенты с коронарным атеросклерозом				
Нативные ЛНП	80,7±4,8	15,7±0,9	9,3±0,7	13,4±0,8
ЦмЛНП	82,6±6,5	23,5±1,4*	12,5±1,1*	29,4±1,5*
ЦИК-ЛНП	85,4±7,2	25,6±2,7*	16,1±1,4*	38,6±2,3*

ФЛ - фосфолипиды, ТГ – триглицериды, СХ – свободный холестерин, ЭХ – эфиры холестерина. Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p<0,05$.

Таблица 44. Содержание сиаловой кислоты в нативных ЛНП, цмЛНП и ЦИК-ЛНП

Препарат ЛНП	Содержание сиаловой кислоты, нмоль/мг апоВ
Здоровые лица	
Нативные ЛНП	44,2±3,5
ЦмЛНП	31,4±1,7*
Пациенты с коронарным атеросклерозом	
Нативные ЛНП	41,3±2,7
ЦмЛНП	25,7±1,4*
ЦИК-ЛНП	19,5±1,5*

Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p<0,05$.

Липидный состав выделенных препаратов липопротеидов приведен в таблице 45. Можно видеть, что десиалированные ЛНП пациентов отличаются от сиалированных липопротеидов, как здоровых лиц, так и пациентов, сниженным на 11-31% содержанием фосфолипидов и нейтральных липидов. Низкий уровень свободного и этерифицированного холестерина, а также триглицеридов и фосфолипидов наблюдался также и у ЦИК-ЛНП (таблица 45).

Содержание липидных гидроперекисей в свежевыделенных препаратах липопротеидов было низким и близким по значению для всех типов ЛНП (таблица 46). Также

не было обнаружено различий в уровне ТБК-активных продуктов в сиалированных, десиалированных ЛНП и ЦИК-ЛНП. Содержание оксистеролов в десиалированных ЛНП и ЦИК-ЛНП было в 1,5-2 раза выше, чем в сиалированных липопротеидах (таблица 46).

Размеры липопротеидных частиц определяли с помощью нативного электрофореза в градиентном поликариламидном геле. Как следует из таблицы 47 диаметр десиалированных ЛНП и ЛНП, входящих в состав циркулирующих иммунных комплексов, был меньше, чем диаметр сиалированных ЛНП.

Десиалированные ЛНП и, в еще большей степени, ЦИК-ЛНП обладали повышенной электрофоретической подвижностью в агарозном геле, по сравнению с сиалированными липопротеидами (таблица 47).

На рисунке 42 приведено распределение по плотности выделенных липопротеидов. По сравнению с сиалированными ЛНП, распределение десиалированных липопротеидов имеет сдвиг в сторону большей плотности. Еще более выраженный сдвиг наблюдался в случае ЦИК-ЛНП. При исследовании липидного состава липопротеидов во фракциях различной плотности было показано, что наиболее плотные фракции содержат наименьшие количества как нейтральных липидов, так и фосфолипидов. При этом содержание эфиров холестерина, триглицеридов и фосфолипидов в десиалированных ЛНП и ЦИК-ЛНП было ниже, чем в сиалированных липопротеидах во всем интервале плотностей. Уровень свободного холестерина в сиалированных ЛНП был выше, чем в десиалированных ЛНП во фракциях с плотностью $d<1,035$.

Таблица 45. Липидный состав нативных ЛНП, цмЛНП и ЦИК-ЛНП

ЛНП	Содержание липидов, мкг/мг апоB			
	ФЛ	ТГ	СХ	ЭХ
Здоровые лица				
Нативные ЛНП	1289±17	308±6	306±20	1884±76
ЦмЛНП	1087±32*	261±7*	263±9*	1455±39*
Пациенты с коронарным атеросклерозом				
Нативные ЛНП	1250±59	315±8	293±17	1828±57
ЦмЛНП	1095±42*	253±14*	245±18*	1386±17*
ЦИК-ЛНП	1053±28*	242±13*	243±4*	1313±8*

ФЛ - фосфолипиды, ТГ – триглицериды, СХ – свободный холестерин, ЭХ – эфиры холестерина. Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от нативных ЛНП, $p<0,05$.

Таблица 46. Содержание ТБК-реактивных продуктов, гидроперекисей и оксистеролов в препаратах ЛНП

Препарат ЛНП	ТБК-реактивные продукты, нмоль/мг белка	Гидроперекиси, нмоль/мг белка	Оксистеролы, мкг/мг белка
Здоровые лица			
Нативные ЛНП	0,15±0,02	16,4±1,4	8,4±0,5
ЦмЛНП	0,19±0,02	14,0±1,0	10,8±0,5*
Пациенты с коронарным атеросклерозом			
Нативные ЛНП	0,14±0,01	15,0±1,2	7,8±0,7
ЦмЛНП	0,15±0,01	14,8±1,5	12,3±0,6*
ЦИК-ЛНП	0,14±0,01	17,2±1,3	16,0±1,0*

Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от нативных ЛНП, $p<0,05$.

Таблица 47. Электрофоретическая подвижность и размеры нативных ЛНП, цмЛНП и ЦИК-ЛНП

Препарат ЛНП	Диаметр ЛНП, нм	Относительная электрофоретическая подвижность
Здоровые лица		
Нативные ЛНП	24,9	1,00
ЦмЛНП	22,0	1.16
Пациенты с коронарным атеросклерозом		
Нативные ЛНП	24,0	1,04
ЦмЛНП	21,3	1,30
ЦИК-ЛНП	19,5	1,39

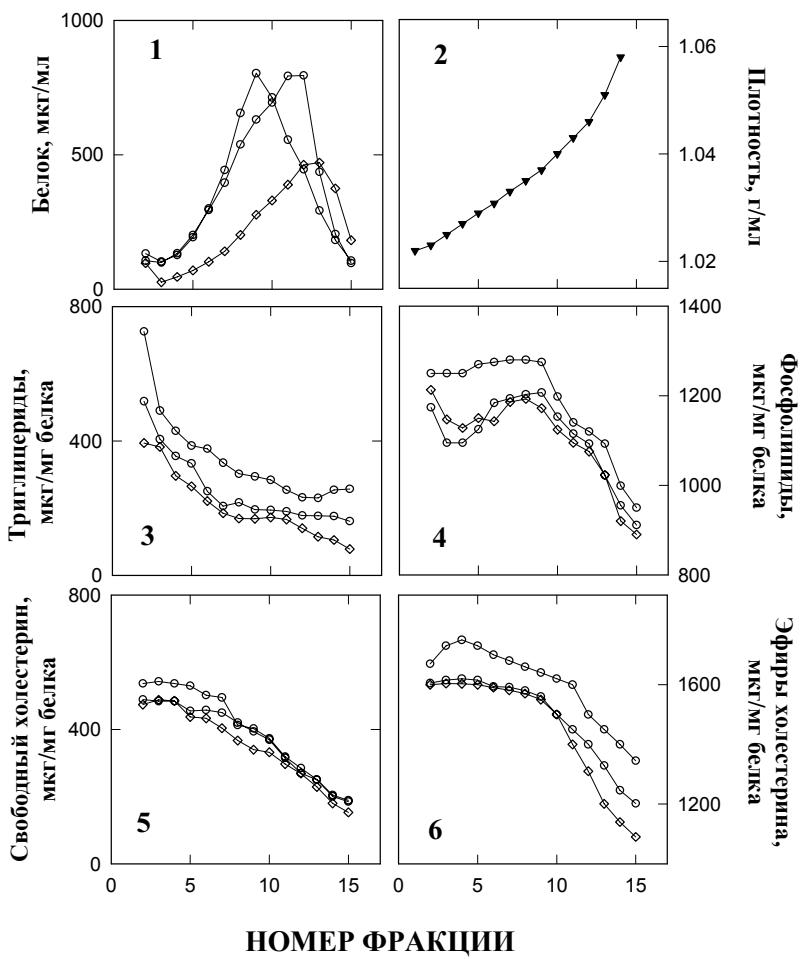


Рис. 42. Содержание апоB (1) и липидов (3-6) во фракциях, полученных при градиентном ультрацентрифугировании нативных ЛНП (о), цмЛНП (○) и ЦИК-ЛНП (▲). Каждое значение - среднее двух определений.

На рисунке 43 представлена корреляционная зависимость между концентрацией (рис. 43.1) десиалированных ЛНП в крови людей и уровнем апоВ в сыворотке (рис. 43.2) и содержанием апоВ в циркулирующих иммунных комплексах (рис. 40.1). Коэффициент корреляции составил -0,02 и 0,78 ($p<0,01$), соответственно. Таким образом, содержание апоВ и, следовательно, ЛНП в циркулирующих иммунных комплексах прямо коррелирует с уровнем десиалированного апоВ в сыворотке, но не с суммарным уровнем апоВ.

2.7.2.2. Атерогенность иммунных комплексов

В таблице 48 представлены данные о влиянии ЛНП и аутоантител против них на содержание суммарного холестерина в клетках, культивируемых из непораженной интимы аорты человека. Можно видеть, что совместное добавление нативных ЛНП и аутоантител ведет к увеличению содержания внутриклеточного холестерина. В случае цмЛНП, эффект аутоантител еще более выражен.

Необходимо отметить, что увеличение размеров иммунных комплексов ведет к заметному увеличению их атерогенного потенциала (таблица 49). Так С1q-компонент комплемента, а также фибронектин вызывали выраженное усиление атерогенности иммунных комплексов.

Данные о ингибирующем влиянии цитохалазина В на обусловленное иммунными комплексами накопление внутриклеточного холестерина, свидетельствуют о захвате комплексов путем фагоцитоза (таблица 50).

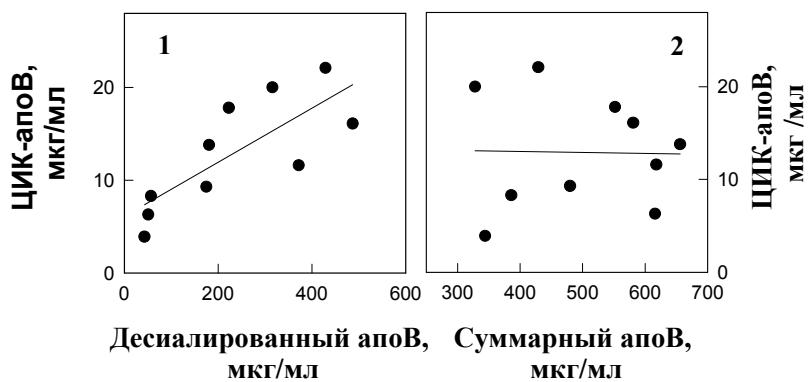


Рис 43. Корреляционные зависимости между содержанием апоВ в циркулирующих иммунных комплексах и содержанием десиалированного апоВ (1) и суммарного апоВ (2) в сыворотке.

Таблица 48. Влияние аутоантител на атерогенность нативных ЛНП и цмЛНП

Добавки	Внутриклеточное содержание холестерина, мкг/мг белка
Контроль	22±2
Нативные ЛНП, 100 мкг/мл	24±2
Нативные ЛНП + аутоантитела, 50 мкг /мл	50±3*
ЦмЛНП, 100 мкг/мл	48±2*
ЦмЛНП + аутоантитела	115±12*

Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p<0,05$.

Таблица 49. Влияние С1q-компоненты комплемента и фибронектина на атерогенность иммунных комплексов

Добавки	Внутриклеточное содержание холестерина, мкг/мг белка
Контроль	38±3
Нативные ЛНП, 100 мкг/мл	41±3
ЛНП + аутоантитела, 50 мкг/мл	68±5*
ЛНП + С1q, 100 мкг/мл	48±5
ЛНП + фибронектин, 100 мкг/мл	42±4
ЛНП + аутоантитела + С1q	105±9*
ЛНП + аутоантитела + С1q + фибронектин	169±13*

Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p<0,05$.

Таблица 50. Влияние цитохолазина В на атерогенность иммунных комплексов

Добавки	Внутриклеточное содержание холестерина, мкг/мг белка
Контроль	28±2
Нативные ЛНП, 100 мкг/мл	28±1
ЛНП + аутоантитела, 50 мкг/мл	62±2*
ЛНП + аутоантитела + цитохалазин В	36±3

Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p<0,05$.

2.7.3. Формирование комплексов ЛНП с компонентами соединительнотканного матрикса

2.7.3.1. Гликозаминогликаны

Хорошо известно, что ЛНП образуют комплексы с некоторыми компонентами внеклеточного матрикса, в частности с гликозаминогликанами [Srinivasan et al., 1970; Iverius, 1972; Lindahl, Hook, 1978]. Мы решили выяснить, может ли внесение в культуру клеток гликозаминогликанов индуцировать ЛНП-опосредованное накопление внутриклеточного холестерина. Одновременное добавление в культуру ЛНП и гиалуроновой кислоты не вызывало накопления внутриклеточного холестерина (таблица 51, эксперимент 1). Гепарин и хондроитин-сульфат также не индуцировали ЛНП-опосредованный липоидоз. Однако, синтетический гликозаминогликан, декстран-сульфат, индуцировал увеличение содержания общего внутриклеточного холестерина на 80% за 24 часа инкубации.

2.7.3.2. Коллагеназа-резистентный дебрис

Другим компонентом внеклеточного матрикса, который добавляли в культуру одновременно с ЛНП, был коллагеназа-резистентный дебрис, полученный путем ферментативного переваривания стенки аорты. Ранее мы заметили, что в сильно загрязненных этим дебрисом культурах клетки за несколько дней культивирования приобретают липидные включения в виде гранул и мелких капель. Добавление коллагеназа-резистентного дебриза в культуру вызывало более чем 5-кратное увеличение уровня внутриклеточного холестерина за 24 часа (таблица 51, эксперимент 4). Еще большее, почти 7-кратное, увеличение содержания холестерина наблюдалось при

одновременном добавлении в культуру дебриса и ЛНП. Делипидированный дебрис в отсутствии ЛНП не вызывал накопления холестерина в культивируемых клетках, однако одновременное добавление в культуру делипидированного дебриса и ЛНП приводило к 4-кратному увеличению общего внутриклеточного холестерина.

