

Д.О. Пашевін, В.Є. Досенко, Ю.В. Биць, О.О. Мойбенко

Активність протеасоми в тканинах аорти, серця та лейкоцитах крові в процесі моделювання холестеринового атеросклерозу

В експериментах по моделюванню холестеринового атеросклероза у кроликів (1%-я холестеринова дієта на протязенні 2 мес) установлені характерні змієненія трипсиноподобної (ТП), химотрипсиноподобної (ХТП) і пептидилглютамил-пептидгідролазної (ПГПГ) активності протеасоми в тканинах аорти, серця і ізолированих лейкоцитах крові. Показано, що холестеринова дієта приводить к суттєвому підвищенню ТП (в 3,2 рази), ПГПГ (в 1,8 рази, $P=0,003$) активності протеасоми в тканинах аорти, а також ПГПГ (в 1,8 рази, $P=0,003$) – в миокарде. В ізолированих моноцитах крові достовірно збільшувалась ХТП (в 1,9 рази, $P=0,05$) і ПГПГ (в 11,6 рази, $P=0,0001$), а в нейтрофільних гранулоцитах – ПГПГ (в 1,8 рази, $P=0,031$) активність протеасоми. Активність протеасоми в лимфоцитах при моделюванні атеросклероза суттєво не мінялась. Приведеніє результати свідчать про те, що алиментарна гиперхолестеринемія приводить к значимим змієненням активності протеасоми в серцево-судинній системі і клієтках крові, приймаючих участь в атерогенезі.

ВСТУП

Вивчення фізіологічного та патофізіологічного значення убіквітинзалежного протеасомного протеолізу значно прискорилось після присудження у 2004 р. Нобелівської премії з хімії за відкриття цієї системи внутрішньоклітинної деградації білків. Відомо, що руйнування протеїнів у клієтині має велике значення в регуляції її життєдіяльності, а його порушення є основою для розвитку патологічних процесів. Зокрема, це стосується найбільш розповсюдженого патологічного процесу в серцево-судинній системі – атеросклерозу, в патогенезі якого досить велике значення завжди приділялося механізмам із залученням протеолітичних ферментів. Протягом останніх років було показано, що протеасомне розщеплення внутрішньоклітинних білків має принципове значення в атерогенезі як фактор регуляції обміну

ліпопротеїдів, експресії молекул клієтинної адгезії, рециклінгу рецепторів, апоптозу гладеньком'язових та ендотеліальних клієтин [1, 2, 10, 11, 17, 20, 26, 29, 31]. З'явилися і перші дані про змієні активності протеасоми та їх наслідки при моделюванні атеросклерозу [12], а також в артеріальних судинах людей, хворих на ішемічну хворобу серця [13]. Versari та співавт. [29] вдалося встановити, що в атеросклеротично змієнених сонних артеріях значно зменшується активність протеасоми та накопичуються убіквітинові кон'югати, що локалізуються з 3-нітротирозином (маркер нітрозильованих протеїнів) у гладеньком'язових клієтинах і макрофагах.

Окрему проблему становить вивчення протеасомного протеолізу при патології серця [19]. Згідно з даними Vulteau A.-L. та співавт. [4] оклюзія коронарної артерії з наступною реперфузією призводить до

© Д.О. Пашевін, В.Є. Досенко, Ю.В. Биць, О.О. Мойбенко

зменшення активності протеасоми в ішемізованій ділянці. Застосування антиоксидантів як відомих кардіопротекторів спричинює стабілізацію активності протеасоми при ішемії–реперфузії, тобто перешкоджає зниженню її під час ішемії [9]. З іншого боку, доведено, що інгібітори протеасоми можуть зменшувати ступінь ураження органів при ішемічному ушкодженні серця, мозку та нирок [15, 19]. Не менш цікавим є вивчення протеасомного протеолізу при хронічній серцевій недостатності. Kostin і співавт. показали [18], що в міокарді людей із серцевою недостатністю, виникають порушення процесів убіквітинізації (збільшення експресії убіквітину та активності убіквітин-кон'югуючого ферменту) та деубіквітинізації (зниження активності ізопептидази Т) при незмінній активності протеасоми та її субодичного складу.

