



УДК 612.391.81

## АЦИЛИРОВАНИЕ 3 $\beta$ -(2-ГИДРОКСИЭТОКСИ)ХОЛЕСТ-5-ЕНА В ПРИСУТСТВИИ ЛЕЦИТИН:ХОЛЕСТЕРИН-АЦИЛТРАНСФЕРАЗЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ

© 1997 г. А. В. Малюгин, Н. В. Медведева, А. Ю. Мишарин<sup>#</sup>

Институт экспериментальной кардиологии КНЦ РАМН, Москва, 121552, 3-я Черепковская ул., 15А

Поступила в редакцию 25.04.96 г.

3 $\beta$ -(2-Гидроксиэтокс)холест-5-ен в составе мицеллярных комплексов с аполипопротеином А1 и пальмитоилолеилфосфатидилхолином ацилировался в присутствии лецитин:холестерин-ацилтрансферазы плазмы крови человека. Начальная скорость ацилирования была в 6–8 раз ниже скорости ацилирования холестерина в тех же условиях. Присутствие 3 $\beta$ -(2-гидроксиэтокс)холест-5-ена не влияло на скорость ферментативного ацилирования холестерина.

*Ключевые слова:* синтетические стеринны, холестерилловые эфиры, лецитин:холестерин-ацилтрансфераза.

Образование холестерилловых эфиров в плазме крови, катализируемое лецитин:холестерин-ацилтрансферазой (ЛХАТ, КФ 2.3.1.43), как известно [1–3], – важнейшая стадия обратного транспорта холестерина, комплексного процесса, обеспечивающего выведение холестерина из организма млекопитающих. Результаты исследований субстратной специфичности и механизма действия ЛХАТ плазмы крови человека неоднократно освещались в обзорах [4–8]. Хорошо известно, что стадия переноса ацильного остатка в реакции, катализируемой ЛХАТ, не является специфичной по отношению к холестерину: в роли акцептора могут выступать многие стеринны [9, 10], алифатические спирты [10, 11] и вода [11, 12].

Ранее при изучении биологической активности и метаболизма синтетических 3 $\beta$ -(2-гидроксиэтокс)замещенных стериннов мы обнаружили их ацильные производные в культуре клеток [13, 14] и в сыворотке крови [15]. Цель настоящего сообщения – проверка возможности образования *in vitro* ацильных производных 3 $\beta$ -(2-гидроксиэтокс)холест-5-ена (I) (холестерилцеллозольва) в составе мицеллярного комплекса аполипопротеин А1–пальмитоилолеилфосфатидилхолин (апоА1–РОРС) в реакции, катализируемой ЛХАТ плазмы крови человека. В качестве источника ЛХАТ использовалась фракция ( $d > 1.21$  г/мл) сыворотки крови здорового донора, активность фермента оценивали по начальной скорости образования радиоактивных стерилловых эфиров в составе предвари-

тельно приготовленных мицеллярных комплексов (“метод экзогенного субстрата” Чена и Альберса [16]).

Так как скорость переноса ацильного остатка в реакции, катализируемой ЛХАТ, зависит от размеров субстратного комплекса, содержания апоА1 (активатора ЛХАТ), природы переносимого ацильного остатка и содержания холестерина, субстратные мицеллярные комплексы апоА1–РОРС–холестерин мы получали по методу [17] в условиях, обеспечивающих образование “оптимального субстрата ЛХАТ” [17, 18]. Комплексы апоА1–РОРС–(I), содержащие вместо холестерина холестерилцеллозольв (I), получали в аналогичных условиях.

Выделенные гелем-хроматографией комплексы имели стехиометрический состав (моль/моль/моль):

апоА1–РОРС–холестерин – 1 : 78 ( $\pm 8$ ) : 5 ( $\pm 2$ ),

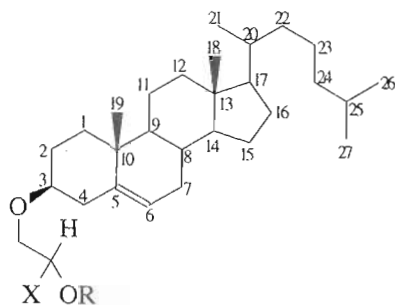
апоА1–РОРС–(I) – 1 : 70 ( $\pm 10$ ) : 4 ( $\pm 2$ ).

