

**ИССЛЕДОВАНИЕ СМЕЩЕНИЯ АПОБЕЛКА  
С ПОВЕРХНОСТИ ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ  
ПРИ ПЕРЕКИСНОЙ МОДИФИКАЦИИ**

**Р.К. Айдыралиев** – канд. биол. наук  
НИИ молекулярной биологии и медицины при НЦКТ МЗ КР,

**О.А. Игембердиева** – научн. сотрудник;

**Э.А. Чойбекова, Т.Б. Мамытов** – студенты

---

Показано, что в окисленных липопротеинах низкой плотности происходит смещение апобелка относительно поверхности липопротеинов. Степень смещения зависит от степени перекисного окисления липидов.

Липопротеины плазмы крови являются транспортной формой липидов в организме человека и животных, развившейся в ходе эволюции. Липопротеины осуществляют транспорт липидов как экзогенного, так и эндогенного происхождения. Плазменные частицы липопротеинов имеют сферическую форму. Внутри частицы находится жировая “капля”, содержащая неполярные липиды (триглицериды и эфиры холестерина) и формирующая ядро частицы. Это ядро окружено оболочкой из фосфолипидов, незэтерифицированного холестерина и белка. Целесообразность образования такой структуры объясняется тем, что неполярные липиды (триглицериды и эфиры холестерина) нераство-

римы в водной среде крови и поэтому не могут транспортироваться. Полярные же липиды (фосфолипиды, незэтерифицированный холестерин) совместно с белком формируют поверхностный гидрофильный слой, который, с одной стороны, защищает внутреннее гидрофобное ядро от водной среды, а с другой – обеспечивает растворимость и транспорт частицы липопротеинов в этой же водной среде. Высокий уровень липопротеинов низкой плотности (ЛНП) является риск-фактором развития атеросклероза [1]. Высокотерогенными считаются модифицированные ЛНП [2, 3]. Уровень модифицированных ЛНП предлагают даже использовать в качестве маркера атеросклероза и коронарной болезни

сердца [4, 5]. Модификация является результатом перекисного окисления липидов (ПОЛ) [2, 3]. В результате перекисной модификации изменяются различные физико-химические свойства липопротеиновой частицы, такие, как заряд поверхности, расположение апобелков относительно поверхности липопротеина и др. [2]. Для исследования этих изменений удобно использовать метод флуоресцентных зондов, обладающий высокой чувствительностью и информативностью при изучении белков и липопротеинов [6].

Белки, в том числе апобелки липопротеинов, обладают собственной флуоресценцией в ультрафиолетовой области спектра, обусловленной в основном остатками триптофана [7]. Если добавить к раствору липопротеинов флуоресцентный зонд, то между молекулами триптофана и зонда может произойти безызлучательный перенос энергии [6]. Эффективность переноса между донором энергии (триптофанил) и акцептором (флуоресцентный зонд) зависит от расстояния между ними. Чем это расстояние меньше, тем эффективность переноса энергии выше. Г.Е. Добрецовым и соотр. [7] было показано, что при хранении ЛНП происходит уменьшение эффективности переноса энергии с белка на флуоресцентный зонд пирен. Это обусловлено “сползанием” аполипипопротеина В с поверхности частицы с образованием белковых выступов. Причина этого, по-видимому, заключается в модификации ЛНП в результате перекисного окисления липидов. В данной работе была поставлена задача исследовать перенос энергии с триптофанилов апобелка на флуоресцентные зонды в перекисномодифицированных ЛНП.

**Материалы и методы.** Липопротеины низкой плотности выделяли из плазмы крови здорового донора методом последовательного ультрацентрифугирования [8] и диализовали в течение 15 ч против 500-кратного объема буферного раствора следующего состава: 0,28 М сахарозы, 10 мМ трис, рН 7,4 .

Автоокисление ЛНП проводили путем инкубации при 37°C. В работе использовали флуоресцентные зонды антрацен (Sigma, США) и 4-(п-диметиламиностирил)-1-додecilпиридиний п-толуолсульфонат (ДСП-12), синтезированный в Институте оргсинтеза АН Латвии (г. Рига) [9]. Флуориметрические измерения проводили на спектрофлуориметре F-3000 фирмы Hitachi в стандартной 1 см прямоугольной кварцевой кювете, ширина щелей возбуждения и флуоресценции составляла 5 нм. Интенсивность флуоресценции измеряли при длине волны 340 нм

(возбуждение 286 нм). Концентрация ЛНП в измерительной кювете составляла 0,02 г/л побелку. Измерения проводили в буферном растворе следующего состава: 0,28 М сахарозы, 10 мМ трис, 2 мМ ЭДТА, рН 7,4.

