

**ОКИСЛЕННЫЕ И СТРУКТУРНО-МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ЛИПОПРОТЕИНЫ
НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ****Ю.И. Рагино, Ю.П. Никитин***Научно-исследовательский институт терапии СО РАМН, Новосибирск*

Изучены окисленно- и структурно-модифицированные липопротеины низкой плотности (ЛНП) при атеросклерозе и некоторых основных факторах его риска. При клинически выраженном коронарном атеросклерозе и при его факторах риска, таких как гиперлипидемия, артериальная гипертензия и сахарный диабет, обнаружены практически сходные потенциально атерогенные изменения ЛНП, свидетельствующие об их окислительной и структурной модификации. Полученные результаты подтверждают патогенетически ключевую роль модифицированных ЛНП при атеросклерозе.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из главных морфологических характеристик атеросклероза является локальное накопление значительного количества липидов, главным образом эфиров холестерина (ХС), в стенке артерий, в частности, в “пенистых клетках”. Появление этих клеток, имеющих массивные включения эфиров ХС в цитоплазме, является своеобразным маркером атеросклеротического процесса. Большая роль в возникновении и развитии атеросклероза придается модифицированным липопротеинам низкой плотности (ЛНП), которые имеют низкое сродство к апо-В,Е-рецепторам клеток, но активно захватываются скэвенджер-рецепторами макрофагов (МФ) [1]. Скэвенджер-рецептор, в отличие от “классического” апо-В,Е-рецептора, не регулируется в зависимости от содержания ХС в клетке. Напротив, модифицированные ЛНП индуцируют экспрессию скэвенджер-рецепторов в МФ [2]. Таким образом, постоянный эндоцитоз ХС-богатых модифицированных ЛНП через скэвенджер-рецепторы МФ приводит к избыточному накоплению ХС в МФ и трансформации их в пенистые клетки [3]. Из всех видов модифицированных ЛНП наиболее атерогенными являются окисленные ЛНП (ок-ЛНП) и мелкие плотные ЛНП (мпЛНП).

В патогенезе атеросклероза большое признание получила концепция ключевой роли ок-ЛНП как инициаторов, провокаторов и индукторов атерогенеза в сосудистой стенке [4–6]. Эта концепция базируется на следующих экспериментальных результатах, полученных в исследованиях *in vivo* и *in vitro*. ЛНП, экстрагиру-

емые из атеросклеротических бляшек человека и животных, имеют физические и биологические свойства, подобные свойствам окисленных *in vitro* ЛНП, и проявляют способность к повышенному взаимодействию со скэвенджер-рецепторами МФ [7]. Обнаружено, что некоторая часть ЛНП в крови больных атеросклерозом проявляет свойства ок-ЛНП, которые являются иммуногенными частицами, и антитела против ок-ЛНП взаимодействуют с эпитопами ЛНП, полученных из атеросклеротических бляшек [8, 9]. Некоторые антиоксиданты, такие как пробукол, оказывают положительный эффект при экспериментальном атеросклерозе, способствуя уменьшению его проявлений [10]. Stenbrencher U.P. [11] было показано, что культивируемые эндотелиальные клетки сосудов, гладкомышечные клетки и МФ способны вызывать окислительную модификацию ЛНП и что ок-ЛНП обладают цитотоксическими и моноцит-хемотоксическими свойствами.

Окислительная модификация ЛНП является многоступенчатым процессом и включает в себя следующие события [4]: образование липоперекисей; фрагментацию окисленных жирных кислот, в результате которой образуются токсические низкомолекулярные продукты (альдегиды, спирты, кетоны и алканы); образование лизолецитина из лецитина; фрагментацию апо-В альдегидами, подобными малоновому диальдегиду (МДА) и последующую модификацию этого полипептида; окисление ХС до оксистеролов (7-кетохолестерола, 5,6-эпоксихолестерола, 7-В-оксихолестерола и др.); образование различных цитотоксических липидов как из жирных кис-

лот, так и из ХС; увеличение ЛНП в размерах в результате гидролиза неполярного ядра этих частиц, представленного эфирами ХС; снижение содержания ХС и изменение липид-белкового взаимодействия между апо-В и однослойной мембраной частицы ЛНП; модификация лизиновых остатков полипептидной цепи апо-В альдегидами и кетонами, появляющимися в результате распада гидроперекисей; снижение взаимодействия частиц ЛНП с апо-В, Е-рецептором к ЛНП в результате модификации апо-В. Свободнорадикальное окисление ЛНП приводит к изменению их химического состава и свойств, что характеризуется снижением содержания свободных полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), исчезновением антиоксидантов и значительным повышением содержания продуктов окисления, которых в свежеевыделенных нативных ЛНП мало. ОкЛНП имеют отрицательный заряд и высокое сродство к скэвнджер-рецепторам МФ [12]. В целом эта окислительная модификация зависит как от наличия двухвалентных ионов Cu^{2+} и Fe^{2+} [13], так и от способности сосудистых клеток — клеток эндотелия, моноцитов, МФ и гладкомышечных клеток — окислять ЛНП [2, 11]. В экспериментах на клеточных культурах все эти клетки способны осуществлять клеточно-зависимую окислительную модификацию ЛНП, но особую роль в этой модификации играют МФ, которые могут активно продуцировать супероксиданион, ОН-радикал, H_2O_2 , гидроперекиси и NO-радикалы. Этот тип клеток является наиболее вероятным индуктором окисления ЛНП [1, 14].

