

А. А. Крутов, А. Ю. Мишарин, В. П. Цибульский, Т. Л. Бушуева,
В. Р. Бабасв, В. С. Репин

НЕЗАВИСИМАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ К НАТИВНЫМ И МОДИФИЦИРОВАННЫМ ЛИПОПРОТЕИНАМ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ НА КЛЕТКАХ В КУЛЬТУРЕ *

Предложен метод, позволяющий независимо визуализировать рецепторы к нативным и модифицированным липопротеинам низкой плотности на клетках в культуре. В основе метода — реконструкция липопротеинов холестерилловыми эфирами, содержащими различные хромофоры, рецепторное связывание их с клетками, флюоресцентная микроскопия клеток при различных длинах волн.

Введение. Рецептор-зависимый эндоцитоз липопротеинов низкой плотности (ЛНП) клетками интенсивно изучается в связи с участием этого процесса в патогенезе атеросклероза [1—5]. Установлено, что клетки макрофагальной природы наряду с рецепторами для нативных ЛНП имеют рецепторы для ЛНП, подвергшихся определенной химической модификации [4—8], в частности для липопротеинов, обработанных малоновым диальдегидом (мда-ЛНП). Взаимодействие модифицированных ЛНП с макрофагами является одним из возможных механизмов образования «пенистых клеток» в сосудистой стенке [9]. В связи с этим независимая визуализация ЛНП- и мда-ЛНП-рецепторов способна дать информацию о путях проникновения и распределении липопротеинов в клетках сосудистой стенки.

Одним из применяемых подходов к локализации ЛНП-рецепторов является взаимодействие клеток в культуре с ЛНП, реконструированными гидрофобными флюоресцентными зондами [10—16]. Аналогично рецепторы для модифицированных ЛНП были локализованы на клетках в культуре с использованием реконструированных мда-ЛНП [8, 13]. В настоящей работе предлагается методический подход к независимой визуализации ЛНП- и мда-ЛНП-рецепторов, использующий реконструкцию липопротеинов двумя различными хромофорами, инкубацию липопротеинов с исследуемыми клетками с последующей флюоресцентной микроскопией при двух длинах волн.

Материалы и методы. Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках «Kieselgel 60», «PSC Kieselgel 60» («Merck», ФРГ). Аналитическое ультрацентрифугирование проводили на приборе «Beckman E» (США).

Аминокaproновая кислота получена от «Chemarol» (ЧССР), 7-нитро-4-хлорбензо-2-окса-1,3-диазол (NBD-хлорид), N-метилимидазол, 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорид (ТПС-хлорид), бис-диметилацеталь малонового диальдегида — от «Aldrich» (США), N,N-диметиламинонафталинсульфонилхлорид (дансилхлорид), триолеин, холестерилолеат и фосфатидилхолин яичного желтка — от «Sigma» (США), холестерин от «Merck» (ФРГ), остальные реактивы и растворители соответствовали стандартным квалификациям хч и осч. Культуральные среды и фетальная сыворотка теленка (ФСТ) получены от «Flow Laboratories» (США), пластиковая посуда — от «Falcon plastics» и «Nunc» (Дания).

ЛНП выделяли из плазмы крови здоровых доноров по [17], липопротеиндефицитную сыворотку по [18], ЛНП обрабатывали малоновым диальдегидом, как в работе [19].

Содержание общего белка определяли по [20]; аполипопротеина В (апоВ) — методом ИФА [21]; фосфолипидов — по липидному фосфору [22]; общего и свободного холестерина — с использованием набора «Boehringer Mannheim Kalibration Kit» (ФРГ).

6-(7-нитробензо-2-окса-1,3-диазол-4-) и л-аминогексановая кислота (III). Смесь NBD-хлорида (200 мг, 1,0 ммоль), 6-аминокапроновой кислоты (197 мг, 1,5 ммоль) и 100 мл абсолютного диоксана кипятили 2 ч, к смеси добавляли

* Представлена членом редколлегии О. В. Рохлиным.

