

© Коллектив авторов, 2016
УДК 616.13.002.2-004.6

Мельниченко А.А.¹, Мясоедова В.А.¹, Елизова Н.В.¹,
Никитина Н.А.², Карагодин В.П.¹, Собенин И.А.¹, Орехов А.Н.¹

Оценка содержания циркулирующих множественно модифицированных липопротеидов низкой плотности в сыворотке крови

¹ — ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

² — ФГБУ «ФНКЦ физико-химической медицины» ФМБА России, 119435, Москва, ул. Б. Пироговская, д. 1а

Цель исследования. Циркулирующие множественно модифицированные ЛНП (цмЛНП) и антитела к ним являются атерогенными компонентами сыворотки больных сердечно-сосудистыми заболеваниями. Цель исследования — разработка метода для определения содержания циркулирующих множественно модифицированных ЛНП в сыворотке крови. **Результаты.** Метод основан на связывании цмЛНП с помощью иммобилизованного на пластике агглютинина ридина, с последующим измерением связавшегося апоВ конъюгированными с пероксидазой поликлональными антителами. Предложенный метод обладает высокой чувствительностью и воспроизводимостью. **Заключение.** Разработанный метод позволяет определять уровень множественно модифицированных ЛНП в сыворотке крови без предварительного выделения фракции липопротеидов.

Ключевые слова: десалирированные липопротеиды; иммуноферментный анализ; диагностика атеросклероза

Для корреспонденции: Александра Александровна Мельниченко, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. ангиопатологии отдела молекулярной и клеточной патофизиологии ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», e-mail: inat-science@yandex.ru

Для цитирования: Мельниченко А.А., Мясоедова В.А., Елизова Н.В., Никитина Н.А., Карагодин В.П., Собенин И.А., Орехов А.Н. Оценка содержания циркулирующих множественно модифицированных липопротеидов низкой плотности в сыворотке крови. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; (2): 107–111.

Благодарности. Работа проведена при финансовой поддержке Российской Федерации в лице Минобрнауки России (Соглашение № 14.616.21.0031 о предоставлении субсидии на расходы для выполнения научных исследований).

Поступила 11.10.14

Melnichenko A.A.¹, Myasoedova V.A.¹, Elizova N.V.¹, Nikitina N.A.², Sobenin I.A.¹, Orekhov A.N.¹

Method for measurement of circulating multiply modified low-density lipoprotein in the blood serum

¹ — FGBNU Institute of General Pathology and Pathophysiology, Laboratory of angiopathology, 125315, Moscow, Baltiyskaya str., 8

² — FGBU FNKTS Physico-Chemical Medicine FMBA of Russia, Laboratory of Molecular Immunology and biochemistry 119435 B. Pirogovskaya str., 1a.

The purpose of research was development of method for the measurement of naturally occurring multiply modified LDL (nomLDL) in serum. nomLDL are atherogenic components of patients with cardiovascular diseases serum. **Results.** We have developed a lectin-sorbent assay for the determination of desialylated LDL in serum. The assay is based on the binding of desialylated LDL by immobilized *Ricinus communis* agglutinin with subsequent measurement of lipoprotein through use of anti-apolipoprotein (apo) B antibody. **Conclusion.** Developed method for measurement of circulating multiply modified low-density lipoprotein in the blood serum characterized with high accuracy and reproducibility and may help establish the diagnostic value of this lipoprotein as a risk factor of atherosclerosis.

Key words: desialylated LDL, lectin-sorbent assay, atherosclerosis diagnostics

For correspondence: Alexandra A. Melnichenko (Ph.D., Senior Researcher, Laboratory angiopathology department of molecular and cellular pathophysiology of the Scientific Research Institute of General Pathology and Pathophysiology), e-mail: inat-science@yandex.ru

For citation: Melnichenko A.A., Myasoedova V.A., Elizova N.V., Nikitina N.A., Sobenin I.A., Orekhov A.N. Method for measurement of circulating multiply modified low-density lipoprotein in the blood serum. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2016; 60 (2): 107–111. (in Russ.).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The work carried out with the financial support of the Russian Federation represented by the Ministry of Education of Russia (Project# 14.616.21.0031).

