

Липопротеиды низкой плотности в атерогенезе — значение сиаловой кислоты*

СОБЕНИН И.А.², ФЕОКТИСТОВ А.С.¹, КАРАГОДИН В.П.¹, ПШЕЖЕЦКИЙ А.В.¹, ОРЕХОВ А.Н.^{1,2}

¹ — Научно-исследовательский институт атеросклероза, Россия, 143025, Москва, Инновационный Центр Сколково, ул. Новая, д.100

² — ФГБУ НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Уровень сиаловой кислоты в плазме крови и липопротеидах низкой плотности (ЛНП) связывают с развитием ряда патологических состояний, включая атеросклероз, рак и т.п. Модифицированные ЛНП, обладающие пониженным по сравнению с нативными липопротеидами содержанием сиаловой кислоты, названы в связи с этим «десиалированными» ЛНП. Цель данной работы — выявление сезонных колебаний транссиалидазной активности сыворотки крови у людей. Почти у 39% испытуемых достоверных сезонных изменений транссиалидазной активности крови выявлено не было. Однако среди остальных волонтеров количество тех, у которых транссиалидазная активность достигала максимальных значений зимой, почти в 3 раза превышало количество испытуемых с обратной сезонной динамикой. В процентах от общего количества испытуемых это составило около 43 и 17% соответственно. Изменение степени модификации циркулирующих ЛНП в результате повышения транссиалидазной активности сыворотки в зимний период у значительного числа людей является дополнительным фактором, вносящим вклад в осенне-зимнее возрастание риска острых сердечно-сосудистых заболеваний. Предполагаемое влияние транссиалидазы непосредственно на ЛНП крови может приводить к возникновению или прогрессированию атеросклеротических поражений в периоды повышенной транссиалидазной активности сыворотки крови.

Ключевые слова: сиаловая кислота, транссиалидазная активность, атеросклеротическое поражение, липопротеиды низкой плотности, атерогенные свойства

Введение

Атеросклероз — одно из наиболее распространённых заболеваний человека. Образование атероматозных бляшек в артериях, приводит к сужению просвета этих сосудов. Дальнейший патогенез может приводить к образованию и отделению тромбов, что зачастую является причиной инфаркта сердца, тромбозов, кровоизлияния в мозг и гангрены нижних конечностей. Кроме вышеперечисленных острых проявлений, явных клинических симптомов атеросклероза не наблюдается, в связи с чем, остро стоит проблема диагностики, профилактики и лечения этого заболевания.

Одним из наиболее ранних проявлений атеросклеротического поражения является аккумуляция липидов клетками интимы аорты человека. Показано, что основным источником липидов являются липопротеиды низкой плотности (ЛНП) [1]. Многочисленными работами было продемонстрировано, что ЛНП, выделенные из крови здоровых лиц, не вызывали внутриклеточного отложения липидов [2, 3]. Была выдвинута гипотеза об изменении свойств ЛНП в результате некой химической модификации. В дальнейшем были получены различные *in vitro* модифицированные ЛНП, вызывавшие накопление липидов в культуре клеток [4, 5, 6]. Кроме того, было показано, что липопротеиды выделенные из крови больных атеросклерозом, в отличие от нативных ЛНП, стимулировали увеличение содержания липидов, клеточную пролиферацию и синтез внеклеточного матрикса, т.е. являлись атерогенными [2, 7].

Дальнейшее изучение ЛНП из крови лиц с атеросклеротическими поражениями показало наличие фракции множественно модифицированных ЛНП, значительно отличающихся от нативных по ряду физико-химических показателей [8, 9]. В частности, для них характерно пониженное в 2–3 раза содержание сиаловой кислоты в углеводных цепях липопротеидной частицы (десиалирование) [10]. Была установлена достоверная обратная корреляция между содержанием сиаловой кислоты в ЛНП и их способностью вызывать накопление липидов *in vitro* [11]. Более того, нативные липопротеиды здоровых лиц после десиалирования бактериальной нейраминидазой приобретали атерогенные свойства [9, 12]. Было показано, что десиалированные липопротеиды начинали агрегировать уже после 6 ч инкубации при 37°C, в то время как сиалированные частицы не формировали агрегатов вплоть до 24 ч инкубации [13]. При этом в ряде работ сообщалось, что агрегация модифицированных ЛНП значительно повышает их атерогенный потенциал [14, 15].

