

УДК 612.015.1-324:15

Котюжинская С. Г., Гоженко А. И., Савицкий И. В., Свирский А. А.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИПИДТРАНСПОРТНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРЛИПИДЕМИИ НА ФОНЕ ГИПЕРГЕПАРИНЕМИИ

Одесский национальный медицинский университет
ГП «Украинский НИИ медицины транспорта», г. Одесса

Известно, что транспорт липопротеинов осуществляется через межклеточные эндотелиальные каналы и неповрежденные эндотелиальные клетки и зависит от липолитической активности сосудистой стенки. Однако усвоение липопротеинов тканями начинается с действия на них липопротеинлипазы, которая расщепляет основные энергетически значимые липиды на жирные кислоты и глицерин, при этом основным механизмом управления ее ферментативной активностью является гепарин. Целью нашего исследования было изучение особенностей показателей липидтранспортной системы у животных при экспериментальной гиперлипидемии в условиях гипергепаринемии. Гиперлипидемию в эксперименте воспроизводили на 25 белых беспородных половозрелых крысах-самцах по методу В. Е. Рыжкова и В. Г. Макарова на фоне одновременного введения водного раствора гепарина в дозе 50 МЕ/кг в течение 21 дня. В ходе исследования оценивали липидный и жирнокислотный спектр крови и активность липопротеинлипазы (по методу Т. Oliversona в модификации В. Н. Титова). Выявлена выраженная гипохолестеринемия и гипотриглицеридемия при увеличении содержания антиатерогенных ХС ЛПВП на фоне снижения уровня насыщенных жирных кислот и увеличения пула ПНЖК, что свидетельствовало о формировании стойкой дислипидемии антиатерогенного генеза. Показано, что при стойкой гипергепаринемии происходит активация липопротеинлипазы, которая обеспечивает адекватный липолиз и не позволяет развиваться атерогенным нарушениям со стороны липидтранспортной системы.

Ключевые слова: липидтранспортная система, липопротеинлипаза, гепарин, экспериментальная гиперлипидемия.

Работа выполнялась в рамках плановой НИР Одесского национального медицинского университета МЗ Украины «Роль и механизмы нарушения липидтранспортной системы крови в патогенезе атеросклероза» (№ госрегистрации 0110U006663).

Известно, что в норме липидтранспортная система посредством липопротеинов обеспечивает доставку к клеткам холестерина и обратный его отток к печени, предупреждая избыточное внутриклеточное накопление с развитием цитотоксического эффекта [1,4,12]. При этом следует отметить, что метаболизм липопротеинов – сложный динамический процесс, включающий в себя не только разнообразное перемещение липидов и апопротеинов между отдельными классами липопротеинов, но и целый ряд реакций, катализируемых ферментами [3,9,11]. Эти взаимодействия приводят к рецепторно-опосредованному поступлению холестерина в клетку или к его удалению из клетки. Другими словами, в организме существует липидтранспортная система, обеспечивающая обмен липидов на должном уровне от потребностей организма [4,14].

Между тем усвоение липопротеинов тканями начинается с действия на них липопротеинлипазы, которая расщепляет основные энергетически значимые липиды на жирные кислоты и глицерин, последние и усваиваются тканями. Известно, что транспортировка липопротеинов осуществляется через межклеточные эндотелиальные каналы и неповрежденные эндотелиальные клетки и зависит от липолитической активности сосудистой стенки [2,5,13]. Важно подчеркнуть, что основным механизмом управления липопротеинлипазной актив-

цией является гепарин [7,15].

Цель исследования

Оценить состояние липидтранспортной системы при экспериментальной гиперлипидемии на фоне повышенного уровня гепарина в плазме крови.

Материалы и методы исследования

Экспериментальные исследования проведены в соответствии с положениями Конвенции по биоэтике Совета Европы (1997), Хельсинской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации (1996), Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 1986), общих этических принципов экспериментов на животных, принятые Первым национальным конгрессом Украины по биоэтике (2001).

