

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

КИНЕТИКА ЭЛИМИНИРОВАНИЯ КАРБОНИЛ-МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ ИЗ КРОВОТОКА

*А.К. Тихазе, С.П. Домогацкий, В.З. Ланкин**

Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии,
121552, Москва, 3-я Черепковская, 15а; *эл. почта: lankin0309@mail.ru

Исследовали кинетику элиминирования карбонил-модифицированных липопротеинов низкой плотности (ЛНП) из кровотока кроликов с использованием изолированных ЛНП кроликов и человека, подвергнутых предварительному биотинилированию или мечению флуоресцентным красителем ФИТЦ. ЛНП плазмы крови кроликов и человека выделяли при помощи дифференциального ультрацентрифугирования в градиенте плотности, а затем ЛНП метили при помощи биотинилирования или ФИТЦ, после чего модифицировали различными низкомолекулярными природными дикарбонилами: малоновым диальдегидом (МДА), глиоксалью или метилглиоксалью. Нативные (контроль) и дикарбонил-модифицированные биотинилированные или ФИТЦ-меченые ЛНП вводили в ушную вену кроликов, после чего через фиксированные интервалы времени отбирали пробы крови. Для определения содержания биотинилированных ЛНП в плазме крови проводили иммуноферментный анализ; ФИТЦ-меченые ЛНП определяли по спектрам флуоресценции. Установлено, что глиоксаль- и метилглиоксаль-модифицированные ЛНП кроликов и человека циркулируют в кровотоке кроликов практически такое же время, как и нативные (немодифицированные) ЛНП. В то же время, МДА-модифицированные ЛНП кролика и человека экстремально быстро элиминировались из кровотока кроликов. Дикарбонил-модифицированные ЛНП плазмы крови доноров не связываются с клетками кровяного русла — эритроцитами и эндотелиоцитами человека. Показано, что при помощи тест-наборов Oxidized LDL ELISA (“Merckodia”, Швеция) можно идентифицировать преимущественно МДА-модифицированные ЛНП. Установлено, что уровень МДА-модифицированных ЛНП в плазме крови больных ИБС резко снижается в процессе терапии гиполипидемическим препаратом ингибитором PCSK9 (пропротеинконвертаза субтилизин-кексинного типа 9, эвулокумаб), активирующим реутилизацию ЛНП в печени. Эти данные позволяют объяснить экстремально быстрое падение уровня МДА-модифицированных ЛНП их усиленной утилизацией в гепатоцитах. Полученные результаты свидетельствуют о высокой атерогенности глиоксаль- и метилглиоксаль-модифицированных ЛНП, длительно циркулирующих в кровотоке.

Ключевые слова: окислительный стресс; карбонил-модифицированные липопротеины низкой плотности (ЛНП); малоновый диальдегид (МДА); глиоксаль; метилглиоксаль; атеросклероз

DOI: 10.18097/PBMC20206606437

ВВЕДЕНИЕ

Окислительный стресс играет важную роль в этиологии и патогенезе атеросклероза и сахарного диабета [1]. Развитие окислительного стресса сопровождается усиленным генерированием активных форм кислорода и снижением эффективности их утилизации антиоксидантными ферментными системами клеток и тканей [1]. При окислительном стрессе в липид-белковых надмолекулярных комплексах (биомембраны и липопротеины) наблюдается активация свободнорадикальных процессов, вследствие чего происходит накопление первичных продуктов окисления полиеновых липидов — липогидропероксидов, дальнейшая окислительная деструкция которых приводит к образованию α,β -оксоальдегидов, в частности, малонового диальдегида (МДА) [2]. Сопутствующая атерогенезу гиперлипидемия является фактором, провоцирующим интенсификацию свободнорадикальных реакций, в результате которых в плазме крови больных накапливаются как первичные, так и вторичные продукты окисления [1]. Вторичные продукты свободнорадикального окисления полиеновых липидов — низкомолекулярные дикарбонилы

(такие как гидрокси-ноненали и МДА) могут легко реагировать со свободными аминокгруппами лизина апопротеина В-100 в липид-транспортирующих наночастицах плазмы крови — липопротеинах низкой плотности (ЛНП), приводя к модификации их структуры [1]. Химически модифицированные ЛНП (в том числе, МДА-модифицированные) захватываются макрофагами стенки сосудов при участии скэвенджер-рецепторов со значительно большей эффективностью, чем частицы неокисленных ЛНП [3, 4]. Следует отметить, что скорость поглощения макрофагами собственно окисленных ЛНП (частиц ЛНП, обогащённых липогидроперокси-ацилами в фосфолипидах наружного слоя) не отличается от скорости захвата нативных (неокисленных) ЛНП, тогда как захват МДА-модифицированных ЛНП происходит с экстремально быстрой интенсивностью [4]. При диабетической гипергликемии усиливаются процессы окислительных превращений глюкозы, приводящие к накоплению низкомолекулярных дикарбониллов, близких по структуре к МДА, таких как гомолог МДА глиоксаль, образующийся при автоокислении глюкозы и изомер МДА метилглиоксаль, который образуется

