

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 576.314.6

©Викторов, Юркив

СВЯЗЫВАНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА И КОМПЛЕКСОВ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА С СЫВОРОТОЧНЫМИ ЛИПОПРОТЕИНАМИ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ С МАКРОФАГАМИ ПЕЧЕНИ

А.В. Викторов, В.А. Юркив

Лаборатория молекулярных механизмов инфекций,
ЦНИИ Эпидемиологии, 111123, Москва, Новогиреевская ул. 3а;
тел.: (495) 181-8630; факс: (495) 181-1522; эл. почта: farm@newtech.ru

Изучено связывание [³H]липополисахаридного токсина (ЛПС) и комплексов ЛПС с сывороточными [¹²⁵I]липопротеинами низкой плотности (ЛПНП) с первичной культурой макрофагов печени (купферовских клеток) крысы. Определено общее, специфическое и неспецифическое связывание. Показано, что для ЛПС и комплексов ЛПНП-ЛПС рецепторное взаимодействие доминирует, составляя 70-77% и 80-85% соответственно. График Скэтчарда для связывания ЛПС существенно не линейен, но линейен для комплекса ЛПНП-ЛПС. На графике Скэтчарда для ЛПС, однако, можно выделить два участка, которые аппроксимируются линейной регрессией. Этим участкам соответствуют два различных центра специфического связывания: один для низких концентраций токсина (0,25-0,5 мкг/мл) с $K_d=0,75$ мкг/мл и другой для высоких концентраций (7,5-15 мкг/мл) с $K_d=5,39$ мкг/мл. Для комплексов ЛПНП-ЛПС было получено только одно значение $K_d=2,80$ мкг белка/мл. Комплексы ЛПНП-ЛПС в значительной степени блокировали связывание ЛПС (-40%), в то время как эффект ацет-ЛПНП и окси-ЛПНП был заметно меньше. В свою очередь, ЛПС был способен существенно ингибировать связывание комплексов ЛПНП-ЛПС (-60%), а ацет-ЛПНП и окси-ЛПНП подавляли взаимодействие комплексов ЛПНП-ЛПС с купферовскими клетками незначительно. Предполагается, что существенная часть как ЛПС, так и комплексов ЛПНП-ЛПС взаимодействует на поверхности купферовских клеток с общими сквенджер-рецепторами, с которыми модифицированные ЛПНП взаимодействуют слабо. Комплексы ЛПНП-ЛПС способны взаимодействовать, кроме рецепторов, общих с ЛПС, также и с другими рецепторами, демонстрирующими сходные параметры связывания, причем рецепторы апо-В/Е не играют существенной роли.

Ключевые слова: липополисахарид, сывороточные липопротеины, купферовские клетки, рецепторы.

ВВЕДЕНИЕ. Рецепторное (специфическое) связывание липополисахаридного токсина (ЛПС) с наружной поверхностью купферовской клетки (КК) является первым необходимым (но не всегда достаточным) этапом ее активации [1, 2]. Существует несколько мембранных белков, способных специфически связываться с ЛПС [3], например, комплекс CD11/CD18 и CD14. Самый известный из них – CD14, который взаимодействует с ЛПС, ассоциированным с ЛПС-переносящим белком (ЛПБ). Механизм активации клетки ЛПС посредством CD14 до конца не изучен. Поскольку CD14 локализован исключительно на наружной поверхности клетки, он не способен передавать сигнал через мембрану. Предполагается, что в этом процессе участвуют другие трансмембранные рецепторные белки, в частности TLR4, с которыми на

Список сокращений: ЛПС – липополисахаридный токсин; ЛПНП – сывороточные липопротеины низкой плотности; КК – купферовские клетки; ЛПБ – липополисахарид-переносящий белок

поверхности мембраны взаимодействует комплекс ЛПС-ЛПБ-CD14 [1]. Другой группой рецепторов КК, с которыми может связываться ЛПС, являются скэвенджер-рецепторы класса А (SR-A) типов I и II, а также макросиалин [4].

