

## СВЯЗЫВАНИЕ ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА *in vitro* СУЛЬФАТИРОВАННЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ПЕКТИНОВ

©2012 г. Ф. В. Витязев<sup>#\*</sup>, Н. М. Падерин, В. В. Головченко

*Учреждение Российской академии наук Институт физиологии Коми научного центра УрО РАН,  
167982, Россия, Сыктывкар, ул. Первомайская, 50*

Поступила в редакцию 04.07.2011 г. Принято к печати 04.08.2011 г.

Показано, что сульфатированные производные пектинов в большей степени, чем исходные пектины, связывают липопротеины низкой плотности (ЛНП) сыворотки крови человека *in vitro*. При этом количество сульфатных групп и молекулярная масса сульфатированных производных являются определяющими факторами. Наибольшей способностью связывать ЛНП обладают сульфатированные производные пектинов с мол. массой выше 200 кДа, содержащие 45 % (по весу) сульфатных групп, наименьшая активность показана для сульфатированных производных с мол. массой ниже 50 кДа, содержащих 5 % сульфатных групп.

**Ключевые слова:** *липопротеины низкой плотности; пектиновые полисахариды; сульфатированные производные пектинов, связывание ЛНП.*

### ВВЕДЕНИЕ

Во второй половине XX века основную опасность для здоровья населения и проблему для здравоохранения стали представлять не инфекционные заболевания, а в первую очередь, болезни сердечно-сосудистой системы, которые в настоящее время являются ведущей причиной заболеваемости, инвалидизации и смертности взрослого населения. Основой многих поражений сердечно-сосудистой системы является атеросклероз, одной из причин которого считают диспропорцию в содержании в плазме крови липопротеинов различных классов - одни из которых переносят холестерин в сосудистую стенку, другие осуществляют обратный процесс. Гиперлипидемия – повышение уровня холестерина в крови, увеличение содержания в крови липопротеинов низкой плотности (ЛНП) и, особенно, снижение уровня липопротеинов высокой плотности (ЛВП) – приводит к изменениям в структуре стенок артерий и формированию атеросклеротических бляшек, что считают главным фактором развития атеросклероза. Для снижения уровня липопротеинов в крови применяют гепарин, природный сульфатированный полисахарид [1]. Однако использование гепарина имеет ряд недостатков: во-первых, существует риск заражения бычьей энцефалопатией, поскольку гепарин получают из печени и лёгких крупного рогатого скота; во-вторых, антикоагулянтные свойства гепарина могут служить причиной

---

Сокращения: ВС и BCS1, BCS2, BCS3 – пектин бадана и – его сульфатированные производные; LM и LMS1, LMS2, LMS3 – пектин ряски и его сульфатированные производные; PN и PNS1, PNS2, PNS3 – пектин рдеста, и его сульфатированные производные; ЛВП - липопротеины высокой плотности; ЛНП – липопротеины низкой плотности

<sup>#</sup> Автор для связи (тел./факс:8(212)24-10-01; эл. почта: [rodefex@mail.ru](mailto:rodefex@mail.ru)).

возникновения геморрагии и тромбоцитопении [2-4]. В связи с этим стоит сложная задача поиска препаратов не только эффективных, но и не оказывающих нежелательных эффектов при их применении в лечебных дозах.