Таким чином, є підстави вважати, що порушення протеасомного протеолізу мають патогенетичне значення при патології серцево-судинної системи, однак майже немає відомостей про зміни активності протеасоми в тканинах серця, судин і клітинах крові при моделюванні атеросклерозу.

Мета нашого дослідження полягала у визначенні хімотрипсиноподібної (ХТП), трипсиноподібної (ТП) та пептидилглютамілпептидгідролазної (ПГПГ) активності протеасоми в динаміці моделювання холестеринового атеросклерозу в тканинах аорти, серця, а також в ізольованих лейкоцитах крові.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на кролях обох статей (середня маса $2,95 \text{ кг} \pm 0,35 \text{ кг}$), яких розділили на дві групи – контрольну (10 кролів) і дослідну (15 кролів). Тварини дослідної групи отримували корм з підвищеним вмістом холестерину (1%) протягом 8 тиж. На 8-му тижні експерименту у тварин контрольної та дослідної груп проводили забір крові з крайової вени вуха для визначення активності протеасоми у клітинах крові.

Фракціонування крові проводили з використанням центрифугування в градієнті перколу. Для цього стабілізовану натрієвою сіллю ЕДТА кров розводили 0,9%-м розчином хлористого натрію в співвідношенні 1:1, після чого нашаровували на заздалегідь підготовлений градієнтний розчин перколу, який складався з 4 шарів з відносною густиною 72, 63, 54 і 45 %. Указані концентрації перколу одержували при змішуванні 9 частин перколу і 1 частини 10-кратного розчину Хенкса (рН 7,0), після чого необхідної густини досягали розбавленням відповідною кількістю 0,9%-го розчину хлористого натрію. Центрифугування крові проводилося в два етапи: 1) при 400 g протягом 5 хв, після чого відбирали перший надосадовий шар, а відібраний об'єм заповнювали фізіологічним розчином; 2) при 800 g протягом 15 хв, з наступним відбором клітин між шарами густини 45 і 54 % (моноцити), 54 і 63% (лімфоцити), 63 і 72 % (нейтрофільні гранулоцити). Відмивання клітин від перколу проводили центрифугуванням протягом 5 хв при 800 g (моноцити та лімфоцити) і 850 g з наступним відбором осаду та його ресуспензуванні в розчині Хенкса. Кількість клітин оцінювали за допомогою підрахунку клітин в камері Горяєва, після чого клітини піддавали дії ультразвуку максимальної інтенсивності протягом трьох хвилин з використанням ультразвукового диспергатора УЗДН А, робили проникними їх мембрани додаванням 10 мкл сапоніну (10 мг/мл) і використовували для біохімічного аналізу.

Визначення ХТП, ТП та ПГПГ-активності протеасоми проводили в 0,025 моль/л тріс-НСІ-буфері (рН 7,5), що містив у кінцевій концентрації 6 мкмоль/л одного із субстратів протеасоми: сукциніл-лейцин-лейцин-валін-тирозин-7-амідо-4-метилкумарину (LLVT-АМС), бок-лейцин-серин-треонін-аргінін-7-амідо-4-метилкумарину (LSTA-АМС) або N-Cbz-лейцин-лейцин-глутамін-амідо-4-метилкумарину (LLG-АМС) [4]. Проби інкубували із зазначеними

субстратами при 37°C протягом 30 хв (при визначенні ТП-активності) та 60 хв (для двох інших). Мірою активності протеасоми була інтенсивність гідролізу специфічних флуорогенних субстратів, яку визначали на спектрофлуориметрі Hitachi-4000 (довжина хвилі збудження/емісії (360/440)). Для підтвердження специфічності протеасомного гідролізу використовували селективні інгібітори протеасоми – класто-лактацистин β -лактон і MG-132 у концентрації 5 мкмоль/л. Відсоток зменшення активності гідролізу відповідних субстратів під дією вказаних інгібіторів трактували як активність протеасоми і виражали в наномолях 7-аміно-4-метилкумарину на 1 млн. клітин за 1 хв. Калібрувальні графіки будували з використанням послідовних розведень 7-аміно-4-метилкумарину (від 0,017 до 0,272 мкмоль/л).

