

Множественная модификация липопротеидов низкой плотности при сахарном диабете*

Бородачев Е.Н.¹, Собенин И.А.¹, Карагодин В.П.², Бобрышев Ю.В.¹, Орехов А.Н.^{1,2}

¹ — ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, д.8, тел. +7(499)6012181; e-mail: niioopp@mail.ru

² — Научно-исследовательский институт атеросклероза, Инновационный центр Сколково, Москва, 143025, ул. Новая, д.100, тел. +7(495)4120113, +7(495)4121557; e-mail: office@inat.ru

Преждевременное появление и быстрое развитие атеросклероза сопутствует сахарному диабету. Сердечно-сосудистые заболевания остаются лидирующей причиной заболеваемости и смертности среди больных диабетом. Отложение внутриклеточных липидов в сосудистой стенке является характерной чертой атеросклеротического поражения на клеточном уровне. Считается, что источником накопления внутриклеточных липидов являются липопротеиды низкой плотности (ЛНП), при этом ЛНП должны быть каким-то образом химически модифицированы, чтобы оказывать атерогенный эффект. В этой статье объединены данные об атерогенных модификациях ЛНП, встречающихся у больных диабетом. ЛНП больных диабетом, в отличие от ЛНП здоровых людей, вызывают значительное увеличение содержания внутриклеточного холестерина в культуре клеток интимы аорты человека, т.е. производят прямой атерогенный эффект. Результаты исследований показали, что *in vivo* модифицированные атерогенные ЛНП в отличие от нативных ЛНП, имеют меньший размер, более высокую плотность и электроотрицательный заряд, являются десИАлированными и гликозилированными.

Ключевые слова: сахарный диабет, атеросклероз, модифицированные липопротеиды низкой плотности, неферментативное гликозилирование, десИАлирование, накопление внутриклеточного холестерина

Введение

Поздние стадии сахарного диабета включают в себя множество клинических осложнений, в основном затрагивающих стенки крупных (макроангиопатия) и малых сосудов (микроангиопатия), а также периферическую нервную систему (нейропатия). Считается, что макроангиопатия имеет атеросклеротическую природу [8], хотя в артериях наблюдаются некоторые патоморфологические изменения, специфичные только для диабета [30, 31]. Хотя сердечно-сосудистые заболевания и не являются обязательными для диабета, они встречаются намного чаще среди больных диабетом 1-го и 2-го типа, чем у людей без диабета [19, 29]. Преждевременное возникновение и быстрое прогрессирование атеросклероза является характерной особенностью сахарного диабета, как это было продемонстрировано во множестве эпидемиологических исследований [20, 27, 65, 69]. Более того, сердечно-сосудистые заболевания остаются лидирующей причиной заболеваемости и смертности у пациентов с инсулинозависимым (1-й тип) и инсулинонезависимым (2-й тип) сахарным диабетом [14, 21, 39].

Однако механизмы раннего атерогенеза у больных диабетом остаются неясными. Отложение внутриклеточных липидов, в основном свободного и этерифицированного холестерина, в сосудистой стенке является характерной особенностью раннего атеросклеротического поражения на клеточном уровне [6, 47]. Полагается, что липопротеиды низкой плотности (ЛНП) являются источником накопления внутриклеточных липидов, при этом, для того, чтобы ЛНП оказывали атерогенный эффект, они

должны быть некоторым образом химически модифицированы [28]. Доказательства, что некоторые формы модифицированных ЛНП встречаются *in vivo*, быстро накапливаются, хотя их клиническое значение остается неопределенным. В этом обзоре мы попытались обобщить последние данные об атерогенных модификациях ЛНП, встречающихся при сахарном диабете.

Атерогенность ЛНП больных диабетом

Эксперименты в большинстве исследований планировались с учетом следующих предположений:

1) в атеросклерозе, развивающемся в интимальном слое человеческой аорты и мышечных клетках, играют значительную роль процессы отложения внутриклеточных липидов [2, 41, 57];

2) клетки, выделенные из интимы аорты человека, сохраняют свои свойства в культуре довольно продолжительное время (до 7–14 дней) [42, 49]. Одним из этих свойств является способность клеток накапливать липиды в присутствии таких добавок, как сыворотка крови [11, 48] или ЛНП [44, 59], полученные от больных атеросклерозом.

Взятые вместе, эти данные позволяют заключить, что культивируемые клетки интимы аорты человека являются подходящим объектом для исследований атеросклеротических внутриклеточных изменений.

Некоторое время назад была разработана клеточная методика, которая позволила нам оценить так называемый атерогенный потенциал биологических жидкостей. Дальнейшие исследования показали, что сыворотка кро-

* Работа была поддержана Министерством образования и науки РФ

ви, полученная не только от больных атеросклерозом, но и больных диабетом, обладает атерогенными свойствами, что приводит к отложению внутриклеточных липидов [52]. И, наоборот, сыворотка крови, полученная от здоровых доноров, как правило, не вызывает накопления липидов в культуре клеток [11, 48]. Что касается больных сахарным диабетом, то в нашем исследовании (180 пациентов) сыворотка крови, полученная от 55% больных диабетом 1-го типа и почти от 90% больных диабетом 2-го типа, обладала атерогенным эффектом. В среднем сыворотка крови больных сахарным диабетом увеличивала содержание внутриклеточного холестерина на 75%.