Другими группами исследователей были обнаружены ЛНП в крови человека, характеризующиеся повышенным электроотрицательным зарядом, в последствии выделенные с помощью ионообменной хроматографии [16], а также фракции ЛНП, отличающихся от нативных меньшими размерами и более высокой плотностью, так называемых, мелких/плотных ЛНП [17]. Эти классы ЛНП также характеризовались пониженным содержанием сиаловой кислоты по сравнению с нативными и склонностью к агрега-

* Работа поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации.

ции [18]. Дальнейшие исследования показали наличие атерогенности ЛНП данных фракций и их агрегатов в культуре макрофагов [19].

Можно привести целый ряд признаков, общих как для десалированных, так и для «электроотрицательных» и мелких/плотных ЛНП: малый размер частиц, высокая плотность, увеличенный поверхностный отрицательный заряд, повышенная способность к агрегации, изменённый липидный и белковый состав, способность индуцировать внутриклеточное накопление липидов. Кроме того, было показано, что во всех рассматриваемых фракциях модифицированных липопротеидов уровень сиаловой кислоты значительно ниже, чем в нативных ЛНП [10]. На основе полученных данных был сделан вывод, что электроотрицательные, мелкие/плотные и десалированные ЛНП являются одними и теми же множественно модифицированными липопротеидами низкой плотности (ммЛНП).

Таким образом, атерогенные модифицированные липопротеиды низкой плотности, обнаруженные в плазме крови человека, отличаются от нативных ЛНП по целому ряду параметров, одним из которых является содержание сиаловой кислоты. Однако необходимо заметить, что обработка нативных липопротеидов бактериальной нейраминидазой (приводящая только к десалированию) сама по себе достаточна для возникновения атерогенности [20]. Следовательно, можно говорить о значительной роли потери сиаловой кислоты в проявлении атерогенных свойств ЛНП.

Ранее была выделена и охарактеризована транссиалидаза из сыворотки крови человека, которая способна осуществлять перенос остатков сиаловой кислоты между гликозилированными участками биополимеров [20]. В частности, *in vitro* показана возможность данного фермента десалировать липопротеиды, выделенные из крови человека [21].

Цель данной работы — выявить сезонные колебания транссиалидазной активности сыворотки крови у людей.

Материалы и методы

1. Сбор сыворотки крови

Забор крови производился в поликлинике №202 г. Москвы. В исследовании принимали участие 23 волонтера, которые наблюдались в течение года. В июле и декабре 2009 г. был произведён забор крови для исследования у всех волонтеров. Кровь забирали натошак из локтевой вены. Клетки крови отделяли центрифугированием в течение 20 мин при 1600 g на центрифуге Beckman GPR. Полученную сыворотку крови разделяли на аликвоты и хранили при температуре -70°C .

2. Мечение сиаловой кислоты фетуина тритием

К 250 мкл раствора фетуина (2 мг/мл) добавляли равный объём 0,1 М ацетатного буфера (pH 4,0). Реакционную смесь охлаждали до $+4^{\circ}\text{C}$, помещали в ледяную баню, и вносили 50 мкл свежеприготовленного водного раствора 10 мМ NaIO_4 . Смесь инкубировали 10 мин при постоянном перемешивании. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл глицерина, после чего пробы инкубировали 10 мин при тех же условиях. Полученный раствор диализовали против 2000 объёмов фосфатно-солевого буфера (pH 7,0) при $+4^{\circ}\text{C}$ с двойной сменой буфера в течение суток.

В раствор, содержащий окисленный субстрат, при комнатной температуре вносили 10 мкл $\text{NaV}[\text{H}]_4$ в 0,1 М NaOH (1 мКи). Пробы инкубировали 30 мин при 20°C при постоянном перемешивании. Затем в инкубационную смесь вносили 10 мкл 0,1 М немеченого NaVH_4 и инкубировали 30 мин при тех же условиях. Препараты диализовали в течение 48 ч против 2000 объёмов фосфатно-солевого буфера (pH 7,0) с четырьмя сменами буфера. Полученный меченый фетуин стерилизовали фильтрацией (диаметр пор 450 нм).

3. Получение агарозного геля, ковалентно связанного с фетуином, меченным тритием по сиаловой кислоте

300 мкг сухой бромциан-активированной агарозы суспендировали в 15 мл 1 мМ HCl (pH 4,5) и инкубировали 1 ч при постоянном перемешивании для набухания. Гель центрифугировали 10 мин при 3150 g, супернатант удаляли, а осадок промывали 15 мл 1 мМ HCl , после чего гель центрифугировали при тех же условиях. Осадок промывали 15 мл 0,2 М карбонатно-бикарбонатного буфера (pH 8,5), затем центрифугировали при тех же условиях, супернатант удаляли.