Information about authors:

Melnichenko A.A. <http://orcid.org/0000-0002-4989-7600>

Myasoedova V.A. <http://orcid.org/0000-0001-8414-5300>

Elizova N.V. <http://orcid.org/0000-0002-9646-8091>

Nikitina N.A. <http://orcid.org/0000-0003-4246-9950>

Sobenin I.A. [Http://orcid.org/0000-0003-0978-6444](http://orcid.org/0000-0003-0978-6444)

Orekhov A.N. <http://orcid.org/0000-0002-6495-1628>

Received 11.10.14

Введение

Ранее было показано, что сыворотка больных с коронарным атеросклерозом вызывает накопление липидов в клетках, полученных из непораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека, т.е. атерогенны [1]. Циркулирующие множественно модифицированные ЛНП (цмЛНП) и антитела к ним также являются атерогенными компонентами сыворотки больных сердечно-сосудистыми заболеваниями [2]. Было показано, что биохимический состав, физические характеристики, а также взаимодействие с клеточными рецепторами данных липопротеидов кардинально отличается от нативных ЛНП. Основное различие заключается в низком содержании сиаловой кислоты, терминальном сахаре биантенной цепи апополипротеина (апо) В [3, 4]. Учитывая, что после удаления сиаловой кислоты, терминальным сахаром становится галактоза, был разработан способ выделения модифицированных ЛНП на сорбенте с иммобилизованным агглютинином *Ricinus communis* (РКА120). Данный агглютинин имеет высокое сродство к терминальной бета-галактозе и низкое сродство к другим сахарным остаткам, входящим в состав полисахаридных цепей ЛНП [5]. Таким образом, цмЛНП связывались на колонке с пришитым РКА120 и элюировались 50 мМ раствором галактозы [6].

Цель исследования — разработка метода для определения содержания циркулирующих множественно модифицированных (цмЛНП) в сыворотке крови.

Методика

Метод основан на связывании цмЛНП с помощью иммобилизованного на пластике РКА120, с последующим измерением связавшегося апоВ конъюгированными с пероксидазой поликлональными антителами. Изучены образцы крови 22 мужчин в возрасте от 28 до 56 лет. Содержание общего холестерина и триглицеридов в сыворотке не превышало 5,2 и

1,7 ммоль/л соответственно. Кровь для исследований забирали натощак в пробирку с ЭДТА, полученную сыворотку стерилизовали пропусканием через фильтр с размером пор 45 нм. ЛНП и цмЛНП были выделены и охарактеризованы, как описано в [6].

Для определения содержания десиалированных ЛНП в сыворотке использовали 96-луночные плашки. В лунки вносили по 100 мкл раствора РСА₁₂₀ в изотоническом фосфатном буфере в концентрации 30 мкг/мл и инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Затем лунки промывали 4 раза ИФБ, содержащем 2 г/л бычьего сывороточного альбумина (БСА) (ИФБ/БСА), после чего в лунки вносили по 100 мкл раствора БСА в ИФБ в концентрации 20 г/л и оставляли при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем лунки снова промывали раствором ИФБ/БСА вносили в них 100 мкл исследуемого образца в ИФБ и инкубировали в течение 2 ч при 20°C. Потом лунки снова промывали раствором ИФБ/БСА и вносили по 100 мкл меченых пероксидазой поликлональных антител (1 мкг/мл) и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Последующее проявление проводили добавлением цитратного буфера, рН 4,5, содержащего ортофенилендиамин и перекись водорода. Инкубировали 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением серной кислоты. Оптическую плотность измеряли при длине волны 492 нм на многоканальном спектрофотометре.

Результаты и обсуждение

Для определения оптимальной концентрации РКА120, необходимой для связывания цмЛНП, был проведен ряд экспериментов. Из данных, представленных на рис. 1, видно, что количество десиалированных ЛНП, связывающихся с РКА120 остается постоянным при концентрации агглютинина 30—50 мг/л. Таким образом, в дальнейшем РКА120 использовали в концентрации 30 мг/л.