Возник вопрос: связаны ли атерогенные свойства сыворотки крови с липопротеидами? Для ответа на этот вопрос из атерогенной сыворотки были выделены липопротеиды низкой плотности, липопротеиды очень низкой плотности и липопротеиды высокой плотности. Дилипидированная сыворотка крови (лишенная всех липидосодержащих частиц) полностью потеряла свой атерогенный потенциал. Среди всех классов липопротеидов только фракция ЛНП ($\rho = 1,019-1,063$ г/мл) обладала атерогенными свойствами. Важно заметить, что ЛНП, выделенные из неатерогенных сывороток крови, не влияли на содержание внутриклеточных липидов. В отличие от этого, ЛНП, выделенные из атерогенных сывороток, оказались атерогенными в 90% случаев. Серьезная положительная корреляция в отношении вызывания накопления холестерина была выявлена между сывороткой крови и соответствующими ЛНП ($r = 0,89$, $p < 0,001$) [54]. Таким образом, стало возможным сделать вывод, что атерогенность сыворотки крови в основном обуславливалась ЛНП. Кроме того, эти данные можно рассматривать как существенный признак того, что ЛНП больных сахарным диабетом могут быть модифицированы, учитывая, что нативные ЛНП от большинства здоровых доноров не вызывали накопления внутриклеточных липидов.

Неферментативное гликозилирование ЛНП

Неферментативное гликозилирование белков — это сложная химическая реакция, приводящая к формированию стабильной связи между молекулой глюкозы и аминокислотной группой белка. При диабете гипергликемия может вызывать значительное увеличение гликозилированных продуктов. Связь между гипергликемией и сердечно-сосудистыми заболеваниями предполагалась в некоторых [32], но не всех [40], исследованиях больных сахарным диабетом 1-го типа. Н.К. Kim и I.V. Kucur первыми продемонстрировали повышенный уровень фруктозил-лизина в ЛНП больных диабетом [23]. Было показано, что у индивидов с гипергликемией происходит неферментативное гликозилирование всех классов аполипидов, включая апо-В [13]. М.Ф. Lopes-Virella с соавторами показали, что ЛНП, гликозилированные *in vitro*, способны вызывать накопление этерифицированного холестерина в первичной культуре моноцитов-макрофагов человека [33]. Схожим образом *in vitro* гликозилированные нормальные ЛНП оказали такой же эффект на культуру клеток интимы аорты человека [62]. ЛНП, выделенные из сыворотки крови больных диабетом 1-го типа, стимулировали отложение холестерина в культивируемых моноцитах-макрофагах человека, и этот эффект хорошо коррелировал со степенью неферментативного гликозилирования ЛНП [36].

Мы показали, что увеличение количества остатков фруктозил-лизина в 2—2,5 раза во время *in vitro* гликозилирования привело к способности изначально неатерогенных ЛНП вызывать умеренное, но значимое накопление холестерина в культуре клеток (до 35% выше начального уровня) (неопубликованные данные). *In vitro* гликозилирование ЛНП сопровождалось практически эквивалентным уменьшением количества свободных аминокислотных групп (неопубликованные данные), так как глюкоза образует Шиффовы основания и перегруппировки Амадори предположительно с ϵ -аминогруппами лизина. Считается, что остатки лизина играют важную роль в определении третичной структуры аполипидов, и уменьшение их количества может влиять на взаимодействие липопротеид-клетка [15, 37].

В ЛНП больных сахарным диабетом наблюдалось усиление неферментативного гликозилирования, в среднем, количество фруктозил-лизина было увеличено на 25% в сравнении с ЛНП здоровых доноров [54]. Следует отметить, что значительная положительная корреляция была выявлена между количеством фруктозил-лизина в ЛНП больных диабетом и их атерогенным эффектом ($r = 0,57$, $p < 0,01$). Таким образом, неферментативное гликозилирование само по себе является атерогенной модификацией ЛНП больных диабетом, встречающейся *in vivo*.

Однако, увеличение количества гликозилированного апо-В у больных диабетом не является существенно высоким, а иногда даже не наблюдается [26], и атерогенный эффект неферментативно гликозилированных ЛНП достаточно умеренный. В совокупности эти причины не позволяют приписать гликозилированным ЛНП ведущую роль в инициации и прогрессировании атеросклеротического процесса. Были сделаны многочисленные попытки объяснить значение гликозилированных ЛНП в атерогенезе, например, вероятен измененный метаболизм гликозилированных апо-В у больных диабетом [35, 73]. Метаболические отклонения, ассоциированные с гликозилированием ЛНП, включают в себя снижение узнаваемости ЛНП классическим ЛНП-рецептором [22, 24, 34], замедление избавления плазмы от ЛНП [58, 72], увеличение поглощения ЛНП макрофагами, усиление агрегации тромбоцитов [70], усиление ковалентной связи ЛНП с сосудистой стенкой [7] и возникновение свободных форм кислорода [17], возможно, приводящих к окислительному стрессу как липидной, так и белковой части ЛНП [66]. Однако реальная роль неферментативно гликозилированных ЛНП в развитии атеросклероза далека от понимания.

