

УДК 612.015 (088.8)

©Коллектив авторов

**ПЕПТИДНЫЙ АНАЛОГ АПОЛИПОПРОТЕИНА Е УСИЛИВАЕТ
КЛИРЕНС ЛИПОПРОТЕИНОВ И СНИЖАЕТ УРОВЕНЬ
СЫВОРОТОЧНОГО ХОЛЕСТЕРИНА.**

П.Г. ЛОХОВ, О.М. ИПАТОВА, В.Н. ПРОЗОРОВСКИЙ.

Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН.
119832, Москва, ул. Погодинская, д.10. факс (095)2450857

Известно, что аполипопротеин Е обеспечивает рецепторный захват липопротеинов через апо В,Е и апо Е (печеночный ремнантный) рецепторы. В данной работе показано, что пептид, соответствующий своей аминокислотной последовательностью 139-158 участку аполипопротеина Е, способен усиливать поглощение фосфолипидных мицелл гепатоцитами. Липофильность пептида была увеличена ацилированием его по N-концу эфиром пальмитиновой кислоты. Ацилированный пептид усиливал клиренс липопротеинов и снижал уровень холестерина в крови. После внутривенной инъекции пептида крысам отмечено снижение в сыворотке крови общего холестерина, холестерина липопротеинов высокой плотности и аполипопротеина В.

Ключевые слова: пептидный аналог, аполипопротеин Е, холестерин, липопротеины, атеросклероз.

ВВЕДЕНИЕ. Повышенный уровень холестерина, входящего в липопротеины низкой плотности (ЛПНП), ответственен за атеросклероза [1]. Снижение уровня липопротеинов (ЛП) этого класса в крови является одним из способов лечения данной патологии. В организме ЛПНП, как содержащие в основном аполипопротеин В (апо В), удаляются через апо В,Е рецепторы печени и периферических клеток. Наличие аполипопротеина Е (апо Е) в этих частицах существенно влияет на их сродство к апо В,Е рецептору, которое снижается в порядке: апо В:Е, апо В, апо В:Е:С, апо В:С [2]. Также известно, что ЛПНП образуются из ремнантов мелких липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП), которые в отличие от крупных ЛПОНП содержат мало апо Е и, вследствие более длительной циркуляции в крови, в процессе липолитической деградации превращаются в ЛПНП [3]. Обогащение ремнантных частиц ЛПОНП

апо Е приводит к увеличению их клиренса из плазмы крови [4,5]. Следует отметить, что внутривенное введение апо Е приводит к падению холестерина сыворотки у гиперлипидемических кроликов [6,7]. Суммируя эти данные можно заключить, что снижение плазменного пула ЛПНП можно достичь насыщением ЛПНП и ЛПОНП лигандом, способным, подобно апо Е, взаимодействовать с апо В,Е и апо Е рецепторами, что должно привести к более эффективному высокоаффинному рецепторному захвату ЛПНП и снижению их образования из ЛПОНП.

Ранее мы показали, что амфипатный пептид, соответствующий 139-158 аминокислотным остаткам человеческого апо Е (Ser-His-Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Arg-Asp-Ala-Asp-Asp-Leu-Gln-Lys-Arg), взятый из участка, ответственного за взаимодействие с рецептором (140-160 [8]) и для увеличения липофильности ацилированный по N-концу эфиром пальмитиновой кислоты, способен встраиваться в липидный слой липосом и через взаимодействие с апо-В,Е рецепторами вызывать эндоцитоз липосом клетками феохромоцитомы крысы PC12 [9]. Преинкубация клеток с ЛПНП (>95% апо В) ингибировала действие пептида (не опубликованные данные), что подтвердило участие во взаимодействии именно апо В,Е рецептора.

В данной работе рассматривается способность вышеуказанного пептида усиливать поглощение липидных частиц (мицелл с диаметром близким к диаметру ЛПОНП) культурой гепатоцитов, а также его способность влиять на уровень ЛП и холестерин крови крысы. В опыте оценивалось падение уровня апо В, общего холестерина и холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) в сыворотке крови крысы после однократной внутривенной инъекции пептида.

