

УДК 616-018:576.34  
© Коллектив авторов

## **ПРИМЕНЕНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ И АНТИГИПОКСАНТОВ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ОКИСЛЕНИЯ ЛНП ПОД ВЛИЯНИЕМ МАКРОФАГОВ И ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ ИШЕМИИ И РЕПЕРFUЗИИ СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ.**

*М.В. Биленко, А.В. Хильченко, С.А. Павлова.*

ГУ НИИ биомедицинской химии РАМН им. В.Н. Ореховича,  
Погодинская ул. 10, 119121 Москва, Россия, факс (7)-(095)-245-08-57

Хорошо известно, что окисленные ЛНП являются ключевым фактором возникновения атеросклероза. В работе изучена интенсивность окислительной модификации ЛНП под влиянием культуры эндотелиальных клеток (ЭК) пупочной вены плода человека и культуры макрофагов (МФ) человека, а также способность антиоксидантов (АО) - К-фенозана, пробуккола и десферала, и антигипоксантов (АГ) - янтарной кислоты, гипоксена и дельтарана, ингибировать окислительную модификацию ЛНП крови человека. Способность АО ингибировать окисление ЛНП снижается в ряду: десферал > пробуккол > К-фенозан, а АГ в ряду: дельтаран >> янтарная кислота (только в дозе 40 мкг/мл) >> гипоксен (нет эффекта). Способность АО защищать МФ и ЭК от потери жизнеспособности в процессе их инкубации совместно с окисленными ЛНП в условиях ишемии соответствует их антиоксидантным свойствам; защитный эффект АГ на МФ снижается в ряду: янтарная кислота > гипоксен > дельтаран. Добавление макрофагов к ЭК+ЛНП, и совместное инкубирование их в аэробных условиях и при ишемии не оказывает существенного влияния на величину ЭФП, содержание ТБК-РП и жизнеспособность ЭК; добавление МФ к 24 ч ишемизированным ЭК + ЛНП в раннем реперфузионном периоде снижает величину ЭФП, что, по-видимому, связано с избирательным потреблением макрофагами ЛНП, окислительно модифицированных в процессе длительной инкубации с ЭК.

**Ключевые слова:** окислительный стресс, эндотелиальные клетки, макрофаги, ЛНП, антиоксиданты, антигипоксанты.

**ВВЕДЕНИЕ.** Липопротеины низкой плотности (ЛНП) являются основными липопротеинами плазмы крови, переносящими холестерин в крови и участвующими в образовании атеросклеротических бляшек в стенке сосудов. Особую роль в этом играют окислительно модифицированные ЛНП, в которых в процессе окисления меняется структура апо-В белка, что ведет к нерегулируемому захвату их скэвэнжер-рецепторами моноцитов/макрофагов, трансформирующихся затем в пенистые клетки, с распадом последних и освобождением холестерина, что способствует липидной инфильтрации стенки сосуда [1-3].

Ранее нами было показано, что во внутрисосудистом окислении ЛНП активная роль принадлежит эндотелиальным клеткам (ЭК) [4,5] и фагоцитирующим клеткам крови [6,7], причем, инкубация ЭК и макрофагов (МФ) в условиях ишемии усиливает их способность окислительно модифицировать ЛНП [4,6,8]. Ишемия/реперфузия сосудистой стенки возникает при гипертензии, стрессе, локальном спазме [9], что приближает нас к пониманию механизма

патогенеза атеросклероза как в аэробных условиях, так и в условиях временной ишемии и реперфузии, а также делает крайне актуальным поиск специфических средств его профилактики и лечения. Поскольку окислительная модификация ЛНП носит свободно радикальный характер, оптимальными препаратами для профилактики окислительной модификации ЛНП являются антиоксиданты (АО), хотя антигипоксанты (АГ) также могут обладать сходным или, наоборот, противоположно направленным эффектами.

В литературе имеется множество работ, посвященных исследованию способности природных и синтетических АО предотвращать окисление ЛНП в процессе их диализа [10], при окислении ЛНП *in vitro* под влиянием системы гемин+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> или Cu<sup>2+</sup> [11-14], при клеточно-опосредованном окислении [12,15-17]. В последние годы наиболее пристальному изучению подвергаются препараты фенольного ряда и среди них в наибольшей степени пробукол. Способность пробукола не только снижать уровень холестерина в крови, но и быть активным АО [18, 19], его высокая липофильность и сравнительно низкая токсичность способствовали его широкому применению не только в эксперименте *in vivo* и *in vitro* [15,19-21], но и в клинике [22,23]. В то же время пробукол, в отличие от других антиоксидантов (аскорбиновой кислоты,  $\alpha$ -токоферола и др.), не защищает ЛНП от снижения в них в процессе окисления липофильных антиоксидантов ( $\alpha$ - и  $\gamma$ -токоферола,  $\beta$ -каротина) [17], играющих существенную роль в защите ЛНП от окисления [24, 25].

В нашей предварительной работе был показан защитный эффект пробукола при окислении ЛНП, вызванном ЭК и МФ, с оценкой окисления ЛНП по содержанию гидроперекисей (ГП) и величине ЭФП [26]. Однако изучение защитного действия пробукола на окисление ЛНП, оцененное по содержанию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП), величине ЭФП и числу жизнеспособных МФ, а также сравнение защитного эффекта пробукола с другими АО: однофенольным АО - К-фенозаном и хелатором железа - десфералом, или препаратами АГ действия: янтарной кислотой (ЯК), гипоксеном (Г) и дельтараном (Д), ранее проведено не было и подобные работы в литературе отсутствуют.

Работа выполнена на разработанных нами тест-системах, состоящих из конфлюэнтной культуры ЭК и культуры МФ, а также комбинированной тест-системы, состоящей из ЭК + МФ. Тест-системы были использованы как в аэробных условиях, так и в условиях ишемии и ишемии/реперфузии; *in vivo* являются оригинальными, чувствительными и легко воспроизводимыми экспериментальными моделями и позволяют проводить скрининг и сравнительное исследование различных антирадикальных, антиоксидантных, противоишемических и антигипоксантных препаратов, так же как и других препаратов, повреждающих или защищающих сосуды от различных неблагоприятных воздействий [27].

