

ВЛИЯНИЕ НАТУРАЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ НА АТЕРОГЕННУЮ МОДИФИКАЦИЮ ЛПНП

И. Азарова^{1, 2},

А. Феоктистов², кандидат биологических наук,

А. Орехов^{2, 3}, доктор биологических наук, профессор

¹Московский физико-технический институт, Долгопрудный

²Научно-исследовательский институт

атеросклероза (Сколково), Москва

³Научно-исследовательский институт общей патологии

и патофизиологии РАМН, Москва

E-mail: irina.nik.azarova@gmail.com

Модифицированные липопротеиды низкой плотности (ЛПНП) стимулируют накопление холестерина в клетках кровеносных сосудов, способствуя развитию атеросклероза. Атерогенную модификацию ЛПНП вызывает фермент транссиалидаза. В данной работе исследовано влияние на транссиалидазную активность плазмы экстрактов из натуральных продуктов.

Ключевые слова: атеросклероз, десИАлирование, накопление липидов, липопротеиды низкой плотности, натуральные продукты, транссиалидаза.

Один из ключевых факторов в патогенезе атеросклероза — накопление липидов, включая эфиры холестерина, в клетках стенок сосудов. Большую роль во внутриклеточном накоплении липидов играют циркулирующие в плазме крови множественно модифицированные липопротеиды низкой плотности (ЛПНП) [1, 2], которые по физическим и химическим свойствам отличаются от нативных. Множественно модифицированные ЛПНП характеризуются низким содержанием сиаловых кислот, меньшим размером и более высокой плотностью, высокой электроотрицательностью, тенденцией к агрегации, проявлением атерогенности [3, 4]. Вероятно, одним из важнейших процессов, приводящих к образованию множественно модифицированных ЛПНП, является их ферментативная модификация под влиянием транссиалидазы плазмы крови.

Транссиалидаза выделена из человеческой плазмы крови с помощью аффинной хроматографии на полисиаловой кислоте, ковалентно связанной с агарозой [5, 6]. Обработка нативных ЛПНП транссиалидазой приводит к их десИАлированию и, как следствие, к проявлению их способности вызывать накопление холестерина в клетках интимы аорты человека [5, 7]. Можно предположить, что ингибирование транссиалидазы снижает скорость модификации ЛПНП и снижает накопление холестерина в клетках сосудов. Было показано, что производные гепарина и цитозина способны снижать транссиалидазную активность [8]. Кроме того, возможность использовать продукты природного происхождения для предотвращения и лечения атеросклероза открывает хорошие перспективы с учетом их низкой токсичности.

Мы исследовали влияние экстрактов растений и продуктов пчеловодства на активность транссиалидазы плазмы крови человека.

Растительные экстракты. Использовались спиртовые экстракты (70% этанол) растений, водорослей и продуктов пчеловодства.

Выделение и радиоактивное мечение ЛПНП. Кровь брали из локтевой вены донора утром натощак в пробирку, содержащую 1 мг/мл этилендиамидтетраацетата натрия (ЭДТА). Клетки крови отделяли центрифугированием при 1600 об. в течение 15 мин на центрифуге TJ-6 Beckman (Beckman Instruments, США). ЛПНП выделяли из плазмы крови двукратным центрифугированием [8]. Образцы плазмы помещали в поликарбонные ультрацентрифужные пробирки (Beckman Instruments, США), затем на них наслаивали двойное количество раствора NaBr (1,019 г/мл). После ультрацентрифугирования в течение 2 ч при 125 000 об. на роторе 50 Ti (Beckman Instruments, США) убиралась слою, содержащие липопротеиды очень низкой и промежуточной плотности. К оставшейся плазме добавляли твердый NaBr (до конечной плотности 1,470 г/мл), затем наслаивали 2-й раствор NaBr (1,065 г/мл) и центрифугировали в течение 18 ч при 125 000 об. Кольцо, содержащее ЛПНП, отбирали отдельно, диализовали при 4°C в течение ночи против 4000 объемов 50 мМ Tris-HCl (pH 7,0), после чего стерилизовали фильтрацией (диаметр пор 0,45 мкм). ³H-мечение ЛПНП осуществляли на C-8 положении сиаловой кислоты, как описано R. Veh и соавт. [9].

Получение липопротеиддефицитной плазмы. Для получения липопротеиддефицитной плазмы начальную плотность плазмы доводили до 1,39 г/мл твердым NaBr. На образцы наслаивали равный объем раствора NaBr (1,065 г/мл) и центрифугировали в течение 18 ч при 125 000 об. (ротор 50 Ti, Beckman Instruments, США). Свободные липопротеиды удаляли, а липопротеиддефицитную плазму диализовали при 4°C в течение ночи против 4000 объемов 50 мМ Tris-HCl (pH 7,0).