МЕТОДИКА. Синтез, анализ, ацилирование и очистка пептида. Пептид синтезировали твердофазным методом Меррифилда [10,11] с использованием Fmoc-защищенных аминокислот [12] (NovaBiochem, Швейцария) на автоматическом пептидном синтезаторе Peptide Synthesizer 431A (Applied Biosystems, США), используя N-гидроксibenзотриазол/карбодиимидный метод активации аминокислот [13]. Процесс синтеза контролировали тестом Кайзера [14].

Чистоту синтезированного пептида оценивали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ; хроматограф Beckman, США) на аналитической колонке Ultrasphere - I.P., 5 мкм, 4,6 мм IDx 15 см (Altex, США) при 206 нм. Образец пептида очищенный методом ВЭЖХ на колонке Ultropac Column TSK ODS - 120T, 5 мкм, 4,6 x 250 мм (LKB, Швеция) анализировали на белковом секвенаторе Protein Sequencing System (MilliGen/Biosearch, США) методом последовательной пептидной деградации по Эдману.

Пептид до снятия его с твердой фазы и депротекции боковых радикалов аминокислотных остатков ацилировали по N-концу эфиром пальмитиновой кислоты (Sigma, США) с использованием N-гидроксibenзотриазол/карбодиимидного [13] метода активации карбоксильной группы. Процесс ацилирования контролировали тестом Кайзера [14].

Чистоту ацилированного пептида оценивали методом ВЭЖХ как описано выше для пептида. Ацилированный пептид (далее просто пептид) очищали методом ВЭЖХ (Altex Model 324, США) на колонке Ultrasphere - ODS, 5 мкм, 10 x 250 мм (Altex, США) в градиенте изопропанола от 30 до 100% в течение 1

часа. Элюенты удаляли последовательной обработкой на роторном испарителе и лиофилизацией. Очищенный пептид подвергали гидролизу в вакуумированной ампуле 24 часа 6N HCl при 110°C. Содержание аминокислот определяли на том же хроматографе на колонке Ultrasphere - I.P., 5 мкм, 4,6 x 150 мм (Altex, США) с предколоночной модификацией гидролизата фенилизотиоцианатом [15].

Приготовление мицелл. Для получения мицелл препарат Имливхол (Natterman, Германия, состав: фосфотидилхолин 500 мг (3,2% лизофосфатидилхолина), тринатриевая соль глицеризиновой кислоты 200 мг, мальтоза 1800 мг; препарат даёт фосфолипидные мицеллы средним диаметром 65,6 нм и фактором полидисперсности 0,44) растворяли в 9 мл раствора (Natterman, Германия, состав: трометамол 157,5 мг, соляная кислота 115,5 мг, вода для инъекций до 9 мл). К полученным мицеллам постепенно, с перемешиванием, добавляли насыщенный спиртовой раствор перена (Serva, Германия) до конечного мольного соотношения 40/1 (фосфолипид/перен). Мицеллы трижды по 12 часов диализовали против раствора Хенкса (ПанЭко, Россия), после чего постепенно, с перемешиванием, добавляли пептид до конечного соотношения 5 мг пептида на 1 мл раствора мицелл.

Получение суспензии гепатоцитов. Для получения гепатоцитов [16,17], новорожденных крыс декапитировали, в асептических условиях извлекали печень, измельчали ножницами и инкубировали в течении 45 мин при 37°C в буфере А. Печеночную ткань промывали буфером В для отделения клеток от ткани. Материал диспергировали и прогоняли через фильтр 200 микрон. Суспензию клеток центрифугировали 2 мин при 50g для получения фракции гепатоцитов. Полученную фракцию промывали 2 раза буфером В и ресуспендировали в разбавленном 2 объемами забуференного Перкола, центрифугировали 5 мин при 1500g (для сепарации живых гепатоцитов от мертвых). Живые гепатоциты промывали раствором Хенкса и ресуспендировали в культуральной среде. Полученные в опытах результаты пересчитывали на количество входящего в гепатоциты белка, измеренного методом Лоури [18].

