

9. Хроматография в тонком слое полиамида / П. Д. Решетов, Г. Г. Честухина, С. Махмутов, А. С. Пышкина // Химия природ. соединений.— 1971.— № 1.— С. 66—88.
10. Некоторые физико-химические свойства белка тел включений вируса ядерного полиэдруса и вируса гранулеза озимой совки, *Agrotis segetum* / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак, С. Б. Серебряный // Биополимеры и клетка.— 1985.— 1, № 3.— С. 121—124.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики
АН УССР, Киев

Получено 27.03.89

УДК 616.132—004.6—09;616.132—02:577.122.856

**Р. З. Ваврин, А. С. Кузнецов, Н. С. Парфенова, В. А. Носкин,
Л. В. Оленикова, И. В. Криворученко, А. Ю. Сунгуров, Е. И. Коган,
Е. Я. Маграчева, Ю. И. Пивоварова**

РАЗМЕРЫ ЛИПОПРОТЕИДОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА И НОРМОЛИПИДЕМИЕЙ *

Сопоставлены свойства обычных по размеру ($R=9,8\pm 0,1$ нм) и мелких ($R=7,6\pm 0,1$ нм) липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) здоровых людей и мелких липопротеидов этого же класса ($R=7,7\pm 0,1$ нм) пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС). Установлено, что у здоровых лиц мелкие ЛПНП более склонны к агрегации, чем обычные. С другой стороны, мелкие ЛПНП больных ИБС еще более нестабильны, чем мелкие ЛПНП здоровых лиц. Предположено, что нестабильность ЛПНП может быть фактором риска ИБС.

Введение. Взаимосвязь между дислиппротеинемиями в ИБС общеизвестна. Вместе с тем особый интерес представляет это заболевание у пациентов с нормолипидемией. В частности, описан синдром гиперapo-B-липопропротеинемии, типичный для этой группы больных. Синдром характеризуется относительным обеднением частиц ЛПНП липидами и обогащением белковыми компонентами [1], а также увеличением как скорости синтеза, так и элиминации из кровотока [2].

Цель данной работы состояла в изучении размеров ЛПНП и свойств их поверхности у пациентов с ИБС, сопровождающейся нормолипидемией, по сравнению со здоровыми людьми.

Материалы и методы. Кровь получали от лиц без клинических признаков ИБС и от пациентов с ИБС, документированной коронаро- и кардиографически. Выделение ЛПНП и комплекс различных методов, позволяющих получить информацию о размерах, заряде, свойствах поверхности, стабильности, конформации белка и взаимодействии липопротеидов (ЛП) с макрофагами, описаны ранее [3—7].

Результаты и обсуждение. Из данных табл. 1 видно, что пациенты с ИБС имеют близкие уровни суммарных триглицеридов и α -холестерина со здоровыми людьми, а уровень общего холестерина достигает верхней границы нормы (250 мг/дл). То есть ИБС у этих пациентов сопровождается или нормолипидемией, или умеренной гиперхолестеринемией.

При анализе с помощью лазерной корреляционной спектроскопии были выявлены три типа распределений ЛПНП по радиусу (R) (рис. 1). Для типа *A* характерно преобладание частиц с $R=9—11,5$ нм (среднечисленный $R=9,8$ нм). В случае типа *B* отмечался сдвиг в сторону преобладания мелких ЛПНП с $R=7—9$ нм ($\bar{R}_N=7,7$ нм). При типе *B* увеличивалась доля как частиц с $R=7—9$, так и 11,5—15,0; 15—21 нм по сравнению с типом *A* ($\bar{R}_N=9,8$). То есть при типе *B* значение среднечисленного радиуса одинаково с типом *A*.

* Представлена членом редколлегии В. М. Кавсаном.