Выделение транссиалидазы. Сывороточную транссиалидазу выделяли с помощью аффинной хроматографии. Человеческую липопротеиддефицитную плазму наносили на колонку с сефаразой с ковалентно связанной с ней полисиаловой

кислотой (Syntesome GmbH, Германия). Колонку промывали 10 объемами 50 мМ Tris-HCl; связанный фермент элюировали 3 объемами раствора 5 мМ сиаловой кислоты в 50 мМ Tris-HCl (pH 7,0). Полученный препарат транссиалидазы диализовали против 5 мМ Tris-HCl в течение дня с тройной сменой буфера. Фермент концентрировали методом ультрафильтрации (Amicon, США) и хранили при -70°C. Концентрацию белка в растворе фермента определяли по [3].

Измерение транссиалидазной активности. Для определения транссиалидазной активности ЛПНП, меченные тритием, ковалентно связывали с CNBr-активированной сефарозой и использовали как донора сиаловой кислоты [4]. Реакционная смесь содержала (общий объем 200 мкл): 10–20 мкл меченных ЛПНП, связанных с сефарозой, 50 мкг асиалофетина, 50 мМ Tris-HCl (pH 7,0), 1 мМ дитиотреитол (ДТТ), 2 мМ CaCl₂ и 10 мкг транссиалидазы, выделенной из плазмы крови человека. Инкубацию проводили при постоянном перемешивании в течение 4 ч при 37°C. Контрольная смесь не содержала фермента. После инкубации к реакционной смеси добавляли 0,3 мл ледяной воды и центрифугировали в течение 5 мин при 5000 об. при 4°C; 0,2 мл надосадочной жидкости использовали для определения радиоактивности с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика 1215 Rack-Beta (LKB, Швеция).

Достоверность различий между группами среднего значения оценивали с помощью двустороннего t-теста Стьюдента, используя VMDP – статистический пакет программ [10].

Данные, представленные в таблице, показывают влияние различных концентраций экстрактов растений, водорослей и продуктов пчеловодства на активность транссиалидазы, выделенной из плазмы крови человека.

Экстракты корня лапчатки (*Potentilla erecta*) и цветов календулы (*Calendula officinalis*) не оказывают влияния на активность фермента. Экстракты зверобоя (*Hypericum perforatum*) и тысячелистника (*Achillea millefolium*) снижают транссиалидазную активность на 45–71% при концентрациях 100–1000 мкг/мл.

Влияние различных экстрактов натуральных веществ на активность транссиалидазы, выделенной из плазмы крови человека, *in vitro* (M±σ, % от контроля)

Экстракт	Концентрация экстракта, мг/мл						
	0	0,01	0,1	1	10	100	1000
Корень лапчатки (<i>Potentilla erecta</i>)	100±7	99±9	94±8	97±6	95±6	102±5	89±6
Цветы календулы (<i>Calendula officinalis</i>)	100±7	111±12	108±7	103±3	105±8	92±6	88±4
Зверобой (<i>Hypericum perforatum</i>)	100±7	93±7	95±9	98±5	95±7	72±5	57±4
Тысячелистник (<i>Achillea millefolium</i>)	100±7	99±5	94±3	92±8	78±4	54±4	27±3
Корень женьшеня (<i>Panax ginseng</i>)	100±7	94±6	95±8	98±6	99±3	95±5	88±6
Корень элеутерококка (<i>Eleutherococcus senticosus</i>)	100±7	95±5	105±7	100±7	101±8	95±6	85±8
Корень родиолы розовой (<i>Rhodiola rosea</i>)	100±7	98±6	103±5	98±5	89±5	72±4	58±5
Прополис	100±7	97±9	99±8	108±10	103±7	98±3	88±5
Мед	100±7	94±4	95±6	92±5	88±4	85±8	60±4
Пыльца	100±7	92±5	80±2	49±4	43±2	21±3	14±2
Королевский комбу (<i>Saccharina</i>)	100±7	98±7	95±6	89±5	85±4	81±5	74±3
Фукус пузырчатый (<i>Fucus vesiculosus</i>)	100±7	93±8	101±5	90±4	81±3	75±4	65±2
Лук (<i>Allium cepa</i>)	100±7	96±4	97±5	95±7	92±6	82±2	73±6
Чеснок (<i>Allium sativum</i>)	100±7	92±4	85±5	81±6	63±4	32±3	10±4

Среди растительных экстрактов с общим седативным эффектом только экстракт корня родиолы розовой (*Rhodiola rosea*) снижает транссалидазную активность на 36–44% при концентрациях 100–1000 мг/мл. Представители семейства *Araliaceae* – женьшень (*Panax ginseng*) и элеутерококк (*Eleutherococcus senticosus*) – не оказывают необходимого эффекта.

Экстракты продуктов пчеловодства вызывают снижение транссалидазной активности. Спиртовой экстракт пчелиной пыльцы подавляет транссалидазную активность на 51–86% при концентрациях 1–1000 мг/мл. Водный экстракт оказывает подобный эффект на активность фермента (данные не представлены).

