

ОБЗОРЫ

УДК 612.015

©Коллектив авторов

ПРОЦЕССЫ МОДИФИКАЦИИ ЛИПОПРОТЕИНОВ, ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ И ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ РОЛЬ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЛИПОПРОТЕИНОВ

Л.А.БЕЛОВА, О.Г.ОГЛОБЛИНА, А.А.БЕЛОВ, В.В. КУХАРЧУК.

Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ,
121552 Москва, 3-я Черепковская ул., 15-А.

Факс (095)415-2962.

Обзор посвящен модификациям липопротеинов (ЛП*), происходящим в результате различных биохимических реакций. Рассмотрены возможные механизмы окисления ЛП и природа прооксидантов, участвующих в этих процессах. Особое внимание обращено на участие протеолитических ферментов в модификации ЛП.

Ключевые слова: липопротеины, модификация, протеолиз, окисление, атерогенез.

Липопротеины (ЛП) - это комплексы липидов с белками, присутствующие во всех живых организмах. ЛП выполняют важнейшую функцию транспорта, накопления и хранения липидов в тканях, а также являются необходимой составляющей различных морфологических структур клетки [1, 2]. Синтез ЛП происходит в печени и кишечнике [1, 2].* При этом различные классы ЛП *in vivo* находятся в динамическом равновесии, поэтому деление ЛП по липидному и белковому составу является условным [1, 2].

Принятые сокращения: ГМК - гладкомышечные клетки, ЛП - липопротеины, ЛПВП, ЛПНП, ЛПОНП и ЛППП - липопротеины высокой, низкой, очень низкой и промежуточной плотности, оксЛПНП - окисленные ЛПНП, ЛФХ - лизофосфатидилхолин, ПМЯ - полиморфноядерные лейкоциты, СЖК - свободные жирные кислоты, СОД - супероксиддисмутаза, ТГ - триглицериды, ФЛ - фосфолипиды, ХС - холестерин, ЭХ - эфиры холестерина.

О метаболизме ЛП.

В плазме крови человека выделяют 4 основных класса ЛП: хиломикроны, ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП), ЛП низкой плотности (ЛПНП) и ЛП высокой плотности (ЛПВП) (см. табл. 1). ЛПНП переносят в клетки холестерин (ХС), а ЛПОНП - триглицериды (ТГ) эндогенного происхождения [2, 3].

Обогащенные ТГ липопротеиновые частицы (хиломикроны и ЛПОНП) быстро разрушаются до ремнантов (остатков) и удаляются из циркуляции в течение нескольких минут [4]. Основную роль в удалении циркулирующих ЛП играют рецепторы печени. Было показано, что рецепторы ЛПНП, связывающие апо-В и апо-Е-содержащие ЛП, способны удалять ЛПНП, ЛП промежуточной плотности (ЛППП) или ремнанты ЛПОНП, бета-ЛПОНП (которые характеризуются содержанием в них значительных количеств эфиров ХС) и апо-Е-ЛПВП, (необычные ЛПВП-подобные частицы, появление которых в крови индуцируется диетой, обогащенной ХС) [4].

Результатом катаболизма ЛПОНП является образование ЛПНП. Основная роль ЛПНП заключается в обеспечении всех клеток организма постоянно доступным источником ХС. ХС необходим для синтеза клеточных мембран, а также является субстратом для образования других продуктов метаболизма, например, желчных кислот, половых гормонов, кортикостероидов [1, 2, 4].

Повышенный уровень ЛПНП и ЛПОНП в крови связывают с патогенезом различных заболеваний сердца и атеросклерозом [2, 3]. К атерогенным ЛП также относят ЛП(а), который по липидному составу не отличается от ЛПНП (см. табл. 1), но кроме апо-В содержит апо(а), связанные между собой дисульфидными мостиками [1, 5]. В организме человека обнаружены также различные модифицированные ЛП (см. далее "Химические модификации ЛП").

Из-за их участия в процессах атерогенеза ЛП вызывают пристальное внимание ученых и медиков всего мира [6, 7]. Наиболее изученными являются ЛПНП.

Метаболизм ЛПНП осуществляется с помощью рецепторопосредованного эндоцитоза. Рецепторы ЛПНП экспрессируются фактически всеми протестированными клетками (печени, половых желез, надпочечников, фибробластами, макрофагами) [1, 4]. Рецепторы ЛПНП подвержены метаболической регуляции и изменение транспорта ХС влияет на уровень их экспрессии. Обогащенная ХС диета подавляет активность рецепторов, в то время как при увеличенном потреблении ХС или пониженном синтезе ХС в печени их активность возрастает [1, 2, 4].

Нативные ЛПНП узнаются ЛПНП-рецепторами на многих клетках и эти рецепторы подавляются, когда клетка содержит достаточно ХС.

Модифицированные ЛП и атерогенез.

Помимо типичных апо-В,Е-рецепторов ("классический" ЛПНП-рецептор), активность которых относительно низкая и не ведет к накоплению эфиров ХС в клетке, некоторые клетки имеют рецепторы, участвующие в захвате частиц ЛП: а) ацетил-ЛПНП-рецепторы, или "классические" скэвенджер-рецепторы. Эти рецепторы связывают ацетилированные, ацетоацетилированные, сукцинизированные, конъюгированные с малоновым диальдегидом ЛПНП, но не связывают нативные ЛПНП; б) рецепторы к обогащенным ХС бета-ЛПОНП; в) рецепторы к декстран-сульфату, которые могут взаимодействовать с комплексами ЛПНП-гликозаминогликан и ЛПНП-протеогликан; г) Fc- (к Fc-

фрагменту иммуноглобулина) и C_3 - (к C_3 -компоненту комплемента) рецепторы, с помощью которых макрофаги могут захватывать иммунные комплексы, в том числе комплексы ЛП-иммуноглобулин; д) рецепторы к ремнантам хиломикронов и ЛПОНП; е) специфические рецепторы для окс-ЛПНП [6-10].