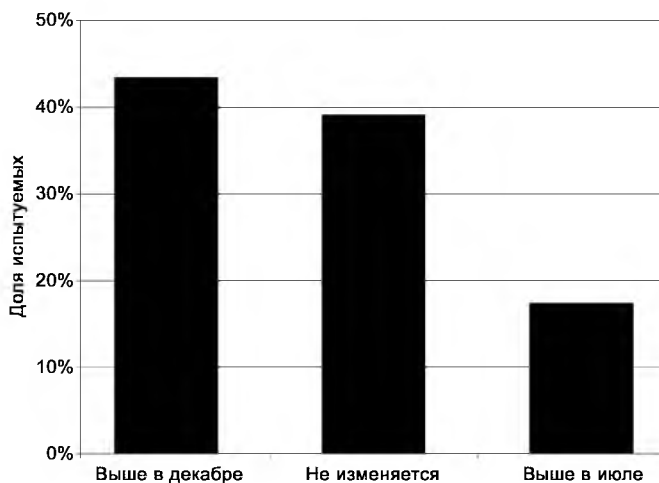
К промывкой активированной агарозе добавляли 5 мл раствора фетуина (0,4 мг/мл), меченного тритием по сиаловой кислоте. Пробы инкубировали 2 ч при комнатной температуре и постоянном перемешивании. После инкубации суспензию центрифугировали 10 мин при 3150 g, супернатант удаляли. Для блокировки непрореагировавших CN -групп к осадку прибавляли 15 мл 20 мМ глицинового буфера (pH 8,5) и смесь инкубировали 1 ч при постоянном перемешивании. Полученный гель промывали по 5 раз попеременно 20 мл 0,2 М ацетатного (pH 4,5) и 0,2 М карбонатно-бикарбонатного (pH 8,5) буферов. К осажденному гелю прибавляли 2 мл 50 мМ Tris-HCl (pH 7,0) и хранили при 4°C .

4. Получение десалированного фетуина методом кислотного гидролиза

К 5 мг белка прибавляли 1 мл 0,1 н серной кислоты. Смесь нагревали на водяной бане (80°C) в течение 1 ч. По окончании инкубации раствор белка нейтрализовали 0,1 н NaOH до pH 7,0; пробы диализовали против фосфатно-солевого буфера (pH 7,0) при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение ночи с несколькими сменами буфера и стерилизовали фильтрацией (диаметр пор 450 нм).

5. Определение активности транссиалидазы с использованием в качестве субстрата фетуина, меченного тритием по сиаловой кислоте, ковалентно связанного с агарозным гелем

К 200 мкл исследуемой сыворотки добавляли 60 мкл суспензии меченного тритием фетуина (донора сиаловой кислоты), связанного с агарозой. Определение ставили в двух вариантах: с добавлением 30 мкл десалированного фетуина (акцептора сиаловой кислоты) и без него. Объём реакционной смеси доводили до 300 мкл 50 мМ Tris-HCl (pH 7,0). Инкубацию проводили при 37°C , в темноте, при постоянном перемешивании в течение 3 ч. По истечении времени инкубации к реакционной смеси добавляли 200 мкл воды и центрифугировали 10 мин при 3150 g. После этого отбирали 200 мкл супернатанта и переносили его во флаконы для жидкостно-сцинтилляционного счёта, содержащие 5 мл сцинтилляционной жидкости (ЖС-8, Реахим, Украина) и измеряли количество бета-распадов трития на жидкостно-сцинтилляционном счётчике 1215 Rack-Beta (LKB, Швеция).



Паттерны сезонной динамики трансгилидазной активности сыворотки крови у волонтеров

Результаты и обсуждение

Были получены данные о ферментативной трансгилидазной активности сывороток крови испытуемых в летний и зимний период. Образцы, проинкубированные в отсутствие акцептора сиаловой кислоты, характеризовали сиалидазную активность в исследованных сыворотках, в то время как образцы, проинкубированные с десилированным фетуином, отражали суммарную сиалидазную и трансгилидазную активность. Поэтому в качестве численного выражения трансгилидазной активности сыворотки крови использовали различие в доле меченой сиаловой кислоты, перенесенной с геля в раствор, между образцами, содержащими акцептор сиаловой кислоты, и образцами без акцептора.