2 г силикагеля Л 40/100 и упаривали в вакууме. Смесь продуктов, адсорбированную на силикагеле, помещали в верхнюю часть колонки (2,5×12 см) с тем же силикагелем, уравновешенным смесью бензол:диоксан (5:1). Колонку промывали 200 мл той же смеси, продукт III элюировали смесью бензол:диоксан (2:1), упаривали и кристаллизовали из 80 %-ного водного метанола. Оранжевые кристаллы, температура плавления 150—152 °С, λ_{\max} , диоксан, 465 нм (23000). Выход 185 мг (63 %).

6 - (5 - N,N - диметиламинонафталин - 1 - сульфонил) - аминок-гексановая кислота (IV). К раствору дацилхлорида (135 мг, 0,5 ммоль) в 50 мл ацетона добавляли раствор 6-аминокапроновой кислоты (163 мг, 1,25 ммоль) в 18 мл воды, затем добавляли 2 мл 1 М раствора бикарбоната натрия, выдерживали 90 мин при 45 °С, упаривали, добавляли 10 мл хлороформа и 10 мл насыщенного раствора бикарбоната натрия, водный слой экстрагировали хлороформом (3×5 мл), объединенный хлороформный раствор сушили, упаривали и остаток хроматографировали на колонке (2,5×12 см) с силикагелем с использованием линейного градиента бензол: (бензол:диоксан) (2:1). Фракцию, содержащую IV, хроматографировали на пластинке в системе гексан:ацетон:муравьиная кислота (70:30:1). После элюирования ацетоном и высушивания в вакууме получен светло-зеленый стеклообразный продукт; λ_{\max} , диоксан, 336 нм (34000). Выход 116 мг (0,47 ммоль), 93 %.

Хроматофорсодержащие холестерилловые эфиры I и II (общий метод). Смесь эквимольных количеств кислоты (III или IV) и холестерина высушивали переупариванием с абсолютным толуолом, растворяли в абсолютном толуоле (3 мл/1 ммоль), добавляли ТПС-хлорид (1,2 эквивалента) при 0 °С, затем 2,5 эквивалента N-метилимидазола, перемешивали в эвакуированной колбе 20 мин, добавляли толуол (10 мл/1 ммоль) и насыщенный раствор бикарбоната натрия (5 мл/1 ммоль), водный слой экстрагировали толуолом (2×5 мл). Объединенный толуольный экстракт последовательно промывали равными объемами насыщенного раствора бикарбоната натрия, воды, 2 % соляной кислоты, воды, сушили, упаривали и хроматографировали на колонке (1,8×10 см) с силикагелем в линейном градиенте бензол: (бензол:ацетон) (2:1).

3 - β - О - [6 - (7 - нитробензо - 2 - окса - 1,3 - диазол - 4 -)иламиногексаноил]холест-5-ен (I): оранжевые кристаллы, температура плавления 119—121 °С (из смеси гексан:ацетон, 5:1). Н-ЯМР спектр: 0,630 с 18 CH₃; 0,815 δ (6,6), 0,817 δ (6,6) 26 CH₃, 27 CH₃; 0,870 δ (6,6) 21 CH₃; 0,961 с 19 CH₃ в холестерилловом фрагменте; 2,27 τ (6,7); 6,120 δ (8,0); 8,431 δ (8,0) α CH₂ и протоны ацильного фрагмента. Выход 84 %.

3 - β - О - [6 - (5 - N,N-диметиламинонафталин - 1 - сульфонил (-амидогексаноил)-холест-5-ен (II). Н-ЯМР спектр: 0,626 с 18 CH₃; 0,814 δ (6,6), 0,817 δ (6,6) 26 CH₃, 27 CH₃; 0,864 δ (6,6) 21 CH₃; 0,960 с 19 CH₃ в холестерилловом фрагменте; 2,07 τ (6,5); 2,84 с, 7,14 δ (7,3), 7,47 псевдо τ , 7,52 псевдо τ , 8,19 $\delta\delta$ (7,3; \sim 1), 8,49 δ α CH₂, CH₃N и протоны нафталинового цикла. Выход 72 %.