Возможно, что макрофаги имеют несколько разновидностей скэвенджер-рецепторов: один вид рецепторов распознает ацетилированные ЛПНП, второй - перекисно-модифицированные, а третий - и те, и другие [2, 10]. Как уже отмечалось, в отличие от ЛПНП-рецепторов, рецепторы к модифицированным ЛП не снижают своей активности при накоплении ХС в макрофагах, то есть отсутствует регуляция поглощения модифицированных ЛП [1, 11]. Значительная часть макрофагов после захвата ими модифицированных ЛП и накопления в них эфиров ХС трансформируется в пенные клетки и остается в интиме артерий [6, 7, 12-16]. Однако, этим участие модифицированных ЛП в процессах атерогенеза не ограничивается.

На разных стадиях атерогенеза, начиная от проникновения ЛП в артериальную стенку, принимает участие пять типов клеток: эндотелиальные, ГМК, моноциты\макрофаги (моноциты, превратившиеся в макрофаги), тромбоциты и лимфоциты [2,6,7,15,16]. Модифицированные ЛП влияют на их взаимодействия и на продуцирование ими разнообразных веществ.

Модифицированные ЛП индуцируют экспрессию гликопротеинов адгезии на поверхности эндотелия. Появление такого специфического гликопротеина адгезии приводит к увеличению адгезии моноцитов\макрофагов и Т-лимфоцитов на эндотелии (90% прикрепившихся клеток составляют моноциты и 10% - лимфоциты) [16].

Одной из характерных морфологических черт атеросклероза является пролиферация ГМК в интиме. Пролиферации ГМК предшествует их миграция из меди, где эти клетки выполняют сократительную функцию, придающую артериям эластичность. Миграция ГМК из меди в интиму происходит под влиянием хемотактических факторов, экспрессируемых эндотелиальными клетками, макрофагами и фибробластами интимы артерий, по-видимому, в ответ на появление в ней модифицированных ЛП, а пролиферация ГМК - под влиянием факторов роста. Мигрировавшие в интиму и подвергшиеся в ней пролиферации ГМК резко изменяют свои свойства и превращаются в "метаболически активные клетки" или "синтезирующий тип ГМК". Они начинают усиленно синтезировать соединительнотканые белки (эластин, коллаген) [2,6,17,18]. ГМК синтезирующего типа, обладающие апо-В,Е-рецепторами и не содержащие скэвенджер-рецепторов, оказались способными при инкубации с нативными ЛПНП, обогащенными ХС, накапливать эфиры ХС [2].

Следовательно, процесс развития атеросклеротических поражений сосудов - это результат взаимодействия различных типов клеток и продуцирования ими разнообразных веществ, включая хемоаттрактанты, факторы роста, цитокины, ферменты и оксиданты.

Химические модификации ЛП.

Рассмотрим теперь более подробно, что такое модифицированные ЛП. Модификация липопротеиновых частиц может происходить в результате нескольких процессов: протеолиза белковой части ЛП, химической модификации (в том числе окисления) липидов и белков, агрегации липопротеиновых частиц или образования иммунных комплексов. В результате таких модификаций ЛП

становятся атерогенными и токсичными, увеличивается захват этих ЛП макрофагами [7, 19, 20].

На повышенную атерогенность модифицированных ЛП указывает целый ряд данных [2, 10]. Так, химическая модификация частиц ЛПНП влияет на их проникновение в стенку артерий [21-23]. Иммуно-гистохимические исследования показали, что атеросклеротические бляшки содержат нагруженный эфирами холестерина макрофаг, или пенные клетки. Предполагается, что моноциты/макрофаги становятся пенными клетками за счет захвата, гидролиза и ретроградной модификации эфиров ХС, присутствующих в ЛПНП [1, 2, 6, 19]. Однако, пенные клетки образуются только после модификации ЛП [20].

Как уже отмечалось, в наибольшей степени изучены ЛПНП. Поэтому в дальнейшем речь будет идти в основном именно об этом классе ЛП.

Известно, что некоторые химические модификации ЛПНП (ацетилирование, ацетоацетилирование и др.) превращают их в формы, которые намного быстрее захватываются макрофагами. Однако, доказательств существования *in vivo* таких химически модифицированных форм ЛПНП или того, что они могут быть образованы биологическим путем, пока не получено [24]. Время полужизни ацетилированных ЛПНП *in vivo* около 1 мин. В связи с этим биологически модифицированные ЛПНП, которые связываются с ацетил-ЛПНП - рецепторами, трудно детектировать в плазме крови, и если они образуются *in vivo*, их концентрация в крови очень мала. Поэтому до сих пор не известны нативные ЛП, которые связываются *in vivo* с ацетил-ЛПНП - рецепторами [4].