Начальную скорость ЛХАТ-зависимого ацилирования стериннов в комплексах оценивали с помощью ТСХ по образованию радиоактивных стерилловых эфиров. Предынкубацией комплексов апоА1–РОРС–холестерин и апоА1–РОРС–(I) с [ $^{14}$ C]холестерином и [ $^3$ H]холестерилцеллозольвом (I\*) были получены три радиоактивных субстрата ЛХАТ: апоА1–РОРС–[ $^{14}$ C]холестерин, апоА1–РОРС–(I)–[ $^{14}$ C]холестерин и апоА1–РОРС–(I\*). Содержание радиоактивного вещества не превышало 1% от присутствующего в комплексе немеченого субстрата во всех опытах.

Кинетические кривые ЛХАТ-зависимого ацилирования представлены на рисунке. Образование холестерилловых эфиров не наблюдалось при

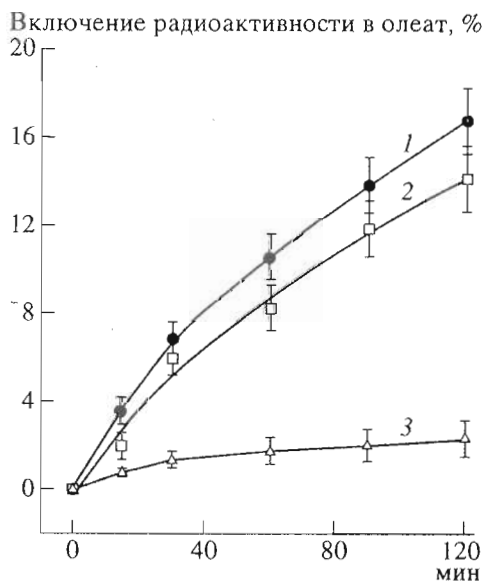
Сокращения: ЛХАТ – лецитин:холестерин-ацилтрансфераза, апоА1 – аполипопротеин А1; РОРС – пальмитоилолеилфосфатидилхолин.

<sup>#</sup> Автор для переписки.



- (I): X = R = H  
 (I\*): X = [<sup>3</sup>H]; R = H  
 (II): X = H; R = CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CO

инактивации ЛХАТ нагреванием или обработкой иодацетамидом [8]. Скорость ЛХАТ-зависимого ацилирования [<sup>14</sup>C]холестерина в комплексе апоА1-РОРС-холестерин (кривая 1) близка к полученной для этого комплекса ранее [16, 17]. Достоверных различий в скорости ацилирования [<sup>14</sup>C]холестерина в составе этого комплекса и комплекса, включающего холестерилцеллозольв (кривая 2), не выявлено. Это не явилось неожиданностью, поскольку влияние холестерина и холестерилцеллозоля (I) на физические свойства фосфолипидов близки [19]. Кривая 3 указывает на образование олеата холестерилцеллозоля (II) в ЛХАТ-катализируемой перэтерификации. Ско-



Кинетические кривые олеоилирования радиоактивно меченых стероидов в присутствии ЛХАТ плазмы крови человека в составе мицеллярных комплексов апоА1-РОРС-[<sup>14</sup>C]холестерин (1), апоА1-РОРС-(I)-[<sup>14</sup>C]холестерин (2), апоА1-РОРС-(I\*) (3). За 100% принималось общее содержание радиоактивности в пробе.

