

КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.

УДК 577.122:577.152. 616.13-004.6-07.

©Коллектив авторов

УРОВЕНЬ 7 α -ГИДРОКСИХОЛЕСТЕРИНА ПЛАЗМЫ КРОВИ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ КАТАБОЛИЗМА ХОЛЕСТЕРИНА ПРИ ГИПЕРЛИПИДЕМИИ И ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ.

Э.Д. ПОЛЯКОВА¹, Т.Н. ИВАНОВА¹, Е.И. ВОЩИННИКОВ¹,
А.М.ОЛФЕРЬЕВ², Н.В. ПЕРОВА².

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии РАМН, 119832, Москва, Погодинская ул. 10, факс. 7-095-2450857.

²Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины Минздрава РФ, 101953, Москва, Петроверигский пер. 10, факс. 7-095-9285063.

Исследовано содержание 7 α -гидроксихолестерина (7 α -гидрокси-ХС) в сыворотке крови 10 мужчин 31-60 лет с гиперлипидемией (общий ХС > 6,5 ммоль/л) до и в процессе лечения микронизированным фенофибратом (Липантил 200М), фирма "Laboratoire Fournier", Франция. Для определения концентрации 7 α -гидрокси-ХС применяли высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) в обращенной фазе после предварительной обработки экстрагированного из сыворотки крови 7 α -гидрокси-ХС ферментом холестериноксидазой. В качестве внутреннего стандарта использовали 7 β -гидрокси-ХС. Концентрацию 7 α -гидрокси-ХС определяли до начала лечения Липантилом 200М (точка 0), а также через 1, 2 и 3 мес после приема препарата в дозе 200 мг/день. У этих же лиц в сыворотке крови измеряли уровень общего ХС, ХС ЛНП, ЛОНП, ЛВП и триглицеридов (ТГ). Показано однонаправленное падение уровня общего ХС, ХС ЛНП, ЛОНП и ТГ и содержания 7 α -гидрокси-ХС в период лечения. Через 2 и 3 мес лечения концентрация 7 α -гидрокси-ХС снижалась с $1,3 \pm 0,1$ до $0,8 \pm 0,2$ и $0,7 \pm 0,1$ мкмоль/л, то есть на 43% и 48% от исходного уровня, соответственно. Наиболее близкие по величине изменения обнаружены для ТГ, ХС ЛОНП и 7 α -гидрокси-ХС. Сопоставление полученных нами и литературных данных позволяет говорить о том, что уровень 7 α -гидрокси-ХС может быть критерием интенсивности процессов окисления ХС в желчные кислоты.

Ключевые слова: 7 α -гидроксихолестерин, 7 α -гидроксилаза, гиперлипидемия, холестерин, триглицериды, микронизированный фенофибрат (Липантил 200М).

ВВЕДЕНИЕ. Процессы образования холестерина (ХС) и его превращения в желчные кислоты происходят в печени и являются важными факторами, определяющими гомеостаз ХС, его уровень в плазме крови и развитие коронарного атеросклероза и ИБС [1-3]. Первой реакцией, лимитирующей скорость окисления ХС в первичные желчные кислоты - холевую и хенодезоксихолевую, является его превращение в 7α -гидроксихолестерин (7α -гидрокси-ХС). Фермент, катализирующий данную реакцию, - 7α -гидроксилаза (КФ 1.14.13.17), локализован в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов и относится к надсемейству цитохромов P450 - CYP7 [4,5]. Фермент в печени находится под контролем множественных факторов: концентрации желчных кислот, ХС, гормонов и лекарственных соединений [6,7]. Регуляция активности 7α -гидроксилазы желчными кислотами происходит по принципу обратной связи, после их реабсорбции в кишечнике и транспорта через портальную вену в клетки печени [2,6]. Все регуляторные факторы, включая субстратную активацию ХС и контроля фермента желчными кислотами, осуществляются на уровне транскрипции генов 7α -гидроксилазы [8,9].