2.7.3.3. Эластин

В состав коллагеназа-резистентных частичек внеклеточного матрикса стенки аорты может входить эластин. Вот почему было решено испытать в культуре этот компонент сосудистой стенки. Эластин, выделенный из аорты человека, вызывал 3.5-кратное увеличение внутриклеточного холестерина, в то время как делипидированный эластин в отсутствии ЛНП не изменял значимо содержание холестерина (Таблица 51, эксперимент 3). Добавление в культуру делипидированного эластина вместе с ЛНП приводило к существенному накоплению холестерина в культивируемых клетках (более чем 3-кратное увеличение).

Таблица 51. Влияние ЛНП и различных агентов на содержание суммарного холестерина в клетках непораженной интимы аорты человека

Добавки	Внутриклеточное содержание холестерина, мкг/мг белка
<i>Эксперимент 1.</i>	
Контроль	7,8±0,3
ЛНП, 100 мкг/мл	8,1±0,9
ЛНП+гиалуроновая кислота, 100 мкг/мл	7,5±0,8
ЛНП+гепарин, 100 мкг/мл	7,2±0,8
ЛНП+хондроитин сульфат, 100 мкг/мл	8,5±0,5
ЛНП+декстран сульфат, 100 мкг/мл	12,8±0,5*
<i>Эксперимент 2.</i>	
Контроль	20,3±1,8
ЛНП, 100 мкг/мл	20,5±1,6
ЛНП+Фибронектин (Фн), 100 мкг/мл	19,6±2,6
ЛНП+Гепарин (Гп), 100 мкг/мл	18,1±0,7
ЛНП+Коллаген (К), 100 мкг/мл	31,5±2,6*
ЛНП+Фн+Гп	32,0±2,4*
ЛНП+Фн+Гп+С	52,8±6,2*
ЛНП+Фн+Гп (Комплекс)	153,7±8,3*
ЛНП+Фн+Гп+С (Комплекс)	195,7±4,3*

Продолжение на следующей странице.

Добавки	Внутриклеточное содержание холестерина, мкг/мг белка
Эксперимент 3.	
Контроль	8,9±0,6
ЛНП, 100 мкг/мл	8,7±0,8
Дебрис, 100 мкг белка/мл	48,9±3,7*
Делипидированный дебрис, 100 мкг белка/мл	10,3±0,5
ЛНП+Дебрис	59,9±1,3*
ЛНП+делипидированный дебрис	37,5±2,8*
Эксперимент 4.	
Контроль	11,4±0,8
ЛНП, 100 мкг/мл	13,5±1,5
Эластин, 200 мкг/мл	40,0±7,3*
Делипидированный эластин, 200 мкг/мл	13,0±2,1
ЛНП+Делипидированный эластин	36,2±4,5*

Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p<0,05$.

2.7.3.4. Фибронектин, гепарин, коллаген

Одним из важнейших компонентов внеклеточного соединительнотканного матрикса аорты является коллаген [StClair, 1976]. Денатурированный коллаген - желатин, добавленный в культуру одновременно с ЛНП, вызывал небольшое (1.5-кратное), но значимое увеличение холестерина в культивируемых клетках (таблица 51, эксперимент 2).

Высокомолекулярный гликопротеид фибронектин входит в состав внеклеточного матрикса аорты и других артерий [Natali et al., 1981; Jensen et al., 1983; Orekhov et al., 1984; Dalferes et al., 1985; Labat-Robert, 1985; Smith, Ashal, 1986]. Добавление в культуру фибронектина вместе с ЛНП не изменяло содержание внутриклеточного холестерина (таблица 51, эксперимент 2). Однако, если в культуру помимо ЛНП и фибронектина добавляли еще и гепарин, который, как указывалось выше, сам по себе не индуцирует ЛНП-опосредованный клеточный липоидоз (таблица 51, эксперименты 1 и 2), то это приводило к значимому 1,5-кратному увеличению уровня внутриклеточного холестерина. Если кроме перечисленных веществ добавляли еще и желатин, то наблюдалось 2,5-кратное увеличение содержание холестерина. Значительно более существенное, 8- и 10-кратное увеличение внутриклеточного холестерина наблюдалось, если в культуру добавляли заранее приготовленные по Falcone et al. [1984] комплексы из ЛНП, фибронектина и гепарина без желатина или вместе с ним, соответственно.

2.7.3.5. Латекс

Микросфера полистиринового латекса диаметром 1 мкм, добавленные в культуру субэндотелиальных интимальных

клеток аорты одновременно с ЛНП (50 мкг белка/мл), индуцировали значимое увеличение внутриклеточного содержания триглицеридов, свободного холестерина и эфиров холестерина в 1,5, 2,5 и 4 раза, соответственно (таблица 52). Ни ЛНП, ни латекс сами по себе не изменяли содержание внутриклеточных липидов.

Таблица 52. Влияние ЛНП и полистириновых микросфер (латекс) на содержание липидов в клетках непораженной интимы аорты человека

Добавки	Содержание липидов, мкг/мг белка			
	ФЛ	ТГ	СХ	ЭХ
Контроль	31,5±1,9	3,1±0,2	6,3±0,5	5,4±0,4
ЛНП, 50 мкг/мл	29,5±0,6	3,3±0,4	6,9±0,5	6,4±1,3
Латекс, 10 ⁹ /мл	31,7±4,4	3,8±0,2	7,3±0,5	7,2±0,6
ЛНП+латекс	38,9±2,3	4,5±0,2*	16,2±1,4*	20,9±0,9*

ФЛ - фосфолипиды, ТГ – триглицериды, СХ – свободный холестерин, ЭХ – эфиры холестерина. Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, p<0,05.

Для более детальной характеристики индуцированного латексом ЛНП-опосредованного накопления внутриклеточных липидов были проведены дополнительные эксперименты.

При постоянной концентрации латекса (10^9 микросфер/мл) накопление общего внутриклеточного холестерина зависело от концентрации ЛНП в культуральной среде. Значимое увеличение содержания холестерина в клетках имело место при концентрации ЛНП равной 50 мкг белка/мл, а при концентрациях 200-500 мкг белка/мл наступало насыщение эффекта. Накопление холестерина зависело также от количества микросфер, добавляемых в культуру. В диапазоне концентраций 10^8 - 10^{10} микросфер/мл имела место прямая линейная зависимость между приростом внутриклеточного холестерина и числом микросфер, добавляемых в культуральную среду, содержащую 50 мкг белка ЛНП/мл.

ЛНП и полистироловые микросфераы были способны образовывать ассоциаты в культуральной среде в условиях культивирования. Образование ассоциата происходило довольно быстро - уже через 1 час до 30% холестерина ЛНП, инкубируемых с полистироловыми микросферами, адсорбировалось на поверхности микросфер (таблица 53). Максимальное количество ЛНП (иногда более половины внесенных в среду ЛНП) адсорбировалось на микросферах за 4-8 часов инкубации.

Микросфераы одного диаметра, но приготовленные из различного материала, различались по способности адсорбировать ЛНП на своей поверхности. Максимальное количество ЛНП, адсорбирующихся на карбоксилированных микросферах, на 50-70% превышало максимальное количество ЛНП, адсорбирующихся на полистироловых микросферах

(таблица 53). Эти два типа микросфер отличались и по способности вызывать ЛНП-опосредованный прирост холестерина в культивируемых интимальных клетках. При инкубации с карбоксилированными микросферами прирост холестерина был на 70% выше, чем при инкубации с полистириновыми шариками латекса (таблица 54).

Таблица 53. Адсорбция ЛНП на поверхности микросфер латекса

Время инкубации, час	Адсорбированный белок, мкг	Адсорбированный холестерин, мкг
Полистириновые микросфераы		
1	20,8±1,4	15,3±1,2
4	29,7±3,0	30,4±1,4
16	38,0±1,8	37,4±2,2
Карбоксилированные микросфераы		
1	37,8±2,6	30,7±1,4
4	49,3±4,7	50,6±2,4
16	56,7±3,2	53,5±1,7

10^9 микросфер латекса инкубировали с 100 мкг/мл ЛНП в среде 199 при 37°C. После инкубации латекс промывали трижды ИФБ и определяли содержание в нем белка и холестерина. Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение.

Таблица 54. Влияние ЛНП, полистириновых (Пс) и карбоксилированных (Кс) микросфер на содержание суммарного холестерина в клетках непораженной интимы аорты человека

Добавки	Внутриклеточное содержание холестерина, мкг/мг белка
Контроль	12,4±1,7
Пс-микросфераы, 109/мл	14,8±1,7
Кс-микросфераы, 109/мл	13,8±0,9
ЛНП, 100 мкг/мл	13,3±0,8
ЛНП+Пс-микросфераы	37,5±4,3*
ЛНП+КС-микросфераы	54,2±6,8*
ЛНП+Пс-микросфераы (комплекс)	40,8±2,4*
ЛНП+Кс-микросфераы (комплекс)	59,3±4,8*

Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p<0,05$.

Внесение в культуру заранее приготовленных ассоциатов ЛНП с микросферами, отмытых от свободных ЛНП с помощью центрифугирования, вызывало увеличение содержания общего холестерина в культивируемых клетках. Прирост холестерина в этом случае был приблизительно таким же, как при одновременном добавлении ЛНП и микросфер; различие между полистироловыми и карбоксилированными микросферами в способности индуцировать накопление холестерина также сохранялось (таблица 54).

Следует отметить, что в присутствии ЛНП и в их отсутствии карбоксилированные микросфера захватывались клетками эффективнее, чем полистироловые. Так, в присутствии ЛНП клетки захватывали 10 ± 4 полистироловых микросфер на клетку (среднее±стандартное математическое отклонение, определено на 200 клетках) и 21 ± 7 карбоксилированных микросфер (150 клеток), без ЛНП - 12 ± 4 полистироловых (200 клеток) и 20 ± 5 карбоксилированных (100 клеток).

2.7.3.6. Образование нерастворимых ЛНП-содержащих ассоциатов

Результаты экспериментов с индуцированным латексом ЛНП-опосредованным накоплением внутриклеточного холестерина позволили предположить, что принципиальное значение в этом процессе имеет образование нерастворимого ассоциата ЛНП с латексом. В связи с этим было решено проверить, в каких случаях образуются нерастворимые ассоциаты между ЛНП и испытанными ранее веществами: эластином, коллагеном, гликозаминогликанами, фибронектоном и пр.

С этой целью ЛНП (100 мкг белка/мл) инкубировали с испытуемыми агентами в культуральной среде, соблюдая условия культивирования. Через определенные промежутки времени инкубационную смесь подвергали центрифугированию (10.000xg, 20 мин) и в осадке определяли суммарный холестерин. Частицы коллагеназа-резистентного дебриса и эластина в условиях культивирования были способны образовывать нерастворимые ассоциаты с ЛНП, причем эластин связывал ЛНП эффективнее и быстрее чем дебрис. Из всех испытанных гликозаминогликанов только декстран-сульфат образовывал нерастворимые ассоциаты с ЛНП. За 24 часа инкубации в условиях культивирования декстран-сульфат способствовал появлению в осадке 20% от исходно добавленных ЛНП (по холестерину), что ниже чем в случае эластина и дебриса (37% и 30%, соответственно). Другие гликозаминогликаны: хондроитин-сульфат, гиалуроновая кислота и гепарин - не вызывали появления в осадке измеряемых количеств холестерина. Желатин по эффективности образования нерастворимых ассоциатов с ЛНП был близок к декстран-сульфату. Фибронектин не образовывал нерастворимых ассоциатов с ЛНП, в то время как 24-часовая инкубация ЛНП с фибронектином и гепарином или фибронектином, гепарином и желатином приводила к появлению в осадке, соответственно, 73% и 82% от исходно внесенных в инкубационную смесь ЛНП.

Таким образом, можно видеть, что именно те агенты, которые способны индуцировать ЛНП-опосредованное накопление внутриклеточного холестерина в культуре, образуют в условиях культивирования нерастворимые ассоциаты с ЛНП, и наоборот, вещества, неспособные

образовывать нерастворимые ассоциаты с ЛНП, не индуцируют накопление внутриклеточного холестерина. Более того, можно заметить, чем эффективнее то или иное вещество образует нерастворимый ассоциат с ЛНП, тем выше накопление холестерина в культивируемых клетках. Была обнаружена прямая и очень высокая корреляция (коэффициент корреляции равен 0.927) между содержанием холестерина в нерастворимом ассоциате, образующемся в условиях культивирования, и приростом холестерина в культивируемых клетках.

Помимо перечисленных комплексов ЛНП мы также исследовали комплексы ЛНП-протеогликаны. Протеогликаны были выделены из непораженной и атеросклеротической интимы аорты человека. Как следует из данных, приведенных в таблице 55, все исследованные комплексы протеогликанов с ЛНП вызывали накопление внутриклеточного холестерина. При этом комплексы, содержащие цмЛНП, были более атерогенными (таблица 55).

В таблице 56 представлены данные о влиянии цитохалазина В на накопление внутриклеточного холестерина, вызванного комплексами ЛНП-протеогликаны интимы аорты человека. Можно видеть, что цитохалазин В ингибирует внутриклеточное отложение холестерина. Эти результаты свидетельствуют о том, что комплексы ЛНП-протеогликаны захватываются интимальными гладкомышечными клетками путем фагоцитоза.