при ферментативном окислении триозофосфатов [5] и свободнорадикальном окислении шестиатомных углеводов [6]. Ранее нами было показано, что образующиеся при окислительном катаболизме углеводов глиоксаль-модифицированные ЛНП захватываются культивируемыми макрофагами человека с большей эффективностью, чем МДА-модифицированные ЛНП [7]. Эти наблюдения дали нам право утверждать, что молекулярный механизм повреждения стенки сосудов при сахарном диабете, фактически, не отличается от такового при атеросклерозе, но протекает более интенсивно вследствие большей “атерогенности” глиоксаль- и метилглиоксаль-модифицированных ЛНП [8]. Поскольку дикарбонил-модифицированные ЛНП утилизируются с помощью специальных рецепторов, включая сквенджер-рецепторы, *a priori* можно было полагать, что эти ЛНП должны элиминироваться из кровотока со значительно большей скоростью, чем неокисленные ЛНП. В доступной литературе имеются немногочисленные сведения о клиренсе нативных ЛНП из кровотока человека [9, 10], тогда как данных о скорости элиминации дикарбонил-модифицированных ЛНП из кровотока животных или человека обнаружить не удалось. Исходя из этого, настоящая работа посвящена исследованию клиренса МДА-, глиоксаль- и метилглиоксаль-модифицированных ЛНП кролика и человека, введенных в кровяное русло кроликов.

Предварительные результаты ряда экспериментов были доложены на Всероссийской конференции “Роль свободнорадикальных процессов в этиологии и патогенезе распространенных патологий” (Иркутск, 2016).

МЕТОДИКА

ЛНП выделяли из плазмы крови кроликов при помощи дифференциального ультрацентрифугирования в градиенте плотности [11] с использованием ротора Ti 50 на препаративной ультрацентрифуге Optima XPN-80 (“Beckman Coulter”, США). Солевой раствор ЛНП концентрировали при помощи Sephadex G-100 fine и диализовали против 2000 объемов 100 mM K,Na-фосфатного буфера pH 7,4 в течение 18 ч при 4°C. Концентрацию белка в препаратах ЛНП определяли по методу Лоури. Полученные ЛНП метили при помощи биотинилирования [12], добавляя биотин-сукцинимид в диметилсульфоксиде (ДМСО) из расчёта 100 мкг/мг белка ЛНП и после инкубации в течение 2 ч при комнатной температуре избавлялись от избытка биотина при помощи гель-фильтрации на колонках с Sephadex G25 fine. Биотинилированные ЛНП модифицировали, инкубируя их с МДА, который получали методом кислотного гидролиза из его полуацетала 1,1,3,3-тетраэтоксипропана [4, 13], либо при инкубации в присутствии глиоксаля или метилглиоксаля [4, 7]. От избытка альдегидов после модификации избавлялись с помощью диализа

как описано выше. Для характеристики полученных препаратов ЛНП проводили нефелометрический анализ. Дикарбонил-модифицированные и нативные биотинилированные ЛНП кролика (гомологичные ЛНП) вводили кроликам породы “шиншилла” в ушную вену из расчёта 75 мкг белка ЛНП/кг, после чего через фиксированные интервалы времени отбирали пробы крови с использованием ЭДТА (1 мг/мл) в качестве антикоагулянта и антиоксиданта. Для определения содержания биотинилированных ЛНП в плазме крови животных проводили иммуноферментный анализ с использованием конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена [14]. ЛНП человека изолировали из сыворотки крови здоровых доноров при помощи дифференциального ультрацентрифугирования в градиенте плотности [15], после чего частицы ЛНП метили флуоресцеин изотиоцианатом (ФИТЦ) и от непрореагировавшего ФИТЦ избавлялись при помощи диализа [16]. ФИТЦ-меченые ЛНП человека (гетерологичные ЛНП) вводили в ушную вену кроликов из расчёта 450 мкг белка ЛНП/кг, после чего через фиксированные интервалы времени отбирали пробы крови как описано выше. Измерение флуоресценции проводили в образцах плазмы крови кролика при длине волны возбуждения 495 нм и длине волны испускания 519 нм на спектрофлуориметре Hitachi F-2700 (Япония).