**МЕТОДИКА.** Выделение липопротеинов низкой плотности (ЛНП,  $d = 1,019 - 1,065$  г/см<sup>3</sup>) проводили из плазмы крови здоровых доноров методом препаративного ультрацентрифугирования в присутствии NaBr и 0,01% ЭДТА ("Sigma", США) [28,29]. Перед опытом ЛНП диализовали в течение 18 ч при +4°C против 6000 объемов 10 mM фосфатного буфера (pH 7,4), без добавления ЭДТА и антиоксидантов. Белок определяли методом Лоури. ЛНП использовали в концентрации 200 мкг белка/мл среды.

Культуру эндотелиальных клеток человека получали из вены пупочного канатика плода человека с помощью 0,1% коллагеназы ("Sigma") и инкубировали в при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе ("Assab", Швеция) - в ростовой среде, приготовленной на основе среды RPMI-1640 (Flow, США) с добавлением 1 mM Na-бикарбоната, 2 mM L-глутамина, 1 mM Na пирувата ("Sigma"), 300 ед/мл гентомицина, 10 % сыворотки теленка (ИЭИ РАМН им. Н.Ф.Гамалеи), NERES и фактора роста ЭК, в течение 7 дней в чашках Петри и затем, после пересева в 24-х луночные планшеты ("Costar", Нидерланды), еще дважды по 7 дней до состояния конфлюэнтности во втором пересеве.

## ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ И АНТИГИПОКСАНТОВ НА ОКИСЛЕНИЕ ЛНП

Культуру макрофагов получали путем выделения макрофагов из крови локтевой вены здорового донора, натошак. Кровь в присутствии Ficoll Pague центрифугировали 20 мин при 400 g, дважды отмывали PBS и инкубировали в чашках Петри в ростовой среде в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при  $37^\circ\text{C}$  в течение 18 часов.

Инкубацию ЛНП с эндотелиальными клетками и/или макрофагами проводили в без белковой субстрат-дефицитной (инкубационной) среде (RPMI-1640 + Na-бикарбонат + NEPS, при отсутствии дополнительных субстратов, фактора роста ЭК и эмбриональной сыворотки теленка) в аэробных (воздух 95% +  $\text{CO}_2$  5%), ишемических ( $\text{N}_2$  95% +  $\text{CO}_2$  5%) [30] или реперфузионных условиях (перенос чашек с клетками из условий ишемии в аэробные условия).

Окислительную модификацию ЛНП оценивали по содержанию продуктов ПОЛ: диеновых конъюгатов (ДК) и (ТБК-РП), а также по величине ЭФП. Содержание ТБК-РП определяли модифицированным для ЛНП методом на спектрофотометре Beckman DU-7 [31] с добавлением в пробы 0,4 мМ ионола (ВНТ). Оптическую плотность рассчитывали в максимуме поглощения (532 нм), ТБК-РП выражали через эквивалентное количество MDA, используя коэффициент молярной экстинкции, равный  $156000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ . Содержание ДК определяли спектрофотометрическим методом по поглощению раствора липидов при 232 нм [32]. Экстракцию липидов проводили в смеси метанол-гексан [33].

Величину ЭФП оценивали по изменениям в отрицательном заряде ЛНП, а именно величине амплитуды движения ЛНП в сторону положительного заряда в 1% агарозном геле, pH 8,4, при комнатной температуре в течение 3 ч. Измерение амплитуды ЭФП проводили, используя программу, разработанную для персонального компьютера.

Цитотоксический эффект ЛНП на культуру ЭК и МФ определяли по количеству клеток, оставшихся прикрепленными ко дну чашек Петри по окончании эксперимента [10].

Статистическую обработку проводили, используя критерий Стьюдента для малых выборок. Данные выражали в виде средней арифметической  $\pm$  ошибки средней.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Влияние АО и АГ на окислительную модификацию ЛНП под влиянием МФ, совместно инкубированных в условиях ишемии.

Совместная инкубация МФ с ЛНП 24 ч в условиях ишемии без добавления АО и АГ (рис.1 и 3, контроли) сопровождалась существенным повышением величины ЭФП, умеренным ростом содержания ТБК-РП и резким снижением числа жизнеспособных МФ ( $p < 0,01$ ).

Применение антиоксиданта К-фенозана достоверно снижало степень окисленности ЛНП по критерию ЭФП лишь в концентрации  $10^{-5} \text{ M}$  ( $p < 0,05$ ) и слабо влияло на увеличение числа жизнеспособных МФ.

Применение пробуккола и десферала было более эффективным, чем К-фенозана, так как достоверно снижало рост ЭФП, уже начиная с концентрации  $10^{-7} \text{ M}$ , повышая при этом число жизнеспособных клеток, начиная с концентрации  $10^{-7} \text{ M}$  (десферал) и  $10^{-6} \text{ M}$  (пробуккол). На содержание ТБК-РП (их снижение) все антиоксиданты (см. рис.1) во всех использованных концентрациях оказывали эффект, имеющий характер лишь выраженной тенденции.

Таким образом, окислительная модификация ЛНП, рост которой был вызван 24 ч совместной инкубацией с МФ в условиях ишемии, снижалась при использовании всех антиоксидантов, несмотря на различные механизмы их действия (рис.2). По началу выраженного антиокислительного эффекта, оцененного по критерию начального достоверного снижения величины ЭФП, использованные антиоксиданты располагались в следующей последовательности: десферал ( $10^{-7} \text{ M}$ )  $\geq$  пробуккол ( $10^{-7} \text{ M}$ )  $>$  К-фенозан ( $10^{-5} \text{ M}$ ). При концентрации  $10^{-5} \text{ M}$  антиокислительный эффект всех антиоксидантов был выражен примерно одинаково и был максимальным. Антиоксиданты повышали также жизнеспособность МФ, снижающуюся после инкубации с ЛНП, причем защитный эффект АО на жизнеспособность МФ имел ту же последовательность, что и их антиоксидантный эффект: десферал ( $10^{-7} \text{ M}$ )  $>$  пробуккол ( $10^{-8} \text{ M}$ )  $>$  К-фенозан ( $10^{-7} \text{ M}$  и более лишь тенденция к росту).

