

УДК 616.13-04 6-092:616.153.96

©Коллектив авторов

СПОСОБ ОЦЕНКИ ХОЛЕСТЕРИН-АКЦЕПТОРНОЙ ЕМКОСТИ ЛИПОПРОТЕИНОВ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Т.И.Торховская¹, Л.И.Иванова¹, Э.М.Халилов¹, О.А.Азизова¹, С.В.Дриницына²,
Ж.И.Ключникова¹, С.С.Маркин², Г.Г.Иванов²

¹ Научно-исследовательский институт физико-химической медицины МЗ РФ,
119828, Москва, М.Пироговская ул., д.1а, факс (095) 246-48-84;

² Московская Медицинская Академия им. И.М.Сеченова,
119832, Москва, Большая Пироговская ул., д.6

Предложен простой способ количественной оценки способности липопротеинов высокой плотности (ЛВП) абсорбировать дополнительное количество холестерина (ХС), позволяющий косвенно судить об интенсивности первого, скорость-лимитирующего звена обратного транспорта ХС - его акцепции из клеток на ЛВП. Он включает использование устойчивого искусственного донора ХС - покрытых им инертных полимерных частиц, что делает его более удобным по сравнению с использованием клеточных культур. Показано, что общая грубая фракция ЛВП (т.е. сыворотка крови после удаления апоВ содержащих липопротеинов) может включить дополнительно более 50% ХС. Однако эта способность оказалась резко сниженной, а в ряде случаев полностью отсутствовала, у ЛВП 63-х больных ишемической болезнью сердца (ИБС), по сравнению с ЛВП 41 здорового донора. Различие в потенциальной холестерин-акцепторной емкости проявлялось даже в случаях равных исходных концентраций ЛВП. Была выявлена отрицательная корреляция ($r = -0,32$, $p < 0,05$) между указанным свойством ЛВП (Δ ХС ЛВП) и их способностью к окислению *in vitro* в присутствии ионов Cu^{2+} , что может служить дополнительным свидетельством атерогенной роли окисляемости ЛВП. Курс лечения больных фосфолипидами (в форме препарата "Липостабил") привел к восстановлению холестерин-акцепторной способности ЛВП, за счет коррекции их липидного состава. Обсуждаются возможные механизмы связи этой способности ЛВП с их окисляемостью, а также обосновывается необходимость оценки свойств ЛВП и активности обратного транспорта ХС у больных ИБС при выборе стратегии лечения.

Ключевые слова: липопротеины высокой плотности, холестерин-акцепторная способность, окисляемость, фосфолипиды, обратный транспорт холестерина, ишемическая болезнь сердца.

ВВЕДЕНИЕ. Несмотря на множество убедительных данных о значении обратного транспорта холестерина (ХС) в обеспечении устойчивости к атеросклерозу [1], только в последние годы активация обратного транспорта ХС стала, наконец, рассматриваться как равноценный - наряду с ХС-понижающей терапией - способ борьбы с этим заболеванием [1,2]. Появились новые данные, указывающие на двойственный механизм начального, скорость-лимитирующего этапа обратного транспорта ХС - его удаления из биомембран липопротеинами высокой плотности (ЛВП) [2,3]. Открыты специфические клеточные белки (кавеолин, SCP-2, SR-B1, "АТР-связывающий кассетный белок" и др.), способствующие образованию в мембране ХС-фосфолипидных кластеров с последующим комплексобразованием с апопротеином А1 ЛВП и выходом из

ОЦЕНКА ХОЛЕСТЕРИН-АКЦЕПТОРНОЙ ЕМКОСТИ ЛВП

клетки [3,4]. Считают, что интенсивность этого процесса может определять уровень ХС ЛВП в плазме [4]. Другой путь, более "традиционный" - это неспецифический диффузионный переход молекул ХС из клеточных мембран в поверхностный монослой ЛВП [2,5], зависящий от свойств как донора, так и акцептора ХС. В то же время в ряде исследований с использованием одного и того же донора ХС - мембран эритроцитов [6,7] или ткани интимы аорты [8] - и одной и той же концентрации акцептора показано, что ЛВП3 и ЛВП2 больных ишемической болезнью сердца (ИБС) оказываются более слабыми акцепторами ХС, чем в норме. Аналогичный результат был получен для лиц с низким уровнем ХС ЛВП (<40 мг/дл) - для них фракционный выход ХС был относительно ниже обычного, причем он положительно коррелировал с концентрацией фосфолипидов (ФЛ) ЛВП [9]. Следовательно, при наличии ИБС или ее фактор риска - низкой концентрации ЛВП - в них происходят качественные изменения, снижающие способность к захвату ХС.