Изучение состояния липидтранспортной системы проводили на 25 белых беспородных половозрелых крысах-самцах, массой 200-250 г. Гиперлипидемию в эксперименте воспроизводили по методу В.Е. Рыжкова и В. Г. Макарова атерогенной диетой, содержащей 30 % подсолнечного масла, 2,5% холестерина и 0,12% метилурацила, из расчета 1 г жировой нагрузки на

100 г массы тела, в течение 21 дня [8], на фоне одновременного введения водного раствора гепарина «Биолек» (Украина) в дозе 50 МЕ/кг.

Контрольные животные (n=10) получали 0,9 % раствор хлорида натрия в объеме доз экспериментальной группы и находились на стандартном рационе вивария, имея свободный доступ к пище и воде.

По истечении срока животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом. Проводили забор крови, которую стабилизировали цитратом натрия.

Активность липопротеинлипазы (ЛПЛ) плазмы крови определяли титрованием по методу T. Oliversona в модификации В. Н. Титова [9]. Показателем активности фермента является количество освобожденных жирных кислот из триглицеридов в течение 1 часа (ммоль/л/ч). Содержание гепарина определяли по реакции с толуидиновым синим по методу Piepkea в модификации А. П. Чернышовой [10].

Содержание в плазме крови липопротеинов определяли на автоанализаторе «Dixion Toqus» (Россия) с помощью ферментативных диагностических наборов фирмы «Биомарк» (г. Львов). Определение триглицеридов (ТГ) в сыворотке крови энзиматическим колориметрическим методом М. Флетчера [6]. Концентрация общего холестерина (ОХС) определялась стандартным ферментативным методом. Уровень холестерина в липопротеинах высокой плотности (ХС ЛПВП) определяли в супернатанте после осаждения из плазмы липопротеинов низкой (ХС ЛПНП) и очень низкой плотности (ХС ЛПОНП) смесью фосфоровольфрамата натрия с 0,5 М

хлоридом магния тем же методом, что и ОХС. Содержание ХС ЛПНП и ХС ЛПОНП вычисляли по формуле W.T. Friedwald et al. [6]. Для оценки степени риска атеросклероза рассчитывали коэффициент атерогенности (КА) по формуле А. Н. Климова [6].

Для оценки жирнокислотного спектра плазмы крови определяли концентрацию жирных кислот методом газовой хроматографии по методике F. Marangoni [9] на хромато-масс-спектрометре Agilent MS D 1100 (“Hewlett Packard”, США).

Статистический анализ результатов исследований проводили по общепринятым в экспериментальной медицине методам с использованием пакета программ “Microsoft Excel-2000”. Результаты обрабатывались параметрическими методами вариационной статистики и представлены в виде средних арифметических значений и ошибка средних значений ($M \pm m$). Достоверность различий между средними значениями в группах определяли по t-критерию Стьюдента, оценивая вероятность полученных результатов на уровне значимости не менее 95% ($p < 0,05$).

Результаты исследования и их обсуждение

Нами отмечено, что концентрация гепарина в крови у животных опытной группы была достоверно выше контрольных величин на 46,47 %, что позволяет говорить о развитии стойкого гипергепаринемического состояния в экспериментальной группе животных (рис. 1). На этом фоне отмечалось достоверное увеличение ферментативной активности ЛПЛ, которое составило 109,77 %, по сравнению с контрольными данными.