Для дослідження активності протеасоми у тканинах тварин піддавали евтаназії за допомогою повітряної емболії. Аорту гомогенізували в скляному гомогенізаторі в тріс-НСІ-буфері (рН 7,4), центрифугували (900 g протягом 10 хв), а супернатант використовували для біохімічного дослідження. Вміст білка в гомогенатах аорти

визначали за методом Lowry [23]. Активність протеасоми виражали в наномолях 7-амідо-4-метилкумарину на 1 мг білка за 1 хв. Флуорогенні субстрати, класто-лактацистин β -лактон, MG-132, солі, 7-аміно-4-метилкумарин, дитіотреїтол, суміш інгібіторів протеїназ були виробництва фірми “Sigma” (США), “PSI – ICN” (США). Отримані результати обробляли математично з використанням комп’ютерних програм Origin 7.0 і Excel 97. Достовірність різниці середніх величин визначали за критерієм t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Згодовування кролям корму, збагаченого холестеринном, протягом 2 міс призводило до розвитку вираженої гіперхолестеринемії. Якщо у контрольних тварин вміст холестерину у плазмі крові становив 1,7 ммоль/л, то через 4 тиж гіперхолестеринової дієти він збільшився до 36 ммоль/л, а через 8 тиж сягнув 39 ммоль/л, тобто підвищився у 23 рази.

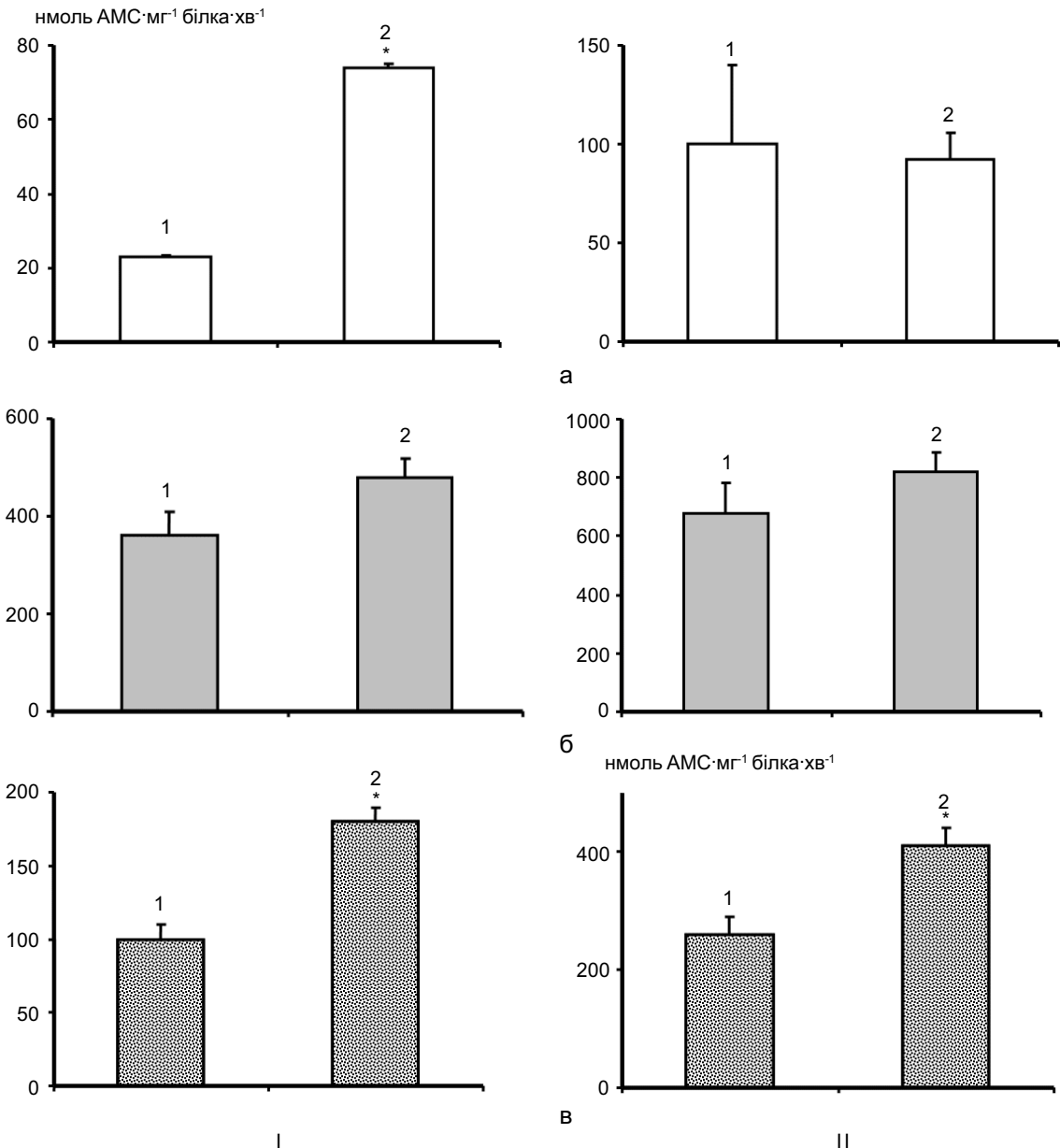
Отримані результати свідчать про суттєвий вплив гіперхолестеринової дієти на активність протеасоми як в ізольованих лейкоцитах кролів, так і в тканинах аорти та серця (таблиця, рисунок). При цьому

