

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

УДК 541.515-547.915.5.963-59.089-616.13-004.6-616.379-008.64

М.А. Гречникова, С.П. Домогатский, Г.Г. Коновалова, А.К. Тихазе, В.З. Ланкин

### КЛИРЕНС КАРБОНИЛ-МОФИЦИРОВАННЫХ ЛИПОПРОТЕИДОВ ИЗ КРОВотоКА КРОЛИКОВ

ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, Москва, Россия

Исследовали клиренс альдегид-модифицированных липопротеидов низкой плотности (ЛНП) у кроликов с использованием изолированных при помощи препаративного ультрацентрифугирования биотинилированных ЛНП кроликов и ФИТЦ-меченых ЛНП человека. Глиоксаль- и метилглиоксаль-модифицированные ЛНП кроликов и человека циркулируют в кровотоке такое же время, что и нативные ЛНП. МДА-модифицированные ЛНП быстро элиминируются из кровотока. Вероятно, глиоксаль- и метилглиоксаль-модифицированные ЛНП более атерогенны, в то время как МДА-модифицированные ЛНП могут подвергаться усиленной утилизации.

**Ключевые слова:** окислительный стресс, модифицированные липопротеиды низкой плотности, малоновый диальдегид, глиоксаль, метилглиоксаль, атеросклероз, сахарный диабет

### CLEARANCE OF CARBONYL-MODIFIED LIPOPROTEINS FROM THE BLOODSTREAM OF RABBITS

M.A. Grechnikova, S.P. Domogatskiy, G.G. Konovalova, A.K. Tikhaze, V.Z. Lankin

Russian Cardiology Research and Production Complex, Moscow, Russia

We have suggested that the molecular mechanism of vascular wall damage in diabetes is not substantially different from that in atherosclerosis. Thus, it can be assumed that aldehyde-modified LDL should be eliminated from the blood stream with much greater speed than non-oxidized LDL. In the available literature there is information about the clearance of native human LDL from the bloodstream, whereas information on the clearance of the aldehyde-modified LDL in animals or humans was not found. Based on this, the present work is devoted to the clearance of aldehyde-modified LDL of rabbits and humans introduced into the bloodstream of rabbits. We investigated the clearance of glyoxal-, methylglyoxal- and MDA-modified LDL from the bloodstream of rabbits. We used biotinylated LDL of rabbit blood plasma and FITC-labeled LDL of human blood plasma. LDL was isolated with preparative ultracentrifugation in NaBr gradient. It was shown that glyoxal- and methylglyoxal-modified LDL of rabbits and humans circulated in the bloodstream for the same time as native LDL while MDA-modified LDL was rapidly eliminated from the bloodstream. The data obtained indicated the possibility of greater atherogenic potential of glyoxal- and methylglyoxal-modified LDL as they circulate in the bloodstream for a rather long time. At the same time, MDA-modified LDL is likely to be exposed to enhanced elimination by macrophages after their "linkage" to blood cells.

**Key words:** oxidative stress, modified LDL, MDA, glyoxal, methylglyoxal

Окислительный стресс играет важную роль в развитии ряда патологических состояний, включая атеросклероз и сахарный диабет [7, 18]. Индукция окислительного стресса может происходить при гиперпродукции активных форм кислорода и первичных продуктов свободнорадикального окисления. При свободнорадикальном окислении полиеновых липидов в качестве первичных продуктов накапливаются липогидропероксиды, окислительная деструкция которых сопровождается образованием  $\alpha,\beta$ -оксоальдегидов, в частности малонового диальдегида (МДА) [6, 17]. Сопутствующая развитию атеросклероза гиперлипидемия является фактором, провоцирующим интенсификацию свободнорадикальных процессов, в результате которых накапливаются как первичные, так и вторичные продукты окисления в плазме крови больных [6], причем эти продукты в основном локализованы в липид-транс-