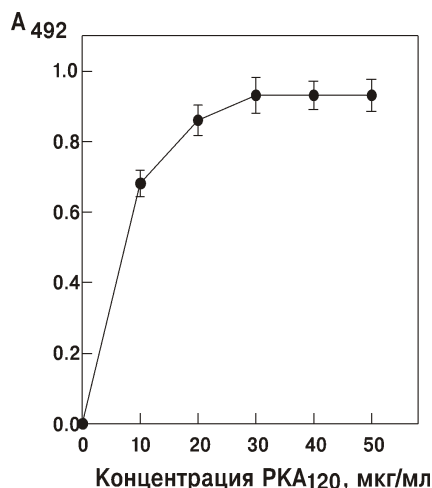


Рис. 1. Концентрационная зависимость для покрывающего раствора.

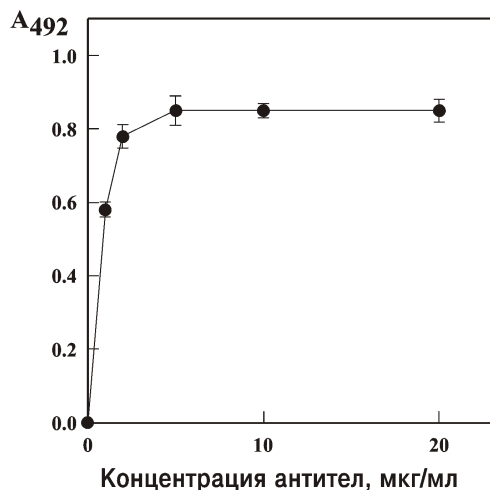


Рис. 2. Определение оптимальной концентрации анти-апоВ поликлональных антител.

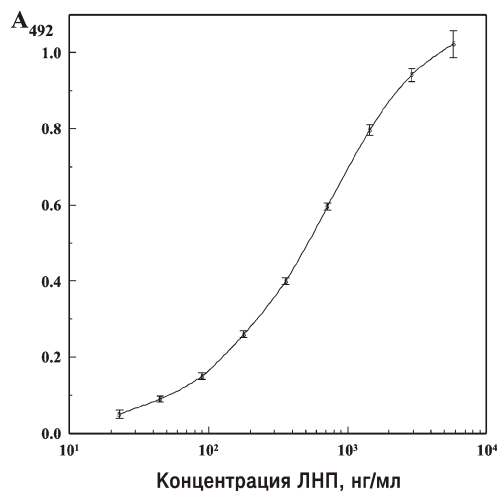


Рис. 3. Калибровочная кривая для ЛНП, обработанные нейраминидазой.

Для определения оптимальной концентрации анти-апо-В поликлональных антител были исследованы 5 разведений последних. На рис. 2 видно, что в диапазоне концентраций 5—20 мкг/л количество определяющегося апоВ остается неизменным, поэтому в качестве оптимальной была выбрана концентрация поликлональных антител к апоВ100 в 10 мкг/л.

На рис. 3 представлена типичная кривая титрования обработанных нейраминидазой десалирированных ЛНП при использовании оптимальных концентраций лектина (30 мкг/л) и антител к апоВ (10 мкг/л).

Калибровочные кривые обработанных нейраминидазой ЛНП, выделенных из крови больных цмЛНП , и нативных ЛНП представлены на рис. 4. Видно, что кривые обработанных нейраминидазой ЛНП и цмЛНП практически совпадают. Также видно, что данный метод может использоваться при определении концентрации десалирированных ЛНП в сыворотке крови в диапазоне 20—800 г/л. При этом сиалирированные (нативные) ЛНП, выделенные с помощью лектиновой хроматографии, не связываются с РКА120 вплоть до концентрации 1000 г/л.

Для определения специфичности РКА120 при определении содержания десалирированных ЛНП, образцы ЛНП были обработаны галактозидазой для удаления углеводных остатков, как описано у Nagai с соавт. [7] Данная методика позволяет удалить более 95% галактозы, содержащейся в ЛНП. Обработанные галактозидазой десалирированные ЛНП не связывались с лектиновой подложкой, в отличие от необработанных ЛНП.