Поскольку непосредственное определение активности 7α -гидроксилазы в печени человека возможно лишь в биоптатах, для ее регистрации разрабатываются косвенные подходы. Одним из таких подходов является измерение концентрации первого продукта реакции 7α -гидрокси-ХС в плазме крови [10-13]. Сопоставление активности 7α -гидроксилазы в биоптатах печени и уровня 7α -гидрокси-ХС в сыворотке больных холелитиазом [14], а также у лиц с гиперлипидемией, принимавших секвестрант желчных кислот - холестирамин [13,14], показало, что концентрация 7α -гидрокси-ХС в сыворотке коррелирует с активностью фермента в биоптатах печени.

Целью данного исследования явилось выяснение возможности измерения содержания 7α -гидрокси-ХС в плазме крови, как критерия интенсивности процессов окисления ХС у пациентов с гиперлипидемией и при ее лечении фенофибратом 3-го поколения - микронизированным фенофибратом - Липантилом 200М. Для определения концентрации 7α -гидрокси-ХС была использована высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖК) в обращенной фазе с предварительной обработкой 7α -гидрокси-ХС ферментом холестериноксидазой [15].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Обследовано 10 мужчин в возрасте 31-60 лет с гиперлипидемией (уровень общего ХС $>6,5$ ммоль/л (250 мг/дл)). Все пациенты получали рекомендации кардиолога по немедикаментозной коррекции гиперлипидемии [16]. Если через два месяца диетотерапии уровень ХС оставался выше 6,5 ммоль/л, пациентам назначали Липантил 200М («Laboratoire Fournier», Франция) по 1 капсуле (200 мг) ежедневно. Исследование крови проводили перед началом курса лечения (точка 0), а затем через 1, 2 и 3 мес терапии. Кровь забирали натощак утром из локтевой вены в вакуумированные пробирки. В сыворотке крови определяли уровень общего ХС и ТГ энзиматическим методом на автоанализаторе Centrifichem-600 с использованием наборов фирмы «Randox», (Англия). Концентрацию ХС липопротеинов высокой плотности (ЛВП) в сыворотке крови измеряли после осаждения липопротеинов низкой (ЛНП) и очень низкой плотности (ЛОНП) фосфовольфраматом Na в присутствии ионов Mg^{2+} [17].

Определение содержания 7α -гидрокси-ХС с помощью ВЭЖК было разработано на основе методов [12-15]. В качестве внутреннего стандарта использовали 7β -гидрокси-ХС. Стандарты 7α - и 7β -гидрокси-ХС были синтезированы в НИИ витаминов г. Москвы д.х.н. Н.А.Богословским. Идентификацию стандартов проводили по спектрам ЯМР. Отсутствие примеси второго изомера было подтверждено методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). Удельное вращение в хлороформе составляло для 7β -гидрокси-ХС $[\alpha]_D^{20} = +4.8^\circ$ и для 7α -гидрокси-ХС - $[\alpha]_D^{20} = +7.0^\circ$, соответственно. Подготовку проб для ВЭЖК проводили следующим образом. Перед экстракцией липидов к 0,5 мл сыворотки добавляли 1 мкг 7β -гидрокси-ХС и 0,7 мл 0,9% NaCl в 1,8 мл абсолютного этанола, для создания в пробе 60% концентрации спирта [13]. Липиды экстрагировали трижды 5 мл гексана. После выпаривания под током азота к остатку добавляли 2,0 мл 5% КОН в 90% этаноле и инкубировали в водяной бане при 55°C в течение 1 ч для омыления эфиров 7α -гидрокси-ХС [12]. Затем стеринны экстрагировали трижды 5 мл гексана. Экстракты промывали дважды раствором этанола в дистиллированной воде, в объемном соотношении 1:1, и выпаривали в токе азота. Остаток растворяли в 0,23 мл изопропанола и 0,2 мл наносили на обратнофазовую колонку Сепарон (3,0 мм x 25 см, 7 мкмоль, фирма "Элсико") для освобождения от ХС. Колонку уравнивали смесью ацетонитрил:изопропанол:вода (45:45:10 об/об). Элюаты собирали в течение 13 мин при скорости потока 0,7 мл/мин, а затем выпаривали под током азота при 60°C . К остатку добавляли 0,1 М К-фосфатный буфер, pH 7,4, холат Na в конечной концентрации 5% и 0,5 ед. холестериноксидазы в 10 мМ К-фосфатном буфере, содержащем 1 мМ дитиотреитол и 20% глицерин [15]. Инкубацию проводили 10 мин при 37°C . Реакцию останавливали 2,0 мл этанола и экстрагировали трижды 5 мл гексана. Пробы выпаривали под током азота. Остаток растворяли в 0,1 мл смеси ацетонитрил:метанол (70:30 об/об) и 0,02 мл наносили на колонку. Элюцию стериннов проводили той же смесью при скорости потока 0,8 мл/мин. Через 15 мин скорость потока увеличивали до 1 мл/мин. Стеринны идентифицировали по их абсорбции при 240 нм. Концентрацию рассчитывали в соответствии с площадью пиков стандартов 7α - и 7β -гидрокси-ХС, обработанных аналогичным образом. Соответственно количеству исходного стандарта делали поправку на полноту экстракции при обработке проб.

