

РОЛЬ ГАЛОГЕНИРУЮЩЕГО СТРЕССА В АТЕРОГЕННОЙ МОДИФИКАЦИИ ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ

© 2020 г.

О. М. ПАНАСЕНКО^{1, #},
Т. И. ТОРХОВСКАЯ^{1, 2}, И. В. ГОРУДКО³,
А. В. СОКОЛОВ^{1, 4}

¹ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр
физико-химической медицины

Федерального медико-биологического агентства», Москва

²Научно-исследовательский институт биомедицинской химии
имени В.Н. Ореховича, Москва

³Белорусский государственный университет, Минск

⁴Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

I. Введение. II. Ферментативная активность миелопероксидазы. Активные формы галогенов. Галогенирующий стресс. III. Взаимодействие активных форм галогенов с компонентами липопротеинов низкой плотности. IV. Модификация структуры липопротеинов низкой плотности под действием активных форм галогенов. V. Взаимодействие миелопероксидазы с липопротеинами низкой плотности. VI. Биомаркеры миелопероксидазы и галогенирующего стресса при сердечно-сосудистых заболеваниях. VII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Липопротеины низкой плотности (ЛНП) – главная транспортная форма холестерина и его эфиров в крови человека. Повышение в плазме крови концентрации холестерина и ЛНП является диагностическим критерием риска развития атеросклероза [1] – хронического заболевания сосудов, для которого характерно прогрессирующее накопление

Принятые сокращения: apoB-100 – аполипопротеин B-100; АФГ – активные формы галогенов; ЛНП – липопротеины низкой плотности; ЛОНП – липопротеины очень низкой плотности; ЛВП – липопротеины высокой плотности; ЛНП-Cl – ЛНП, модифицированные HOCl; ЛНП-Br – ЛНП, модифицированные NOBr; м-ЛНП – модифицированные ЛНП; МПО – миелопероксидаза; ПОЛ – перекисное окисление липидов; ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания; ЦП – церулоплазмин; ЦП-Cl – ЦП, модифицированный HOCl.

[#]Адрес для корреспонденции: o-panas@mail.ru

В обзоре представлены результаты, полученные при поддержке грантов РФФИ 17-04-00530 (главы III, IV, V), 18-515-00004 (глава II) и РНФ 17-75-30064 (глава VI).

холестерина с развитием атероматозных бляшек, сужающих просвет сосудов и ведущих к развитию сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). После классических работ основоположника «холестериновой теории» развития атеросклероза Н.Н. Аничкова, постулировавшего, что «без холестерина нет атеросклероза», основные усилия были направлены на коррекцию концентрации общего холестерина в плазме [2]. Когда в 1960-х годах J.W. Gofman впервые использовал аналитическое ультрацентрифугирование для того, чтобы выделить из плазмы холестерин-переносящие липопротеины [3, 4], было обнаружено увеличение концентрации ЛНП у пациентов с сердечными приступами. К концу 1970-х годов было доказано, что ЛНП являются источником липидов, накапливающихся в сосудах, а возникающая за счет высокого уровня ЛНП гиперхолестеринемия до сих пор считается важнейшим фактором риска ССЗ [5].

В 1970–1980-х годах появились исследования, направленные не только на выявление количества отдельных классов липопротеинов, но и на особенности их физико-химических свойств. Возникло понятие «модифицированные ЛНП» (м-ЛНП), которые отличались от ЛНП плазмы здоровых лиц с известным содержанием и соотношением белковых и липидных компонентов [6, 7]. Было доказано, что нативные ЛНП захватываются многими клетками крови и сосудистой стенки через специальные В,Е-рецепторы. Этот физиологический механизм пополнения клеткой липидного запаса регулируется по принципу отрицательной обратной связи и не позволяет клетке перенасытиться холестерином [8]. Модификация поверхности ЛНП приводит к тому, что В,Е-рецепторы перестают «узнавать» их, но такие м-ЛНП захватываются макрофагами и гладкомышечными клетками сосудистой стенки через рецепторы-мусорщики (scavenger receptor) по нерегулируемому механизму, что вызывает перенасыщение клеток эфирами холестерина, с образованием пенистых клеток – основы будущей атеросклеротической бляшки [9, 10]. Так было положено начало развитию новой концепции о преимущественной роли именно м-ЛНП в атерогенезе, связанной с различными видами атерогенных модификаций ЛНП. Вне зависимости от типа модификации: окисление [11, 12], протеолиз [13, 14], липолиз [15], десИАлирование [16, 17], гликозилирование [18], – м-ЛНП захватываются клетками через рецепторы-мусорщики, трансформируя их в пенистые клетки.

Роль м-ЛНП в атерогенезе в упрощенном виде представлена на схеме рис. 1. ЛНП мигрируют из кровотока в субэндотелиальное пространство, где становятся потенциальными мишенями для различного рода модификаторов ферментативной и неферментативной природы. Образующиеся м-ЛНП захватываются рецепторами-

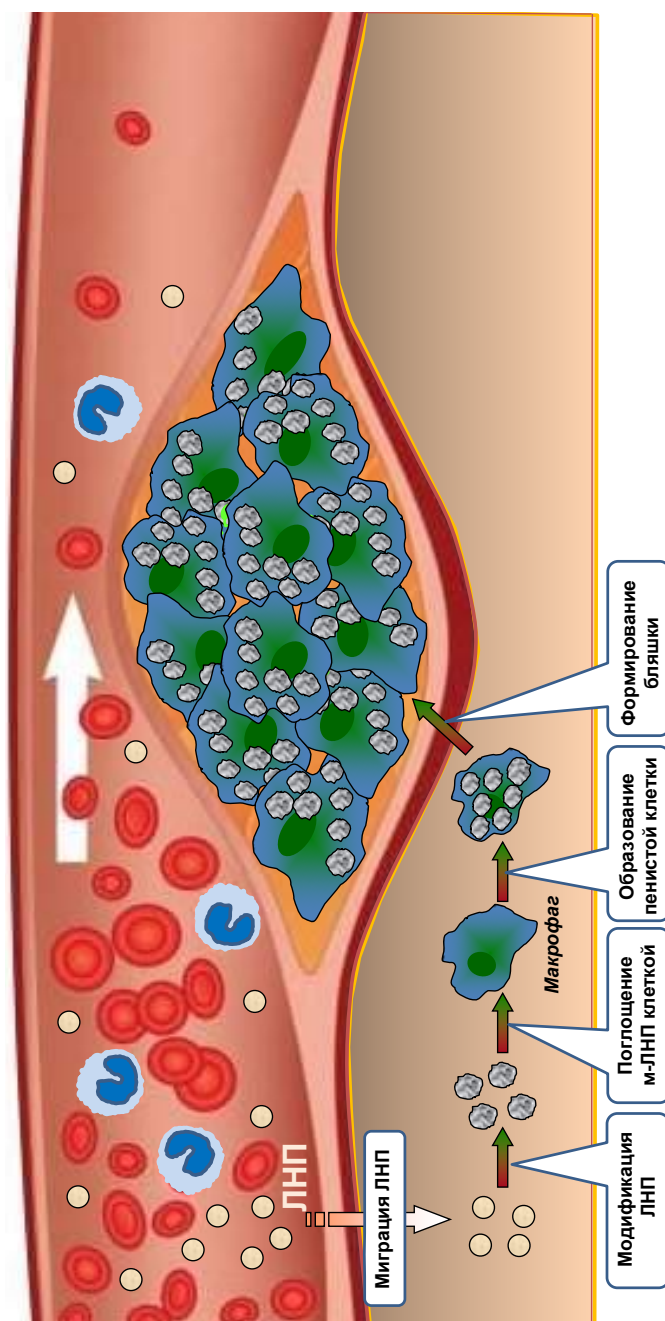


Рис. 1. Роль модифицированных ЛНП (м-ЛНП) в формировании атеросклеротической бляшки и развитии атеросклероза (см. текст).

мусорщиками, приводя к перегрузке фагоцитов холестерином и их трансформации в пенистые клетки, дающие начало формированию атеросклеротической бляшки.

В крови больных с ССЗ были обнаружены подфракции ЛНП, отличающиеся по физико-химическим свойствам от нативных ЛНП и обладающие проатерогенными свойствами, среди которых выделяют окисленные, электроотрицательные, десиалированные, мелкие плотные или наоборот – агрегированные ЛНП [19–21]. Основная причина проатерогенной модификации ЛНП до сих пор не определена. На роль потенциального атерогенного модификатора ЛНП претендует фермент миелопероксидаза (МПО), для которого показан повышенный уровень в атеросклеротически поврежденных участках аорты [22], а также в плазме крови у больных ССЗ [23]. Этот фермент содержится в нейтрофилах и моноцитах, секретируется во внеклеточную среду при их активации и обеспечивает антимикробную защиту организма [24]. МПО катализирует окисление ионов галогенов до соответствующих гипогалоидных кислот. При окислении хлорида образуется хлорноватистая кислота (НОСl), являющаяся важнейшим природным предшественником свободных радикалов в организме [25]. При этом НОСl и другие гипогалоидные кислоты запускают образование последующих активных галоген-содержащих соединений, взаимодействующих с белками и липидами ЛНП. Для таких соединений в последние годы был введен термин «активные формы галогенов» (АФГ) [25, 26] по аналогии с ранее принятыми и широко используемыми в литературе активными формами кислорода или азота [27, 28].

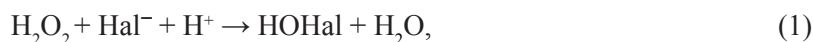
В обзоре рассмотрены данные о влиянии МПО, АФГ и индуцируемой ими реакции организма – галогенирующего стресса – на изменения свойств ЛНП крови, способствующие повышению их атерогенности и тем самым формированию атеросклеротического поражения сосудистой стенки.

II. ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ. АКТИВНЫЕ ФОРМЫ ГАЛОГЕНОВ. ГАЛОГЕНИРУЮЩИЙ СТРЕСС

Зрелая МПО представляет собой гликозилированный гомодимер ($M \sim 145$ кДа). Каждый из протомеров состоит из легкой β -субъединицы и тяжелой α -субъединицы, содержащей гем и остаток цистеина, который образует димер с помощью дисульфидной связи [29]. Фермент обнаруживается главным образом в азурофильных гранулах нейтро-

филов и в лизосомах моноцитов. Его содержание в нейтрофилах составляет 2–5% от общего клеточного белка или 2–4 мкг в 10^6 клеток. В моноцитах содержится около 0,9% (по весу) МПО [30–32]. При активации нейтрофилов и моноцитов в результате их дегрануляции часть МПО высвобождается во внеклеточное пространство (>20% в случае нейтрофилов [33]). МПО может появиться вне клетки также в результате нетоза или некроза нейтрофилов [34]. Сама МПО является сильным аутокринным регулятором функций нейтрофилов. Связываясь с интегрином CD11b/CD18 на их поверхности, МПО активирует тирозинкиназы, увеличивает концентрацию ионов Ca^{2+} в цитозоле, что в конечном итоге усиливает их дегрануляцию, способствуя дальнейшему высвобождению во внеклеточное пространство белков гранул, в том числе и самой МПО [35–38].

На рис. 2 схематично представлены основные функции МПО. На первом этапе (реакция 1) нативный фермент реагирует с молекулой H_2O_2 с образованием так называемого Соединения I, гем которого является сильным окислителем благодаря оксоферрильной форме железа и катион-радикалу порфирина. Соединение I МПО, как и других гем-содержащих пероксидаз, осуществляет последовательное одно-электронное окисление различных субстратов (нитрита, аскорбата, тирозина и др.) через образование Соединения II с возвращением в исходную форму фермента и замыканием пероксидазного цикла (реакции 1–3). В отличие от обычных пероксидаз, Соединение I МПО способно также осуществлять сразу 2-х электронное окисление галогенидов (реакция 4): хлорида (Cl^-), бромида (Br^-) или иодида (I^-) с образованием соответствующих гипогалоидных кислот: хлорноватистой (HOCl), бромноватистой (HOBr) или иодноватистой (HOI), замыкая цикл галогенирования (реакции 1 и 4) [25]:



где здесь и далее Hal – атом галогена. Соли HOCl называются гипохлоритами. Поскольку pK_a HOCl составляет $\sim 7,5$ [39], то в водной среде при физиологических значениях pH молекулярная форма HOCl присутствует примерно в равных концентрациях с диссоциированной формой – гипохлорит-анионом:



Аналогично с участием МПО окисляются присутствующие в плазме крови в существенно меньших концентрациях бромид (20–100 мкМ) и иодид (<0,6 мкМ) [40]. Галогенсодержащие реакционные соединения, в первую очередь гипогалоидные кислоты, образующиеся в ферментативном акте МПО, принято называть первичными АФГ [25, 26].

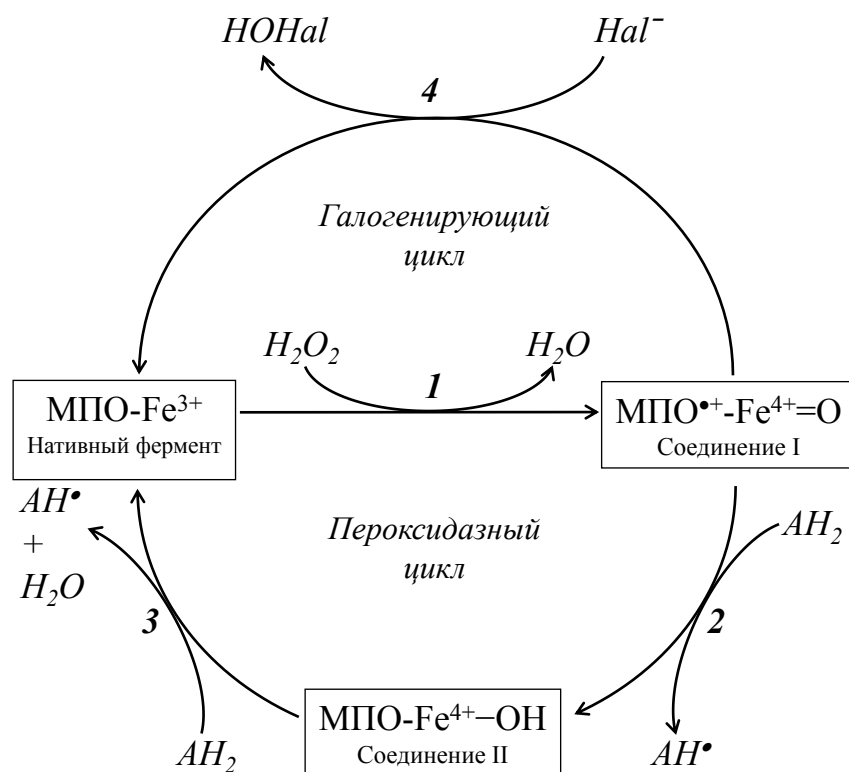


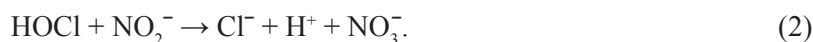
Рис. 2. Схема функционирования галогенирующего и пероксидазного цикла МПО.

Hal – галоген. АН₂ – субстрат пероксидазы.

Из-за высокой реакционной способности первичные АФГ могут взаимодействовать со многими функциональными группами присутствующих в организме соединений, приводя к образованию новых продуктов – вторичных АФГ. Наиболее важными из вторичных АФГ, повреждающих рассматриваемые нами белковые и липидные компоненты ЛНП, являются продукты взаимодействия гипогалоидных кислот с аминами и амидами. В реакции HOCl и HOBr с аминами образуются моно- и ди- хлор- и бромамины (R-NHCl, R-NC_l₂ и R-NHBr, R-NBr₂, где R – любая молекула, содержащая амино-группу) [25, 41]. В физиологических условиях, при невысокой концентрации HOCl и тем более HOBr, образуются преимущественно моногалогенамины [25]. Важно отметить, что аминогруппы содержатся во всех основных классах биомолекул, входящих в состав ЛНП: белках, фосфолипидах,

углеводах. Аналогичная реакция HOCl и HOBr с амидами ($\text{R}-\text{C}(\text{O})-\text{NHR}_1$) приводит к образованию хлор- и бромамидов ($\text{R}-\text{C}(\text{O})-\text{NClR}_1$ и $\text{R}-\text{C}(\text{O})-\text{NBrR}_1$) соответственно [25, 41]. Вторичные АФГ, хотя и с меньшей скоростью, чем первичные, способны реагировать с функциональными группами белков и других биомолекул, чаще всего замещая в них атом водорода на атом галогена [25, 41].

Вторичные АФГ могут также образовываться в реакциях гипогалоидных кислот с неорганическими соединениями. Так, например, HOCl окисляет нитрит до нитрата по реакции, описываемой суммарным уравнением ($k = 7,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ при $\text{pH } 7,2$, 25°C [42]):



В этой реакции в качестве интермедиата образуется хлористый нитрил (NO_2Cl) [43], который обладает не только нитрующим, но и выраженным хлорирующим действием в отношении фенольных соединений, в частности, тирозина [42]. NO_2Cl распадается на радикалы [43]:



что приводит к образованию тирозильного радикала [43] и пероксидации липидов в ЛНП [42, 44].