Рассматривая взаимодействие эндотоксина с клеточными рецепторами, необходимо учитывать его агрегатное состояние, а именно: эндотоксин, не связанный с клетками, в кровотоке может находиться как в свободном состоянии, так и быть ассоциированным с сывороточными белками и липопротеинами. В свободном состоянии ЛПС присутствует либо в виде мономеров (при уровне ниже критической концентрации мицеллообразования (ККМ) [5], т.е. очевидно в отсутствие интоксикации), либо в виде крупных агрегатов (мицелл) с молекулярной массой от нескольких сот кДа до 2000 кДа [5, 6], образующихся при повышенных концентрациях ЛПС. Комплексы ЛПС с сывороточными липопротеинами различной плотности (очень низкой, низкой и высокой) образуются с помощью специальных сывороточных белков и являются весьма стабильными структурами [4, 7]. Состав и структура комплексов ЛПС сывороточными липопротеинами низкой плотности (ЛПНП) хорошо изучены [8]. При нормальных и гиперлипидемических условиях ассоциация ЛПС с липопротеинами преобладает, причем распределение эндотоксина по различным видам липопротеинов зависит от нескольких факторов, например, содержания в частице холестерина [7].

Потенциально комплексы ЛПНП-ЛПС способны “предоставить” эндотоксину дополнительные пути проникновения в клетку. Так, комплексы могут связываться с тремя типами рецепторов, присутствующих на КК: со скэвенджер-рецепторами (которые могут отличаться от скэвенджер-рецепторов, поглощающих ЛПС), с рецепторами самого ЛПС и с рецепторами ЛПНП – рецепторами апо-В/Е [7, 8]. В связи с этим нелишне напомнить, что доставка холестерина в клетки стенок артерий с помощью комплексов ЛПНП-ЛПС может инициировать процесс атеросклероза, который в последнее время все больше и больше рассматривается как хроническое воспалительное заболевание стенок сосудов [9].

Наконец, как ЛПС, так и комплексы ЛПНП-ЛПС могут неспецифически внедряться в мембрану КК, вызывая в ней структурные изменения.

В настоящей работе связывание ЛПС и комплексов ЛПНП-ЛПС с КК было изучено в присутствии сывороточных белков, поскольку известно, что клеточные ответы на действие ЛПС, как правило, значительно усиливаются в присутствии ЛПБ [10] (хотя существуют сообщения и о том, что КК могут заметно активироваться эндотоксином и без сывороточных белков [11]). До сих пор параметры связывания ЛПС с клеточной мембраной КК изучались лишь для концентраций токсина, значительно превосходящих пределы, встречающиеся *in vivo* [6]. В настоящей работе исследовалось связывание с КК физиологических концентраций ЛПС. Характеристики процесса связывания комплексов ЛПНП-ЛПС с КК были исследованы впервые.

МЕТОДИКА. В качестве немеченого липополисахаридного токсина (ЛПС) в работе использовали коммерческий очищенный лиофилизированный препарат ЛПС дикого типа *Salmonella typhimurium* (“Sigma”, США). Тритиевая метка была введена в молекулу ЛПС с помощью реакции с NaB^3H_4 (20 Ci/м-моль), как подробно описано в работе [12]. Удельная активность полученного [^3H]ЛПС составила 22800 имп/мкг.

ЛПНП человека были выделены, как описано ранее [8]. Йодированные [^{125}I]ЛПНП ([^{125}I]апо-В 100) были получены по методу [13]. Для модификации ЛПНП использовали либо обработку уксусным ангидридом [13] (ацет-ЛПНП), либо окисление в присутствии ионов меди [13] (окси-ЛПНП). Комплексы [^{125}I]ЛПНП-ЛПС (135600 имп/мин на 1 мкг белка) были приготовлены в присутствии сывороточных белков по методике [8]. Содержание ЛПС в комплексах ЛПНП-ЛПС определено, как описано ранее [8], и составило 0,1 мкг ЛПС на 1 мкг апобелка.

Макрофаги печени (КК) были выделены из самцов крыс породы Sprague-Dawley весом 250-300 г согласно методу, подробно описанному ранее [14, 15]. Чистота КК была не менее 90% (окрашивание пероксидазой, морфология и захват латексных частиц); при этом более 95% выделенных клеток не прокрашивалось трипановым синим, т.е. были жизнеспособны. Клетки культивировали в 24-луночных культуральных пластиковых плашках с плотностью 5×10^5 клеток/луночку/0,5 мл в среде RPMI 1640 с добавлением 10%-ной телячьей сыворотки в инкубаторе (37°C, 5% CO₂) в течение 48 часов до начала экспериментов.