портирующих наночастицах плазмы крови – липопротеидах низкой плотности (ЛНП). Показано, что окислительно-модифицированные ЛНП захватываются макрофагами стенки сосудов (при участии скэвенджер-рецепторов) со значительно большей эффективностью, чем частицы неокисленных ЛНП [4, 10]. Следует отметить, что скорость поглощения макрофагами собственно окисленных ЛНП (частиц ЛНП, обогащенных липогидропероксидами) не отличается от скорости захвата нативных ЛНП, тогда как захват МДА-модифицированных ЛНП происходит весьма интенсивно [10]. При диабетической гипергликемии усиливаются процессы окисления глюкозы, причем при ее автоокислении образуется гомолог МДА глиоксаль, а при катаболизме триозофосфатов – изомер МДА метилглиоксаль [13]. Ранее нами было показано, что глиоксаль-модифицированные ЛНП захватываются культивируемыми ма-

крофагами человека с не меньшей эффективностью, чем МДА-модифицированные ЛНП [1, 9]. Исходя из этого, нами было высказано предположение, что молекулярный механизм повреждения стенки сосудов при диабете по существу не отличается от такового при атеросклерозе [8]. Таким образом, можно было полагать, что альдегид-модифицированные ЛНП должны элиминироваться из кровотока со значительно большей скоростью, чем неокисленные ЛНП. В доступной литературе имеются сведения о клиренсе нативных ЛНП из кровотока человека [5, 12], тогда как сведений о клиренсе альдегид-модифицированных ЛНП у животных или человека обнаружить не удалось. Исходя из этого, настоящая работа посвящена клиренсу альдегид-модифицированных ЛНП кролика и человека, введенных в кровяное русло кроликов.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ЛНП плазмы кроликов выделяли при помощи дифференциального ультрацентрифугирования в градиенте плотности NaCl, а затем NaBr [11] на препаративной ультрацентрифуге L8-M (ротор 50 Ti, Beckman, США). Солевой раствор ЛНП концентрировали при помощи Sephadex G-100 fine и диализовали против 2000 объемов боратного буфера с pH 8,0 в течение 18 часов при 4 °С. Концентрацию белка в препаратах ЛНП определяли по методу Лоури. Полученные ЛНП метили при помощи биотинилирования [2], добавляя раствор биотин-сукцинимиды в ДМСО из расчета 100 мкг метки на 1 мг белка ЛНП. Полученную смесь инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре, а затем избавлялись от избытка биотина при помощи гель-фильтрации на колонках с Sephadex G25 fine. Биотинилированные ЛНП модифицировали в присутствии МДА (получали методом кислотного гидролиза из его полуацетата 1,1,3,3-тетраэтоксипропана) [14], глиоксаля и метилглиоксаля. От избытка альдегидов после модификации избавлялись с помощью диализа. Для характеристики полученных препаратов ЛНП проводили их нефелометрический анализ. Альдегид-модифицированные и нативные биотинилированные ЛНП вводили в ушную вену кроликов из расчета 75 мкг белка ЛНП / кг веса, после чего через определенные интервалы времени отбирали пробы крови с использованием ЭДТА в качестве антикоагулянта. Для определения биотинилированных ЛНП в плазме крови осуществляли иммуноферментный анализ с использованием конъюгата стрептавидина с

пероксидазой хрена [3]. ЛНП плазмы крови человека изолировали из сыворотки здоровых доноров при помощи ультрацентрифугирования [16], после чего частицы ЛНП метили флуоресцеин тиоцианатом (ФИТЦ) [15]. ФИТЦ-меченые ЛНП человека вводили в ушную вену кроликов из расчета 450 мкг белка ЛНП / кг веса, после чего через определенные интервалы времени отбирали пробы крови, как описано выше. Измерение флуоресценции проводили в разбавленных в 20 раз образцах плазмы кролика при длине волны возбуждения 495 нм и длине волны испускания 519 нм. Опыты по клиренсу ЛНП кроликов повторяли трижды; опыты по клиренсу ЛНП человека – дважды. Опыты на животных выполняли в соответствии с правилами гуманного обращения с животными, регламентированными «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными Приказом МЗ СССР № 742 от 13.11.84 г. «Об утверждении правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» и № 48 от 23.01.85 г. «О контроле за проведением работ с использованием экспериментальных животных».