Следует подчеркнуть, что окислительная способность АФГ определяется не входящим в их состав атомом кислорода, как это имеет место быть в случае активных форм кислорода (H_2O_2 , $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$ и др.), а атомом галогена. Именно он в данном случае вступает в окислительно-восстановительный акт, принимая электроны от окисляемого соединения и превращаясь в галогенид:



Благодаря этому гипогалоидные кислоты являются сильными двух-электронными окислителями, их окислительная способность уменьшается в ряду: $\text{HOCl} > \text{HOBr} > \text{HOI}$ (окислительно-восстановительные потенциалы для пары $\text{HOHal}/\text{Hal}^-, \text{H}_2\text{O}$ составляют соответственно 1,08, 0,93 и 0,57 В) [45].

Понятно, что относить АФГ к активным формам кислорода, как это делают авторы некоторых работ [46, 47], принципиально неверно. Другие названия, используемые в литературе, а именно «хлорирующие/бромирующие оксиданты» (chlorinating/brominating oxidants) [48], «хлорирующие интермедиаты» (chlorinating intermediates) [49] или «активные хлорирующие/бромирующие формы» (reactive chlorinating/brominating species) [50, 51] не отражают всей гаммы реакционной способности атома галогена, реализуемой как в реакциях окисления,

так и в реакциях отличных от окислительно-восстановительных, а именно в реакциях замещения, присоединения и др. [25, 26, 41]. Поэтому название АФГ (reactive halogen species), обоснованное и предложенное нами в предшествующих работах [25, 26, 52] и используемое в работах других авторов [53, 54] представляется на наш взгляд более информативным и правильным.

Выраженный антимикробный эффект АФГ, используемый природой для экстренного уничтожения патогенов в очагах воспаления и инфекции, таит в себе потенциальную опасность, поскольку неконтролируемая «утечка» реакционных АФГ может явиться причиной повреждения жизненно важных молекул и надмолекулярных структур [25]. В здоровом организме этого не происходит, поскольку чрезмерная продукция АФГ сдерживается рядом факторов, которые препятствуют экзоцитозу МПО из нейтрофилов, ингибируют активность МПО, перехватывают АФГ. Однако истощение этой антигалогецирующей системы при одновременном усилении продукции АФГ может спровоцировать так называемый галогецирующий стресс, характеризующийся дисбалансом между образованием АФГ и способностью организма удалять или нейтрализовать их [25, 26]. Разумеется, галогецирующий стресс не может существовать сам по себе. Как правило, он тесным образом связан с проявлениями окислительного, нитрующего и карбонильного стрессов, поскольку АФГ, реагируя с различными соединениями и функциональными группами, приводят к образованию активных форм кислорода, азота и карбонильных соединений [26].

III. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ ГАЛОГЕНОВ С КОМПОНЕНТАМИ ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ

На основании модельных кинетических расчетов, а также проведенных экспериментов было установлено, что основными мишенями в ЛНП для HOCl и HOBr главным образом являются аминокислотные остатки Met, Cys, His, Trp, Lys, Tyr, дисульфидные и концевые NH_2 -группы белка, NH_2 -группы полярных головок фосфатидилэтаноламина и фосфатидилсерина, ненасыщенные связи холестерина, а также антиоксиданты: каротиноиды, токоферол и убихинол. Остатки Arg и ненасыщенные связи алифатических жирнокислотных цепей фосфолипидов быстро реагируют с HOBr и медленнее с HOCl . В таблице приведены константы скорости реакций второго порядка HOCl и HOBr с функциональными группами указанных соединений,

Таблица. Компоненты ЛНП, реагирующие с НОСл и НОВr , и соответствующие константы скоростей реакций второго порядка

Компонент	Количество на частицу ЛНП	$k_{\text{НОСл}}, \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$	$k_{\text{НОВr}}, \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$
АпоВ-100	[58]	[55]	[56]
Met	78	$3,8 \times 10^7$	$3,6 \times 10^6$
Cys	9	$3,0 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$
Дисульфидная связь	8	$1,6 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$
His	115	$1,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^6$
Lys	357	$5,0 \times 10^3$	$2,9 \times 10^5$
Trp	37	$1,1 \times 10^4$	$3,7 \times 10^6$
Tyr	151	44	$2,3 \times 10^5$
Arg	148	26	$1,8 \times 10^3$
Asn	247	0,03	1,9
Gln	230	0,03	1,9
NH_2 -группа концевая	1	$1,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$
Пептидная связь	4535	10	50–900
Липиды	[58]	[58]	[59]
Фосфатидилсерин*	5	$3,3 \times 10^4$	$9,3 \times 10^5$
Фосфатидилэтаноламин*	15	$1,8 \times 10^4$	$8,8 \times 10^5$
Фосфатидилхолин*	610	0,018	–
Двойные связи	5095	8,7	$1,1 \times 10^4$
Сфингомиелин (амид)	171	18,7 [93]	–
Антиоксиданты	[144]		[59]
Токоферол	7	$1,3 \times 10^3$ [58]	$6,4 \times 10^4$
Убихинол	0,1	$1,3 \times 10^3$ [58]	$2,5 \times 10^6$
β -Каротин	0,29	$2,3 \times 10^4$ [146]	–

*Указана константа скорости реакции с «полярными головками» фосфолипидов.

которые, как правило, укладываются в диапазон от 10^3 до 10^8 $M^{-1}s^{-1}$. Гораздо медленнее первичные АФГ реагируют с пептидной связью в белке, остатками Gln, Asn и практически не вступают в реакцию с остатками Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe и фосфохолиновой группой фосфатидилхолина [55–59]. Ниже мы более подробно рассмотрим, какие изменения в основных компонентах ЛНП – белке, липидах, углеводах, антиоксидантах – могут быть причиной их проатерогенной модификации.

МОДИФИКАЦИЯ АПОЛИПОПРОТЕИНА В-100

Основным белковым компонентом ЛНП (до 98%) является апоВ-100 ($M \sim 512$ кДа), выполняющий важную функцию «узнавания» В,Е-рецепторов на поверхности клеток. Инкубация ЛНП в присутствии различных концентраций $HOCl$ приводила к убыли аминокислотных остатков в следующей последовательности: Met ~ Cys > Lys ~ Tyr > His ~ Arg [57]. В ряде исследований сравнивали потери функциональных групп апоВ-100 в составе ЛНП под действием реагента $HOCl$ и в присутствии системы $МПО + H_2O_2 + Cl^-$. В большинстве исследований данные, полученные при использовании реагента $HOCl$, оказались похожими на те, что были установлены в случае системы $МПО + H_2O_2 + Cl^-$. Это значит, что именно $HOCl$, продуцируемая с участием МПО, является модифицирующим агентом [60, 61].

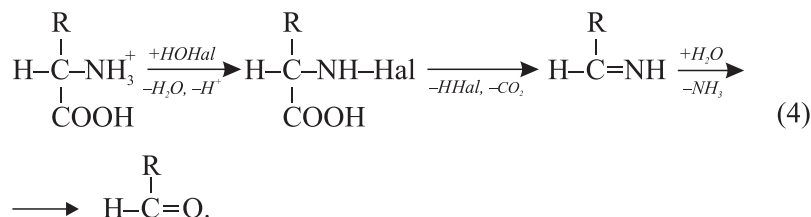
Следует отметить, однако, что модификация конкретных сайтов апоВ-100 после связывания функционирующей МПО с поверхностью ЛНП в ряде случаев отличалась селективностью от варианта использования реагента $HOCl$ [62, 63]. Так, в работе [63] было исследовано влияние $HOCl$ и функционирующей МПО ($МПО + H_2O_2 + Cl^-$) на модификацию аминокислотных остатков в составе ЛНП. После трипсинолиза апоВ-100 авторы обнаружили 97 пептидов, содержащих модифицированные остатки преимущественно Met, а также Tyr и Trp. Между пептидами, модифицированными под действием $HOCl$ и в присутствии функционирующей МПО, найдены существенные различия. Авторы предположили, что они могут быть обусловлены, с одной стороны, сайт-специфичной модификацией апоВ-100 при связывании МПО с поверхностью ЛНП в отличие от модификации под действием реагента $HOCl$, с другой – обнаруженным ими увеличением (до 90%) активности МПО при связывании с ЛНП. Анализ пептидов после трипсинолиза апоВ-100 из ЛНП крови больных с высоким риском ССЗ показал определенное сходство между пептидами, модифицированными *in vitro* и *in vivo*. Интересно, что некоторые

остатки (Met⁴, Met⁷⁸⁵, Met¹⁸⁷³, Met²⁰¹⁵, Trp²⁴⁶⁸, Trp³⁹⁴³ и Met⁴¹⁹²) были модифицированы уже в нативных ЛНП, что свидетельствует об их повышенной чувствительности к АФГ [63].

Кинетические данные для реакции NOBr с аминокислотными остатками, присутствующими в апоВ-100, свидетельствуют в пользу того, что NOBr в целом более активна по сравнению с NOCl. NOBr быстрее, чем NOCl, реагирует с His, Trp, Lys, Tyr, Arg, свободными NH₂-группами, дисульфидными связями [55, 56].

Результатом взаимодействия первичных АФГ с белком часто является их агрегация, обусловленная образованием межмолекулярных сшивок в белке. Можно выделить три главных механизма образования таких сшивок, связанных с функционированием МПО.

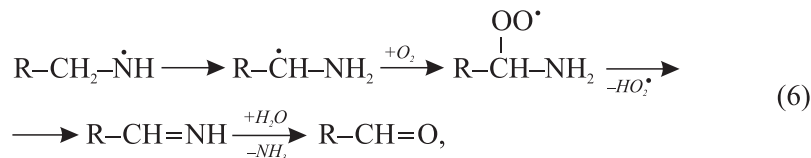
Первый механизм заключается в том, что NOCl и NOBr реагируют с NH₂-группой с образованием альдегида. Это может происходить по двум независимым путям. Во-первых, в реакции с концевой NH₂-группой, расположенной в α-положении от карбоксильной группы, образуются неустойчивые хлор- и бромамины, которые через стадии декарбосилирования и дезаминирования превращаются в альдегиды:



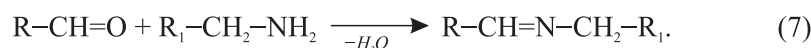
Во-вторых, хлор- и бромамины, образующиеся в реакции NOCl и NOBr с NH₂-группой боковой цепи Lys и являющиеся более устойчивыми, претерпевают гомолитический распад N-Hal связи:



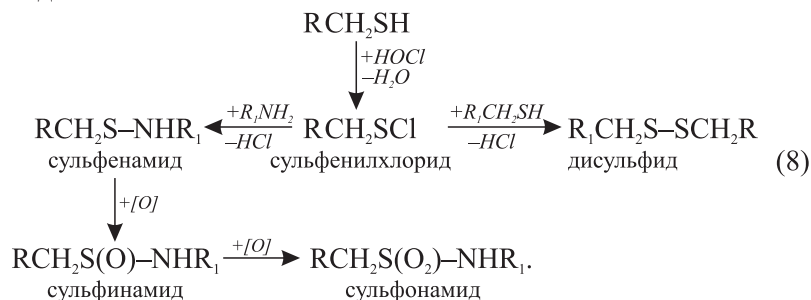
Далее N-центрированный радикал мигрирует на соседний C-атом, и в аэробных условиях в конечном итоге образуется альдегид [64]:



который в реакции со свободной NH₂-группой (главным образом, того же Lys) образует как внутри-, так и межмолекулярные сшивки:



Второй механизм образования межмолекулярных сшивок в белке обусловлен взаимодействием HOCl с SH-группой Cys, согласно приведенной ниже схеме.



Возникающий нестойкий сульфенилхлорид реагирует либо со второй SH-группой остатка Cys, образуя дисульфидную связь (–S–S–), либо с аминогруппой остатка Lys с образованием сульфенамида, то есть –N–S– ковалентной сшивки. Последний претерпевает дальнейшее последовательное окисление до сульфинамида и сульфонамида [65, 66].

Наконец, третий механизм образования сшивок в белке также является МПО-зависимым, но не связан с образованием АФГ. Он обусловлен одноэлектронным окислением остатка Tug в пероксидазном цикле МПО сначала до радикала Tug, который затем димеризуется в ди-Tug, что и приводит к образованию сшивки [67].

Результатом взаимодействия белка с первичными АФГ может быть и фрагментация, которая обусловлена деструкцией пептидной связи. При взаимодействии HOCl или NOBr с амидной группой, входящей в пептидную связь, атом водорода замещается на атом галогена с образованием хлор- или бромамидов соответственно [25, 55, 56]. Константы скорости бимолекулярной реакции HOCl и NOBr с соединениями, моделирующими пептидную связь, сильно зависят от химической структуры соединения и варьируют в пределах 3–4-х порядков. При этом во всех случаях скорость реакции амидной группы с NOBr примерно в 30–40 раз превышает таковую для HOCl [55, 56]. В водной среде хлорамиды медленно гидролизуются с разрывом пептидной связи и фрагментацией белка [68]. Методом спиновых ловушек было показано, что N–Cl(Br) связь может претерпевать гомолитический разрыв с образованием N-центрированного радикала, например, в присутствии ионов металлов переменной валентности. N-центрированный радикал в результате внутримолекулярной перегруппировки трансформируется в C-центрированный радикал, что приводит к фрагментации полипептидной цепи [64, 69]. Однако, по

мнению ряда авторов, в силу того, что константа скорости реакции HOCl с амидной связью не превышает $25 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [55], осуществление её в ЛНП *in vivo* маловероятно [57].

Модифицировать апоВ-100 может и хлористый нитрил (NO_2Cl), образующийся в качестве интермедиата в реакции нитрита с HOCl и распадающийся на свободные радикалы (см. реакцию (3)). Было отмечено, что NO_2Cl хлорирует и нитрует остатки Туг, а также приводит к образованию тирозильного радикала [42–44]. Такие частицы ЛНП с нитрованным апоВ-100 селективно узнаются рецептором-мусорщиком CD36 на клетках сосудистой стенки [70]. Аналогичный процесс может иметь место в очагах воспаления, где повышено образование как нитрита, так и HOCl [57].

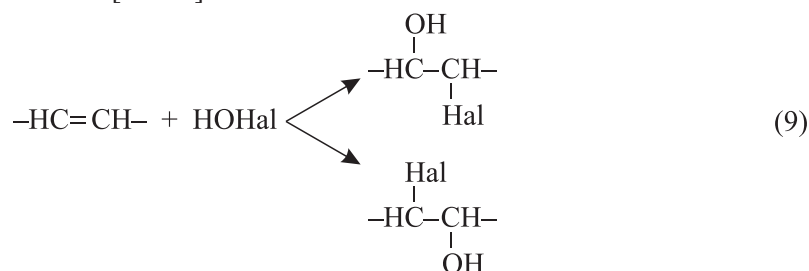
МОДИФИКАЦИЯ ЛИПИДОВ

Реальными мишенями для реакционных галоген-содержащих соединений среди липидов, входящих в состав ЛНП, являются главным образом ненасыщенные $-\text{CH}=\text{CH}-$ связи жирнокислотных цепей липидов и холестерина, а также NH_2 -группы полярных головок некоторых фосфолипидов.

Реакции активных форм галогенов с ненасыщенными связями

Реакция АФГ с ненасыщенными связями $-\text{CH}=\text{CH}-$ идет по двум основным механизмам: молекулярному, реализующемуся без участия свободных радикалов, и свободнорадикальному (пероксидация липидов), протекающему через стадии образования пероксидов и интермедиатов-радикалов.

Молекулярный механизм включает электрофильное присоединение HOCl или HOBr по двойной связи согласно суммарному уравнению (9) с образованием изомеров хлор- или бромгидринов соответственно [71–73]:



Аналогичные продукты получались и в том случае, если ненасыщенные фосфолипиды инкубировали в присутствии системы

МПО+H₂O₂+галогенид. Отсутствие в среде инкубации МПО, одного из ее субстратов (H₂O₂ или галогенида) или добавление в среду азид натрия (ингибитор МПО), таурина или Met (ловушки HOCl и HOBr) полностью предотвращало образование хлор- или бромгидринов. Это значит, что именно HOCl и HOBr, образующиеся при МПО-опосредованном катализе, участвуют в синтезе хлор- и бромгидринов соответственно [74–81].

В том случае, если в жирнокислотной цепи одновременно присутствовали несколько ненасыщенных связей, то атаке со стороны HOCl (или HOBr) подвергалась любая из них. При избытке гипогалогидных кислот в реакцию вступали все двойные связи [72, 73, 82]. В случае взаимодействия полиненасыщенных фосфолипидов, содержащих остатки арахидоновой или докозагексаеновой кислот, с гипогалоидными кислотами или с МПО+H₂O₂+Cl⁻/Br⁻-системой основным продуктом был лизофосфолипид. Это связано с проявлением отрицательного индуктивного эффекта (*-I*-эффект), обусловленного внедрением в ацильную углеводородную цепь при синтезе по реакции (9) хлор- или бромгидринов электроноакцепторных заместителей, таких как Cl, Br, OH. *-I*-эффект способствует образованию дефицита электронной плотности на атоме углерода сложноэфирной связи, приводящего к ее гидролизу [77, 79–83].