На рис. 5 представлено сравнение кривых титрации сыворотки и ЛНП, выделенных из крови больных ССЗ и здоровых лиц. Видно, что данные кривые практически совпадают при определении содержания десалирированных ЛНП как в сыворотке, так и в липопротеидах, выделенных из крови. Таким образом, можно сделать вывод о том, что компоненты сыворотки практически не влияют на точность определения содержания десалирированных ЛНП в ней в диапазоне концентраций 20—200 мкг/л. При сравнении содержания цмЛНП в сыворотке крови от 12 пациентов и в общей фракции ЛНП, выделенной из крови тех же пациентов, коэффициент корреляции составил 0,9 (рис. 6).

На рис. 7 представлены данные определения уровня десалирированных ЛНП в сыворотке методами ИФА и лектиновой хроматографии. Видно, что данные, полученные этими методами практически совпадают (коэффициент корреляции 0,96, $p < 0,005$). Чувствительность метода составляет 5 нг цмЛНП на мл пробы.

Измерение уровня цмЛНП в крови 30 здоровых доноров показало, что их содержание варьирует от 12 до 105 мкг/мл (1,4—19,7% от общего уровня апоВ в сыворотке). Средняя концентрация составила

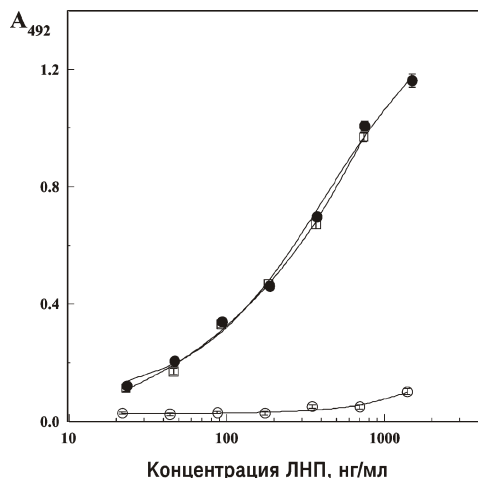


Рис. 4. Калибровочные кривые для нативных ЛНП (O), цмЛНП (●) и ЛНП, обработанные нейраминидазой (□).

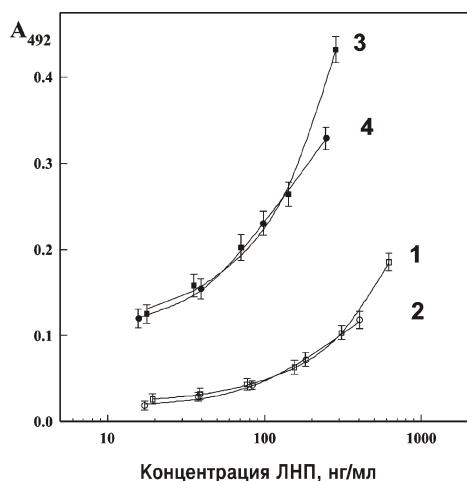


Рис. 5. Определение уровня цмЛНП у здоровых лиц (1, 2) и больных сердечно-сосудистыми заболеваниями (3, 4) в цельной сыворотке (1, 4) и в ЛНП (2, 3).

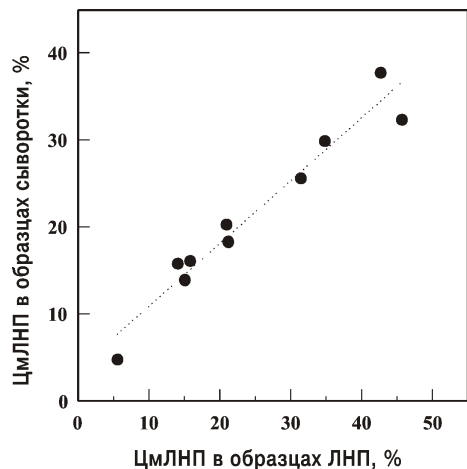


Рис. 6. Корреляционная зависимость между уровнем цмЛНП, определенном в сыворотке и в препарате липопротеидов.