Состав 10-кратно концентрированного буфера: 1,4 M NaCl, 50 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 16 mM Na₂HPO₄, и 4 mM KH₂PO₄ (Merck, Германия). Для приготовления буфера А и В перед опытом 100 мл 10-кратно концентрированного буфера разводили до 1 л дистиллированной и деионизированной водой и добавляли 25 mM NaHCO₃ и 2 mM ЭДТА (буфер А), или 1 mM CaCl₂ (буфер В). Для получения забуференного Перкола разводили 87 мл Перкола (Sigma, США) до 100 мл 10-кратно концентрированным буфером. Культуральную среду [19] готовили на среде 199, забуференной 10 mM Хепесом, с добавлением 200 ед/мл пенициллина, 5% эмбриональной телячьей сыворотки и 2 mM глутамина (Панэко, Россия). Полученные буфера и культуральную среду стерилизовали фильтрацией через стерильный фильтр с порами 0,22 мкм (Millipore, США).

Взаимодействие мицелл с гепатоцитами. Для исследования связывания мицелл с гепатоцитами к 200 мкл суспензии гепатоцитов добавляли 150 мкл раствора мицелл (в опыте - мицеллы с пептидом, в контроле - мицеллы без пептида) и 150 мкл раствора Хенкса. Инкубацию проводили 1 час при 4°C (данные условия исключают эндоцитоз мицелл). По окончании инкубации гепатоциты промывали 4 раза ледяным раствором Хенкса и часть клеток

лизировали 1% раствором Тритона X-100 (Bio-Rad, США). Другую часть ресуспензировали в культуральной среде и инкубировали 4 часа при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. После инкубации клетки трижды промывали раствором Хенкса содержащим 4 М мочевины (Serva, Германия), после чего клетки лизировали. Лизаты клеток флуориметрировали при длине волны возбуждения 330 нм и длине волны эмиссии 400 нм на спектрофлуориметре Luminescence Spectrometer LS 50B (Perkin-Elmer, Англия).

Животные. Использовали нелинейных белых крыс самцов весом 130-150 грамм находящихся на стандартной диете. Опыты проводили на 12-16 часы после последнего приема пищи. В каждой опытной группе было 4 животных.

Для получения суспензии более жизнеспособных и морфологически сохранных гепатоцитов использовали новорожденных нелинейных крыс на 3 дне после рождения [20].

Действие пептида на общий холестерин, холестерин ЛПВП и апо В сыворотки. Пептид в дозе 50 мг/кг вводили в хвостовую вену крысы. На четвертый час после инъекции крыс декапитировали, собирали кровь и после центрифугирования получали сыворотку, в которой измеряли общий холестерин, холестерин ЛПВП и апо В.

Общий холестерин измеряли с реагентом Monotest Cholesterol, High performance (Boehringer Mannheim, Германия) [21-23]. К 2 мкл сыворотки добавляли 200 мкл реагента и инкубировали 5 минут при 37°C. Измерения проводили на приборе Multiskan PLUS (Labsystems, Финляндия) при 500 нм. Количество холестерина определяли по калибровочному графику построенному с использованием стандартного раствора холестерина Precimat Cholesterol, High performance (Boehringer Mannheim, Германия).

Измерение холестерина ЛПВП производили после выпадения ЛПНП и ЛПОНП из сыворотки при нарушении коллоидного равновесия входящих в них белков [24]. К 250 мкл сыворотки добавляли 10 мкл 1М раствора MnCl₂ (Analar, Англия) и 10 мкл гепарина 5000 ед/мл (Sigma, USA), и инкубировали 30 минут при 4°C. Затем сыворотку центрифугировали 30 мин при 2500 об/мин и 4-6°C. В супернатанте измеряли холестерин ЛПВП реагентом Monotest Cholesterol, High performance, как описано выше.