На возможность существования *in vivo* модифицированных ЛП указывают данные по изменению свойств ЛПНП у больных различными заболеваниями. Из атеросклеротических бляшек и интерстициальной жидкости человека были выделены оксЛПНП [25]. ЛПНП больных с хронической почечной недостаточностью карбамиллированы по остаткам лизина [11]. Другим известным типом модификации ЛПНП, существующим *in vivo*, является десиалирование. В плазме крови больных коронарной болезнью сердца были обнаружены ЛПНП, апобелки которых, будучи гликопротеинами, отличаются пониженным содержанием сиаловых кислот и повышенной способностью накапливать липиды в культивируемых клетках [26-28]. Причем десиалированные ЛПНП отличаются от салированных по нескольким параметрам. Так, они сильно различаются по содержанию липидов. Кроме того десиалированные ЛПНП содержат в больших количествах оксистеролы (см. далее "Окисление ЛП") [28, 29]. Низкое содержание сиаловых кислот в ЛП больных коронарной болезнью сердца может быть вызвано как десиалированием уже существующей углеводной цепи, так и ее неполным салированием при патологических условиях [28, 29]. Десиалирование ЛП может осуществляться под действием сиалидаз, а так же при взаимодействии ЛП с клетками крови, эндотелиальными или другими клетками [28].

Имеются данные о наличии в крови больных сахарным диабетом гликозилированных ЛПНП, причем неферментативное гликозилирование затрагивает все классы апобелков, включая апо-В [9, 11]. Гликозилирование не только облегчает окисление ЛПНП, но также увеличивает способность структурных белков стенки сосуда связывать белки плазмы, в том числе ЛПНП [2, 30, 31]. Sobenin и соавт. [26] установили, что способность ЛПНП больных диабетом индуцировать внутриклеточное накопление ХС связана с различными

типами модификаций ЛПНП, включая неферментативные гликозилирование и десиалирование, а также изменения липидного состава ЛП. Сочетание гликозилирования и десиалирования ЛПНП оказывает синергическое атерогенное действие на культивируемые клетки интимы человека [26]. Следовательно, процессы модификации ЛП играют значительную роль в прогрессировании развития атеросклероза у больных диабетом.

Иммуногистохимическими методами было показано, что в атеросклеротических бляшках содержатся также апобелки, остатки тирозина в которых подверглись нитрованию [32]. Следовательно, атерогенность ЛП может быть связана не с одной, а с несколькими модификациями ЛП.

Помимо химической модификации ЛП может происходить их агрегация и образование иммунных комплексов модифицированных ЛП с антителами к ним [2,8,10,31,33-36]. Даже минорные изменения в нативных ЛПНП делают их иммуногенными, поэтому различные формы модифицированных ЛПНП, как показано в опытах на животных, являются иммуногенными веществами [8,37]. ОксЛПНП также иммуногенны и в сыворотке крови человека и экспериментальных животных были обнаружены антитела к ним [8,23,36]. Tertov и соавт. [35] выделили из крови пациентов с коронарным атеросклерозом циркулирующие иммунные комплексы, содержащие ЛПНП. Авторы исследовали химический состав и физико-химические характеристики составных частей этих иммунных комплексов и сделали вывод, что ЛПНП, выделенные из иммунных комплексов, являются модифицированными ЛП, напоминающими по своим свойствам десиалированные ЛПНП [35].

Показано, что ЛПНП артерий, содержащие специфические эпитопы оксЛПНП, частично находятся в агрегированном состоянии [8, 10]. Tertov и соавт. [33] проверили гипотезу о ключевой роли агрегатов модифицированных ЛПНП в накоплении липидов клетками интимы аорты. Они показали, что существует прямая корреляция между степенью агрегации ЛП и количеством аккумулированных ЭХ. Причем накопление ЭХ происходит только в присутствии модифицированных ЛПНП, то есть необходимым условием внутриклеточного накопления липидов является агрегация модифицированных ЛП [33, 34].

Lopes-Virella и Virella [30] показали, что активация макрофагов иммунными комплексами, содержащими ЛПНП, приводит к парадоксальному увеличению количества ЛПНП-рецепторов, нарушая еще больше за счет этого гомеостаз ХС и увеличивая вероятность развития атеросклеротического поражения.

Свойство макрофагов захватывать модифицированные ЛП связано, по-видимому, с их защитной функцией, направленной на удаление из организма всего чужеродного. Следовательно, модифицированные липиды считаются "чужеродными веществами" [9, 32]. Предполагают, что клетки Купфера в печени быстро удаляют модифицированные ЛПНП из плазмы, экспрессируя ацетил-ЛПНП-рецепторы [24]. Следовательно, индуцированная клетками модификация ЛПНП может иметь физиологическое значение, так как она приводит к их быстрому удалению из внесосудистого пространства, особенно в местах воспаления.

Таким образом, пусковым механизмом образования пенистых клеток, ключевого события развития атеросклероза, является модификация ЛП, которая может происходить под действием различных факторов и веществ. Причем,

фагоцитирующие клетки способны захватывать помимо модифицированных ЛПНП и другие классы ЛП (или их ремнанты), следовательно, в атерогенезе могут принимать участие модифицированные ЛП различных классов.

Окисление ЛП. Окисление ЛП - частный случай химической модификации. Процессы окисления ЛП причастны к модификации ДНК и белков, радиационному повреждению клеток, образованию возрастных пигментов, модификации структуры клеточных мембран, инициации роста опухоли, образованию атеросклеротических бляшек [38]. Вот почему окисление ЛП вызывает пристальное внимание ученых всего мира. Из всех классов ЛП окисление в первую очередь затрагивает ЛПНП [6,7,31,39]. В литературе обычно используют термины "окисление липидов" или "окисление ЛПНП" без уточнений, какие молекулы или их составные части подвергаются окислительной модификации, или рассматривают только окисление полиненасыщенных жирных кислот. Но ЛП - сложная частица, и помимо остатков полиненасыщенных жирных кислот (линолевой, арахидоновой и т.д.), входящих в состав эфиров ХС, фосфолипидов (ФЛ), ТГ, окислительной модификации могут подвергаться другие составные части молекул ЛП и липидов клеточных мембран: апобелки, стерольные остатки ХС и эфиров ХС, ФЛ.