Если в среде инкубации МПО+H₂O₂+Cl⁻/Br⁻-системы с полиненасыщенными фосфолипидами отсутствовал фермент или один из его субстратов (H₂O₂ или галогенид), а также если был добавлен ингибитор МПО – азид натрия или перехватчики HOCl и HOBr – таурин или Met, то образование лизофосфолипидов не происходило. Это значит, что именно под действием HOCl или HOBr, образующихся при МПО-катализе, полиненасыщенные фосфолипиды превращаются в их лизо-производные [77, 80].

Особый интерес вызывает реакция первичных АФГ с ненасыщенной связью плазмалогенов, содержание которых в ЛНП составляет около 4,5% (от всех фосфолипидов ЛНП) [84]. Плазмалоген отличается от других фосфолипидов тем, что одна из гидроксильных групп остатка глицерола в *sn*-1 положении этерифицирована не жирной кислотой через сложноэфирную связь, а длинной алифатической цепью через простую эфирную связь, в α -положении к которой находится двойная –HC=CH– связь (рис. 3). Как оказалось, эта алкенилэфирная связь является мишенью для первичных АФГ. В результате взаимодействия HOCl (или HOBr) с плазмалогеном образуется лизофосфатидилхолин по механизму, независимому от фосфолипазы A₂, и альдегид, галогенированный во 2-м положении (см. первую стадию на рис. 3) [51, 85, 86].

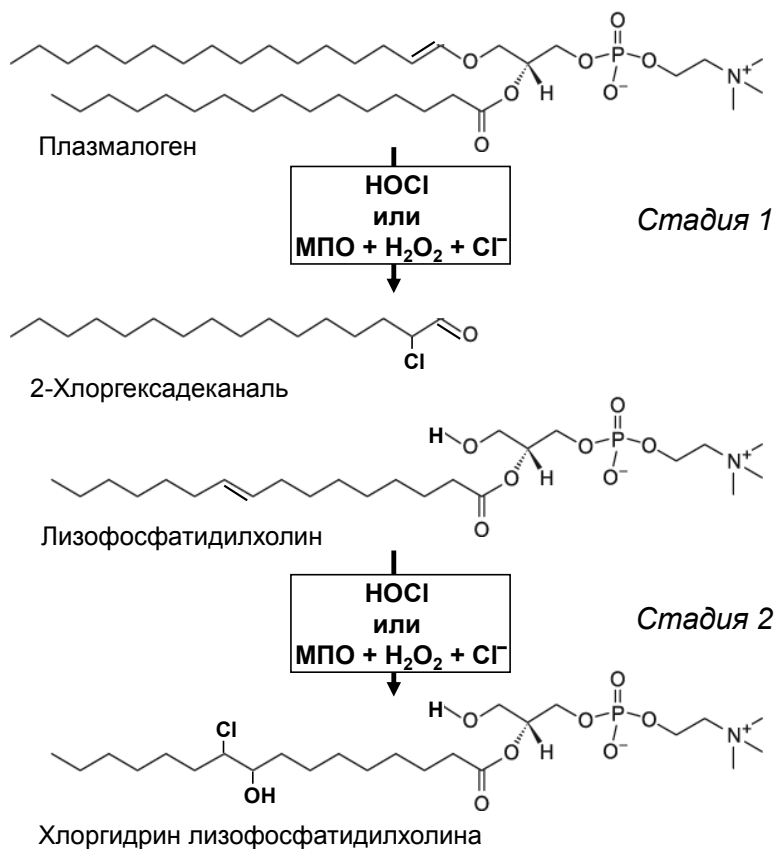


Рис. 3. Схема модификации плазмалогена под действием НОСІ или функционирующей МПО (МПО + H₂O₂ + СІ⁻) (см. текст).

Аналогичный эффект наблюдался и в том случае, если АФГ генерировались системой МПО+H₂O₂+СІ⁻/Вг⁻ или активированными нейтрофилами. В отличие от НОСІ, которая реагировала с алкенил-эфирной связью плазмалогена только при «кислых» рН, НОВг вступала в реакцию и при нейтральных значениях рН. Если СІ⁻ и Вг⁻ присутствовали одновременно в качестве субстрата МПО, то главным продуктом оказывался 2-бромальдегид [51, 85].

Если в реакционной среде одновременно присутствовали плазмалоген и ненасыщенный фосфатидилхолин, реакция шла предпочтительнее с плазмалогеном с образованием лизофосфатидилхолина, а уже потом образовывался хлоргидрин ненасыщенной связи в

ацильной цепи фосфатидилхолина [87]. В случае плазмалогена, содержащего в *sn*-2 положении остаток моновенасыщенной жирной кислоты, на первом этапе образовывались лизофосфатидилхолин и 2-галогенальдегид. И лишь на второй стадии моновенасыщенный лизофосфатидилхолин превращался в его галогенгидрин (см. рис. 3) [86, 87]. Это происходит потому, что HOCl и NOBr значительно быстрее реагируют с алкенилэфирной связью плазмалогена, чем с ненасыщенной связью ацильной цепи фосфолипида [88]. Однако, если в *sn*-2 положении плазмалогена присутствовал остаток полиненасыщенной (докозагексаеновой) кислоты, то под действием HOCl происходило не только образование 2-хлоральдегида, но и последующее отщепление остатка полиненасыщенной кислоты с образованием глицерохолинфосфата [86], вероятно, по механизму, который был описан выше для полиненасыщенного фосфатидилхолина.

Подобные реакции происходили и в ЛНП. Инкубация ЛНП в присутствии $\text{МПО} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^-$ -системы приводила к накоплению в ЛНП 2-хлоргексадеканала и 2-хлороктадеканала, а также хлоргидринов ненасыщенных лизофосфатидилхолинов. В том случае, если ЛНП инкубировали с активированными моноцитами, то содержание 2-хлоральдегидов многократно увеличивалось как в ЛНП, так и в клетках [50].

Полученные результаты позволяют утверждать, что МПО, продуцируя HOCl/NOBr , может имитировать функцию фосфолипазы путем образования хлор- или бромгидринов из полиненасыщенных фосфолипидов с последующим спонтанным гидролизом их сложноэфирной связи до лизофосфолипида. Последний образуется также в результате расщепления алкенилэфирной связи плазмалогена под действием HOCl/NOBr (рис. 3). Методами масс-спектрометрии и ^{31}P -ЯМР было показано, что при инкубации ЛНП в присутствии HOCl увеличивалось содержание лизофосфатидилхолина [89]. Указанные реакции могут иметь важное биологическое значение, поскольку, с одной стороны, известно, что лизофосфатидилхолин содержится в ЛНП в достаточно больших количествах (~50 мкг/мг белка) и его содержание в ЛНП увеличивается при атеросклерозе [90, 91], с другой – лизофосфатидилхолин играет роль регулятора активности тромбоцитов и эндотелиальных клеток, что позволяет именовать его атеротромботической молекулой [92].

Сфингомиелин (~400 мкг/мг белка) – второй по содержанию фосфолипид в ЛНП после фосфатидилхолина (~900 мкг/мг белка) – представляет собой единственный фосфолипид человека, основа которого не включает глицериновый остаток. Сфингомиелин состоит

из аминокспирта сфингозина, к аминогруппе которого присоединена молекула жирной кислоты, а к гидроксильной группе – полярная группа фосфохолина ((I) на рис. 4). Мишенями для АФГ в молекуле сфингомиелина являются двойная связь сфингозина и атом водорода амидной связи. HOCl реагирует со сфингомиелином с константой скорости реакции $18,7 \pm 3,05 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [93], то есть быстрее, чем с ненасыщенными связями ацильных цепей ($0,56 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [94]). Методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии было показано, что HOCl , добавленная как реагент или продуцируемая с участием МПО, трансформировала сфингомиелин в хлор-производные, образующиеся в результате присоединения HOCl по двойной связи сфингозина ((II) на рис. 4) или замещения атома водорода амидной связи на атом хлора ((III) на рис. 4). При действии 2-х молекул HOCl возможно протекание обеих реакций с образованием соединения (IV) (рис. 4). В качестве минорных продуктов были зарегистрированы эпоксид (в результате реакции дегидрохлорирования хлоргидрина; (V) на рис. 4), а также хлор-производное $-\text{CH}=\text{CCl}-$, образующееся при замещении атома водорода двойной связи $-\text{CH}=\text{CH}-$ на атом хлора ((VI) на рис. 4). Следы последних продуктов были зарегистрированы также при действии первичных АФГ на ненасыщенные связи ацильных цепей фосфолипидов [78, 81, 82]. Хлорированные производные сфингомиелина оказывали существенное влияние на клетки, инициировали продукцию ими активных форм кислорода, нарушали трансмембранный потенциал митохондрий, индуцировали апоптоз, повреждали ДНК [93].

В молекуле холестерина единственной вероятной мишенью для гипогалоидных кислот является двойная связь в положении 5,6 стероидного ядра. Методами тонкослойной хроматографии, ЯМР и хроматомасс-спектрометрии было установлено, что добавление HOCl к фосфолипидным липосомам, содержащим холестерин, равно, как и их инкубация в присутствии МПО+ H_2O_2 +СГ-системы, приводили к образованию хлор-производных, главным образом изомеров α - и β -хлоргидринов [95, 96]. Аналогичные продукты образовывались в ЛНП [97], если их обрабатывали HOCl или инкубировали в присутствии МПО+ H_2O_2 +СГ-системы. Каталаза и ловушки HOCl предотвращали образование указанных продуктов, что свидетельствовало о причастности МПО к их возникновению и об участии HOCl в этой реакции [95]. В отличие от хлоргидринов алифатических углеводородных цепей, хлоргидрины холестерина не стойки и в результате дальнейшего дегидрохлорирования превращались в эпоксиды. Гидролиз и дальнейшее окисление α - и β -эпоксидов при-

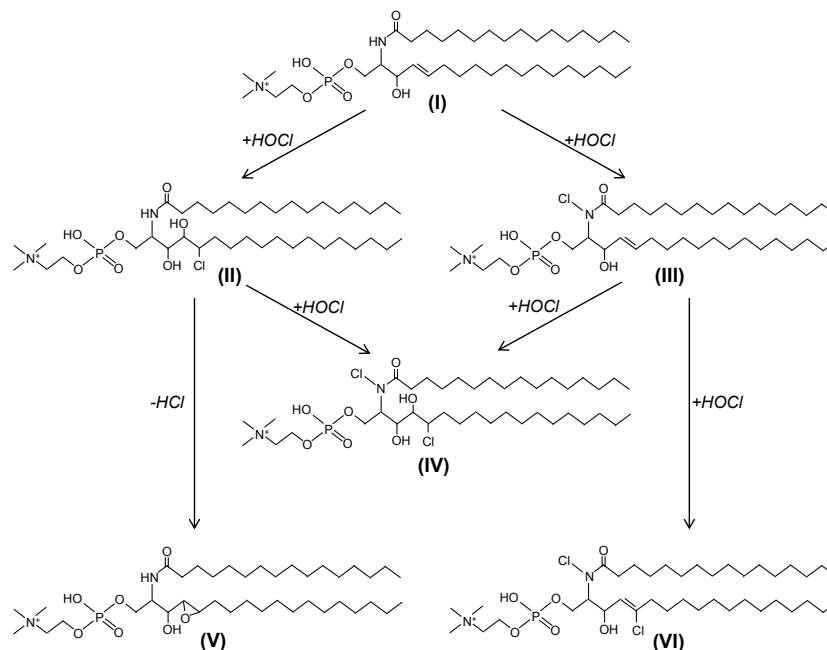


Рис. 4. Схема модификации сфингомиелина под действием HOCl (см. текст).

водили к образованию целого ряда гидроксид- и кето-производных холестерина [98, 99]. Реакция HOBr с двойной связью холестерина протекает аналогично HOCl, но требует меньших количеств HOBr по сравнению с HOCl [100].

Свободнорадикальный механизм модификации ненасыщенных липидов под действием АФГ подробно изложен в обзорах [25, 101]. Мы остановимся здесь лишь на основных результатах, подтверждающих существование такого механизма для ЛНП. Первые работы о перекисном окислении липидов (ПОЛ) в ЛНП под действием АФГ или системы МПО+H₂O₂+Cl⁻ относятся к началу 90-х годов прошлого столетия [102, 103]. Многочисленные последующие исследования показали, что инкубация ЛНП с первичными АФГ или в присутствии системы МПО+H₂O₂+Cl⁻ сопровождалась образованием типичных продуктов, обычно выявляемых при использовании традиционных способов инициирования ПОЛ: первичных молекулярных продуктов – диеновых конъюгатов и гидропероксидов [102, 104]; вторичных продуктов карбонильной природы, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой [101–103, 105–108]; конечных флуоресцирующих в видимой

области света продуктов (типа оснований Шиффа), образующихся при взаимодействии окисленных липидов с белком (см. реакцию (7)) [105, 108]. Перехватчики свободных радикалов – α -токоферол и бутилированный гидрокситолуол в микромолярных концентрациях полностью блокировали АФГ-индуцированное ПОЛ [42, 106], что подтверждает свободнорадикальный механизм этой реакции. Проникая в липидную фазу ЛНП [109], НОСІ вызывала деградацию липидорастворимых антиоксидантов (каротиноидов, α -токоферола) [42, 71, 110], снижая тем самым резистентность ЛНП к ПОЛ [110]. На роль стадии иницирования АФГ-индуцированного ПОЛ может претендовать реакция НОСІ или НОВг с гидропероксидами (константы скорости составляют $10,8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ и $8,9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ для НОСІ и НОВг соответственно [111]), всегда присутствующими в следовых количествах в ненасыщенном липиде [112]; при этом образуются пероксильные и алкоксильные радикалы [111, 113–120]. Повышенный уровень ЛНП, содержащих продукты ПОЛ, неоднократно был обнаружен в крови больных ССЗ [121, 122].

Известно, что некоторые вещества способны усиливать ПОЛ в ЛНП. Так, например, модифицированный под действием НОСІ гемоглобин в ~ 2 раза увеличивал по сравнению с нативным белком накопление продуктов ПОЛ в ЛНП. Увеличение прооксидантной способности гемоглобина при его инкубации с НОСІ связано с разрушением гема и высвобождением ионов Fe^{2+} с последующим их окислением до Fe^{3+} под действием НОСІ [123]. В последней реакции образуется $\cdot\text{ОН}$ -радикал – чрезвычайно эффективный инициатор ПОЛ [124].

Нитрит также усиливал НОСІ-индуцированное ПОЛ в ЛНП [42]. Причина этого заключается в образовании в ходе реакции (2) хлористого нитрила (NO_2Cl), распадающегося на свободные радикалы по реакции (3). Добавление в реакционную смесь перехватчика свободных радикалов – бутилированного гидрокситолуола – значительно ингибировало аккумуляцию продуктов ПОЛ в ЛНП, свидетельствуя о радикальном механизме пероксидации ЛНП в присутствии смеси $\text{НОСІ} + \text{NO}_2^-$ [42]. Смесь $\text{НОСІ} + \text{NO}_2^-$ вызывает в белке образование радикала Туг [44], который образуется также в пероксидазном цикле МПО при окислении Туг Соединениями I и II (см. рис. 2). Туг-радикал – известный инициатор свободнорадикальных реакций ПОЛ в ЛНП [125]. Другая возможность МПО-индуцированного усиления ПОЛ в ЛНП в присутствии нитрита не связана с образованием НОСІ и NO_2Cl , а обусловлена окислением NO_2^- в пероксидазном цикле МПО до радикала $\text{NO}_2\cdot$ [44].

Присутствие в ЛНП NH_2 -групп Lys способствует HOCl -индуцированному ПОЛ. HOCl реагирует с NH_2 -группой Lys с образованием хлорамина Lys, распадающегося по реакции (5) до N-центрированного радикала. Последний инициирует ПОЛ в ЛНП [104]. Похожие реакции протекают и при действии HOCl на NH_2 -группу фосфатидилэтаноламина, в результате которых также образуется N-центрированный радикал, способный усиливать ПОЛ [126].