Опыты по клиренсу гомологичных ЛНП кроликов повторяли трижды; опыты по клиренсу гетерологичных ЛНП человека повторяли дважды. В отдельных экспериментах исследовали возможность связывания различных дикарбонил-модифицированных ЛНП с эритроцитами и культивируемыми эндотелиоцитами человека. Эритроциты получали из взятой с ЭДТА (1 мг/мл) донорской крови; культивируемые эндотелиоциты из пупочной вены человека [17] были любезно предоставлены сотрудником лаборатории клеточной адгезии Института экспериментальной кардиологии Национального медицинского исследовательского центра кардиологии (НМИЦ кардиологии) О.А. Антоновой. ФИТЦ-меченые дикарбонил-модифицированные ЛНП плазмы крови человека инкубировали в изотоничном фосфатном буфере pH 7,4 в течение 5 ч при 37°C с суспензией эритроцитов или эндотелиоцитов и, после седиментации клеток в рефрижераторной центрифуге 3-16KL Sigma (США), клетки трижды отмывали физиологическим раствором, а затем лизировали в гипотоничном 50 mM K,Na-фосфатном буфере pH 7,4 с добавлением детергента Triton X-100 после чего флуоресценцию образцов измеряли, как указано выше. Все использованные реактивы были производства “Sigma-Aldrich” (США). Результаты обрабатывали статистически с использованием пакета прикладных программ SPSS 14, представляя данные как среднее \pm стандартное отклонение.

Кроме того, было проведено клиническое исследование, в которое было включено 9 мужчин со стабильной ишемической болезнью сердца (ИБС) в возрасте 59 \pm 10 лет, у которых имелось документированное подтверждение

атеросклеротического поражения не менее одной магистральной коронарной артерии по данным коронароангиографии. Пациенты получали стандартную терапию, включая антиагреганты, β -блокаторы, ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (ИАПФ), антагонисты рецепторов ангиотензина (АРА), причём до начала исследования все пациенты принимали максимально переносимую дозу статинов. Поскольку за время терапии статинами не было достигнуто целевых уровней холестерина ЛНП, пациентам назначали гиполипидемическую терапию с включением ингибитора PCSK₉ (пропротеинконвертаза субтилизин-кексинного типа 9, эволокумаб “Amgen” (США) в дозе 420 мг один раз в месяц). Показатели липидного обмена определяли стандартными методами на химическом анализаторе Architect C8000 (“Abbott”, США) с использованием реактивов этой же фирмы. Уровень окислительно модифицированных ЛНП в плазме крови определяли иммунохимическим методом при помощи тест-наборов Oxidized LDL ELISA (“Mercodia”, Швеция), содержащих моноклональные антитела mAb-4E6 к МДА-модифицированным ЛНП [13]. В отдельном опыте с помощью тест-наборов Mercodia проводили титрование МДА-, глиоксаль- и метилглиоксаль-модифицированных ЛНП плазмы крови доноров.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ STATISTICA 10, применяя непараметрические методы статистического анализа. Статистически достоверными считали различия между группами при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Инкубация дикарбонил-модифицированных биотинилированных ЛНП кролика в плазме крови этих же животных *in vitro* в течение 5 ч показала, что модифицированные ЛНП не подвергаются какой-либо деструкции в присутствии компонентов плазмы крови (данные электрофоретического анализа не приводятся).

Результаты нефелометрии свидетельствуют о том, что нативные ЛНП кролика и глиоксаль-модифицированные ЛНП кролика были представлены исключительно частицами диаметром 30 нм (таблица). В то же время, в образцах МДА-модифицированных и метилглиоксаль-модифицированных ЛНП кролика было обнаружено 2,5% агрегатов частиц, на порядок превышающих размер (>300 нм в диаметре) нативных частиц ЛНП (таблица).

На рисунке 1 представлены результаты исследования скорости элиминирования

биотинилированных нативных и дикарбонил-модифицированных ЛНП кролика из кровотока этих животных (гомологичные ЛНП). Предварительные результаты этих экспериментов были опубликованы ранее [18]. Видно, что содержание биотинилированных нативных, глиоксаль- и метилглиоксаль-модифицированных ЛНП в кровотоке животных резко возрастало сразу же после их введения (рис. 1А), а затем постепенно снижалось в течение последующих 8 ч, причём нами не было выявлено достоверных различий в скорости клиренса нативных, глиоксаль- и метилглиоксаль-модифицированных ЛНП (рис. 1Б, кривые 1-3 соответственно). В то же время, уровень биотинилированных МДА-модифицированных ЛНП кролика в кровотоке резко падает в течение 1 ч после их введения (рис. 1А, кривая 4), а через 2 ч после введения биотинилированные МДА-модифицированные ЛНП в кровотоке кроликов практически не обнаруживаются (рис. 1Б, кривая 4).

Известно, что у человека оборот ЛНП составляет примерно 25-30% в день [9, 10], тогда как, на основании наших расчётов, у кроликов за день из кровотока элиминируется около 50% нативных ЛНП. Таким образом, клиренс нативных ЛНП у кроликов почти вдвое превышает клиренс ЛНП у человека.