49+10 мкг/мл (7,1+1,7% от уровня апоВ). Уровень цмЛНП в крови у 30 пациентов с коронарным атеросклерозом составлял от 173 мкг/мл (14,0% от уровня апоВ в сыворотке) до 774 мкг/мл (56,5%) (в среднем 402+54 мкг/мл или 35,9+4,3%). Различия средних уровней содержания десалированных ЛНП в крови здоровых лиц и пациентов было статистически значимым ($p < 0,05$).

В литературе представлены противоречивые данные относительно диагностической роли десалированных ЛНП в отношении атеросклероза. Было показано, что содержание сиаловой кислоты в ЛНП не является маркером ранних стадий развития сердечно-сосудистых заболеваний [8]. Этими же исследователями [9] данный параметр был изучен у пациентов с прогрессирующим атеросклерозом коронарной артерии. Было обследовано 100 пациентов после коронарной ангиографии и показано, что содержание сиаловой кислоты в ЛНП возрастает в процессе развития атеросклероза.

С другой стороны, было продемонстрировано, что у больных с ССЗ уровень десалированных или циркулирующих множественно модифицированных ЛНП значительно снижен по сравнению со здоровыми лицами [4, 10, 11].

Позднее другими авторами было сделано предположение о том, что в дополнение к усилению поглощения холестерина клетками, десалирование ЛНП может способствовать преждевременному развитию атеросклероза, ослабляя обратный транспорт холестерина [12]. А терапия ССЗ статинами способствует увеличению содержания сиаловой кислоты в ЛНП пациентов [13, 14].

Таким образом, есть основания предполагать, что десалированные ЛНП являются маркером развития атеросклероза. Необходимость в разработке ускоренного и

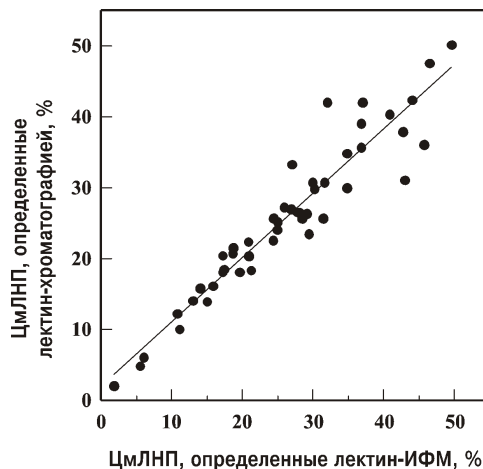


Рис. 7. Сравнение результатов определения количества цмЛНП в препарате с помощью колоночной хроматографии и твердофазным лектин-иммуноферментным методом (лектин-ИФМ).

улучшенного метода определения данного параметра очевидна. Это позволит провести более масштабные клинические исследования для подтверждения диагностической значимости уровня модифицированных ЛНП в крови.

Твердофазный лектин-иммуноферментный метод определения цмЛНП, описанный в данной статье, обладает высокой чувствительностью и воспроизводимостью. Сравнение результатов измерений, проведенных с помощью колоночной лектин-хроматографии и этим методом, выявило их тесную корреляцию. Разработанный метод позволяет точно и надежно измерять концентрацию цмЛНП без предварительного выделения фракции липопротеидов. Эта методика может быть использована в дальнейшем для рутинного определения содержания цмЛНП в сыворотке крови для экспресс-диагностики атерогенных дислипидемий при сердечно-сосудистых заболеваниях [15—19].