Статистический анализ результатов проводили по t критерию Стьюдента, различия считали статистически достоверными при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Концентрация 7α -гидрокси-ХС в плазме крови на 3-4 порядка ниже содержания общего ХС. В связи с этим непременным условием для определения 7α -гидрокси-ХС является освобождение проб от холестерина. Кроме того, для увеличения чувствительности метода нами был использован принцип ферментативной обработки образцов, содержащих 7α - или 7β -гидрокси-ХС, холестериноксидазой [15]. В результате реакции образуется непредельный продукт окисления стериннов - 4-холестен-3-он, что значительно повышает чувствительность метода. На рис. 1 представлены типичные профили разделения 7α -гидрокси-4-холестен-3-она и 7β -гидрокси-4-холестен-3-она методом ВЭЖК в обращенной фазе в стандартных образцах (I) и в сыворотке крови (II). Среднее время выхода для 7α -гидрокси-ХС и для 7β -гидрокси-ХС составляло $6,5 \pm 0,2$ и $7,3 \pm 0,3$ мин ($n=27$), соответственно.

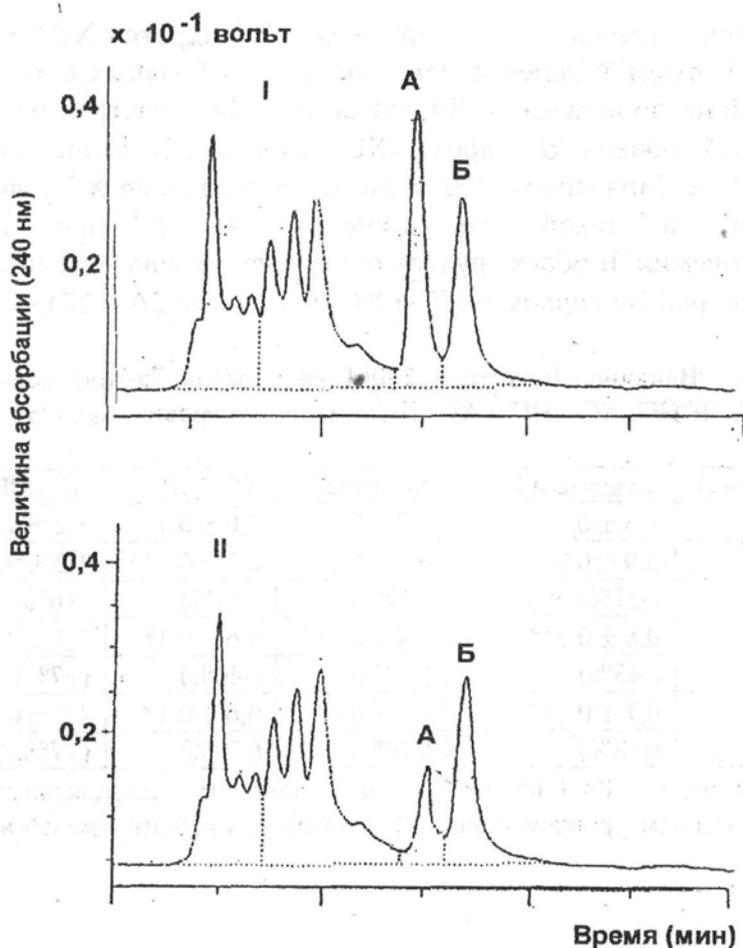


Рисунок 1.