Реконструированные ЛНП. Для введения соединений I и II в ЛНП отдельно получали смесь липидов: 4,8 мг фосфатидилхолина яичного желтка, 2,4 мг триолеина, 2,0 мг холестерина, 4,4 мг холестерилолеата и 4,0 мг соединения I (или II) растворяли в 1,2 мл абсолютного изопропанола. Раствор хранили в темноте при -20 °С. Раствор липидов (100 мкл), нагретый до 40 °С, вводили шприцом в охлажденный до 4 °С буфер (1 мл): 140 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 11,6 мМ Na₂HPO₄, 1,5 мМ KН₂PO₄. К полученной эмульсии добавляли 0,24 мл буфера, содержащего ЛНП (2 мг апоВ) и 3 мл ЛДС (60 мг белка), перемешивали на вортексе 1 мин, инкубировали при 37 °С 24 ч. Полученную прозрачную смесь центрифугировали в течение 24 ч при 40000 об/мин и 4 °С для флотации непрореагировавшей липидной эмульсии, доводили плотность раствора до 1,063 г/мл и ЛНП выделяли флотацией при 40000 об/мин и 4 °С в течение 36 ч. Препарат ЛНП, содержащий флуоресцирующий холестерилловый эфир I или II хроматографировали на колонке 1,2×70 см с сепарозой CL-4В, проводя хроматографию в буфере со скоростью 19 мл/ч.

Спектральные измерения. Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре «Beckman DU 8», спектры ПМР — на приборе «WM500, Bruker» (ФРГ), спектры флуоресценции — на приборе «Aminco SPF 500» при 25 °С в кювете с длиной оптического пути 1 см. Длина волны возбуждения 465 нм для NBD-содержащих хромофоров, 335 нм — для дансил-содержащих хромофоров. Тушение флуоресценции реконструированных ЛНП и мда-ЛНП проводили йодид-ионом. Константу тушения [23] определяли по уравнению Штерна — Фольмера: $I_0/I = 1 + K_{sv} \cdot C$, где I и I_0 — интенсивности

флюоресценции в присутствии и отсутствие тушителя, K_{ext} — константа тушения, C — концентрация йодид-иона.

Имуноферментный анализ проводили по методу [21] с использованием иммобилизованных антител козы против ЛНП человека.

Клетки. Нормальные фибробласты выращивали из полученного путем биопсии кусочка кожи предплечья здорового донора. Клетки культивировали при 37 °С в атмосфере 95 % воздуха и 5 % двуокиси углерода в пластиковых флаконах с площадью поверхности 75 см² в среде Игла, содержащей 25 мМ НЕРЕС, 220 мМ NaHCO₃, 1 % незаменимых аминокислот, 100 мкг/мл канамицина, 2 мМ глутамин и 15 % ФСТ.

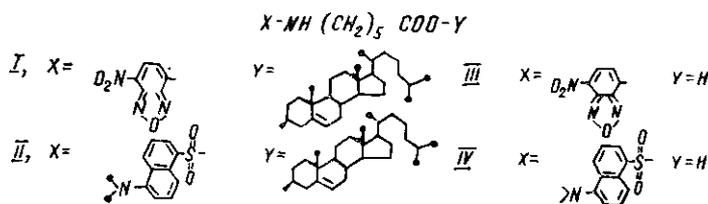
Перитонеальные макрофаги мыши линии J774 культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 4 мМ глутамин, 100 мкг/мл канамицина и 10 % ФСТ.

Рецепторный иммуноферментный анализ (РИФА) [21, 24]. Для проведения экспериментов фибробласты и макрофаги выращивали в лунках 96-ячеечной плашки до состояния монослоя. За 48 ч до начала эксперимента фибробласты отмывали ФСР и добавляли среду, содержащую 10 % ЛДС. После отмывки ФСР к клеткам добавляли среду с 10 % ЛДС, содержащую антитела с пероксидазой хрена (АТ-ПХ), и липопротеины в возрастающих концентрациях и инкубировали в течение 3 ч при 37 °С в атмосфере, содержащей 5 % углекислого газа. Затем клетки отмывали на холоду ФСР-БСА и последовательно вносили 50 мкл 0,5 %-ного раствора тритона X-100 в 50 мМ цитратном буфере (рН 4,7) и добавляли 150 мкл субстратной смеси. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 50 %-ной серной кислоты, измеряли оптическую плотность при 492 нм. Каждое измерение проводили троекратно.