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Инкубация альдегид-модифицированных биотинилированных ЛНП кролика в плазме крови этих животных *in vitro* в течение 5 часов показала, что модифицированные ЛНП не подвергаются, вероятно, какой-либо деструкции в присутствии компонентов плазмы крови.

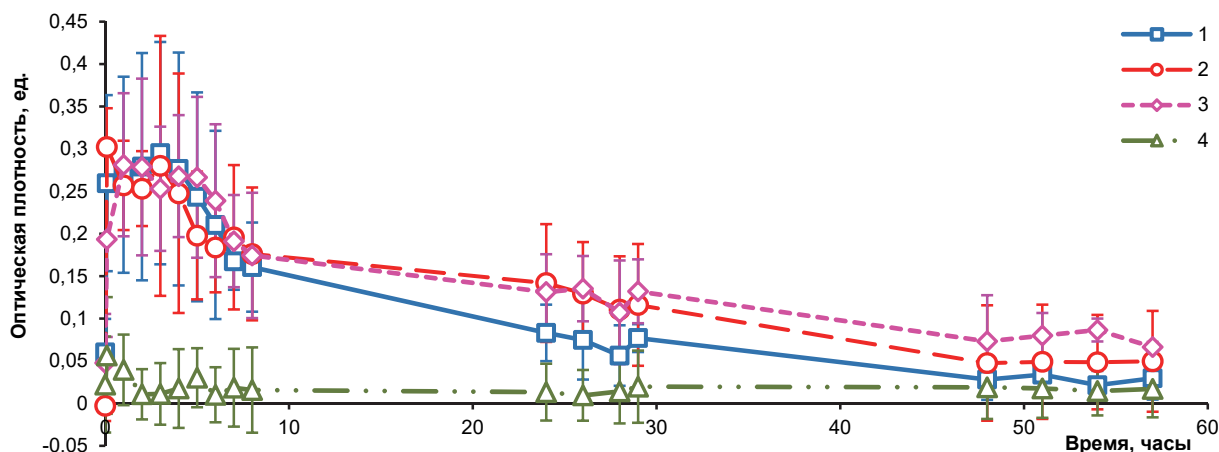
Результаты нефелометрии свидетельствуют о том, что нативные ЛНП кролика и глиоксаль-модифицированные ЛНП кролика были представлены исключительно частицами размером около 30 нм (табл. 1). В то же время 2,5 % МДА-модифицированных и метилглиоксаль-модифицированных ЛНП кролика были представлены агрегатами частиц, на порядок превышающих нативные частицы ЛНП кролика по размеру (табл. 1).

На рисунке 1 представлены результаты исследования скорости элиминации нативных и альдегид-модифицированных ЛНП кролика из кровотока этих животных. Видно, что содержание в кровотоке меченых нативных, глиоксаль- и метилглиоксаль-модифицированных ЛНП после их введения животным резко возрастало, а затем постепенно снижалось в течение последующих трех суток, причем не было выявлено количественных различий в клиренсе нативных, глиоксаль- и метилглиоксаль-модифи-