Разные авторы приписывают атерогенные и токсичные свойства различным компонентам модифицированных ЛП. В организме процессы модификации составных частей ЛП могут протекать одновременно и, по-видимому, нельзя нивелировать роль одних продуктов и преувеличивать роль других. Кроме того образующиеся в процессе перекисного окисления липидов гидроперекиси, ненасыщенные альдегиды и малоновый диальдегид подавляют активность гликолиза и окислительного фосфорилирования, ингибируют синтез белка и нуклеиновых кислот, нарушают различные ферментативные процессы, модифицируя SH-группы и дисульфидные связи ферментов [3,40-42].

Известно, что оксЛП токсичны для различных типов клеток, включая эндотелиальные и гладко-мышечные клетки, перитонеальные макрофаги мыши и моноциты/макрофаги человека [31, 43, 44].

Токсичность оксЛПНП может быть обусловлена продуктами окисления ХС (оксистеролами) [23]. У оксистеролов широкий спектр биологических активностей, включая ингибирование синтеза ДНК и ХС, модуляцию иммунного ответа и другие. Как было показано, токсичность медь-оксЛПНП для ГМК связана с 7-кетохолестерином и 7-гидроксихолестеринами [23]. Токсичность оксистеролов может быть обусловлена их способностью ингибировать кальмодулин, кальций-связывающую протеиназу, которая участвует в многочисленных клеточных процессах. Они также могут замещать ХС в клеточных мембранах, изменяя таким образом структуру и функции мембраны, что может вызывать гибель клеток [23].

В результате взаимодействия аминокислотных остатков апобелков с продуктами перекисного окисления липидов, могут образовываться карбонильные производные апо-В [31, 41]. Модификация апо-В приводит к взаимодействию ЛПНП и ЛП(а), в состав которых он входит (см. табл.1), со скэвенджер-рецепторами макрофагов и ГМК.

Перекисное окисление фосфолипидов ЛП во время инкубации ЛПНП с культурами эндотелиальных клеток, ГМК или макрофагов приводит к превращению фосфатидилхолина в лизофосфатидилхолин (ЛФХ) [22,45]. ЛФХ

образуется в результате гидролиза фосфатидилхолина внутриклеточными фосфолипазами A₂ [45,46]. Некоторые исследователи считают, что атерогенные свойства оксЛПНП и модифицированных эндотелием ЛП, которые проявляют повышенную способность накапливаться в клетках, вызывать нарушение эндотелий-зависимой релаксации сосудов, способствовать агрегации тромбоцитов, в значительной степени обусловлены присутствием в них ЛФХ [45-50]. ЛФХ, модифицированные фосфолипиды или окисленные стеролы могут покидать модифицированные ЛПНП и оказывать повреждающее действие на стенку артерий [36,46].

Таблица. Классификация ЛП и их состав [1,2,4]

Класс ЛП	Плотность, г/мл	Фракция липидов						Белковая фракция*				
		%	ТГ	ХС	ЭХ	ФЛ	СЖК	%	А	В	С	Е
Хиломикроны	<0,94	98	83	3	5	7	-	2	+	+	+	-
ЛПОНП	0,94-1,006	90	51	7	12	18	2	10	-	+	+	+
ЛПНП	1,006-1,063	78	10	8	37	22	1	22	-	+	+	-
ЛПВП	1,063-1,21	48	6	3	14	24	1	52	+	-	+	-
ЛП(а)	1,055-1,085	69	5	8	37	19	-	31	-	+	-	-

А, В, С и Е апобелки: апо-А, апо-В, апо-С и апо-Е, соответственно.

Механизмы окисления ЛП и прооксиданты. Известно, что окислительные модификации ЛПНП могут происходить в присутствии каталитических количеств ионов переходных и тяжелых металлов [10,31,41,51], а также под действием макрофагов [7,10,31,51], эндотелиальных клеток [24,44,52], ГМК [53] и полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯ) [25,54]. ПМЯ могут накапливаться в местах воспаления и таким образом играть роль инициатора повреждения эндотелия и образования бляшки, хотя в отличие от других перечисленных выше клеток, они не являются основными клеточными компонентами атеросклеротических поражений сосудов [54, 55].

В последние годы усиленно изучаются процессы, с помощью которых клетки модифицируют ЛПНП. Механизмы индуцированного клетками окисления ЛПНП до конца не выяснены, хотя было предложено много теорий, объясняющих их [32,41,42,51-54]. Предположительно существует два основных механизма окисления ЛПНП клетками: 1) с помощью клеточной липоксигеназной активности и 2) под действием выделяемых клетками метаболитов кислорода [54].

Вопрос о том, какие из окислительных агентов принимают участие в окислении липидов, также до конца не выяснен. Так, например, перекись водорода легко проникает через клеточные мембраны, но она является слабым окислителем и обычно глутатионпероксидаза и каталаза легко обезвреживают ее. Однако, из H₂O₂ в присутствии ионов металлов образуются реакционноспособные гидроксильные радикалы (НО•) [21], а под действием миелопероксидазы в присутствии хлорид-ионов образуется мощнейший оксидант - хлорноватистая кислота НОСl [55]. Неизвестно, под действием какого оксиданта происходит окисление эфиров ХС в плазме, однако, в модельных системах такое окисление вызывают различные радикалы-инициаторы: синглетный кислород, пероксинитрит и ионы Cu²⁺ [56].