Наряду с гепарином, гипополидемическим действием обладают сульфатированные полисахариды, выделенные из зеленой водоросли *Ulva pertusa* [5, 6], гриба *Pholiota nameko* [7-9]; гликозаминогликан хитозан [10]; пектиновые полисахариды [11, 12]. В данной работе изучена способность сульфатированных производных пектинов связывать ЛНП сыворотки крови человека *in vitro*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для сульфатирования использовали предварительно выделенные различные по структуре физиологически активные пектины рдеста плавающего (PN), ряски малой (LM), бадана толстолистного (BC). Линейная область всех пектинов представлена 1,4- $\alpha$ -D-галактуронаном. Разветвленная область пектина LM образована апиогалактуронаном [13], BC – рамногалактуронаном-I [14], в составе макромолекулы PN разветвленная область практически отсутствует [15]. Сульфатирование проводили в безводной среде, используя в качестве растворителя DMF и варьируя количество хлорсульфоновой кислоты (одно-, двух- и трехкратный избыток в расчете на одну гидроксильную группу галактуронана макромолекулы пектина). В результате получены образцы производных пектинов BCS, LMS, PNS с разным содержанием сульфатных групп (таблица). Выявлено, что при сульфатировании пектинов происходит частичная деструкция, сопровождающаяся разрушением боковых цепей разветвленных областей их макромолекул. Наибольшей деструкции при сульфатировании подвергается молекула LM, в состав которой входит значительное количество боковых цепей, образованных остатками апиофуранозы с лабильными гликозидными связями (таблица).

При сульфатировании пектинов образуются смеси полимергомологов, для разделения которых использовали метод последовательной ультрафильтрации на мембранах с размером пор для  $M$  300 и 100 кДа. В результате получены сульфатированные производные пектинов близкого строения, но с разной молекулярной массой (табл.).

*Связывание ЛНП сыворотки крови человека in vitro.* Полученные в данной работе результаты согласуются с представленными в литературе [11, 12, 16] и свидетельствуют о способности пектинов связывать ЛНП, причем эта способность у пектинов BC и LM ниже, а у PN сравнима с активностью гепарина, использованного в качестве положительного контроля (рис. 1). В то же время степень связывания ЛНП сульфатированными производными этих же пектинов существенно выше, чем у контрольного образца (рис. 1). Степень связывания ЛНП зависит от количества введенных в макромолекулу пектина сульфатных групп. Наибольшей степенью

связывания ЛНП из полученных сульфатированных производных обладают BCS3, LMS3, PNS3, содержащие наибольшее количество сульфатных групп (рис. 1).

Существенным фактором, влияющим на связывание ЛНП, является молекулярная масса сульфатированных производных пектинов (рис. 2). Сравнение образцов LMS3-1 и LMS3-3 со сходным строением и одинаковым содержанием сульфатных групп, полученных ультрафильтрацией LMS3, показало, что степень связывания ЛНП у образца LMS3-1 с  $M$  236 кДа в три раза выше, чем у LMS3-3, имеющего  $M$  36 кДа (рис. 2). Подобные результаты наблюдаются при сравнении активности образцов с разной молекулярной массой, полученных при разделении сульфатированных производных BCS3 и PNS3 (рис.2).

Приведенные результаты и низкая токсичность полученных сульфатированных производных пектинов ( $LD_{50}$  превышает 1000 мг/кг) свидетельствуют о возможности использования их в качестве препаратов гипополидемического действия. Ранее проведенные нами исследования [17] показали, что сульфатированные производные пектинов, так же как гепарин, обладают антикоагулянтным действием, которое может стать причиной развития геморрагии и тромбоцитопении. Однако при одинаковой концентрации антикоагулянтные свойства сульфатированных производных пектинов менее выражены, чем у гепарина [17]. Это позволяет предположить, что препараты на основе сульфатированных производных пектинов будут иметь меньший спектр побочных эффектов; в частности, при их использовании в медицинской практике развитие геморрагии и тромбоцитопении будет менее вероятным.

Таким образом, сульфатирование пектинов приводит к изменению их биологической активности, в частности, гипополидемической. Способность связывать ЛНП сыворотки крови человека *in vitro* у исходных пектинов ниже, чем у их сульфатированных производных. Наибольшей способностью связывать липопротеины плазмы крови, вовлекаемые в атерогенную дислипидемию, обладают сульфатированные производные пектинов с  $M$  выше 200 кДа и с содержанием сульфатных групп 45 % (по весу).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Общие аналитические методы.** *Содержание гликуроновых кислот* определяли по реакции с 3,5-диметилфенолом в присутствии конц. серной кислоты и калибровочному графику, построенному для *D*-галактурановой кислоты, фотокolorиметрирование проводили при 400 и 450 нм [18].