Зміни активності протеасоми (нмоль 7-амідо-4-метилкумарину на 1 млн клітин за 1 хв) в ізольованих лейкоцитах крові при моделюванні холестеринного атеросклерозу (M \pm m)

Схема досліджу	Трипсиноподібна активність	Хімотрипсиноподібна активність	Пептидилглютаміл пептидгідролазна активність
	Моноцити		
Контроль (n=19)	25,22 \pm 7,26	22,0 \pm 1,97	0,059 \pm 0,0082
Холестеринова дієта (n=10)	37,25 \pm 16,6 P=0,45	41,2 \pm 12,01 P=0,05	0,68 \pm 0,15 P=0,0001
	Лімфоцити		
Контроль (n=18)	1,14 \pm 0,27	8,46 \pm 1,61	0,1 \pm 0,03
Холестеринова дієта (n=18)	0,634 \pm 0,13 P=0,14	8,63 \pm 2,12 P=0,95	0,139 \pm 0,043 P=0,5
	Гранулоцити		
Контроль (n=18)	0,327 \pm 0,01	3,83 \pm 0,6	0,27 \pm 0,05
Холестеринова дієта (n=10)	0,438 \pm 0,05 P=0,4	3,44 \pm 0,8 P=0,71	0,49 \pm 0,07 P=0,03

окремі види протеїназної активності вказаного мультиферментного комплексу змінюються по-різному. Так, у моноцитах ТП-активність протеасоми збільшується в 1,5 раза ($P=0,45$), ХТП – в 1,9 раза ($P=0,05$), а ПГПГ – в 11,6 раза ($P=0,0001$). У лімфоцитах динаміка іншого характеру: ТП-активність протеасоми у лімфоцитах змен-

шується на 44 % ($P=0,95$), а ХТП і ПГПГ-активності суттєво не змінюються порівняно з контролем. Зміни в нейтрофільних гранулоцитах мають ту саму спрямованість, що й у моноцитах – ТП та ПГПГ-активності збільшуються на 34 % ($P = 0,4$) та у 1,8 раза ($P = 0,031$) відповідно, а ХТП-активність практично не змінювалася.