рость ацилирования стерина (I\*) была в 6–8 раз ниже, чем для [<sup>14</sup>C]холестерина.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности ацилирования гидроксиэтоксигруппы стерилцеллозолей в плазме крови, в реакции, катализируемой ЛХАТ, а также указывают на то, что присутствие 3β-(2-гидроксиэтокси)замещенных стероидов в плазме не влияет на ЛХАТ-зависимое ацилирование природного субстрата – холестерина.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

АпоА1 выделен из плазмы крови человека по методу [20], фракцию плазмы крови человека с плотностью  $d > 1,21$  г/мл получали ультрацентрифугированием, как описано в работе [16]; РОРС, холестерин, холестерилолеат, сывороточный альбумин человека, 2-меркаптоэтанол, трис(гидроксиэтил)амин (трис) и холат натрия получены от фирмы Sigma, [4-<sup>14</sup>C]холестерин – от New England Nuclear (NEN Research Products, Du Pont), 3β-(2-гидроксиэтокси)холест-5-ен (I), 3β-[2-(9-циклооктадеценилокси)этокси]холест-5-ен (II) и 3β-(2-гидрокси-2-[<sup>3</sup>H]этокси)холест-5-ен (I\*) синтезированы по методам [15, 19].

### Получение субстратных мицеллярных комплексов [17, 18]

АпоА1 (2.8 мг), РОРС (9.2 мг), холат натрия (5.0 мг), холестерин или холестерилцеллозольв (I) (0.24 мг) смешивали при интенсивном встряхивании в 1.5 мл буфера, pH 8.0, содержащего 10 мМ трис-НСl, 0.15 М NaCl, 1 мМ NaN<sub>3</sub>, 0.01% EDTA, и диализовали 48 ч против того же буфера (4 × 2 л). После диализа полученный комплекс пропускали через колонку (1.6 × 90 см) с сефарозой CL 4В (Pharmacia) в том же буфере со скоростью 12 см<sup>3</sup>/ч, собирая фракции по 1 мл. Фракция, содержащая белок, выходила одним пиком в объеме 15 мл. Три аликвоты из разных частей пика анализировали на содержание апоА1, РОРС и холестерина. Стехиометрический состав комплексов, выделенных из трех частей пика, был одинаков и с указанной ошибкой приведен выше. Содержание апоА1 оценивали спектрофотометрически (принимая оптическое поглощение раствора при 280 нм с концентрацией апоА1, равной 1 мг/мл, за 1.15), содержание РОРС – по липидному фосфору [21], содержание холестерина – ферментативным методом с использованием набора Cholesterol monotest (Boehringer). Для оценки содержания соединения (I) в тех же условиях получали комплекс апоА1-РОРС-(I) с добавлением следовых количеств соединения (I\*) (30000 расп/(мин мкмоль)). После выделения радиоактивного комплекса гель-фильтрацией содержание соединения (I) в комплексе рассчитывали по радиоактивности.

Аликвоту (100 мкл) выделенного нерадиоактивного комплекса (20 мкг апоА1) в буфере смешивали с 125 мкл 2% раствора альбумина, 25 мкл 0.1 М раствора 2-меркаптоэтанола, прибавляли радиоактивно меченый стерин (40000 расп/мин) в 5 мкл этанола, добавляли 230 мкл буфера и инкубировали 30 мин при 37°C. Затем в каждую пробу вносили по 20 мкл фракции ( $d > 1.21$  г/мл) плазмы крови и продолжали инкубацию при 37°C 15, 30, 60, 90 и 120 мин. Реакцию в каждой пробе останавливали прибавлением 1 мл метанола, затем добавляли по 2 мл хлороформа, нижние фазы отделяли, растворитель высушивали в токе азота, остатки растворяли в 25 мкл хлороформа и хроматографировали на пластинках с силикагелем Kieselgel 60 (Merck) в системе гексан-эфир-уксусная кислота (70 : 29 : 1) с добавлением нерадиоактивных внутренних стандартов: холестерина, холестерилолеата, холестерилцеллозолева (I) и олеата (II). Хроматограммы проявляли в парах иода. Зоны, соответствующие холестерину, соединению (I) и олеатам, вырезали и использовали для измерения радиоактивности в толуольном сцинтилляторе на приборе Tracor Instrument. Каждую инкубацию проводили трижды. Содержание радиоактивности во фракции олеатов получали как среднее для трех хроматограмм каждой инкубации и выражали в процентах по отношению к общему содержанию радиоактивности в пробе.