ЛНП с низким содержанием сиаловой кислоты при диабете

Десиалированные ЛНП являются еще одним известным типом модифицированных липопротеидов, встречающимся *in vivo*. Ранее было показано, что ЛНП, *in vitro* обработанные с помощью нейраминидазы, утрачивают значительную часть сиаловой кислоты, что делает их способными вызывать массивное накопление липидов в культивируемых моноцитах-макрофагах [9] и гладкомышечных клетках интимы [46]. Дальнейшие клинические исследования показали, что ЛНП от пациентов с атеросклерозом характеризуются пониженным содержанием сиаловой кислоты, причем уровень сиаловой кислоты обратно коррелирует с атерогенными эффектами ЛНП, исследован-

ными в культуре клеток [45]. Однако, пониженный уровень содержания сиаловой кислоты наблюдался не только у больных атеросклерозом, но также и у больных сахарным диабетом. В наших исследованиях до 90% случаев были охарактеризованы снижением уровня содержания сиаловой кислоты в ЛНП в среднем на 30% по сравнению с ЛНП здоровых доноров [54]. Интересно, что значительная обратная корреляция наблюдалась между уровнем содержания сиаловой кислоты в ЛНП и их атерогенностью, выявленной в культуре клеток ($r = -0,51$, $p < 0,001$) [54]. Эти данные позволили предположить, что десиалирование (или любой другой процесс, приводящий к образованию ЛНП с пониженным содержанием сиаловой кислоты) является дополнительным, если не доминирующим, путем модификации ЛНП при сахарном диабете. Механизмы десиалирования пока не раскрыты. В крови больных атеросклерозом или диабетом не обнаружили какое-либо значимое увеличение нейраминидазной активности, но наблюдали повышенный уровень свободной сиаловой кислоты в плазме крови при различных патологических состояниях, включая атеросклероз [1, 12, 38]. С другой стороны, десиалированные ЛНП могут возникать в крови в результате нарушенного посттрансляционного гликозилирования апо-В гепатоцитов, но этот возможный механизм совсем не исследован и может рассматриваться только как предположение. Предварительные данные, полученные в исследовании модификации ЛНП с использованием меченых предшественников показали, что десиалированные ЛНП могут быть стареющими липопротеидами [43], и в этом случае десиалирование может происходить в результате длительного циркулирования или поглощения ЛНП в тканях.

Физико-химическая и функциональная разнородность ЛНП при диабете

Для выделения ЛНП с низким содержанием сиаловой кислоты из крови человека была разработана методика аффинной хроматографии лектинов [64]. Этот метод был основан на предположении, что если апо-В лишен сиаловой кислоты, он начинает экспрессировать галактозу в качестве сахара в его полисахаридной составляющей. *Ricinus communis agglutinin* (RCA120), лектин, выделенный из клебевины, способен связываться с гликопротеинами, на терминальном конце полисахаридной цепочки которых находится остаток галактозы. Будучи ковалентно связанным с агарозной матрицей, он позволяет аффинно выделять десиалированные ЛНП. Фракция десиалированных ЛНП была обнаружена в крови больных атеросклерозом и охарактеризована в деталях [18, 50, 60, 61, 63]. Аналогично, ЛНП пациентов с сахарным диабетом можно легко разделить на две фракции: с высоким и низким уровнем содержания сиаловой кислоты. Оказалось, что количество десиалированных ЛНП значительно выше у больных диабетом, чем у здоровых людей (в среднем 35% против 12%) [54, 55].

ЛНП с высоким содержанием сиаловой кислоты, не связавшиеся аффинно с гелем, оказались почти идентичны нативным ЛНП, полученным от здоровых доноров, и имели практически нормальный уровень сиаловой кислоты. Что касается других физико-химических параметров, таких, как неферментативное гликозилирование, содержание свободного и этерифицированного холестерина,

электрофоретическая подвижность, плотность и размер частиц, не было обнаружено существенных отличий от нативных ЛНП. Эти ЛНП не вызывали значимого накопления холестерина в культуре клеток интимы человека, несмотря на атерогенность общего препарата ЛНП [54, 55].