Одним из изменений свойств ЛВП может быть их модификация под действием окисления, к которому они чувствительны в той же мере или даже большей, чем липопротеины низкой плотности (ЛНП) [10,11]. Показано, что окисление ЛВП разобщает их способность осуществлять выход ХС из плазматических мембран клеток в культуре [12-14], хотя некоторые формы окисленных ЛВП могут стимулировать выход внутриклеточного ХС к клеточной поверхности [15]. Повреждающее влияние окисления на акцепцию ХС липопротеинами может осуществляться через возникновение белковых сшивок апо А1, разрушение и выход ФЛ или другие процессы [11].

Экспериментальное изучение факторов, влияющих на акцепцию ХС и обуславливающих ее снижение при ИБС, затруднено требованием к использованию постоянного донора ХС. Целью настоящей работы явилось изучение способности ЛВП включать в свою структуру дополнительное количество ХС (т.е. потенциальной холестериновой емкости) в условиях избытка холестерина. Нами использовалась в качестве донора ХС искусственная система, а в качестве акцептора - суммарная фракция ЛВП после осаждения апоВ-содержащих липопротеинов, т.е. в сочетании с другими компонентами плазмы. Исследовалась данная способность ЛВП из плазмы больных атеросклерозом, изучалось влияние окисляемости ЛВП, а также увеличения в них относительного содержания ФЛ в условиях *in vivo* - при лечении больных ИБС фосфолипидами.

МЕТОДИКА. Использовали плазму крови 63 больных ИБС и 41 здорового донора. В отдельном исследовании (подробно описанном ранее [16]) исследовали плазму крови 12 больных ИБС в ходе терапии полиненасыщенным фосфатидилхолином (в форме "липостабила").

В качестве донора ХС использовали суспензию инертного полимерного носителя с нанесенным холестерином. Для ее получения 1 г порошкообразного полимера инкубировали в 10% растворе ХС в этаноле, после чего медленно упаривали растворитель на ротационном испарителе.

Для определения холестерин-акцепторной емкости использовали фракцию плазмы после преципитации апоВ - содержащих липопротеинов реагентом "Boehringer Mannheim", включающим фосфорно-вольфрамовую кислоту. Исходную концентрацию холестерина ЛВП определяли с помощью ферментативных наборов на автоанализаторе "Центрифихем-400" после аналогичной преципитации.

В предварительных экспериментах были выбраны условия инкубации, обеспечивающие насыщение ЛВП холестерином. Параллельно ставили "контроль" без ЛВП (с 0,9% NaCl) - для учета возможности спонтанного выхода ХС в среду. Фракцию плазмы инкубировали с ХС-содержащим полимером 2 часа при 37°C при перемешивании, после чего осадок удаляли центрифугированием, а в супернатанте определяли концентрацию ХС на автоанализаторе; по ее приросту за время инкубации (Δ ХС) и судили о холестериновой емкости суммарной фракции ЛВП.

Окисляемость ЛВП оценивали по образованию малонового диальдегида (МДА) после Cu^{2+} -индуцированного перекисного окисления [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ За время инкубации фракции ЛВП плазмы после удаления апоВ-содержащих липопротеинов с покрытыми холестерином частицами инертного полимера определенная часть ХС переходила в среду, давая прирост его концентрации в относительно широком интервале - от 0 до 25 мг/дл, т.е. ~ до 50% от его исходного содержания в ЛВП. При инкубации с 0,9% раствором NaCl концентрация ХС в супернатанте оставалась практически нулевой. Это указывает на отсутствие спонтанной десорбции ХС и, соответственно, на участие в нем компонентов плазмы, в первую очередь ЛВП - в силу их известных ХС-акцепторных свойств. При этом выход ХС в среду оказывался существенно более низким в случаях инкубации с фракцией плазмы крови больных ИБС. Величины потенциальной холестериновой емкости ЛВП (Δ ХС ЛВП) у здоровых лиц и у больных ИБС приведены в таблице 1.