Авторы благодарны Российскому фонду фундаментальных исследований (проект № 95-04-12165) за оказанную финансовую поддержку.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Glomset J.A.* // J. Lipid Res. 1968. V. 9. P. 155–167.
2. *Barter P.* // Curr. Opin. Lipidol. 1993. V. 4. P. 210–217.
3. *Fielding C.J., Fielding P.E.* // J. Lipid Res. 1995. V. 36. P. 211–218.
4. *Glomset J.A.* // Blood Lipids and Lipoproteins: Quantitation, Composition and Metabolism / Ed. G.J. Nelson. N.Y.: Wiley-Interscience, 1972. P. 745–787.
5. *Jonas A.* // Exp. Lung Res. 1984. V. 6. P. 255–270.
6. *Jonas A.* // J. Lipid Res. 1986. V. 27. P. 689–698.
7. *Fielding C.J.* // Advances in Cholesterol Research / Eds M. Esfahani, J.B. Swaney. N.Y.: Telford Press, Caldwell, 1990. P. 271–314.
8. *Jonas A.* // Biochim. Biophys. Acta. 1991. V. 1084. P. 205–220.
9. *Piran U., Nishida T.* // Lipids. 1979. V. 14. P. 478–482.
10. *Kitabatake K., Piran U., Kamio Y., Doi Y., Nishida T.* // Biochim. Biophys. Acta. 1979. V. 573. P. 145–154.
11. *Piran U., Nishida T.* // J. Biochem. (Tokyo). 1976. V. 80. P. 887–889.
12. *Aron L., Jones S., Fielding C.J.* // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. P. 7220–7226.
13. *Misharin A.Yu., Alquier C., Steinshneider A.Ya., Malugin A.V., Lafont H.* // Med. Chem. Res. 1995. V. 5. P. 409–416.
14. *Мишиарин А.Ю., Крылов А.С., Алки К., Лафонт Ю., Штейншнейдер А.Я., Косых В.А., Морозкин А.Д.* // Биоорг. химия. 1997. В печати.
15. *Малюгин А.В., Новиков Д.К., Алки К., Лафонт Ю., Мишиарин А.Ю.* // Биоорг. химия. 1996. Т. 22. С. 717–720.
16. *Chen C.-H., Albers J.J.* // J. Lipid Res. 1982. V. 23. P. 680–691.
17. *Jonas A., Wald J.H., Toohill K.J.H., Krul E.S., Kezdy K.E.* // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 22123–22129.
18. *Leroy A., Toohill K.J.H., Fruchart J.-C., Jonas A.* // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 4798–4805.
19. *Малюгин А.В., Новиков Д.К., Косых В.А., Косенков Е.И., Медведева Н.В., Валентинова Н.В., Штейншнейдер А.Я., Мишиарин А.Ю.* // Биоорг. химия. 1996. Т. 22. С. 541–547.
20. *Мишиарин А.Ю., Замаева Н.Ю., Медведева Н.В., Бушуева Т.Л.* // Биоорг. химия. 1991. Т. 17. С. 53–59.
21. *Vaskovsky V.E., Kostetsky E.V., Vasendin I.M.* // J. Chromatogr. 1975. V. 114. P. 129–141.

## Acylation of $\beta$ -(2-Hydroxyethoxy)cholest-5-ene in the Presence of Lecithin-Cholesterol Acyltransferase from Blood Plasma

A. V. Malugin, N. V. Medvedeva, and A. Yu. Misharin

*Institute of Experimental Cardiology, Cardiological Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Tret'ya Cherepkovskaya ul. 15A, Moscow, 121552 Russia*

**Abstract**— $\beta$ -(2-Hydroxyethoxy)cholest-5-ene in the composition of the micellar complexes with apolipoprotein A1 and palmitoyloleoylphosphatidylcholine was acylated in the presence of lecithin-cholesterol acyltransferase from human plasma. The initial rate of acylation was 6–8 times lower than the rate of cholesterol acylation under the same conditions. The presence of  $\beta$ -(2-hydroxyethoxy)cholest-5-ene did not affect the rate of the enzymic acylation of cholesterol.

*Key words:* synthetic sterols, cholesteryl esters, lecithin-cholesterol acyltransferase.