Для связанных ЛНП (десиалированных или с низким содержанием сиаловой кислоты) картина резко меняется. Снижение содержания сиаловой кислоты (на 25–60% в сравнении с несвязанными ЛНП) оказалось не единственной характеристикой этой подфракции ЛНП. Фракция десиалированных ЛНП также имела пониженное содержание нейтральных липидов (особенно этерифицированного холестерина) и повышенный уровень лизофосфолипидов [54, 55]. Еще одной важной находкой было то, что десиалированные ЛНП оказались значительно более гликозилированными, чем несвязанные (с высоким уровнем сиаловой кислоты): количество остатков фруктозил-лизина было в 1,3–1,7 раза выше. Ранее мы показали, что *in vitro* модификация нативных ЛНП одновременно несколькими способами (т.е. неферментативное гликозилирование и десиалирование) приводит к неожиданному сильному увеличению атерогенности, в сравнении с ЛНП модифицированными единственным способом [56]. Другими словами, десиалирование и гликозилирование производят синергетический эффект на атерогенность ЛНП. Можно было бы ожидать, что фракция связанных ЛНП, которые также гликозилированы, ответственна за высокий атерогенный потенциал ЛНП больных диабетом. Действительно, связанные ЛНП приводили к 2,5–4,7-кратному увеличению содержания внутриклеточного холестерина, когда общий препарат ЛНП приводил к увеличению количества холестерина только в 1,4–2,3 раза [54, 55]. Более низкая атерогенность общего препарата ЛНП может быть объяснена присутствием значительного количества немодифицированных ЛНП.

Также были получены данные о других характеристиках фракции модифицированных ЛНП при диабете. С помощью электрофореза на градиентном полиакриламидном геле при неденатурирующих условиях было показано, что размер частиц связанных ЛНП на 0,5–2,3 нм меньше несвязанных ЛНП [53]. Связанные ЛНП были также охарактеризованы повышенной плотностью раствора, что было продемонстрировано с помощью градиентного ультрацентрифугирования [53]. Эти результаты хорошо коррелируют с данными об уменьшенном содержании липидов в этой фракции ЛНП. Следует отметить, что способность связанных ЛНП вызывать накопление холестерина в культуре клеток значительно усиливается в соответствии с увеличением плотности. Утверждается, что присутствие малых, плотных ЛНП в кровотоке человека тесно связано с развитием атеросклероза [5, 10, 25]. Приняв во внимание высокий атерогенный эффект связанных ЛНП, выявленный в культуре клеток, можно предположить, что малый размер и увеличенная плотность являются типичными атрибутами модифицированных ЛНП.

Кроме того, связанные ЛНП были охарактеризованы увеличенным электроотрицательным поверхностным зарядом, если судить по повышенной электрофоретической подвижности. Более электроотрицательная фракция ЛНП была выделена из крови больных атеросклерозом и охарактеризована как фракция модифицированных атеро-

генных ЛНП [3, 4, 16]. Необходимо заметить, что многочисленные методики *in vitro* модификации ЛНП (такие, как ацетилирование [67], метилирование [71], ацето-ацетилирование [68], металл-зависимое окисление, обработка малондальдегидом и глутаральдегидом [51] и т.д.) приводят к формированию анионных ЛНП, таким образом придавая им атерогенный эффект. Возможно, поверхностный заряд ЛНП играет важную роль во взаимодействии липопротеид—клетка, и изменения заряда могут значительно изменить внутриклеточный метаболизм ЛНП, приводя к отложению липидов.

Заключение

Результаты исследований, в том числе собственных, позволяют заключить, что в крови больных диабетом существует фракция модифицированных ЛНП наряду с нативными. Появляющиеся естественным путем модифицированные ЛНП имеют отличия в физико-химических свойствах:

- 1) они являются десалированными и неферментативно гликозилированными липопротеидами;
- 2) они являются более малыми по размеру и плотными ЛНП;
- 3) они более электроотрицательны, чем нативные ЛНП;
- 4) они атерогенны в отношении вызывания накопления внутриклеточного холестерина.

Таким образом, открытую атерогенную фракцию липопротеидов можно называть множественно модифицированными ЛНП и приписать им значимую роль в преждевременном развитии атеросклероза при сахарном диабете. Однако источник и дальнейший метаболизм этих *in vivo* модифицированных ЛНП еще предстоит изучить.

Список литературы

1. Abdella N., Akanji A.O., Mojiminiyi O.A., Al Assoussi A., Moussa M. Relation of serum total sialic acid concentrations with diabetic complications and cardiovascular risk factors in Kuwaiti Type 2 diabetic patients // *Diabetes Res. Clin. Pract.* — 2000. — Vol. 50(1). — P. 65–72.
2. Andreeva E.R., Orekhov A.N., Smirnov V.N. Quantitative estimation of lipid-laden cells in atherosclerotic lesions of the human aorta // *Acta Anat. Basel.* — 1991. — Vol. 141. — P. 316–323.
3. Avogaro P., Bon G.B., Cazzolato G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans // *Arteriosclerosis.* — 1988. — Vol. 8. — P. 79–87.
4. Avogaro P., Cazzolato G., Bittolo Bon G. Some questions concerning a small, more electronegative LDL circulating in human plasma // *Atherosclerosis.* — 1991. — Vol. 91. — P. 163–171.
5. Ban Y., Koba S., Tsunoda F. et al. Predominance of small dense low-density lipoproteins and abnormal glucose regulation in patients with acute coronary syndrome // *Circ. J.* — 2006. — Vol. 70(4). — P. 393–401.
6. Born G.V., Medina R., Shafi S., Cardona-Sanclemente L.E. Factors influencing the uptake of atherogenic plasma proteins by artery walls // *Biorheology.* — 2003. — Vol. 40(1–3). — P. 13–22.
7. Brownlee M., Vlassara H., Cerami A. Nonenzymatic glycosylation products on collagen covalently trap low-density lipoprotein // *Diabetes.* — 1985. — Vol. 34. — P. 938–941.
8. Burchfiel C.M., Reed D.M., Marcus E.B., Strong J.P., Hayashi T. Association of diabetes mellitus with coronary atherosclerosis and myocardial lesions. An autopsy study from the Honolulu Heart Program // *Am. J. Epidemiol.* — 1993. — Vol. 137. — P. 1328–1340.
9. Camejo G., Lopez A., Lopez F., Quinones J. Interaction of low density lipoproteins with arterial proteoglycans. The role of charge and sialic acid content // *Atherosclerosis.* — 1985. — Vol. 55. — P. 93–105.