Оказалось, что у пяти здоровых людей имелось распределение ЛПНП по радиусу типа *A*, а у трех — типа *B*. В случае больных ИБС у пяти пациентов имелось распределение типа *B* и у двух — типа *B* (табл. 1). Полученные данные свидетельствуют о том, что при ИБС на фоне нормолипидемии (умеренной гиперхолестеринемии) гораздо чаще выявляются мелкие ЛПНП, чем у здоровых лиц. Этот вывод согласуется с результатами других исследователей [8]. Хотя присутствие мелких ЛПНП и расценивается как фактор риска ИБС [9], воз-

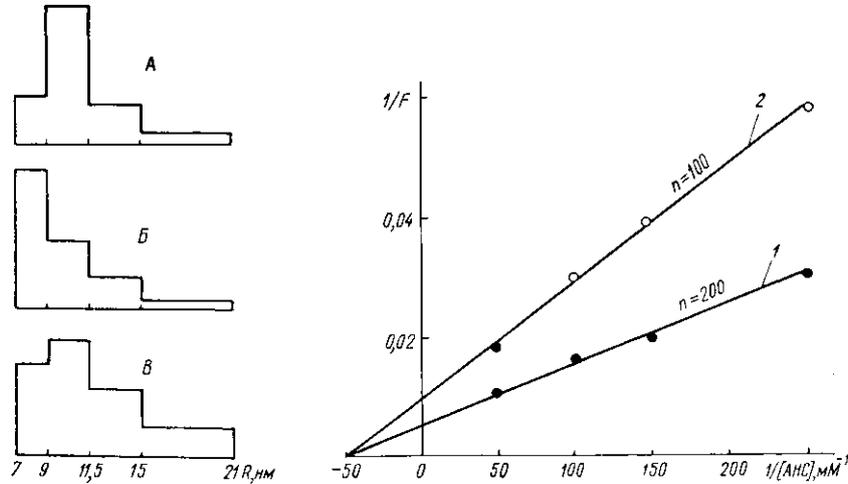


Рис. 1. Типы распределений ЛПНП по радиусу частиц

Fig. 1. Patterns of LDL radius distributions

Рис. 2. Титрование ЛПНП зондом АНС: 1 — ЛПНП пациента 3; 2 — ЛПНП донора 10. График представлен в обратных координатах. Ось абсцисс — величина, обратная концентрации зонда в образце ЛП; ось ординат — величина, обратная интенсивности флюоресценции зонда. Обратная величина отрезка, отсекаемого по оси ординат, характеризует относительное число мест связывания зонда липопротеидной частицей. Концентрация белка ЛП — 50 мкг/мл. Длина волны возбуждения и испускания флюоресценции 380 и 470 нм соответственно. Спектрофлюориметр «Hitachi MPF-4». Ширина щелей монохроматоров 5 нм

Fig. 2. LDL titration by ANS label. Data are plotted in reciprocal concentration of ANS label in a LDL specimen; ordinate is a reciprocal fluorescence intensity. The intersection of the curve and the ordinate characterizes the relative number of sites on the lipoprotein particle bonding ANS label. Protein concentration — $50 \cdot 10^{-6}$ g/ml. Wave length of exciting light — is 380 nm, that of fluorescence — 470 nm. Spectrofluorimeter «Hitachi MPF-4». Width of monochromator gaps is 5 nm. 1 — LDL of patient 3. 2 — LDC of donor 10

можно, из-за рецептор-независимого пути их выделения из кровотока [10], представляется важным сравнение свойств мелких ЛПНП у больных людей.

В табл. 2 представлены параметры, характеризующие поверхность ЛП-частиц, локализацию в них белка, конформацию апо-ЛПНП и агрегационную устойчивость ЛПНП у пациентов с ИБС и здоровых лиц с типами распределения ЛП по радиусу *B* и *A*.

В спектре флюоресценции зонда диметиламинохолкона (ДМХ) в составе ЛПНП больных отмечалось преобладание коротковолновой компоненты ($F_{480}/F_{560} = 1,31 \pm 0,09$) по сравнению с обычными ЛПНП здорового человека ($F_{480}/F_{560} = 1,11 \pm 0,04$). Мелкие ЛП здоровых людей имели промежуточное соотношение компонент флюоресценции ДМХ между ЛПНП больных и обычными ЛПНП здорового человека ($F_{480}/F_{560} = 1,13 \pm 0,04$). Следовательно, можно считать, что микроокружение ДМХ в составе ЛПНП больных ИБС более гидрофобное, чем в составе мелких ЛПНП здорового человека.