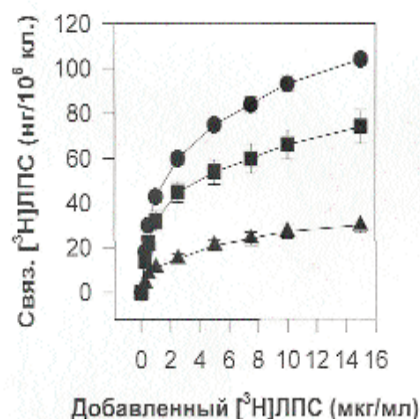
Чтобы дифференцировать процессы собственно связывания ЛПС и комплексов ЛПНП-ЛПС с поверхностью клетки от их интернализации, т.е. захвата внутрь клетки, измерение проводили при пониженной температуре (4°C). Предварительные эксперименты показали, что при 4°C основная масса ЛПС и комплексов ЛПНП-ЛПС связывается с КК в течение 4-х часов, что хорошо согласуется с литературными данными [6]. Присутствие сыворотки обеспечивало наличие в инкубационной смеси ЛПС-переносящих белков (ЛПБ) и, следовательно, вовлечение в связывание рецепторов CD14 [16]. Неспецифическое связывание определяли в присутствии 20-30-кратного избытка немеченого агента. Специфическое связывание определяли по разности между общим и неспецифическим связыванием.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. На рисунке 1А представлена зависимость количества ассоциированного с КК эндотоксина от его концентрации в культуральной среде. Верхний предел диапазона концентраций ЛПС, для которых проводилось изучение связывания, был сознательно ограничен физиологически разумными значениями, т.е. порядка нескольких мкг/мл. Все кривые выходят на насыщение при концентрации добавленного ЛПС около 10-15 мкг/мл. Во всем изученном концентрационном диапазоне специфическое связывание доминировало, составляя для низких концентраций ЛПС приблизительно 77% от общего, а для высоких – около 70%.

График Скэтчарда (рис. 1Б) для специфического связывания ЛПС с КК не является линейным, что указывает на связывание с различными центрами (или рецепторами). Тем не менее, на этом графике можно выделить два приблизительно линейных участка для низких и высоких концентраций эндотоксина, обозначив их, соответственно, как центр связывания “1” и центр связывания “2”. Путём экстраполяции линейных участков графика (линейная регрессия) можно оценить параметры связывания обоих центров, а именно, числа центров связывания на клетку n_1 и n_2 , а также константы K_{d1} и K_{d2} . Сходные расчеты были сделаны и для графика в двойных обратных координатах. В результате получены следующие данные: для низких концентраций ЛПС (0,25–0,50 мкг/мл) $n_1 = 51$ нг/клетку и $K_{d1} = 0,75$ мкг/мл; для высоких концентраций ЛПС (7,5–15,0 мкг/мл) $n_2 = 97$ нг/клетку и $K_{d2} = 5,39$ мкг/мл. При определении количества молекул токсина, связанного с клеткой, нужно знать молекулярную массу ЛПС, которая может варьировать в очень широких пределах. Если для приблизительной оценки принять молекулярную массу мономера ЛПС дикого типа, равной в среднем 13 кДа [8], то получаем: $n_1 = 2,4 \times 10^6$ молекул ЛПС/клетку, а $n_2 = 4,5 \times 10^6$ молекул ЛПС/клетку. Как связываются с рецепторами агрегаты/мицеллы ЛПС совершенно неизвестно. Тем не менее, если при расчетах принять среднюю массу агрегатов ЛПС равной 2000 кДа [6, 12], то приведенные выше значения уменьшатся более, чем на 2 порядка.

Ранее Shnyra и Lindberg [6], изучая связывание ЛПС с КК, показали, что при очень высоких концентрациях ЛПС (20-60 мкг/мл) график Скэтчарда линейен и константа K_d имеет более высокое значение, чем приведенное выше. Однако, следует принять во внимание, что использованная этими авторами добавка 50-кратного избытка немеченого токсина на фоне уже очень высоких концентраций меченого ЛПС значительно превысила нетоксичный для КК порог (около 50 мкг/мл [17]) и, следовательно, изучение связывания проводилось уже при патологическом состоянии клеток, возможно, с существенной деструкцией плазматической мембраны.