10. Chait A., Brazg R.L., Tribble D.L., Krauss R.M. Susceptibility of small, dense, low-density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, pattern B // *Am. J. Med.* — 1993. — Vol. 94. — P. 350–356.
11. Chazov E.I., Tertov V.V., Orekhov A.N., Lyakishev A.A., Petrova N.V., Kurdanov K.A., Khashimov K.A., Novikov I.D., Smirnov V.N. Atherogenicity of blood serum from patients with coronary heart disease // *Lancet.* — 1986. — Vol. 2. — P. 595–598.
12. Crook M.A., Tutt P., Simpson H., Pickup J.C. Serum sialic acid and acute phase proteins in type 1 and type 2 diabetes mellitus // *lin. Chim. Acta.* — 1993. — Vol. 219. — P. 131–138.
13. Curtiss L.K., Witztum J.L. Plasma apolipoproteins AI, AII, B, CI, and E are glucosylated in hyperglycemic diabetic subjects // *Diabetes.* — 1985. — Vol. 34. — P. 452–461.
14. Esteghamati A., Abbasi M., Nakhjavani M., Yousefizadeh A., Basa A.P., Afshar H. Prevalence of diabetes and other cardiovascular risk factors in an Iranian population with acute coronary syndrome // *Cardiovasc. Diabetol.* — 2006. — Vol. 5. — P. 15.
15. Haberland M.E., Olch C.L., Folgelman A.M. Role of lysines in mediating interaction of modified low density lipoproteins with the scavenger receptor of human monocyte macrophages // *J. Biol. Chem.* — 1984. — Vol. 259. — P. 11305–11311.
16. Hodis H.N., Krams D.M., Avogaro P., Bittolo-Bon G., Cazzolato G., Hwang J., Peterson H., Sevanian A. Biochemical and cytotoxic characteristics of an *in vivo* circulating oxidized low density lipoprotein (LDL-) // *J. Lipid Res.* — 1994. — Vol. 35. — P. 669–677.
17. Imanaga Y., Sakata N., Takebayashi S. et al. *In vivo* and *in vitro* evidence for the glycooxidation of low density lipoprotein in human atherosclerotic plaques // *Atherosclerosis.* — 2000. — Vol. 150(2). — P. 343–355.
18. Jaakkola O., Solakivi T., Tertov V.V., Orekhov A.N., Miettinen T.A., Nikkari T. Characteristics of low-density lipoprotein subfractions from patients with coronary artery disease // *Coron. Artery Dis.* — 1993. — Vol. 4. — P. 379–385.
19. Juutilainen A., Lehto S., Ronnema T., Pyorala K., Laakso M. Similarity of the impact of type 1 and type 2 diabetes on cardiovascular mortality in middle-aged subjects // *Diabetes Care.* — 2008. — Vol. 31(4). — P. 714–719.
20. Kannel W.B., Larson M. Long-term epidemiologic prediction of coronary disease. The Framingham experience // *Cardiology.* — 1993. — Vol. 82. — P. 137–152.
21. Kannel W.B., McGee D.L., Schatzkin A. An epidemiological perspective of sudden death. 26-year follow-up in the Framingham Study // *Drugs.* — 1984. — Vol. 28. — Suppl. 1. — P. 1–16.
22. Kawamura M., Heinecke J.W., Chait A. Increased uptake of alpha-hydroxy aldehyde-modified low density lipoprotein by macrophage scavenger receptors // *J. Lipid Res.* — 2000. — Vol. 41(7). — P. 1054–1059.
23. Kim H.J., Kurup I.V. Nonenzymatic glycosylation of human plasma low density lipoprotein. Evidence *in vitro* and *in vivo* glycosylation // *Metabolism.* — 1982. — Vol. 31. — P. 348–353.
24. Klein R.L., Lopes Virella M.F. Metabolism by human endothelial cells of very low density lipoprotein subfractions isolated from type 1 (insulin-dependent) diabetic patients // *Diabetologia.* — 1993. — Vol. 36. — P. 258–264.
25. Koba S., Hirano T., Kondo T. et al. Significance of small dense low-density lipoproteins and other risk factors in patients with various types of coronary heart disease // *Am. Heart J.* — 2002. — Vol. 144(6). — P. 1026–1035.
26. Kortlandt W., Benschop C., van Rijn H.J., Erkelens D.W. Glycated low density lipoprotein catabolism is increased in rabbits with alloxan-induced diabetes mellitus // *Diabetologia.* — 1992. — Vol. 35. — P. 202–207.
27. Kozek E., Gorska A., Fross K., Marciniowska A., Citkowska A., Sieradzki J. Chronic complications and risk factors in patients with type 1 diabetes mellitus—retrospective analysis // *Przegl. Lek.* — 2003. — Vol. 60(12). — P. 773–777.
28. Kruth H.S. Receptor-independent fluid-phase pinocytosis mechanisms for induction of foam cell formation with native low-density lipoprotein particles // *Curr. Opin. Lipidol.* — 2011. — Vol. 22(5). — P. 386–393.
29. Laing S.P., Swerdlow A.J., Slater S.D. et al. Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes // *Diabetologia.* — 2003. — Vol. 46. — P. 760–765.
30. Ledet T., Neubauer B., Christensen N.J., Lundbaek K. Diabetic cardiopathy // *Diabetologia.* — 1979. — Vol. 16. — P. 207–209.