Относительное число мест связывания зонда анилинафталенсульфоната (АНС) поверхностью ЛПНП при высокой ионной силе рас-

твора (1,0 М NaCl), то есть при блоке электростатических взаимодействий, оказалось выше в случае ЛП больных, чем в случае мелких ЛПНП здорового человека. Еще более низкое связывание зонда было в случае обычных ЛПНП здоровых людей (рис. 2 и табл. 2). Эти данные более наглядно, чем результаты с использованием ДМХ, указывают на качественные различия поверхности ЛПНП больных и мелких ЛПНП здоровых людей.

Заряд ЛП-частиц, для оценки которого использовали соотношение $(F-F^0)/F$, где F^0 — интенсивность флюоресценции АНС в ЛП при низкой ионной силе раствора (0,01 М), а F — при высокой ионной силе раствора (1,0 М NaCl), был на 60 % выше у мелких ЛПНП по сравнению с обычными ЛП здоровых (табл. 2). Эта величина находится в хорошем соответствии с теоретическим увеличением плотности поверх-

Таблица 1

Липиды плазмы крови и тип распределения ЛПНП по радиусу у обследуемых лиц
Blood plasma lipids and patterns of LDL distributions for different patients

Группа	№	Общий холестерин, мг/дл	Суммарные триглицериды, мг/дл	α -Холестерин, мг/дл	Тип распределения
ИБС	1	251	168	44	Б
	2	254	143	55	Б
	3	250	98	—	Б
	4	251	127	37	Б
	5	195	108	—	Б
	6	225	128	48	В
	7	275	160	47	В
	$M \pm m$	243 ± 25	133 ± 26	46 ± 7	
Здоровые	8	202	113	44	Б
	9	189	132	39	Б
	10	160	80	43	Б
	11	173	84	45	А
	12	185	95	39	А
	13	191	91	42	А
	14	250	112	47	А
	15	204	100	51	А
	$M \pm m$	194 ± 27	101 ± 17	44 ± 4	

Таблица 2

Физико-химические характеристики ЛПНП
Physics-chemical properties of LDL

Параметры	Здоровые		ИБС
	Мелкие ЛП	Обычные ЛП	
R , нм	$7,6 \pm 0,1$	$9,8 \pm 0,1$	$7,7 \pm 0,1$
Отношение компонент флюоресценции ДМХ (F_{480}/F_{560})	$1,13 \pm 0,04$	$1,11 \pm 0,04$	$1,31 \pm 0,09$
Относительное число мест связывания АНС	152 ± 9	100 ± 4	179 ± 3
Эффективность тушения собственной флюоресценции ЛП зондом ДМХ ($1-F/F^0$)	$0,63 \pm 0,05$	$0,79 \pm 0,06$	$0,51 \pm 0,06$
Интенсивность светорассеяния, отн. ед.	53 ± 12	31 ± 6	87 ± 24
Элементы вторичной структуры:			
α -спираль	34,6	35,6	35,2
β -структура (параллельная)	10,3	11,0	9,3
β -структура (антипараллельная)	11,3	11,6	12,3
β -изгибы	14,6	15,2	15,0
неупорядоченная структура	29,2	26,4	28,0

Примечание. Число параллельных образцов в каждой группе равно трем.