*Реакции активных форм галогенов
с «полярными головками» фосфолипидов*

«Полярные головки» фосфолипидов в ЛНП в основном представлены холинфосфатом, этаноламинфосфатом и серинфосфатом. Известно, что ни HOCl , ни HOBr не реагируют с заметной скоростью с четвертичным азотом фосфатидилхолина [71, 72, 75, 77, 78, 82, 83, 127, 128]. Напротив, NH_2 -группа этаноламинфосфата и серинфосфата реагирует с HOCl и HOBr с образованием соответственно хлор- и бромаминов довольно быстро (см. табл.). Оказалось, что хлорамины фосфатидилэтаноламина и фосфатидилсерина довольно сильно отличались по своей устойчивости. Это обусловлено присутствием в серинфосфате карбоксильной группы в соседнем положении с NH_2 -группой. Такие хлорамины быстро разлагаются с образованием альдегидов. На рис. 5 приведена схема превращения аминоксигруппы фосфатидилсерина и фосфатидилэтаноламина при взаимодействии с HOCl . NH_2 -группа фосфатидилэтаноламина под действием HOCl сначала превращается в моно-, а потом в дихлорамин [126, 129], который претерпевает гомолитический разрыв $\text{N}-\text{Cl}$ связи с образованием N-центрированного радикала (см. рис. 5) [126]. Такое различие в механизмах превращения хлораминов фосфатидилэтаноламина и фосфатидилсерина послужило поводом выдвинуть гипотезу о регуляции МПО-зависимого ПОЛ ненасыщенных фосфолипидов [126]. Было установлено, что присутствие фосфатидилэтаноламина в липосомах из ненасыщенного фосфатидилхолина способствовало дополнительной аккумуляции продуктов ПОЛ под действием HOCl , благодаря образованию N-центрированного радикала, выполняющего роль инициатора ПОЛ. Включение фосфатидилсерина в липосомы из фосфатидилхолина напротив ингибировало HOCl -индуцированное ПОЛ, поскольку снижало концентрацию HOCl в результате ее взаимодействия с аминоксигруппой. При этом образовывались только молекулярные продукты, не способные инициировать реакции ПОЛ (см. рис. 5 и [126]).

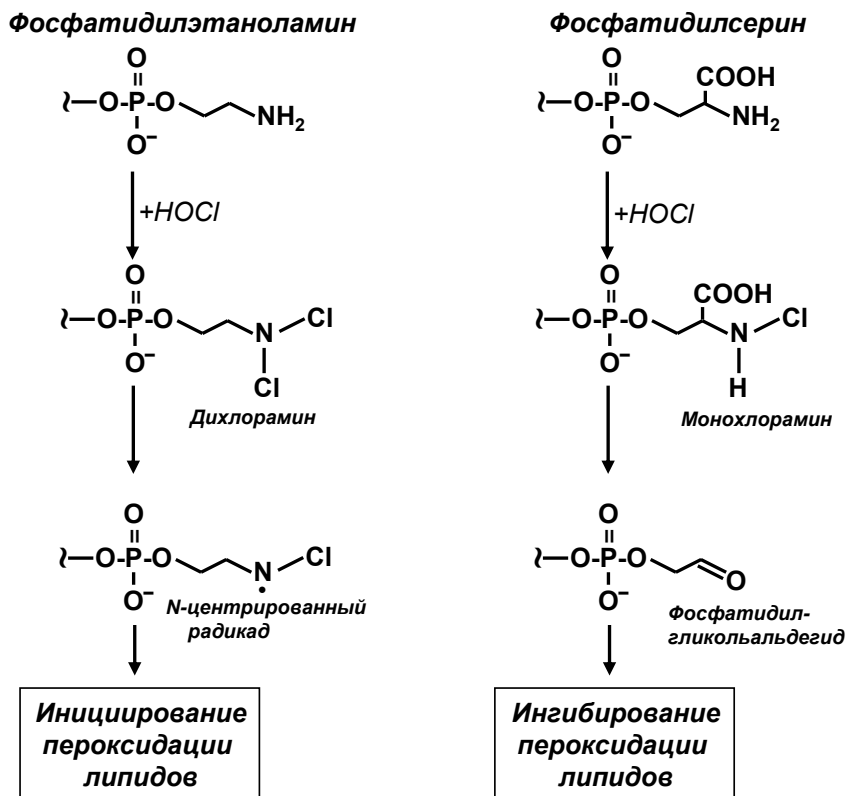


Рис. 5. Схема модификации фосфатидилэтаноламина и фосфатидилсерина под действием HOCl, образующейся при МПО-катализе (см. текст).

При действии HOCl или HOBr на ненасыщенный фосфатидилэтаноламин атаке подвергались как NH_2 -группа «полярной головки», так и $-\text{CH}=\text{CH}-$ связи ацильных цепей. Разница состояла только в том, что в реакцию с HOCl в первую очередь вступала NH_2 -группа, и только после того, как все амины превращались в дихлорамины, как это показано на рис. 5, начинали образовываться хлоргидрины [130]. Это обусловлено большой разницей (в 3–4 порядка) в константах скорости реакций HOCl с NH_2 -группой и ненасыщенной $-\text{HC}=\text{CH}-$ связью фосфатидилэтаноламина (см. табл. и [58]). При действии HOBr на ненасыщенный фосфатидилэтаноламин бромамины и бромгидрины начинали регистрироваться практически одновременно [130]. Это и понятно, поскольку разница в константах скоростей указанных реакций незначительна (см. табл. и [59]).

МОДИФИКАЦИЯ УГЛЕВОДОВ

Углеводы содержатся в ЛНП в составе гликолипидов и апоВ-100, являющегося гликопротеином. В апоВ-100 присутствуют N-ацетилглюкозамин, галактоза, манноза и сиаловая кислота в мольном соотношении примерно 4:2:5:2 [131]. Гликоконъюгаты, связанные с апоВ-100, представлены двумя основными типами цепей: биантенными сиалированными и высокоманнозными, содержащими также N-ацетилглюкозамин. По расчетам авторов работы [132], молекула апоВ-100 содержит 5–6 высокоманнозных и 8–10 сиалированных конъюгатов, связанных с белком через остатки Asn. Углеводный состав липидной фракции ЛНП отличается от состава сахаров, связанных с белком. Так гликолипиды ЛНП не содержат маннозу, но в их состав входит глюкоза и N-ацетилгалактозамин [131].

Известно, что первичные АФГ либо вообще не реагируют с сахарами, не содержащими азот, например, с рибозой, глюкозой, глюкуроновой кислотой, либо реагируют крайне медленно [133, 134]. В то же время, они с заметной скоростью вступают в реакции с N-ацетилированными аминами [41, 134]. В таком случае реальной мишенью для АФГ в апоВ-100 и гликолипидах ЛНП могут быть N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин, сиаловые кислоты. Было установлено, что на первом этапе атом водорода N-ацетамидной группы замещается на атом галогена с образованием хлор- или бромамида. На рис. 6 в качестве примера приведена схема превращений N-ацетилированного амина при действии HOCl . Образующийся хлорамид медленно гидролизует до монохлорамина и ацетата (путь 1 на рис. 6) [135] или в результате гомолитического разрыва $\text{N}-\text{Cl}$ связи превращается в N-центрированный амидил-радикал (путь 2 на рис. 6) [136, 137]. Как уже было сказано ранее (см. путь 1 на рис. 6 и реакцию (3)), $\text{N}-\text{Cl}$ связь в монохлорамине также претерпевает гомолитический разрыв с образованием N-центрированного радикала. Далее оба N-центрированных радикала способны изомеризоваться в C-центрированные, локализованные как на C-атоме во 2-м положении кольца, так и на C-атоме соседнего кольца, что ведет к фрагментации кольца и полисахаридной цепи в целом [135–137]. Подобные реакции наблюдали также при действии NOBr на гликозаминогликаны [138]. Ионы металлов переменной валентности способствуют гомолитическому разрыву $\text{N}-\text{Cl}$ связи [137, 138]. Присутствие супероксидного анион-радикала существенно ускоряет этот разрыв, вероятно, за счет восстановления ионов металлов переменной валентности [139, 140].

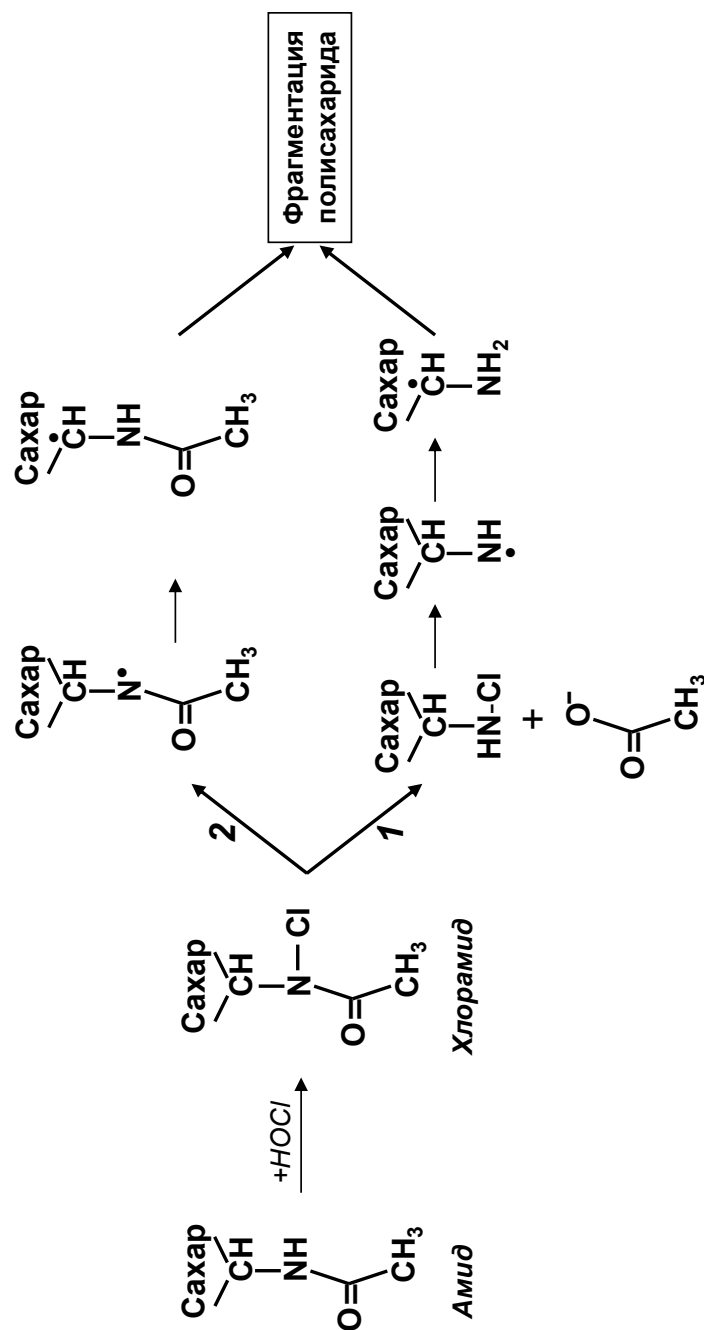


Рис. 6. Схема превращений N-ацетилированного аминосахара при действии HOCl (см. текст).

Существует гипотеза, согласно которой десиалирование ЛНП трансформирует их в проатерогенную форму [141, 142]. Такие ЛНП интенсивно захватываются субэндотелиальными клетками, превращая их в пенистые клетки [20]. Десиалированные ЛНП были выделены из крови больных атеросклерозом [20, 141]. Авторы гипотезы предполагают, что десиалирование ЛНП осуществляется в крови под действием фермента транс-сиалидазы [143]. Описанные в этом разделе результаты позволяют предположить, что, по крайней мере, частично отщепление гликоконъюгатов от ЛНП может происходить и под действием АФГ, образующихся при участии МПО.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ ГАЛОГЕНОВ С АНТИОКСИДАНТАМИ

В состав ЛНП входит множество липидорастворимых антиоксидантов. На 1 моль ЛНП в среднем приходится 6,37 и 0,93 моля α - и γ -токоферола соответственно, 0,1 моля убихинола-10 (восстановленного коэнзима Q_{10}), а также каротиноидов: β -каротина (0,53 моля), α -каротина (0,22 моля), ликопина (0,29 моля), криптоксантина (0,25 моля) и следовые количества лютеина, ангидролютеина, зеаксантина, кантаксантина [110, 144]. При действии $HOCl$ на ЛНП в той или иной степени разрушаются все антиоксиданты. Быстрее других исчезает убихинол-10, несколько медленнее ликопин, затем α -токоферол и β -каротин [145]. Сравнение каротиноидов (цис- и транс-ликопин, α - и β -каротин) и их окси-производных (зеаксантин, α - и β -криптоксантин, цис- и транс-ангидролютеин, лютеин) показало, что в составе ЛНП первые являются более эффективными перехватчиками $HOCl$. Снижение содержания этих каротиноидов в ЛНП на 25% происходило, когда на одну частицу ЛНП приходилось 36–52 молекул $HOCl$ [110]. Однако, учитывая количество молекул антиоксидантов, приходящихся на 1 частицу ЛНП, оказалось, что для 50%-ного окисления α -токоферола требовался ~125-кратный, убихинола-10 и ликопина ~2000-кратный, а β -каротина ~2500-кратный избыток $HOCl$. Константы скорости второго порядка реакций $HOCl$ с тролоксом (водорастворимым аналогом α -токоферола), убихинолом-0 (аналогом убихинола-10) и β -каротином значительно уступают таковым для реакций $HOCl$ с функциональными группами некоторых аминокислотных остатков (табл. и [55, 58, 146]).

Нитрит усиливает деградацию α -токоферола и β -каротина в ЛНП под действием $HOCl$ [42]. Это обусловлено реакциями (2) и (3), в которых образуются радикалы $\cdot NO_2$ и $Cl\cdot$, реагирующие с α -токоферолом и β -каротином в ЛНП быстрее, чем $HOCl$ [42].

Константы скорости аналогичных реакций НОВг с тролоксом и убихинолом-0 оказались соответственно в ~50 и ~2000 раз больше, чем с НОСІ [59]. Но и в этом случае проведенные расчеты показали, что даже при мольном избытке НОВг:ЛНП = 2000 только 0,4% НОВг реагирует с антиоксидантами, остальная НОВг – с липидами (56,6%) и белком (43,0%) [59]. Из этого следует, что антиоксиданты вряд ли являются основной мишенью для АФГ. Это подтверждают результаты работы [147], в которой было показано, что ~8-кратное обогащение или ~6-кратное обеднение ЛНП по α -токоферолу не влияет на модификацию остатков Trp и Lys в апоВ-100 под действием НОСІ.

IV. МОДИФИКАЦИЯ СТРУКТУРЫ ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ АКТИВНЫХ ФОРМ ГАЛОГЕНОВ

Разнообразие реакций АФГ с функциональными группами апоВ-100, липидов, антиоксидантов и углеводов, представленное в главе III, не может не сопровождаться изменением физико-химических свойств и структурной организации частицы ЛНП. Для оценки изменения физико-химических свойств фосфолипидного поверхностного моно-слоя ЛНП были использованы спин-меченные аналоги стеариновой кислоты с парамагнитным фрагментом у 5-го, 12-го и 16-го С-атомов. Такой набор зондов давал возможность получать информацию о физико-химических свойствах липидной фазы на различном удалении от поверхности частицы ЛНП. Добавление НОСІ к ЛНП приводило, с одной стороны, к уменьшению подвижности, а с другой – к увеличению полярности микроокружения жирнокислотных цепей фосфолипидов вплоть до 12-й CH_2 -группы (до глубины ~1,7 нм от поверхности частицы ЛНП). Заметные изменения в более глубоких областях (в районе 16-й CH_2 -группы) начинали проявляться лишь при концентрации НОСІ выше 1 мМ [148].

НОСІ-индуцированное изменение структуры апоВ-100 было исследовано с использованием спиновой метки, 3-малеимидопроксила, ковалентно связывающейся с SH-группами белка. Спектр ЭПР ЛНП, меченных этой меткой, представлял собой суперпозицию двух сигналов: широкого и узкого, обусловленных соответственно сильно и слабо иммобилизованной на белке меткой. Это свидетельствует о наличии в ЛНП двух популяций SH-групп, обладающих большей и меньшей подвижностью. НОСІ приводила к снижению доли сигнала от сильно иммобилизованной спиновой метки и возрастанию доли сигнала от метки, слабо связанной с белком. Оба указанных факта

свидетельствуют об увеличении под действием НОСІ подвижности сайтов апоВ-100, с которыми связана метка [149].

Известно, что частицы ЛНП имеют отрицательный поверхностный потенциал, равный $-16-17$ мВ [150, 151]. Неоднократно методами электрофореза, а также ЭПР с использованием парамагнитных катионов Mn^{2+} было показано, что действие первичных АФГ на ЛНП приводило к увеличению их отрицательного поверхностного заряда и электрофоретической подвижности [145, 147, 151]. Главным образом это могло быть обусловлено трансформацией положительно заряженных аминокислотных остатков Lys, His и Arg [55, 56], а также NH_2 -групп этаноламинфосфата и серинфосфата фосфолипидов, расположенных на поверхности частицы ЛНП [58, 59], в галогенамины или другие нейтральные продукты. Нарушение распределения локальных зарядов на поверхности ЛНП может способствовать их агрегации. В экспериментах *in vitro* неоднократно было показано, что инкубация ЛНП с НОСІ или в присутствии системы $MPO+H_2O_2+Cl^-$ сопровождалась увеличением среднего размера частиц ЛНП [152, 153]. Модифицированные таким образом ЛНП (ЛНП-СІ) вызывали накопление холестерина в культивируемых гладкомышечных клетках из неповрежденной атеросклерозом интимы аорты человека [153]. Интересно, что накопление липидов в клетках, как правило, возрастало с увеличением среднего размера частиц ЛНП [17, 20, 142]. Подобные сферические липидные включения диаметром 100–400 нм были неоднократно обнаружены в пораженной атеросклерозом артериальной интима [154, 155].