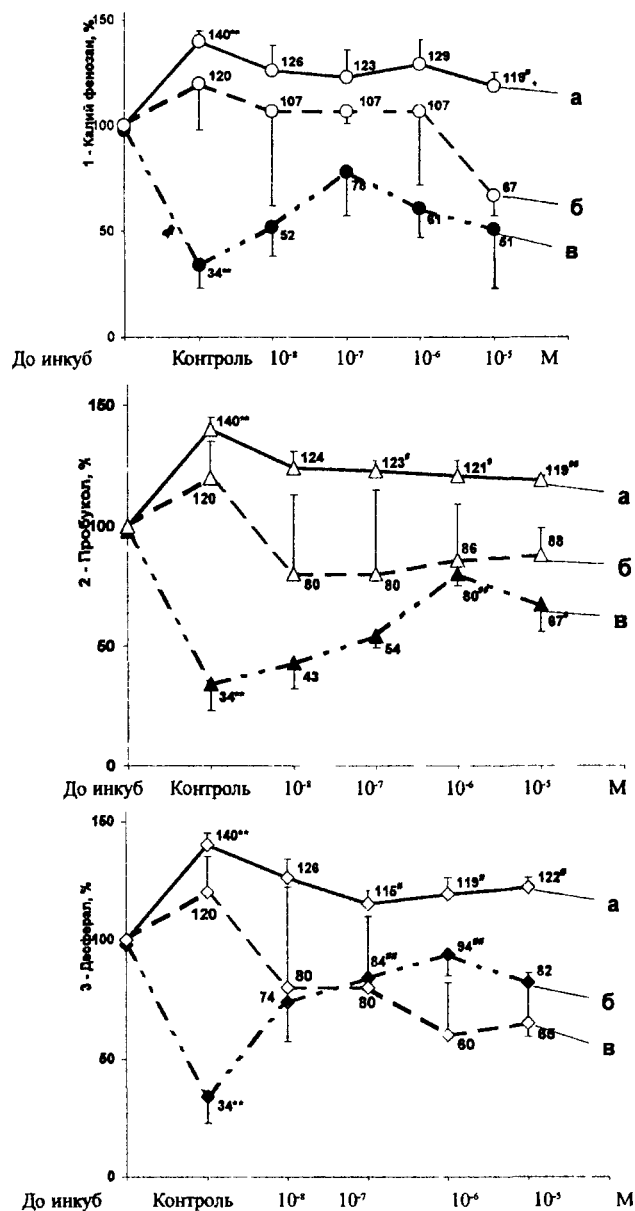


Рисунок 1.

Влияние К-фенозана (1), пробукола (2) и десферала (3) на величину ЭФП ЛНП (а), содержание ТБК-РП (б) и число жизнеспособных МФ (в) после 24ч совместной инкубации в условиях ишемии (% к величине до инкубации). \*\* - достоверность различий с величиной до инкубации: \*\* -  $p < 0,01$  #,## - достоверность различий с контролем: # -  $p < 0,05$ ; ## -  $p < 0,01$ .

Контроль - опыты без АО

Применение антигипоксантов, а именно, янтарной кислоты и гипоксена, в опытах с культурой МФ + ЛНП (см. рис. 3) вызывало рост величины ЭФП (в опытах с янтарной кислотой в дозе 2,5 мкг/мл; в опытах с гипоксеном в дозе 10 мкг/мл), однако существенно не влияло на содержание ТБК-РП, хотя в опытах с гипоксеном имела место выраженная, дозозависимая тенденция к росту величины ЭФП. Максимальная доза янтарной кислоты (40 мкг/мл) вызывала достоверное падение ЭФП по сравнению с контролем. Оба препарата способствовали росту числа жизнеспособных МФ в культуре: в опытах с янтарной кислотой рост был достоверным при всех использованных дозах; в опытах с гипоксеном рост имел

# ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ И АНТИГИПОКСАНТОВ НА ОКИСЛЕНИЕ ЛНП

С 0 0 10 10 10 [М] С 0 0 10 10 10 [М] С 0 0 10 10 10 [М]

К-фенозия (exp 13,1) Пробукот (exp 12,4) Десферат (exp 15,1)

К-фенозия (exp 13,1)

Пробукот (exp 12,4)

Десферат (exp 15,1)

Рисунок 2

Типичные гель-электрофореграммы ЛНП после инкубации ЛНП с МФ и различными дозами антиоксидантов