Разделение 7α -гидрокси-4-холестен-3-она (А) и 7β -гидрокси-4-холестен-3-она (Б) ВЭЖК в обращенной фазе на колонке Сепарон SG x RpS (3 x 250 мм), фирмы Элсико. I - стандартные образцы; II - сыворотка крови.

Уровень 7α -гидрокси-ХС у больных с гиперхолестеринемией составил $1,3 \pm 0,1$ мкмоль/л сыворотки крови, что согласуется с данными, приведенными в литературе [12-14]. Через 2 и 3 мес приема Липантила 200М уровень 7α -гидрокси-ХС достоверно снижался на 43 % и 48% и составлял $0,8 \pm 0,2$ и $0,7 \pm 0,1$ мкмоль/л соответственно (таблица). Снижение уровня 7α -гидрокси-ХС происходило на фоне умеренного понижения общего ХС и ХС ЛНП (на 14 и 16% соответственно) и резкого падения уровня ХС ЛОНП на 40% и 39% от исходного (таблица). Известно, что Липантил 200М является эффективным гипотриглицеридемическим препаратом [17]. Поэтому следующей задачей нашего исследования было выяснение особенностей изменения уровня 7α -гидрокси-ХС при гиперхолестеринемии, не сочетающейся с гипертриглицеридемией (гиперлипопротеинемия (ГЛП) типа IIa по Фредриксону) и при комбинированной ГЛП (типа IIб по Фредриксону). Сопоставление изменения уровня 7α -гидрокси-ХС у больных с нормальным и повышенным исходным содержанием ХС ЛОНП показало, что содержание 7α -гидрокси-ХС в сыворотке крови достоверно ($P < 0,05$) увеличено при повышенном уровне ХС ЛОНП, т.е. при ГЛП типа IIб.

Сравнение изменения содержания 7α -гидрокси-ХС у больных с изолированной формой гиперхолестеринемии и у больных с комбинированной гиперлипимией на фоне лечения Липантилом 200М представлено на рис.2А. Как видно, исходный уровень 7α -гидрокси-ХС был в 1,5 раза выше при ГЛП типа IIб ($P < 0,05$). Лечение Липантилом 200 М снижало окисление ХС у лиц с ГЛП типа IIб примерно в такой же степени, как и при изолированной гиперхолестеринемии. В обеих группах обнаружено количественное соответствие в снижении уровней 7α -гидрокси-ХС и ХС ЛОНП (рис.2А и 2Б).

Таблица. Влияние Липантила 200М на уровень 7α -гидрокси-ХС (мкмоль/л), общего ХС и ХС ЛОНП, ХС ЛНП и ХС ЛВП сыворотки крови (ммоль/л).

Срок лечения (мес)	α -гидрокси ХС	ХС общий	ХС ЛОНП	ХС ЛВП	ХС ЛНП
0	$1,3 \pm 0,1$	$7,3 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$	$5,1 \pm 0,2$
1	$0,9 \pm 0,2$ (-31%)	$6,0 \pm 0,3^*$ (-17%)	$0,5 \pm 0,1^{**}$ (-51%)	$1,3 \pm 0,1$ (+6%)	$4,3 \pm 0,3$ (-16%)
2	$0,8 \pm 0,2^{**}$ (-43%)	$6,4 \pm 0,4^*$ (-12%)	$0,6 \pm 0,1^*$ (-40%)	$1,3 \pm 0,1$ (+7%)	$4,6 \pm 0,3^*$ (-11%)
3	$0,7 \pm 0,1^{**}$ (-48%)	$6,2 \pm 0,4^*$ (-14%)	$0,6 \pm 0,1^*$ (-39%)	$1,3 \pm 0,1$ (+7%)	$4,3 \pm 0,4^*$ (-16%)

Примечание. * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,02$ или $0,01$ - достоверность различий по сравнению с исходным уровнем (точка 0). В скобках процент изменений от исходного уровня.