Апо В измеряли иммунотурбидиметрическим методом [25]. К 10 мкл сыворотки добавляли 50 мкл антисыворотки (антисыворотка козы к апо В человека, Calbiochem, Швейцария), 200 мкл буфера (Трис-буфер 50 ммоль/л, pH 8,0) и инкубировали 2 часа при 37°C. Количество апо В измеряли по поглощению при 500 нм на приборе Multiskan PLUS.

Все представленные результаты являются средним значением \pm станд. отклон. из 4 независимых опытов. Статистическую обработку проводили с использованием критерия t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Чистота синтезированного пептида (метод ВЭЖХ) и аминокислотный состав (метод последовательной пептидной деградации) приведены в таблице 1. Ацилирование пептида привело к возрастанию его липофильности и увеличению времени задержки выхода при обратнофазовой гидрофобной хроматографии (рис.1). Аминокислотный анализ нового пика на профиле элюции подтвердил соответствие его синтезированному пептиду (табл. 1).

Таблица 1. Характеристика синтезированного пептида и его ацилированной формы.

	чистота (%)	аминокислотный состав (% выхода)							
		Ser	His	Leu	Arg	Lys	Asp	Ala	Gln
пептид	96	95	96	98-106 ¹	93-107	96-99	(-) ²	100	104
цилирпептид	96	94	93	110 ³	93	91	101	95	94

Примечание. (1) - указан диапазон % выхода для повторяющихся в пептиде аминокислот (Leu, Arg, Lys); (2) - выход Asp при секвенировании пептида не определяли из-за наличия свободной карбоксильной группы у бокового радикала способной связываться с носителем пептида; (3) - указан средний % выхода приходящийся на одну аминокислоту для повторяющихся в пептиде аминокислот.

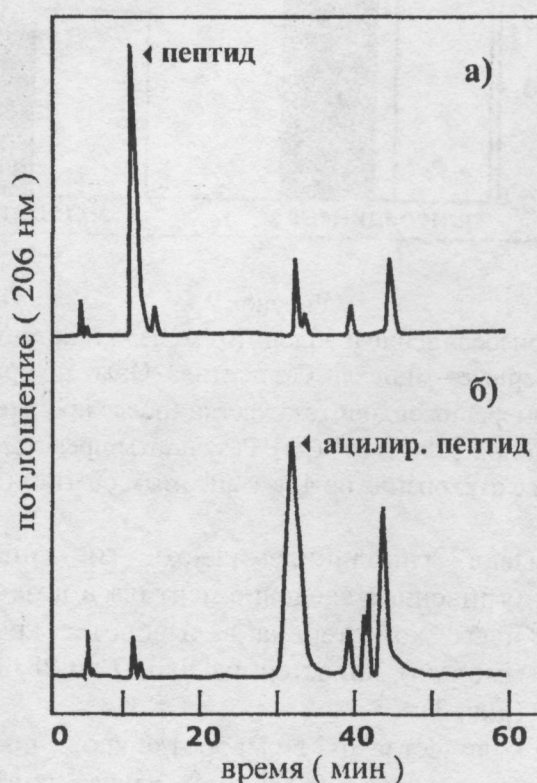


Рисунок 1.

Профили элюции обратнофазовой гидрофобной ВЭЖХ синтезированного пептида до (а) и после (б) ацилирования эфиром пальмитиновой кислоты. Градиент изопропанола 30 - 100% за 60 минут на колонке C₁₈.

Действие пептида приводит к усилению связывания фосфолипидных мицелл гепатоцитами. Количество связавшихся в опыте мицелл посредством действия пептида составляет 120 мкг/мг (фосфолипидов мицелл/мг белка гепатоцитов) (рис.2). Преобладание количества поглощенных гепатоцитами фосфолипидов в опыте над контролем (рис.2) указывает на наличие опосредованного пептидом эндоцитоза мицелл.