На начальных этапах окисления ЛНП появляются частицы, в которых повышено содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), снижен уровень антиоксидантов, нарушено сродство ЛНП к апо-В,Е-рецепторам, в то же время их способность взаимодействовать со скэвнджер-рецепторами макрофагов слаба. Такие ЛНП, обладая цитотоксичностью, выступают в качестве инициаторов воспалительного процесса. Их называют “минимально” окисленными ЛНП [15]. Появление “минимально” или “среднеокисленных” ЛНП рассматривают как фактор, инициирующий возникновение и развитие атеросклероза [1, 6, 15].

Обычно для оценки окислительной модификации ЛНП *in vivo* используется определение уровня содержания продуктов ПОЛ (гидроперекисей липидов, оксистеролов, диенов и др.) в выделенных ЛНП. С другой стороны, одним из информативных показателей “предрасположенности” ЛНП к окислительной модификации является исследование их резистентности к окислению *in vitro* в присутствии ионов металлов переменной валентности. Этот показатель отражает как прооксидантную возможность

ЛНП (содержание в них ПНЖК, гидроперекисей липидов) [16], так и их антиоксидантный потенциал (содержание α -токоферола, γ -токоферола, ретинола и других антиоксидантов) [13]. Информация об изменении химических и физических свойств ЛНП в процессе окисления в основном получена с использованием моделей окисления нативных ЛНП *in vitro* в присутствии ионов Cu^{2+} или Fe^{2+} . Концентрационные и временные характеристики этих изменений в процессе инкубации ЛНП *in vitro* с катализаторами окисления в настоящее время подробно изучены [13]. В целом процесс окисления ЛНП обычно делят на три последовательные фазы. В первую фазу — лаг-фазу — в ЛНП истощаются запасы в первую очередь α -токоферола и в последнюю — β -каротина. Минимальная липидная перекисидация этой фазы объясняется хорошей защитой ПНЖК эндогенными антиоксидантами. Анализ содержания основных антиоксидантов в ЛНП свидетельствует о наличии широкого спектра жирорастворимых антиоксидантов. Основным антиоксидантом в них считается α -токоферол, так как только он содержится во всех липопротеиновых частицах (в среднем на частицу приходится около 6 молекул α -токоферола) [17]. Более того, при Cu^{2+} -индуцированном окислении ЛНП накопление в них продуктов ПОЛ наблюдается только после полного исчезновения α -токоферола, концентрация которого падает значительно быстрее, чем γ -токоферола, ликопена, β -каротина, криптоксантина и др. [18]. Вторая фаза — фаза распространения окисления, во время которой ПНЖК быстро окисляются с образованием липидных гидроперекисей. После начала липидной перекисидации концентрации МДА и других продуктов ПОЛ начинают увеличиваться параллельно множественным повреждениям ЛНП под воздействием ионов Cu^{2+} или Fe^{2+} . ЛНП в основном содержат ПНЖК, такие как линолевая кислота (С-18:2), составляющая примерно 90 % общего состава ПНЖК, и арахидоновая кислота (С-20:4). Окисленные *in vitro* ЛНП имеют сниженное содержание фосфолипидов и ЭХС, более высокую плотность частиц [19]. Скорость образования и распада гидроперекисей липидов в ЛНП зависит от отношения Cu^{2+} /ЛНП, так как каждая частица ЛНП имеет 17 одинаковых медьсвязывающих участков [20]. Диаметр частиц ЛНП возрастает на 50 % после 24 ч окисления, происходит окислительная деформация апоВ-100. Во время длительного окисления ЛНП свободнорадикальная цепочечная реакция распространяется медленно и на ХС, но только после того, как ПНЖК уже окислительно разрушены. Если увеличить концентрацию ЛНП, то продолжительное их окисление *in vitro* приводит к частичной агрегации частиц ЛНП [19, 21]. Третья фаза — фаза разло-

жения. Она начинается тогда, когда большинство ПНЖК (около 70–80 %) окислилось и концентрация липидных пероксидов начинает падать. Пик нарастания липидных пероксидов (максимальная скорость окисления) приходится на границу второй и третьей фаз [13].