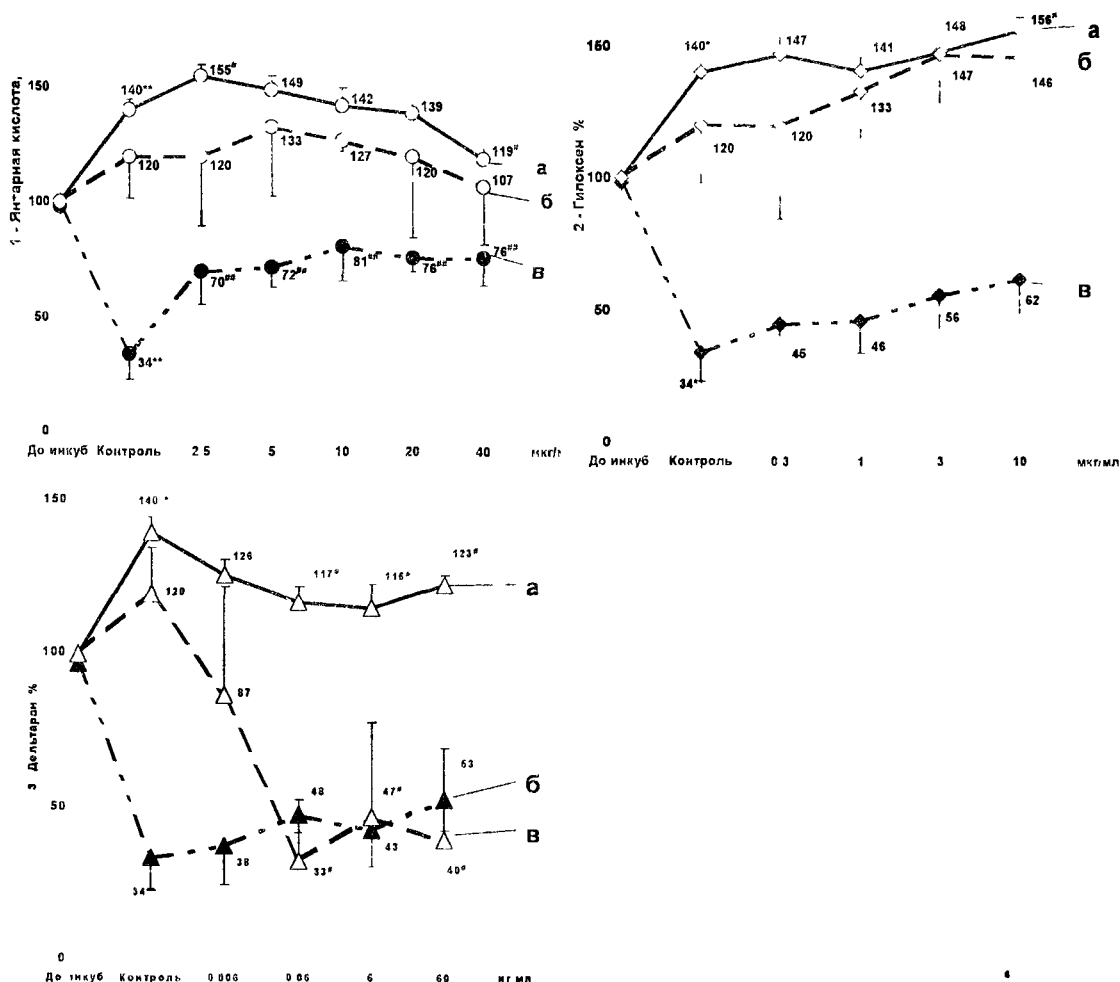


Рисунок 3

Влияние янтарной кислоты (1), глутатона (2) и дельфинидина (3) на величину ЭФН ЛНП (а), содержание ЛКРП (б) и число жизнеспособных МФ (в) после 24ч совместной инкубации в условиях ишемии (% к величине до инкубации) \* - достоверность различий с величиной до инкубации \*# -  $p < 0,01$  ## - достоверность различий с контролем # -  $p < 0,05$ , ### -  $p < 0,01$  Контроль - опыты без ЛГ

характер выраженной тенденции. Из приведенных данных видно, что оба препарата практически не оказывали антиоксидантного эффекта, но оказывали

Таблица. Способность ЭК окислительно модифицировать ЛНП при инкубации в аэробных условиях, условиях ишемии и ишемии + реперфузии с добавлением и без добавления МФ.

Показатели		До инкубации	Условия инкубации		
			Аэробная	Ишемия	Ишемия + 3ч реперфузии
ЭФП (% к до инкубации)	ЭК+ЛНП	(100 ± 3)	(138±3**)	(135 ± 3**)	(150 ± 4**)
	ЭК+ЛНП+МФ		(149±4**)	(149±12*)	(127 ± 6**)
ТБК-РП нмоль/мл, (% к до инкубации)	ЭК+ЛНП	1,79±0,58 (100±32)	1,09±0,13 (61±7)	0,83±0,19 (47±11)	0,96±0,13 (54±7)
	ЭК+ЛНП+МФ		1,35±0,01 (75±1)	0,83±0,38 (47±21)	1,6±0,18* (90±10)
Число жизнеспособных клеток *10 <sup>4</sup> (% к	ЭК+ЛНП	24 ± 6 (100± 25)	20,4 ± 5 (85±6)	12,8 ± 6 (53±6)	11,2 ± 4,3 (47±18)

клеток \*10<sup>4</sup> (% к

Примечание: \*, \*\* - достоверность различий с исходными значениями до инкубации; \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ ; † - достоверность различий между опытами с реперфузией и ишемией († -  $p < 0,05$ ); # - достоверность различий между опытами с ЭК+ ЛНП с МФ и без МФ -  $p < 0,05$ ; число опытов 3-6.

существенное положительное влияние на устойчивость МФ к комбинированному воздействию ишемии и цитотоксическому (ЦТ) эффекту окисленных ЛНП.

Дельтаран, в отличие от янтарной кислоты и гипоксена, начиная с дозы 0,06 нг/мл, оказывал выраженный АО эффект, достоверно снижая величину ЭФП и содержание ТБК-РП, что может быть обусловлено его пептидной природой [34, 35]. Более слабый защитный эффект дельтарана на жизнеспособность МФ, как по сравнению с другими АГ, так и по сравнению с АО, вероятно, обусловлен его высоким ЦТ эффектом.

Таким образом, антиокислительный эффект в опытах с АГ был выявлен лишь у дельтарана и при применении высоких доз янтарной кислоты. По защитному - комбинированному, противоишемическому и антицитотоксическому, эффекту окисленных ЛНП антигипоксанты, учитывая их начальную эффективную дозу, располагались в следующей последовательности: янтарная кислота (2,5 мкг/мл) > гипоксен (лишь тенденция при всех дозах) > дельтаран (слабая тенденция при всех использованных, но более низких дозах).

*Влияние АО на окислительную модификацию ЛНП под влиянием ЭК и ЭК + МФ, совместно инкубированных в условиях ишемии и реперфузии.*

Из данных по изучению влияния антиоксидантов (использован лишь К-фенозан) на окислительную модификацию ЛНП под влиянием культуры ЭК видно, что при совместной инкубации ЭК с ЛНП в условиях ишемии и ишемии + 1ч реперфузии без добавления К-фенозана (рис.4, контроли) величина ЭФП ЛНП была значительно повышена, а содержание ДК и число жизнеспособных ЭК снижено, причем изменения после инкубации в условиях ишемии + реперфузия были выражены резче, чем после одной ишемии.

Добавление К-фенозана к культуре ЭК+ЛНП до начала их 24-х ч инкубации в условиях ишемии выявило умеренную тенденцию к снижению ЭФП и ДК по сравнению с контролем во всех исследованных концентрациях. Однако, в концентрации  $10^{-7}$ - $10^{-5}$  М К-фенозан значительно повышал число жизнеспособных ЭК ( $p < 0,01$ ).