Данные по клиренсу ФИТЦ-меченых нативных и дикарбонил-модифицированных ЛНП плазмы крови человека (гетерологичные ЛНП) у кроликов в двух сериях экспериментов представлены на рисунках 2А и 2Б. Необходимо отметить, что клиренс гетерологичных ЛНП человека у кроликов, как и ожидалось, происходит значительно быстрее, чем клиренс гомологичных ЛНП кролика (ср. рис.1 и рис.2).

Несмотря на некоторые различия в элиминации глиоксаль- и метилглиоксаль-модифицированных ЛНП человека из кровотока кроликов в отдельных экспериментах (рис. 2А, 2Б), в целом данные двух серий экспериментов достаточно близки. Более того, следует отметить, что и в этих сериях опытов дикарбонил-модифицированные ЛНП человека (гетерологичные ЛНП) элиминируются из кровотока кроликов почти в 3 раза быстрее, чем дикарбонил-модифицированные ЛНП кролика (гомологичные ЛНП) (ср. рис. 1 и рис. 2). В то же время, клиренс гетерологичных МДА-модифицированных ЛНП (ЛНП человека) у кроликов происходит, как и в случае гомологичных МДА-модифицированных ЛНП (ЛНП кролика), со значительно большей скоростью, чем клиренс других дикарбонил-модифицированных ЛНП (рис. 1, 2).

Таблица. Результаты нефелометрического определения характеристик препаратов нативных и дикарбонил-модифицированных ЛНП кролика (d, нм — диаметр частиц в нанометрах)

d, нм	% объёма фракции ЛНП			
	Нативные ЛНП	Глиоксаль-модифицированные ЛНП	Метилглиоксаль-модифицированные ЛНП	МДА-модифицированные ЛНП
30	100	100	97,5	97,5
> 300	0	0	2,5	2,5

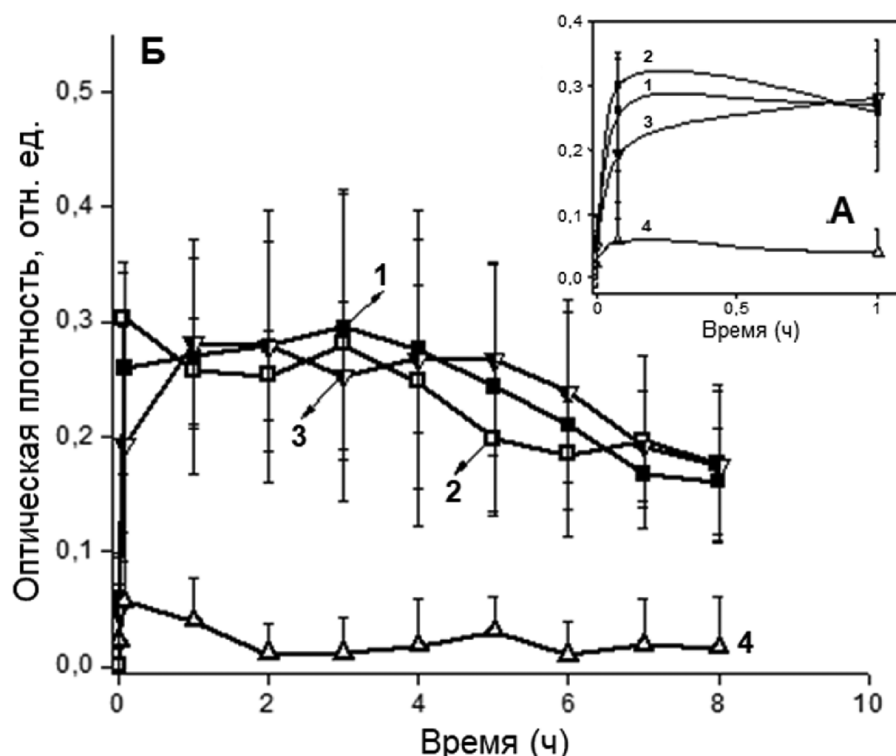


Рисунок 1. Кинетика элиминирования биотинилированных нативных и дикарбонил-модифицированных ЛНП кролика из кровотока этих животных (гомологичные ЛНП): А — в течение первого часа после введения карбонил-модифицированных ЛНП в кровоток кролика; Б — то же, но за весь период наблюдения. 1 — нативные (немодифицированные) ЛНП; 2 — глиоксаль-модифицированные ЛНП; 3 — метилглиоксаль-модифицированные ЛНП; 4 — МДА-модифицированные ЛНП.