Известно, что модификация ЛПНП под действием ПМЯ зависит от микромолярных количеств ионов железа и меди в среде [25, 51]. В опытах *in vitro* показано, что окисление ЛПНП нейтрофилами потенцируется ферритином. По-видимому, супероксид-анион, продуцируемый нейтрофилами, способен высвободить ион железа из ферритина, присутствующего в плазме и выделяемого клетками, что способствует генерированию оксидантов, инициирующих окисление ЛП [25]. После активации ПМЯ выделяют множество метаболитов кислорода (что позволяет им умерщвлять микроорганизмы), но они также содержат 5- и 15-липоксигеназы, поэтому любой из вышеуказанных механизмов может участвовать в окислении ЛП в этом случае [16, 54].

В случае модификации ЛПНП под действием артериальных ГМК основная роль приписывается супероксид-аниону и тиолам, выделяемыми этими клетками [53].

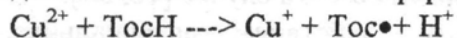
Известно, что для окисления ЛПНП макрофагами необходимо наличие ионов железа [51]. Wilkins и Leake [51] изучили возможную роль различных реакционноспособных кислородных молекул и радикалов (супероксид-анион, перекись водорода, гидроксил-радикал и синглетный кислород) в окислении ЛПНП макрофагами. С этой целью они исследовали способность захватчиков кислородных радикалов (маннитол и диазобисциклооктан) и ферментов, деградирующих реакционноспособный кислород (СОД и каталаза), ингибировать окисление ЛПНП перитонеальными макрофагами мыши.

Отсутствие ингибирования с маннитолом (от 1 до 10 мкМ) или нетоксичными концентрациями диазобисциклооктана (до 10 мкМ) позволяет предположить, что ни гидроксил-радикал, ни синглетный кислород не участвуют в окислении ЛПНП макрофагами. Однако, эти реакционноспособные молекулы могут генерироваться на поверхности частиц ЛПНП и быть таким образом недоступными для этих двух веществ-захватчиков. Роль супероксид-аниона остается невыясненной, так как СОД оказывала различные эффекты, иногда ускоряя окисление ЛПНП, иногда ингибируя его. Каталаза ингибировала модификацию ЛПНП макрофагами, но степень ингибирования по непонятной причине сильно различалась от опыта к опыту. Таким образом, возможно, что перекись водорода участвует в модификации ЛПНП макрофагами, а роль супероксид-аниона остается невыясненной [51].

Yan и соавт. предложили другой механизм окисления ЛП [41]. После стимуляции нейтрофилы и моноциты высвобождают реакционноспособные кислородсодержащие молекулы, такие как супероксид-анион и перекись водорода. Кроме того они выделяют миелопероксидазу - фермент, в результате действия которого образуется НОСl [55]. Окислительная модификация ЛПНП НОСl приводит к модификации белковой части, причем образование перекисей липидов происходит в незначительной степени [41]. Доказательством наличия НОСl-модификации ЛПНП *in vivo* является выделение из атеросклеротических бляшек человека белков, модифицированных миелопероксидазой и НОСl. Кроме того, НОСl-модифицированный аро-В, несмотря на отсутствие перекисного окисления липидов, быстро захватывается макрофагами [41]. Альтернативный механизм, предложенный Moore et. al. [32], включает реакцию образования пероксинитрита из двух радикалов NO и супероксид-аниона в артериальной стенке. Пероксинитрит способен окислять липиды даже в присутствии высоких концентраций антиоксидантов плазмы. Помимо липидов пероксинитрит

способен окислять в плазме SH-группы, высвобождать медь из церулоплазмина и образовывать нитро-производные тирозина [32].

Lynch и Frei [57] показали, что для железо-зависимого окисления ЛПНП, в отличие от медь-зависимого, требуется наличие супероксид-аниона. Инкубация ЛПНП с ионами Fe^{3+} супероксид-анионом приводит к быстрому образованию ионов Fe^{2+} и последующей окислительной модификации ЛП. Так как медь-зависимое окисление происходит без экзогенного восстановителя, сами ЛПНП способны восстанавливать Cu^{2+} до Cu^+ . Предполагают, что перекисное окисление липидов, наблюдаемое в таких системах, является следствием взаимодействия ионов Cu^{2+} и токоферола с генерированием ионов Cu^+ :



Модификация ЛПНП под действием ионов меди сопровождается лаг-периодом, во время которого расходуются антиоксиданты. Затем развитие цепной реакции приводит к образованию перекисных радикалов вследствие окисления полиненасыщенных жирных кислот. Хотя ионы переходных металлов способствуют быстрому окислению липидов и *in vitro* ЛПНП может связывать ионы меди, неизвестно, достаточно ли *in vivo* свободных ионов меди и железа или комплексов этих металлов для того, чтобы вызвать окисление ЛПНП. Однако, интактный медь-переносящий белок церулоплазмин, как и токоферол, может действовать в качестве прооксиданта [58].

Следовательно, в окислении ЛП могут быть задействованы несколько механизмов, и даже клетки одного и того же типа могут использовать различные пути [36, 41, 51].