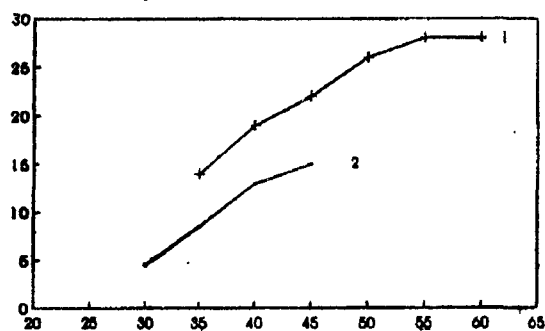
Таблица 1. Максимальное количество холестерина (Δ ХС), адсорбируемое *in vitro* липопротеинами высокой плотности здоровых лиц и больных ИБС.

Категории обследованных	Кол-во	Δ ХС ЛВП (мг/дл плазмы)
Здоровые лица	41	$16,4 \pm 2,3$
Больные ИБС	63	$5,4 \pm 1,9$ ($p < 0,01$)

Видно, что у больных ИБС этот показатель снижается в среднем более, чем в три раза - от 16,4 до 5,4 мг/дл - по сравнению со здоровыми лицами.

На первый взгляд может показаться, что причиной этого является лишь известное различие в концентрации акцептора, ЛВП, особенно ЛВПЗ [1]. Однако снижение средних концентраций ХС ЛВП у больных ИБС не является, как известно, столь резким [4].

Кроме того, как видно из рисунка 1, кривая зависимости поглощения ХС липопротеинами высокой плотности от исходного уровня ХС ЛВП проходит ниже для больных ИБС, чем для здоровых лиц. То есть - даже при совпадающем интервале концентраций ХС ЛВП (35 - 45 мг/дл) суммарная фракция ЛВП плазмы крови больных ИБС способна включить существенно меньшее количество ХС, чем в норме.



Риснок 1.

Зависимость холестериновой емкости суммарных ЛВП (Δ ХС ЛВП) здоровых доноров (1) и больных ИБС (2) от уровня холестерина ЛВП. По оси абсцисс - исходная концентрация ХС ЛВП в плазме крови (мг/дл), По оси ординат - потенциальная холестериновая емкость ЛВП (Δ ХС ЛВП, мг/дл плазмы после удаления апоВ-содержащих липопротеинов)

Это не связано и с различием фракционного спектра ЛВП, т.к. концентрации ЛВПЗ - основного акцептора ХС - практически постоянны [4,5]. При использовании в качестве акцептора ХС суммарной фракции ЛВП, вместе с плазменными белками, нельзя исключить возможного влияния следующего звена обратного транспорта ХС - его этерификации посредством лецитин-холестерина-ацилтрансферазы с дальнейшим транспортом к апоВ-липопротеинам с помощью белка-переносчика эфиров холестерина [1]. Однако в отсутствии апоВ-липопротеинов как акцепторов эфиров ХС это влияние вряд ли является

ОЦЕНКА ХОЛЕСТЕРИН-АКЦЕПТОРНОЙ ЕМКОСТИ ЛВП

существенным. Основная причина ослабления холестерин-акцепторных свойств ЛВП заключается, по всей вероятности, в химических и/или структурных изменениях самих ЛВП, особенно ЛВПЗ [14, 17, 18].