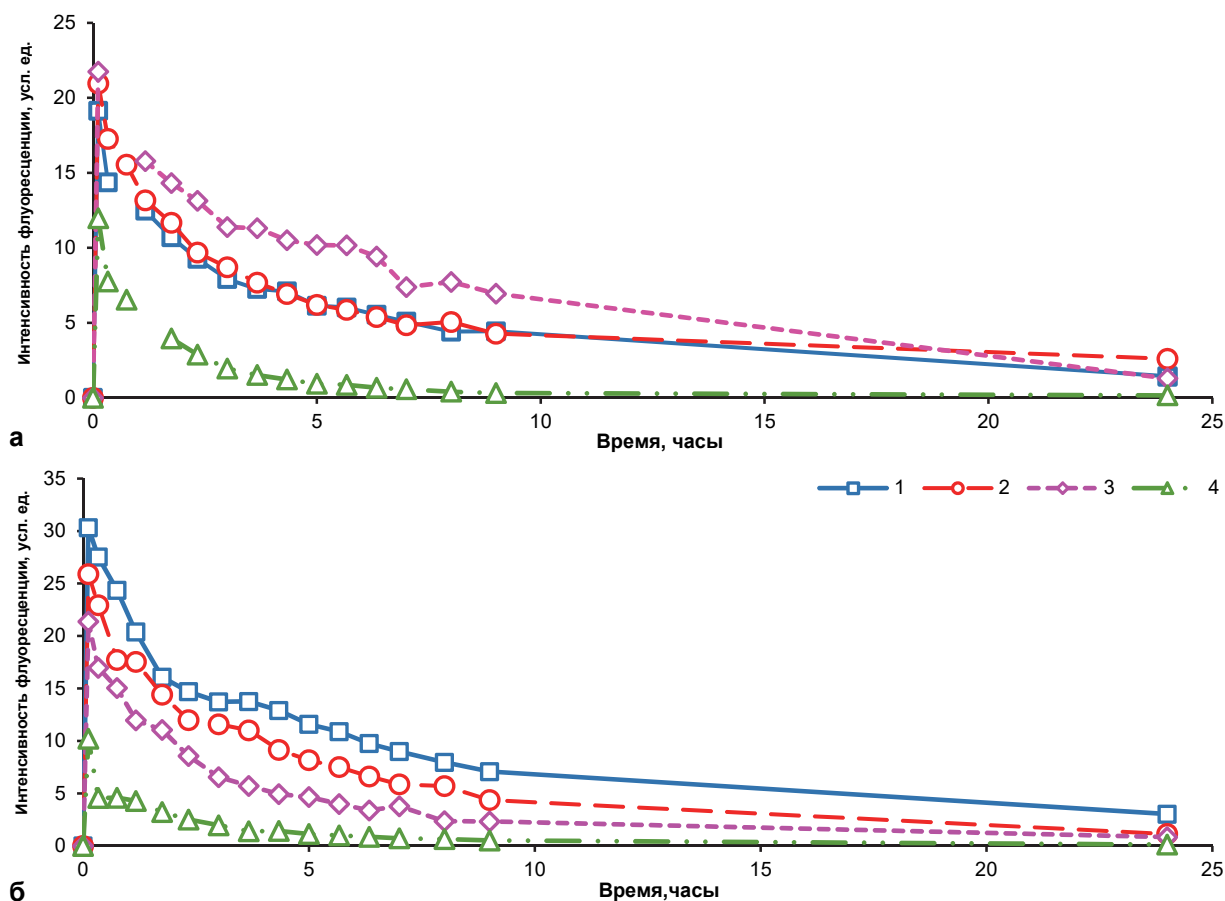
Таблица 1  
Результаты нефелометрического определения характеристик препаратов нативных и альдегид-модифицированных ЛНП кролика

d, нм	% объема 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

Примечание. d – диаметр частиц.



**Рис. 1.** Элиминация модифицированных ЛНП кролика из кровотока этих животных: 1 – нативные ЛНП; 2 – глиоксаль-модифицированные ЛНП; 3 – метилглиоксаль-модифицированные ЛНП; 4 – МДА-модифицированные ЛНП. Приведены средние значения по трем сериям экспериментов с 95%-ми доверительными интервалами.



**Рис. 2.** Элиминация модифицированных ЛНП человека из кровотока кроликов (приведены данные двух отдельных экспериментов): 1 – нативные ЛНП; 2 – глиоксаль-модифицированные ЛНП; 3 – метилглиоксаль-модифицированные ЛНП; 4 – МДА-модифицированные ЛНП.

цированных ЛНП (рисунок 1, кривые 1, 2 и 3 соответственно). В то же время МДА-модифицированные ЛНП кролика практически не обнаруживались в кровотоке животных уже через несколько минут после введения. Известно, что у человека оборот ЛНП составляет примерно 25–30 % в день [5, 12], тогда как, согласно полученным нами данным, у кроликов

за день элиминируется около 50 % меченых ЛНП. Таким образом, клиренс ЛНП у кроликов несколько выше, чем у человека.