А. Концентрационная зависимость



Б. График Скэтчарда

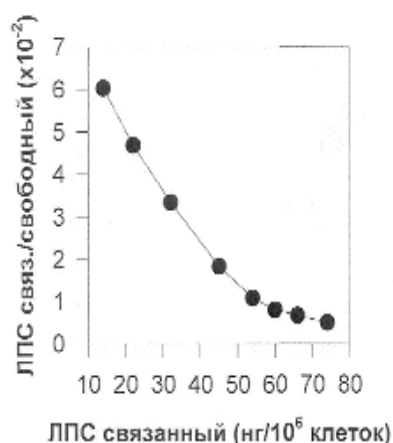


Рисунок 1.

Параметры связывания $[^3\text{H}]$ -ЛПС (22800 имп/мин/мкг) с культурой купферовских клеток (10⁶ клеток/мл, 4 ч, 4°C).

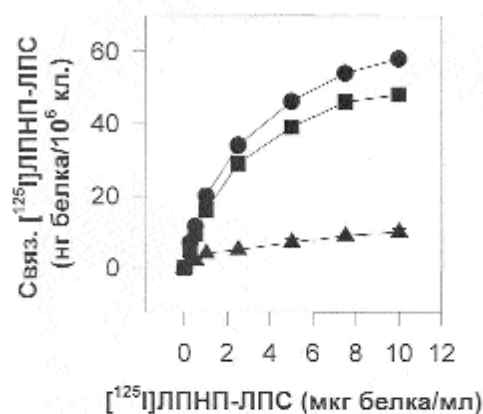
(А) Концентрационная зависимость общего (●), специфического (■) и неспецифического (▲) связывания. Неспецифическое связывание определено в присутствии 30-кратного избытка немеченого токсина. Специфическое связывание рассчитано по разности между общим и неспецифическим связыванием.

(Б) График Скэтчарда для специфического связывания ЛПС.

Параметры связывания комплексов ЛПНП-ЛПС с первичной культурой КК представлены на рисунке 2. Кривая специфического связывания выходит на плато приблизительно при концентрации добавленных комплексов 8-10 мкг белка/мл (рис. 2А). Доля специфически связанных комплексов составляет 80-85% от общего количества комплексов, ассоциированных с клетками. График Скэтчарда (рис. 2Б) линеен, что позволяет определить следующие параметры связывания: $n = 63$ нг белка/клетку и $K_d = 2,8$ мкг белка/мл. Если принять массу комплексов ЛПНП-ЛПС около 3000 кДа [7], то получаем $12,6 \times 10^3$ центров связывания на клетку. Хотя, в принципе, изученные комплексы могут взаимодействовать с несколькими типами рецепторов, а именно, с рецепторами ЛПС, рецепторами ЛПНП и скэвенджер-рецепторами [3, 8], логично предположить, что полученные параметры специфического связывания характеризуют некий доминирующий (возможно,

усредненный) тип взаимодействия. Таковым, вероятнее всего, является связывание со сквенджер-рецепторами, которые, как известно, играют ключевую роль в связывании с клетками как ЛПС, так и модифицированных ЛПНП [3, 4, 6, 7,]. Дополнительная информация на этот счет была получена при изучении взаимного влияния ЛПС и комплексов ЛПНП-ЛПС на связывание с КК и эффекта на этот процесс окси- и ацет-ЛПНП.

А. Концентрационная зависимость



Б. График Скэтчарда

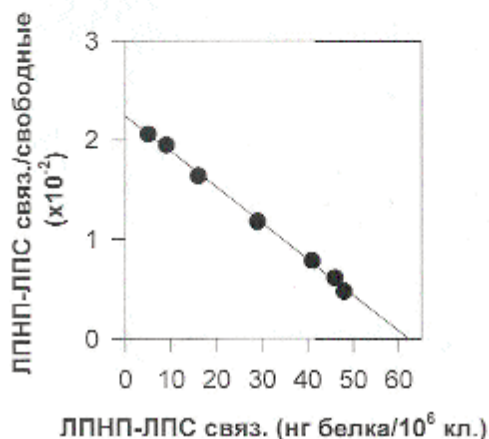


Рисунок 2.