Такие изменения могут быть обусловлены, в частности, окислением ЛВП, снижающим *in vitro* их способность удалять ХС из клеток [11-15]. Процесс же окисления липопротеинов - как показано в ряде работ на ЛНП - более информативно прослеживается не путем измерения непосредственного количества продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) (подверженного влиянию артефактов и дополнительного ПОЛ в ходе процедуры), а путем измерения потенциальной способности липопротеинов к окислению (окисляемости) [19, 20]. Атерогенная роль окисляемости ЛНП в настоящее время хорошо доказана [19, 20], в то время как для ЛВП этот процесс практически не исследовался.

Нами проведено сопоставление окисляемости ЛВП, индуцированной ионами Cu^{2+} , со способностью захватывать дополнительное количество ХС, т.е. с холестериновой емкостью ЛВП (таблица 2).

Таблица 2. Концентрация МДА, образующегося в ЛВП при инкубации в присутствии ионов Cu^{2+} , у лиц с разной холестерин-акцепторной активностью ЛВП (Δ ХС ЛВП)

Интервалы Δ ХС ЛВП (мг/дл плазмы удаления апоВ – липопротеинов)	Кол-во	Концентрация МДА (нмоль/мл)
0 – 3	17	$18,48 \pm 2,71$
4 – 10	27	$13,24 \pm 1,80$
11 – 20	19	$6,23 \pm 1,12$

Примечание: (коэффициент корреляции между Δ ХС ЛВП и концентрацией МДА $r = -0,32$, $p < 0,05$)

Как видно, окисляемость ЛВП - оцениваемая по уровню образующегося малонового диальдегида - сопряжена со снижением их способности включать ХС - коэффициент корреляции составлял $r = -0,32$ ($p < 0,05$).

Возникает вопрос - какие изменения ЛВП *in vivo*, стимулирующие их окисляемость, могут ингибировать акцепцию ХС?

Предполагают [11, 21], что более вероятным местом окисления ЛВП *in vivo* является не кровяное русло, а интерстициальная жидкость интимы артерий и других периферических тканей, куда они легко проникают вследствие малого размера [11]. Медиаторами окисления могут служить - как и для ЛНП - продукты, присутствующие в очаге воспаления или атеросклеротической бляшке, включая миелопероксидазу, продукты ее реакции, перекись водорода, пероксинитрилы, липоксигеназу [11]. При этом окислению подвергается сначала или белковая часть ЛВП (при действии радикалов тирозина) [15], или липидная (под влиянием ионов металлов, липоксигеназы) [11]. Последующими этапами окислительной модификации оказывается образование белковых сшивок (димеров апо А1), а также разрушение и выход ФЛ - с соответствующим снижением отношения ФЛ/ХС, существенного для ХС-акцепторных свойств ЛВП [9, 13].

С целью выяснения возможного влияния доли фосфолипидов на ХС-акцепторную функцию ЛВП, а также на потенциальную возможность обратимости ее снижения у больных ИБС, мы проанализировали влияние курса терапии полиненасыщенным фосфолипидом (в составе препарата "Липостабил") на акцепцию ХС (табл. 3).

Как видно из таблицы 3, уже через месяц введения фосфолипидов - по мере возрастания в ЛВП их относительного содержания - возрастает холестерин-акцепторная емкость ЛВП, а через 3 месяца она почти достигает нормальных значений, что свидетельствует о влиянии уровня ФЛ на это свойство ЛВП и о возможности его восстановления - даже если в основе его лежало снижение ФЛ в результате их окислительной деструкции [11].

Вопрос же о локализации процесса окисления ЛВП, на наш взгляд, остается дискуссионным - еще в большей степени, чем для ЛНП, для которых "многочисленные попытки найти точные количественные свидетельства наличия окисленных ЛНП в

Таблица 3. Холестерин-акцепторная емкость фракции ЛВП плазмы крови у больных ИБС в ходе курса лечения полиненасыщенным фосфатидилхолином

	Δ ХС ЛВП	ФЛ/ХС ЛВП
До лечения (n=12)	$3,4 \pm 1,1$	$1,25 \pm 0,10$
Через 2 недели	$3,5 \pm 1,4$	$1,40 \pm 0,15$
Через месяц	$10,0 \pm 2,1$	$1,60 \pm 0,20$
Через 3 месяца	$12,3 \pm 2,2$	$1,90 \pm 0,20$
Здоровые лица	$16,4 \pm 2,3$	$1,5 - 2,0^*$