Протеолиз ЛП. Помимо окислительных модификаций клетки могут также модифицировать ЛП протеолитически. Гидролиз ЛП могут вызывать различные протеиназы (клеточные и гуморальные): катепсины, эластаза лейкоцитов, плазмин, тромбин и др. [11, 59-61]. Ферментативные модификации липопротеинов приводят к изменению их взаимодействия с клетками. Известно, что ограниченный протеолиз ЛПНП приводит к быстрому захвату этих частиц макрофагами [2, 60] (см. "Химические модификации ЛП"). Показано, что удаление 20% белка с ЛПНП путем обработки трипсином приводит к 10-20-кратному увеличению степени их поглощения и деградации фибробластами кожи людей с гомозиготной гиперхолестеринемией по сравнению с поглощением и деградацией нативных ЛПНП. Обработанные трипсином ЛПНП как и оксЛПНП с большей интенсивностью захватываются макрофагами и с меньшей - фибробластами по сравнению с нативными ЛПНП [11]. Ограниченный протеолиз белка ЛПНП тромбином *in vitro* приводил к увеличению связывания ЛПНП с фибронектином - важным компонентом внеклеточного матрикса [11].

Раапанен и соавт. [61, 62] обнаружили, что протеолитическая деградация частиц ЛПНП запускает также механизм слияния липидных частиц. Обработка ЛПНП химотрипсином делает частицы нестабильными и приводит к образованию частиц большего размера. Кроме того было найдено, что возрастает связывание слившихся частиц с протеогликанами аорты человека. Причем, после протеолиза связывание с протеогликаном как слившихся, так и неслившихся частиц возрастает, но неслившихся - в меньшей степени [61].

Вероятными причинами наблюдаемого усиления связывания

протеолизированных ЛПНП являются большие количества ионных взаимодействий и/или усиление ионных взаимодействий между протеолизированным апо-В и протеогликанами. Во время протеолиза апобелков и слияния частиц ЛП конформационные изменения в оставшихся фрагментах апо-В могут экспонировать домены связывания с протеогликаном (содержащие остатки лизина и аргинина). Действительно, несмотря на потерю остатков лизина из апо-В во время протеолиза, количество "активных" (заряженных боковых цепей) остатков лизина не уменьшается, что указывает или на образование новых "активных" остатков лизина во время пространственной реорганизации оставшихся фрагментов апо-В, и/или на устойчивость основных доменов апо-В к протеолитическому расщеплению (и последующему высвобождению из частицы) [61, 62].

Какие же протеиназы могут запускать слияние частиц ЛПНП в интиму артерии, которая является местом образования атеросклеротического поражения? Чтобы попасть в интиму частица ЛПНП должна пересечь слой эндотелиальных клеток, а при достижении субэндотелия ее окружают клетки интимы паренхиматозной природы, главным образом ГМК. Кроме того в интиму присутствует еще три типа клеток: тучные клетки, макрофаги и Т-лимфоциты [60,63]. В гранулах тучных клеток интимы артерий и коронарных сосудов присутствует химаза, обладающая химотрипсиноподобной активностью. Макрофаги также секретируют протеолитические ферменты (например, катепсин В), способные гидролизовать апо-В. Кроме того, матриксные металлопротеиназы, секретируемые мигрирующими ГМК и ГМК, участвующими в ремоделировании тканей в пораженной атеросклерозом интиму артерий, могут участвовать в образовании липидных пятен в своем микроокружении. Наконец, интима артерий человека может содержать некоторое количество цитолитических Т-клеток, которые после активации также высвобождают сериновые протеиназы [60, 61].

Таким образом, различные протеолитические ферменты из разных типов клеток могут вызывать слияние частиц ЛПНП, которые обладают повышенной способностью связываться с протеогликанами [60 - 62].

Не всякая протеолитическая деградация апо-В приводит к слиянию частиц ЛП. Piha и соавт. [60] установили, что протеолиз ЛПНП трипсином, химотрипсином или проназой приводит к образованию и высвобождению фрагментов апо-В из ЛПНП и запускает процесс слияния частиц. Обработка же ЛПНП плазмином, калликреином или тромбином, которая также приводит к образованию фрагментов апо-В, но не к их выделению из ЛПНП, не запускает механизм слияния частиц [60]. При инкубации обработанных протеиназами частиц ЛПНП с макрофагами только слившиеся частицы ЛПНП переваривались макрофагами [60]. При совместном культивировании тучных клеток и макрофагов стимуляция тучных клеток вызывает увеличение скорости захвата ЛПНП макрофагами в 50 раз по сравнению с таковым в отсутствие тучных клеток [62].

Следовательно, протеолитическая модификация частиц ЛПНП может влиять на их взаимодействия с различными клетками, а также приводить к усилению их связывания с протеогликанами, что может быть причиной локальной аккумуляции ХС ЛПНП в областях интимы, предрасположенных к локальному атерогенезу.

Большую роль в процессах атерогенеза играют эластаза и эластазоподобные ферменты, которые содержатся в различных клетках, в том числе моноцитах и макрофагах, ГМК, фибробластах, синовиоцитах и ПМЯ [41, 65]. Амаго и соавт. [66] показали, что у женщин со стенозами (по данным коронарной ангиографии) концентрация эластазы лейкоцитов выше по сравнению с донорами. Продуцирование и секреция эластаз различными клетками может влиять на метаболизм эластина и вызывать повреждение соединительных тканей в области атеросклеротических повреждений. Образующиеся пептиды эластина, по-видимому, хемотактичны для моноцитов [64].

Polasek и соавт. [59, 67] в опытах *in vitro* показали, что ЛПНП и ЛПВП человека способствуют выделению из ПМЯ крови человека протеиназы, которая расщепляет апо-В и апо-А-II. Они доказали, что этой протеиназой является эластаза лейкоцитов. В атеросклеротических бляшках были обнаружены также фрагменты апо(а) [68]. Исследования Edelstein и соавт. [68] показали, что ограниченный протеолиз апо(а) человека панкреатической эластазой приводит к расщеплению связи Ile 3520 - Leu 3521 с образованием двух дискретных фрагментов с различными химическими, функциональными и метаболическими свойствами. Фрагментация апобелков различных ЛП под действием эластаз может происходить при патологических процессах, например в местах воспаления, где накапливаются ПМЯ и макрофаги. Было показано, что выделение эластазы из лейкоцитов зависит от концентрации ЛП в среде [59].