ностного заряда как следствием уменьшения площади поверхности ЛП-частицы при условии неизменности заряда белка. В случае ЛПНП больных ИБС прирост отрицательного заряда составлял 40 % по отношению к мелким ЛПНП здорового человека (табл. 2). Если заряд апоВ составляет 55 элементарных единиц на молекулу [11], то на одной ЛПНП-частице больных будут присутствовать дополнительно $55 \times 0,40 = 22$ заряда. Если же их появление обусловлено перекисной модификацией апоВ [7], то это соответствует блоку только 7 % аминокислотных групп апоВ. Данная величина не является критической для «включения» домена, узнаваемого сквенжен-рецептором макрофагов [12]. Эти сведения наряду с результатами наших предыдущих исследований [7] свидетельствуют о слабой модификации ЛПНП у пациентов с ИБС продуктами перекисного окисления липидов, которая не сопровождается усилением захвата таких ЛП макрофагами.

Доступность триптофанов белка ЛПНП для ДМХ, оцениваемая по выражению $(I - F/F^0)$, где F^0 — интенсивность собственной флуоресценции без ДМХ, а F — в присутствии 10 мкМ ДМХ (концентрация белка ЛПНП 0,2 мг/мл), была ниже в мелких ЛПНП, чем в обычных у здоровых людей (табл. 2). У пациентов с ИБС зонд тушил только на 20 % меньше флуоресценции по сравнению с мелкими ЛП этого же класса здоровых людей. Приведенные результаты указывают на то, что у здоровых людей уменьшение размеров ЛПНП сопровождается перераспределением триптофанов апоВ из липидной фазы в водную. В случае ЛП больных ИБС этот эффект более значительный. Возможно, он отражает конформационные перестройки апоВ малого масштаба у пациентов с ИБС, выявляемые с помощью моноклональных антител [13]. С другой стороны, на основании данных кругового дихроизма у нас нет оснований для вывода о крупномасштабных конформационных перестройках в мелких ЛПНП больных и здоровых людей, поскольку соотношение элементов вторичной структуры сходно во всех изученных образцах ЛП (табл. 2).

В целом полученные данные свидетельствуют о различиях в гидрофобности поверхности, заряде и локализации белка в мелких ЛПНП больных и здоровых людей. Мелкие ЛП пациентов с ИБС нельзя рассматривать как атерогенные, так как степень модификации апоВ незначительна и захват ЛПНП пациентов № 2 и № 8 макрофагами (оцениваемый по эстерификации ^{14}C -олеиновой кислоты) практически одинаков: 2537 ± 169 и 2399 ± 280 имп·мин $^{-1}$ ·мг $^{-1}$ клеточного белка (число параллельных чашек 3 в каждом случае). Можно полагать, что выявленные особенности свойств мелких ЛПНП у пациентов с ИБС проявляются в том, что такие ЛП более склонны к агрегации, чем мелкие ЛПНП здоровых людей, поскольку интенсивность светорассеяния с длиной волны 400 нм под углом 90° на 60 % выше у первых по сравнению со вторыми. С другой стороны, мелкие ЛПНП более нестабильны, чем обычные у здоровых людей (табл. 2).

Можно полагать, что атерогенный потенциал мелких ЛПНП реализуется в стенке аорты или из-за их высокой склонности к агрегации, или вследствие воздействия на ЛП-частицу дополнительных факторов. Здесь возможна аналогия с ЛП(а), которые плохо узнаются макрофагами в виде отдельных частиц, но эффективно поступают в макрофаги после агрегации. Отличительной чертой ЛП(а) является их низкая стабильность [14].

SIZES OF LOW-DENSITY LIPOPROTEINS IN PATIENTS
WITH ISCHEMIC HEART DISEASE AND NORMOLIPIDEMIA

R. Z. Vavrin, A. S. Kuznetsov, N. S. Parfenova, V. A. Noskin, L. V. Olennikova,
I. V. Krivoruchenko, A. Yu. Sungurov, E. I. Kogan, E. Ya. Magracheva, Yu. I. Pivovarova

B. P. Konstantinov Institute of Nuclear Physics,
Academy of Sciences of the USSR,
Institute of Experimental Medicine,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

Summary

The properties of size-usual low-density lipoproteins (LDL) ($R=9.8\pm 0.1$ nm), LDL of small size in healthy persons ($R=7.6\pm 0.1$ nm) and the size-small ($R=7.7\pm 0.1$ nm) lipoproteins of the same class in patients with ischemic heart disease (IHD) are compared.