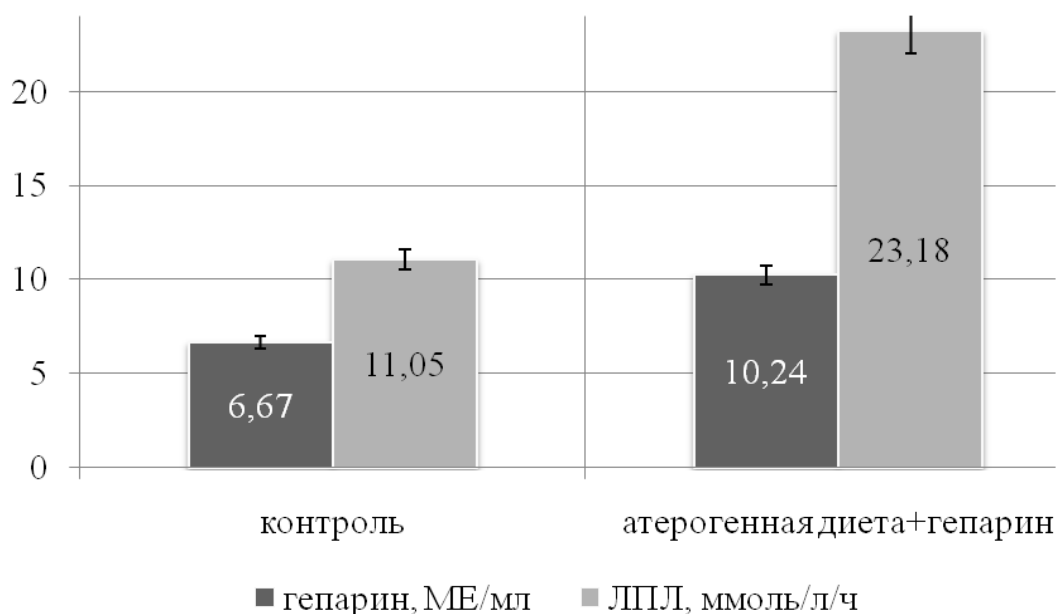


Рис. 1. Соотношение изменения динамики ЛПЛ и гепарина в исследуемых группах животных.

Состояния липидтранспортной системы в условиях гипергепаринемии характеризовалось снижением содержания в крови опытных животных уровня ОХС на 14,65 % по сравнению с контрольными данными (табл. 1).

Таблица 1.
Показатели липидного обмена у крыс, содержащиеся на атерогенной диете на фоне введения гепарина, (M±m)

Показатели, ммоль/л	Контрольная группа (n=10)	Атерогенная диета + гепарин (n=25)
ОХС	1,57±0,31	1,34±0,54
ТГ	1,15±0,02	1,05±0,03
ХС-ЛПВП	0,73±0,04	0,86±0,10
ХС-ЛПНП	0,69±0,03	0,60±0,04*
ХС-ЛПОНП	0,58±0,02	0,51±0,03*
КА, ед.	1,14±0,14	0,56±0,08

Примечание. * – $p \leq 0,05$ – достоверность различий по сравнению с контрольной группой.

Наряду с этим наблюдали изменения концентрации ХС и во фракции ЛПНП и ЛПОНП – содержание их уменьшалось на 5,02 % и на 13,73 %, соответственно. Что касается концентрации ТГ, то наблюдалось снижение содержания на 8,7 % по сравнению с контрольными данными. Увеличение уровня ХС ЛПВП было умеренным (на 17,81 %) и проявлялось в виде тенденции по сравнению с данными контрольной группы. Такие благоприятные изменения сопровождалось отчетливым уменьшением атерогенного потенциала крови – КА снижался в 2,04 раза.

При исследовании жирнокислотного состава плазмы крови животных отмечалось снижение уровня НЖК при незначительном повышении уровня МНЖК (табл. 2).

Таблица 2.
Жирнокислотный состав крови у крыс с гиперлипидемией при введении гепарина, (M±m)

Жирные кислоты, %	Контрольная группа (n=10)	Атерогенная диета + гепарин (n=25)
Пальмитиновая	15,11±1,16	13,97±1,24
Стеариновая	18,39±2,03	16,43±1,75
Олеиновая	15,33±0,27	16,12±0,68
Арахидоновая	10,94±0,73	11,16±0,63
Линолевая	25,38±0,84	26,13±0,67
α-линоленовая	9,35±0,44	9,84±0,32
Эйкозопентаеновая	0,13±0,01	0,17±0,02*
Докозагексаеновая	5,46±0,26	6,18±0,17*

Примечание. * – $p \leq 0,05$ – достоверность различий с контрольной группой.

Так, титр пальмитиновой кислоты в опытной группе уменьшался на 7,55 %, а стеариновой – на 10,66 % по сравнению с контрольными данными. Со стороны олеиновой кислоты наблюдалась тенденция к росту концентрации, что составило 5,15 % по отношению к интактным животным.

В классе ω- 6 ПНЖК наблюдалось увеличение суммарного количества по сравнению с контрольными величинами до 37,29±1,30 % против 36,32±1,57 %. Следует заметить, что при этом доля каждой из кислот была одинакова, так уро-

вень арахидоновой кислоты увеличивался на 2,01 %, а концентрации линоленовой кислоты возрастала на 2,95 % от показателей животных в контрольной группе.