Добавление К-фенозана к культуре ЭК+ЛНП до начала их 24ч ишемии и с последующей 1ч реперфузией вело к снижению величины ЭФП ЛНП лишь при концентрации К-фенозана, равной  $10^{-5}$  М. Влияние К-фенозана на содержание ДК и число жизнеспособных ЭК носило характер тенденции.

Таким образом, К-фенозан во всех концентрациях, кроме концентрации  $10^{-5}$  М, оказывал умеренный ингибирующий эффект на способность ишемизированных и реперфузированных ЭК окислительно модифицировать ЛНП, но более выраженный защитный эффект на жизнеспособность ишемизированных и реперфузированных ЭК

# ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ И АНТИГИПОКСАНТОВ НА ОКИСЛЕНИЕ ЛНП

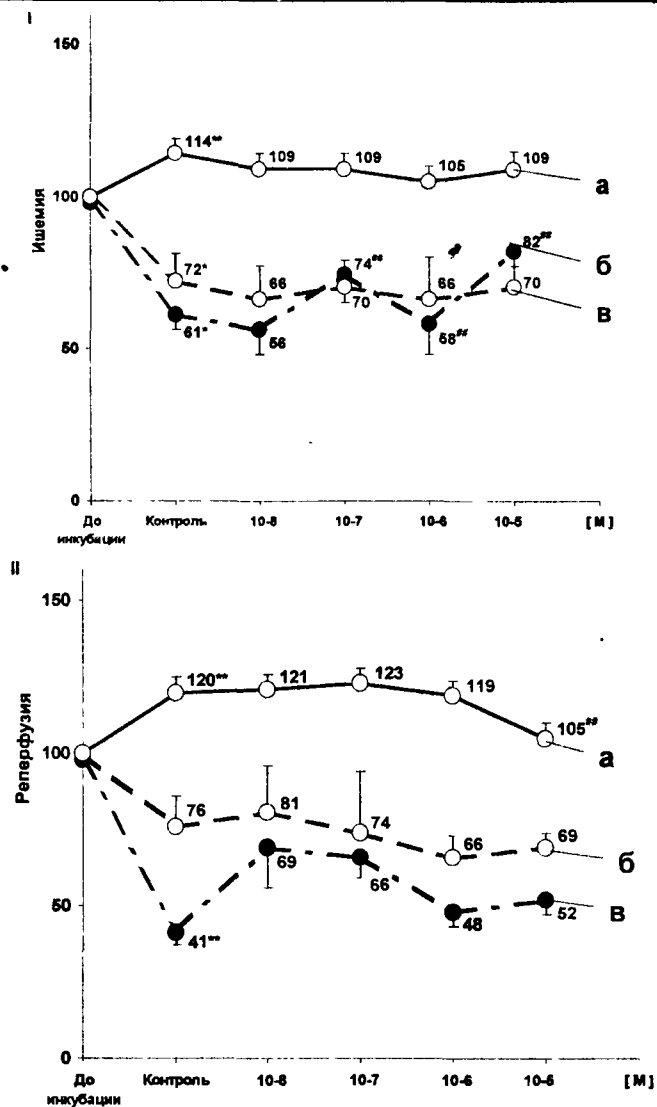


Рисунок 4.

Влияние К-фенозана на величину ЭФП ЛНП (а), содержание ДК (б) и число жизнеспособных МФ (в) после 24ч совместной инкубации в условиях ишемии (I) и 1ч реперфузии (II) (% к величине до инкубации). \*\*, \* - достоверность различий в контрольных опытах с величиной до инкубации: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$  ## - достоверность различий в опытных сериях с контролем: # -  $p < 0,05$ ; ## -  $p < 0,01$ .

(начиная с концентраций  $10^{-7}$  М и при ишемии и при реперфузии). В концентрации  $10^{-5}$  М К-фенозан в условиях реперфузии выраженно снижал окислительную модификацию ЛНП (по критерию ЭФП), т.е. эффективная концентрация К-фенозана в опытах с ЭК при их реперфузии была аналогична эффективной концентрации К-фенозана в опытах с МФ при их ишемии (см. рис.1 и 4).

Данные по изучению влияния антиоксидантов (К-фенозана, пробукола и десферала) на окислительную модификацию ЛНП под влиянием ЭК + МФ представлены в таблице и на рис. 5

Из таблицы видно, что инкубация ЭК с ЛНП в аэробных условиях, условиях ишемии и условиях ишемии с последующей реперфузией без антиоксидантов (контроли) приводила к повышению величины ЭФП ЛНП и снижению содержания ТБК-РП и числа жизнеспособных ЭК. Эти изменения возрастали в ряду: аэробная