Данные по клиренсу нативных и альдегид-модифицированных ЛНП плазмы крови человека у кроликов в двух сериях экспериментов представлены на рисунке 2. В целом клиренс гетерологичных

ЛНП человека у кроликов происходит быстрее, чем клиренс гомологичных ЛНП кролика. Несмотря на некоторые флуктуации элиминации глиоксаль- и метилглиоксаль-модифицированных ЛНП человека из кровотока кроликов, в целом данные двух серий экспериментов достаточно близки, однако можно отметить, что модифицированные ЛНП человека элиминируются из кровотока кроликов почти в 3 раза быстрее, чем модифицированные ЛНП кролика (рис. 2). Тем не менее, клиренс МДА-модифицированных ЛНП человека осуществляется, как и в случае МДА модифицированных ЛНП кролика, значительно быстрее, чем клиренс других альдегид-модифицированных ЛНП.

Таким образом, вопреки ожиданиям, глиоксаль- и метилглиоксаль-модифицированные ЛНП могут циркулировать в кровотоке не меньшее время, чем нативные ЛНП. Исходя из того факта, что в клиренсе нативных ЛНП основную роль играют клетки печени, можно полагать, что этот путь является основным и для элиминации глиоксаль- и метилглиоксаль-модифицированных ЛНП. В то же время чрезвычайно быстрое исчезновение МДА-модифицированных ЛНП из кровотока не может быть объяснено их столь быстрой утилизацией в печени. Можно полагать, что МДА может вызывать присоединение ЛНП после реакции апопротеина или аминокислотных групп частиц с одной из альдегидных групп этого диальдегида к белкам клеток крови при взаимодействии аминокислотных групп с второй (свободной) альдегидной группой МДА. Следовательно, полученные нами данные не позволяют сделать однозначное заключение об особенностях клиренса различных альдегид-модифицированных ЛНП, тем не менее, очевидно, что альдегид-зависимая модификация ЛНП может играть важную роль в механизмах повреждения

#### ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Капелько В.И., Шепелькова Г.С., Шумаев К.Б., Панасенко О.М., Коновалова Г.Г., Беленков Ю.Н. Механизмы окислительной модификации липопротеидов низкой плотности при окислительном и карбонильном стрессе // Биохимия. – 2007. – Т. 72, № 10. – С. 1330–1341.
2. Lankin VZ, Tikhaze AK, Kapelko VI, Shepelkova GS, Shumaev KB, Panasenkov OM, Konovalova GG, Belenkov YN (2007). The mechanisms of oxidative modification of LDL under oxidative and carbonyl stress [Mekhanizmy okislitel'noy modifikatsii lipoproteidov nizkoy plotnosti pri okislitel'nom i karbonil'nom stresse]. *Biokhimiya*, 72 (10), 1330-1341.
3. Bayer EA, Wilchek M (1990). Protein biotinylation. *Meth. Enzymol.*, (184), 138-160.
4. Cartun RW, Pedersen CA (1989). An immunocytochemical technique offering increased sensitivity and lowered cost with a streptavidin-horseradish peroxidase conjugate. *J. Histotechnol.*, 12 (4), 273-277.
5. Goldstein JL, Brown MS (2009). History of discovery: the LDL receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 29 (4), 431-438.