Определенные особенности наблюдались в группе ω-3 ПНЖК. Не смотря на увеличения суммарного количества кислот, изменение происходили в основном за счет достоверного увеличения ЭПК и ДГК ($p < 0,05$), в то время как уровень α-линоленовой кислоты изменялся недостоверно.

Анализ полученных данных свидетельствовал об антиатерогенном состоянии липидтранспортной системы в данной группе на фоне повышения концентрации гепарина в плазме крови, что приводило к увеличению ферментативной активности липопротеинлипазы и, в свою очередь, к развитию дислипидемии, проявляющейся гипохолестеринемией и гипотриглицеридемией, повышением уровня антиатерогенных фракций холестерина на фоне снижения уровня НЖК и достоверного увеличения ω-3 ПНЖК.

Выводы

Таким образом, можно констатировать, что повышение уровня гепарина при хроническом его введении на фоне атерогенной диеты приводит к активации липопротеинлипазы, обеспечивая тем самым адекватный липолиз, и не позволяет развиваться атерогенным нарушениям со стороны липидтранспортной системы. Свидетельством того служат гипотриглицеридемия и гипохолестеринемия, которые реализуются также в снижении холестерина в составе атерогенных фракций ЛПНП и ЛПОНП, тогда как уровень ХС ЛПВП увеличивается относительно контрольных величин. Отмечается и повышение пула ПНЖК на фоне уменьшения титра НЖК.

Полученные результаты позволяют считать, что уровень гепаринемии определяет не только характер изменения активности липопротеинлипазы, но и особенности перестройки функций липидтранспортной системы в целом.

Литература

- Бодрова О.В. Атеросклероз / О.В. Бодрова. – М. : Крон-Пресс, 2000. – 408 с.
- Гоженко А.И. Липопротеинлипаза в патологии липидного обмена / А.И. Гоженко, С.Г. Котюжинская // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2011. – № 2. – С. 8-13.
- Ким Л.Б. Роль гепарина в регуляции трансапиплярного обмена и перекисного окисления липидов у больных ишемической болезнью сердца / Л.Б. Ким, В.Ю. Куликов, В.Н. Мельников // Бюллетень СО РАМН. – 2010. – № 1. – С. 72-77.
- Коваленко В.Н. Холестерин и атеросклероз: традиционные взгляды и современные представления / В.Н. Коваленко, Т.В. Талаева, В.В. Братусь // Український кардіологічний журнал. – 2010. – № 3. – С. 3-12.
- Максименко А.В. Функции и состояние эндотелиального гликокаликса в норме и патологии / А.В. Максименко, А.Д. Турашев // Атеросклероз и дислипидемии. – 2011. – № 2. – С. 4-17.
- Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / Под ред. М.И. Прохоровой. – Л. : Изд.-во Ленинградского ун-та, 1982. – 272 с.
- Зайцева Н.С. Роль активности липопротеинлипазы, гиперинсулинемии и уровня незэстерифицированных жирных кислот в развитии дислипидемий / Н.С. Зайцева, Т.В. Виногорова, И.А. Олейник [и др.] // Медицинский академический журнал – 2005. – Т 5, № 4. – С. 43-49.

8. Рыжов В.Е. Методические указания по изучению гипополипидемического и антиатеросклеротического действия фармакологических веществ / В.Е. Рыжов, В.Г. Макаров // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению фармакологических веществ: под ред. Р. У. Хабриева. – М.: Медицина, 2005. – С. 455-456.
9. Титов В.Н. Атеросклероз как патология полиеновых жирных кислот. Биологические основы теории атеросклероза / В.Н. Титов. – Москва, 2002. – 495 с.
10. Чернышова А.П. Основные ферментативные процессы в патологии и клинике ревматизма / А.П.Чернышева // Труды НГМИ. – Новосибирск, 1960. – С. 430-437.
11. Dontas I.A. Changes of blood biochemistry in the rabbit animal model in atherosclerosis research; a time or stress-effect / I.A. Dontas, K.A. Marinou, D. Iliopoulos [et al.] // Lipids Health Dis. – 2011. – Vol. 10. – P. 139-144.
12. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis / A.V. Khera, M. Cuchel, M. de la Llera-Moya [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2011. – Vol. 364, N 2. – P. 127-135.
13. Tall A.R. HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis / A.R. Tall, L. Yvan-Charvet, N. Terasaka [et al.] // Cell Metab. – 2008. – Vol. 7, N 5. – P. 365-375.
14. Tsutsumi K. Lipoprotein Lipase and Atherosclerosis // Current Vascular Pharmacology. – 2003. – № 1. – P. 11-17.
15. Yasuda T. Update on the role of endothelial lipase in high-density lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport, and atherosclerosis / T. Yasuda, T. Ishida, D. J. Rader // Circ. J. – 2010. – Vol. 74. – P. 2263-2270.