Следует отметить, что роль эластазоподобных ферментов в стенке артерий до сих пор окончательно не выяснена.

Возможно, что протеолиз ЛП выполняет в организме защитную функцию. Mackness и Durrington [31] считают, что эластазоподобная протеиназа, ассоциированная с ЛПВП, может способствовать быстрому удалению из циркуляции модифицированных окислением ЛПНП, гидролизуя поврежденный окислительной модификацией апо-В.

Таким образом, модификация ЛП - физиологический процесс, способствующий их быстрому удалению из циркуляции и из внесосудистого русла. Однако, в некоторых случаях (повышенное содержание ЛПНП, воспалительные процессы) модифицированные ЛП индуцируют накопление эфиров ХС в макрофагах человека и могут нарушать функции эндотелиальных клеток и тромбоцитов. Кроме того эти модифицированные ЛП способны запускать механизмы аутоиммунного ответа, что вызывает образование аутоантител и последующее образование иммунных комплексов, содержащих ЛПНП. Как модифицированные ЛП, так и иммунные комплексы, содержащие аутоантитела к модифицированным липидам могут быть вовлечены в образование пенистых клеток, активацию макрофагов и повреждение эндотелиальных клеток. Следовательно, модификация ЛП может приводить к повреждению эндотелия и накоплению атерогенных липидов в артериальной стенке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Томпсон Г. Р. (1992) Руководство по гиперлипидемии. Изд-во Gorenjski Tisk, Югославия.

2. *Климов А. Н., Никульчева Н. Г.* (1995) Липиды, липопротеиды и атеросклероз. Изд-во "Питер", Санкт-Петербург.
3. *Artman N. R.* (1969) *Adv. Lipid Res.*, **7**, 245-330.
4. *Plasma Lipoproteins* (1987)(New Comprehensive Biochem., **14**) (Gotto A. M., ed.) Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford.
5. *Howard G.C., Pizzo S. V.* (1993) *Lab. Invest.*, **69**, 373-386.
6. *Ross R.* (1993) *Nature*, **362**, 801-809.
7. *Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T.E. et al.* (1989) *N. Engl. J. Med.*, **320**, 915-924.
8. *Yla-Herttuala S., Palinski W., Butler S. W. et.al.* (1994) *Arterioscl. Thrombosis*, **14**, 32-40.
9. *Klimov A. N.* (1988) *Atherosclerosis Rev.*, **17**, 75-86.
10. *Lougheed M., Steinbrecher U. P.* (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 11798-11805.
11. *Шинкумер В.О.* (1987) *Вопр. мед. химии*, **33**, 2-8.
12. *Faggiotto A., Ross R.* (1984) *Arteriosclerosis*, **4**, 323-356.
13. *Masuda J., Ross R.* (1990) *Arteriosclerosis*, **10**, 164-187.
14. *Rosenfeld M.E., Tsukada T., Gown A.M., Ross R.* (1987) *Arteriosclerosis*, **7**, 9-23.
15. *Witztum J. L., Steinberg D.* (1991) *J. Clin. Invest.*, **88**, 1785-1792.
16. *Joris I., Zand T., Nunnari J. J. et al.* (1983) *Am. J. Pathol.*, **113**, 341-358.
17. *Libby P., Warner S.J.C., Salomon R.N., Birinyi L.K.* (1988) *N.Engl. J. Med.*, **318**, 1493-1498.
18. *Sjolund M., Hedin U., Sejersen T. et al.* (1988) *J. Cell Biol.*, **106**, 403-413.
19. *Steinberg D.* (1987) *Circulation*, **76**, 508-514.
20. *Clare K., Hardwick S. J., Carpenter K. L. H. et al.* (1995) *Atherosclerosis*, **118**, 67-75.
21. *Nielsen L.B.* (1996) *Atherosclerosis*, **123**, 1-15.
22. *Gorog P., Kakkar V.V.* (1987) *Atherosclerosis*, **65**, 99-107.
23. *Portman O.W., O'Malley J.P., Alexander M.* (1987) *Atherosclerosis*, **66**, 227-235.
24. *Henriksen T., Mahoney E. M., Steinberg D.* (1983) *Atherosclerosis*, **3**, 149-156.
25. *Abdalla D. S. P., Costa-Rosa L. F. B. P., Monteiro H. P., et al.* (1994) *Atherosclerosis*, **107**, 157-163.
26. *Sobenin I. A., Petrov V. V., Koshhinsky T. et al.* (1993) *Atherosclerosis*, **100**, 41-54.
27. *Orechov A.N., Tertov V.V., Mukhin D.N., Mikhailenko I.A.* (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **162**, 206-211.
28. *Tertov V.V., Sobenin I. A., Gabbasov Z.A. et al.* (1992) *Lab. Invest.*, **67**, 665-675.
29. *Tertov V.V., Orechov A.N., Sobenin I. A. et al.* (1993) *J. Lipid Res.*, **34**, 365-375.
30. *Lopes-Virella M. F., Virella G.* (1996) *Ann. Med.*, **28**, 347-354.
31. *Mackness M. I., Durrington P. N.* (1995) *Atherosclerosis*, **115**, 243-253.
32. *Moore K. P., Darley-Usmar V., Morrow J., Roberts II L. J.* (1995) *Circ. Res.*, **77**, 335-341.
33. *Tertov V.V., Sobenin I. A., Gabbasov, Z.A. et al.* (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **163**, 489-494.