Зміни трипсиноподібної (а), хімотрипсиноподібної (б) та пептидилглютаміл пептид-гідролазної (в) активності протеасоми в тканинах аорти (I) та серця (II) при моделюванні холестеринового атеросклерозу: 1 – контроль, 2 – холестеринова дієта. AMC – 7-амідо-4-метилкумарин. * $P < 0,05$ порівняно з контролем

Таким чином, можна зробити попередній висновок про вплив гіперхолестеринемії на активність протеасоми в моноцитах і нейтрофільних гранулоцитах, причому найбільшою мірою це позначалося на активності ПГПГ, яка вірогідно збільшувалася у цих типах лейкоцитів. Зважаючи на велике значення моноцитів, як попередників тканинних макрофагів і “пінистих клітин” в атерогенезі, можна прогнозувати, що збільшення активності внутрішньоклітинної деградації протеїнів у цих клітинах може мати патогенетичне значення. Зокрема встановлено, що ліпополісахариди спричиняють підвищення активності ХТП та ПГПГ протеасоми в макрофагах, наслідком чого є збільшення експресії прозапальних генів (фактор некрозу пухлин β , ІЛ-6, ІЛ-12, іNOS, циклооксигеназа 2) [22]. Інгібітор протеасоми запобігав цьому ефекту ліпополісахаридів, який пов’язаний, зокрема, із активацією утворення транскрипційного фактора NF- κ B. Отже, холестерин і ліпополісахариди односпрямовано впливають на активність протеасоми у макрофагах, що забезпечує прозапальну активацію цих клітин і збільшує їх активність у разі потрапляння до тканин судинної стінки. Відомо, що ліпополісахариди також здатні ініціювати атерогенез [25].

У тканинах аорти зміни протеасомного протеолізу мали таке саме спрямування, що і у клітинах крові (моноцити та нейтрофільні гранулоцити). ТП-активність протеасомного комплексу збільшилась у 3,2 рази порівняно з контролем ($P=0,003$), ХТП – у 1,33 рази ($P=0,11$), а ПГПГ – у 1,8 рази ($P = 0,003$). Отримані результати певною мірою збігаються з даними Herrmann і співавт. [12], де холестериновий атеросклероз моделювався у свиней (утримання на гіперхолестериновій дієті протягом 12 тиж). За даними цієї групи дослідників, ХТП-активність мала тенденцію до збільшення, однак ПГПГ-активність не змінювалася. Розбіжності в результатах слід пов’язувати з вибором тва-

рин для проведення експериментів – траводні кролі є більш чутливими до гіперхолестеринемії порівняно зі свинями, які вживають продукти як рослинного, так і тваринного походження. Вказаних дослідах вміст холестерину у свиней збільшувався лише у 5,3 рази через 3 міс (у наших дослідах концентрація холестерину перевищувала контрольні значення у 23 рази). Для відтворення атеросклерозу у всеїдних тварин як правило, крім холестеринової дієти додатково ушкоджують судинну стінку. Крім того, відмінності можуть бути зумовлені регіональними особливостями судин, бо вищезгадані дослідники вивчали зміни протеасомної активності у вінцевих судинах, а не в аорті. Однак абсолютно протилежні дані було отримано при визначенні протеасомної активності у сонних артеріях людей, хворих на атеросклероз – спостерігалось значне зниження ХТП-активності протеасоми [29]. Аналіз цих даних наводить на думку про відмінності протеасомної активності на різних стадіях атерогенезу, бо в будь-якому разі в експерименті неможливо відтворити вплив атерогенних факторів, що спостерігаються протягом життя людини.

Зміни протеасоми в тканинах серця мали менш виражений характер, ніж в аорті. Вірогідно змінювалася ПГПГ-активність – у 1,57 рази ($P = 0,007$), а зміни двох інших не були достовірними. Зіставити отримані результати з даними досліджень інших авторів ми не можемо, бо таких до сьогодні не проводилося. Проте зміни в протеасомному протеолізі виявлено при різних патологічних процесах у серці. Так, у праці Tsukamoto і співавт. [27] показано, що при відтворенні перенавантаження серця у мишей в тканинах міокарда знижується активність протеасоми та накопичуються убіквітинізовані білки. Їх кількість вірогідно збільшувалася в 2 рази через 2 тиж після оперативного втручання та у 2,8 рази – через 4 тиж. Такі самі зміни спосте-