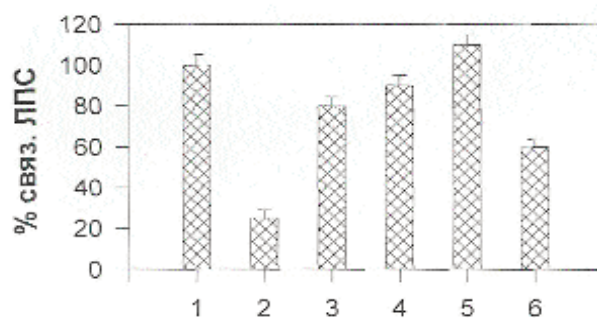
Параметры связывания комплексов [¹²⁵I]-ЛПНП-ЛПС (135600 имп/мин/мкг белка) с культурой купферовских клеток (10⁶ клеток/мл, 4 ч, 4°C). (А) Концентрационная зависимость общего (●), специфического (■) и неспецифического (▲) связывания. Неспецифическое связывание определено в присутствии 20-30-кратного избытка немеченых комплексов. Специфическое связывание рассчитано по разности между общим и неспецифическим связыванием. (Б) График Скэтчарда для специфического связывания ЛПНП-ЛПС.

На рисунке 3А показано, что связывание ЛПС существенно подавлялось добавлением 30-кратного избытка комплексов ЛПНП-ЛПС, в то время как интактные и модифицированные ЛПНП мало влияли на связывание с клеточной мембраной ЛПС. Интересно отметить, что ЛПС, напротив, был способен существенно ингибировать связывание ацет-ЛПНП (-45%) и окси-ЛПНП (-70%)

СВЯЗЫВАНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА С МАКРОФАГАМИ

(не показано). По-видимому, этот факт объясняется тем, что число мест связывания ЛПС намного (в 10-100 раз) выше, чем ацет-ЛПНП или окси-ЛПНП, а различная степень ингибирования, возможно, связана с тем, что ацет-ЛПНП и окси-ЛПНП взаимодействуют с неодинаковыми сквенджер-рецепторами [18, 19]. Известно, что как ЛПС, так и окси-ЛПНП (но не ацет-ЛПНП) могут взаимодействовать с макросиалином [4] (связывание окси-ЛПНП с макросиалином на КК было недавно поставлено под сомнение [20]). Логично предположить, что комплексы ЛПНП-ЛПС также могут связываться с макросиалином. На рисунке 3Б видно, что ЛПС существенно блокировал связывание с КК комплексов ЛПНП-ЛПС, вероятно, за счет взаимодействия комплексов с рецепторами ЛПС (включая и возможные ЛПС-специфичные сквенджер-рецепторы). Ингибирующий эффект модифицированных ЛПНП был заметно меньше, а интактные ЛПНП лишь незначительно уменьшали связывание комплексов ЛПНП-ЛПС. Это позволяет предположить, что существенная часть комплексов ЛПНП-ЛПС взаимодействует на поверхности КК со сквенджер-рецепторами и рецепторами ЛПС, в то время как рецепторы ЛПНП (апо-В/Е) играют лишь незначительную роль.

А. Связывание [^3H]ЛПС



Б. Связывание [^{125}I]ЛПНП-ЛПС

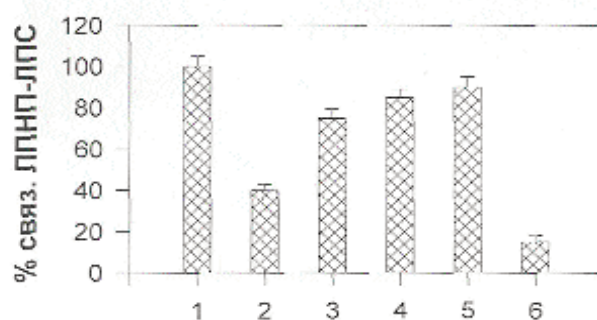


Рисунок 3.

Эффект добавления 30-кратного избытка немеченого агента на связывание [^3H]-ЛПС (2,5 мкг/мл) (А) и [^{125}I]-ЛПНП-ЛПС (2,5 мкг белка/мл) (Б) с культурой купферовских клеток (10^6 клеток/мл, 4ч, 4°C). 1 – контроль (без добавок); 2 – добавление ЛПС; 3 – добавление ацет-ЛПНП; 4 – добавление окси-ЛПНП; 5 – добавление интактных ЛПНП; 6 – добавление комплексов ЛПНП-ЛПС.