Экстракты королевского комбу (*Saccharina japonica*) и фукуса пузырчатого (*Fucus vesiculosus*) снижают транссалидазную активность соответственно на 24 и 36% при использовании наибольших концентраций.

Экстракты растений семейства лилейных (*Liliacea*) вызывают значительное уменьшение активности транссалидазы. Спиртовой экстракт чеснока (*Allium sativum*) снижает активность фермента на 92% при концентрации 1000 мг/мл. Подобный ингибиторный эффект наблюдается для водного и хлороформного экстрактов чеснока (данные не представлены).

Наиболее важные исследования транссалидазы были проведены при изучении простейших, таких как *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Endotrypanum* spp. [11] и др. Многие из этих организмов могут быть причиной опасной патологии (сонной болезни, болезни Чагаса). Большинство транссалидаз простейших паразитов являются фактором вирулентности. Поэтому поиск ингибиторов транссалидазы представляет особый интерес [12].

Мы провели поиск потенциальных ингибиторов транссалидазной активности человеческой плазмы крови среди продуктов природного происхождения. Исследование показало, что ингибиторы транссалидазы можно получить из некоторых растений и продуктов пчеловодства. Экстракты королевского комбу, фукуса пузырчатого, тысячелистника, зверобоя, лука и меда оказали ингибиторный эффект на активность транссалидазы. Однако наибольший эффект наблюдался в экспериментах с пчелиной пыльцой и экстрактом чеснока.

Ранее мы показали, что главный атерогенный компонент плазмы крови от пациентов с коронарным атеросклерозом – ЛПНП с низким содержанием сиаловых кислот [1, 13]. Обработка нативных ЛПНП транссалидазой *in vitro* приводит к их десалированию и активации атерогенных свойств. Таким образом, можно предположить, что ингибирование транссалидаз должно привести к сокращению атерогенных свойств плазмы крови. Результаты данной работы могут послужить основой для разработки новых подходов к профилактике и лечению атеросклероза у человека.

Литература

1. Orekhov A., Tertov V., Mukhin D. Desialylated low density lipoprotein - naturally occurring lipoprotein with atherogenic potency // *Atherosclerosis*. – 1991; 86: 153–61.
2. Orekhov A., Tertov V., Mukhin D. et al. Modification of low density lipoprotein by desialylation causes lipid accumulation in cultured cells. Discovery of desialylated lipoprotein with altered cellular metabolism in the blood of atherosclerotic patients // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1989; 162: 206–11.
3. Lowry O., Rosebrough N., Farr A. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951; 193: 265–75.
4. Millar J. The sialylation of plasma lipoproteins // *Atherosclerosis*. – 2011; 154: 1–13.
5. Tertov V., Kaplun V., Sobenin I. et al. Human plasma trans-sialidase causes atherogenic modification of low density lipoprotein // *Atherosclerosis*. – 2001; 159: 103–15.
6. Tertov V., Sobenin I., Tonevitsky A. 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. Taniguchi T., Ishikawa Y., Tsunemitsu M. et al. Stimulation of cholesteryl ester synthesis in human monocyte-derived macrophages by asialo low density lipoproteins // *Arteriosclerosis*. – 1989; 9: 767.
8. Tertov V., Kaplun V., Sobenin I. et al. Low-density lipoprotein modification occurring in human plasma. Possible mechanism of *in vivo* lipoprotein desialylation as a primary step of atherogenic modification // *Atherosclerosis*. – 1998; 138: 183–95.
9. Veh R., Corfield A., Sander M. et al. Neuraminic acid-specific modification and tritium labelling of gangliosides // *Biochem. Biophys. Acta*. – 1977; 486: 145–60.
10. Dixon W., Brown M. *Biomedical Computer Programs. P-Series*. University of California Press, Berkeley. 1977; 185–203.
11. Schenkman S. Structural and functional properties of trypanosoma trans-sialidase // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1994; 48: 499–523.
12. Agusti R., Paris G., Ratier L. et al. Lactose derivatives are inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase activity toward conventional substrates *in vitro* and *in vivo* // *Glycobiology*. – 2004; 14 (7): 659–70.
13. Tertov V., Orekhov A., Sobenin I. et al. Carbohydrate content 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: 365–75.

EFFECT OF NATURAL PRODUCTS ON THE ATHEROGENIC MODIFICATION OF LDL I. Azarova^{1,2}; A. Feoktistov², Candidate of Biological Sciences; Professor A. Orekhov^{2,3}, Biol.D

¹Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudnyi, Moscow Region

²Institute for Atherosclerosis Research (Skolkovo), Moscow

³Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Modified low-density lipoproteins (LDL) stimulate cholesterol accumulation in the cells of blood vessels, favoring the development of atherosclerosis. The enzyme trans-sialidase induces atherogenic modification of LDL. This investigation has studied the effect of extracts from natural products on plasma trans-sialidase activity.

Key words: atherosclerosis, desialation, lipid accumulation, low-density lipoproteins, natural products, trans-sialidase.