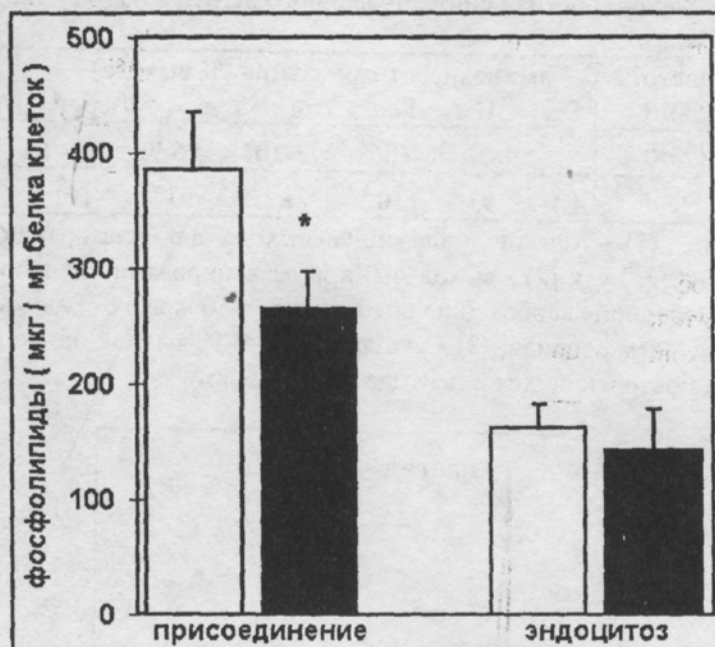


Рисунок 2

Действие пептида на присоединение и эндоцитоз мицелл гепатоцитами. Белые столбцы - мицеллы с пептидом, черные - мицеллы без пептида. Опыт по присоединению проходил 1 час при 4°C. Для измерения эндоцитоза клетки (после промывания) дополнительно инкубировали 4 часа при 37°C и 5% CO₂. Результаты представлены как среднее \pm стандартное отклонение по 4 независимым опытам (* $p < 0,05$).

Пептид оказывал гиполипидемическое и гипохолестеринемическое действия на крыс. Внутривенное введение пептида в дозе 50 мг/кг через четыре часа дает падение общего холестерина в сыворотке крови крысы до $56 \pm 7\%$ (с 1,3 ммоль/л до 0,7 ммоль/л), холестерина ЛПВП до $28 \pm 10\%$, апо В до $85 \pm 11\%$ от исходного уровня (рис. 3).

Для снижения количества ЛП в сыворотке крови посредством увеличения их рецепторного захвата, лиганд (в данном случае синтезированный пептид) должен обладать следующими свойствами:

- встраиваться в липидную поверхность ЛП;
- взаимодействовать с ЛП рецепторами;
- сохранять свои способности *in vivo*.

Предположение, что синтезированный пептид способен встраиваться в липидную поверхность и взаимодействовать с апо В,Е (и апо Е) рецепторами, было основано на способности амфипатного участка апо Е, из которого взята последовательность пептида, принимать при взаимодействии с липидной поверхностью конформацию альфа спирали и взаимодействовать с апо-В,Е рецепторами фибробластов[26]. Способность пептида усиливать связывание и поглощение липосом клетками РС12 [9], а также нивелирование его действия при предварительной инкубации клеток с ЛПНП (неопубл. данные) подтвердило данное предположение.