Степень перекисного окисления оценивали по уровню ТБК-реактивных продуктов (ТБКРК) [10], представленных в единицах концентрации малонового диальдегида (МДА) на единицу веса белка ЛНП. При расчетах использовали молярный коэффициент экстинкции комплекса МДА-ТБК равный  $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$  [11]. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [12].

**Результаты.** В присутствии зонда ДСП-12 интенсивность ультрафиолетовой флуоресценции ЛНП снижается (рис.1). Это свидетельствует о том, что между молекулами триптофана и зонда происходит перенос энергии возбуждения. Мы исследовали перенос энергии с белка на ДСП-12 в нативных и подвергнутых автоокислению при 37°C ЛНП. Оказалось (см. рис. 2), что в окисленных липопротеинах эффективность переноса энергии ниже, чем в нативных. ДСП-12 является положительно заряженным зондом. Поэтому снижение эффективности переноса может быть следствием как “сползания” апобелка с поверхности частицы, так и его погружения вглубь частицы. Мы исследовали перенос энергии с белка на нейтральный гидрофобный зонд антрацен, молекулы которого распределены по всему объему гидрофобного ядра липопротеинов. И в этом случае (рис. 3) эффективность переноса энергии в окисленных ЛНП оказалась ниже, чем в нативных. Полученные результаты подтверждают данные Г.Е. Добрецова [7] и свидетельствуют в пользу “сползания” апобелков с поверхности липопротеинов при их модификации. Причиной этого является перекисное окисление липидов. Связана ли степень “сползания” апобелков со степенью ПОЛ? Для изучения этого вопроса мы отбирали образцы ЛНП на разных стадиях инкубации. В них определяли содержание ТБК-реактивных продуктов, отражающих уровень перекисного окисления, и эффективность переноса энергии между белком (остатками триптофана) и зондом ДСП-12. Из полученных результатов видно (рис. 4), что эффективность переноса энергии с триптофанилов на флуоресцентный зонд ДСП-12 уменьшается, а, следовательно, степень “сползания” апобелка с поверхности липопротеинов увеличивается пропорционально увеличению степени перекисного окисления липидов.

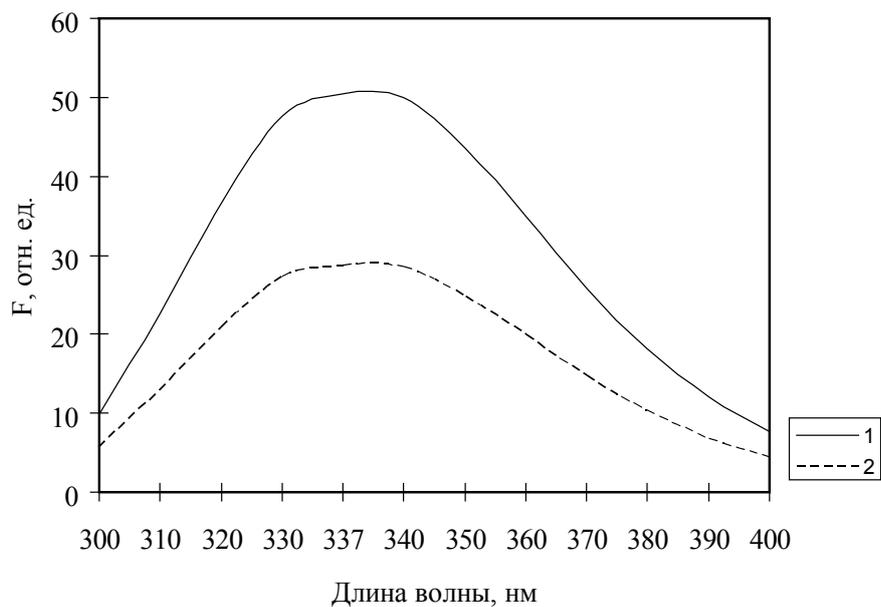


Рис. 1. Спектр ультрафиолетовой флуоресценции ЛНП в отсутствии (1) и в присутствии 2,5 мкМ ДСП-12. Здесь и на рис. 2–4 [ЛНП] = 0,02 г белка/л.