Примечание: (* - рассчитано из данных работ [5, 18])

крови не дают положительных результатов" [20]. Нельзя исключить возвращение некоторого количества модифицированных ЛВП из интерстициальной жидкости в плазму крови в результате диффузии. ЛВП могут содержать и продукты ПОЛ, адсорбируемые ими из ЛНП [10] или из биомембран [22]. И хоть из-за относительно низкой концентрации их трудно зафиксировать в нативной плазме обычными методами - за исключением случаев выраженного ПОЛ (например, при стрессе или воспалительных реакциях [20]) - все же они оказывают воздействие на тонкую структуру ЛВП (фиксируемую, в частности, методом спиновых зондов [17]) Можно полагать, что именно такая модификация снижает как окислительную стабильность ЛВП (например, путем повреждения связанного с ними фермента параоксоназы [11]), так и способность адсорбировать ХС - что мы и наблюдаем в настоящей работе.

Это предположение согласуется с данными *in vitro* [23], что даже совсем небольшая окислительная модификация ослабляет способность ЛВП к захвату ХС, определенный вклад может вносить и появление на поверхности ЛВП оксистероидов в результате окисления ХС [24]

Таким образом, доказана сниженная способность суммарной ЛВП-содержащей фракции у больных ИБС к "пассивной акцепции" холестерина [11], являющейся существенным звеном его обратного транспорта. Пр продемонстрирована сопряженность этого свойства с окисляемостью ЛВП, а также возможность его коррекции в процессе терапии фосфолипидами. Логически - к такому же эффекту должна приводить также и антиоксидантная терапия, широко применяемая в последнее время. В свете данных о влиянии модификации *in vitro* ЛВП на реакции "клеточного гомеостаза" холестерина - через регулируемые протеинкиназой С процессы передачи сигнала [11,25] - можно предположить влияние окисляемости ЛВП и на "активный" (т.е. обусловленный клеточными процессами) выход ХС из клеток.

Использованный же нами простой способ оценки холестериновой емкости ЛВП может быть применен для обнаружения недостаточности обратного транспорта ХС, не выявляемой простым определением концентрации ХС ЛВП - что необходимо при выборе стратегии лечения.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Von Eckardsen A., Nofer I.R., Assman G. (2001). Arter. Thromb. Vasc. Ther., **21**, 13-27
2. Kawashiri M., Maugeais C., Rader D.J. (2000) Cur.Atherosclerosis Reports, **2**, 363-372.
3. Schroeder F., Gallegos A., Atshaves B. et al. (2001) Exp. Biol. Med (Maywood), **226** (10), 873-890
4. Yokohama S. (2000). Biochim. Biophys. Acta, **1529**, 231-244.
5. Genshel J., Schmidt H.H. (2001) Z. Gastroenterol., **39**, 321-327.
6. Тарховская Т.И., Горбатенкова Е.А., Дудаев В.А., Чеснокова Я.М., Азизова О.А., Халилов Э.М. (1986). Вopr. мед. химии, **26** (2), 101-104
7. Klimov A., Parfenova N., Petrova-Maslakova L., Kuznetsov A., et al. (1989) In "Phosphatidylcholine: effects on cell membrane and transport of cholesterol", wbn-Verlag, Bingen-Rhein, 45-56.