ЛНП гетерогенны, и внутри их плотностного градиента (1,019–1,063 г/мл) есть субпопуляции частиц, различных как по физико-химическим, так и по биологическим свойствам. Под действием липопротеинлипазы (ЛПЛ) на поверхности сосудистого эндотелия происходит гидролиз триглицеридов (ТГ) липопротеинов очень низкой плотности (ЛОНП), которые превращаются вначале в меньшие по размеру и обогащенные ХС, липопротеины промежуточной плотности (ЛПП), а затем в ЛНП. Крупные частицы ЛОНП практически не превращаются в ЛНП потому, что их ремнанты содержат много апо-Е и удаляются из кровотока через апо-Е-рецепторы или апо-В,Е-рецепторы, к которым они имеют большее сродство, чем ЛНП. Мелкие частицы ЛОНП, напротив, содержат мало апо-Е (1–2 молекулы на частицу), медленно элиминируются этим рецепторным путем, длительно циркулируют в крови, подвергаясь процессам липолитической деградации, и, в конечном счете, превращаются в субфракции ЛНП. Таким образом, именно мелкие частицы ЛОНП являются истинными предшественниками ЛНП и их субфракций [22]. Возможна и прямая секреция частиц ЛНП печенью. Об этом свидетельствовали кинетические исследования по изучению метаболизма апо-В во фракциях ЛОНП и ЛНП. Обнаружено, что при некоторых условиях и у человека, и у животных пул апо-В ЛНП превышает таковой ЛОНП, что позволило высказать предположение о дополнительных путях образования ЛНП и их субфракций. Апо-В,Е-рецепторы также имеют отношение к образованию субфракций ЛНП. При недостаточной рецепторной активности нарушается захват клетками не только ЛНП, но и ЛПП, что приводит к удлинению времени их циркуляции в крови и обогащению эфирами ХС, в том числе и за счет переноса эфиров ХС с липопротеинов высокой плотности (ЛВП), и превращением их в процессе дальнейшей липолитической деградации в субфракции ЛНП. Таким образом, существует несколько механизмов образования субфракций ЛНП: при липолитической деградации ЛОНП; путем прямой секреции ЛНП клетками печени; при недостаточности апо-В,Е-рецепторов — за счет возросшей доли трансформации ЛПП в ЛНП [22].

Субфракции ЛНП отличаются по содержанию липидов и белков, а также по химическому составу (ХС и его эфирам, ТГ, фосфолипидам,

витамины Е). По данным Chapman M.J. и соавторов, апо-Е неравномерно распределен в субфракциях ЛНП, его молярное содержание в мПЛНП в 60 раз ниже, чем апо-В. Это означает, что лишь одна мелкая плотная частица ЛНП из 60 имеет в своем составе оба белка. В больших легких субфракциях ЛНП количество апо-Е выше — одна частица из 8 содержит оба аполипопротеина. С увеличением плотности субфракций ЛНП увеличивается содержание в них свободного ХС и его эфиров [22]. Говоря о структурной гетерогенности фракции ЛНП, часто используют термин “фенотип”. Частицы ЛНП фенотипа А имеют диаметр 26–27 нм, низкую плотность (1,025–1,038 г/мл) и подразделяются на 3 субкласса: ЛНП-1, ЛНП-2, ЛНП-3. У людей с фенотипом В частицы ЛНП имеют меньший диаметр (<25 нм), большую плотность (>1,038 г/мл) и у них выделяется два субкласса: ЛНП-4 и ЛНП-5 [13]. Частицы ЛНП содержат 1 молекулу апо-В-100 и разное количество липидов, которое может занимать около 70 % веса мелких плотных ЛНП и около 80 % веса легких больших ЛНП. Характер фенотипа наследуется, однако внешние факторы также оказывают влияние на распределение частиц ЛНП по субклассам.

На основе структуры и метаболизма ЛНП могут быть разделены минимум на 3 большие субфракции. Большие легкие частицы ЛНП являются предшественниками средних и мПЛНП у здоровых людей. Среди этих субфракций средние ЛНП (плавающая плотность 1,030–1,036 г/мл) имеют более высокое сродство к апо-В,Е-рецептору клеток *in vitro*, обладают оптимальной рецептор-связывающей конформацией апо-В-100 и поэтому в плазме крови ЛНП преимущественно катаболизируются именно за счет средних частиц ЛНП [23]. Таким образом, средние субфракции ЛНП играют большую роль в гомеостазе ХС. Исследования по изучению процесса переноса эфиров ХС от ЛВП к апо-В-содержащим липопротеинам показали, что средние субфракции ЛНП являются большими акцепторами эфиров ХС и, поэтому, они играют скорее защитную роль, чем проатерогенную. По связыванию с апо-В,Е-рецепторами и скорости деградации субфракции ЛНП располагаются следующим образом: средние > легкие > плотные. Все эти данные говорят о том, что средние ЛНП не обладают атерогенными свойствами [22, 23]. Для мПЛНП характерно низкое содержание сиаловой кислоты. МПЛНП, в отличие от больших легких и средних частиц ЛНП, имеют более высокую электрофоретическую подвижность, более отрицательный заряд, они в большей степени склонны к агрегации. Эта субфракция ЛНП слабо связывается с апо-В,Е-