Таблица 55. Влияние комплексов нативных ЛНП и цмЛНП и протеогликанов интимы аорты человека на содержание суммарного холестерина в клетках непораженной интимы аорты человека

Добавки	Внутриклеточное содержание холестерина, % от контроля
Контроль	100±6
Нативные ЛНП, 100 мкг/мл	109±8
+протеогликаны непораженной интимы аорты человека, 100 мкг белка/мл	167±6*
+протеогликаны жировой полосы, 100 мкг/мл	198±12*
ЦмЛНП, 100 мкг/мл	189±11*
+протеогликаны непораженной интимы аорты человека, 100 мкг белка/мл	243±16*
+протеогликаны жировой полосы, 100 мкг/мл	376±27*

Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p<0,05$.

Таблица 56. Влияние цитохалазина В на содержание суммарного холестерина в клеках, культивируемых из непораженной интимы аорты человека

Добавки	Внутриклеточное содержание холестерина, % от контроля
Контроль	100±10
Цитохалазин В, 10^{-5} М	102±8
ЦмЛНП, 100 мкг/мл	167±12*
ЦмЛНП-протеогликаны	389±34*
ЦмЛНП-протеогликаны+ цитохалазин В	137±21

Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение. *, достоверное отличие от контроля, $p<0,05$.

2.7.4. Обсуждение результатов

Основным итогом исследований, результаты которых представлены в этой главе, является заключение, что цмЛНП способны образовывать агрегаты, иммунные комплексы и комплексы с компонентами соединительнотканного матрикса. Эти комплексы захватываются клетками с помощью фагоцитоза и вызывают значительное накопление внутриклеточных липидов.

Диаметр агрегатов ЛНП составляет от 50 до 500 нм. Зная, что диаметр частицы ЛНП составляет 24-27 нм и, предполагая, что он не изменяется при агрегации, а агрегат имеет сферическую форму, можно приблизительно рассчитать количество частиц, формирующих агрегат. Расчет показывает, что агрегат может содержать от 5 до 4000 частиц ЛНП. Большая часть агрегатов содержит около 500 частиц ЛНП. Следовательно, захват одного агрегата эквивалентен захвату нескольких сотен или тысяч частиц ЛНП. Это делает понятным высокий атерогенный потенциал агрегатов ЛНП.

Такой же высокий атерогенный потенциал проявляли и ЛНП-содержащие иммунные комплексы. Результаты этого исследования показывают, что ЛНП, входящие в состав циркулирующих иммунных комплексов, отличаются от нативных липопротеидов по многим параметрам. ЦИК-ЛНП имеют низкое содержание сиаловой кислоты, т.о. это - десиалированные ЛНП. Содержание нейтральных липидов и фосфолипидов в ЦИК-ЛНП значительно ниже, чем в нативных липопротеидах. ЦИК-ЛНП имеют меньший диаметр и большую плотность. Повышенная электрофоретическая подвижность указывает на больший отрицательный заряд частиц ЦИК-ЛНП. Наконец, в отличие от нативных ЛНП, ЦИК-ЛНП способны вызывать отложение

нейтральных липидов и, в первую очередь, эфиров холестерина в клетках непораженной интимы аорты человека. Таким образом, ЦИК-ЛНП по всем исследованным характеристикам сходны с цмЛНП, обнаруженными и описанными нами.

Мы обнаружили тесную корреляцию между содержанием ЛНП в циркулирующих иммунных комплексах и уровнем цмЛНП, но не общих ЛНП в крови людей. Этот факт свидетельствует о том, что преимущественно цмЛНП образуют комплексы с аутоантителами. Это наблюдение хорошо согласуется с полученными нами ранее данными о том, что сродство аутоантител к *in vitro* десиалированным ЛНП выше, чем к нативным липопротеидам [Orekhover et al., 1991]. Более того, мы показали ранее, что связывание аутоантител с суммарными ЛНП пациентов, содержащих высокий процент десиалированных липопротеидов, выше, чем с суммарными ЛНП здоровых лиц, где доля десиалированных ЛНП низка.

ЦмЛНП имеют ряд модификаций, которые могли бы стимулировать иммунный ответ. К ним относятся изменение третичной структуры апоВ и углеводного состава, модификация аминогрупп остатков лизина, агрегация липопротеидных частиц. Все эти факты позволяют предположить, что именно циркулирующие множественно-модифицированные ЛНП обладают иммуногенными свойствами.

В данном исследовании мы обнаружили, что содержание оксистеролов в ЦИК-ЛНП выше, чем в нативных сиалированных ЛНП. Это может указывать на протекание процессов перекисного окисления липидов в этих липопротеидах. Недавно появились сообщения о наличии в крови пациентов антител против окисленных ЛНП [Palinski et al., 1989; Salonen et al., 1992; Craig et al., 1984; Eber et al., 1994; Maggi et al., 1994]. При этом в

большинстве работ были использованы антитела не против окисленных ЛНП, а против МДА-лизина и против МДА-модифицированных ЛНП. Нами также обнаружено, что аутоантитела, выделенные из крови пациентов с коронарным атеросклерозом и имеющие наивысшее сродство к десиалированным ЛНП, имеют также большее сродство к МДА-модифицированным ЛНП, чем к нативным липопротеидам [Orekhov et al., 1991]. Таким образом, факт наличия в крови антител к МДА-модифицированным ЛНП не вызывает сомнения. С другой стороны, мы не обнаружили ЛНП с высоким уровнем малонового диальдегида, выявляемого как ТБК-реактивный продукт, в циркулирующих иммунных комплексах. Этот факт может объясняться отсутствием или очень низким содержанием МДА-модифицированных ЛНП в циркуляции. С другой стороны, малоновый диальдегид способен образовывать аддукты со многими другими белками помимо аполипопротеинов [Craig et al., 1984]. Поэтому можно предположить, что образование антител против МДА-лизина вызвано наличием в крови других МДА-модифицированных белков, отличных от апоВ. Это предположение подтверждается перекрестной реактивностью анти-МДА-ЛНП и анти-МДА-альбумина [Salonen et al., 1992]. Наконец, нельзя исключить периодического появления в циркуляции МДА-ЛНП, обусловленного повышением концентрации малонового диальдегида при активации процессов перекисного окисления липидов.

Использование техники иммуноблоттинга после разделения человеческих аутоантител против ЛНП методом изоэлектрофокусировки продемонстрировало наличие 12-15 хорошо разделяющихся фракций иммуноглобулинов G, взаимодействующих с ЛНП [Orekhov et al., 1991]. Это позволяет

предположить, что различные подфракции иммуноглобулинов представляют собой аутоантитела к различным эпитопам модифицированной липопротеидной частицы. Дальнейшие исследования позволяют определить вклад отдельных модификаций в иммуногенность модифицированных липопротеидов. Однако, уже сейчас ясно, что появление в крови пациентов аутоантител против липопротеидов связано с наличием в циркуляции цмЛНП.

Во многих исследованиях было продемонстрировано наличие высоких концентраций циркулирующих иммунных комплексов, включая комплексы, содержащие ЛНП, в крови пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и гиперлипидемиями [Beaumont et al., 1969; Fust et al., 1977, 1978; Farrell et al., 1977; Gallagher et al., 1982; Szondy et al., 1983; Tertov et al., 1987, 1988; Konarska et al., 1986]. В атеросклеротических поражениях сосудов человека и в пенистых клетках были найдены иммуноглобулины и другие компоненты иммунных комплексов [Niculescu et al., 1985, 1987; Vlaicu et al., 1985; Lazzani et al., 1985]. Возможно, циркулирующие иммунные комплексы, содержащие ЛНП, *in vivo* могут также стимулировать накопление внутриклеточных липидов в зоне атеросклеротических реакций.

В нашем исследовании было обнаружено формирование крупных нерастворимых комплексов ЛНП с рядом природных и искусственных компонентов. Первым из таких комплексов был описан комплекс ЛНП с декстран-сульфатом [Basu et al., 1979]. Добавленный в сыворотку декстран-сульфат осаждает в основном ЛНП и ЛОНП [Brown et al., 1983; Pearson, 1976; Kielian, Cohn, 1982]. С другой стороны, известно, что нативные ЛНП образуют комплексы с декстран-сульфатом [Srinivasan et al.,

1970; Iverius, 1972; Lindahl, Hook, 1978]. Было показано, что ЛНП-декстран-сульфат комплексы деградируются с высокой эффективностью макрофагами и, что холестерин ЛНП накапливается в клетках [Basu et al., 1979].

Давно известно, что ЛНП образуют комплексы с определенными гликозаминогликанами, и предполагается, что это свойство ЛНП важно в накоплении ЛНП в интерстициальном пространстве и клетках при патологических условиях [Srinivasan et al., 1970; Iverius, 1972; Lindahl, Hook, 1978]. Однако, Basu et al. [1979] не смогли показать, что какие-либо из естественных гликозаминогликанов увеличивают захват и деградацию ЛНП в перитонеальных макрофагах мыши, хотя некоторые из них, особенно декстран-сульфат, как известно, образуют комплексы с ЛНП. Эти наблюдения хорошо согласуются с нашими данными. Из всех исследованных нами гликозаминогликанов только декстран-сульфат индуцировал ЛНП-опосредованное накопление холестерина в культивируемых субэндотелиальных клетках аорты человека и перитонеальных макрофагах мыши. Мы связываем это с тем, что только декстран-сульфат, но не другие гликозаминогликаны, способен образовывать нерастворимый комплекс с ЛНП в условиях культивирования.

Гепарин способен образовывать комплексы с ЛНП, но, в отличие от декстран-сульфата, гепарин образует растворимые комплексы и, вероятно, поэтому комплексы ЛНП-гепарин не вызывают накопления липидов. С другой стороны, Falcone et al. [1984] показали недавно, что гепарин вместе с фибронектином или вместе с фибронектином и денатурированным коллагеном образует ЛНП-содержащие комплексы, которые вызывают существенное накопление эфиров холестерина в культивируемых макрофагах. Используя эти комплексы, мы

получили на культивируемых субэндотелиальных клетках аорты такие же эффекты, какие получили Falcone et al. на макрофагах. Кроме того, нам удалось продемонстрировать, что каждый из компонентов, входящих в комплекс ЛНП-гепарин-фибронектин-желатин или комбинация этих компонентов вызывает ЛНП-опосредованное накопление внутриклеточного холестерина только в том случае, если в процессе инкубации их с ЛНП образуются нерастворимые ЛНП-содержащие комплексы.

Данные о том, что декстран-сульфат или гепарин вместе с фибронектином и коллагеном индуцируют накопление внутриклеточных липидов, позволяют предположить, что гликозаминогликаны, как составная часть протеогликанов, являются необходимым компонентом в ЛНП-опосредованном липоидозе артериальных клеток. Протеогликаны артериальной стенки связываются с ЛНП *in vitro* [Vijayagopal et al., 1980, 1981, 1983], и крупные ЛНП-протеогликан комплекссы, исследованные как липопротеин-гликозаминогликан комплекссы, были экстрагированы из сосудистой ткани [Srinivasan et al., 1972, 1975, 1983; Woodard et al., 1976]. Salisbury et al. [1985] показали, что макрофаги, инкубируемые с комплексами ЛНП-аортальные протеогликаны, накапливают большие количества эфиров холестерина. Кроме того, Vijayagopal et al. [1985] показали, что ассоциация нативных агрегатов протеогликанов с ЛНП необходима для стимуляции ЛНП-опосредованного накопления эфиров холестерина в макрофагах.

Взаимодействие ЛНП и сосудистого внеклеточного матрикса в течение долгого времени рассматривалось как важный момент в накоплении липидов в атеросклеротическом поражении [Samejo, 1982]. Большая часть ЛНП, инфильтрирующих сосудистую стенку, остается внеклеточной

[Hoff et al., 1975; Hoff, Gaubatz, 1975; Walton, Morris, 1977]. Было обнаружено, что пропорция связанных нерастворимых ЛНП к экстрагируемым ЛНП в атеросклеротическом поражении увеличивается [Bradly et al., 1979; Hoff et al., 1978]. Связывание ЛНП с внеклеточным матриксом может происходить за счет их взаимодействия как с протеогликанами, так и с другими компонентами артериальной соединительной ткани. В этой связи мы исследовали коллагеназа-резистентные частицы (неидентифицированный компонент сосудистой стенки), очищенный эластин аорты и денатурированный коллаген. Эластин был исследован потому, что давно известен как весьма важный фактор в патогенезе атеросклероза [Kramsch et al., 1971, 1973; Tokita et al., 1977; Noma et al., 1983; Guyton et al., 1985; Winlove et al., 1985]. Было предположено, что эластин или ЛНП-эластин комплексы могут играть уникальную и важную роль в ранних внеклеточных накоплениях липидов в артериях человека [Guyton et al., 1985]. Эластин, коллагеназа-резистентные частицы и денатурированный коллаген индуцировали ЛНП-опосредованное накопление холестерина в интимальных клетках аорты человека и перитонеальных макрофагах мыши. В то же время, эти агенты способствовали инсолюбилизации ЛНП. Мы склонны предполагать, что именно образование нерастворимых ассоциатов с ЛНП обеспечивает накопление внутриклеточных липидов в тех случаях, когда культивируемые клетки инкубируются с компонентами внеклеточного матрикса.