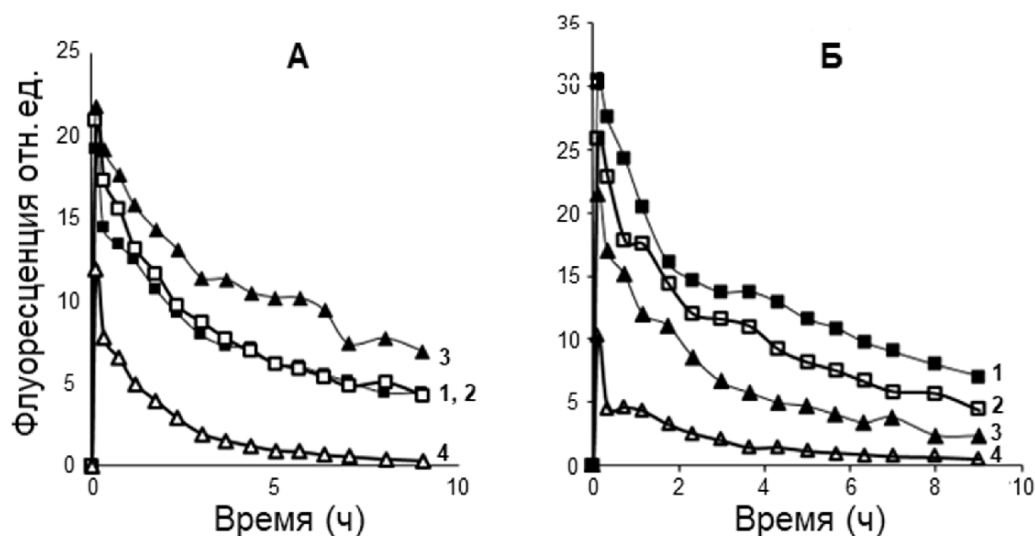


Рисунок 2. Кинетика элиминирования ФИТЦ-меченых нативных и дикарбонил-модифицированных ЛНП плазмы крови человека (гетерологичные ЛНП) из кровотока кроликов в двух независимых сериях (А, Б) экспериментов: 1 — нативные (немодифицированные) ЛНП; 2 — глиоксаль-модифицированные ЛНП; 3 — метилглиоксаль-модифицированные ЛНП; 4 — МДА-модифицированные ЛНП.

Поскольку дикарбонил-модифицированные ЛНП легко агрегируют [19], можно было полагать, что частицы модифицированных ЛНП могут связываться не только друг с другом (как это происходит в процессе агрегации), но и с биомембранами клеток в сосудах, таких как красные кровяные клетки и эндотелиальные клетки. Вследствие того, что МДА-модифицированные ЛНП,

согласно нашим данным, агрегируют значительно быстрее, чем глиоксаль- и метилглиоксаль-модифицированные ЛНП [19], экстремально высокую скорость элиминирования МДА-модифицированных ЛНП из кровотока животных можно было бы объяснить повышенной способностью этих ЛНП связываться с клетками сосудистого русла.

Тем не менее, как видно из рисунка 3, все исследованные дикарбонил-модифицированные ФИТЦ-меченые ЛНП плазмы крови человека, включая МДА-модифицированные ЛНП, практически не связываются ни с красными кровяными клетками (рис. 3А), ни с эндотелиальными клетками (рис. 3Б) человека.

Проведённые нами эксперименты показали, что тест-наборы Oxidized LDL ELISA ("Mercodia") способны преимущественно идентифицировать МДА-модифицированные ЛНП плазмы крови человека, в то время как для выявления нативных (неокисленных) ЛНП и глиоксаль- или метилглиоксаль-модифицированных ЛНП этот метод менее пригоден (рис. 4).

При исследовании пациентов, получавших холестерин-снижающий препарат эволокумаб (ингибитор PCSK9), вызывающий экспрессию рецепторов ЛНП в клетках печени и, тем самым, приводящий к резкому снижению уровня атерогенных (обогащенных холестерином) ЛНП в плазме крови, мы одновременно обнаружили весьма значительное снижение уровня окислительно модифицированных ЛНП, определяемых тест-наборами Oxidized LDL ELISA ("Mercodia"), то есть, исходя из приведённых на рисунке 4 данных, снижение уровня МДА-модифицированных ЛНП (рис. 5). Предварительные данные этих исследований были частично опубликованы ранее [20]. Эти результаты указывают на то, что обнаруженная в нашем исследовании высокая скорость элиминации МДА-модифицированных ЛНП из кровотока млекопитающих (рис. 1, 2) объяснима высокой скоростью реутилизации этих ЛНП в печени. В то же время, глиоксаль-модифицированные и метилглиоксаль-модифицированные ЛНП способны циркулировать в кровотоке млекопитающих практически столь же долго, что и нативные