31. Ledet T., Rasmussen L.M., Heickendorff L., Barfod K., Thøgersen V.B. The nature of large vessel disease in diabetes mellitus // *J. Diabet. Complications*. — 1990. — Vol. 4. — P. 63–65.
32. Lehto S., Ronnemaa T., Pyörälä K., Laakso M. Poor glycemic control predicts coronary heart disease events in patients with type 1 diabetes without nephropathy // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 1999. — Vol. 19. — P. 1014–1019.
33. Lopes Virella M.F., Klein R.L., Lyons T.J., Stevenson H.C., Witztum J.L. Glycosylation of low-density lipoprotein enhances cholesterol ester synthesis in human monocyte-derived macrophages // *Diabetes*. — 1988. — Vol. 37. — P. 550–557.
34. Lopes Virella M.F., Sherer G.K., Lees A.M., Wohltmann H., Mayfield R., Sagel J., LeRoy E.C., Colwell J.A. Surface binding, internalization and degradation by cultured human fibroblasts of low density lipoproteins isolated from type 1 (insulin-dependent) diabetic patients: changes with metabolic control // *Diabetologia*. — 1982. — Vol. 22. — P. 430–436.
35. Lopes Virella M. Abnormal metabolism of low density lipoprotein in diabetes mellitus // *Horm. Metab. Res.* — 1985. — Suppl. 15. — P. 83–87.
36. Lyons T.J., Klein R.L., Baynes J.W., Stevenson H.C., Lopes Virella M.F. Stimulation of cholesterol ester synthesis in human monocyte-derived macrophages by low-density lipoproteins from type 1 (insulin-dependent) diabetic patients: the influence of non-enzymatic glycosylation of low-density lipoproteins // *Diabetologia*. — 1987. — Vol. 30. — P. 916–923.
37. Mahley R.W., Innerarity T.L., Weisgraber K.B., Oh S.Y. Altered metabolism (in vivo and in vitro) of plasma lipoproteins after selective chemical modification of lysine residues of the apoproteins // *J. Clin. Invest.* — 1979. — Vol. 64. — P. 743–750.
38. Nigam P.K., Narain V.S., Kumar A. Sialic acid in cardiovascular diseases // *Indian J. Clin. Biochem.* — 2006. — Vol. 21(1). — P. 54–61.
39. Norhammar A., Malmberg K., Diderholm E. et al. Diabetes mellitus: the major risk factor in unstable coronary artery disease even after consideration of the extent of coronary artery disease and benefits of revascularization // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 2004. — Vol. 43(4). — P. 585–591.
40. Orchard T.J., Olson J.C., Erbey J.R. et al. Insulin resistance-related factors, but not glycemia, predict coronary artery disease in type 1 diabetes: 10-year follow-up data from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study // *Diabetes Care*. — 2003. — Vol. 26. — P. 1374–1379.
41. Orekhov A.N., Andreeva E.R., Krushinsky A.V., Novikov I.D., Tertov V.V., NESTAIO G.V., Khashimov Kh.A., Repin V.S., Smirnov V.N. Intimal cells and atherosclerosis. Relationship between the number of intimal cells and major manifestations of atherosclerosis in the human aorta // *Am. J. Pathol.* — 1986. — Vol. 125. — P. 402–415.
42. Orekhov A.N., Andreeva E.R., Tertov V.V., Krushinsky A.V. Dissociated cells from different layers of adult human aortic wall // *Acta Anat. Basel*. — 1984. — Vol. 119. — P. 99–105.
43. Orekhov A.N., Tertov V.V. Atherogenic factors of blood: desialylated LDL and anti-LDL autoantibodies // *New aspects of metabolism and behaviour of mesenchymal cells during the pathogenesis of arteriosclerosis / Hauss W.H., Wissler R.W., Bauch H.-J., Eds.* — Düsseldorf, Westdeutscher Verlag. — 1991. — P. 73–85.
44. Orekhov A.N., Tertov V.V., Kudryashov S.A., Smirnov V.N. Triggerlike stimulation of cholesterol accumulation and DNA and extracellular matrix synthesis induced by atherogenic serum or low density lipoprotein in cultured cells // *Circ. Res.* — 1990. — Vol. 66. — P. 311–320.
45. Orekhov A.N., Tertov V.V., Mukhin D.N. Desialylated low density lipoprotein — naturally occurring modified lipoprotein with atherogenic potency // *Atherosclerosis*. — 1991. — Vol. 86. — P. 153–161.
46. Orekhov A.N., Tertov V.V., Mukhin D.N., Mikhailenko I.A. Modification of low density lipoprotein by desialylation causes lipid accumulation in cultured cells: discovery of desialylated lipoprotein with altered cellular metabolism in the blood of atherosclerotic patients // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1989. — Vol. 162. — P. 206–211.
47. Orekhov A.N., Tertov V.V., Novikov I.D., Krushinsky A.V., Andreeva E.R., Lankin V.Z., Smirnov V.N. Lipids in cells of atherosclerotic and uninvolved human aorta. I. Lipid composition of aortic tissue and enzyme-isolated and cultured cells // *Exp. Mol. Pathol.* — 1985. — Vol. 42. — P. 117–137.