Наши данные свидетельствуют о том, что конечный результат - накопление внутриклеточных липидов - не зависит от природы агента, индуцирующего это накопление. Более того, наши эксперименты с антителами и латексом, которые тоже

вызывают ЛНП-опосредованное накопление липидов, позволили предположить, что присутствие в комплексе определенных компонентов внеклеточного матрикса на самом деле не так уж важно. Значительно более важным оказалось то, сколько ЛНП может сорбировать на себе инсолюбилизирующий субстрат. Это демонстрируют наши эксперименты с полистероловыми и карбоксилированными шариками латекса. Чем больше ЛНП сорбировалось на шариках, тем выше было накопление холестерина в культивируемых клетках. Мы обнаружили прямую и очень тесную корреляцию между накоплением внутриклеточного холестерина и содержанием холестерина в нерастворимых ассоциатах, образующихся при инкубации клеток с ЛНП в присутствии различных агентов. Величина холестерина, накапливающегося в клетках, зависела не от природы агента, но от количества холестерина, связанного с нерастворимым ассоциатом. Ни в одном случае мы не обнаружили накопления липидов, если параллельно не отмечалась инсолюбилизация ЛНП.

Итак, накопление внутриклеточного холестерина за счет нерастворимого ЛНП-содержащего ассоциата - это неспецифическое явление в том смысле, что оно не зависит от природы вещества, взаимодействующего с ЛНП. Кроме того, это явление неспецифично еще и потому, что не только ЛНП, но и другие липопротеиды, такие как ЛОНП и даже ЛВП вызывали накопление холестерина в клетках, если образовывали нерастворимые ассоциаты с каким-либо субстратом. Как и ЛНП, ЛОНП и ЛВП вызывали тем большее накопление внутриклеточного холестерина, чем больше холестерина попадало в нерастворимый ассоциат, образующийся при инкубации. ЛОНП- и ЛВП-опосредованное накопление

холестерина в клетках не было обнаружено, если нерастворимый ассоциат не образовывался. Более того, агрегаты ЛНП и их иммунные комплексы также вызывают отложение внутриклеточного холестерина. Из этого мы делаем вывод, что накопление внутриклеточных липидов индуцируемое ЛНП-содержащими нерастворимыми ассоциатами - это неспецифическое явление, которое не зависит ни от природы инсолюбилизирующего агента, ни от природы липид-несущей частицы, но зависит, прежде всего, от количества липида в ассоциате.

Существует еще один признак неспецифичности накопления внутриклеточных липидов, индуцируемого инсолюбилизацией ЛНП. Инсолюбилизация липопротеида вызывала накопление внутриклеточного холестерина как в субэндотелиальных клетках интимы аорты человека, так и в макрофагах. Следовательно, клеточный липидоз, индуцируемый инсолюбилизацией ЛНП, может проявляться на клетках разных типов.

Какое значение может иметь инсолюбилизация ЛНП в патогенезе атеросклероза, точнее, в липидозе клеток, который сопровождает атеросклероз, начиная с самых ранних его проявлений? Если попытаться экстраполировать наши данные, полученные в культуре клеток на ситуацию *in vivo*, резонно поставить вопрос, какие частицы в сосудистой стенке или в крови способны образовывать нерастворимый комплекс с ЛНП и тем самым индуцировать внутриклеточное накопление холестерина, которое имеет место при атеросклерозе. В сосудистой стенке в зоне атероматозного распада недостатка в таких частицах, по-видимому, нет. Атероматозная деградация эластических и коллагеновых волокон, а также других

внеклеточных соединительнотканых структур может приводить к появлению в артериальной стенке частиц эластина, коллагена, протеогликанов, способных образовывать нерастворимые комплексы с ЛНП. Исходя из этого, следует предположить, что обнаруженное нами и другими исследователями накопление внутриклеточных липидов, опосредуемое ЛНП-содержащими нерастворимыми комплексами, может иметь отношение по крайней мере к далеко зашедшему процессу атеросклеротического изменения артерии, сопровождающимся разрушением соединительной ткани.

Заключение

В этом исследовании в крови людей была обнаружена подфракция липопротеидов низкой плотности, способная вызывать накопление липидов и, в первую очередь, эфиров холестерина, в гладкомышечных клетках непораженной интимы аорты человека. Таким образом, была преодолена парадоксальная ситуация, когда нативные ЛНП не вызывали отложения внутриклеточного жира, а *in vitro* модифицированные ЛНП не были обнаружены в кровотоке.

Помимо накопления эфиров холестерина цмЛНП стимулируют клеточную пролиферацию и синтез компонентов соединительнотканного матрикса.

Нам удалось показать, что атерогенные ЛНП характеризуются многочисленными изменениями в углеводной, белковой и липидной составляющих и могут быть названы множественно-модифицированными ЛНП. Множественная модификация происходит в плазме крови человека.

Продемонстрировано, что цмЛНП теряют сродство к ЛНП-рецептору, однако, преобретают способность взаимодействовать с рядом других мембранных рецепторов и компонентов. Усиленный захват клетками цмЛНП, низкая скорость деградации липопротеидных частиц и гидролиза их эфиров холестерина, а также стимуляция этерификации свободного холестерина являются причинами внутриклеточного накопления эфиров холестерина, образующих липидные включения, характерные для атеросклеротических клеток. Этот процесс может быть усилен формированием цмЛНП крупных комплексов (агрегаты, иммунные комплексы, комплексы с компонентами матрикса), захватываемых клетками путем фагоцитоза.

Таким образом, в этом исследовании открыты и изучены циркулирующие в крови человека множественно-модифицированные ЛНП, способные вызывать все проявления атеросклероза на клеточном уровне.

Выводы

1. Обнаружена и выделена подфракция циркулирующих модифицированных липопротеидов низкой плотности (цмЛНП), которые, в отличие от нативных ЛНП, вызывают накопление липидов, в частности, эфиров холестерина, в гладкомышечных клетках непораженной интимы аорты человека, т.е. являются атерогенными. Вызванное цмЛНП внутриклеточное накопление липидов сопровождается усилением синтеза компонентов соединительнотканного матрикса и стимулирует клеточную пролиферацию. Таким образом, цмЛНП вызывают все основные проявления атеросклероза человека на клеточном уровне: липоидоз, фиброз, гиперцеллюлярность.
2. ЦмЛНП отличаются от нативных ЛНП низким содержанием аполипопротеид В-связанной и липид-связанной сиаловой кислоты, т.е. представляют собой десиалированные ЛНП. ЦмЛНП характеризуются также сниженным уровнем нейтральных углеводов как в апобелке, так и в гликолипидах липопротеидной частицы.
3. Содержание нейтральных липидов (свободного и этерифицированного холестерина и триглицеридов), а также фосфолипидов (фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, сфингомиелина) в цмЛНП ниже, чем в нативных липопротеидах.
4. ЦмЛНП имеют повышенный уровень оксистеролов и аддуктов липидов с апобелком, что указывает на большую степень окисленности *in vivo*. При этом, способность цмЛНП вызывать накопление внутриклеточного холестерина не коррелирует со степенью *in vivo* окисленности ЛНП. Сниженное, по сравнению с нативными ЛНП, содержание жирорастворимых антиоксидантов: убихинола, α - и γ -токоферолов, каротиноидов, -

по-видимому, определяет повышенную окисляемость цмЛНП *in vitro*.

5. ЦмЛНП имеют меньший размер, большую плотность и повышенный электроотрицательный заряд по сравнению с нативными ЛНП.

6. Изменения доступности аминогрупп лизиновых остатков для взаимодействия тринитробензолсульфоновой кислотой и устойчивости к протеолитической деградации свидетельствуют о модификации аминогрупп и изменении третичной структуры аполипопротеида В в частицах цмЛНП.

7. Многочисленные изменения, обнаруженные в белковой, липидной и углеводной составляющих атерогенных цмЛНП, а также изменения физических параметров липопротеидных частиц определяют эти липопротеиды как множественно-модифицированные ЛНП.

8. Обнаруженные нами цмЛНП, а также более электроотрицательные ЛНП и мелкие плотные ЛНП, описанные другими исследователями, по-видимому, представляют собой одну и ту же подфракцию близких по свойствам липопротеидных частиц, подвергшихся множественной модификации.

9. Множественная модификация нативных ЛНП может происходить в плазме крови и представляет собой каскад последовательных событий: десиалирование ЛНП, появление атерогенных свойств, потеря нейтральных липидов и фосфолипидов, уменьшение размера частиц, увеличение электроотрицательного заряда частиц, протекание процессов перекисного окисления липидов. Десиалирование ЛНП осуществляется обнаруженной в крови человека транссиалидазой, переносящей сиаловую кислоту между

гликоньюгатами липопротеидов, гликопротеидов и ганглиозидов плазмы и клеток крови.

10. Захват цмЛНП гладкомышечными клетками непораженной и, особенно, атеросклеротической интимы аорты человека значительно превосходит захват нативных ЛНП. Усиленный захват цмЛНП обусловлен их дополнительным, помимо ЛНП-рецептора, связыванием со скэвенджер-рецептором, ациалогликопротеид-рецептором, а также с протеогликанами плазматических мембран клеток аорты. Скорость внутриклеточной деградации аполипопротеида В цмЛНП существенно ниже скорости деградации апобелка нативных липопротеидов. Этот феномен объясняется изменением третичной структуры аполипротеида В цмЛНП, а также вовлечением различных клеточных протеиназ в деградацию апобелка нативных и модифицированных липопротеидов. Усиленный захват и низкая скорость деградации апобелка приводят к накоплению цмЛНП в гладкомышечных клетках интимы аорты человека.

11. Низкая скорость гидролиза эфиров холестерина, входящих в состав цмЛНП, и стимуляция внутриклеточной этерификации свободного холестерина являются причиной цмЛНП-зависимого накопления эфиров холестерина в клетках, культивируемых из непораженной интимы аорты человека.

12. Образование крупных комплексов, содержащих цмЛНП (агрегатов, комплексов с компонентами соединительнотканного матрикса, циркулирующих иммунных комплексов), стимулирует захват липопротеидов клетками, подавляет деградацию липидов цмЛНП и, тем самым, усиливает их атерогенный потенциал.

Список литературы

Аничков НН. Частная патологическая анатомия. Выпуск II. Сердце и сосуды. Второе издание. Москва-Ленинград, Медгиз, 1947.

Бошков ВН, Кузьменко ЕС, Резинк Т, Ткачук ВА. Гормоноподобное действие липопротеидов плазмы крови на тромбоциты и гладкомышечные клетки сосудов человека. Биохимия. 1994; 59, 958-966.

Валентинова НВ, Бушуева ТЛ, Медведева НВ, Морозкин АД, Фуки ИВ. Физико-химические свойства подфракций липопротеидов низкой плотности, полученных в равновесном градиенте плотности. Мол Биология. 1989;23, 1447-1454.

Герасимова, ЕН, Перова НВ, Торховская ТИ, Рууге ЭК, Твердислов ВА, Пасечник ВИ. Молекулярные аспекты взаимодействия липопротеидов плазмы с сосудистой стенкой. Бюлл ВКНЦ АМН СССР. 1978;1, 21-31.

Добрецов ГЕ, Спирин ММ, Кузнецов АА, Попов АВ. Пространственная организация липопротеидов низкой плотности аорты человека. Бюлл Эксп Биол Мед. 1983;96, 45-47.

Климов А.Н. Причины и условия возникновения атеросклероза. Превентивная кардиология (под редакцией Г.И. Косицкого) М., Медицина. 1977, С. 260-321.

Климов А.Н. Аутоиммунная теория патогенеза атеросклероза. Труды 16-й конференции ФЕБО. М.ю Наука. 1987, С. 119-125.

Климов А.Н. Атеросклероз. Превентивная кардиология (под редакцией Г.И. Косицкого) М., Медицина. 1987, С. 239-316.

Климов А.Н. Аутоиммунная теория патогенеза и концепция модифицированных липопротеидов. Вестн АМН СССР. 1990; N11, 30-36.

Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Липиды, липопротеиды и атеросклероз. Практическая медицина. Питер Пресс, С.-Питербург. 1995.

Назарова ВЛ, Андреева ЕР, Тертов ВВ, Гельдиева БС, Орехов АН. Иммуноцитохимическая локализация скэвенджер рецептора в гладкомышечных клетках аорты человека. Бюлл Эксп Биол Мед. 1995;120, 195-198.

Панасенко ОМ, Азизова ОА, Торховская ТИ, Дудаев ВА. Изучение особенностей структурной организации липопротеидов плазмы крови больных ИБС методом спиновых зондов. Вопр мед хим. 1984;6, 40-45.

Формазюк ВЕ, Добрецов ГЕ, Полесский ВА, Торховская ТИ, Герасимова ЕН, Владимиров ЮА. Изменение структуры атерогенных липопротеидов при экспериментальном атеросклерозе. Вопр мед. хим. 1980;4, 540-545.

Afifi AA, Azen SP. Statistical analysis. A computer oriented approach, New York: Academic Press, 1979;138-142.

Aguel NM, Ball RY, Waldman H, Mitchinson MJ. Monocytic origin of foam cells in the atherosclerotic plaques. Atherosclerosis. 1984;53, 265-271.

Alaupovic P. Apolipoproteins and lipoproteins. Atherosclerosis. 1971;13, 141-159.

Austin MA, King MC, Vranizan KM, Newman B, Krauss RM. Inheritance of low-density lipoprotein subclass patterns: results of complex segregation analysis. Am J Hum Genet. 1988;43, 838-846.

Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WC, Krauss RM. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. JAMA. 1988;260, 1917-1921.

Aviram M, Bierman EL, Chait A. Modification of low density lipoprotein bylipoprotein lipase or hepatic lipase induced enhanced

uptake and cholesterol accumulation in cells. J Biol Chem. 1988;263, 15416-15423.

Aviram M, Keidar S, Brook JG. Reduced uptake of cholesterol esterase-modified low density lipoprotein by macrophages. J Biol Chem. 1991;11567-11575.

Aviram M, Maor I. Phospholipase A-2-mediated LDL is taken up at enhanced rate by macrophages. 1992;185, 465-473.

Aviram M, Maor I. Phospholipase D modified LDL is taken up by macrophages at increased rate. A possible role for phosphatidic acid. J Clin Invest. 1993;91, 1942-1952.