34. *Tertov V.V., Sobenin I. A., Orechov A.N.* (199) Molecular biology of atherosclerosis. Proc. 57th Europ. Atherosclerosis Soc. Meet./ Ed. M.J.Halpern. John Libbey & Company Ltd. pp.37 - 44.
35. *Tertov V.V., Sobenin I. A., Orechov A.N.* (1996) *Atherosclerosis*, **122**, 191-199.
36. *Witztum J. L.* (1994) *Lancet*, **344**, 793-795.
37. *Steinbrecher U. P., Fisher M., Witztum J. L., Curtis L. K.* (1984) *J. Lipid Res.*, **25**, 1109-1116.
38. *Porter N. A., Caldwell S. F., Mills K. A.* (1995) *Lipids*, **30**, 277-290.
39. *Tertov V.V., Kaplun V.V., Dvoryantsev S.N., Orechov A.N.* (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **214**, 608-613.
40. *Ланкин В.З., Вухерм А.М., Тухазе А.К. и др.* (1989) *Вопр. мед. химии*, №3, 18-24.
41. *Yan L-J., Lodge J. K., Traber M. G. et al.* (1997) *J. Lipid Res.*, **38**, 992-1001.
42. *Chio K. S., Tappel A. L.* (1969) *Biochemistry*, **8**, 2827-2832.
43. *Morel D.W., Hessler J.R., Chisolm G.M.* (1983) *J. Lipid Res.*, **24**, 1070-1076.
44. *Speidel M.T., Booyse F.M., Abrams A. et al.* (1990) *Thromb. Res.*, **58**, 251-257.
45. *Коротаева А.А., Чеглаков И.Б., Морозкин А.Д. и др.* (1996) *Биол. мембраны*, **13**, 484-495.
46. *Проказова Н.В., Звездина Н.Д., Коротаева А.А.* (1998) *Биохимия*, **63**, 31-37.
47. *Nakano T., Raines E.W., Abraham J.A. et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 1069-1073.
48. *Murohara T., Kugiyama K., Ohgushi M. et al.* (1994) *Am. J. Physiol.*, **267**, H2441-H2449.
49. *Eizawa H., Yui Y., Kosuga K. et al.* (1995) *Circulation*, **92**, 3520-3526.
50. *Korotaeva A.A., Cheglakov I.V., Prokazova N.V.* (1997) *Platelets*, **8**, 43-51.
51. *Wilkins G. M., Leake D. S.* (1994) *Biochim. Biophys. Acta*, **1215**, 250-258.
52. *Jones B. G., Rose F. A., Tudball N.* (1994) *Atherosclerosis* **105**, 165-170.
53. *Heinecke J. W., Rosen H., Suzuki L. A., Chait A.* (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 10098-10103.
54. *Katsura M., Forster L. A., Ferns G. A. A., Anggard E.E.* (1994) *Biochem. Biophys. Acta*, **1213**, 231-237.
55. *Белова Л.А.* (1997) *Биохимия*, **62**, 563-570.
56. *Smith L. L.* (1996) *Lipids*, **31**, 453-487.
57. *Lynch S. M., Frei B.* (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 5158-5163.
58. *Ehrenwald E., Chisolm G. M., Fox P.L.* (1994) *J. Clin. Invest.*, **93**, 1493-1501.
59. *Polacek D., Byrne R. E., Fless G. M., Scanu A. M.* (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 2057-2063.
60. *Piha M., Lindstedt L., Kovanen P. T.* (1995) *Biochemistry*, **34**, 10120-10129.
61. *Paananen K., Saarinen J., Annala A., Kovanen P. T.* (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 12257-12262.
62. *Paananen K., Kovanen P. T.* (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 2023-2031.
63. *Toborec M., Kopieczna-Grzebieniak E., Drozd M., Wieczorec M.* (1995) *Atherosclerosis*, **115**, 217-224.
64. *Rouis M., Nigon F., Lafuma Ch. et al.* (1990) *Arteriosclerosis*, **10**, 246-255.
65. *Landi A., Bihari-Varga M., Keller L. et al.* (1992) *Atherosclerosis*, **93**, 17-23.

66. *Amaro A., Gude F., Gonzalez-Juanatey J. R. et al.* (1995) *J. Cardiovasc. Risk.*, **2**, 149-153.
67. *Byrne R. E., Polacek B., Gordon J. I., Scam A. M.* (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 14537-14543.
68. *Edelstein C., Italia J. A., Klezovitch O., Scam A. M.* (1996) *J. Lipid Res.*, **37**, 1786-1801.

Поступила 15.10.98.

MODIFICATION OF LIPOPROTEINS. PHYSIOLOGICAL AND PATHOGENETICAL ROLE OF MODIFIED LIPOPROTEINS: A REVIEW

L. A. BELOVA, O. G. OGLOBLINA, A. A. BELOV, V. V. KUKCHARCHUK.

Russian Cardiology Research Complex, 3-ya Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow
121552 Russia. FAX: (7-095) 415-29-62.

The review is devoted to modification of lipoproteins (Lp) connected with various biological processes. Possible mechanisms of Lp oxidation and the nature of oxidants involved in to these processes are considered. Specific attention is paid to the participation of proteolytic enzymes in modification of Lp.

Key Words: lipoproteins, modification, proteolysis, oxidation, atherogenesis.