рігалися в міокарді людей із хронічною серцевою недостатністю. Інгібітори протеасоми (MG 132 у концентрації 0,5 мкмоль/л і лактацистин у концентрації 10 мкмоль/л) за даними цих авторів спричинювали порушення рівноваги між про- і антиапоптотичними білками в бік перших у культурі неонатальних кардіоміоцитів. Зокрема, значно підвищувався вміст проапоптотичних білків p53 та bax. Введення в клітини малих інтерферуючих РНК (siRNA), які пригнічували синтез вказаних білків, запобігало апоптотичній загибелі кардіоміоцитів при дії інгібіторів протеасоми. В цілому автори роблять висновок, що пригнічення активності протеасоми є одним із механізмів розвитку серцевої недостатності, бо спричинює розвиток апоптозу кардіоміоцитів і, таким чином, зменшує кількість функціонуючих клітин серця.

Добре відомо, що ймовірність розвитку захворювань серця збільшується з віком, що деякі автори пов'язують із зниженням експресії субодиниць протеасоми. Із використанням технології генетичних матриць (мікрочіпів) встановлено, що серед 6347 генів лише в 2 % спостерігається залежне від віку зменшення експресії. І серед цього 2 відсотка є гени, які кодують субодиниці 20S та 26S протеасоми [7, 8]. Паралельно зі зниженням експресії субодиниць протеасоми спостерігається і накопичення модифікованих окисненням білків [7]. У дослідженнях на щурах віком 8, 21 та 26 міс було показано, що активність усіх трьох каталітичних субодиниць протеасоми в тканинах серця значно знижується з віком [5]. Найбільше це стосується ТП-активності протеасоми. Пурифікована із тканин серця старих тварин 20S протеасома також відрізнялася меншою казеїнолітичною та пептидазною активністю. Використовуючи двомірний електрофорез, ці дослідники показали, що при старінні змінюється субодиничний склад мультикаталітичного ферментного комплексу – у старих тварин

в складі протеасоми значно більше субодиниць Zeta, N3, C10 та Z, а у молодих – Y та C2. Поряд із цими змінами, звичайно, спостерігалось і накопичення убіквітинізованих, окиснених білків у тканинах серця старих тварин.

З іншого боку, Zhang L. і співавт. [32] показали, що інгібітори протеасоми значно зменшують розмір інфаркту мозку при емболії середньої церебральної артерії у щурів. В експериментах Campbell B. і співавт. [6], проведених на ізольованому серці з перфузією його розчином, який містив нейтрофільні гранулоцити, використання інгібіторів протеасоми зменшувало ступінь ушкодження міокарда при ішемії–реперфузії. Таким чином питання про лікувальну стратегію щодо впливу на протеасомий протеоліз при патології серця залишається відкритим, невідомо зокрема, наскільки доцільно пригнічувати активність протеасоми, що й так зменшується з віком чи, навпаки, треба сприяти активації цього макромолекулярного комплексу, активність якого, за нашими результатами, при моделюванні холестеринового атеросклерозу, збільшується. На нашу думку, збільшення активності протеасоми на ранніх стадіях атерогенезу, що спостерігається як у клітинах крові, так і в тканинах аорти, є результатом компенсаторної активації внутрішньоклітинного протеолізу [20] внаслідок підвищення кількості модифікованих, окиснених, ушкоджених білків, які є субстратами протеасомної деградації. Доведено, що кількість цих протеїнів збільшується за умов експериментальної гіперхолестеринемії [24], а застосування антиоксидантів призводить до зменшення експресії субодиниць протеасоми та функціональних порушень у протеасомальному протеолізі [26]. З іншого боку, прозапальна відповідь клітин організму, що спостерігається при холестеринозі, також потребує залучення протеасомного протеолізу [3, 14, 23]. Звісно з часом ці компенсаторні меха-

нізми виснажуються і активність протеасоми набуває значень, що характерні для за давнених стадій як атерогенезу, так і асоційованих з віком захворювань серця [1, 7, 8].