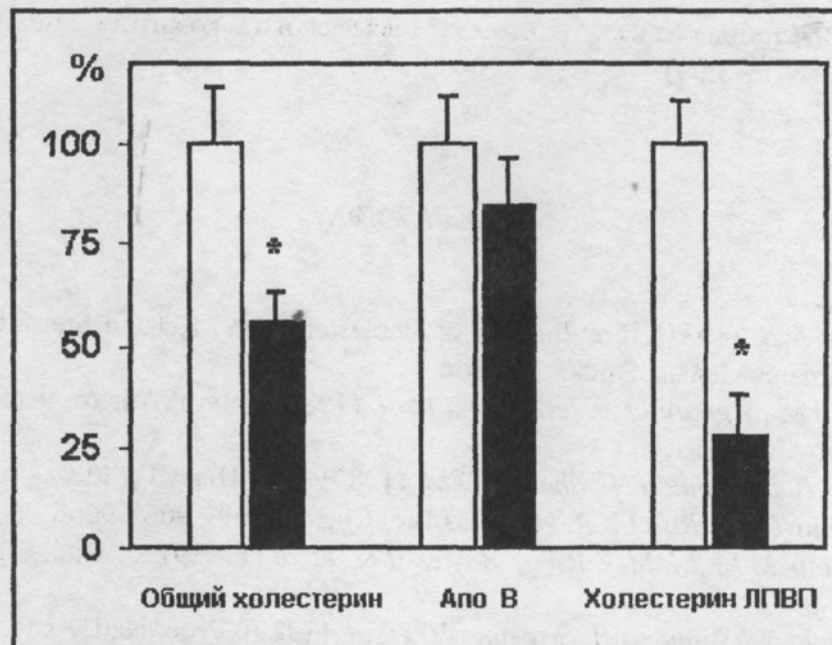


Рисунок 3.

Действие пептида на общий холестерин, холестерин ЛПВП и апо В сыворотки крови крысы. Измерения проводили на интактных животных (белые столбцы) и животных на 4 час после внутривенного введения пептида дозой 50 мг/кг (черные столбцы). Результаты представлены в процентах как среднее \pm стандартное отклонение по 4 крысам. За 100 % взяты результаты по интактным животным (* - статистическая достоверность отличий $p < 0,001$).

В организме апо Е содержащие ЛПП поглощаются преимущественно печеночной тканью, т.к. гепатоциты имеют высокую экспрессию как апо В,Е, так и апо Е рецепторов. Опыт на клетках показал способность пептида связывать имитирующие ЛПП мицеллы с гепатоцитами, что ведет к последующему эндоцитозу мицелл.

Внутривенное введение пептида крысам показало, что пептид сохраняет свои способности в организме, при действии на него сывороточных пептидаз и конкуренции за рецепторы со стороны нативных апо В и Е. Снижение на 15% апо В в сыворотке крови указывает на усиление поглощения атерогенных ЛПП (ЛПНП). Более выраженное падение общего холестерина (на 44%) связано с падением холестерина ЛПВП, который составляет основную часть холестерина крови крысы [27]. Таким образом однократная инъекция пептида приводит к снижению в сыворотке крови уровня ЛПП разных плотностей, что, вероятно, обусловлено неспецифичностью взаимодействия пептида с ЛПП. Другими словами, действие пептида на ЛПП той или иной плотности коррелирует с их общей поверхностью доступной для взаимодействия с пептидом.

Снижение холестерина сыворотки крови посредством усиленного поглощения ЛПП вызванного рассмотренным пептидом, может иметь терапевтическое применение при лечении атеросклероза. Оказывая преимущественно влияние на избыточно представленные фракции ЛПП, пептид и может, вероятно, оказывать корректирующее действие при гиперлипидемиях.

Работа поддержана грантом Московского комитета по науке и технологиям (N 15-Зд/9).

ЛИТЕРАТУРА.