Механизм взаимодействия ЛПС с клеткой во многом зависит от его агрегатного состояния. При высоких концентрациях ЛПС большая часть токсина либо специфически связывается со сквенджер-рецепторами (включая

макросиалин), либо неспецифически внедряется в липидный бислой плазматической мембраны гидрофобными жирнокислотными цепочками липида А. Одним из вариантов этого процесса служит образование ЛПС высокостабильных комплексов с сывороточными липопротеинами [7, 21], например, комплекса ЛПНП-ЛПС [8]. Подобным образом связанный ЛПС не способен вызвать полноценную активацию клетки [21] и этот механизм является, скорее всего, относительно безопасным путем нейтрализации и удаления ЛПС. Тем не менее, остальная часть эндотоксина опосредованно (с участием ЛПБ) взаимодействует с рецепторами CD14, после чего образовавшийся комплекс диффундирует по поверхности мембраны до рецепторов TLR4 [1], способных (в отличие от CD14) осуществлять трансмембранную передачу сигнала и задействовать стандартный механизм активации клетки через ядерный фактор транскрипции NF κ B [9].

Ранее было показано, что при гиперлипидемии (обычно вызываемой высокими концентрациями эндотоксина [22, 23]) основная масса ЛПС ассоциирована с сывороточными липопротеинами и, следовательно, в значительной степени нейтрализована; в условиях же гиполлипидемии, напротив, лишь небольшая доля ЛПС связана с липопротеинами [21]. Можно предположить, что низкие концентрации ЛПС, постоянно присутствующие в кровотоке, поддерживают полезную фоновую активность КК [15], в то время как высокие токсичные дозы эндотоксина нейтрализуются описанными выше способами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. ЛПС имеет на поверхности КК два различных центра рецепторного связывания, причем установленные в работе параметры носят, скорее всего, в обоих случаях усредненный характер. Так, первый центр, доминирующий при низких концентрациях эндотоксина, предположительно характеризует взаимодействие с рецепторами, специфичными для ЛПС, например, CD14 и определенные скэвенджер-рецепторы. Второй центр связывания, реализуемый преимущественно при высоких концентрациях ЛПС, относится к скэвенджер-рецепторам, с которыми могут взаимодействовать также и комплексы ЛПНП-ЛПС. Таким образом, существенная часть ЛПС и комплексов ЛПНП-ЛПС, особенно в условиях интоксикации, связывается с общими скэвенджер-рецепторами, с которыми, однако, модифицированные ЛПНП взаимодействуют слабо. Комплексы ЛПНП-ЛПС способны взаимодействовать, кроме рецепторов, общих с ЛПС, также и с другими рецепторами, демонстрирующими сходные параметры связывания, причем рецепторы апо-В/Е играют несущественную роль.

Авторы выражают благодарность проф. Д.Л.Эрнесту (университет штата Аризона, Тусон, США) и проф. Я.Б. Хуку (университет Томаса Джефферсона, Филадельфия, США) за помощь в выделении купферовских клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Su G.L. (2002) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **283**, G256-G265.
2. Oosten van M., Amersfoort van E.S., Berkel van T.J., Kuiper J. (2001) *J. Endotoxin Res.*, **7**, 381-384.
3. Amersfoort van E.S., Berkel van T.J., Kuiper J. (2003) *Clin. Microbiol. Rev.*, **16**, 379-414.
4. Oosten van M., Bilt van de E., Berkel van T.J.C., Kuiper J. (1998) *Infect. Immun.*, **66**, 5107-5112.
5. Schromm A.B., Brandenburg K., Rietschel E.T., Seydel U. (1995) *J. Endotoxin Res.*, **2**, 313-323.
6. Shnyra A., Lindberg A.A. (1995) *Infect. Immunity*, **63**, 865-873.
7. Lenten van B.J., Fogelman A.M., Haberland M.E., Edwards P.A. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2704-2708.