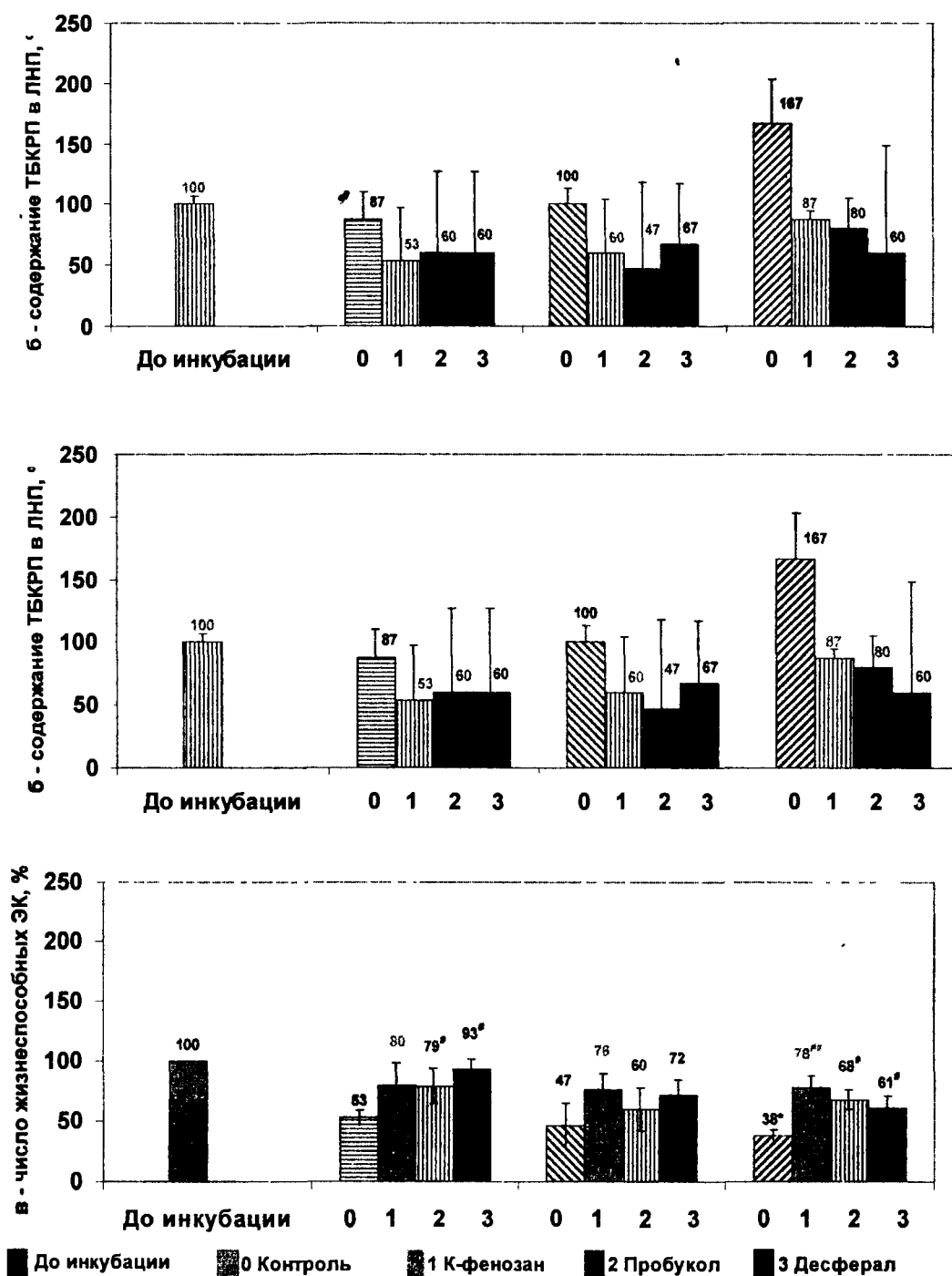


Рисунок 5.

Влияние К-фенозана (1), пробукола (2) и десферала (3) на величину ЭФП ЛНП (а), содержание ТБК-РП (б) и число жизнеспособных ЭК (в), инкубированных в условиях ишемии (24ч) и ишемии + реперфузия (3ч), а также в условиях реперфузии с добавлением МФ (% к величине до инкубации). \*,\*\* - достоверность различий с до инкубации: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$  #,## - достоверность различий с контролем: # -  $p < 0,05$ ; ## -  $p < 0,01$ .

Контроль - опыты без АО



#### ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ И АНТИГИПОКСАНТОВ НА ОКИСЛЕНИЕ ЛНП

инкубация < ишемия < ишемия + реперфузия. Добавление макрофагов к культуре ЭК+ЛНП и последующая совместная инкубация ЭК+ЛНП+МФ в течение 24 ч в аэробных условиях и условиях ишемии существенно не меняло величину ЭФП и содержание ТБК-РП по сравнению с инкубацией без МФ. Добавление МФ в раннем реперфузионном периоде к уже 24 ч ишемизированной культуре ЭК приводило к достоверному снижению величины ЭФП, недостоверному повышению содержания ТБК-РП. Число жизнеспособных ЭК имело выраженную тенденцию к снижению во всех условиях инкубации ЭК+ЛНП+МФ, по сравнению с опытами без МФ.

Применение антиоксидантов в дозе  $10^{-5}$  М, оптимально эффективной в опытах с МФ (см. рис. 1 и 2), приводило к снижению величины ЭФП ЛНП в условиях ишемии и ишемии + реперфузия, как без добавления МФ, так и с добавлением МФ в реперфузионном периоде (рис. 5). Антиоксиданты при всех условиях инкубации увеличивали также число жизнеспособных ЭК по сравнению с контрольными опытами (0), причем положительный эффект на жизнеспособность клеток был максимально выражен при применении пробуккола и десферала в условиях ишемии и К-фенозана в условиях реперфузии с добавлением МФ. Из представленных данных очевидно, что высокая концентрация АО уменьшала окислительную модификацию ЛНП и увеличивала число жизнеспособных ЭК при их длительной (24 ч) инкубации с ЛНП в условиях ишемии и реперфузии (3 ч), как без добавления МФ, так и с добавлением МФ в раннем реперфузионном периоде.

Таким образом, приведенные результаты еще раз доказали, что культуры и ЭК, и МФ окислительно модифицируют ЛНП уже в течение первых 24-х часов их совместной инкубации, причем окисление ЛНП при ишемии+реперфузия выражено резче, чем при ишемии, а при ишемии резче, чем в аэробных условиях (см. рис. 1 и 4, табл.). Усиление способности МФ и ЭК окислять ЛНП в условиях ишемии и ишемии+реперфузия по сравнению с аэробными условиями, по-видимому, обусловлено участием в процессе окисления ЛНП и макрофагами, и эндотелиальными клетками фосфолипазы А<sub>2</sub>, липоксигеназы и систем продукции NO [14, 36-40], активность которой усилена при гипоксии и ишемии [6,41], в ЭК также участием и резким усилением при ишемии ксантиноксидазы [6,37,41], а в МФ существенную роль в окислении играет также NADPH-оксидаза [35, 42].

Кроме того известно, что парциальное давление ( $pO_2$ ) в сосудистой стенке в нормальных условиях составляет всего 30-70 торг, то есть 3,8-8,5 % (1 торг = 0,125 %), а в условиях *in vitro* окисление ЛНП под влиянием  $Cu^{2+}$  успешно проходило как при 20%, так и при 2%  $O_2$  [43].