D.A.Pashevyn, V.E.Dosenko, Yu.V.Byts, A.A.Moibenko

PROTEASOME ACTIVITY CHANGES IN AORTA, HEART TISSUES AND BLOOD LEUCOCYTES IN MODELLING OF CHOLESTEROL ATHEROSCLEROSIS

In experiments on modelling of cholesterol atherosclerosis in rabbits (1% cholesterol-rich diet during 2 month) it was determined changes of trypsin-like (TL), chymotrypsin-like (CHTL) and peptidylglutamylpeptidase (PGPG) proteasomal activity in tissues of aorta, heart and isolated blood leukocytes. It was shown that cholesterol-rich diet caused significant increase of TL (3.2 fold, $P=0.003$), PGPG (1.8 fold, $P=0.003$) proteasomal activity in aorta tissues, and PGPG activity (1.8-times, $P=0.003$) in myocardium. In isolated blood monocytes, the CHTL and PGPG activities were significantly increased (1.9 fold, $P=0.05$ and 11.6 fold, $P=0.0001$, respectively) and in PMN leucocytes the PGPG activity of proteasome was also significantly increased (1.8 fold, $P=0.031$). Proteasomal activity in lymphocytes during cholesterol atherosclerosis modelling had no significant changes. The data obtained indicate that alimentary hypercholesterolemia induces considerable changes of proteasomal activity in cardio-vascular system and blood cells that take part in atherogenesis.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

O.O. Bogomoletz National Medical University, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Биць Ю.В., Досенко В.С., Медведєв В.В. Роль апоптозу в патогенезі атеросклерозу // *Фізіол. журнал.* – 2000. – **46**, №5. – С.83–93.
2. Гольдберг А., Еледж С., Гарпер Дж.В. Механізми клітинної смерті // *Світ науки.* – 2001, № 2. – С.32–37.
3. Brand K., Eisele T., Kreusel U. et al. Dysregulation of monocytic nuclear factor – kappa B by oxidized low-density lipoprotein // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 1997. – **17**, №10. – P.1901–1909.
4. Bulteau A. – L., Lundberg K.C., Humphries K.M. et al. Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/reperfusion // *J. Biol. Chem.* – 2001 – **276**, №32. – P.30057–30063.
5. Bulteau A.L., Szweda L.I., Friguet B. Age-dependent declines in proteasome activity in the heart // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2002. – **397**, №2. – P.298–304.
6. Campbell B., Adams J., Shin Y.K. et al. Cardio-protective effects of a novel proteasome inhibitor following ischemia and reperfusion in the isolated perfused rat heart // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 1999. – **31**, №2. – P.467–476.
7. Carrard G., Bulteau A.L., Petropolus Friguet B. Impairment of proteasome structure and function in aging // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2002. – **34**. – P.1461–1474.
8. Carrard G., Dieu M., Raes M. et al. Impact of ageing on proteasome structure and function in human lymphocytes // *Int. J. Biochem.* – 2003. – **35**. – P.728–739.
9. Das S., Powell S.R., Wang P. et al. Cardioprotection with palm tocotrienol: antioxidant activity of tocotrienol is linked with its ability to stabilize proteasomes // *Amer. J. Physiol. Heart Circulat. Physiol.* – 2005. – **289**. – H361–H367.
10. Drexler HC, Risau W, Konecny MA. Disregulation of proteasome function induces programmed cell death in proliferating endothelial cells // *FASEB J.* – 2000. – **14**, №1 – P. 65–77.
11. Dupre D.J., Chen Z., Le Gouill C. et al. Trafficking, ubiquitination, and down – regulation of the human platelet-activating factor receptor // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**, №48. – P.48228–48235.
12. Hermann J., Gulati R., Napoli C. et al. Oxidative stress-related increase in ubiquitination in early coronary atherosclerosis // *FASEB J.* – 2003. – **17**, №12. – P.1730–1732.
13. Herrmann J, Ciechanover A, Lerman LO, Lerman A. The ubiquitin-proteasome system in cardiovascular diseases – a hypothesis extended // *Cardiovasc. Res.* – 2004. – **61**, №1. – P.11–21.
14. Hipp M.S., Urbich C., Mayer P. et al. Proteasome inhibition leads to NF-kappaB-independent IL-8 transactivation in human endothelial cells through induction of AP-1 // *Eur. J. Immunol.* – 2002. – **32**, №8. – P. 2208–2217.
15. Itoh M., Takaoka M., Shibata A. et al. Preventive effect of lactacystin, a selective proteasome inhibitor, on ischemic acute renal failure in rats // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2001. – **298**. – P.501–507.
16. Kikuchi J., Furukawa Y., Kubo N. et al. Induction of ubiquitin-conjugating enzyme by aggregated low density lipoprotein in human macrophages and its implications for atherosclerosis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2000. – **20**, №1. – P.128–134.
17. Kim HH, Kim K. Enhancement of TNF-alpha-mediated cell death in vascular smooth muscle cells through cytochrome c-independent pathway by the proteasome inhibitor // *FEBS Lett.* – 2003. – **535**, №1–3. – P.190–194.
18. Kostin S., Pool L., Elsasser A. et al. Myocytes die by multiple mechanisms in failing human heart // *Circulat. Res.* – 2003. – **92**, №7. – P.715–724.
19. Kukan M. Emerging roles of proteasomes in ischemia-reperfusion injury of organs // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2004. – **55**. – P.3–15.