References

1. Chazov E.I., Tertov V.V., Orekhov A.N. et al. Atherogenicity of blood serum from patients with coronary heart disease. *Lancet*. 1986; 2 (8507): 595-8.
2. Tabas I. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J Clin Invest*. 2002; 110 (7): 905-11.
3. Tertov V.V., Bittolo-Bon G., Sobenin I.A. and others. Naturally occurring modified low density lipoproteins are similar if not identical: more electronegative and desialylated lipoprotein subfractions. *Exp Mol Pathol*. 1995; 62 (3): 166-72.
4. Tertov V.V., Orekhov A.N., Sobenin I.A. et al. Carbohydrate composition of protein and lipid components in sialic acid-rich and -poor low density lipoproteins from subjects with and without coronary artery disease. *J Lipid Res*. 1993; 34 (3): 365-75.
5. Baenziger J.U., Fiete D. Structural determinants of Ricinus communis agglutinin and toxinspecificity for oligosaccharides. *J Biol Chem*. 1979; 254: 9795-9.
6. Tertov V.V., Sobenin I.A., Tonevitsky A.G. et al. Isolation of atherogenic modified (desialylated) low density lipoprotein from blood of atherosclerotic patients: separation from native lipoprotein by affinity chromatography. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990; 167: 1122-7.
7. Nagai T., Miyaichi Y., Tomimori T., Yamada H. Inhibition of mouse liver sialidase by plant flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989; 163: 25-32.
8. Chappey B., Myara I., Giral P. et al. Evaluation of the sialic acid content of LDL as a marker of coronary calcification and extracoronary atherosclerosis in asymptomatic hypercholesterolemic subjects. PCV-METRA Group. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995; 15: 334-9.
9. Chappey B., Beyssens B., Foos E. et al. Sialic acid content of LDL in coronary artery disease: no evidence of desialylation in subjects with coronary stenosis and increased levels in subjects with extensive atherosclerosis and acute myocardial infarction: relation between desialylation and in v. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; 18 (6): 876-83.
10. Orekhov A.N., Tertov V.V., Mukhin D.N. Desialylated low density lipoprotein — naturally occurring lipoprotein with atherogenic potency. *Atherosclerosis*. 1991; 86: 153-61.
11. Tertov V.V., Orekhov A.N., Sobenin I.A. and others. Three types of naturally occurring modified lipoproteins induce intracellular lipid accumulation due to lipoprotein aggregation. *Circ Res*. 1992; 71: 218-28.
12. Harada L.M., Carvalho M.D., Passarelli M., Quintro E.C. Lipoprotein desialylation simultaneously enhances the cell cholesterol uptake and impairs the reverse cholesterol transport system: in vitro evidences utilizing neuraminidase-treated lipoproteins and mouse peritoneal macrophages. *Atherosclerosis*. 1998; 139 (1): 65-75.
13. VN Titov Clinical biochemistry lipid-lowering therapy and the mechanisms of action of statins. *Pathogenesis*. 2013; 11: 16-26.
14. Lindbohm N., Gylling H., Miettinen TE, Miettinen TA. Statin treatment increases the sialic acid content of LDL in hypercholesterolemic. *Atherosclerosis*. 2000; 151 (2): 545-50.
15. Davydov D.M. Asymmetry in the cardiovascular system: its nature and role in maintaining stability and adaptation to stressful influences. *Pathogenesis*. 2013; 11: 26-31.
16. Kushlinsky N.E., Timofeev Yu. The role of the RANK / RANKL / OPG in the pathogenesis of primary and metastatic bone tumors. *Pathogenesis*. 2013; 11: 9-15.
17. Lysko A.I., Dudchenko A.M. Catalytic Antioxidants: potential therapeutic agents for the correction of pathologies caused by oxidative stress. *Pathogenesis*. 2013; 11: 22-8.
18. Markov N.A., Shevtsova E.F. Stress-induced depression as a risk factor for Alzheimer's disease: the role of glycogen synthase kinase-3. *Pathogenesis*. 2013; 11: 4-8.
19. Hugaeva V.K. Legends and actual patterns of microcirculation. *Pathogenesis*. 2013; 11: 32-41.

Сведения об авторах:

Мельниченко Александра Александровна, e-mail: inat-science@yandex.ru

Мясоедова Вероника Александровна, e-mail: myika@yandex.ru

Никитина Надежда Александровна, e-mail: nikitinanadyaa@mail.ru; лаборатория молекулярной иммунологии и биохимии, 119435, Москва, ул. Б. Пироговская, д. 1а; Елизова Наталья Владимировна, e-mail: natalina5@ya.ru

Собенин Игорь Александрович, e-mail: sobenin@cardio.ru

Орехов Александр Николаевич, e-mail: a.h.opexob@gmail.com