Флюоресцентная микроскопия. Клетки, помещенные в чашки диаметром 35 мм инкубировали в среде, содержащей 10 % ЛДС в течение суток, затем среду заменяли на свежую, содержащую реконструированные ЛНП или мда-ЛНП (15—20 мкг апоВ в 1 мл), и инкубировали в течение 4 ч при 37 °С, затем клетки отмывали свежей средой в течение 10 мин при 37 °С, промывали ФСР и фиксировали 3 %-ным раствором формальдегида в ФСР в течение 20 мин. Препараты промывали ФСР и добавляли смесь ФСР — глицерин (1 : 9). Визуализацию проводили на флюоресцентном микроскопе «Ortop», используя стандартный набор фильтров.

Результаты и обсуждение. В задачи данной работы входило: 1) выбор структур и простого метода получения хромофорсодержащих холестерилловых эфиров, пригодных для реконструкции липопротеинов; 2) проведение реконструкции ЛНП и мда-ЛНП хромофорсодержащими холестерилловыми эфирами, характеристика реконструированных частиц, доказательство сохранения антигенных свойств апоВ; 3) визуализация ЛНП- и мда-ЛНП-рецепторов в культурах фибробластов эксплантантов кожи человека и макрофагов мыши линии J774. (Рецепторное связывание липопротеинов с данными клеточными культурами исследовано [3, 4, 6, 8, 9].)

Хромофорсодержащие холестерилловые эфиры I и II. Среди гидрофобных флюоресцентных зондов, использовавшихся для реконструкции ЛНП, наиболее удобны флюоресцентные аналоги холестерилловых эфиров жирных кислот, содержащие хромофорный фрагмент в ацильной [10] или стеринной [11, 14] части молекулы. Число использованных соединений достаточно велико, однако их получение требует проведения синтеза по оригинальной схеме в каждом конкретном случае. В настоящей работе получены и использованы холестерилловые эфиры I и II.



Синтез тривиален и состоит из модификации аминофункции 6-аминокапроновой кислоты стандартными реагентами, используемыми для

флюоресцентной дериватизации аминогрупп; ацилирования полученными продуктами гидроксильной функции холестерина в присутствии конденсирующих реагентов [25]. Спектральные характеристики приведены в табл. 1. Данная схема позволяет просто получить холестерилловые эфиры с требуемыми спектральными свойствами.

Реконструированные липопротейны. Соединения I и II вводили в инкубационную смесь в составе липидной эмульсии, содержащей очищенный фосфатидилхолин яичного желтка, холестерин,

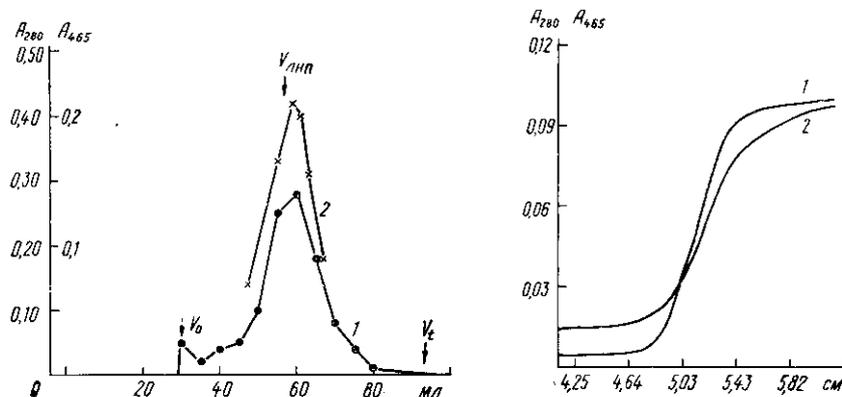


Рис. 1. Гель-хроматография реконструированных липопротейнов ЛНП-I на колонке 0,8×60 см с сефарозой CL-4В, скорость 14 мл/ч (хроматографический профиль разделения мда-ЛНП-II аналогичен). Стрелкой указан объем выхода нативных ЛНП

Fig. 1. Gel chromatography of reconstituted lipoproteins LDL-I on 0.8×60 cm column with CL-4B Sepharose. Elution rate was 14 ml/h. (The separation of mda-LDL-II has the same picture.) The arrow shows the elution volume of native LDL

Рис. 2. Распределение оптической плотности при аналитическом ультрацентрифугировании реконструированных липопротейнов ЛНП-I при 280 (1) и 465 нм (2) через 140 мин после начала ультрацентрифугирования. (Центрифугирование в растворе КВг, плотность 1,17 г/л, скорость 17000 об/мин)