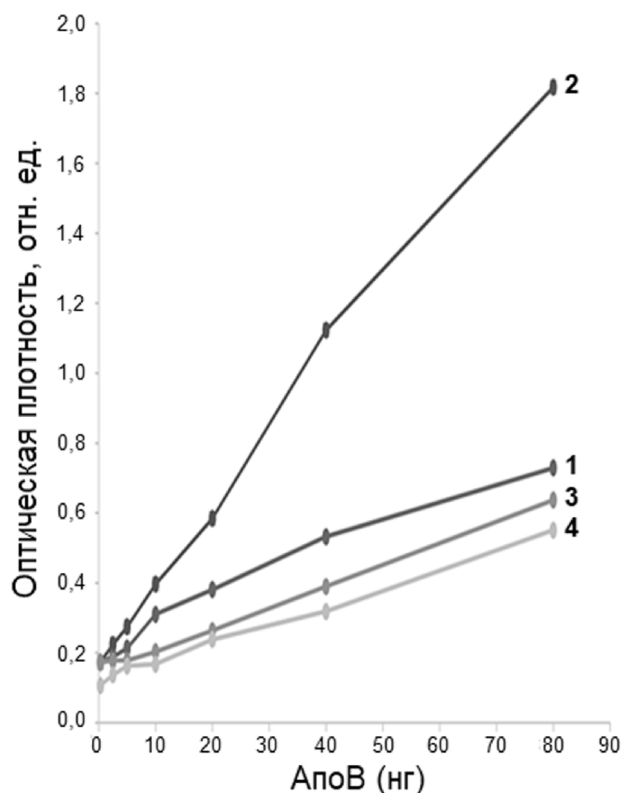


Рисунок 4. Концентрационные кривые связывания различных дикарбонил-модифицированных ЛНП с антителами, содержащимися в тест-наборах Oxidized LDL ELISA ("Mercodia").

1 — нативные (немодифицированные) ЛНП;
2 — МДА-модифицированные ЛНП;
3 — глиоксаль-модифицированные ЛНП;
4 — метилглиоксаль-модифицированные ЛНП.

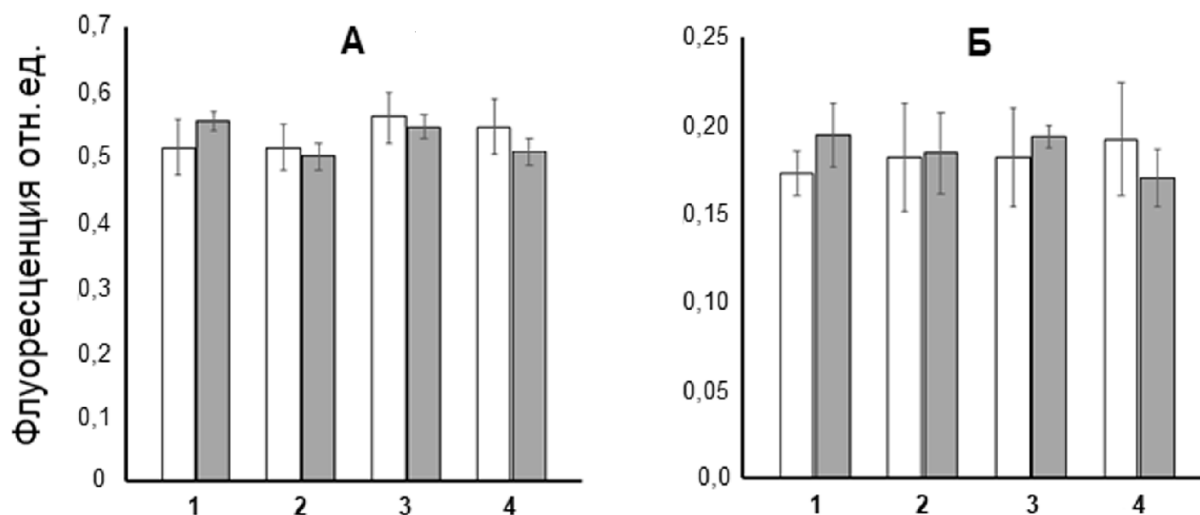


Рисунок 3. Связывание ФИТЦ-меченых нативных и дикарбонил-модифицированных ЛНП плазмы крови человека с эритроцитами человека (А) и культивируемыми эндотелиоцитами пупочной вены (Б): светлые столбики — инкубация клеток с немечеными ЛНП; темные столбики — инкубация клеток с ФИТЦ-мечеными ЛНП. 1 — нативные (немодифицированные) ЛНП; 2 — глиоксаль-модифицированные ЛНП; 3 — метилглиоксаль-модифицированные ЛНП; 4 — МДА-модифицированные ЛНП (различия между светлыми и темными столбиками, а также между столбиками 1 и 2-4 на рисунке 3А и рисунке 3Б статистически недостоверны; $p > 0,05$).