В главе III были рассмотрены три потенциальных механизма образования межмолекулярных сшивок в апоВ-100 с участием МПО, которые могут явиться причиной агрегации частиц ЛНП. Hazell с соавт. показали [60], что агрегация ЛНП крови человека, вызванная НОСІ или системой $MPO+H_2O_2+Cl^-$, сопровождалась приростом содержания карбонильных соединений и одновременным исчезновением остатков Lys. Все эффекты исчезали, если ЛНП предварительно подвергались восстановительному метилированию, которое блокирует аминогруппы Lys в апоВ-100. Так, было установлено, что агрегация ЛНП происходила согласно первому механизму (см. реакции (4), (6) и (7) в главе III) через хлорамины остатков Lys, превращения их в альдегиды с последующим образованием межмолекулярных сшивок типа оснований Шиффа.

При исследовании влияния НОСІ на ЛНП крови человека были обнаружены высокомолекулярные комплексы белков, которые оказались устойчивыми к нагреванию в присутствии додецилсульфата

натрия и 1,4-дителиотреитола, что свидетельствовало о существовании ковалентных, но не дисульфидных сшивок, вероятнее всего, по первому механизму (см. главу III). Увеличение концентрации HOCl сопровождалось увеличением ди-Туг (третий механизм, глава III). Однако зарегистрированное количество ди-Туг было не достаточно для того, чтобы объяснить существование всех имеющихся межмолекулярных сшивок в ЛНП [156].

Потенциальная возможность образования внутри- и межмолекулярных S–S и S–N сшивок в ЛНП по второму механизму (см. схему (8) в главе III) была продемонстрирована на примере синтетических пептидов, содержащих Cys и Lys [66]. В результате инкубации таких пептидов с HOCl удалось зарегистрировать внутри- и межмолекулярный сульфенамид, образующийся согласно схеме (8), который далее последовательно окислялся до сульфинамида и сульфонамида. Таким образом, регистрируемые S–N сшивки возникали в результате HOCl -опосредованного взаимодействия между SH-группой Cys и аминок группой Lys. Среди продуктов реакции обнаруживались и дисульфиды, возникающие в результате реакции сульфенилхлорида с SH-группой Cys (см. схему (8) в главе III) [66].

Таким образом, АФГ, образованные с участием МПО, модифицируют физико-химические свойства и структурную организацию поверхностного протеолипидного слоя частиц ЛНП, стимулируя их агрегацию и трансформацию в проатерогенную форму.

V. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ С ЛИПОПРОТЕИНАМИ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ

Учитывая, что МПО является ярко выраженным поликатионом ($pI \sim 10$), а поверхность ЛНП в целом заряжена отрицательно [150, 157], априори можно предположить, что они могут взаимодействовать между собой. Впервые взаимодействие МПО и ЛНП было показано с помощью их соосаждения фосфовольфрамом, а также при изучении электрофоретической подвижности МПО и ЛНП [158]. В связи с тем, что взаимодействию препятствовало присутствие катионного детергента цетримида, а также повышение концентрации NaCl до 0,3 М или понижение pH до 3,6, нами было высказано предположение о его электростатической природе [159]. Методами электрофореза, гель-фильтрации и фотонной корреляционной спектроскопии было установлено, что МПО связывается с поверхностью ЛНП и липопротеинов очень низкой плотности (ЛОНП), образуя комплексы со средним диаметром $28,0 \pm 1,9$ и $85,9 \pm 8,9$ нм соответственно [160].

Использование спин-меченных производных жирных кислот, встраивающихся в фосфолипидный монослой ЛНП с локализацией парамагнитного центра на разном удалении от поверхности, позволило установить, что взаимодействие МПО с ЛНП не оказывает существенного влияния на параметры спектров ЭПР зондов, свидетельствуя об отсутствии участия липидов в образовании контактов между МПО и ЛНП. Исследование распределения парамагнитных катионов Mn^{2+} между поверхностью частиц ЛНП и водным окружением показало, что взаимодействие МПО с ЛНП не приводит к значительному изменению отрицательного поверхностного заряда ЛНП. Это предполагает, что зона контакта между МПО и ЛНП крайне мала и не затрагивает фосфолипиды – основные носители заряженных групп на поверхности ЛНП [159].

Интересно, что МПО не взаимодействовала с липопротеинами высокой плотности (ЛВП). Поскольку ЛНП и ЛОНП отличаются от ЛВП содержанием на своей поверхности апоВ-100, мы предположили, что МПО связывается именно с этим белком. Данное предположение подтверждал тот факт, что антитела против апоВ-100 вытесняли МПО из комплекса с ЛНП или ЛОНП [160]. Анализ первичной структуры апоВ-100 с выбором участков, не содержащих катионных аминокислотных остатков, но обогащенных анионными аминокислотами, которые могли бы претендовать на потенциальные сайты связывания МПО, привел к выявлению трех пептидов: ${}^1EEEEMLEN^7$, ${}^{53}VELEVPQ^{59}$ и ${}^{445}EQIQDDCTGDED^{456}$. Методом электрофореза было показано, что только пептид ${}^{445}EQIQDDCTGDED^{456}$ разобщал комплекс МПО-ЛНП, претендуя на роль сайта связывания МПО с апоВ-100 на поверхности ЛНП. Исследования, проведенные методом гель-фильтрации, показали, что данный пептид специфически взаимодействует с МПО, то есть пептид разобщает комплекс МПО-ЛНП за счет связывания с МПО, а не с ЛНП [159].

Ассоциация МПО с поверхностью ЛНП сопровождается повышением активности фермента [63], что способствует модификации поверхности ЛНП образующимися при МПО-катализе АФГ. Такая модификация ЛНП снижает аффинность апоВ-100 к В,Е-рецептору клеток и увеличивает сродство к скавенджер-рецепторам. Модифицированные ЛНП захватываются моноцитами-макрофагами, что приводит к прогрессивному накоплению внутриклеточного холестерина и его эфиров и трансформации клеток в пенистые [161].

С МПО также взаимодействует белок плазмы крови, церулоплазмин (ЦП), ингибируя при этом пероксидазную и галогенирующую

активности МПО [162–164]. Оказалось, что ЦП не теряет способности связываться с МПО и ингибировать ее активность, когда фермент ассоциирован с поверхностью ЛНП. При этом образуются тройные комплексы ЦП–МПО–ЛНП(ЛОНП) [160]. Нам удалось показать, что при использовании пептида $^{445}\text{EQIQDDCTGDED}^{456}$, разобщающего взаимодействие МПО с ЛНП, а также физиологических модуляторов галогенирующей активности МПО, тиоцианата и ЦП, снижалось накопление холестерина моноцитами-макрофагами в присутствии ЛНП-С1, а также ЛНП, модифицированных NOBr (ЛНП-Br) [161].

На основании полученных данных можно предложить обобщенную схему участия МПО, АФГ, а также пептида $^{445}\text{EQIQDDCTGDED}^{456}$ и ингибиторов/модуляторов галогенирующей активности (ЦП и тиоцианата) в проатерогенной модификации ЛНП, активации моноцитов и формировании пенистых клеток (см. рис. 7). Связывание МПО с ЛНП приводит к их сайт-специфической модификации (1 на рис. 7). ЛНП-С1 (ЛНП-Br) являются стимулом для лейкоцитов (2 на рис. 7), провоцируя респираторный взрыв и экзоцитоз МПО нейтрофилами и моноцитами (3 на рис. 7, указано в случае моноцитов). Секретируемая МПО связывается с ЛНП и усиливает их повреждение, замыкая тем самым «порочный круг» образования ЛНП-С1 (ЛНП-Br). Последние в комплексе с МПО захватываются моноцитами/макрофагами, приводя к накоплению в них холестерина и трансформации их в пенистые клетки (4 на рис. 7). Ингибиторы/модуляторы галогенирующей активности МПО (ЦП и тиоцианат), как и разобщитель комплекса ЛНП–МПО ($^{445}\text{EQIQDDCTGDED}^{456}$) препятствуют окислительной/галогенирующей модификации ЛНП, что, с одной стороны, уменьшает их захват клетками и снижает аккумуляцию внутриклеточного холестерина (5 на рис. 7), с другой, размыкает «порочный круг» активации моноцитов (нейтрофилов) и образования ЛНП-С1 (ЛНП-Br) (6 на рис. 7).

Эти результаты дают возможность внести важное дополнение в схему рис. 1 (см. главу I), описывающую роль м-ЛНП в формировании атеросклеротической бляшки. Связывание МПО с ЛНП и проатерогенная модификация их поверхности начинают реализовываться уже в кровотоке. Далее после миграции комплекса МПО–ЛНП в суб-эндотелиальное пространство трансформация ЛНП в проатерогенную форму усугубляется. Эту гипотезу подтверждает факт обнаружения нами комплексов апоВ-100-содержащих липопротеинов с МПО в крови больных атеросклерозом [160].

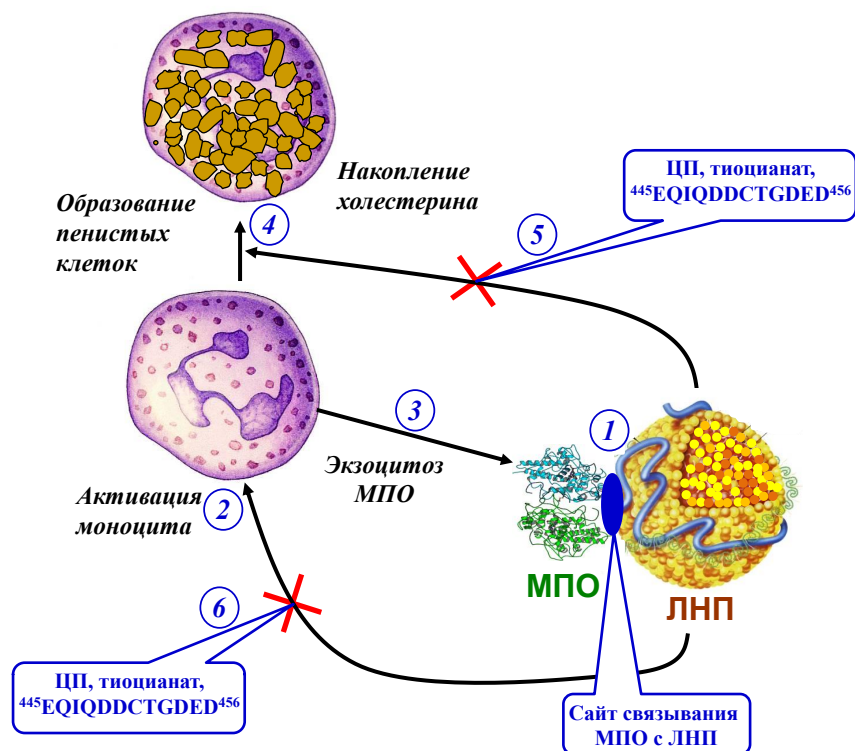


Рис. 7. Обобщенная схема участия МПО, пептида $^{445}\text{EQIQDDCTGDED}^{456}$, разобщающего ее связывание с ЛНП, и ингибиторов/модуляторов галогенирующей активности (ЦП и тиоцианата) в проатерогенной модификации ЛНП, активации моноцитов и формировании пенистых клеток (см. текст).

VI. БИОМАРКЕРЫ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ И ГАЛОГЕНИРУЮЩЕГО СТРЕССА ПРИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Проведенные в последние годы эпидемиологические исследования показали, что высокая концентрация МПО в крови человека ассоциирована с повышенным риском ССЗ независимо от классических факторов риска таких, как тропонин-Т, С-реактивный белок и др. (см. обзоры [23, 165]). Действительно, у таких больных повышение концентрации или активности МПО неоднократно регистрировалось в плазме или сыворотке крови [166–168], лейкоцитах [166], атеросклеротической

бляшке [169], а также в составе комплексов с апоВ-100-содержащими ЛНП и ЛОНП [160]. Увеличение концентрации и/или активности МПО, как правило, сопровождалось накоплением в крови и тканях ее специфических биомаркеров.

Идеальным биомаркером МПО-индуцированной модификации белка является 3-хлортирозин. Этот продукт образуется в организме при взаимодействии НОС1 с Туг, обладает высокой стабильностью и может быть выявлен различными сочетаниями методов хроматографии, масс-спектрометрии, ЯМР и др. Повышенный уровень 3-хлортирозина был зарегистрирован в плазме крови человека при инфаркте миокарда [170, 171], в атеросклеротической бляшке и выделенных из нее ЛНП [172, 173], в ЛВП [174, 175] и изолированном из них и аорты аполипопротеине А-I при ССЗ [176], в гомогенате сердечной ткани при мерцательной аритмии [177]. Важно отметить, что регистрируемый уровень 3-хлортирозина, как правило, коррелировал с количеством МПО [170, 171] в изучаемом объекте, а также не редко – с выраженностью заболевания [176].

Белки, модифицированные НОС1/НОВг, могут быть обнаружены иммуноферментным методом с использованием моноклональных антител. Такие антитела не связываются с модифицированным альдегидами или ионами Cu^{2+} белком, который, как правило, появляется при окислительном стрессе, но очень специфичны и чувствительны к АФГ-модифицированным эпитопам [178]. АФГ-модифицированные белки были обнаружены в атеросклеротической бляшке аорты [179] и участках подвздошной артерии, пораженных атеросклерозом [180]. В последнем случае уровень АФГ-модифицированного белка коррелировал с содержанием МПО и апоВ-100 в сосуде и степенью его поражения [180].

Специфическим маркером повреждения липидов при галогенирующем стрессе являются хлор- и бромгидрины алифатических цепей липидов. Эти соединения очень стабильны и могут накапливаться в организме в весьма ощутимых количествах, поскольку концентрация ненасыщенных связей алифатических цепей *in vivo* высока. Недостатком этих биомаркеров является сравнительно низкая скорость их образования (табл.). Используя метод жидкостной хроматографии–масс-спектрометрии (LC-MS), авторам работы [181] впервые удалось после инкубации ЛНП с НОС1 зарегистрировать образование в фосфолипидной фракции ЛНП хлоргидринов (но не гидропероксидов) олеиновой, линолевой и арахидоновой кислот. Messner с соавт. на модели эндотелиальных клеток артерии человека после их обработки НОС1 методом ESI-MS показали образование хлоргидринов

лизофосфатидилхолина [87]. Позднее эти же авторы обнаружили в атеросклеротической бляшке человека 60-кратное увеличение содержания хлоргидрина лизофосфатидилхолина по сравнению с непораженной атеросклерозом тканью [182]. Использование моноклональных антител против хлоргидринов олеиновой кислоты, описанных в работе [183], представляет собой альтернативный подход для обнаружения повреждения ткани, инициированного АФГ, образовавшимися в МПО-зависимых реакциях.

Еще одним важным маркером АФГ-индуцированного повреждения липидов являются алифатические 2-хлоральдегиды, образующиеся в реакции НОС1 с плазмалогеном (см. рис. 3). Эти соединения не обладают высокой стабильностью, но их очень низкие концентрации могут быть обнаружены чувствительным методом хроматомасс-спектрометрии. 2-Хлоргексадеканаль накапливался в сердце крысы при экспериментальном инфаркте миокарда [184]. В атеросклеротической бляшке аорты человека было зарегистрировано более чем 1400-кратное увеличение 2-хлоргексадеканаля по сравнению с аортой здоровых доноров [91]. Параллельно с 2-хлоральдегидом в результате разрыва двойной связи плазмалогена (рис. 3) образуется лизофосфатидилхолин, 20- и 34-кратное увеличение которого (для лизофосфатидилхолина с арахидоновой и линолевой кислотами соответственно) также удалось зарегистрировать в атеросклеротической бляшке по сравнению с непораженными участками аорты [91].

Роль маркера МПО-зависимой галогенирующей деструкции нуклеотидов и нуклеиновых кислот могут выполнять галоген-производные пуриновых и пиримидиновых оснований. Так, авторы работы [185] обнаружили в участках аорты человека, пораженных атеросклерозом, 10-кратное по сравнению с непораженными участками увеличение уровня 5-хлорурацила, который образуется в организме по МПО-зависимому пути. Количество 5-бромурацила также было выше в атеросклеротической бляшке по сравнению с непораженными участками аорты, но это отличие не было статистически достоверным [185].