Проведенная оценка степени окисленности ЛНП с применением различных препаратов показала, что изменение величины ЭФП является более стабильным и более демонстративным показателем, чем оценка накопления продуктов ПОЛ - ТБК-РП и ДК. По-видимому, это обусловлено быстрым метаболизмом продуктов ПОЛ и ковалентным связыванием ТБК-РП с аминок группами апоВ белка ЛНП, ведущим к модификации апоВ белка, росту отрицательного заряда ЛНП и увеличению величины их ЭФП. Нестабильность продуктов ПОЛ в клетках вела также к большим разбросам их величины; падению, а не росту их содержания в ряде опытов; в случаях с ростом - возможности установления лишь тенденции к росту, а не достоверного роста.

Еще более неоднозначным было выявленное в контрольных и опытных сериях снижение числа жизнеспособных клеток в культурах МФ и ЭК. Вероятно, снижение жизнеспособности МФ и ЭК обусловлено несколькими факторами: неблагоприятными условиями длительной инкубации клеток в обедненной субстратами и не содержащей белка (инкубационной) среде; влиянием на клетки ишемии и реперфузии; ЦТ эффектом ЛНП, окисленных в процессе инкубации с МФ и ЭК. Более выраженная гибель МФ по сравнению с ЭК в контрольных опытах (сохранение 34% МФ против 41-53% ЭК, см. рис. 1 и рис.4 - 5), по-

видимому, обусловлена захватом макрофагами окисленных ЛНП, переполнением их ЛНП и гибелью [1-3,6,44,45]. Возможность гибели макрофагов в связи с избирательным захватом ими уже окисленных ЛНП подтверждается и в опытах с добавлением свежих макрофагов к ЭК, длительно инкубированным с ЛНП в условиях ишемии. Вместо роста ЭФП было выявлено его падение ( $p < 0.01$ ), несмотря на выраженную тенденцию к росту содержания продуктов ПОЛ и снижение числа жизнеспособных ЭК, по сравнению с опытами без добавления МФ, то есть МФ, добавленные к культуре поврежденных ишемией и ЛНП ЭК, оказывали добавочный ЦТ эффект и на сами ЭК (см. табл.).

Отсутствие полного соответствия между ростом окисленности ЛНП и снижением числа жизнеспособных МФ очевидно также из опытов с АГ и АО. Так, не обладающие антиоксидантными свойствами янтарная кислота и гипоксен, повышали жизнеспособность МФ; обладающий антиоксидантными свойствами дельтаран - в меньшей степени влиял на жизнеспособность МФ (см. рис. 3), а антиоксидант К-фенозан - на жизнеспособность ЭК (см. рис. 4). Ценность теста на жизнеспособность инкубируемых клеток для понимания механизма атеросклероза, и его недостаточная расшифрованность подчеркивается и в других работах [10].

Сравнительная оценка способности антиоксидантов ингибировать окислительную модификацию ЛНП под влиянием МФ и ЭК выявила наибольший эффект у десферала (достоверный защитный эффект препарата проявился в меньшей, чем у других концентрациях), затем у пробуккола и в наименьшей степени у К-фенозана. Дельтаран, антиоксидантный эффект которого был выявлен также при различных видах стресса [34, 35], возможно, окажется сильнее даже вышеперечисленных АО, однако механизм его действия и токсичность пока изучены слабо.

Более высокая эффективность десферала, по сравнению с фенольными антиоксидантами еще раз подчеркивает существенную роль  $Fe^{2+}$  на различных этапах перекисного окисления липидов [6, 41], в том числе в липидах, входящих в состав ЛНП [45]. Более высокая эффективность пробуккола, по сравнению с К-фенозаном, обусловлена наличием в К-фенозане одного, а в пробукколе двух симметрично расположенных фенольных (ароматических) колец, играющих существенную роль в восстановлении липидных радикалов, причем, ни у К-фенозана, ни у пробуккола, в отличие от десферала, в диапазоне концентраций  $10^{-8}$  -  $10^{-6}$  М не выражен дозо-зависимый антиоксидантный эффект; последний проявляется лишь в концентрации  $10^{-5}$  М. Есть данные, что защитный эффект пробуккола, по сравнению с другими АО, занимает позицию:  $\alpha$ -токоферол (1,0) > пробуккол (0,76) > ВНТ (0,58) [46].

Выполнение данной работы поддержано грантами РФФИ: (№ 00-04-48819); (№ 02-04-533)

## ЛИТЕРАТУРА.

1. Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E. et al. (1989) N. Engl. J. Med. **320**, 915-324.
2. Hodis H.N., Kranssch D.M., Avogaro P., et. al. (1994) J. Lipid Res. **35**, 669-677.
3. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. (1999) Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. Питер, С-Пб.
4. Биленко М.В., Ладыгина В.Г., Федосова С.В. (1998) Бюлл. exper. биол. мед. **126** (9), 302-306
5. Биленко М.В. (1999) Вопр. мед. химии **45**, 446