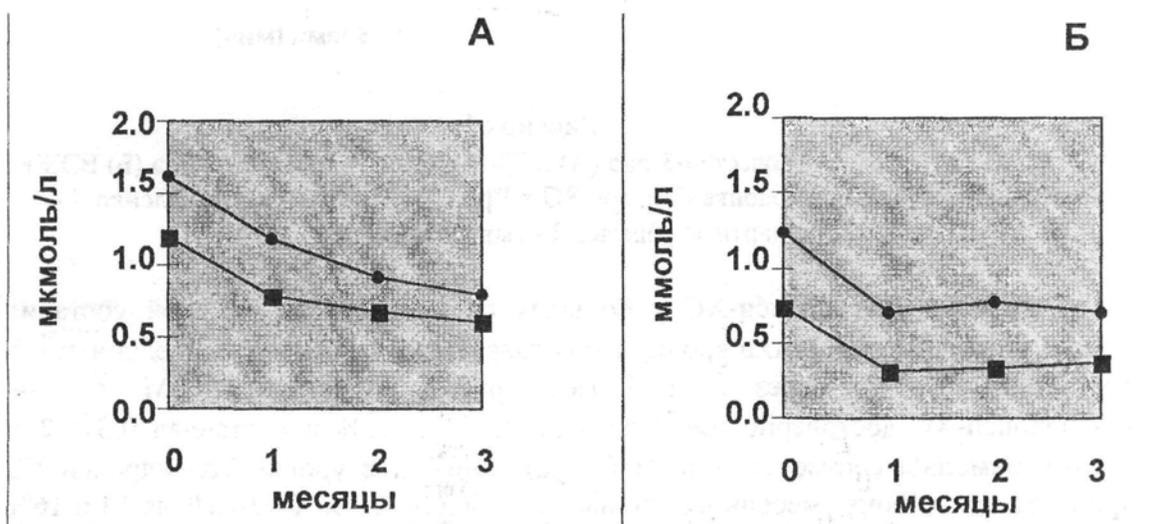


Рисунок 2.

Содержание 7α -гидрокси-ХС (А) и ХС ЛОНП (Б) в сыворотке при различных формах гиперлипидемии до (точка 0) и в период лечения Липантилом 200М.

- - изолированная форма гиперхолестеринемии (ГЛП типа IIа)
- - комбинированная форма гиперлипидемии (ГЛП типа IIб)

Звездочки - достоверность различий по сравнению с исходным уровнем ($P < 0,05$).

Следует отметить, что гипертриглицеридемия сопряжена с увеличением образования ЛОНП в печени и сопровождается стимуляцией в гепатоцитах синтеза ХС, который необходим для построения вновь образуемых мицелл ЛОНП. О положительной корреляции синтеза ХС и продукции ЛОНП

свидетельствуют ряд исследований [18,19]. В то же время известно, что ХС является непосредственным субстратом для 7α -гидроксилазы и повышение его концентрации в клетках печени стимулирует транскрипцию новых молекул данного фермента и повышает его активность [20,21]. Таким образом, повышение уровня 7α -гидрокси-ХС при ГЛП типа Пб согласуется с литературными данными и позволяет сделать заключение, что при гипертриглицеридемии усилен катаболизм ХС и его превращение в желчные кислоты.

Нами не проведено непосредственное определение активности 7α -гидроксилазы в печени. Однако из литературы известно, что содержание 7α -гидрокси-ХС в сыворотке коррелирует с активностью 7α -гидроксилазы в условиях стимуляции образования желчных кислот при лечении холестираминем [11], и в случае снижения синтеза желчных кислот при приеме хенодезоксихолевой кислоты [13]. Авторами установлена достоверная положительная корреляция между активностью микросомальной 7α -гидроксилазы в печени и уровнем эстерифицированного и общего 7α -гидрокси-ХС в сыворотке. Таким образом, полученные нами данные наряду с литературными позволяют судить об интенсивности окисления ХС в желчные кислоты по изменению концентрации общего 7α -гидрокси-ХС в сыворотке.