Недавно нами были получены специфические антитела против галогенированных ЛНП (ЛНП-Cl и ЛНП-Br) и хлорированного ЦП (ЦП-Cl) [186, 187]. Усовершенствованный метод ИФА с использованием этих антител позволил обнаружить в крови больных ССЗ ЛНП-Cl, ЛНП-Br, а также ЦП-Cl. Интересно, что содержание ЛНП-Cl, ЛНП-Br и ЦП-Cl в крови больных хорошо коррелировало с уровнем МПО, установленным методом ИФА, а также с ее галогенирующей активностью ($r \sim 0,80$). ЛНП-Cl и ЛНП-Br демонстрировали высокий

уровень положительной корреляционной связи между собой ($r=0,91$; $p<0,0001$) и не были связаны ни с пероксидазной активностью плазмы, ни с пероксидазной активностью МПО [186]. Полученные результаты подтверждают важную роль галогенирующего стресса в атерогенной модификации ЛНП. Галогенированные ЛНП и ЦП могут быть использованы в качестве потенциальных биомаркеров галогенирующего стресса при ССЗ.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные в обзоре результаты свидетельствуют о важной роли галогенирующего стресса в атерогенной модификации ЛНП, ключевым звеном которой является сайт-специфичное связывание МПО с поверхностью ЛНП. Ингибирование МПО или разобщение комплекса МПО-ЛНП предотвращает МПО-зависимую модификацию ЛНП, накопление холестерина в клетках сосудов и развитие ранних стадий атеросклероза. Становится очевидным, что одной из важнейших задач, направленных на предупреждение и замедление атеросклероза, может быть разработка средств и подходов, обеспечивающих снижение МПО-зависимой продукции АФГ. Для этого просматриваются, как минимум, три возможности. Первая – это поиск способов, ограничивающих экзоцитоз МПО при активации и дегрануляции нейтрофилов, как это было показано, например, для глюкокортикоидов – α -метилпреднизолона и гидрокортизона [188]. Вторая – это ингибирование галогенирующей активности МПО, например, под действием ЦП [163, 164] или переключение фермента на пероксидазный цикл путем изменения pH среды [189]. Третья – перехват и нейтрализация уже образовавшихся АФГ. Еще одна возможность предотвратить или замедлить атеросклероз – поиск эффективных, нетоксичных разобщителей комплекса МПО-ЛНП наподобие пептида $^{445}\text{EQIQDDCTGDED}^{456}$, имитирующего сайт связывания МПО с апоВ-100 на поверхности ЛНП. Важным представляется выявление новых специфичных, чувствительных и информативных биомаркеров МПО и галогенирующего стресса, которые могли бы послужить основой для создания современных методов ранней диагностики риска атеросклероза и ССЗ. Выяснение всех этих вопросов позволит в перспективе разработать принципиально новые подходы и методы, направленные на профилактику, диагностику и своевременное предупреждение галогенирующего стресса, а значит и атеросклероза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Климов, А.Н., Никульчева Н.Г. (1999) Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. СПб.: Питер, 512 с.
2. Аничков Н.Н. (1965) Основные теоретические положения к дальнейшему изучению проблемы атеросклероза. Атеросклероз. Л.: Мед., 14–21.
3. Gofman, J.W., Glazier, F., Tamplin, A., Strisowe, B., De Lalla, O. (1954) Lipoproteins, coronary heart disease, and atherosclerosis, *Physiological Reviews*, **34**(3), 589–607.
4. De Lalla, O.F., Gofman, J.W. (1954) Ultracentrifugal analysis of serum lipoproteins, *Methods of Biochemical Analysis*, **1**, 459–478.
5. Tada, H., Kawashiri, M.A., Nohara, A., Inazu, A., Mabuchi, H., Yamagishi, M. (2017) Impact of clinical signs and genetic diagnosis of familial hypercholesterolaemia on the prevalence of coronary artery disease in patients with severe hypercholesterolaemia, *European Heart Journal*, **38**, 1573–1579.
6. Carew, T.E. (1989) Role of biologically modified low-density lipoprotein in atherosclerosis. *American Journal of Cardiology*, **64**(13), 18G–22G.
7. Aviram, M. (1993) Modified forms of low density lipoprotein and atherosclerosis, *Atherosclerosis*, **98**, 1–9.
8. Brown, M.S., Goldstein, J.L. (1976) Receptor-mediated control of cholesterol metabolism, *Science*, **191**, 150–154.
9. Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Basu, S.K., Brown, M.S. (1979) Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low-density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **76**, 333–337.
10. Fogelman, A.M., Schechter, J.S., Hokom, M., Child, J.S., Edwards, P.A. (1980) Malondialdehyde alteration of low-density lipoprotein leads to cholesterol accumulation in human monocyte-macrophages, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **77**, 2214–2218.
11. Panasenko, O.M., Azizova, O.A., Vladimirov, Yu.A. (1992) Peroxidation of blood lipoproteins and the development of atherosclerosis, *Soviet Medical Reviews. Section B. Physicochemical Aspects of Medicine Reviews*, **3**, 1–74.
12. Steinbrecher, U.P., Zhang, H., Lougheed, M. (1990) Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis, *Free Radical Biology and Medicine*, **9**, 155–168.
13. Панасенко О.М., Аксенов Д.В., Мельниченко А.А., Супрун И.В., Янушевская Е.В., Власик Т.Н., Собенин И.А., Орехов А.Н. (2005) Протеолиз апопротеида В-100 нарушает его топографию на поверхности ЛПНП, снижая их устойчивость к ассоциации, *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, **140**, 530–534.
14. Piha, M., Lindstedt, L., Kovanen, P.T. (1995) Fusion of proteolyzed low-density lipoprotein in the fluid phase: a novel mechanism generating atherogenic lipoprotein particles, *Biochemistry*, **34**, 10120–10129.
15. Аксенов Д.В., Мельниченко А.А., Супрун И.В., Янушевская Е.В., Власик Т.Н., Собенин И.А., Панасенко О.М., Орехов А.Н. (2005) Гидролиз фосфолипидов фосфолипазами А₂ и С нарушает конформацию аполипопротеина В-100 на поверхности липопротеидов низкой плотности, снижая их устойчивость к ассоциации, *Бюллетень*

- экспериментальной биологии и медицины, **140**, 418–422.
16. Мельниченко А.А., Тертов В.В., Иванова О.А., Аксенов Д.В., Собенин И.А., Попов Е.В., Каплун В.В., Супрун И.В., Панасенко О.М., Орехов А.Н. (2005) Десалирование снижает устойчивость апо-В-содержащих липопротеидов к ассоциации, повышая их атерогенный потенциал, *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, **140**, 60–64.
 17. Панасенко О.М., Тертов В.В., Мельниченко А.А., Аксенов Д.В., Собенин И.А., Каплун В.В., Супрун И.В., Орехов А.Н. (2006) Связь размера дегликозилированных различными ферментами апо-В-содержащих липопротеинов с их атерогенным потенциалом, *Биологические мембраны*, **23**, 225–234.
 18. Turk, Z., Skrabalo, Z. (1987) The cell-interactive properties of glucosylated very-low-density and low-density lipoproteins, *Cellular and Molecular Biology*, **33**, 345–354.
 19. Avogaro, P., Bon, G.B., Cazzolato G. (1988) Presence of a modified low density lipoprotein in humans, *Arteriosclerosis*, **8**, 79–87.
 20. Tertov, V.V., Sobenin, I.A., Gabbasov, Z.A., Popov, E.G., Jaakkola, O., Solakivi, T., Nikkari, T., Smirnov, V.N., Orekhov, A.N. (1992) Multiple-modified desialylated low density lipoproteins that cause intracellular lipid accumulation. Isolation, fractionation and characterization, *Laboratory Investigation*, **67**, 665–675.
 21. Austin, M.A., Breslow, J.L., Hennekens, C.H., Buring, J.E., Willett, W.C., Krauss, R.M. (1988) Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction, *JAMA-Journal of the American Medical Association*, **260**, 1917–1921.
 22. Daugherty, A., Dunn, J.L., Rateri, D.L., Heinecke, J.W. (1994) Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions, *Journal of Clinical Investigation*, **94**, 437–444.
 23. Schindhelm, R.K., van der Zwan, L.P., Teerlink, T., Scheffer, P.G. (2009) Myeloperoxidase: a useful biomarker for cardiovascular disease risk stratification? *Clinical Chemistry*, **55**, 1462–1470.
 24. Klebanoff, S.J. (2005) Myeloperoxidase: friend and foe, *Journal of Leukocyte Biology*, **77**, 598–625.
 25. Панасенко О.М., Горудко И.В., Соколов А.В. (2013) Хлорноватистая кислота как предшественник свободных радикалов в живых системах, *Успехи биологической химии*, **53**, 195–244.
 26. Панасенко О.М., Сергиенко В.И. (2010) Галогенирующий стресс и его биомаркеры. *Вестник Российской АМН*, № **1**, 27–39.
 27. Sies, H. (1991) Role of reactive oxygen species in biological processes, *Klinische Wochenschrift*, **69**, 965–968.
 28. Darley-Usmar, V., Halliwell, B. (1996) Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system, *Pharmaceutical Research*, **13**, 649–662.
 29. Fiedler, T.J., Davey, C.A., Fenna, R.E. (2000) X-ray crystal structure and characterization of halide-binding sites of human myeloperoxidase at 1.8 Å resolution, *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 11964–11971.
 30. Schultz, J., Kaminker, K. (1962) Myeloperoxidase of the leucocyte of normal human blood. 1. Content and localization, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **96**, 465–467.
 31. Edwards, S.W. (1994) Biochemistry and physiology of the neutrophil. Cambridge-New York-Melbourn: Cambridge University Press. 299 p.

32. Deby-Dupont, G., Deby, C., Lamy, M. (1999). Neutrophil myeloperoxidase revisited: its role in health and disease, *Intensivmedizin und Notfallmedizin*, **36**, 500–513.
33. Smith, R.J., Speziale, S.C., Bowman, B.J. (1985) Properties of interleukin-1 as a complete secretogen for human neutrophils, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **130**, 1233–1240.
34. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria, *Science*, **303**, 1532–1535.
35. Lau, D., Mollnau, H., Eiserich, J.P., Freeman, B.A., Daiber, A., Gehling, U.M., Brümmer, J., Rudolph, V., Münzel, T., Heitzer, T., Meinertz, T., Baldus, S. (2005) Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **102**, 431–436.
36. Григорьева Д.В., Горудко И.В., Соколов А.В., Костевич В.А., Васильев В.Б., Черенкевич С.Н., Панасенко О.М. (2016) Миелопероксидаза стимулирует дегрануляцию нейтрофилов, *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, **161**, 483–488.
37. Gorudko, I.V., Grigorieva, D.V., Sokolov, A.V., Shamova, E.V., Kostevich, V.A., Kudryavtsev, I.V., Syromiatnikova, E.D., Vasilyev, V.B., Cherenkevich, S.N., Panasenکو, O.M. (2018) Neutrophil activation in response to monomeric myeloperoxidase, *Biochemistry and Cell Biology*, **96**, 592–601.
38. El Kebir, D., József, L., Pan, W., Filep, J.G. (2008) Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through CD11b/CD18 integrins and prolongs inflammation, *Circulation Research*, **103**, 352–359.
39. Morris, J.C. (1966) The acid ionization constant of HOCl from 5 to 35°, *Journal of Physical Chemistry*, **70**, 3798–3805.
40. Furtmüller, P.G., Burner, U., Obinger, C. (1998) Reaction of myeloperoxidase compound I with chloride, bromide, iodide, and thiocyanate, *Biochemistry*, **37**, 17923–17930.
41. Pattison, D.I., Davies, M.J. (2006) Reactions of myeloperoxidase-derived oxidants with biological substrates: gaining chemical insight into human inflammatory diseases, *Current Medicinal Chemistry*, **13**, 3271–3290.
42. Panasenکو, O.M., Briviba, K., Klotz, L.-O., Sies, H. (1997) Oxidative modification and nitration of human low-density lipoproteins by the reaction of hypochlorous acid with nitrite, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **343**, 254–259.
43. Eiserich, J.P., Cross, C.E., Jones, A.D., Halliwell, B., van der Vliet, A. (1996) Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. A novel mechanism for nitric oxide-mediated protein modification, *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 19199–19208.
44. Byun, J., Mueller, M., Fabjan, J.S., Heinecke, J.W. (1999) Nitrogen dioxide radical generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-nitrite system promotes lipid peroxidation of low density lipoproteins, *FEBS Letters*, **455**, 243–246.
45. Furtmüller, P.G., Jantschko, W., Zederbauer, M., Jakopitsch, C., Arnhold, J., Obinger, C. (2004) Kinetics of interconversion of redox intermediates of lactoperoxidase, eosinophil peroxidase and myeloperoxidase, *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **57**, S30–S31.
46. Кулинский В.И. (1999) Активные формы кислорода и оксидативная

- модификация макромолекул: польза, вред и защита. *Соросовский образовательный журнал*, № 1, 2–7.
47. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1999) Free radical in biology and medicine. Oxford: Oxford University Press, 617–783.
48. Gaut, J.P., Yeh, G.C., Tran, H.D., Byun, J., Henderson, J.P., Richter, G.M., Brennan, M.L., Lusic, A.J., Belaouaj, A., Hotchkiss, R.S., Heinicke, J.W. (2001) Neutrophils employ the myeloperoxidase system to generate antimicrobial brominating and chlorinating oxidants during sepsis, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **98**, 11961–11966.
49. Dunford, H.B., Marquez-Curtis, L.A. (2002) Myeloperoxidase: kinetic evidence for formation of enzyme-bound chlorinating intermediate, *Methods in Enzymology*, **354**, 338–350.
50. Thukkani, A.K., Albert, C.J., Wildsmith, K.R., Messner, M.C., Martinson, B.D., Hsu, F.F., Ford, D.A. (2003) Myeloperoxidase-derived reactive chlorinating species from human monocytes target plasmalogens in low density lipoprotein, *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 36365–36372.
51. Albert, C.J., Crowley, J.R., Hsu, F.F., Thukkani, A.K., Ford, D.A. (2002) Reactive brominating species produced by myeloperoxidase target the vinyl ether bond of plasmalogens: disparate utilization of sodium halides in the production of alpha-halo fatty aldehydes, *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 4694–4703.
52. Панасенко О.М., Горудко И.В., Ковалева А.М., Гусев С.А., Сергиенко В.И., Матишов Д.Г. (2010) Продукция и реакционные свойства активных форм галогенов в механизмах канцерогенеза, *Вестник Южного научного центра РАН*, **6**(3), 73–90.
53. Rüdiger, J., Bobrowski, N., Liotta, M., Hoffmann, T. (2017) Development and application of a sampling method for the determination of reactive halogen species in volcanic gas emissions, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **409**, 5975–5985.
54. Ronsein, G.E., Winterbourn, C.C., Di Mascio, P., Kettle, A.J. (2014) Cross-linking methionine and amine residues with reactive halogen species, *Free Radical Biology and Medicine*, **70**, 278–287.
55. Pattison, D.I., Davies, M.J. (2001) Absolute rate constants for the reaction of hypochlorous acid with protein side chains and peptide bonds, *Chemical Research in Toxicology*, **14**, 1453–1464.
56. Pattison, D.I., Davies, M.J. (2004) Kinetic analysis of the reactions of hypobromous acid with protein components: implications for cellular damage and use of 3-bromotyrosine as a marker of oxidative stress, *Biochemistry*, **43**, 4799–4809.
57. Malle, E., Marsche, G., Arnhold, J., Davies, M.J. (2006) Modification of low-density lipoprotein by myeloperoxidase-derived oxidants and reagent hypochlorous acid, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1761**, 392–415.
58. Pattison, D.I., Hawkins, C.L., Davies, M.J. (2003) Hypochlorous acid-mediated oxidation of lipid components and antioxidants present in low-density lipoproteins: absolute rate constants, product analysis, and computational modeling. *Chemical Research in Toxicology*, **16**, 439–449.
59. Skaff, O., Pattison, D.I., Davies, M.J. (2007) Kinetics of hypobromous acid-mediated oxidation of lipid components and antioxidants, *Chemical Research in Toxicology*, **20**, 1980–1988.
60. Hazell, L.J., van den Berg, J.J., Stocker, R. (1994) Oxidation of low-

- density lipoprotein by hypochlorite causes aggregation that is mediated by modification of lysine residues rather than lipid oxidation, *Biochemical Journal*, **302**, 297–304.
61. Jerlich, A., Horakova, L., Fabjan, J.S., Giessauf, A., Jürgens, G., Schaur, R.J. (1999) Correlation of low-density lipoprotein modification by myeloperoxidase with hypochlorous acid formation, *International Journal of Clinical and Laboratory Research*, **29**, 155–161.
 62. Yang, C.Y., Gu, Z.W., Yang, M., Lin, S.N., Garcia-Prats, A.J., Rogers L.K., Welty, S.E., Smith, C.V. (1999) Selective modification of apoB-100 in the oxidation of low density lipoproteins by myeloperoxidase in vitro, *Journal of Lipid Research*, **40**, 686–698.
 63. Delporte, C., Boudjeltia, K.Z., Noyon, C., Furtmüller, P.G., Nuyens, V., Slomianny, M.C., Madhoun, P., Desmet, J.M., Raynal, P., Dufour, D., Koyani, C.N., Reyé, F., Rousseau, A., Vanhaeverbeek, M., Ducobu, J., Michalski, J.C., Nève, J., Vanhamme, L., Obinger C., Malle, E., Van Antwerpen, P. (2014) Impact of myeloperoxidase-LDL interactions on enzyme activity and subsequent posttranslational oxidative modifications of apoB-100, *Journal of Lipid Research*, **55**, 747–757.
 64. Hawkins, C.L., Davies, M.J. (2005) The role of reactive N-bromo species and radical intermediates in hypobromous acid-induced protein oxidation, *Free Radical Biology and Medicine*, **9**, 900–912.
 65. Hawkins, C.L., Pattison, D.I., Davies, M.J. (2003) Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins, *Amino Acids*, **25**, 259–274.
 66. Fu, X., Mueller, D.M., Heinecke, J.W. (2002) Generation of intramolecular and intermolecular sulfenamides, sulfinamides, and sulfonamides by hypochlorous acid: a potential pathway for oxidative cross-linking of low-density lipoprotein by myeloperoxidase, *Biochemistry*, **41**, 1293–1301.
 67. Heinecke, J.W., Li, W., Francis, G.A., Goldstein, J.A. (1993) Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyzes the oxidative cross-linking of proteins, *Journal of Clinical Investigation*, **91**, 2866–2872.
 68. Thomas, E.L. (1979) Myeloperoxidase, hydrogen peroxide, chloride antimicrobial system: nitrogen-chlorine derivatives of bacterial components in bactericidal action against *Escherichia coli*, *Infection and Immunity*, **23**, 522–531.
 69. Hawkins, C.L., Davies, M.J. (1998) Reaction of HOCl with amino acids and peptides: EPR evidence for rapid rearrangement and fragmentation reactions of nitrogen-centered radicals, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, **2**, 1937–1945.
 70. Podrez, E.A., Febbraio, M., Sheibani, N., Schmitt, D., Silverstein, R.L., Hajjar, D.P., Cohen, P.A., Frazier, W.A., Hoff, H.F., Hazen, S.L. (2000) Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species, *Journal of Clinical Investigation*, **105**, 1095–1108.
 71. Панасенко О.М., Арнхольд Ю., Сергиенко В.И. (2002) Повреждение липидов мембран гипохлоритом, *Биологические мембраны*, **19**, 403–434.
 72. Панасенко О.М., Арнхольд Ю., Сергиенко В.И., Арнольд К., Владимиров Ю.А. (1996) Стехиометрия взаимодействия гипохлорита с ненасыщенными связями фосфатидилхолина и свободных жирных кислот в составе липосом, *Биологические мембраны*, **13**, 271–281.