Avogaro P, Bittolo Bon G, Cazzolato G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. Arteriosclerosis. 1988; 8, 79-87.

Avogaro P, Cazzolato G, Bittolo-Bon G. Some questions concerning a small, more electronegative LDL circulating in human plasma. Atherosclerosis. 1991;91, 163-171.

Axen R, Porath J. Chemical coupling of enzymes to cross-linked dextran («Sephadex»). Nature. 1966;210, 367-369.

Babiy AV, Gebicki JM, Sullivan DR. Vitamin E content and low density lipoprotein oxidizability induced by free radicals. Atherosclerosis. 1990;81, 175-182.

Baenziger JU, Fiete D. Structural determinants of Ricinus communis agglutinin and toxin specificity for oligosaccharides. J Biol Chem. 1979;254, 9795-9799.

Balla G, Jacob HS, Eaton JW, Belcher JD, Verchelotti GM. Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. Arterioscler Thromb. 1991;11, 1700-1711.

Basu SK, Goldstein JL, Anderson RGW, Brown MS. Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of

cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts. Proc Natl Acad Sci USA. 1976; 73, 3178-3182.

Basu SK, Brown MS, Ho YK, Goldstein JL. Degradation of low density lipoprotein-dextran sulfate complexes associated with deposition of cholesteryl esters in mouse macrophages. J. Biol. Chem. 1979;254, 7141-7146.

Bates SR, Wissler RW. Effect of hyperlipemic serum on cholesterol accumulation in monkey aortic medial cells. Biochim Biophys Acta. 1976;450, 78-88.

Beaumont J-L, Beaumont V, Antonucci M. Presence d'un auto-anticorps anti-beta-lipoproteines dans le serum d'un lapin ayant une hyperlipidemie par immunisation (l'hyperlipidemie par autoanticorps experimentale). C. R. Acad. Sci. [D] (Paris). 1969;268, 1830-1832.

Beaumont JL, Doucet F, Vivier P, Antonucci M. Immunoglobulin-bound lipoproteins (Ig-Lp) as a marker of familial hypercholesterolemia, xanthomatosis and atherosclerosis. Atherosclerosis. 1988; 74, 191-201.

Bermes Jr EW, McDonald HJ: The stability of human serum lipoprotein *in vitro*. Ann Clin Lab Sci. 1972;2, 226-232.

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, 212-221.

Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method for total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol. 1959;37, 911-917.

Boyd HC, Gown AM, Wolfbauer G, Chait A. Direct evidence for a protein recognised by a monoclonal antibody against oxidatively modified LDL in atherosclerotic lesions from a

Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. Am. J. Pathol. 1989;135, 815-825.

Bradby GHV, Walton KW, Watts R. The binding of total low-density lipoproteins in human arterial intima affected and unaffected by atherosclerosis. Atherosclerosis. 1979;32, 403-422.

Brown MS, Goldstein JL, Krieger JM, Ho YK, Anderson RGW. Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins. J Cell Biol. 1979;82, 597-613.

Brown MS, Basu SK, Falck JR, Ho YK, Goldstein JL. The scavenger cell pathway for lipoprotein degradation: specificity of the binding site that mediates the uptake of negatively-charged LDL by macrophages. J. Supramol. Struc. 1980;13, 67-81.

Brown MS, and Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. Annu. Rev. Biochem. 1983;52, 223-261.

Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol hemostasis. Science. 1986;232, 34-47.

Bruce RA, Hornsten TR. Exercise stress testing in evaluation of patients with ischemic heart disease. Prog.. Cardiovasc.. Dis. 1969;11, 371-379.

Burton GW, Ignold KU. (1984) Beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. Science. 1984; 224, 569-573.

Bowie A, Owens D, Collins P, Johnson A, Tomkin GH: Glycosylated low density lipoprotein is more sensitive to oxidation: implications for the diabetic patient? Atherosclerosis 1993;102, 63-67.

Bowry VW, Stocker R. Tocopherol-mediated peroxidation. The prooxidant effect of vitamin E on the radical-initiated oxidation of human low-density lipoprotein. J Amer Chem Soc. 1992;115, 6029-6044.

Bowry VW, Ignold KU, Stocker R. (1992) Vitamin E in human low density lipoprotein. When and how this antioxidant becomes a pro-oxidant. *Biochem J.* 1992;288, 341-344.

Camejo G. The interactions of lipids and lipoproteins with the intercellular matrix of arterial tissue: its possible role in atherogenesis. *Adv Lipid Res.* 1982;19, 1-53.

Camejo G, Lopez A, Lopez F, Quinones J. Interaction of low density lipoproteins with arterial proteoglycans. The role of charge and sialic acid content. *Atherosclerosis.* 1985;55, 93-105.

Campeau L. Grading of agina pectories. *Circulation.* 1976;54, 522-523.

Cathcart MA, McNally AK, Morel DW, Chisolm GM, III. (1989) Superoxide anion participation in human monocyte-mediated oxidation of low-density lipoprotein to a toxin. *J Immunol.* 1989;142, 1963-1969.

Chait A, Brazg RL, Krauss RM. Increased oxidative susceptibility of LDL subfractions in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype. *Arterioscler Thromb.* 1991;11, 1425a.

Chapman MJ, Laplaud PM, Luc G, Forgez P, Bruckert E, Goulinet S. Further resolution of the low density lipoprotein spectrum in normal human plasma: physicochemical characteristics of discrete subspecies separated by density gradient ultracentrifugation. *J Lipid Res.* 1988;29, 442-458.

Chappell DA, Fry GL, Waknitz MA, Berns JJ Ligand size as a determinant for catabolism by the low density lipoprotein (LDL) receptor pathway. A lattice model for LDL binding. *J Biol Chem.* 1991;266, 19296-302.

Chatterjee S, Kwiterowich PO, Jr. Glycosphingolipids and plasma lipoproteins: a review. *Can J Biochem Cell Biol.* 1984;62, 385-397.

Chen RM, Fisher-Dzoga K. Effect of hyperlipemic serum lipoproteins on the lipid accumulation and cholesterol flux of rabbit aortic medial cells. *Atherosclerosis*. 1977;28, 339-353.

Chen GC, Liu W, Duchateau P, Allaart J, Hamilton RL, Mendel CM, Lau K, Hardman DA, Frost PH, Malloy MJ, Kane JP. Conformational differences in human apolipoprotein B-100 among subspecies of low density lipoprotein (LDL). Association of altered proteolytic accessibility with decreased receptor binding of LDL subspecies from hypertriglyceridemic subjects. *J Biol Chem*. 1994;269, 29121-29128.

Chiu HC, Jeng JR, Shieh SM: Increased oxidizability of plasma low density lipoprotein from patients with coronary artery disease. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1225, 200-208.

Clark DA, Foulds EL, Jr, Wilson FH, Jr: Effects of hydrogen peroxide on lipoproteins and associated lipids. *Lipids*. 1969;4, 1-8.

Clevidence BA, Morton RE, West G, Dusek DM, Hoff JF: Cholesterol esterification in macrophages. Stimulation by lipoproteins containing apo B isolated from human aortas. *Arteriosclerosis*. 1983;4, 196-207.

Cominacini L, Garbin U, Cenci B, Davoli A, Pasini C, Ratti E, Gaviragi G, LoCascio V, Pastorino AM. Predisposition to LDL oxidation during copper-catalyzed oxidative modification and its relation to α -tocopherol content in humans. *Clin Chim Acta*. 1991;204, 57-68.

Cookson FB. The origin of foam cells in atherosclerosis. *Br J Exp Path*. 1971;52, 62-69.

Cooper A, Hatton C, Sardharwalla IB. Acid β -mannosidase of human plasma: influence of age and sex on enzyme activity. *J Inherited Metab Dis*. 1987;10, 229-233.

Craig WY, Poulin SE, Nelson CP, Ritchie RF. ELISA of IgG antibody to oxidized low-density lipoprotein: effect of blocking buffer and method of data expression. *Clin Chem.* 1984;40, 882-890.

Croft KD, Williams P, Dimmitt S, Abu-Amsha R, Beilin LJ. Oxidation of low-density lipoproteins: effect of antioxidant content, fatty acid composition and intrinsic phospholipase activity on susceptibility to metal ion-induced oxidation. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1254, 250-256.

Dalferes ER, Jr, Radhakrishnamurthy B, Berenson GS. Identification of fibronectin and laminin in glycoprotein extracts of human aorta. *Artery.* 1985;13, 41-49.

Dartsch PC, Bauriedel G, Schinko I, Weiss HD, Hofling B, Betz E. Cell constitution and characteristics of human atherosclerotic plaques selectively removed by percutaneous atherectomy. *Atherosclerosis.* 1989;80, 149-157.

Daugherty A, Zweifel BS, Sobel BE, Schonfeld G: Isolation of low density lipoprotein from atherosclerotic vascular tissue of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Arteriosclerosis.* 1988;8, 768-777.

Dean R, Simpson J. Free radical damage to proteins and its role in the immune response. *Molec Aspects Med.* 1991;12, 121-128.

De Graaf J, Hak-Lemmers HLM, Hectors MPC, Demacker PNM, Hendriks JCM, Stalenhoef AFH. Enhanced susceptibility to in vitro oxidation of the dense low density lipoprotein subfraction in healthy subjects. *Arterioscler Thromb.* 1991;11, 298-306.

DeJager S, Bruckert E, Chapman MJ. Dense low density lipoprotein subspecies with diminished oxidative resistance predominate in combined hyperlipidemia. *J Lipid Res.* 1993;34, 295-308.

Diment S, Leech MS, Stahl PD. Cathepsin D is membrane-associated in macrophage endosomes. *J Biol Chem.* 1988;263, 6901-6907.

Dixon WJ, Brown MB. *Biomedical Computer Programs*. P-Series, University of California Press, Berkeley. 1977, 185-203.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colormetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 1956;28, 350-356.

Eber B, Schumacher M, Tatzber F, Kaufmann P, Luha O, Esterbauer H, Klein W. Autoantibodies to oxidized low density lipoproteins in restenosis following coronary angioplasty. *Cardiology.* 1994;84, 310-315.

Eisenberg S, Sehayek E, Olivecrona T, Vlodavsky I. Lipoprotein lipase enhances binding of lipoproteins to heparan sulfate on cell surface and extracellular matrix. *J Clin Invest.* 1992;90, 2013-2021.

Ehnholm C, Garoff H, Renkonen O, and Simons K. Protein and carbohydrate composition of Lp(a) lipoprotein from human plasma. *Biochemistry.* 1972;11, 3229-3232.

Esterbauer H, Jurgens G, Quehenberger O, Koller E. Autoxidation of human low density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *J Lipid Res.* 1987;28, 495-509.

Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M. Continuous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radical Res Commun.* 1989;6, 65-75.

Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radcal Biol Med.* 1992;13, 341-390.

Falcone DJ, Mateo, N, Shio H, Minick CR, Fowler SD. Lipoprotein-heparin-fibronectin-denatured collagen complexes enhance cholesteryl ester accumulation in macrophages. *J Biol Chem.* 1984;99, 1266-1274.

Farrell C, Bloth B, Nielson H. A survey for circulating immune complexes in patients with acute myocardial infarction. *Scand J Immunol.* 1977;6, 1233-1240.

Filipovic A, Schwarzmann G, Mraz W, Wiegandt H, Buddecke E. Sialic-acid content of low-density lipoproteins controls their binding and uptake by cultured cells. *Eur J Biochem.* 1979;93, 51-55.

Fisher WR. Heterogeneity of plasma low density lipoproteins manifestations of the physiologic phenomenon in man. *Metabolism.* 1983;32, 283-291.

Fless GM, ZumMallen ME, Scanu AM. Physicochemical properties of apolipoprotein(a) and apolipoprotein(a-) derived from the dissociation of human plasma lipoprotein(a). *J Biol Chem.* 1986;261, 8712-8716.

Fluckiger R. Glycosilation of lipoproteins: chemistry and biological implications. *Monogr Atheroscler.* 1985;13, 53-62.

Fogelman AM, Shechter I, Seager J, Hokom M, Child JS, Edwards PA. Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1980;77, 2214-2218.

Fogelman AM, Haberland ME, Seager J, Hokom M, Edwards PA. Factors regulating the activities of the low density lipoprotein receptor and the scavenger receptor on human monocyte-macrophages. *J Lipid Res.* 1981;22, 1131-1141.

Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem.* 1957;226, 497-509.

Fong LG, Parthasarathy S, Witztum JL, Steinberg D. Nonenzymatic oxidative cleavage of peptide bonds in apoprotein B-100. *J Lipid Res.* 1987;28:1466-1477.

Fontaine M, Malmendier CL. Carbohydrate content of human VLDL, IDL, LDL and HDL plasma apolipoproteins from fasting normal and hyperlipemic patients. *Clin Chim Acta.* 1975;64, 91-93.

Fontaine M, Malmendier CL. Relationship between the carbohydrate content of lipoproteins of VLDL, IDL and LDL and the plasma level of these lipoproteins in man. *Atherosclerosis.* 1978;30, 285-292.

Foote CS, Denny RW. Chemistry of singlet oxygen VIII. Quenching of by beta-carotene. *J Amer Chem Soc.* 1968;90, 6233-6235.

Fowler SM, Scio MA, Haley NJ. Characterization of lipid-laden aortic cells from cholesterol rabbits. IV. Investigation of macrophage-like properties of aortic cell populations. *Lab Invest.* 1979;41, 372-378.

Frei B, Kim C, Ames B. Ubiquinol-10 as an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87, 4879-4883.

Fust G, Szekely J, Gero S. Circulating immune complexes in vascular disease. *Lancet.* 1977;1, 193-194.