It is shown that in healthy person LDL of small size were more inclined to aggregation than the LDL of usual size. As to the size-small lipoproteins in IHD, they are more instable than those in healthy persons.

It is suggested, that LDL instability may be a risk factor of ischemic heart disease.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Association of coronary atherosclerosis with hyperapobetalipoproteinemia (increased protein but normal cholesterol levels in human plasma low density lipoproteins) / A. Sniderman, S. Shapiro, D. Narpolet et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1980.—77, N 1.—P. 604—608.
2. Kesaniemi Y. A., Grundy S. M. Overproduction of low density lipoproteins associated with coronary heart disease // Arteriosclerosis.—1983.—3, N 1.—P. 40—46.
3. Распределение плазменных липопротеидов по размерам / В. Т. Лозовский, Г. Е. Шмелев, В. А. Носкин и др. // Биофизика.—1987.—32, № 2.—С. 285—291.
4. Пространственная организация липопротеидов низкой плотности аорты человека: изучение с помощью флуоресцентных зондов / Г. Е. Добрецов, М. М. Спириин, А. С. Кузнецов, А. В. Попов // Бюл. эксперим. биологии и медицины.—1983.—93, № 10.—С. 45—47.
5. Взаимодействие липопротеидов низкой плотности с заряженными лигандами: исследование с помощью флуоресцентного зонда 1-анилинонафтален-8-сульфоната / А. С. Кузнецов, В. И. Ховратович, Д. В. Иоффе, А. В. Попов // Вопр. мед. химии.—1983.—29, № 4.—С. 61—65.
6. Конформация и локализация белка в липопротеидах низкой плотности в норме и при ишемической болезни сердца / А. С. Кузнецов, Н. С. Парфенова, А. Ю. Sungurov и др. // Укр. биохим. журн.—1989.—61, № 3.—С. 47—52.
7. Перекисная модификация липопротеидов низкой плотности при ишемической болезни сердца / А. С. Кузнецов, Н. С. Парфенова, А. Д. Денисенко и др. // Там же.—С. 111—114.
8. Studies of low density lipoprotein molecular weight in human beings with coronary artery disease / J. R. Crouse, J. S. Parks, H. M. Schey, F. R. Kahl // J. Lipid Res.—1985.—26, N 5.—P. 566—574.
9. Lipoprotein abnormalities in coronary artery disease patients / E. Y. Schaefer, J. R. McNamary, J. M. Ordovas et al. // Arteriosclerosis.—1986.—6, N 5.—P. 549a.
10. Thompson G. R., Kano M., Reeve J. Turnover and interconversion of LDL subfraction // Adv. Exp. Med.—1987.—210.—P. 105—109.
11. Ghosh S. Interaction of low density lipoproteins with small and large molecules // Low density lipoproteins / Eds Ch. E. Day, R. S. Levy.—New York: Plenum press, 1976.—P. 371—412.
12. Haberland M. E., Olch Ch. L., Fogelman A. M. Role of lysines in mediating interaction of modified low density lipoprotein with the scavenger-receptor of human monocyte-macrophages // J. Biol. Chem.—1984.—259, N 18.—P. 11305—11311.
13. Investigation of human blood plasma apo-B-containing lipoproteins by means of monoclonal antibodies against low density lipoproteins / I. N. Trakht, K. A. Kovaleva, E. V. Yanushevskaya et al. // Ather. Rev.—1988.—17.—P. 51—66.
14. Morrisett J. D., Guyton J. R., Gaubatz J. W. Lipoprotein (a): structure, metabolism and epidemiology // Plasma lipoproteins / Ed. A. M. Gotto.—Amsterdam: Elsevier, 1987.—P. 129—151.

Ин-т ядер. физики им. Б. П. Константинова
АН СССР, Ленинград
Ин-т эксперим. медицины АМН СССР, Ленинград

Получено 26.04.89