20. Li W., Yuan X.M., Olsson A.G., Brunk U.T. Uptake of oxidized LDL by macrophages results in partial lysosomal enzyme inactivation and relocation // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 1998. – **18**. – P.177–184.
21. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. et al. Protein measurement with Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – 193. – P.265–275.
22. Qureshi N., Perera P.Y., Shen J. et al. The proteasome as a lipopolysaccharide-binding protein in macrophages: differential effects of proteasome inhibition on lipopolysaccharide-induced signaling events // *J. Immunol.* – 2003. – **171**(3). – P.1515–25.
23. Robbesyn F., Garcia V., Auge N. et al. HDL counterbalance the proinflammatory effect of oxidized LDL by inhibiting intracellular reactive oxygen species rise, proteasome activation, and subsequent NF-kappaB activation in smooth muscle cells // *FASEB J.* – 2003. – **6**. – P.743–745.
24. Silaste M.L., Rantala M., Alfthan G. et al. Changes in dietary fat intake alter plasma levels of oxidized low-density lipoprotein and lipoprotein(a) // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2004. – **24**, №3. – P.498–503.
25. Stoll L.L., Denning G.M., Weintraub N.L. Potential role of endotoxin as a proinflammatory mediator of atherosclerosis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2004. – **24**. – P.2227–2236.
26. Takabe W., Kodama T., Hamakubo T. et al. Anti-atherogenic antioxidants regulate the expression and function of proteasome alpha-type subunits in human endothelial cells // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**, №44. – P.40497–40501.
27. Tsukamoto O., Minamino T., Okada K. et al. Depression of proteasome activities during the progression of cardiac dysfunction in pressure-overloaded heart of mice // *Biochem. Biophys. Res. Com.* – 2006. – **340**. – P.1125–1133.
28. Tummala P.E., Chen X.L., Sundell C.L. et al. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis // *Circulation.* – 1999. – **100**, №11. – P.1223–1229.
29. Versari D., Herrmann J., Güssl M., et al. Dysregulation of the ubiquitin-proteasome system in human carotid atherosclerosis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – **26**, №9. – P.2132–2139.
30. Vieira O., Escargueil-Blanc I., Jurgens G. Oxidized LDLs alter the activity of the ubiquitin-proteasome pathway: potential role in oxidized LDL-induced apoptosis // *FASEB J.* – 2000. – **3**. – P.532–542.
31. Wenner C., Lorkowski S., Engel T., Cullen P. Apolipoprotein E in macrophages and hepatocytes is degraded via the proteasomal pathway // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2001. – 282, №2. – P.608–614.
32. Zhang L., Zhang Z.C., Zhang R.L. et al. Postischemic (6-Hour) treatment with recombinant human tissue plasminogen activator and proteasome inhibitor PS-519 reduces infarction in a rat model of embolic focal cerebral ischemia // *Stroke.* – 2001. – **32**. – P.2926–2931.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;
Нац. мед. ун-т ім. О.О. Богомольця, Київ*

*Матеріал надійшов до
редакції 30.08.2007*