6. Gylling H, Kontula K, Miettinen TA (1995). Cholesterol absorption and metabolism and LDL kinetics in healthy men with different apoprotein E phenotypes and apoprotein B Xba I and LDL receptor Pvu II genotypes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, (15), 208-213.
7. Jomova K, Valko M (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283 (2-3), 65-87.
8. Lankin VZ, Tikhaze AK (2003). Free radical lipoperoxidation during atherosclerosis and antioxidative therapy of this disease. *Free Radicals, Nitric Oxide, and Inflammation: Molecular, Biochemical, and Clinical Aspects* (Tomasi A (eds.) et al.). *NATO Science Series*, (344), 218-231.
9. Lankin VZ, Konovalova GG, Tikhaze AK, Shumaev KB, Kumskova EM, Viigmaa M (2014). The initiation of free radical peroxidation of low-density lipoproteins by glucose and its metabolite methylglyoxal: a common molecular mechanism of vascular wall injury in atherosclerosis and diabetes. *Mol. Cell. Biochem.*, 395 (1-2), 241-252.
10. Lankin VZ, Tikhaze AK, Kumskova EM (2010). Aldehyde-dependent modification of low-density lipoproteins. *Handbook of lipoprotein research* (Rathbound JE (ed.)), 85-107.
11. Lankin VZ, Tikhaze AK, Kumskova EM (2012). Macrophages actively accumulate malonyldialdehyde-modified but not enzymatically oxidized low-density lipoprotein. *Mol. Cell. Biochem.*, 365 (1-2), 93-98.
12. Lindgren FT (1975). Preparative ultracentrifugal laboratory procedures and suggestions for lipoprotein analysis. *Analysis of lipids and lipoproteins* (Perkins EG (ed.)). *Amer. Oil. Chemists' Soc.*, 204-224.
13. Miettinen TA, Gylling H, Vanhanen H, Ollus A (1992). Cholesterol absorption, elimination, and synthesis related to LDL kinetics during varying fat intake in men with different apoprotein E phenotypes. *Arteriosclerosis Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, (12), 1044-1052.
14. Niedowicz DM, Daleke DL (2005). The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell. Biochem. Biophys.*, 43 (2), 289-330.
15. Requena JR, Fu MX, Ahmed MU, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, Thorpe SR (1997). Quantification of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts to lysine residues in native and oxidized human low-density lipoprotein. *Biochem. J.*, 322, 317-325.
16. Staines WA, Meister B, Melander T, Nagy JJ, Hokfelt TJ (1988). Three-color immunofluorescence histochemistry allowing triple labeling within a single section. *Histochem. Cytochem.*, (36), 145-151.
17. Tertov VV, Kaplun VV, Dvoryantsev SN, Orechov AN (1995). Apolipoprotein B-bound lipids as a marker for evaluation of low-density lipoprotein oxidation in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (214), 608-613.
18. Witz G (1989). Biological interactions of  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes. *Free Rad. Biol. Med.*, (7), 333-349.
19. Yla-Herttuala S (1991). Macrophages and oxidized low-density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Ann. Med.*, 23 (5), 561-567.

**Сведения об авторах**  
**Information about the authors**

**Гречникова Мария Александровна** – лаборант-исследователь ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава РФ (121552, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, 15А; e-mail: m.grechnikova@gmail.com)  
**Grechnikova Maria Alexandrovna** – Researcher Assistant of Russian Cardiology Research and Production Complex (121552, Moscow, 3ya Cherepkovskaya str., 15A; e-mail: m.grechnikova@gmail.com)

**Домогатский Сергей Петрович** – доктор биологических наук, заведующий лабораторией ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава РФ (e-mail: spdomo@yandex.ru)  
**Domogatskiy Sergey Petrovich** – Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Russian Cardiology Research and Production Complex (e-mail: spdomo@yandex.ru)

**Коновалова Галина Георгиевна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» (e-mail: gavakon5050@mail.ru)  
**Konovalova Galina Georgievna** – Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher of Russian Cardiology Research and Production Complex (e-mail: gavakon5050@mail.ru)

**Тихазе Алла Карловна** – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии свободнорадикальных процессов Института клинической кардиологии ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» (e-mail: tikhaze@cardio.ru)

**Tikhaze Alla Karlovna** – Doctor of Medical Sciences, Professor, Leading Research Officer of the Laboratory of Biochemistry of Free-Radical Processes of Institute of Clinical Cardiology of Russian Cardiology Research and Production Complex (e-mail: tikhaze@cardio.ru)

**Ланкин Вадим Зиновьевич** – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией биохимии свободнорадикальных процессов Института клинической кардиологии ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» (e-mail: lankin@cardio.ru)

**Lankin Vadim Zinovievich** – Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Laboratory of Biochemistry of Free-Radical Processes of Institute of Clinical Cardiology of Russian Cardiology Research and Production Complex (e-mail: lankin@cardio.ru)