48. Orekhov A.N., Tertov V.V., Pokrovsky S.N., Adamova I.Y., Martsenyuk O.N., Lyakishev A.A., Smirnov V.N. Blood serum atherogenicity associated with coronary atherosclerosis. Evidence for nonlipid factor providing atherogenicity of low-density lipoproteins and an approach to its elimination // *Circ. Res.* — 1988. — Vol. 62. — P. 421–429.
49. Orekhov A.N., Tertov V.V., Smirnov V.N. Lipids in cells of atherosclerotic and uninvolved human aorta. II. Lipid metabolism in primary culture // *Exp. Mol. Pathol.* — 1985. — Vol. 43. — P. 187–195.
50. Orekhov A.N., Tertov V.V., Sobenin I.A., Smirnov V.N., Via D.P., Guevara J., Jr., Gotto A.M., Jr., Morrisett J.D. Sialic acid content of human low density lipoproteins affects their interaction with cell receptors and intracellular lipid accumulation // *J. Lipid Res.* — 1992. — Vol. 33. — P. 805–817.
51. Seechter I., Fogelman A.M., Haberland M.E., Seager J., Horkom M., Edwards P.A. The metabolism of native and malondialdehyde-altered low density lipoproteins by human monocyte-macrophages // *J. Lipid Res.* — 1981. — Vol. 22. — P. 63.
52. Slavina E.S., Madanat A.Y., Pankov Yu.A., Syrkin A.L., Tertov V.V., Orekhov A.N. Diabetes mellitus and atherosclerosis // *N. Engl. J. Med.* — 1987. — Vol. 317. — P. 836.
53. Sobenin I.A., Jaakkola O., Tertov V.V. Density characteristics of atherogenic modified LDL fraction in diabetic patients // *Atherosclerosis*. — 1994. — Vol. 109. — P. 239.
54. Sobenin I.A., Tertov V.V., Koschinsky T., Bunting C.E., Slavina E.S., Dedov I.I., Orekhov A.N. Modified low density lipoprotein from diabetic patients causes cholesterol accumulation in human intimal aortic cells // *Atherosclerosis*. — 1993. — Vol. 100. — P. 41–54.
55. Sobenin I.A., Tertov V.V., Orekhov A.N. Characterization of chemical composition of native and modified low density lipoprotein occurring in the blood of diabetic patients // *Int. Angiol.* — 1994. — Vol. 13. — P. 78–83.
56. Sobenin I.A., Tertov V.V., Orekhov A.N., Smirnov V.N. Synergetic effect of desialylated and glycosylated low density lipoproteins on cholesterol accumulation in cultured smooth muscle intimal cells // *Atherosclerosis*. — 1991. — Vol. 89. — P. 151–154.
57. Stary H.C., Bleakley Chandler A., Glagov S., Guyton J.R., Insull W., Jr., Rosenfeld M.E., Schaffer S.A., Schwartz C.J., Wagner W.D., Wissler R.W. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis: A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association // *Arterioscler. Thromb.* — 1994. — Vol. 14. — P. 840–856.
58. Steinbrecher U.P., Witztum J.L. Glucosylation of low-density lipoproteins to an extent comparable to that seen in diabetes slows their catabolism // *Diabetes*. — 1984. — Vol. 33. — P. 130–134.
59. Tertov V.V., Orekhov A.N., Martsenyuk O.N., Perova N.V., Smirnov V.N. Low-density lipoproteins isolated from the blood of patients with coronary heart disease induce the accumulation of lipids in human aortic cells // *Exp. Mol. Pathol.* — 1989. — Vol. 50. — P. 337–347.
60. Tertov V.V., Orekhov A.N., Sobenin I.A., Morrisett J.D., Gotto A.M., Jr., Guevara J.G. arbohydrate composition of protein and lipid components in sialic acid-rich and -poor low density lipoproteins from subjects with and without coronary artery disease // *J. Lipid Res.* — 1993. — Vol. 34. — P. 365–375.
61. Tertov V.V., Sobenin I.A., Gabbasov Z.A., Popov E.G., Jaakkola O., Solakivi T., Nikkari T., Smirnov V.N., Orekhov A.N. Multiple-modified desialylated low density lipoproteins that cause intracellular lipid accumulation. Isolation, fractionation and characterization // *Lab. Invest.* — 1992. — Vol. 67. — P. 665–675.
62. Tertov V.V., Sobenin I.A., Gabbasov Z.A., Popov E.G., Orekhov A.N. Lipoprotein aggregation as an essential condition of intracellular lipid accumulation caused by modified low density lipoproteins // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1989. — Vol. 163. — P. 489–494.
63. Tertov V.V., Sobenin I.A., Orekhov A.N. Characterization of desialylated low-density lipoproteins which cause intracellular lipid accumulation // *Int. J. Tissue React.* — 1992. — Vol. 14. — P. 155–162.
64. Tertov V.V., Sobenin I.A., Tonevitsky A.G., Orekhov A.N., Smirnov V.N. Isolation of atherogenic modified (desialylated) low density lipoprotein from blood of atherosclerotic patients: separation from native lipoprotein by affinity chromatography // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1990. — Vol. 167. — P. 1122–1127.
65. Uddin S.N., Malik F., Bari M.A. et al. Angiographic severity and extent of coronary artery disease in patients with type 2 diabetes mellitus // *Mymensingh. Med. J.* — 2005. — Vol. 14(1). — P. 32–37.