8. Victorov A.V., Medvedeva N.V., Gladkaya E.M. et al. (1989) Biochim. Biophys. Acta, **984**, 119-127.
9. Kanters E., Pasparakis M., Gijbels M.J.J. et al. (2003) J. Clin. Invest., **112**, 1176-1185.
10. Uesugi T., Froh M., Arteel G.E. et al. (2002) J. Immunol., **168**, 2963-2969.
11. Zipfel A., Schenk M., Metzdorf B. et al. (2001) Inflammation, **25**, 287-292.
12. Larsen N.E., Sullivan R. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81**, 3491-3495.
13. Kooij van der M.A., Morand O.H., Kempen H.J., Berkel T.J.C. (1996) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., **16**, 106-114.
14. Victorov A.V., Abril E.R., Hamlin C.E. et al. (1991) Cells of the Hepatic Sinusoid, Kupffer Cell Foundation (E. Wisse, D.L. Knook, R.S. McCuskey Eds.), **3**, 449-452.
15. Victorov A.V., Hoek J.B. (1995) Biochim. Biophys. Res. Commun., **215**, 691-697.
16. Schumann R.R., Leong S.R., Flaggs G.W. et al. (1990) Science, **249**, 1429-1431.
17. Bossuyt van H., Desmaretz C., Rombaut B., Wisse E. (1988) Arch. Toxicol., **62**, 316-324.
18. Ling W., Loughheed M., Suzuki H. et al. (1997) J. Clin. Invest., **100**, 244-252.
19. Berkel van T.J.C., Rijke de Y.B., Kruijt J.K. (1991) J. Biol. Chem., **266**, 2282-2289.
20. Beer de M.C., Zhao Z., Webb N.R., van der Westhuyzen D.R., de Villiers W.J. (2003) J. Lipid Res., **44**(4), 674-685.
21. Feingold K.R., Funk J.L., Moser A.H. et al. (1995) Infect. Immun., **63**, 2041-2046.
22. Victorov A.V., Gladkaya E.M., Novikov D.K. et al. (1989) FEBS Lett., **256**, 155-158.
23. Liao W., Rudling M., Angelin B. (1999) Hepatology, **30**(5), 1252-1256.

Поступила: 17. 09. 2004.

BINDING OF LIPOPOLYSACCHARIDE AND COMPLEXES OF LIPOPOLYSACCHARIDE WITH SERUM LOW DENSITY LIPOPROTEINS TO LIVER MACROPHAGES

A.V. Victorov, V.A. Yurkiv

Laboratory of Molecular Mechanisms of Infections, Central Research Institute of Epidemiology, Novogireevskaya ul., 3a, Moscow, 111123 Russia; tel.: (495) 181-8630; e-mail: farm@newtech.ru

Binding of [³H]-lipopolysaccharide toxin (LPS) and complexes of LPS with serum [¹²⁵I]-labeled low density lipoproteins (LDL) with primary culture of rat liver macrophages (Kupffer cells) has been studied. Total, specific and nonspecific binding was determined. The receptor interaction was shown to dominate for both LPS and LDL-LPS complexes, amounting to 70-77% and 80-85%, respectively. The Scatchard plot was essentially non-linear for LPS binding but linear for LDL-LPS complexes. At the LPS Scatchard graph, however, two regions approximately fitting linear regression could be identified. Those regions correspond to two different types of specific binding sites: the first is for lower toxin concentrations of 0.25-0.50 microg/ml with K_d=0.75 microg/ml; while the second is for higher LPS concentrations of 7.5-15 microg/ml with K_d=5.39 microg/ml. For LDL-LPS complexes only K_d equal to 2.80 microg/ml was ascertained. The LDL-LPS complexes significantly blocked the LPS binding (-40%) while acetylated or oxidized LDLs exerted a less pronounced effect. LPS inhibited binding of LDL-LPS complexes (-60%), while acetylated or oxidized LDLs suppressed interaction of LDL-LPS complexes with Kupffer cells insignificantly. It is suggested that, while binding to the Kupffer cell surface, a substantial portion of both LPS and LDL-LPS complexes share the same scavenger receptors with which, however, modified LDLs interact weakly. The LDL-LPS complexes can interact, apart from receptors common with LPS, with other receptors exhibiting similar binding parameters, with the apo-B/E receptors playing an inessential role.

Key words: lipopolysaccharide, serum lipoproteins, Kupffer cells, receptors.