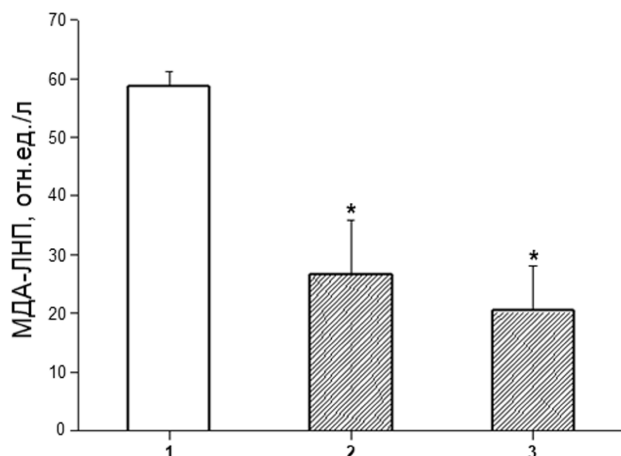


Рисунок 5. Изменение уровня окислительно модифицированных ЛНП (преимущественно МДА-модифицированных ЛНП, определяемых тест-набором Oxidized LDL ELISA (“Merckodia”) в плазме крови больных ИБС после терапии ингибитором PCSK₉ — эволюмабом фирмы Amgen (420 мг/мес). 1 — до начала терапии; 2 — через 1,5-4 месяца после начала терапии; 3 — через 9-13,5 месяцев после начала терапии. * — $p < 0,05$ (достоверность отличий от уровня до начала терапии).

(неокисленные) ЛНП (рис. 1, 2). Следовательно, глиоксаль-модифицированные и метилглиоксаль-модифицированные ЛНП могут быть значительно более “атерогенны”, чем МДА-модифицированные ЛНП, что согласуется с ранее полученными нами данными о преимущественном захвате этих ЛНП культивируемыми макрофагами [7]. Исходя из этого, понятно усиление атерогенеза при наличии сахарного диабета, поскольку гипергликемия способствует накоплению глиоксаля и метилглиоксаля, что, в свою очередь, вызывает усиленное образование глиоксаль- и метилглиоксаль-модифицированных ЛНП, захват которых клетками стенки сосудов (макрофагами и плейоморфными гладкомышечными клетками) и вызывает образование атеросклеротических повреждений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что глиоксаль- и метилглиоксаль-модифицированные ЛНП, по всей вероятности, являются более “атерогенными”, чем МДА-модифицированные ЛНП, поскольку время их полужизни сравнимо с таковым нативных (немодифицированных) ЛНП и их длительная циркуляция в кровяном русле увеличивает вероятность их захвата клетками стенки сосудов. Результаты этого и наших предшествующих исследований [8, 21] хорошо согласуются с представлением о прогрессировании атерогенеза при увеличении уровня глиоксаля и метилглиоксаля в процессе возникновения карбонильного стресса (резкое увеличение содержания низкомолекулярных карбонильных соединений), сопутствующего развитию сахарного диабета.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны докт. биол. наук К.Б. Шумаеву, канд. биол. наук Г.Г. Коноваловой и М.А. Гречниковой за помощь в работе и участие в предварительном обсуждении результатов, а также канд. мед. наук Ю.А. Шуваловой за предоставление для исследования образцов крови пациентов, получавших холестерин-снижающую терапию с включением эволюмаба.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта №14-15 00245 П Российского научного фонда.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты на животных проводили в соответствии с Международными рекомендациями “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях” (The European Convention, 1986). У пациентов, включённых в исследование, предварительно было получено письменное информированное согласие. Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом НМИЦ кардиологии (протокол №19 от 22 марта 2017 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lankin V.Z., Tikhaze A.K. (2017) Curr. Aging Sci., **10**(1), 18-25.
2. Witz G. (1989) Free Rad. Biol. Med., **7**(3), 333-349.
3. Goldstein J.L., Brown M.S. (2009) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., **29**(4), 431-438.
4. Lankin V.Z., Tikhaze A.K., Kumskova E.M. (2012) Mol. Cell. Biochem., **365**(1-2), 93-98.
5. Niedowicz D.M., Daleke D.L. (2005) Cell Biochem. Biophys., **43**(2), 289-330.
6. Lankin V.Z., Shadyro O.I., Shumaev K.B., Tikhaze A.K., Sladkova A.A. (2019) J. Antioxidant Activity, **1**(4), 34-45.
7. Lankin V.Z., Tikhaze A.K., Konvalova G.G., Kumskova E.M., Shumaev K.B. (2010) In: Handbook of Lipoprotein Research (Rathboun J.E., ed.), NOVA Sci. Publish., Inc., NY, pp. 85-107.
8. Lankin V.Z., Konvalova G.G., Tikhaze A.K., Shumaev K.B., Kumskova E.M., Viigmaa M. (2014) Mol. Cell. Biochem., **395**(1-2), 241-252.
9. Gylling H., Kontula K., Miettinen T.A. (1995) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., **15**(2), 208-213.
10. Miettinen T.A., Gylling H., Vanhanen H., Ollus A. (1992) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., **12**(9), 1044-1052.
11. Lindgren F.T. (1975) In: Analysis of Lipids and Lipoproteins. (Perkins E.G., ed.), Champain (Ill.): Amer. Oil. Chemists' Soc., pp. 204-224.
12. Bayer E.A., Wilchek M. (1990) Meth. Enzymol., **184**, 138-160.