Fust G, Szondy E, Szekely J. Studies on the occurrence of circulating immune complexes in vascular diseases. *Atherosclerosis.* 1978;29, 181-190.

Galeano NF, Milne R, Marcel YL, Walsh MT, Levy E, Ngu'yen T-D, Gleeson A, Arad Y, Witte L, Al-Haideri M, Rumsey SC, 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.

Gallagher PJ, Jones DB, Casey CR, Sharratt GP. Circulating immune complexes in cardiac disease. *Atherosclerosis.* 1982;44, 241-244.

Garner B, Dean RT, Jessup W. (1994) Human macrophages-mediated oxidation of low-density lipoprotein is delayed and independent of superoxide production. *Biochem J.* 1994; 301, 421-428.

Gerrity RG. The role of the monocyte in atherogenesis. II. Migration of foam cells from atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 1981;103, 191-200.

Gimbrone MA, Cotran RS, Folkman J. Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis. *J Cell Biol.* 1974;60, 673-684.

Gofman JW, Young W, Tendy R. Ischemic heart disease, atherosclerosis, and longevity. *Circulation.* 1966;34, 679-697.

Goldstein JL, Hazzard WR, Schrott HG, Bierman EL, Motulsky AG. Hyperlipidemia in coronary heart disease. I. Lipid levels in 500 survivors of myocardial infarction. *J Clin Invest.* 1973;52, 1533-1543.

Goldstein JL, Anderson RGW, Buja LM, Basu SK, and Brown MS. Overloading human aortic smooth muscle cells with low density lipoprotein-cholesterol esters reproduced features of atherosclerosis in vitro. *J Clin Invest.* 1977;59, 1196-1202

Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site of macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low-density lipoprotein, producing cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979;76, 333-337.

Goldstein JL, Basu SK, Brown MS. Receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells. *Methods Enzymol.* 1983; 98, 241-260.

Guyton GR, Bocan TMA, Schifani TA. Ultrastructural localization of perifibrous lipid in grossly normal human aortic intima - role of elastin. *Fed. Proc.* 1985;44, 1134.

Habeeb AFSA. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal Biochem.* 1966;14, 328-336.

Haberland ME, Fogelman AM, Edwards PA. Specificity of receptor-mediated recognition of malondialdehyde-modified low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982;79, 1712-1716.

Haberland ME, Fogelman AM. The role of altered lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Amer Heart J.* 1987;259, 11305-11311.

Haberland ME, Fong D, Cheng L. Malondialdehyde-altered protein occurs in atheroma of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Science.* 1988;241, 215-218.

Hanson GK, Bonjers G, Nilsson L-A. Plasma protein accumulation in injured endothelial cells: Immunofluorescent localization of Ig and fibrinogen in the rabbit aortic endotelium. *Exp Mol Pathol.* 1979;30, 12-26.

Hanson GK, Bonjers G, Bylock A, Hjalmarsson L. Ultrastructural studies of the localization of IgG in the aortic endothelium and subendothelial intima of atherosclerotic and nonatherosclerotic intima. *Exp Mol Pathol.* 1980;33, 302-315.

Hara A, Radin NS. Lipid extraction of tissue with low-toxicity solvent. *Anal Biochem.* 1978;90, 420-426.

Hardy MR, Townsend RR, Lee YC. Monosaccharide analysis of glycoconjugates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Anal Biochem.* 1988;170, 54-62.

Hashim SA, Schuttrenger GM. Rapid determination of tocopherol in macro and microquantites of plasma. Am J Clin Nutr. 1966;19, 137-147.

Haust MD. Light and electron microscopy of human atherosclerosis lesions. Adv Exp Med Biol. 1978;104, 33-59.

Hazel LJ, Stocker R: Oxidation of low-density lipoprotein with hypochlorite causes aggregation that is mediated by modification of lysine residues rather than lipid oxidation. Biochem J. 1994;302,165-172.

Heinecke JW, Baker L, Rosen H, Chait A. Superoxide-mediated modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. J Clin Invest. 1986;77, 757-764.

Henricksen T, Mahoney EM, Steinberg D. Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein. Atherosclerosis. 1983;4, 357-364.

Hiramatsu K, Rosen H, Heinecke JW, Wolfbauer G, Chait A. Superoxide initiates oxidation of low density lipoprotein by human monocytes. Arteriosclerosis. 1987;7, 55-60.

Hoff HF, Gaubatz JW. Ultrastructural localization of plasma lipoproteins in human intracranial arteries. Virchows Arch A Pathol Anat Histol. 1975;363, 111-121.

Hoff HF, Lie JT, Titus JL, Bajardo RJ, Jackson RL, DeBakey ME, Gotto AM. Lipoproteins in atherosclerotic lesions: localization by immunofluorescence of apo-low density lipoproteins in human atherosclerotic arteries from normal and hyperlipoproteinemics. Arch Pathol. 1975;99, 253-258.

Hoff HF, Heideman CL, Gaubatz JW, Scott DW, Gotto AM. Detergent extraction of tightly bound apo-B from extracts of normal aortic intima and plaques. Exp Mol Pathol. 1978;28, 290-300.

Hoff HF, Bradley WA, Heideman CL, Gaubatz JW, Karagas

MD, Gotto AM Jr: Characterization of low density lipoprotein-like particle in the human aorta from grossly normal and atherosclerotic regions. *Biochim Biophys Acta*. 1979;573, 361-374.

Hoff HF, 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.

Holander W, Colombo MA, Kirkpatrick B, Paddock J. Soluble proteins in the human atherosclerotic plaque; With special reference to immunoglobulins, C₃-complement, α 1-antitrypsin and α 2-macroglobulin. *Atherosclerosis*. 1979;34, 391-405.

Ignold KU, Webb AS, Witter D, Burton GW, Metcalfe TA, Miller DP. Vitamin E remains the major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human plasma even in individuals suffering severe vitamin E deficiency. *Arch Biochem Biophys*. 1987;259, 224-235.

Ikezava H, Aoyagi T, Takeuchi T, Umezava H. Effect of protease inhibitors of actinomycetes on lysosomal peptide-hydrolases from swine liver. *J Antibiot*. 1971;24, 488-492.

Ikezava H, Yamada K, Aoyagi T, Takeuchi T, Umezava H. Effect of antipain on lysosomal peptide-hydrolases from swine liver. *J Antibiot*. 1972;25, 738-746.

Iverius P-H. The interaction between human plasma lipoproteins and connective tissue glycosaminoglycans. *J Biol Chem*. 1972;247, 2607-2613.

Jaakkola O, Solakivi T, Yla-Hertuala S, Nikkari T. Receptor-mediated binding and degradation of subfractions of human plasma low-density lipoprotein by cultured fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*. 1989;1005, 118-122.

Jaakkola O, Solakivi T, Tertov VV, Orekhov AN, Miettinen TA, Nikkari T: Characteristics of low-density lipoprotein subfractions from

patients with coronary artery disease. Coron Artery Dis. 1993;4, 379-385.

Jensen BA, Holund B, Clemmensen I. Demonstration of fibronectin in normal and injured aorta by an indirect immunoperoxidase technique. Histochemistry. 1983;77, 395-403.

Jessup W, Rankin SM, De Whalley CV, Hoult JRS, Scott J, Leake DS. α -Tocopherol consumption during low-density lipoprotein oxidation. Biochem J. 1990;265, 399-405.

Jessup W, Mander EL, Dean RT. The intracellular storage and turnover of apolipoprotein B of oxidized LDL in macrophages. Biochim Biophys Acta .1992;1126, 167-177.

Johnson DC, Polta TZ. Amperometric detection in liquid chromatography with pulsed cleaning and reaction of noble metal electrodes. Chromatogr Forum. 1986;1,.37-44.

Jurgens G, Lang J, Esterbauer H. Modification of human low density lipoprotein by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. Biochim Biophys Acta. 1986; 875, 103-114.

Jurukova Z. Cytomorphology of atherosclerosis: smooth muscle cells in formation and regression of atherosclerotic lesions. Zentralbl Allg Pathol. 1989;135, 599-606.

Kacharava AG, Tertov VV, Orekhov AN. Autoantibodies against low-density lipoprotein and atherogenic potential of blood. Ann Med. 1993;25,551-555.

Kacharava A.G., Tertov V.V., Orekhov A.N. Low density lipoprotein and atherogenic potential of blood: effect of lovastatin and low-density lipoprotein apheresis. Cardiol. Elderly.- 1993.- Vol. 1.- P. 203-207

Kagan V, Serbinova E, Packer L. Antioxidant effects of ubiquinone-10s in microsomes and mitochondria are mediated by

tocopherol recycling. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;169, 851-857.

Kawabe Y, Cynshi O, Takashima Y, Suzuki T, Ohba Y, Kodama T. Oxidation induced aggregation of rabbit low-density lipoprotein by azo initiator. *Arch Biochem Biophys.* 1994;310, 489-486.

Kielian MC, Cohn ZA. Intralysosomal accumulation of polyanions. II. Polyanion internalization and its influence on lysosomal pH and membrane fluidity. *J Cell Biol.* 1982;93, 875-882.

Kirschke H, Langner J, Wiederanders B, Ansorge S, Bohley P, Broghammer U. Cathepsin, L. A new proteinase from rat liver lysosomes. *Eur J Biochem.* 1977;74, 293-300.

Kleinman Y, Eisenberg S, Oschry Y, Gavish D, Stein O, Stein Y: Defective metabolism of hypertriglyceridemic low density lipoprotein in cultured human skin fibroblasts. Mormalization with bezafibrate therapy. *J Clin Invest.* 1985;75, 1796-1803.

Klimov AN, Denisenko AD, Popov AV, Nagornev VA, Pleskov VM, Vinogradov AG, Denisenko TV, Magracheva EYa, Kheifes GM, Kuznetsov AS. Lipoprotein-antibody immune complexes: Their catabolism and role in foam cell formation. *Atherosclerosis.* 1985;58, 1-15.

Klimov AN, Denisenko AD, Vinogradov AG, Nagornev VA, Pivovarova YI, Sitnikova OD, Pleskov VM. Accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with human-antibody autoimmune complexes. *Atherosclerosis.* 1988;74, 41-46.

Kokkonen JO, Kovanen PT. Proteolytic enzymes of mast cells granules degrade low density lipoprotein and promote their granule-mediated uptake by macrophage *in vitro*. *J Biol Chem.* 1989;264, 10749-10755.

Konarska R, Shaikh M, La Ville A. Immunoglobulins containing circulating immune complexes in hypercholesterolaemic patients. *Atherosclerosis*. 1986;60, 89-91.

Kontush A, Huebner C, Finckh B, Kohlschuetter A, Beisiegel U. Low density lipoprotein oxidizability by copper correlates to its initial ubiquinol-10 and polyunsaturated fatty acid content. *FEBS Lett.* 1994;341, 69-73.

Kontush A, Huebner C, Finckh B, Kohlschuetter A, Beisiegel U. How different constituents of low density lipoprotein determine its oxidizability by copper: a correlation approach. *Free Radical Res.* 1996; 24, 135-147.

Koren E, Solter D, Lee DM, Reiner Z, McConathy WJ, Dashti N, Alaupovich P. Characterization of monoclonal antibody that binds equally to all apolipoprotein and lipoprotein forms of human plasma apolipoprotein B. I. Specificity and binding studies. *Biochim Biophys Acta*. 1986;876, 91-100.

Kosykh VA, Preobrazhenski SN, Fuki IV, Zaikina OE, Tsibulski VP, Repin VS, Smirnov VN. Cholesterol can stimulate secretion of apoB by cultural human hepatocytes. *Biochem Biophys Acta*. 1985;836, 385-395.

Koteliansky VE, Glukhova MA, Bejanian MV, Smirnov VN, Filimonov VV, Zalite OM, Venyaminov SYu. A study of the structure of fibronectin. *Eur J Biochem*. 1981;119, 619-624.

Kramsch DM, Franzblau C, Hollander W. The protein and lipid composition of arterial elastin and its relationship to lipid accumulation in the atherosclerotic plaque. *J Clin Invest*. 1971;50, 1666-1677.

Kramsch DM, Hollander W. The interaction of serum and arterial lipoproteins with elastin of the arterial intima and its role in

the lipid accumulation in atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1973;52, 236-247.

Krauss RM, Burke DJ. Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans. *J Lipid Res.* 1982;23, 97-104.

Kruth HS, Skarlatos SI, Lilly K, Chang J, Ifrim I. sequestration of acetylated LDL and cholesterol crystals by human monocyte-derived macrophages. *J Cell Biol.* 1995;129, 133-145.

Kundu SK, Diego I, Osovitz SS, Marcus DM. Glycosphingolipids of human plasma. *Arch Biochem Biophys.* 1985;238, 388-400.

Kwiterovich P, Bachorik P, Simon A. Isolation and partial characterization of the glycopeptides from human plasma low density lipoproteins, *Circ. Suppl III.* 1974.Vols. 49 &50, Abst. 1032:267.

Kwiterovich PO, Jr. HyperapoB: a pleiotropic phenotype characterized by dense low-density lipoproteins and associated with coronary artery disease. *Clin Chem.* 1988;34, B71-B77.

Labat-Robert J . 1985. Comparative distribution patterns of type I and III collagens and fibronectin in human arteriosclerotic aorta. *Pathol. Biol.* 1985;33, 261-265.

La Belle M, Krauss RM. Differences in carbohydrate content of low density lipoproteins associated with low density lipoprotein subclass patterns. *J Lipid Res.* 1990;31, 1577-1588.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227, 680-685.

Lazzani A, Colombo M, Franzblau C, Hollander W. Detection of immune proteins and apoproteins in the lipid-protein fraction and foam cells of plaque. *Arteriosclerosis.* 1985;5, 522a.