# **ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ И АНТИГИПОКСАНТОВ НА ОКИСЛЕНИЕ ЛНП**

6. *Bilenko M.V.* (2001) Ischemia and Reperfusion of Various Organs Injury Mechanisms. Methods of Prevention and Treatment. New Science Publishers, Inc. Huntington, New York.
7. *Биленко М.В., Хильченко А.В., Шмитько Н.А.* (2003) Бюлл. exper. биол. мед. **135**, 410-413.
8. *Биленко М.В., Вахрушева Т.В., Федосова С.В.* (1998) Бюлл. exper. биол. мед. **126**, 9, 314-317.
9. *Crawford D.W., Kramsch D.M.* (1988) Exp. Mol. Pathol. **49**, 215-233.
10. *Morel D., Hessler J., Chisolm G.* (1983) J. lipid. res. **24**, 1070-1076.
11. *Retsky K.L., Freeman M.W., Frei B.* (1993) J. Biol. Chem. **268**, 1304-1309.
12. *Matthews A.J., Vercellotti G.M., Menchaca H.J. et al.* (1997) J. Surg. Res. **73**, 1, 35-40.
13. *Proudfoot J.M., Croft K.D., Puddey I.B. and Beilin L.J.* (1997) Free Rad. Biol. Med. **23**, 5, 720-728.
14. *Hanasaki K., Yamada K., Yamamoto S., et al.* (2002) J. Biol. Chem. **277**, 29116-29124.
15. *Plane F., Kacobs M., McMamus D., Bruckorfer K.R.* (1993) Atherosclerosis. **103**, 73-79.
16. *Muller K., Carpenter K.L., Freeman M.A., Mitchinson M.J.* (1999) Free Radic. Res. **30**, 1, 59-71.
17. *Jialal I., Grundy S.M.* (1991) J. Clin. Invest. **87**, 2, 597-601.
18. *Parthasarathy S., Young S.G., Witztum J.L., Pittman R.C., Steinberg D.* (1986) J. Clin. Invest. **77**, 2, 641-644.
19. *Kita T., Nagano Y., Yokode M., Ishii K., et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **84**, 16, 5928-5931.
20. *Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T.E.* (1988) Am. J. Cardiol., **62**, 68-128.
21. *Chisolm G.M. and Morel D.W.* (1988) Am. J. Cardiol., **62**, 20B - 26B.
22. *Tardif J.C.* (2000) Can. J. Cardiol. **16**, (Suppl. D), 2D - 4D.
23. *Тухазе А.К., Ланкин В.З., Коновалова Г.Г. и др.* (1999) Бюлл. exper. биол. мед., **128**, 186-189.
24. *Goulinet S., Chapman M.J.* (1997) Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. **17**, 786-796.
25. *Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jurgens G.* (1992) Free Radic. Biol. Med. **13**, 341-390.
26. *Биленко М.В., Хильченко А.В., Коновалова Г.Г., Ланкин В.З.* (2003) Бюлл. exper. биол. мед. **136**, 142-145.
27. *Биленко М.В.* (1999) "Человек и лекарство". Тезисы докладов. Москва, 16.
28. *Lindgren F.T.* (1975) Analysis of Lipid and Lipoproteins. Champaigne, pp. 204-224.
29. *Tertov V.V., Kaplun V.V., Dvoryantsev S.N., et al.* (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun. **214**, 608-613.
30. *Bilenko M.V., Sevanian A., and Hochstein P.* (1993) Mol. Cell. Cardiol., **25**, Suppl. 1, IX P5, p. 5.85
31. *Вахрушева Т.В., Дремена Е.С., Шаров В.С., Азизова О.А.* (1997) Биофизика, **42**, 662-670.
32. *Bolland J.L., Koch H.J.* (1945) J. Chem. Soc., 7-12, 445-447.
33. *Bligh E.H., Dyer W.J.* (1959) Can. J. Biochem., **37**, 911-913.
34. *Рухирева Г.Т., Маклецова М.Г., Менджеруцкий А.М. и др.* (1993) Известия РАН, №2, 243-256.
35. *Бондаренко Т.И., Милютин Н.П., Шустанова Т.А., Михалева И.И.* (1999) Рос. физиол. журнал. **85**, 1076-1080.
36. *Ланкин В.З., Тухазе А.К., Беленков Ю.Н.* (2000) Кардиология. **40**, 48- 61.
37. *Wilkins G.M., Leake D.S.* (1994) Biochim. Biophys. Acta, **1211**, 69-78.
38. *Jessup W.* (1993) Biochem. Soc. Trans., **21**, 321-325.
39. *Liu G.X., Ou L.V., Liu J.H., et al.* (2000) Acta Pharmacol. Sin. **7**, 637-640.

40. *Верри Н., Watanabe M., Sanhara M., et al.* (2002) *Biol. Pharm. Bull.* **6**, 710-717.
41. *Биленко М.В.* (1989) Ишемические и реперфузионные повреждения органов. "Медицина", Москва.
42. *Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньшикова Е.Б.* (2001) Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологические аспекты. Москва. МАИК. "Наука\Интерпериодика".
43. *Hatta A. and Frei B.* (1995) *J. Lipid Res.*, **36**, **11**, 2383-2393.
44. *Gorog P., Kakkar V.V.* (1987) *Atherosclerosis*, **65**, 99-107.
45. *Van Jaarsveld H., Pool G.F., Barnard H.C.* (1998) *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **99**, 69-80.
46. *Kanek T., Raji K., Matsuo M.* (1994) *Free Radic. Biol. Med.* **16**, 405-409.

Поступила 01.04.2003.

**THE USE OF ANTIOXIDANTS AND ANTIHYPOXANTS FOR DECREASING OF LDL  
OXIDATIVE MODIFICATION BY MACROPHAGES AND ENDOTHELIAL CELLS UNDER  
ISCHEMIA AND REPERFUSION OF VASCULAR WALL.**

*M.V. Bilenko, A.V. Khilchenko, S.A. Pavlova.*

Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, RAMS  
Pogodinskaya St. 10, Moscow, 119121 Russia, fax (095) 245-08-57.

Oxidative modification of LDL is a key factor in pathogenesis of atherosclerosis. In this work the effects of antioxidants (K-phenosan, probucol, and desferal) and antihypoxants (succinic acid, hypoxen, and deltaran) on the macrophage- and endothelial cell-mediated oxidation of LDL was studied. Electrophoretic mobility of LDL, the content of lipid peroxide products (TBARS and diene conjugates, DC) and cell viability were used as the indexes of LDL oxidation. The effectiveness of antioxidants as inhibitors of LDL oxidation decreased in the following order: desferal > probucol > K-phenosan, and antihypoxant ability was decreased in line: deltaran >> succinic acid (effect only in dose 40mg/ml) >> hypoxane (no effect). The effect antioxidants on protection of cell viability (MP and EC) during ischemia reduced in the same order. The effectiveness of antihypoxant protection of MP viability, decreased in the following order: succinic acid > hypoxen >> deltaran. Macrophages added to 24h ischemized EC + LDL in early reperfusion period decreased LDL EPM. This may apparently be attributed to selective uptake of oxidized LDL by MP.

**Key words:** oxidative stress, endothelial stress, macrophages, LDL, antioxidants, antihypoxants