Fig. 2. Optical density distribution during the analytical ultracentrifugation of reconstituted lipoproteins LDL-I at 280 nm (1) and 465 nm (2) 140 min after the beginning of ultracentrifugation. Centrifugation was carried out in KBr solution, density—1.17 g/l, 17000 rpm

триолеин, холестерилолеат. В состав инкубационной смеси входили ЛНП (или мда-ЛНП) и свежая липопропротеиндефицитная сыворотка плазмы крови ($d > 1,216$ г/мл), содержащая катализаторы обмена неполярных липидов. Реконструированные липопротейны выделяли двукратным ультрацентрифугированием с последующей гель-хроматографией (рис. 1). Совпадение объемов выхода белка и хромофоров свидетельствует о хроматографической гомогенности выделяемой фракции. Данные аналитического ультрацентрифугирования при двух длинах

Таблица 1
Спектральные свойства холестерилловых эфиров I и II
Spectral properties of cholesteryl esters I and II

Растворитель	Спектры I		Спектры II	
	Поглощения λ , нм (ϵ)	Флюоресценции λ , нм (ν)	Поглощения λ , нм (ϵ)	Флюоресценции λ , нм (ν)
Гексан	463 (24000)	509 (0,37)	337 (29000)	469 (0,36)
Бензол	463 (21600)	517 (0,55)	347 (29000)	480 (0,48)
Этилацетат	462 (23000)	515 (0,69)	343 (36000)	490 (0,41)
Диоксан	463 (23000)	517 (0,49)	343 (34000)	484 (0,57)
Этанол	465 (24000)	530 (0,50)	345 (34000)	510 (0,40)
Метанол	465 (23500)	532 (0,43)	345 (34000)	512 (0,40)

волн указывают на гомогенность препаратов по данным флотации (рис. 2). Состав и спектральные свойства реконструированных липопротеинов сведены в табл. 2.

О локализации хромофоров в гидрофобной области реконструированных липопротеинов судили по сравнению их спектров флюоресценции с таковыми соединений I и II в разных растворителях (табл. 1).

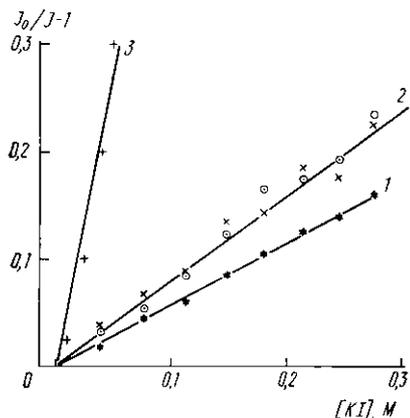


Рис. 3. Тушение флюоресценции реконструированных липопротеинов в присутствии йодид-иона: 1, 3 — флюоресценция триптофановых хромофоров в ЛНП и в воде соответственно (возбуждение при 295 нм, флюоресценция при 330 нм); 2 — флюоресценция холестерилового эфира I в реконструированных ЛНП-II (возбуждение при 465 нм, флюоресценция при 520 нм). Тушение флюоресценции мда-ЛНП-II измеряли аналогично

Fig. 3. The quenching of lipoprotein chromophores in the presence of iodide ion: 1, 3 — the tryptophan fluorescence in LDL and in water, respectively (excitation at 295 nm, fluorescence at 330 nm); 2 — the fluorescence of LDL-I (excitation at 465 nm, fluorescence at 520 nm). The quenching of mda-LDL-II in the presence of iodide ion was the same

Зависимость интенсивности флюоресценции ЛНП-I и мда-ЛНП-II от концентрации тушителя, не проникающего в гидрофобную область, представлена на рис. 3. Низкое значение константы Штерна — Фольмера ($K_{sv}=0,9$) указывает на отсутствие контакта хромофора с водной фазой. Такое же значение K_{sv} было получено для гидрофобных остатков триптофана апоВ в составе ЛНП, в то время как для свободного триптофана в воде K_{sv} составляет 12,0 [26].