ОЦЕНКА ХОЛЕСТЕРИН-АКЦЕПТОРНОЙ ЕМКОСТИ ЛВП

- 8 Климов А.Н., Петрова-Маслакова Л.Г., Мамонтова И.Ф., Парфенова Н.С., Ковалева И.Г., Трюфанов В.Ф. (1982) *Вопр мед химии*, **20**, 122-126
- 9 Fournier N., Paul J.L., Atger V., et al. (1997) *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**, 2685-2691
- 10 Parthasarathy S., Barnett J., Fong L.G. (1990) *Biochim Biophys Acta*, **1044**, 275-283
- 11 Fransis G.A. (2000) *Biochim Biophys Acta*, **1483**, 217-35
- 12 Morel D.W. (1994) *Biochem Biophys Res Com*, **200**, 408-416
- 13 Rifici V., Khachaurian A. (1996) *Biochim Biophys Acta*, **1299**, 87-94
- 14 Bonnefont-Rousselot D., Mota C., Khalil A.O., et al. (1995) *Biochim Biophys Acta*, **1255**, 23-30
- 15 Fransis G.A., Oram J.F., Heineke J.W., Bierman E.L. (1996) *Biochemistry*, **35**, 15188-15197
- 16 Markin S.S., Khalilov E.M., Torkhovskaya T.I. et al. (1994) *Atherosclerosis*, **2** (special issue), 237, abstr 254
- 17 Панасенко О.М., Азизова О.А., Торховская Т.И., Лудаев В.А. (1984) *Вопр мед химии*, № 6, 40-45
- 18 Фам-Тхи М., Торховская Т.И., Озерова И.Н., Полесский В.А., Курданов Х.А., Герасимова Е.Н. (1981) *Вопр мед химии*, № 5, 701-706
- 19 Азизова О.А., Вахрушева Т.Н., Дремина Е.С. и др. (1996) *Бюлл эксп биол мед*, **122**, 32-36
- 20 Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. (2001) *Окислительный стресс* М: МАИК "Наука/Интерпериодика"
- 21 Frei B., Stocker R., Ames B.N. (1988) *Proc Nat Acad Sci USA*, **85**, 9748-9752
- 22 Klimov A.N., Kozhevnikova K.A., Kuzmin A.A., Kuznetsov A.S., Belova E.S. (2001) XII Lipid Meeting Leipzig (Germany), 51
- 23 Morel D.W. (1994) *Biochem Biophys Res Comm*, **200**, 408-416
- 24 Gesquiere L., Loreau N., Blache D. (1997) *Free Radical Biol Med*, **232**, 541-547
- 25 Mendez A.J., Oram J.F., Bierman E.F. (1991) *J Biol Chem*, **266**, 10104 - 10111

Поступила 15 10 2002

THE WAY OF EVALUATION OF CHOLESTEROL ACCEPTING CAPACITY OF PLASMA HIGH DENSITY LIPOPROTEINS.

T.I.Torkhovskaya¹, L.I.Ivanova¹, E.M.Khalilov¹, O.A.Asisova¹, S.V.Drinizyna¹, Zh.I.Klyuchnikova¹, S.S.Markin², G.G.Ivanov²

¹Institute of Physico-Chemical Medicine, M Pirogovskaya, 1a Moscow 119992, Russia

²I.M. Sechenov Moscow Medical Academy Moscow, Russia

The simple way of quantitative evaluation of high density lipoproteins (HDL) capacity to absorb additive cholesterol quantity is proposed. It allows to evaluate indirectly intensity of the first rate limiting stage of reverse cholesterol transport its accepting from the cells by means of HDL. The way includes the usage of stable artificial cholesterol donor - cholesterol covered inert polymer particles, which are than more convenient, than cell culture use. The total HDL rough fraction (i.e. serum after apoB lipoproteins removal) was shown to include more than 50% cholesterol in addition to yet presenting amount. But this ability is sharply reduced, or sometimes even is completely absent, in HDL of 63 coronary heart disease (CHD) patients (as compared with 41 healthy donors). This difference of potential cholesterol accepting capacity is revealed even at the same initial HDL concentrations. The negative correlation ($r = -0.32$, $p < 0.05$) between this HDL property (Δ HDL cholesterol) and their oxidability in the ions Cu^{2+} presence was observed. This underlines atherogenic role of HDL oxidability. The treatment of patients by phospholipids (as Lipostabyl) resulted to recovery of HDL cholesterol accepting capacity. The possible mechanisms of junction of this HDL activity with their oxidability are discussed, as well as necessity of evaluation of HDL properties and reverse cholesterol transport for the choice of care strategy of CHD patients.

Key words high density lipoproteins, cholesterol accepting capacity, oxidability, phospholipids, reverse cholesterol transport, coronary heart disease