73. Winterbourn, C.C., van den Berg, J.J., Roitman, E., Kuypers, F.A. (1992) Chlorohydrin formation from unsaturated fatty acids reacted with hypochlorous acid, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **296**, 547–555.
74. Spalteholz, H., Panasenکو, O.M., Arnhold, J. (2006) Formation of reactive halide species by myeloperoxidase and eosinophil peroxidase, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **445**, 225–234.
75. Panasenکو, O.M., Vakhrusheva, T., Tretyakov, V., Spalteholz, H., Arnhold, J. (2007) Influence of chloride on modification of unsaturated phosphatidylcholines by the myeloperoxidase/hydrogen peroxide/bromide system, *Chemistry and Physics of Lipids*, **149**, 40–51.
76. Carr, A.C., Winterbourn, C.C., van den Berg, J.J. (1996) Peroxidase-mediated bromination of unsaturated fatty acids to form bromohydrins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **327**, 227–233.
77. Панасенко О.М., Шпальтехольц Г., Шиллер Ю., Арнхольд Ю. (2006). Опосредованное лейкоцитарной миелопероксидазой образование бромгидринов и лизофосфолипидов из ненасыщенных фосфатидилхолинов, *Биохимия*, **71**, 707–718.
78. Панасенко О.М., Осипов А.Н., Шиллер Ю., Арнхольд Ю. (2002) Взаимодействие экзогенного гипохлорита и гипохлорита, продуцируемого в системе МПО+H₂O₂+Cl⁻ с ненасыщенным фосфатидилхолином, *Биохимия*, **67**, 1071–1084.
79. Panasenکو, O.M., Spalteholz, H., Schiller, J., Arnhold, J. (2003). Myeloperoxidase-induced formation of chlorohydrins and lysophospholipids from unsaturated phosphatidylcholines, *Free Radical Biology and Medicine*, **34**, 553–562.
80. Панасенко О.М., Шпальтехольц Г., Шиллер Ю., Арнхольд Ю. (2004) Опосредованная миелопероксидазой деструкция ненасыщенных фосфатидилхолинов в составе липосом, *Биологические мембраны*, **21**, 138–150.
81. Spalteholz, H., Wenske, K., Panasenکو, O.M., Schiller, J., Arnhold, J. (2004) Evaluation of products upon the reaction of hypochlorous acid with unsaturated phosphatidylcholines, *Chemistry and Physics of Lipids*, **129**, 85–96.
82. Arnhold, J., Osipov, A.N., Spalteholz, H., Panasenکو, O.M., Schiller, J. (2002) Formation of lyso-phospholipids from unsaturated phosphatidylcholines under the influence of hypochlorous acid, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1572**, 91–100.
83. Arnhold, J., Osipov, A.N., Spalteholz, H., Panasenکو, O.M., Schiller, J. (2001) Effects of hypochlorous acid on unsaturated phosphatidylcholines, *Free Radical Biology and Medicine*, **31**, 1111–1119.
84. Engelmann, B., Bräutigam, C., Thiery, J. (1994) Plasmalogen phospholipids as potential protectors against lipid peroxidation of low density lipoproteins, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **204**, 1235–1242.
85. Albert, C.J., Crowley, J.R., Hsu, F.F., Thukkani, A.K., Ford, D.A. (2001) Reactive chlorinating species produced by myeloperoxidase target the vinyl ether bond of plasmalogens. Identification of 2-chlorohexadecanal, *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 23733–23741.
86. Leßig, J., Schiller, J., Arnhold, J., Fuchs, B. (2007) Hypochlorous acid-mediated generation of glycerophosphocholine from unsaturated plasmalogen glycerophosphocholine lipids, *Journal of Lipid Research*, **48**, 1316–1324.
87. Messner, M.C., Albert, C.J., Hsu, F., Ford, D.A. (2006) Selective plasme-

- nylcholine oxidation by hypochlorous acid: formation of lysophosphatidylcholine chlorohydrins, *Chemistry and Physics of Lipids*, **144**, 34–44.
88. Skaff, O., Pattison, D.I., Davies, M.J. (2008) The vinyl ether linkages of plasmalogens are favored targets for myeloperoxidase-derived oxidants: a kinetic study, *Biochemistry*, **47**, 8237–8245.
 89. Schiller, J., Zschörnig, O., Petkovic, M., Müller, M., Arnhold, J., Arnold, K. (2001) Lipid analysis of human HDL and LDL by MALDI-TOF mass spectrometry and ^{31}P -NMR, *Journal of Lipid Research*, **42**, 1501–1508.
 90. Zakiev, E.R., Sukhorukov, V.N., Melnichenko, A.A., Sobenin, I.A., Ivanova, E.A., Orekhov, A.N. (2016) Lipid composition of circulating multiple-modified low density lipoprotein, *Lipids in Health and Disease*, **15**, 134.
 91. Thukkani, A.K., McHowat, J., Hsu, F.F., Brennan, M.L., Hazen, S.L., Ford, D.A. (2003) Identification of alpha-chloro fatty aldehydes and unsaturated lysophosphatidylcholine molecular species in human atherosclerotic lesions, *Circulation*, **108**, 3128–3133.
 92. Siess, W., Zangl, K.J., Essler, M., Bauer, M., Brandl, R., Corrinth, C., Bittman, R., Tigyi, G., Aepfelbacher, M. (1999) Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **96**, 6931–6936.
 93. Nussold, C., Kollrosier, M., Köfeler, H., Rechberger, G., Reicher, H., Ullen, A., Bernhart, E., Walzl, S., Kratzer, I., Hermetter, A., Hackl, H., Trajanoski, Z., Hrzenjak, A., Malle, E., Sattler, W. (2010) Hypochlorite modification of sphingomyelin generates chlorinated lipid species that induce apoptosis and proteome alterations in dopaminergic PC12 neurons in vitro, *Free Radical Biology and Medicine*, **48**, 1588–1600.
 94. Spalteholz, H., Wenske, K., Arnhold, J. (2005) Interaction of hypohalous acids and heme peroxidases with unsaturated phosphatidylcholines, *Biofactors*, **24**, 67–76.
 95. Heinecke, J.W., Li, W., Mueller, D.M., Bohrer, A., Turk, J. (1994) Cholesterol chlorohydrin synthesis by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system: potential markers for lipoproteins oxidatively damaged by phagocytes, *Biochemistry*, **33**, 10127–10136.
 96. Carr, A.C., van den Berg, J.J., Winterbourn, C.C. (1996) Chlorination of cholesterol in cell membranes by hypochlorous acid, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **332**, 63–69.
 97. Hazen, S.L., Hsu, F.F., Duffin, K., Heinecke, J.W. (1996) Molecular chlorine generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system of phagocytes converts low density lipoprotein cholesterol into a family of chlorinated sterols, *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 23080–23088.
 98. van den Berg, J.J., Winterbourn, C.C., Kuypers, F.A. (1993) Hypochlorous acid-mediated modification of cholesterol and phospholipid: analysis of reaction products by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Lipid Research*, **34**, 2005–2012.
 99. Сергиенко В.И., Панасенко О.М., Мурина М.А. (1999) Разработка и внедрение электрохимических методов детоксикации в медицине, *Эфферентная терапия*, **5**(4), 8–17.
 100. Vissers, M.C., Carr, A.C., Chapman, A.L. (1998) Comparison of human

- red cell lysis by hypochlorous and hypobromous acids: insights into the mechanism of lysis, *Biochemical Journal*, **330**, 131–138.
101. Panasenko, O.M. (1997). The mechanism of the hypochlorite-induced lipid peroxidation, *Biofactors*, **6**, 181–190.
102. Stelmazynska, T., Kukovetz, E., Egger, G., Schaur, R.J. (1992) Possible involvement of myeloperoxidase in lipid peroxidation, *International Journal of Biochemistry*, **24**, 121–128.
103. Евгина С.А., Панасенко О.М., Сергиенко В.И., Владимиров Ю.А. (1992) Перекисное окисление липопротеинов крови человека, индуцированное гипохлорит-анионом, *Биологические мембраны*, **9**, 946–953.
104. Hazell, L.J., Davies, M.J., Stocker, R. (1999) Secondary radicals derived from chloramines of apolipoprotein B-100 contribute to HOCl-induced lipid peroxidation of low-density lipoproteins, *Biochemical Journal*, **339**, 489–495.
105. Panasenko, O.M., Evgina, S.A., Aidyraliev, R.K., Sergienko, V.I., Vladimirov, Yu.A. (1994) Peroxidation of human blood lipoproteins induced by exogenous hypochlorite or hypochlorite generated in the system of «myeloperoxidase + H₂O₂ + Cl⁻», *Free Radical Biology and Medicine*, **16**, 143–148.
106. Panasenko, O.M., Evgina, S.A., Driomina, E.S., Sharov, V.S., Sergienko, V.I., Vladimirov, Yu.A. (1995) Hypochlorite induces lipid peroxidation in blood lipoproteins and phospholipid liposomes, *Free Radical Biology and Medicine*, **19**, 133–140.
107. Панасенко О.М., Арнхольд Ю., Арнольд К., Владимиров Ю.А., Сергиенко В.И. (1996) Сравнительное исследование кинетики пероксидации фосфолипидных липосом, индуцированной гипохлоритом и в системе Fe (II) + аскорбат, *Биофизика*, **41**, 334–341.
108. Горбатенкова Е.А., Артман Г.М., Панасенко О.М. (1999) Гипохлорит и липопротеины низкой плотности, модифицированные гипохлоритом, стимулируют адгезию эритроцитов к эндотелию, *Биологические мембраны*, **16**, 437–444.
109. Панасенко О.М., Евгина С.А., Сергиенко В.И. (1993) Изучение способности гипохлорита проникать в липидную фазу липопротеинов крови человека, *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, **115**, 358–360.
110. Панасенко О.М., Панасенко О.О., Бривиба К., Сис Г. (1997) Гипохлорит разрушает каротиноиды в липопротеинах низкой плотности, снижая их резистентность к перекисной модификации. *Биохимия*, **62**, 1332–1338.
111. Чеканов А.В., Осипов А.Н., Владимиров Ю.А., Сергиенко В.И., Панасенко О.М. (2007) Сравнительное исследование взаимодействия бромноватистой и хлорноватистой кислот с трет-бутилгидропероксидом методом спиновых ловушек, *Биофизика*, **52**, 5–13.
112. Rice-Evans, C., Leake, D., Bruckdorfer, K.R., Diplock, A.T. (1996) Practical approaches to low density lipoprotein oxidation: whys, wherefores and pitfalls, *Free Radical Research*, **25**, 285–311.
113. Osipov, A.N., Panasenko, O.M., Chekanov, A.V., Arnhold, J. (2002) Interaction of *tert*-butyl hydroperoxide with hypochlorous acid. A spin trapping and chemiluminescence study, *Free Radical Research*, **36**, 749–754.

114. Панасенко О.М., Осипов А.Н., Чеканов А.В., Арнхольд Ю., Сергиенко В.И. (2002) При взаимодействии гипохлорита с *трет*-бутил гидропероксидом образуется пероксильный радикал, *Биохимия*, **67**, 1061–1070.
115. Чеканов А.В., Панасенко О.М., Осипов А.Н., Арнхольд Ю., Казаринов К.Д., Владимиров Ю.А., Сергиенко В.И. (2002) Взаимодействие *трет*-бутилгидропероксида с гипохлоритом приводит к образованию перекисных радикалов. Исследование методом хемилюминесценции, *Биофизика*, **47**, 787–794.
116. Чеканов А.В., Панасенко О.М., Осипов А.Н., Матвеева Н.С., Казаринов К.Д., Владимиров Ю.А., Сергиенко В.И. (2005) Взаимодействие гипохлорита с гидропероксидом жирной кислоты приводит к образованию свободных радикалов, *Биофизика*, **50**, 13–19.
117. Панасенко О.М., Чеканов А.В., Арнхольд Ю., Сергиенко В.И., Осипов А.Н., Владимиров Ю.А. (2005) Образование свободных радикалов при распаде гидропероксида в присутствии миелопероксидазы или активированных нейтрофилов, *Биохимия*, **70**, 1209–1217.
118. Чеканов А.В., Осипов А.Н., Владимиров Ю.А., Сергиенко В.И., Панасенко О.М. (2006) Взаимодействие гипобромита с *трет*-бутилгидропероксидом. Роль в пероксидации фосфолипидных липосом, *Биологические мембраны*, **23**, 426–432.
119. Noguchi, N., Nakada, A., Itoh, Y., Watanabe, A., Niki, E. (2002) Formation of active oxygen species and lipid peroxidation induced by hypochlorite, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **397**, 440–447.
120. Miyamoto, S., Martinez, G.R., Rettori, D., Augusto, O., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P. (2006) Linoleic acid hydroperoxide reacts with hypochlorous acid, generating peroxyl radical intermediates and singlet molecular oxygen, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **103**, 293–298.
121. Crisby, M., Henareh, L., Agewall, S. (2014) Relationship between oxidized LDL, IgM, and IgG autoantibodies to ox-LDL levels with recurrent cardiovascular events in Swedish patients with previous myocardial infarction, *Angiology*, **65**, 932–936.
122. Holvoet, P., Vanhaecke, J., Janssens, S., Van de Werf, F., Collen, D. (1998) Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease, *Circulation*, **98**, 1487–1489.
123. Осипов А.Н., Брюханова Э.В., Вахрушева Т.В., Панасенко О.М., Владимиров Ю.А. (1997) Влияние гипохлорита и перекиси водорода на способность гемоглобина стимулировать перекисное окисление липидов липопротеинов низкой плотности, *Биофизика*, **42**, 400–407.
124. Якутова Э.Ш., Дремина Е.С., Евгина С.А., Осипов А.Н., Шаров В.С., Панасенко О.М., Владимиров Ю.А. (1994) Образование свободных радикалов при взаимодействии гипохлорита с ионами железа (II), *Биофизика*, **39**, 275–279.
125. Savenkova, M.L., Mueller, D.M., Heinecke, J.W. (1994) Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase is a physiological catalyst for the initiation of lipid peroxidation in low density lipoprotein, *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 20394–20400.
126. Kawai, Y., Kiyokawa, H., Kimura, Y., Kato, Y., Tsuchiya, K., Terao,