Исходя из данных литературы о повышении продукции желчных кислот при гипертриглицеридемии [22], а также из четкой однонаправленности изменений уровня 7α -гидрокси-ХС, ТГ и ХС ЛОНП, напрашивается вывод о том, что повышение содержания 7α -гидрокси-ХС в плазме крови свидетельствует об усилении катаболизма ХС при ГЛП типа Пб и может служить показателем процесса окисления ХС в желчные кислоты и косвенным критерием изменения активности 7α -гидроксилазы при гиперлипидемии.

Подтверждением правомочности вывода о том, что уровень 7α -гидрокси-ХС является критерием активности 7α -гидроксилазы могут служить данные о соответствии изменения скорости образования ХС и уровня 7α -гидрокси-ХС. В литературе имеется много сведений об однонаправленности скорости синтеза ХС и образования первичных желчных кислот в печени [20-22]. Такое соответствие связано с корреляцией в изменении активности ключевого фермента биосинтеза ХС - 3-гидрокси-3-метилглутарил-СоА-редуктазы и первого лимитирующего фермента образования желчных кислот - 7α -гидроксилазы [21]. Ранее нами показано, что скорость синтеза ХС из ^{14}C -ацетата повышена в лимфоцитах периферической крови больных ИБС при ГЛП типа Пб, а лечение таких больных Липантилом 200М приводило к снижению скорости образования ХС на 40-50% от исходной [19].

Поскольку интенсивность синтеза ХС в лимфоцитах может служить критерием образования его в печени [23,24], а по уровню 7α -гидрокси-ХС можно судить о его окислении в желчные кислоты [13,14], правомочно полагать, что лечение Липантилом 200 М приводит к торможению не только синтеза ХС, но и к снижению активности 7α -гидроксилазы и образования первичных желчных кислот.

Можно полагать, что лечение микронизированным фенофибратом не приведет к холелитиазу, поскольку снижается не только образование желчных кислот, но и синтез ХС [19]. В связи с этим коэффициент насыщенности желчи ХС не должен увеличиваться при приеме Липантила 200М, что могло бы

привести к риску образования желчных камней. Наше предположение подтверждается данными литературы о том, что лечение фенофибратом в течение 6-8 недель не увеличивало риск холелитиаза [25]. По всей вероятности, параллелизм изменений активности синтеза и катаболизма ХС до желчных кислот имеет место и под влиянием микронизированного фенофибрата. Это может являться причиной меньшей опасности холелитиаза при лечении данным препаратом, являющимся фенофибратом 3-го поколения.

Таким образом, гипертриглицеридемия, связанная с повышением уровня в плазме крови частиц ЛОНП и входящего в их состав ХС, сопряжена с повышением концентрации в крови 7α -гидрокси-ХС. Снижение уровня ТГ и ХС ЛОНП под влиянием лечения фенофибратом (Липантилом 200М) сопряжено с отсроченным на 1 мес снижением уровня 7α -гидрокси-ХС, что свидетельствует о падении активности 7α -гидроксилазы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной научно-технической программы "Атеросклероз".