*Содержание сульфатных групп* определяли по методу Доджсона и калибровочному графику, построенному для сульфата калия, при 360 нм [19].

Спектрофотометрические измерения проводили на приборе Ultrospec 3000 (Англия).

*Качественное и количественное определение нейтральных моносахаридов в виде соответствующих ацетатов полиолов проводили с помощью ГЖХ на хроматографе Varian 450-GC (США) с пламенно-ионизационным детектором и интегратором HP 3395A на капиллярной колонке VF-5 ms (0.25 мм Ø × 30 м, Varian), газ-носитель – гелий. ГЖХ ацетатов полиолов проводили в программе: от 175°C (1 мин) до 250°C (2 мин) со скоростью 3°C/мин. Процентное содержание моносахаридов от суммарного препарата вычисляли из площадей пиков, используя коэффициенты отклика детектора [20]. В качестве внутреннего стандарта использовали мио-инозит.*

*Молекулярную массу образцов определяли с помощью ВЭЖХ. Образец (3 мг) растворяли в 0.15 М NaCl (1 мл), раствор фильтровали. Для анализа использовали хроматографическую систему (Shimadzu, Япония): насос LC-20AD, дегазатор DGU-20A<sub>3</sub>, рефрактометр RID-10A, термостат CTO-10AS, колонку Shodex OHpak SB-804 HQ (8.0 мм × 30 см), предколонку Shodex GS-26 7B (7.6 мм × 5 см). Элюирование проводили 0.15 М NaCl (40°C, 0.3 мл/мин). Для калибровки колонки использовали образцы пуллуланов с *M* 6, 12, 50, 110, 200, 400, 800, 1300 и 2200 кДа (Sigma, USA).*

**Полный кислотный гидролиз.** К навеске (4-6 мг) исследуемого образца добавляли 1 мл 2 М TFA, содержащей мио-инозит (1 мг/мл). Смесь термостатировали 5 ч при 100°C, кислоту удаляли многократным упариванием гидролизата с метанолом. Полученные моносахариды идентифицировали с помощью ГЖХ в виде соответствующих ацетатов полиолов [20].

**Сульфатирование пектиновых полисахаридов.** Триэтиламмониевую соль пектина (100 мг) суспендировали в DMF (10 мл), перемешивая при 60°C в течение 0.5 ч, добавляли охлажденный до -25°C раствор хлорсульфоновой кислоты (0.07, 0.13 или 0.20 мл в 4 мл DMF). Реакцию проводили при температуре 25°C в течение 4 ч. Затем реакционную смесь охлаждали до 10°C, добавляя в нее лед, и нейтрализовали 0.5 М NaOH до pH~6-7. Раствор диализовали против дист. воды и лиофилизировали.

В результате получили девять образцов сульфатированных производных пектинов: по три из бадана (BCS1, BCS2, BCS3), ряски (LMS1, LMS2, LMS3) и рдеста (PNS1, PNS2, PNS3) (табл.).

**Фракционирование сульфатированных производных пектинов.** Образцы (по 50 мг) сульфатированных производных (BCS1, BCS3, LMS1, LMS3, PNS1 и PNS3) растворяли в дист. воде (50 мл), растворы последовательно пропускали через мембраны (полисульфон, Millipore, США) с размерами пор для *M* 300 и 100 кДа. Фракции концентрировали и лиофилизировали. Получили восемнадцать полисахаридных фракций: с *M* >300 кДа (BCS1-1, BCS3-1, LMS1-1, LMS3-1, PNS1-1 и PNS3-1), с *M* 100-300 кДа (BCS1-2, BCS3-2, LMS1-2, LMS3-2, PNS1-2 и PNS3-2) и с *M* < 100 кДа (BCS1-3, BCS3-3, LMS1-3, LMS3-3, PNS1-3 и PNS3-3) (табл.).