- J. (2006) Hypochlorous acid-derived modification of phospholipids: characterization of aminophospholipids as regulatory molecules for lipid peroxidation, *Biochemistry*, **45**, 14201–14211.
127. Arnhold, J., Panasenko, O.M., Schiller, J., Vladimirov, Yu.A., Arnold, K. (1995) The action of hypochlorous acid on phosphatidylcholine liposomes in dependence on the content of double bonds. Stoichiometry and NMR analysis, *Chemistry and Physics of Lipids*, **78**, 55–64.
128. Panasenko, O.M., Arnhold, J., Vladimirov, Yu.A., Arnold, K., Sergienko, V.I. (1997) Hypochlorite-induced peroxidation of egg yolk phosphatidylcholine is mediated by hydroperoxides, *Free Radical Research*, **27**, 1–12.
129. Richter, G., Schober, C., Süß, R., Fuchs, B., Birkemeyer, C., Schiller, J. (2008) Comparison of the positive and negative ion electrospray ionization and matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectra of the reaction products of phosphatidylethanolamines and hypochlorous acid, *Analytical Biochemistry*, **376**, 157–159.
130. Carr, A.C., van den Berg, J.J., Winterbourn, C.C. (1998) Differential reactivities of hypochlorous and hypobromous acids with purified *Escherichia coli* phospholipid: formation of haloamines and halohydrins, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1392**, 254–264.
131. Tertov, V.V., Orekhov, A.N., Sobenin, I.A., Morrisett, J.D., Gotto, A.M., Guevara, J.G., (1993) Carbohydrate composition of protein and lipid components in sialic acid-rich and -poor low density lipoproteins from subjects with and without coronary artery disease, *Journal of Lipid Research*, **34**, 365–375.
132. Taniguchi, T., Ishikawa, Y., Tsunemitsu, M., Fukuzaki, H. (1989) The structures of asparagine-linked sugar chains of human apolipoprotein B-100, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **273**, 197–205.
133. Prütz, W.A. (1996) Hypochlorous acid interactions with thiols, nucleotides, DNA, and other biological substrates, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **332**, 110–120.
134. Schiller, J., Arnhold, J., Arnold, K. (1995) Action of hypochlorous acid on polymeric components of cartilage. Use of ^{13}C NMR spectroscopy, *Zeitschrift für Naturforschung*, **50**(9–10), 721–728.
135. Schiller, J., Arnhold, J., Arnold, K. (1995) NMR studies of the action of hypochlorous acid on native pig articular cartilage, *European Journal of Biochemistry*, **233**, 672–676.
136. Hawkins, C.L., Davies, M.J. (1998) Degradation of hyaluronic acid, poly- and monosaccharides, and model compounds by hypochlorite: evidence for radical intermediates and fragmentation, *Free Radical Biology and Medicine*, **24**, 1396–1410.
137. Rees, M.D., Hawkins, C.L., Davies, M.J. (2003) Hypochlorite-mediated fragmentation of hyaluronan, chondroitin sulfates, and related N-acetyl glycosamines: evidence for chloramide intermediates, free radical transfer reactions, and site-specific fragmentation, *Journal of the American Chemical Society*, **125**, 13719–13733.
138. Rees, M.D., Mcniven, T.N., Davies, M.J. (2007) Degradation of extracellular matrix and its components by hypobromous acid, *Biochemical Journal*, **401**, 587–596.
139. Rees, M.D., Hawkins, C.L., Davies, M.J. (2004) Hypochlorite and

- superoxide radicals can act synergistically to induce fragmentation of hyaluronan and chondroitin sulphates, *Biochemical Journal*, **381**, 175–184.
140. Rees, M.D., Davies, M.J. (2006) Heparan sulfate degradation via reductive homolysis of its N-chloro derivatives, *Journal of the American Chemical Society*, **128**, 3085–3097.
 141. Tertov, V.V., Kaplun, V.V., Sobenin, I.A., Orekhov, A.N. (1998) Low-density lipoprotein modification occurring in human plasma. Possible mechanism of in vivo lipoprotein desialylation as a primary step of atherogenic modification, *Atherosclerosis*, **138**, 183–195.
 142. Сухоруков В.Н., Карагодин В.П., Орехов А.Н. (2016) Атерогенные модификации липопротеинов низкой плотности. *Биомедицинская химия*, **62**, 391–402.
 143. Тертов В.В., Никонова Е.Ю., Нифантьев Н.Э., Бовин Н.В., Орехов А.Н. (2002) Донорно-акцепторная специфичность транс-сиалидазы плазмы крови человека. *Биохимия*, **67**, 1093–1100.
 144. Estrbauer, H., Puhl, H., Waeg, G., Krebs, A., Tatzber, F., Rabol, H. (1993) Vitamin E and atherosclerosis – an overview. *Vitamin E.* / Eds. M. Mino, H. Nakamura, A.T. Diplock, H.J. Keyden. Tokyo: Japan Sci. Soc. Press, 233–241.
 145. Hazell, L.J., Stocker, R. (1993) Oxidation of low-density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages, *Biochemical Journal*, **290**, 165–172.
 146. Albrich, J.M., McCarthy, C.A., Hurst, J.K. (1981) Biological reactivity of hypochlorous acid: Implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **78**, 210–214.
 147. Hazell, L.J., Stocker, R. (1997) α -Tocopherol does not inhibit hypochlorite-induced oxidation of apolipoprotein B-100 of low-density lipoprotein, *FEBS Letters*, **414**, 541–544.
 148. Панасенко О.М., Евгина С.А., Сергиенко В.И. (1993) Исследование методом спиновых зондов изменения структуры липопротеинов крови человека под действием гипохлорита натрия, *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, **116**, 153–155.
 149. Панасенко О.М. (1998) Гипохлорит и окислительная модификация липопротеинов крови человека: Дисс. докт. биол. наук. М.: НИИ физико-химической медицины, с. 266.
 150. Панасенко О.М., Борин М.Л., Азизова О.А., Арнольд К. (1985) Определение поверхностного заряда липопротеидов и его изменения при перекисном окислении липидов, *Биофизика*, **30**, 822–827.
 151. Панасенко О.М., Евгина С.А., Никитин С.В., Сергиенко В.И. (1995) Влияние гипохлорита на электрические свойства поверхности липопротеинов крови человека, *Биофизика*, **40**, 545–550.
 152. Jerlich, A., Fabjan, J.S., Tschabuschnig, S., Smirnova, A.V., Horakova, L., Hayn, M., Auer, H., Gutterberger, H., Leis, H.J., Tatzber, F., Waeg, G., Schaur, R.J. (1998) Human low density lipoprotein as a target of hypochlorite generated by myeloperoxidase, *Free Radical Biology and Medicine*, **24**, 1139–1148.
 153. Панасенко О.М., Мельниченко А.А., Аксенов Д.В., Вахрушева Т.В., Супрун И.В., Янушевская Е.В., Власик Т.Н., Собенин И.А., Орехов А.Н. (2004) Миелопероксидаза, модифицируя поверхность и снижая устойчивость к ассоциации липопротеинов низ-

- кой плотности крови человека, повышает их атерогенный потенциал, *Биологические мембраны*, **21**, 498–505.
154. Guyton, J.R., Klemp, K.F. (1994) Development of the atherosclerotic core region. Chemical and ultrastructural analysis of microdissected atherosclerotic lesions from human aorta, *Arteriosclerosis and Thrombosis*, **14**, 1305–1314.
155. Tirziu, D., Dobrian, A., Tasca, C., Simionescu, M., Simionescu, N. (1995) Intimal thickenings of human aorta contain modified reassembled lipoproteins, *Atherosclerosis*, **112**, 101–114.
156. O'Connell, A.M., Giese, S.P., Stanley, K.K. (1994) Hypochlorite oxidation causes cross-linking of Lp(a), *Biochimica et Biophysica Acta*, **1225**, 180–186.
157. Panasenکو, O.M., Azizova, O.A., Arnold, K., Borin, M.L. (1987) Alterations of surface charges of plasma lipoproteins in ischemic heart disease. *Biomedica et Biophysica Acta*, **46**, 97–102.
158. Carr, A.C., Myzak, M.C., Stocker, R., McCall, M.R., Frei, B. (2000) Myeloperoxidase binds to low-density lipoprotein: potential implications for atherosclerosis, *FEBS Letters*, **487**, 176–180.
159. Sokolov, A.V., Chekanov, A.V., Kostevich, V.A., Aksenov, D.V., Vasilyev, V.B., Panasenکو, O.M. (2011) Revealing binding sites for myeloperoxidase on the surface of human low density lipoproteins, *Chemistry and Physics of Lipids*, **164**, 49–53.
160. Sokolov, A.V., Ageeva, K.V., Cherkalina, O.S., Pulina, M.O., Zakharova, E.T., Prozorovskii, V.N., Aksenov, D.V., Vasilyev, V.B., Panasenکو, O.M. (2010) Identification and properties of complexes formed by myeloperoxidase with lipoproteins and ceruloplasmin, *Chemistry and Physics of Lipids*, **163**, 347–355.
161. Sokolov, A.V., Kostevich, V.A., Runova, O.L., Gorudko, I.V., Vasilyev, V.B., Cherenkevich, S.N., Panasenکو, O.M. (2014) Proatherogenic modification of LDL by surface-bound myeloperoxidase, *Chemistry and Physics of Lipids*, **180**, 72–80.
162. Segelmark, M., Persson, B., Hellmark, T., Wieslander, J. (1997) Binding and inhibition of myeloperoxidase (MPO): a major function of ceruloplasmin? *Clinical and Experimental Immunology*, **108**, 167–174.
163. Sokolov, A.V., Ageeva, K.V., Pulina, M.O., Cherkalina, O.S., Samygina, V.R., Vlasova, I.I., Panasenکو, O.M., Zakharova, E.T., Vasilyev, V.B. (2008) Ceruloplasmin and myeloperoxidase in complex affect the enzymatic properties of each other, *Free Radical Research*, **42**, 989–998.
164. Панасенко О.М., Чеканов А.В., Власова И.И., Соколов А.В., Агеева К.В., Пулина М.О., Черкалина О.С., Васильев В.Б. (2008) Влияние церулоплазмينا и лактоферрина на хлорирующую активность лейкоцитарной миелопероксидазы. Изучение методом хемилюминесценции, *Биофизика*, **53**, 573–581.
165. Karakas, M., Koenig, W. (2012) Myeloperoxidase production by macrophage and risk of atherosclerosis, *Current Atherosclerosis Reports*, **14**, 277–283.
166. Zhang, R., Brennan, M.L., Fu, X., Aviles, R.J., Pearce, G.L., Penn, M.S., Topol, E.J., Sprecher, D.L., Hazen, S.L. (2001) Association between myeloperoxidase levels

- and risk of coronary artery disease, *JAMA-Journal of the American Medical Association*, **286**, 2136–2142.
167. Chen, L.Q., Rohatgi, A., Ayers, C.R., Das, S.R., Khera, A., Berry, J.D., McGuire, D.K., de Lemos, J.A. (2011) Race-specific associations of myeloperoxidase with atherosclerosis in a population-based sample: the Dallas Heart Study, *Atherosclerosis*, **219**, 833–838.
 168. Karakas, M., Koenig, W., Zierer, A., Herder, C., Rottbauer, W., Baumert, J., Meisinger, C., Thorand, B. (2012) Myeloperoxidase is associated with incident coronary heart disease independently of traditional risk factors: results from the MONICA/KORA Augsburg study, *Journal of Internal Medicine*, **271**, 43–50.
 169. Sugiyama, S., Okada, Y., Sukhova, G.K., Virmani, R., Heinecke, J.W., Libby, P. (2001) Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes, *American Journal of Pathology*, **158**, 879–891.
 170. Cheng, M.L., Chen, C.M., Gu, P.W., Ho, H.Y., Chiu, D.T. (2008) Elevated levels of myeloperoxidase, white blood cell count and 3-chlorotyrosine in Taiwanese patients with acute myocardial infarction, *Clinical Biochemistry*, **41**, 554–560.
 171. Ho, H.Y., Cheng, M.L., Chen, C.M., Gu, P.W., Wang, Y.L., Li, J.M., Chiu, D.T. (2008) Oxidative damage markers and antioxidants in patients with acute myocardial infarction and their clinical significance, *Biofactors*, **34**, 135–145.
 172. Hazen, S.L., Heinecke, J.W. (1997) 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima, *Journal of Clinical Investigation*, **99**, 2075–2081.
 173. Hazen, S.L., Crowley, J.R., Mueller, D.M., Heinecke, J.W. (1997) Mass spectrometric quantification of 3-chlorotyrosine in human tissues with attomole sensitivity: a sensitive and specific marker for myeloperoxidase-catalyzed chlorination at sites of inflammation, *Free Radical Biology and Medicine*, **23**, 909–916.
 174. Bergt, C., Pennathur, S., Fu, X., Byun, J., O'Brien, K., McDonald, T.O., Singh, P., Anantharamaiah, G.M., Chait, A., Brunzell, J., Geary, R.L., Oram, J.F., Heinecke, J.W. (2004) The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA1-dependent cholesterol transport, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **101**, 13032–13037.
 175. Pennathur, S., Bergt, C., Shao, B., Byun, J., Kassim, S.Y., Singh, P., Green, P.S., McDonald, T.O., Brunzell, J., Chait, A., Oram, J.F., O'Brien, K., Geary, R.L., Heinecke, J.W. (2004) Human atherosclerotic intima and blood of patients with established coronary artery disease contain high density lipoprotein damaged by reactive nitrogen species, *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 42977–42983.
 176. Zheng, L., Nukuna, B., Brennan, M.L., Sun, M., Goormastic, M., Settle, M., Schmitt, D., Fu, X., Thomson, L., Fox, P.L., Ischiropoulos, H., Smith, J.D., Kinter, M., Hazen, S.L. (2004) Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease, *Journal of Clinical Investigation*, **114**, 529–541.

177. Rudolph, V., Andri , R.P., Rudolph, T.K., Friedrichs, K., Klinke, A., Hirsch-Hoffmann, B., Schwoerer, A.P., Lau, D., Fu, X., Klingel, K., Sydow, K., Didi , M., Seniuk, A., von Leitner, E.C., Szoecs, K., Schrickel, J.W., Treede, H., Wenzel, U., Lewalter, T., Nickenig, G., Zimmermann, W.H., Meinertz, T., B ger, R.H., Reichenspurner, H., Freeman, B.A., Eschenhagen, T., Ehmke, H., Hazen, S.L., Willems, S., Baldus, S. (2010) Myeloperoxidase acts as a profibrotic mediator of atrial fibrillation, *Nature Medicine*, **16**, 470–474.
178. Malle, E., Hazell, L., Stocker, R., Sattler, W., Esterbauer, H., Waeg, G. (1995) Immunologic detection and measurement of hypochlorite-modified LDL with specific monoclonal antibodies, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **15**, 982–989.
179. Hazell, L.J., Arnold, L., Flowers, D., Waeg, G., Malle, E., Stocker, R. (1996) Presence of hypochlorite-modified proteins in human atherosclerotic lesions, *Journal of Clinical Investigation*, **97**, 1535–1544.
180. Hazell, L.J., Baerenthaler, G., Stocker, R. (2001) Correlation between intima-to-media ratio, apolipoprotein B-100, myeloperoxidase, and hypochlorite-oxidized proteins in human atherosclerosis, *Free Radical Biology and Medicine*, **31**, 1254–1262.
181. Jerlich, A., Pitt, A.R., Schaur, R.J., Spickett, C.M. (2000) Pathways of phospholipid oxidation by HOCl in human LDL detected by LC-MS, *Free Radical Biology and Medicine*, **28**, 673–682.
182. Messner, M.C., Albert, C.J., McHown, J., Ford, D.A. (2008) Identification of lysophosphatidylcholine-chlorohydrin in human atherosclerotic lesions, *Lipids*, **43**, 243–249.
183. Domigan, N.N., Carr, A.C., Lewis, J.G., Elder, P.A., Winterbourn, C.C. (1997) A monoclonal antibody recognizing the chlorohydrin derivatives of oleic acid for probing hypochlorous acid involvement in tissue injury, *Redox Report*, **3**, 111–117.
184. Thukkani, A.K., Martinson, B.D., Albert, C.J., Vogler, G.A., Ford, D.A. (2005) Neutrophil-mediated accumulation of 2-ClHDA during myocardial infarction: 2-ClHDA-mediated myocardial injury, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **288**, H2955–H2964.
185. Takeshita, J., Byun, J., Nhan, T.Q., Pritchard, D.K., Pennathur, S., Schwartz, S.M., Chait, A., Heinecke, J.W. (2006) Myeloperoxidase generates 5-chlorouracil in human atherosclerotic tissue: a potential pathway for somatic mutagenesis by macrophages, *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 3096–3104.
186. Соколов А.В., Костевич В.А., Васильев В.Б., Панасенко О.М. (2018) Модифицированные гипогалоидными кислотами липопротеины низкой плотности как биомаркеры галогенирующего стресса при сердечно-сосудистых заболеваниях. *Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем.* / Ред. И.Д. Волотовский. Минск: Изд. центр БГУ, 171.
187. Соколов А.В., Костевич В.А., Горбунов Н.П., Григорьева Д.В., Горудко И.В., Васильев В.Б., Панасенко О.М. (2018) Связь между активной миелопероксидазой и хлорированным церулоплазмином в плазме крови пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, *Медицинская иммунология*, **20**, 699–710.

-
188. Liu, L., Wang, Y.X., Zhou, J., Long, F., Sun, H.W., Liu, Y., Chen, Y.Z., Jiang, C.L. (2005) Rapid non-genomic inhibitory effects of glucocorticoids on human neutrophil degranulation, *Inflammation Research*, **54**, 37–41.
189. Власова И.И., Арнхольд Ю., Осипов А.Н., Панасенко О.М. (2006) pH-Зависимая регуляция активности миелопероксидазы, *Биохимия*, **71**, 825–837.