Таблица 2

Состав и свойства реконструированных липопротеинов
Composition and properties of reconstituted lipoproteins

Характеристика	ЛНП-I	мда-ЛНП-II
Состав (апоВ : фосфолипид : хромофорсодержащий холестероловый эфир, моль : моль)	1:730(±70):56(±10)	1:690(±70):53(±10)
Спектр поглощения, нм	465	342
Спектр флюоресценции, нм	522	492

Примечание. Содержание апоВ рассчитано из данных ИФА и определения количества белка; содержание фосфолипида — из определения липидного фосфора; содержание эфиров холестерина I и II — из спектров поглощения (см. «Материалы и методы»).

Данные иммуноферментного анализа (ИФА) указывают на сохранение антигенных свойств апоВ в реконструированных ЛНП и мда-ЛНП. Содержание апоВ, рассчитанное из калибровочной кривой, полученной методом ИФА, находится в соответствии с содержанием общего белка (табл. 2).

Взаимодействие реконструированных липопротеинов с клетками в культуре. Рецепторное связывание ЛНП-I и мда-ЛНП-II исследовалось методом РИФА. Связывание ЛНП-I с фибробластами соответствует связыванию нативных ЛНП (рис. 4, а). Это позволяет локализовать участки клеточной поверхности, связывающие ЛНП-I в виде отдельных флюоресцирующих гранул

(рис. 4, б). В случае мда-ЛНП-II накопления метки в культуре фибробластов не наблюдалось. Связывание ЛНП-I и мда-ЛНП-II с макрофагами мыши линии J774 представлено на рис. 5. В этом случае связывание мда-ЛНП-II превосходит связывание ЛНП-I в 5 раз, что со-

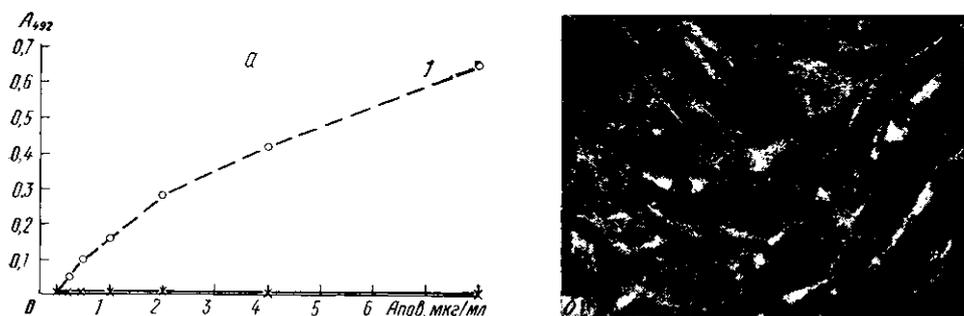


Рис. 4. Связывание реконструированных липопротеинов с фибробластами кожи человека: а — РИФА (взаимодействие ЛНП-I (1) и мда-ЛНП-II (2)); б — флюоресцентная микроскопия клеток после инкубации с ЛНП-I (фильтр 510 нм, $\times 400$)

Fig. 4. Interaction of reconstituted lipoproteins with human skin fibroblasts: а — ELIRA (binding of LDL-I (1) and of mda-LDL-II (2)); б — fluorescent microscopy of cells after their interaction with LDL-I (filter — 510 nm, magnification — 1 : 400)

гласуется с данными [9]. Включение хромофоров в культуру макрофагов, наблюдаемое методом флюоресцентной микроскопии, качественно соответствует данным РИФА. Включение хромофоров в клетки значительно снижается в присутствии нереконструированных липопротеинов, что указывает на рецептор-опосредованный характер захвата клетками реконструированных липопротеинов.

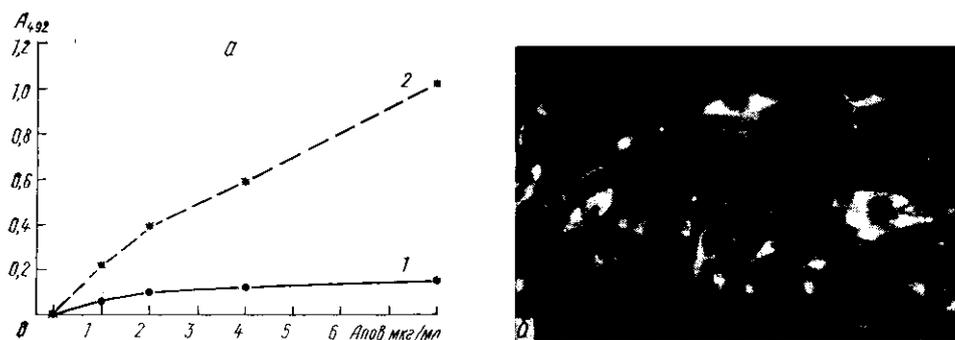


Рис. 5. Связывание реконструированных липопротеинов с макрофагами мыши J774: а — РИФА (взаимодействие ЛНП-I (1) и мда-ЛНП-II (2)); б — флюоресцентная микроскопия клеток после инкубации с мда-ЛНП-II (фильтр 460 нм, $\times 400$)