**Определение физиологической активности.** *Острую токсичность* определяли с помощью экспресс–метода Прозоровского при однократном внутрибрюшинном введении растворов сульфатированных производных пектинов лабораторным мышам [21].

*Гиполипидемическую активность* сульфатированных производных пектинов определяли турбидиметрическим методом, используя гепарин в качестве контроля [22]. Каждый образец анализировали в девяти повторностях. К 0.025 М раствору  $\text{CaCl}_2$  (200 мкл) добавляли сыворотку крови человека (20 мкл), смесь перемешивали, определяли оптическое поглощение полученного раствора  $A_{750}(1)$ . Затем к раствору добавляли 0.5% водный раствор полисахарида, полученную смесь перемешивали 4 мин, и определяли оптическое поглощение раствора  $A_{750}(2)$ . Искомое значение  $A_{750} = A_{750}(1) - A_{750}(2)$ .

**Статистический анализ.** При статистической обработке данных вычисляли среднее арифметическое значение и среднеквадратичное отклонение. Достоверность оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №09-04-00017-а, № 11-04-12110-офи м-2011, Интеграционного проекта фундаментальных научных исследований УрО РАН и СО РАН, программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

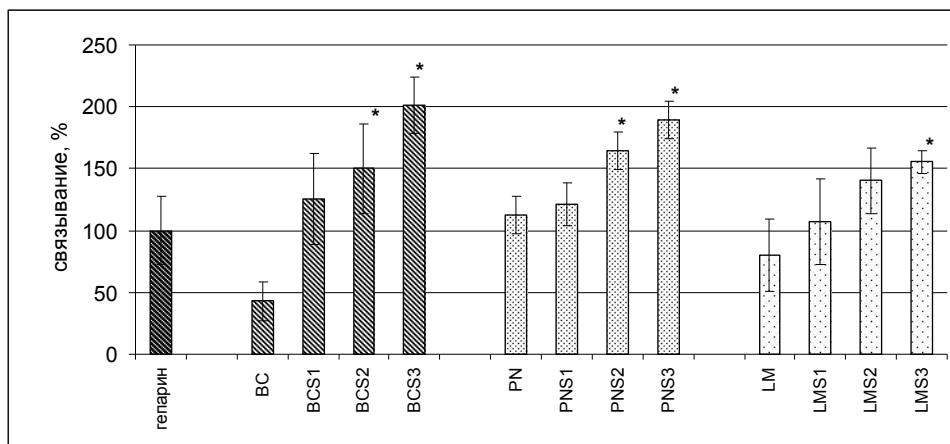
1. Greinacher A., Alban S., Omer-Adam M.A., Weitschies W., Warkentin T.E. // *Thrombosis Res.* 2008. V.122. P. 211–220.
2. Hirsh J., Raschke R. // *Chest.* 2004. V.126. P. 188–203.
3. Javier D-N., Francisco W., Jesús A. // *Peptides.* 2002. V.23. P. 1323–1332.
4. Stevenson J.L., Varkia A., Borsig L. // *Thrombosis Res.* 2007 V.120. Suppl. 2, P. S107–S111.
5. Yu P., Ning L., Xiguang L., Gefei Z., Quanbin Z., Pengchen L. // *Pharmacol. Res.* 2003. V.48. P. 543–549.
6. Yu P., Quanbin Z., Ning L., Zuhong X., Yanmei W., Zhi'en L. // *Applied Phycol.* 2003. V.15. P. 21–27.