1. *Myant N.B.* (1981). The Biology of Cholesterol and Related Steroids. William Heinemann Medical Books, London.
2. *Bard J.M., Agnani G., Cardelin L., et al.* (1989). Intern. Atheroscler. Congress. Viena, Abstr.20.
3. *Havel R.J., Yamada N., Shames D.M.* (1987). Am. Heart J., **113**, 470-474.
4. *Arbeeny C.M., Rifici V.A.* (1984). J.Biol.Chem., **259**, 9662-9666.
5. *Hussain M.M., Mahley R.W., Boyles J.K. et al.* (1989). J. Biol. Chem., **264**, 9571-9582.
6. *Yamada N., Shimano H., Mokuno H. et al.* (1989). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 665-669.
7. *Mahley R.w., Weisgraber K. H., Hussain M. M. et al.* (1989). J. Clin. Invest., **83**, 2125-2130.
8. *Wilson C., Wardell M. R., Weisgraber K. H. et al.* (1991). Science, **252**, 1817-1822.
9. *Лохов П.Г., Инатова О.М., Абакумова О.Ю.* (1999). Вопр. мед. химии, **45**, 136-139.
10. *Barany G. and Merrifield R. B.* (1980). The Peptides. Analysis, Synthesis, Biology (Gross E. and Meienhofer J. ed.), Academic Press, New York, **2**, pp.1-284.
11. *Stewart J. M. and Young J.D.* (1984). Solid-phase Peptide synthesis, Second Edition, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois.
12. *Caprino L.A. and Hang G.Y.* (1972), J. Org. Chem., **37**, 3404-3409.
13. *Konig W. and Geiger R.* (1970). Chem. Ber., **103**, 788-798.
14. *Kaiser E., Colescott R. L., Bossinger C. D., Cook P. I.* (1970). Anal. Biochem., **34**, 595-598.
15. *Heinrikson R. L., Meredith S. C.* (1984). Anal. Biochem., **136**, 65-74.
16. *Meredith M.J.* (1988). Cell Biol. Toxicol., **4**, 405-425.
17. *Wang S.R., Renaud G., Infante J. et al.* (1985). In Vitro Cell Dev. Biol., **21**, 526-530.
18. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A. L., Randall R.J.* (1951). J. Biol. Chem., **193**, 265-275.
19. *Гончаренко Т.М., Никулина С.Е., Крылова О.Ю. и др.* (1989). Вопр. мед. химии, **35**, 51-5.
20. *Marceau N., Noel M., Deschees J.* (1982). In vitro Cell Dev. Biol., **18**, 1-11.
21. *Siedel J. et al.* (1983). Clin. Chem., **29**, 1075.
22. *Kattermann R. et al.* (1984). Clin. Chem. Clin. Biochem., **22**, 245.
23. *Trinder P.* (1969). Ann. Clin. Biochem., **6**, 24.
24. *Тумов В.Н., Бренер Е.Д., Задоя А.А. и др.* (1979). Лаб. дело, N1, 36-41.
25. *Fruchart J.-C.* (1986). Ann. Biol. Clin., **44**, 116.

26. *Mims M.P., Darmule A.T., Tovar R.W. et. al.* (1994). *J. Biol. Chem.*, **269**, 20539-20547.
27. *Ловягина Т.Н., Баньковская Э.Б.* (1970). *Журнал эволюционной биохимии*, **5**, 255-261.

Поступила 4.12.2000.

**AN APOLIPOPROTEIN E PEPTIDE ANALOG MEDIATES ACUTE CLEARANCE
OF THE LIPOPROTEINS AND DECREASES
THE SERUM CHOLESTEROL LEVEL.**

P.G. LOKHOV, O.M. IPATOVA, V.N. PROZOROVSKII.

Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry RAMS.
119832, Moscow, Pogodinskaya st. 10.
fax (095)2450857

Apolipoprotein E mediates lipoprotein binding to the low density lipoprotein (LDL) receptor and to the LDL receptor-related protein. Apolipoprotein E 139-158 peptide increases micellar binding and endocytosis by hepatocytes. The lipophilicity of the peptide was increased by modification of its N-terminus by acylation with palmitic acid ether. The peptide mediates acute clearance of the lipoproteins and decreases the cholesterol level in rat blood. Total cholesterol level, high density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B were measured in the serum after intravenous administration of the acylated peptide.

Key words: peptide analog, apolipoprotein E, cholesterol, lipoprotein, arteriosclerosis.