66. Unal E., Eris C., Kaya B. et al. Paraoxonase and arylesterase activities, lipid profile, and oxidative damage in experimental ischemic colitis model // *Gastroenterol. Res. Pract.* — 2012. — Vol. 2012. — P. 979506.

67. Urata J Ikeda S, Koga S. et al. Negatively charged low-density lipoprotein is associated with atherogenic risk in hypertensive patients // *Heart Vessels.* — 2012. — Vol. 27(3). — P. 235–242.

68. Van Berkel T.J., Van Eck M., Herijgers N., Fluiter K., Nion S. Scavenger receptor classes A and B. Their roles in atherogenesis and the metabolism of modified LDL and HDL // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 2000. — Vol. 902. — P. 113–126.

69. Vanuzzo D., Pilotto L., Mirolo R., Pirelli S. Cardiovascular risk and cardiometabolic risk: an epidemiological evaluation // *G. Ital. Cardiol. (Rome).* — 2008. — Vol. 9 (4 Suppl. 1). — P. 6S–17S.

70. Watanabe J., Wohltmann H.J., Klein R.L., Colwell J.A., Lopes Vi-rella M.F. Enhancement of platelet aggregation by low-density lipoproteins from IDDM patients // *Diabetes.* — 1988. — Vol. 37. — P. 1652–1657.

71. Weisgraber K.H., Innerarity T.L., Mahley R.W. Role of the lysine residues of plasma lipoproteins in high affinity binding to cell surface receptors on human fibroblasts // *J. Biol. Chem.* — 1978. — Vol. 253. — P. 9053.

72. Wiklund O., Witztum J.L., Carew T.E., Pittman R.C., Elam R.L., Steinberg D. Turnover and tissue sites of degradation of glucosylated low density lipoprotein in normal and immunized rabbits // *J. Lipid Res.* — 1987. — Vol. 28. — P. 1098–1109.

73. Witztum J.L., Koschinsky T. Metabolic and immunological consequences of glycation of low density lipoproteins // *Prog. Clin. Biol. Res.* — 1989. — Vol. 304. — P. 219–234.

Поступила 2.04.2013

Multiple modified low density lipoprotein in diabetes mellitus

Borodachev E.N.¹, Sobenin I.A.¹, Karagodin V.P.², Bobrishev Y.V.², Orekhov A.N.^{1,2}

¹ — Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences,
8, Baltiyskaya Str., 125315, Moscow, Russia

² — Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Center,
143025, 100, Novaya Str., Moscow, Russia

A premature onset and rapid progression of atherosclerosis is a characteristic feature of diabetes mellitus. Cardiovascular events remain a leading cause of morbidity and mortality in diabetic patients. The deposition of intracellular cholesterol in the vessel wall is a typical feature of early atherosclerotic lesion at the cellular level. Low density lipoprotein (LDL) is believed to be the source of accumulating intracellular lipids, and LDL demands to be chemically modified in some way to provide atherogenic effect. This paper summarizes the recent findings on low density lipoprotein (LDL) atherogenic modifications in diabetic patients. LDL from diabetic patients, unlike LDL from healthy subjects, caused a significant increase in cholesterol content of cells cultured from unaffected human aortic intima, i.e. produced a direct atherogenic effect. The results of the study have shown that in vivo modified atherogenic LDL subfraction in the blood of diabetic patients is represented by small, dense, more electronegative, desialylated and glycosylated LDL.

Key words: *diabetes mellitus, atherosclerosis, modified low density lipoprotein, non-enzymatic glycosylation, desialylation, intracellular cholesterol accumulation*