13. Requena J.R., Fu M.X., Ahmed M.U., Jenkins A.J., Lyons T.J., Baynes J.W., Thorpe S.R. (1997) *Biochem.J.*, **322**(Pt.1), 317-325.
14. Cartun R.W., Pedersen C.A. (1989) *Annual J. Histotechnol.*, **12**(4), 273-277.
15. Tertov V.V., Kaplun V.V., Dvoryantsev S.N., Orekhov A.N. (1995) *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **214**(2), 608-613.
16. Staines W.A., Meister B., Melander T., Nagy J.I., Hokfelt T.J. (1988) *Histochem. Cytochem.*, **36**(2), 145-151.
17. Antonov A.S., Nikolaeva M.A., Klueva T.S., Romanov Y.A., Babaev V.R., Bystrevskaya V.B., Perov N.A., Repin V.S., Smirnov V.N. (1986) *Atherosclerosis*, **59**, 1-19.
18. Гречникова М.А., Домогацкий С.П., Коновалова Г.Г., Тихазе А.К., Ланкин В.З. (2016) *Бюлл. ВСНЦ СО РАМН*, **1**(3), 104-108. [Grechnikova M.A., Domogatskiy S.P., Konovalova G.G., Tikhaze A.K., Lankin V.Z. (2016) *Bull. VSNZ SO RAMN*, **1**(3), 104-108.]
19. Кумскова Е.М., Аксенов Д.В., Коновалова Г.Г., Тихазе А.К., Ланкин В.З. (2012) *Кардиология*, **52**(6), 61-66. [Kumskova E.M., Aksenov D.V., Konovalova G.G., Tikhaze A.K., Lankin V.Z. (2012) *Kardiologiya*, **52**(6), 61-66.]
20. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Вуйгимаа М., Чазова И.Е. (2018) *Тер. архив*, **90**(9), 27-30. [Lankin V.Z., Tikhaze A.K., Viigimaa M., Chazova I.E. (2018) *Ter. arhiv*, **90**(9), 27-30.]
21. Ланкин В.З., Коновалова Г.Г., Тихазе А.К., Шумаев К.Б., Белова-Кумскова Е.М., Греchnikova M.A., Viigimaa M. (2016) *J. Diabetes.*, **8**(3), 398-404.

Поступила в редакцию: 13. 07. 2020.
После доработки: 21. 10. 2020.
Принята к печати: 22. 10. 2020.

ELIMINATION KINETICS OF CARBONYL-MODIFIED LOW DENSITY LIPOPROTEINS FROM BLOODSTREAM

A.K. Tikhaze, S.P. Domogatsky, V.Z. Lankin*

National Medical Research Center for Cardiology of Ministry of Health of Russian Federation,
15A, 3-ya Cherepkovskaya, Moscow, 121552 Russia; *e-mail: lankin0309@mail.ru

The elimination kinetics of carbonyl-modified low density lipoproteins (LDL) from rabbit bloodstream was studied using isolated LDL of rabbits and humans after preliminary biotinylation or labeling with FITZ. LDL from rabbit or human blood plasma were isolated using differential ultracentrifugation in a density gradient, and then LDL were labeled using biotinylation or FITZ, after which they were modified with various low molecular weight natural dicarbonyls: malondialdehyde (MDA), glyoxal or methylglyoxal. Native and dicarbonyl-modified biotinylated or FITZ-labeled LDL were injected into the ear vein of rabbits and blood samples were taken at certain intervals. To determine the content of biotinylated LDL in blood plasma, an enzyme immunoassay was performed; FITZ-labeled LDL were determined by spectra fluorescence. It is shown that glyoxal- and methylglyoxal-modified LDL in rabbits and humans circulated in the bloodstream for almost the same time as native (unmodified) LDL. At the same time, MDA-modified rabbit and human LDL were extremely quickly eliminated from the rabbit bloodstream. Dicarbonyl-modified LDL from the donors blood plasma were not associated with the red blood cells and endothelial cells. It has been shown that using the kits Oxidized LDL ELISA ("Mercodia", Sweden), it is possible to identify mainly MDA-modified LDL. The level of MDA-modified LDL in the blood plasma of CHD patients sharply decreases during therapy with the hypocholesterolemic drug the PCSK₉ inhibitor (evolokumab), which activates LDL reutilization in the liver cells. These results explain the extreme drop in the level of MDA-modified LDL by their increased utilization in hepatocytes. The results obtained indicate a high atherogenicity of glyoxal- and methylglyoxal-modified LDL, long-term circulating in the bloodstream.

Key words: oxidative stress; modified LDL; MDA; glyoxal; methylglyoxal; atherosclerosis

Funding. This work was carried out with partial financial support from the Russian Science Foundation (grant No. 14-15 00245).

Received: 13.07.2020, revised: 21.10.2020, accepted: 22.10.2020.