Реферат

ХАРАКТЕРИСТИКА ЛІПІДТРАНСПОРТНОЇ СИСТЕМИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ГІПЕРЛІПІДЕМІЇ НА ТЛІ ГІПЕРГЕПАРИНЕМІЇ

Котюжинська С. Г., Гоженко А. І., Савицький І. В., Свірський О. О.

Ключові слова: ліпидтранспортная система, липопротеинлипаза, гепарин, експериментальна гіперліпідемія.

Відомо, що транспортування ліпопротеїнів здійснюється через міжклітинні ендотеліальні канали і неушкоджені ендотеліальні клітини й залежить від ліполітичної активності судинної стінки. Проте за своєю енергетично значущістю ліпіди на жирні кислоти і гліцерин, при цьому основним механізмом управління її ферментативної активністю є гепарин. Метою нашого дослідження було вивчення особливостей показників ліпидтранспортної системи у тварин при експериментальній гіперліпідемії в умовах гіпергепаринемії. Гіперліпідемію в експерименті відтворювали на 25 білих безпородних статевозрілих щурах-самцях за методом В. Є. Рижкова та В. Г. Макарова на тлі одночасного введення водного розчину гепарину в дозі 50 МО/кг протягом 21 дня. В ході дослідження оцінювали ліпідний і жирнокислотний спектр крові і активність ліпопротеїнліпази (за методом Т. Olivecrona в модифікації В. Н. Титова). Виявлено виражені гіпохолестеринемія і гіпотригліцеридемія при збільшенні вмісту антиатерогенних ХС ЛПВЩ на тлі зниження рівня насичених жирних кислот і збільшення пулу ПНЖК, що свідчило про формування стійкої дисліпідемії антиатерогенного генезу. Показано, що при стійкій гіпергепаринемії відбувається активація ліпопротеїнліпази, яка забезпечує адекватний ліполіз і не дозволяє розвиватися атерогенним порушенням з боку ліпидтранспортної системи.

Summary

CHARACTERISTIC OF LIPID-TRANSPORT SYSTEM IN MODELED HYPERLIPIDEMIA AGAINST THE BACKGROUND OF HYPERHEPARINEMIA

Kotyuzhinska S.G., Gozhenko A.I., Sawitskiy I.V., Svirskiy A. A.

Keywords: lipid-transport system, lipoprotein lipase, heparin, experimental hyperlipidemia.

Lipoprotein transport is known to be performed through the endothelial intercellular channels and intact endothelial cells and depends on the lipolytic activity of the vascular wall. However, uptake of lipoproteins by tissues begins with under the lipoprotein lipase impact, which breaks down the main energetically important lipids into fatty acids and glycerol, while the major control mechanism of its enzymatic activity is heparin. The aim of our study was to investigate the characteristic of indicators of lipid-transport system in animals exposed modelled hyperlipidemia against the background of hyperheparinemia. Hyperlipidemia is simulated in the experiment on 25 albino adult male rats by the method of V.Ye. Ryzhkov and V.G. Makarov against the background of the simultaneous administration of heparin water solution in a dose of 50 IU / kg for 21 days. The study evaluated the lipid and fatty acid spectrum of the blood and the activity of lipoprotein lipase (by the method of T. Olivecrona modified by V. N. Titov). There was a substantial hypocholesterolemia and triglyceridemia under increased anti-atherogenic HDL cholesterol due to lower levels of saturated fatty acids and increased pool of PUFA, indicating the formation of anti-atherogenic dyslipidemia resistant genesis. It was shown that when the resistant hyperheparinemia was associated with the activation of lipoprotein lipase, which provides adequate lipolysis and does not allow the development of atherogenic affections by the lipid-transport system.