Lee P, Breckenridge WC. The carbohydrate composition of human apolipoprotein low density lipoprotein from normal and type II hyperlipoproteinemic subjects, *Can J Biochem.* 1976;54, 42-49.

Li Y, Trush MA. Oxidation of hydroquinone by cooper: chemical mechanism and biological effects. *Arch Biochem Biophys.* 1993;300, 346-355.

Lindahl U, Hook M. Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules. *Annu. Rev. Biochem.* 1978;47, 385-417.

Lindgren FT. Preparative ultracentrifugal laboratory procedures and suggestions for lipoprotein analysis. In: Perkins ED, ed. *Analysis of Lipids and Lipoproteins.* New York: American Oil Chemical Society; 1975, 205-224.

Lipid Research Clinics Program, Lipid and lipoprotein analysis. In: *Manual of Laboratory Operations*, DHEW publication No. (NIH) 75-628, 1974, pp. 1-81.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951, 193, 265-275.

Lynch SM, Frei B. Mechanisms of copper- and iron-dependent oxidative modification of human low density lipoprotein. *J Lipid Res.* 1993;34, 1745-1753.

Maebe R, Shimasaki H, Ueta N. Conformational changes in oxidized LDL recognized by mouse peritoneal macrophages. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1215, 79-86.

Maggi E, Bellazzi R, Gazo A, Seccia M, Bellomo G. Autoantibodies against oxidatively-modified LDL in uremic patients undergoing dialysis. *Kidney Intern.* 1994;46, 869-876.

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 the apoproteins. *J Clin Invest.* 1979;64, 743-750.

Marshall WE, Kummerow FA. The carbohydrate constituents of human serum-lipoprotein: galactose, mannose, glucosamine, and sialic acid. *Arch Biochem Biophys.* 1962;98, 271-273.

Meindl P, Bodo G, Palese P, Schulman J, Tuppy H. Inhibition of neuraminidase activity by derivatives of 2-deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneurameric acid. *Virology.* 1974;58, 457-463.

Mellors A, Tappel AL. The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone-10 and ubiquinol-10. *J Biol Chem.* 1966;241, 4353-4356.

Melnick BC, Melnick SF. Analytical isoelectric focusing of apolipoprotein B of human plasma low density lipoproteins in the presence of a nonionic and a zwitterionic detergent. *Anal Biochem.* 1988;171, 320-329.

Mohr D, Bowry VW, Stocker R. Dietary supplementation with coenzyme Q₁₀ results in increased levels of ubiquinol-10 with circulating lipoproteins and increased resistance of human low-density lipoprotein to the initiation of lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta.* 1992;1126, 247-254.

Morton RE, West GA, Hoff HF: A low density lipoprotein-sized particle isolated from human atherosclerotic lesions is internalized by macrophages via a non scavenger-receptor mechanism. *J Lipid Res.* 1986;27, 1124-1134.

Mu J-Z, Tang L-H, Alpers DH. Asialoglycoprotein receptor mRNAs are expressed in most extrahepatic rat tissues during development. *Am J Physiol.* 1993;264, G752-G762.

Mulder M, Lombardi P, Jansen H, van Berkel TJ, Frants RR, Havekes LM. Heparan sulfate proteoglycan are involved in the

lipoprotein lipase-mediated enhancement of the cellular binding of very low density and low density lipoproteins. Biochem Biophys Res Commun. 1992;185, 582-587.

Mukai K, Itoh S, Morimoto H. Stopped-flow kinetic study of vitamin E regeneration reaction with biological hydroquinones (reduced forms of ubiquinone-10, vitamin K and tocopherolquinone) in solution. J Biol Chem. 1992; 267, 22277-22281.

Nagai T, Miyaichi Y, Tomimori T, Yamada H. Inhibition of mouse liver sialidase by plant flavanoids. Biochem Biophys Res Commun 1989;163, 25-32.

Nagamura Y, Kolb H. Presence of a lectin-like receptor for D-galactose on rat peritoneal macrophages. FEBS Lett. 1983;157, 253-256.

Natali PG, Galloway D, Nicotra MR, DeMartino C. Topographic association of fibronectin with elastic fibers in the arterial wall. An immunohistochemical study. Conn Tiss Res. 1987;8, 199-204.

Niculescu F, Rus H, Cristea A. Localization of the terminal C5b-9 complement complex in the human aortic atherosclerotic wall. Immunol. Lett. 1985;10, 109-114.

Niculescu F, Rus HG, Vlaicu R. Immunohistochemical localization of C5b-9, S-protein, C3d and apolipoprotein B in human arterial tissues with atherosclerosis. Atherosclerosis. 1987;65: 1-11.

Nigon F, Lesnik P, Rouis M, Chapman MJ. Discrete subspecies of human low density lipoproteins are heterogeneous in their interactionwith the cellular LDL receptor. J Lipid Res. 1991;32, 1741-1453.

Nishida EG, Kummerow FA. Interaction of serum lipoproteins with the hydroperoxide of methyl linoleate. J Lipid Res. 1960;1, 450-458.

Noma A, Takahashi T, Wada T. Elastin- lipid interaction in the arterial wall. Part 2. In vitro binding of lipoprotein-lipids to arterial elastin and inhibitory effect of high density lipoprotein. *Atherosclerosis*. 1981;38, 373-382.

Noma A, Hirayama T, Yachi A. Inhibitory effect of high density lipoprotein subfraction on the in vitro binding of low density lipoproteins to arterial elastin. *Atherosclerosis*. 1983;49, 171-175.

Noma A, Hirayama T, Yachi A. Studies on the binding of plasma low density lipoproteins to arterial elastin. *Connect Tissue Res.* 1983;11, 123-133.

Obunike JC, Edwards IJ, Rumsey SC, Curtiss LK, Wagner WD, Deckelbaum RJ, Goldberg IJ. Cellular differences in lipoprotein lipase-mediated uptake of low density lipoproteins. *J Biol Chem.* 1994;269, 13129-13135.

Orekhov AN, Andreeva ER, Shekhonin BV, Tertov VV, Smirnov VN. Content and localization of fibronectin in normal intima, atherosclerotic plaque, and under lying media of human aorta. *Atherosclerosis*. 1984;53, 213-219.

Orekhov AN, Tertov VV, Novikov ID, Krushinsky AV, Andreeva ER, Lankin VZ, Smirnov VN. Lipids in cells of atherosclerotic and uninvolved human aorta. I. Lipid composition of aortic tissue and enzyme isolated and cultured cells. *Exp Mol Pathol.* 1985;42, 117-137.

Orekhov AN, Tertov VV, Pokrovsky SN, Adamova IYu, Martsenyuk ON, Lyakishev AA, Smirnov VN. Blood serum atherogenicity associated with coronary atherosclerosis. Evidence for non-lipid factor providing atherogenicity of low-density lipoproteins and an approach to its elimination. *Circ Res.* 1988;62, 421-429.

Orekhov AN, Tertov VV, Mukhin DN, Mikhailenko IA. Modification of low density lipoprotein by desialylation causes lipid accumulation in cultured cells. Discovery of desialylated lipoprotein with altered cellular metabolism in the blood of atherosclerotic patients. Biochem Biophys Res Commun. 1989;162, 206-211.

Orekhov AN, Tertov VV, Kudryashov SA, 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, 311-320.

Orekhov AN, Tertov VV, Mukhin DN. Desialylated low density lipoprotein - naturally occurring lipoprotein with atherogenic potency. Atherosclerosis. 1991;86, 153-161.

Orekhov AN, Tertov VV, Kabakov AE, Adamova IYu, Pokrovsky SN, Smirnov VN: Autoantibodies against modified low density lipoprotein. Nonlipid factor of blood plasma that stimulates foam cell formation. Arterioscler Thromb. 1991;11, 316-326.

Orekhov AN, Kalenich OS, Tertov VV, Novikov ID. Lipoprotein immune complexes as markers of atherosclerosis. Int J Tissue React. 1991;13, 233-236.

Orekhov A.N., Tertov V.V. Atherogenicity of autoantibodies against low density lipoprotein. Agents and Actions.- 1991.- Vol. 32.- P. 128-129

Orekhov A.N., Tertov V.V. Atherogenicity of anti-LDL autoantibodies // Treatment of Severe Dyslipoproteinemia in the Prevention of Coronary Heart Disease. Vol. 3. A.M.

Gotto, Jr, M. Mancini, W.O. Richter, P. Schwandt (eds.). S. Karger GmbH, Basel.- 1992.- P. 91-98

Orekhov AN, Tertov VV, Sobenin IA, Smirnov VN, Via DP, Guevara J, Gotto AM, Jr, 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, 805-807.

Orekhov A.N., Kalenich O.S., Tertov V.V., Perova N.V., Novikov I.D., Lyakishev A.A., Deev A.D., Ruda M.Ya. Diagnostic value of immune cholesterol as a marker for atherosclerosis // J. Cardiovasc. Risk.- 1995.-Vol. 2.- P. 459-466

Palinski W, Rosenfeld ME, Yla-Herttuala S, Gurtner G, Socher SS, Butler SW, 14. Parthasarathy S, Steinbrecher UP, Barnett J, Witztum JL, Steinberg D: Essential role of phospholipase A2 activity in endothelial cell-induced modification of low density lipoprotein. Proc Natl Acad Sci USA. 1985;82, 3000-3004.

Palinski W, Rosenfeld ME, Yla-Herttuala S, Gurtner GC, Socher SS, Butler SW, Parthasarathy S, Carew TE, Steinberg D. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. Proc Natl Acad Sci USA. 1989;86, 1372-1376.

Panasenko JV, Volnova TV, Azizova OA, Vladimirov YA. Free radical modification of lipoproteins and cholesterol accumulation in cells upon atherosclerosis. Free Rad Biol Med. 1991;10, 137-148.

Parthasarathy S, Steinbrecher UP, Barnett J, Witztum SL, Steinbrecher D. Essential role of phospholipase A2 activity in endothelial cell-induced modification of low density lipoprotein. Proc Natl Acad Sci USA. 1985;82, 3000-3005.

Parthasarathy S, Carew TE, Steinberg D, Witztum JL: Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. Proc Natl Acad Sci USA. 1989;86, 1372-1376.

Parums O, Hutchinson MJ. Demonstration of immunoglobulin in the neighbourhood of advanced atherosclerotic plaques. Atherosclerosis. 1981;38, 211-216.

Pearson JD. Lipid metabolism in cultured aortic smooth muscle cells and comparison with other cell types. II. Reversibility of

lipid accumulation caused by hyperlipemic serum. Atherosclerosis. 1976;25, 205-212.

Petrusevich YuM, Slavinsky YuS. Electrochemiluminescent technique for determining the activity of bioantioxidants in the system citrate-methanol. Biophysika. 1969;14, 750-752.

Rankin SM, Knowles ME, Leake DS. Macrophages possess both neutral and acidic protease activities toward low density lipoproteins. Atherosclerosis. 1989;79, 71-78.

Regnstrom J, Nilsson J, Tornvall P, Landou C, Hamsten A: Susceptibility to low-density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. Lancet. 1992; 339, 1183-1186.

Rodriguez-Iturbe B, Katiyar VN, Coello J. Neuraminidase activity and free sialic acid levels in the serum of patients with acute poststreptococcal glomerulonephritis. New Engl J Med. 1981;304, 1506-1510.

Rose GA, Blackburn H. Cardiovascular survey methods. WHO, Geneva. 1968, pp. 82-109.

Ross R, Harker L. Hyperlipidemia and atherosclerosis. Science. 1976;193, 1094-1100.

Smith E, Slater RS. Relationship between low density lipoprotein in aortic intima and serum lipid levels. Lancet. 1972;1;463.

Salisbury BGJ, Falcone DJ, Minick CR. Insoluble low-density lipoprotein-proteoglycan complexes enhance cholesterol ester accumulation in macrophages. Am J Pathol. 1985;120, 6-11.

Salonen JT, Yla-Herttuala S, Yamamoto R, Butler S, Korpela H, Salonen R, Nyysonen K, Palinski W, Witztum JL. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. Lancet. 1992;339, 883-887.

Sato K, Niki E, Shimasaki H. Free radical-mediated chain oxidation of low density lipoprotein and its synergistic inhibition by vitamin E and vitamin C. *Arch Biochem Biophys.* 1990;279, 402-405.

Saxena U, Klein MG, Vanni TM, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase increases low density lipoprotein retention by subendothelial cell matrix. *J Clin Invest.* 1992;89, 373-380.

Scarlatos SI, Rao R, Kruth HS. Accelerated development of human monocyte macrophages cultured on plastek-C tissue culture dishes. *J Tiss Cult Meth.* 1992;14, 113-118.

Sevanian A, Hwang J, Hodis H, Cazzolato G, Avogaro P, Bittolo-Bon G. Contribution of an in vivo oxidized LDL to LDL oxidation and its association with dense LDL subpopulations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16, 784-793.

Shaikh M, Martini S, Quiney JR, Baskerville P, LaVille AE, Browse NL, Duffield R, Turner PR, Lewis B: Modified plasma-derived lipoproteins in human atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis.* 1988;69, 165-172.

Schauer R. Chemistry, metabolism and biology function of sialic acids. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* 1982;40, 131-234.

Schechter I, Fogelman AM, Haberland, Seager S, Hokom M, Edwards PA. The metabolism of native and malondialdehyde-altered low density lipoproteins by human monocyte-macrophages. *J Lipid Res.* 1981;22, 63-74.

Schepert JH, Bedfort DK, Morgan HG. Radioiodination of human low density lipoprotein: a comparison of four methods. *Clin chim Acta.* 1976;66, 97-109.

Schuh J, Fairclough GF, Haschemeyer RH: Oxygen-mediated heterogeneity of apo-low-density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978;75, 3173-3177.