7. Kobayashi M., Magishi N., Matsushita H., Hashimoto T., Fujimoto M., Suzuki M., Tsuji K., Saito M., Inoue E., Yoshikawa Y., Matsuura T. // *Mol. Med.* 2008. V.22. P. 565–570.
8. Haiping Li., Ph D., Mingming Zhang, B.S., Guiji Ma B.S. // *Nutrition.* 2010. V.26. P. 556–562.
9. Jamborova G., Pospisilova N., Semecky V., Hyspler R., Ticha A., Pospechova K., Solichova D., Maxova M., Briestensky J., Real K.J., Nachtigal P. // *Nutrition.* 2008. V.24. P. 1174–1181.
10. Zhang H-l., Jiao Guo Y. T., Hu Y., Su Z. // *Intern. Immunopharmacol.* 2011. V.11. P. 457–461.
11. Vergara-Jimenez M., Conde K., Erickson S K., Fernandez M L. // *J. Lipid Res.* 1998. V.39. P. 1455–1465.
12. Хотимченко М. Ю. // *Биол. моря.* 2009. Т. 35. №4. С. 302–305
13. Golovchenko V.V., Ovodova R.G., Shashkov A.S., and Ovodov Yu.S. // *Phytochemistry.* 2002. V.60. P. 89–97.
14. Головченко В.В., Бушнева О.А., Оводова Р.Г., Шашков А.С., Чижов А.О., Оводов Ю.С. // *Биоорган. химия.* 2007. Т.33. С. 54–63.
15. Popov S.V., Popova G.Y., Paderin N.M., Koval O.A., Ovodova R.G., Ovodov Y.S. // *Phyther Res.* 2007. V. 21. P. 609-614.
16. Злобин А.А., Оводова Р.Г., Попов С.В. // *Химия раст. сырья.* 2003. №2. С. 39–44.
17. Витязев Ф.В., Головченко В.В., Патова О.А., Дрозд Н.Н., Макаров В.А., Шашков А.С., Оводов Ю.С. // *Биохимия.* 2010. Т. 75. N 6. С. 857–867.
18. Usov A.I., Bilan M.I., Klochkova N.G. // *Bot. marina.* 1995. V. 38. P. 43–51.
19. Dodgson K.S., Price R.G. // *Biochem. J.* 1962. V.84. P. 106-110.
20. York W.S., Darvil A.G., McNeil M., Stevenson T.T. // *Meth. Enzymol.* 1986. V. 118. P. 3–40.
21. Прозоровский В., Прозоровская М., Демченко В. // *Фармакол. токсикол.* 1978. №4. С. 497-502.
22. Климов А.Н., Ловягина Т.Н., Баньковская Э.Б. // *Лаб. дело.* 1966. Т.5. С. 276–279.