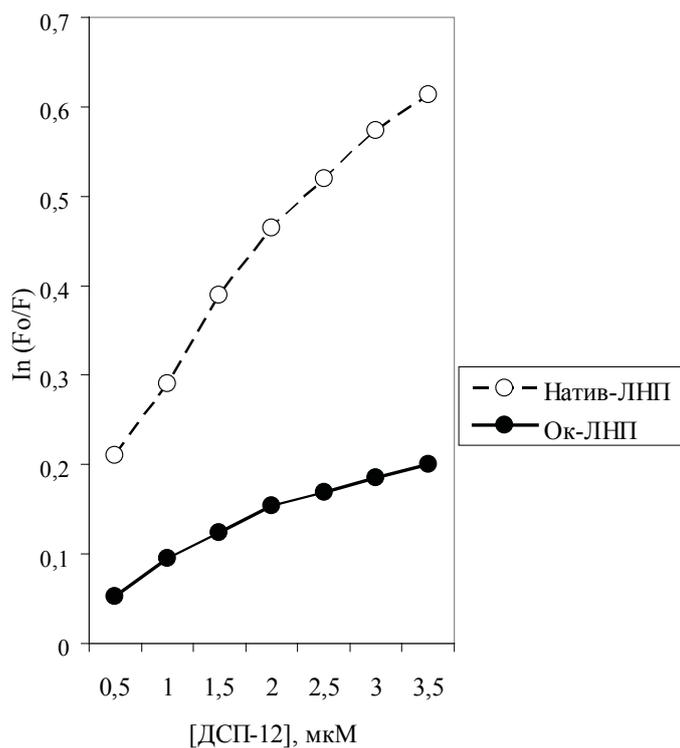


Рис. 2. Перенос: белок-ДСП-12 в негативных ([ТБКРП] = 1,0 мкмоль МДА/г белка) и окисленных ([ТБКРП] = 6,88 мкмоль МДА/г белка) ЛНП. F и Fo интенсивность ультрафиолетовой флуоресценции ЛНП в присутствии и в отсутствии зонда ДСП-12, соответственно.

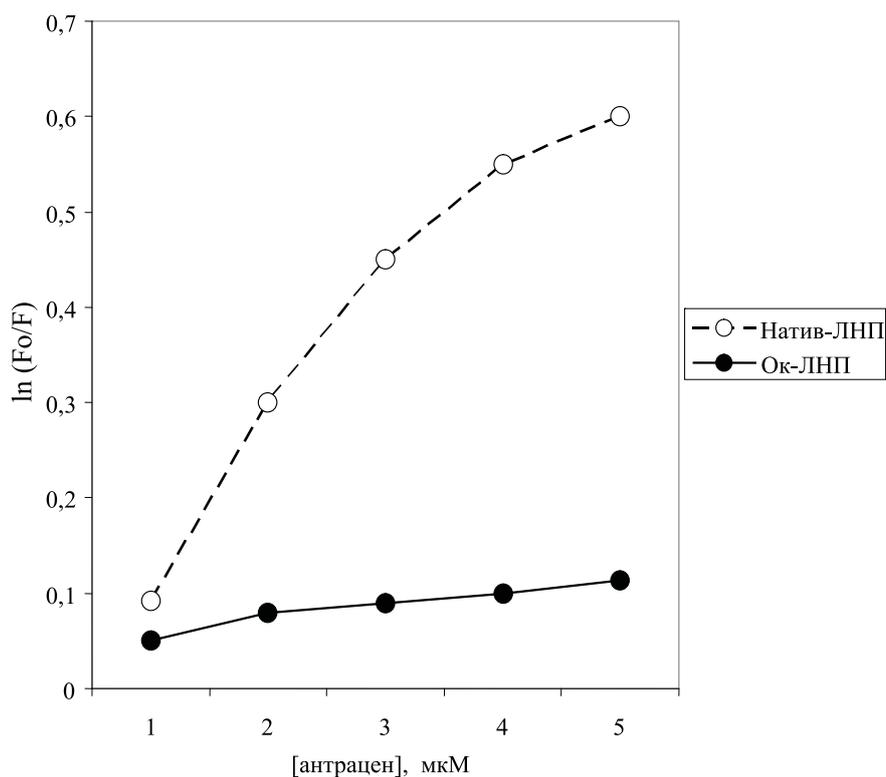


Рис. 3. Перенос: белок-антрацен в нативных ( $[ТБКРП] = 1,0$  мкмоль МДА/г белка) и окисленных ( $[ТБКРП] = 6,88$  мкмоль МДА/г белка) ЛНП. F и  $F_0$  интенсивность ультрафиолетовой флуоресценции ЛНП в присутствии и в отсутствии зонда антрацен, соответственно.