При анализе сезонных различий в трансгилидазной активности сыворотки крови достоверным считали повышение активности в один из сезонов более чем на 20%. По этому критерию выделили три подвыборки испытуемых, у которых:

- 1) трансгилидазная активность сыворотки крови не изменялась в течение года;
- 2) была достоверно выше в зимний период;
- 3) была достоверно выше в летний период (рисунок).

Почти у 39% испытуемых достоверных сезонных изменений трансгилидазной активности крови выявлено не было. Однако среди остальных волонтеров количество тех, у которых трансгилидазная активность достигала максимальных значений зимой, почти в 3 раза превышало количество испытуемых с обратной сезонной динамикой. В процентах от общего количества доноров это составило около 43 и 17% соответственно.

Известно, что значительные сезонные колебания характерны для ряда биохимических параметров крови человека, например, концентрации гемоглобина, вязкости крови, соотношения клеточных популяций [22, 23]. Также в течение года изменяется активность и концентрация некоторых сывороточных и внутриклеточных ферментов [24]. В целом, подобные изменения представляют собой стрессовый ответ организма на зимние условия окружающей среды и соответствующие социальные факторы (короткий световой день, низкие температуры, пониженная

физическая нагрузка и др.). Таким образом, изменение риска модификации циркулирующих ЛНП в результате повышения трансгилидазной активности сыворотки в зимний период у значительного процента людей может являться дополнительным фактором, вносящим вклад в осенне-зимнее возрастание риска острых сердечно-сосудистых заболеваний. Предполагаемое влияние трансгилидазы непосредственно на ЛНП крови может приводить к возникновению или прогрессированию атеросклеротических поражений в периоды повышенной трансгилидазной активности сыворотки крови.

Список литературы

1. Packard C.J., Shepherd J. Low density lipoprotein metabolism // *Prog. Clin. Biol. Res.* — 1988. — Vol. 255. — P. 117–123.
2. Tertov V.V., Orekhov A.N., Martsenyuk O.N., Perova N.V. et al. LDL 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.
3. Rothender M., Krempler F., Kostner G.M. Interaction of various lipoproteins from normal and dyslipoproteinemic plasma with mouse peritoneal macrophages // *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. — 1988. — Vol. 46. — P. 30–34.
4. Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T.E., Khoo J.C. et al. Modification of LDL that increase its atherogenicity // *N. Engl. J. Med.* — 1989. — Vol. 320. — P. 915–924.
5. Lopes-Virella M.F., Klein R.L., Lyons T.J., Stevenson H.C. et al. Glycosylation of LDL enhances cholesteryl ester synthesis in human-derived macrophages // *Diabetes*. — 1988. — Vol. 37. — P. 550–557.
6. Goldstein J.L., Ho H.S.K., Basu S.K., Brown M.S. Binding site on macrophage that mediates uptake and degradation of acetylated LDL producing massive cholesterol deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1979. — Vol. 76. — P. 333–337.
7. Orekhov A.N., Tertov V.V., Pokrovsky S.N., Adamova I.Yu. et al. Blood serum atherogenicity associated with coronary atherosclerosis. Evidence for nonlipid factor providing atherogenicity of LDL and an approach to its elimination // *Circ. Res.* — 1988. — Vol. 62. — P. 421–429.
8. Tertov V.V., Sobenin I.A., Gabbazov Z.A., Popov E.E. et al. Multiple-modified desialylated LDL that cause intracellular lipid accumulation. Isolation, fractionation and characterization // *Lab. Investigation*. — 1992. — Vol. 67. — P. 665–675.
9. Orekhov A.N., Tertov V.V., Mukhin D.N., Mikhailenko I.A. Modification of LDL 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.
10. Tertov V.V., Bittolo-Bon G., Sobenin I.A., Gazzolato G. et al. Naturally occurring modified LDL are similar if not identical: more electronegative and desialylated lipoprotein subfraction // *Experimental and Molecular Biology*. — 1995. — Vol. 62. — P. 166–172.
11. Tertov V.V., Orekhov A.N., Sobenin I.A., Gabbazov Z.A. et al. Three types of naturally occurring modified lipoproteins induce intracellular lipid accumulation due to lipoprotein aggregation // *Circ. Res.* — 1992. — Vol. 71. — P. 218–228.
12. Orekhov A.N., Tertov V.V., Mukhin D.N. Desialylated low density lipoprotein — naturally occurring lipoprotein with atherogenic potency // *Atherosclerosis*. — 1991. — Vol. 86. — P. 153–161.
13. Tertov V.V., Orekhov A.N., Sobenin I.A. et al. Carbohydrate content 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.
14. Tertov V.V., Kaplun V.V., Sobenin I.A., Bovin N.V. Enzymatic desialylation of low density lipoprotein in human plasma. XIII International Symposium on Drug Affecting Lipid Metabolism. Florence (Italy). — May 30 — June 3, 1998: Abstract Book. — P. 81.
15. Панасенко О.М., Тертов В.В., Мельниченко А.А., Аксенов Д.В. и др. Связь размера дегликозилированных различными ферментами апо-В-содержащих липопротеинов с их атерогенным потенциалом // *Биологические мембраны*. — 2006. — Т. 23. — С. 43–52.