ЛИТЕРАТУРА

1. Лопухин Ю.М., Арчаков А.И., Владимиров Ю.А., Коган Э.М. (1983) Холестериноз. - М. Медицина.
2. Illingworth D.R. (1988) Clin. Chem., **34**, B123-B132.
3. Myant N.B., Mitropoulos K.A. (1977) J. Lipid Res., **18**, 135-153.
4. Cohen J.C., Cali I.I., Ielinek D.F. et al. (1992) Genomics., **14**, 153-161.
5. Archakov A.I., Bachmanova G.I. (1990) Cytochrom P-450 and Active Oxygen. Taylor & Frensis, London.
6. Chiang J.Y.L., Stroup D. (1994) J. Biol. Chem., **269**, 17502-17507.
7. Stravitz R.T., Hylemon P.B., Heuman D.M. et al. (1993) J. Biol. Chem., **268**, 13987-13993.
8. Straka M.S., Junker L.H., Zacarro L. et al. (1990) J. Biol. Chem., **265**, 7145-7149.
9. Jelinek D.F., Anderson S., Slaughter C.A. et al. (1990) J. Biol. Chem., **265**, 8190-8197.
10. Einarson K., Angelin B., Ewerth S. et al. (1986) J. Lipid Res., **27**, 82-88.
11. Bjorkhem I., Reihner E., Angelin B. et al. (1987) J. Lipid Res., **28**, 889-894.
12. Bascoul J., Goze C., Domergue N. et al. (1990) Biochim. Biophys. Acta, **1044**, 357-360.
13. Oda H., Yamashita H., Kosahara K. et al. (1990) J. Lipid Res., **31**, 2209 - 2218.
14. Axelson M., Aly A., Sjoval J. (1988). FEBS Lett., **239**, 324-328.
15. Hylemon P.B., Studer E.J., Pandak W.M. et al. (1989) Analyt. Biochem., **182**, 212-216.
16. Оганов П.Г., Перова Н.В. (1990) Кардиология, **5**, 5-7.
17. Перова Н.В., Озерова И.Н., Калинина Л.И. (1996) Тер. архив., **68**, 71-76.
18. Kudchodkar B.J., Sodhi H.S. (1976) Eur. J. Clin. Invest., **6**, 285-298.
19. Иванова Т.Н., Полякова Э.Д., Олферьев А.М., Перова Н.В. (1998) Бюлл. экспер. биол. мед., **125**, 569-573.

21. *Akerlund J-E., Bjorkhem I.* (1990) *J.Lipid Res.*, **31**, 2159-2166.
22. *Einarsson K., Angelin B.* (1986) *Atherosclerosis*, **15**, 67-97.
23. *Stone B.G., Evans C.D., Prigge W.F. et al.* (1989) *J. Lipid Res.*, **30**, 1943-1952.
24. *Полякова Э.Д., Иванова Т.Н., Никулина С.Е. и др.* (1994) *Бюлл. экпер. биол. мед.*, **117**, 248-251.
25. *Podda M., Zuin M.* (1985) *Atherosclerosis*, **55**, 135-142.

Поступила 31.03.99.

THE LEVEL OF BLOOD SERUM 7 α -HYDROXYCHOLESTEROL AS AN INDICATOR OF CHOLESTEROL CATABOLISM UNDER HYPERLIPIDEMIA AND HYPOLIPIDEMIC THERAPY.

E. D. POLYAKOVA¹, T. N. IVANOVA¹, E. I. VOSCHINNIKOV¹, A. M. OLFERIEV²,
N. V. PEROVA².

¹ Institute of Biomedical Chemistry RAMS, 119832, 10 Pogodinskaya Street, Moscow, Russia.

² National Research Centre for Preventive Medicine, 101953, 10 Petroverigsky lane, Moscow, Russia.

The effect of micronised fenofibrate (Lipanthyl 200M, Laboratoire Fournier, France, in dose 200 mg per day) on the serum level of 7 α -hydroxycholesterol (7 α -(OH)C) was studied in 10 men (aged 31-60 years) with hyperlipidemia (total C > 6.5 mmol/l). The levels of 7 α -(OH)C as well as that of total C, LDL C, VLDL C and HDL C and triglycerides (Tg) were measured before Lipanthyl 200 M treatment (point 0) and after 1, 2 and 3 months of the drug administration. The content of 7 α -(OH)C was determined by the reversed phase HPLC after the enzymatic conversion of serum 7 α -(OH)C to 7 α -(OH)-4-cholesten-3-one in cholesterol oxidase reaction. 7 β -(OH)C was used as the internal recovery standard. Lipanthyl treatment resulted in considerable reduction of total C, VLDL C and LDL C levels and 7 α -(OH)C content. Affor the second and third months of therapy serum levels of 7 α -(OH)C were significantly reduced from 1.3 \pm 0.1 to 0.8 \pm 0.2 and 0.7 \pm 0.1 μ mol/l; (P<0.02). The decrease of 7 α -(OH)C content was associated with the decrease in Tg and VLDL C levels. Thus, our data suggest that the level of 7 α -(OH)C of in human serum may be used as an indicator of intensity of cholesterol oxidation into bile acids.

Key words: 7 α -hydroxycholesterol, 7 α -hydroxylase, hyperlipidemia, cholesterol, triglyceride, micronized fenofibrate (Lipanthyl 200M)