Fig. 5. Interaction of reconstituted lipoproteins with mouse macrophages J774: а — ELIRA (binding of LDL-I (1) and of mda-LDL-II (2)); б — fluorescent microscopy of cells after their interaction with mda-LDL-II (filter — 460 nm, magnification — 1 : 400)

Таким образом, предложенный метод позволяет одновременно и независимо идентифицировать и локализовать рецепторы для нативных и модифицированных ЛНП.

В заключение мы считаем нужным отметить, что 1) методы реконструкции ЛНП гидрофобными соединениями [10—16] в наших опытах оказались малоэффективными либо вследствие низкого содержания хромофора в реконструированной частице [10, 14], либо из-за денатурации ЛНП и потери антигенных свойств апоВ [11—13]; 2) использование соединений I и II позволяет локализовать поверхностные рецепторы на клетках в культуре, однако малоэффективно в опытах по на-

копленню холестерилловых эфиров в клетках (отсутствие корреляции между содержанием хромофора внутри клетки и количеством рецептированных липопротеинов, что, вероятно, связано с лизосомальной деградацией I и II, происходящей в процессе интернализации).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Brown M. S., Goldstein J. L.* Receptor mediated endocytosis: insights from lipoprotein receptor system // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1979.—76, N 7.—P. 3330—3337.
2. *Mahley R. W., Innerarity T. L.* Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis // Biochim. et biophys. acta.—1983.—737, N 2.—P. 197—222.
3. *Goldstein J. L., Brown M. S.* Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts: a comparison of cells from a normal subjects and from a patient homozygous familial hypercholesterolemia // J. Biol. Chem.—1974.—249, N 16.—P. 5153—5162.
4. *Henriksen T., Mahoney E. M., Steinberg D.* Enhanced macrophage degradation of low density lipoproteins previously incubated with cultured endothelial cells. Recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1981.—78, N 10.—P. 6499—6503.
5. *Pitts R. E., Innerarity T. L., Mahley R. W.* Foam cell in explants of atherosclerotic rabbit aortas have receptors to β -very low density lipoproteins // Arteriosclerosis.—1983.—3, N 1.—P. 2—12.
6. *A binding site on macrophages that mediated uptake and degradation of acetylated low density lipoproteins producing massive cholesterol deposition / J. L. Goldstein, S. K. Ho, Y. K. Basu, M. S. Brown // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1979.—76, N 1.—P. 333—337.*
7. *Altered metabolism (in vivo and in vitro) of plasma lipoproteins after selective chemical modification of lysine residues of the apoproteins / R. W. Mahley, T. L. Innerarity, H. M. Weisgraber, S. Y. Oh // J. Clin. Invest.—1979.—64, N 3.—P. 743—750.*
8. *Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte—macrophages / A. M. Fogelman, I. Schechter, J. Seager et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1980.—77, N 4.—P. 2214—2218.*
9. *Brown M. S., Goldstein J. L.* Lipoprotein metabolism in the macrophage: implication for cholesterol deposition in atherosclerosis // Annu. Rev. Biochem.—1983.—52, N 2.—P. 223—261.
10. *Slar L. A., Mantullin W. W., Pownall H. J.* Fluorescent cholesteryl esters in the core of low density lipoprotein // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1982.—105, N 2.—P. 674—680.
11. *N-(2-Naphtyl)-23, 24-dinor-5chole-22-amino-3-ol, a fluorescent cholesterol analogue / Y. J. Kao, A. K. Soutar, K.-Y. Hong et al. // Biochemistry.—1978.—17, N 13.—P. 2689—2696.*
12. *Reconstituted low density lipoprotein: a vehicle for the delivery of hydrophobic fluorescent probes to cells / M. Krieger, L. C. Smith, R. G. M. Anderson et al. // J. Supr. Struct.—1979.—10, N 4.—P. 467—478.*
13. *Preparation and spectral properties of lipophilic fluorescent derivatives. Application to plasma low density lipoproteins / J. R. Falck, M. Krieger, J. L. Goldstein, M. S. Brown // J. Amer. Chem. Soc.—1981.—103, N 24.—P. 7396—7398.*
14. *Lipoproteins reconstituted with steroid containing the nitrobenzoxadiazol fluorophore / J. F. Graig, D. R. Via, W. W. Mantullin et al. // J. Lipid Res.—1981.—22, N 4.—P. 687—696.*
15. *Replacement of cholesteryl esters of low density lipoprotein with endogeneous cholesteryl linoleate / M. Krieger, M. S. Brown, J. R. Faust, J. L. Goldstein // J. Biol. Chem.—1978.—253, N 12.—P. 4093—4101.*
16. *Sklar L. A., Graig J. F., Pownall H. J.* Induced circular dichroism of incorporated fluorescent cholesteryl esters and polar lipids as a probe of human serum low density lipoprotein structure and melting // Ibid.—1981.—256, N 9.—P. 4286—4292.
17. *Separation of the main lipoprotein density classes from human plasma by rate zonal ultracentrifugation / J. R. Patsch, S. Suiler, G. Kostner et al. // J. Lipid Res.—1974.—15, N 3.—P. 356—366.*
18. *Lindgren F. T.* Preparative ultracentrifugal laboratory procedures and suggestions for lipoprotein analysis. Analysis lipids and lipoproteins / Ed. E. C. Perkins.—New York: Amer. Oil Chemists Soc., 1975.—P. 204—224.
19. *Haberland M. E., Fogelman A. M., Edwards P. A.* Specificity of receptor-mediated recognitions of malondialdehyde-modified low density lipoproteins // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1982.—79, N 4.—P. 1712—1716.
20. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.—1951.—93, N 2.—P. 265—275.
21. *Enzyme-linked immunoreceptor assay of low density lipoprotein receptors / S. N. Preobrazhensky, V. O. Ivanov, I. V. Fuki et al. // Analyt. Biochem.—1985.—149, N 2.—P. 269—274.*
22. *Vaskovsky V. E., Kostetsky E. V., Vasendin I. M.* A universal reagent for phospholipid analysis // J. Chromatogr.—1975.—114, N 2.—P. 129—141.

23. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран.— М.: Наука, 1980.—320 с.
24. *Enzyme immunoassay of the receptors for modified low density lipoproteins* / S. N. Preobrazhensky, V. P. Tsibulsky, I. V. Fuki et al. // *Analyt. Biochem.*— 1986.— 154, N 3.— P. 382—387.
25. А. с. 1126574 СССР, МКИ⁴, Н 02 № 1/08. Способ получения спин-меченных эфиров холестерина и спин-меченного лецитина / А. Ю. Мишарин, Н. Г. Бушмакина, Б. К. Чернов // *Открытия. Изобретения.*— 1984.— № 44.— С. 109—111.
26. *Lehrer S. S. Solute perturbation of protein fluorescence. The quenching of the tryptophan fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion* // *Biochemistry.*— 1971.—10, N 15.— P. 3254—3263.

НИИ эксперим. кардиологии
Всесоюз. кардиолог. науч. центра АМН СССР, Москва

Получено 25.02.88

INDEPENDENT VISUALIZATION OF RECEPTORS FOR THE NATIVE AND MODIFIED LOW DENSITY LIPOPROTEINS IN CELL CULTURES

A. A. Krutov, A. Yu. Misharin, V. P. Tsibulsky, T. L. Bushueva, V. R. Babaev, V. S. Repin

Institute of Experimental Cardiology, All-Union Cardiological Research Center, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Summary

The method is suggested to prepare cholesteryl esters derivatives containing fluorescent chromophores in acyl chains. The reconstitution of low-density lipoproteins (native and malondialdehyde-treated ones) has been carried out by fluorescent cholesteryl esters. Using the receptor mediated binding of fluorescent lipoproteins to human skin fibroblasts and mouse macrophages the possibility of independent visualization of receptors is shown by means of fluorescent microscopy using observations with different wave-lengths.