16. Avogaro P., Bittolo Bon G., Cazzolato G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans // *Atherosclerosis*. — 1988. — Vol. 8. — P. 79.
17. Shen M.M.S., Krauss R.M., Lindgren F.T., Forte T.M. Heterogeneity of serum low density lipoproteins in normal human subjects // *J. Lipid Res.* — 1981. — Vol. 22. — P. 236–244.
18. La Belle M., Krauss R.M. Differences in carbohydrate content of low density lipoproteins associated with low density lipoprotein subclass patterns // *J. Lipid Res.* — 1990. — Vol. 31. — P. 1577–1588.
19. Avogadro P., Cazzolato G., Bittolo-Bon G. Some questions concerning a small, electronegative LDL circulating in human plasma // *Atherosclerosis*. — 1991. — Vol. 91. — P. 163–171.
20. Tertov V.V., Kaplun V.V., Sobenin I.A., Boytsova E.Y. et al. Human plasma trans-sialidase causes atherogenic modification of low density lipoprotein // *Atherosclerosis*. — 2001. — Vol. 159. — P. 103–115.
21. Tertov V.V., Nikonova E.Y., Nifant'ev N.E., Bovin N.V. et al. Human plasma trans-sialidase donor and acceptor specificity // *Biocchemistry (Moscow)*. — 2002. — Vol. 67. — P. 908–913.
22. Игнатъева С.Н., Терновский Л.Н., Соловьева Н.В. Изменения метаболических свойств клеток крови у студентов в течение учебного года на Европейском Севере // *Нижегородский мед. журнал*. — 2002. — №1. — С. 17–19.
23. Терновский Л.Н. Оптимизация адаптации к факторам среды обитания Европейского Севера: Автореф. дисс. на соискание учёной степени д.м.н. — М., 1996.
24. Шурлыгина А.В., Литвиненко Г.И., Дергачева Т.И., Труфакин В.А. Суточные и сезонные вариации активности дегидрогеназ лимфоцитов крови при вторичном иммунодефицитном состоянии у женщин с острыми воспалительными гинекологическими заболеваниями неспецифической этиологии // *Бюлл. экстрим. биол. и медицины*. — 1998. — Т. 125. — С. 576–578.

Low density lipoproteins in atherogenesis — role of sialic acid

SOBENIN I.A.², FEOKTISTOV A.S.¹, KARAGODIN V.P.¹, PCHEJETSKI A.V.¹, OREKHOV A.N.^{1,2}

¹ — Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Center, 143025, 100, Novaya Str., Moscow, Russia

² — Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8, Baltiyskaya Str., 125315, Moscow, Russia

Sialic acid level in blood plasma and circulating lipoproteins is considered to be a marker for a number of pathologic conditions, including atherosclerotic lesion, cancer, etc. Modified low density lipoprotein (LDL), possessing lowered, in comparison with native lipoproteins amount of sialic acid, are named in this connection desialated LDL. The aim of the present study was the investigation of seasonal fluctuations of trans-sialidase activity in serum of humans blood. Almost 39 % of volunteers haven't revealed reliable seasonal changes of blood trans-sialidase activity. However among other volunteers the quantity of people with maximum trans-sialidase activity values in the winter, almost three times exceeded quantity of volunteers with invariable seasonal dynamics. In percentage of total people it has made about 43 % and 17 %, accordingly. During the winter period trans-sialidase activity in serum raises and modifies circulating low density lipoproteins (LDL). As a result it is an additional factor increasing risk of cardiovascular diseases for many people. This effect may lead to occurrence or progressing of atherosclerotic lesions in periods of increased trans-sialidase activity in serum.

Key words: *sialic acid, trans-sialidase activity, atherosclerotic lesion, low density lipoprotein (LDL), atherogenicity*