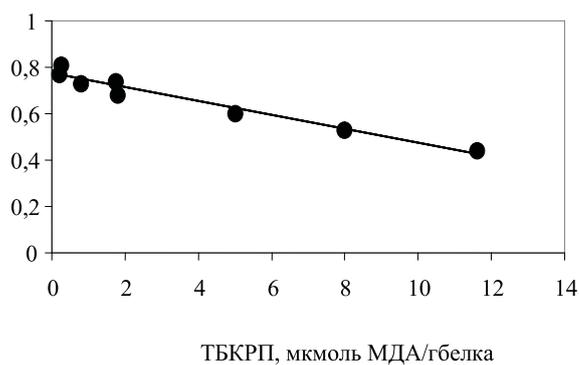


Рис. 4. Изменение эффективности переноса белка на ДСП-12 в ЛНП в зависимости от степени окисления. F и  $F_0$  интенсивность флуоресценции белка в присутствии и в отсутствии ДСП-12, соответственно.  $[ДСП-12] = 5$  мкМ.

Таким образом, в липопротеинах низкой плотности, модифицированных в результате перекисного окисления липидов, происходит снижение эффективности переноса энергии с триптофанилов на флуоресцентные зонды ДСП-12 и антрацен. Это свидетельствует в пользу “сползания” апобелка с поверхности липопротеина при перекисной модификации. Величина уменьшения эффективности переноса энергии, а следовательно, степень смещения аполиппротеина пропорциональна степени перекисного окисления липидов.

### Литература

1. *Giannarco S.H., Bradley W.A.* Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins // *Curr. Opin. Lipidol.* – 1994. – V. 5. – №5. – P. 3313–315.
2. *Айтбаев К.А., Айдыралиев Р.К., Игембердиева О.А.* Окисленные липопротеиды низкой плотности: биохимический состав, механизмы формирования, биологическая активность и связь с коронарной болезнью сердца// *Центральноазиатский мед. ж.* – 2005.– Т. 11. – №1.– С. 61–68.
3. *Mertens A., Holvoet P.* Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis // *FASEB J.* – 2001. – V. 15. – P. 2073–2084.
4. *Holvoet P., Mertens A., Verhamme P., Bogaerts K., Beyens G., Verhaeghe R., Collen D., Muls E., van de Werf F.* Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease // *Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.* – 2001. – V. 21. – P. 844–848.
5. *Toshima S., Hasegawa A., Kurabayashi M., Itabe H., Takano T., Sugano J., Shimamura K., Kimura J., Michishita I., Suzuki T., Nagai R.* Circulating oxidized low density lipoprotein levels a biochemical risk marker for coronary heart disease// *Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.* – 2000. – V. 20. – P. 2243–2247.
6. *Добрецов Г.Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. – М.: Наука, 1989.– 277с.
7. *Dobretsov G.E., Spirin M.M., Chekrygin O.V., Karmansky I.M., Dmitriev V.M., Vladimirov Yu.A.* A fluorescence study of apolipoprotein localization in relation to lipids in serum low density lipoproteins // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 1982. – V. 710. – №2. – P. 172–180.
8. *Havel R., Eder H., Bragdon J.* The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum // *J. Clin. Invest.*– 1955.– V. 34. – №9. – P. 1345–1353.
9. *Dubur G.Y., Dobretsov G.E., Deme A.K., Dubure R.R., Lapshin E.N., Spirin M.M.* Fluorescent probes based on styrylpyridinium derivatives: optical properties and membrane binding // *J. Biochem. Biophys. Methods.* – 1984. – V. 10. – №3–4. – P. 123–134.
10. *Uchiyama M., Michara M.* Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test // *Analytical Biochemistry.* – 1978. – V. 86. – P. 271–278.
11. *Panasenko O.M., Evgina S.A., Aidyaliev R.K., Sergienko V.I., Vladimirov Y.A.* Peroxidation of human blood lipoproteins induced by exogenous hypochlorite or hypochlorite generated in the system of “myeloperoxidase+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Cl<sup>-</sup>” // *Free Radic. Biol. Med.* – 1994. – V. 16. – №2. – P. 143–148.
12. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – V. 193. – №1.– P. 265–275.