Schultze HE, Heide K. 1960. Carbohydrate content of different

blood components, Med Grundlagenforsch. 1960;3, 357.

Senn H-J, Orth M, Fitzke E, Wieland H, Gerok W. Gangliosides in normal human serum. Concentration, pattern and transport by lipoproteins. Eur J Biochem. 1989; 181, 657-662.

Shen MMS, Krauss RM, Lindgren FT, Forte TM. Heterogeneity of serum low density lipoproteins in normal human subjects. J Lipid Res. 1981;22, 236-244.

Shierman RB, Fisher WR. The absence of a role for the carbohydrate moiety in the binding of apolipoprotein B to the low density lipoprotein receptor. Biochem Biophys Acta. 1979;572, 537-540.

Shimano N, Yamada N, Isibashi S, Mokuno H, Mori N, Gotoda T, Harada K, Akanuma Y, Murase T, Takaku F. Oxidation-labile subfraction of human plasma low density lipoprotein isolated by ion-exchange chromatography. J Lipid Res. 1991;32, 763-773.

Silver IA, Murrills RJ, Ethrington DJ. Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. Exp Cell Res. 1988;175, 266-267.

Simpson CF. Phagocytosis by articular modified smooth muscle cells. Artery. 1977;3, 210-218.

Smith EB. The relationship between plasma and tissue lipids in human atherosclerosis. Adv Lipid Res. 1974;12, 1-49.

Smith EB, Ashall C. Fibronectin distribution in human aortic intima and atherosclerotic lesions: concentration of soluble and collagenase-releasable fractions. Biochim Biophys Acta. 1986;880, 10-15.

Soberin IA, Tertov VV, Koschinsky T, Bunting CE, Slavina ES, Dedov II, Orekhov AN. Modified low density lipoprotein from diabetic patients causes cholesterol accumulation in human intimal aortic cells. Atherosclerosis. 1993;100, 41-54.

Srinivasan SR, Lopez SA, Radhakrishnamurthy B, Berenson GS. Complexing of serum pre-beta and beta-lipoproteins and acid mucopolysaccharides. *Atherosclerosis*. 1970;12, 321-334.

Srinivasan SR, Dolan P, Radhakrishnamurthy B, Berenson GS. Isolation of lipoprotein-acid mucopolysaccharide complexes from fatty streaks of human aortas. *Atherosclerosis*. 1972;16: 95-104.

Srinivasan SR, Radhakrishnamurthy B, Pargaonkar PS, Berenson GS. Lipoprotein-acid mucopolysaccharide complexes of human atherosclerotic lesions. *Biochim Biophys Acta*. 1975;388, 58-70.

St. Clair RW. Metabolism of the arterial wall and atherosclerosis. In: *Atherosclerosis Reviews*. 1975. Vol. 1. R. Paoletti and A.M. Gotto, editors. Raven Press, New York. 61-117.

StClair RW, Leight MA. Differential effects of isolated lipoproteins from normal and hypercholesterolemic rhesus monkeys on cholesterol esterification and accumulation in arterial smooth muscle cells in culture. *Biochim Biophys Acta*. 1978;530, 279-291.

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo J, Witztum J. Beyond cholesterol: modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*. 1989; 320, 915- 924.

Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984;81, 3883-3887.

Steinbrecher UP, Witztum JL, Parthasarathy S, Steinberg D. Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification of LDL: correlation with changes in receptor-mediated catabolism. *Arteriosclerosis*. 1987;1, 135-143.

Steinbrecher UP. Role of superoxide in endothelial-cell modification of low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta*. 1988;959, 20-30.

Steinbrecher UP, Lougheed M. Scavenger receptor-independent stimulation of cholesterol esterification in macrophages by low density lipoprotein extracted from human aortic intima. *Arterioscler Thromb*. 1992;12, 608-625.

Stocker R, Bowry VW, Frei B. Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does α -tocopherol. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88, 1646-1650.

Suits AG, Chait A, Aviram M, 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.

Svennerholm L. The quantitative estimating of cerebrosides in nervous tissue. *J Neurochem*. 1956;1, 42-53.

Swaminathan, N., and F. Aladjem. The monosaccharide composition and sequence of the carbohydrate moiety of human serum low density lipoproteins. *Biochemistry*. 1976;19, 1516-1522.

Swinkels DW, Demacker PNM, Hendriks JCV, van't Laar A. Low density lipoprotein subfractions and relationship to other risk factors for coronary artery disease in healthy individuals. *Arteriosclerosis*. 1989;9, 640-613.

Szondy E, Horvath M, Mezey Z, Szekely J, Lengyel E, Fust G, Gero S. Free and complexed anti-lipoprotein antibodies in vascular diseases. *Atherosclerosis*. 1983;49, 66-77.

Tabas I, Lim S, Xu X-X, Maxfeld FR. Endocytosed β -VLVD and LDL are delivered to different intracellular vesicles in mouse peritoneal macrophages. *J Cell Biol*. 1990;111, 929-940.

Taniguchi T, Ishikawa Y, Tsunemitsu M, Fukuzaki H. 1989.

The structures of the asparagine-linked sugar chains of human apolipoprotein B-100. Arch Biochem Biophys. 1989;273, 197-205.

Taniguchi T, Ishikava Y, Tsunemitsu M, Asaoka Y, Matsumoto K, Fukuzaki H. Stimulation of cholesterol ester synthesis in human monocite-derived macrophages by asialo low density lipoproteins. Arteriosclerosis. 1989;9, 767a.

Teng B, Sniderman A, Krauss RM, Kwiterovich PO Jr, Milne RW, Marcel YL. Modulation of apolipoprotein B antigenic determinants in human low density lipoprotein subclasses. J Biol Chem. 1985;260, 5067-5072.

Teng B, Thompson GR, Sniderman AD, Forte TM, Krauss RM, Kwiterovich PO, Jr. Composition and distribution of low density lipoprotein fractions in hyperapobetalipoproteinemia, normolipidemia, and familial hypercholesterolemia. Proc Natl Acad Sci USA. 1983;80, 6662-6666.

Tertov VV, Orekhov AN, Martsenyuk ON, Perova NV, 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;50, 337-347.

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, 489-494.

Tertov VV, Sobenin IA, Tonevitsky AG, Orekhov AN, 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;167, 1122-1127.

Tertov VV, Orekhov AN, Sayadyan KhS, Serebrennikov SG, Kacharava AG, Lyakishev AA, Smirnov VN. Correlation between

cholesterol content in circulating immune complexes and atherogenic properties of CHD patients' serum manifested in cell culture. Atherosclerosis. 1990; 81, 183-189.

Tertov VV, Orekhov AN, Kacharava AG, Sobenin IA, Perova NV, Smirnov VN. Low density lipoprotein-containing circulating immune complexes and coronary atherosclerosis. Exp Mol Pathol. 1990;52, 300-308.

Tertov VV, Sobenin IA, Gabbasov ZA, Popov EG, Jaakkola O, Solakivi T, Nikkari T, Orekhov AN. Multiple-modified desialylated low density lipoproteins that cause intracellular lipid accumulation: isolation, fractionation and characterization. Lab Invest.1992; 67, 665-675.

Tertov VV, Sobenin IA, Gabbasov ZA, Popov EG, Yaroslavov AA, Smirnov VN, Orekhov AN. Three types of naturally occurring modified lipoproteins induce intracellular lipid accumulation due to lipoprotein aggregation. Circ Res. 1992;71, 218-228.

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.

Tertov VV, Sobenin IA, Orekhov AN. Modified (desialylated) low-density-lipoprotein measured in serum by lectin-sorbent assay. Clin Chem. 1995;41, 1018-1021.

Tertov VV, Kaplun VV, Dvoryantsev SN, Orekhov AN. Apolipoprotein B-bound lipids as a marker for evaluation of low density lipoprotein oxidation *in vivo*. Biochem Biophys Res Commun. 1995; 214, 608-613.

Tertov VV, Bittolo-Bon G, Sobenin IA, Cazzolato G, Orekhov AN, Avogaro P. Naturally occurring modified low density lipoproteins

are similar if not identical: more electronegative and desialylated lipoprotein subfractions. *Exp Mol Pathol.* 1995;62, 166-172.

Tertov VV, Sobenin IA, Orekhov AN. Similarity between naturally occurring modified, electronegative and aortic low density lipoprotein. *Free Radical Res.* 1996;25, 313-319.

Tokita K, Kanno K, Ikeda K. Elastin sub-fraction as binding site for lipids. *Atherosclerosis.* 1977;28, 111-119.

Traber MG, Defendi V, Kayden HJ. Receptor activities for low-density lipoprotein and acetylated low-density lipoprotein in a mouse macrophage cell line (IC21) and in human monocyte-derived macrophages. *J Exp Med.* 1981;154, 1852-1867.

Tribble DL, Holl LG, Wood PD, Krauss RM. Variation in oxidative susceptibility among six low density lipoprotein subfractions of different density and particle size. *Atherosclerosis.* 1992;93, 189-199.

Tribble DL, van den Berg JJM, Motchnik PA, Ames BN, Lewis DM, Chait A, and Kraus RM. Oxidative susceptibility of low density lipoprotein subfractions is related to their ubiquinol-10 and α -tocopherol content. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91, 1183-1187.

Van Der Bijl P. Human serum low density lipoproteins: carbohydrate composition in health and disease. In Protides of the Biological Fluids. Pergamon Press, 1974. Oxford, 309-314.

Van der Bijl P, Reman FC. Human very low density lipoproteins: loss of electrophoretic mobility on enzymatic removal of sialic acid residues. *Clin Chim. Acta.* 1975;60, 191-195.

Van der Westhuyzen DR, Gevers W, Coetzee GA. Cathepsin-D-dependent initiation of the hydrolysis by lysosomal enzymes of apoprotein B from low density lipoprotein. *Eur J Biochem.* 1980;112, 153-160.

Van Lenten BJ, Fogelman AM, Hokom MM, Benson L, Haberland ME, Edwards PA. Regulation of the uptake and degradation of β -VLDL in human monocyte-macrophages. *J Biol Chem.* 1983; 258, 5151-5157.

Vaskovsky VE, Kostetsky EY, Vasendin IM. A universal reagent for phospholipid analysis. *J Chromatogr.* 1975;114, 129-141.

Vauhkonen M, Viitala J, Parkkinen J, Rauvala H. High-mannose structure of apolipoprotein-B from low-density lipoproteins of human plasma. *Eur J Biochem.* 1985;152, 43-50.

Veh RW, Corfield AP, Sander M, Schauer R. Neuraminic acid-specific modification and tritium labelling of gangliosides. *Biochim Biophys Acta.* 1977;486, 145-160.

Vijayagopal P, Radhakrishnamurthy B, Srinivasan SR, Berenson GS. Studies of biologic properties of proteoglycans from bovine aorta. *Lab Invest.* 1980;42, 190-196.

Vijayagopal P, Srinivasan SR, Radhakrishnamurthy B, Berenson GS. Interaction of serum lipoproteins and a proteoglycans from bovine aorta. *J Biol Chem.* 1981;256, 8234-8241.

Vijayagopal P, Srinivasan SR, Radhakrishnamurthy B, Berenson GS. Hemostatic properties and serum lipoprotein binding of a heparan sulfate proteoglycan from bovine aorta. *Biochim Biophys Acta.* 1983;758, 70-83.

Vlaicu R, Rus HG, Niculescu F, Cristea A. Immunoglobulins and complement components in human aortic atherosclerotic intima. *Atherosclerosis.* 1985;55, 35-50.

Wallenstein S, Zucker CL, Fleisss JL. Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res.* 1980;47, 1-49.

Walton KW, Morris CJ. Studies on the passage of plasma proteins across arterial endothelium in relation to atherogenesis. *Prog Biochem Pharmacol.* 1977;14, 138-152.

Wagner JR, Motchnic PA, Stocker R, Sies H, Ames BN. The oxidation of blood plasma and low density lipoprotein components by chemically generated singlet oxygen. *J Biol Chem.* 1993;268, 18502-18506.

Warren L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J Biol Chem.* 1959;234, 1971-1975.

Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW. Role of the lysine residues of plasma lipoproteins in high affinity binding to cell surface receptors on human fibroblasts. *J Biol Chem.* 1978;253, 9053-9062.

Winlove CP, Parker KH, Ewins AR. Reversible and irreversible interactions between elastin and plasma lipoproteins. *Biochim Biophys Acta.* 1985;838, 374-380.

Wissler RW, Vesselinovitch D, Getz GS. Abnormalities of the arterial wall and its metabolism in atherogenesis. *Prog Cardiovasc Dis.* 1976;18, 341-352.

Woodard JF, Srinivasan SR, Zimny ML, Radhakrishnamurthy B, Berenson GS. Electron microscopic features of lipoprotein-glycosaminoglycan complexes from human atherosclerotic plaques. *Lab Invest.* 1976;34, 516-521.

Woolen JW, Walker PG. The fluorimetric estimation of N-acetyl- β -glucosaminidase and β -galactosidase in blood plasma, *Clin. Chim. Acta.* 1965;12, 647-658.

Yagi K. Lipid peroxidation. Assay for blood plasma and serum. *Methods Enzymol.* 1984;105, 328-342.

Yamamoto Y, Brodsky MH, Baker JC, Ames BN. Detection and characterization of lipid hydroperoxides at picomole levels by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 1987;160, 7-13.

Yla-Herttula S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, Witztum J, Steinberg D. Evidence for the

presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. J Clin Invest. 1989;84, 1086-1095.

Ziouzenkova O, Winlhofer-Roob BM, Puhl H, Roob JM, Esterbauer H. Lack of correlation between the α -tocopherol content of plasma and LDL, but high correlations for γ -tocopherol and carotenoids. J Lipid Res. 1996;37, 1936-1946.



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