**Таблица.** Характеристика пектинов  
и их сульфатированных производных

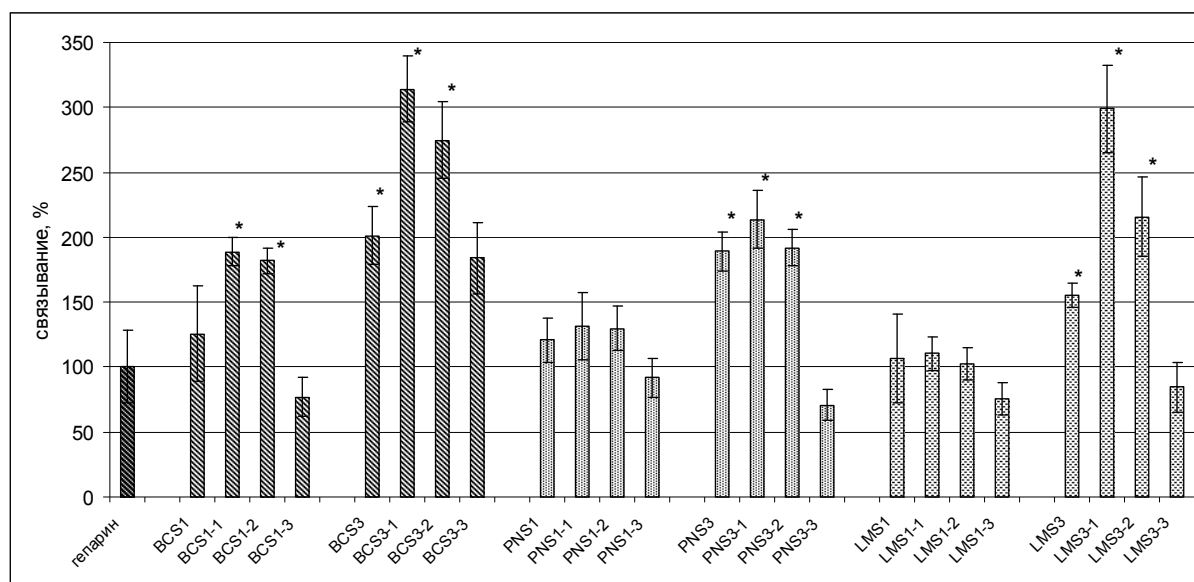
Полисахарид	Состав, % по массе			M, кДа	Связывание ЛПН*, %
	GalA	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HM		
BC	84	-	9	540	43
BCS1	51	28	5	455	126
BCS1-1	51	28	5	446	189
BCS1-2	49	21	5	60	182
BCS1-3	45	18	6	3	77
BCS2	49	40	5	508	150
BCS3	48	45	4	206	201
BCS3-1	49	48	3	260	314
BCS3-2	51	45	2	114	275
BCS3-3	51	40	3	57	184
PN	87	-	6	349	113
PNS1	80	6	6	240	121
PNS1-1	87	7	4	245	131
PNS1-2	77	9	4	60	130
PNS1-3	60	10	5	30	92
PNS2	48	39	3	358	165
PNS3	43	45	4	458	189
PNS3-1	46	45	2	410	214
PNS3-2	37	42	3	140	192
PNS3-3	29	33	4	4	71
LM	64	-	35	260	80
LMS1	64	7	23	205	107
LMS1-1	66	7	25	208	110
LMS1-2	57	9	30	74	103
LMS1-3	40	12	35	36	76
LMS2	40	33	13	216	156
LMS3	36	43	11	208	299
LMS3-1	34	40	11	236	216
LMS3-2	34	37	12	70	85
LMS3-3	23	36	10	36	156

\*Связывание определяли в процентах к контролю (гепарин)

## РИСУНКИ



**Рис. 1.** Зависимость связывания ЛНП сыворотки крови человека от степени сульфатирования производных пектинов (контроль – гепарин). \* Различия достоверны при  $p < 0,05$ .



**Рис. 2.** Зависимость связывания ЛНП сыворотки крови человека от молекулярной массы сульфатированных производных пектинов (контроль – гепарин). \* Различия достоверны при  $p < 0,05$ .



# BINDING OF HUMAN SERUM LOW-DENSITY LIPOPROTEIN -CHOLESTEROL *in vitro* BY SULFATED PECTIN DERIVATIVES

F.V. Vityazev\*, N.M Paderin, V. V. Golovchenko

*Institute of Physiology, Komi Science Centre, The Urals Branch, Russian Academy of Sciences, ul.  
Pervomaiskaya 50, 167982 Syktyvkar, Russia.*

The ability to bind human serum LDL-C *in vitro* by the native pectins is lower than that of their sulfation derivatives. The number of sulfate groups and molecular weight of the sulfated derivatives are assumed to be crucial factors. The sulfated derivatives of pectin with molecular weight above 200kDa containing 45 wt% sulfate groups possess the highest ability to bind atherogenic lipids, the lowest activity was estimated for the derivatives with molecular weight below 50kDa containing 5 wt% of sulfate groups.

**Key words:** *low-density lipoproteins, pectins, pectin sulfates, binding LDL-C.*

---

Abbreviations: BC – bergenia pectin, LM – pectin of duckweed, PN – pondweed pectin, BCS1, BCS2 and BCS3 – sulfated derivatives of bergenia pectin, LMS1, LMS2 and LMS3 – sulfated derivatives of pectin of duckweed, PNS1, PNS2 and PNS3 – sulfated derivatives of pondweed pectin, low-density lipoprotein – LDL-C.

\* To whom correspondence should be addressed; tel/fax +7(8212)241001; e-mail:rodefex@mail.ru