

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.

УДК 612.015+616.153.922

©Коллектив авторов

ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ ЛИПОПРОТЕИДОВ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ ПРИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ГИПЕРЛИПОПРОТЕИДЕМИЯХ

М.Г. ТВОРОГОВА, П.Н. ВАСИН, Т.А. РОЖКОВА, В.В. КУХАРЧУК, В.Н. ТИТОВ.

Институт клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова, Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ, Москва
121552, 3-я Черепковская, 15 А, факс (095) 4152962

У 53 пациентов с разными формами наследственной гиперлипопротеидемии (ГЛП) проведены исследования липидного состава липопротеидов высокой плотности (ЛВП). Контрольную группу составили 20 практически здоровых лиц. Применение одномерной хроматографии в тонком слое силикагеля при последовательном использовании двух систем растворителей для разделения липидного экстракта ЛВП позволило выявить 10 фракций липидов. Идентифицировано 4 фракции фосфолипидов: 3 основных - фосфатидилхолин, лизофосфатидилхолин и сфингомиелин и одну из минорных - фосфатидилэтаноламин. В составе липидов ЛВП присутствуют свободный холестерин и эфиры холестерина, выделены 3 фракции глицеридов - моно-, ди- и триглицериды, а также свободные жирные кислоты. Соотношение отдельных фракций фосфолипидов и холестерина в ЛВП, полученное при компьютерной денситометрии хроматограмм, совпадает с данными, полученными общепринятыми методами. Сопоставление соотношений отдельных классов липидов в составе ЛВП у лиц с нормо- и гиперлипидемией позволяет отметить, что при всех рассматриваемых нами формах наследственной ГЛП имеет место увеличение лизофосфатидилхолина и снижение фосфатидилэтаноламина.

Ключевые слова: липопротеиды высокой плотности, гиперлипопротеидемия, холестерин, фосфолипиды.

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время разработаны и широко применяются в лабораторной практике количественные методы определения отдельных классов липидов - холестерина (ХС), триглицеридов (ТГ), суммарных фосфолипидов (ФЛ). Однако, при углубленной диагностике и в научных исследованиях предпочтительно определить не только концентрацию липидов в крови, но и соотношение липидов в отдельных классах липопротеидов (ЛП). Среди методов, применяемых для исследования липидного состава ЛП, хроматография на тонком слое силикагеля (ТСХ) по-прежнему занимает достойное место. Это обусловлено не только относительной простотой и доступностью методов, но и высокой чувствительностью, хорошей воспроизводимостью, а также наличием современных методов количественной оценки компонентов.

Методической трудностью разделения липидов сыворотки крови и ЛП является наличие как полярных липидов (ФЛ, свободные жирные кислоты, моно- и

диглицериды, ХС) так и неполярных (ТГ, эфиры ХС). Для определения липидного состава образцов обычно применяют отдельные системы растворителей для разделения полярных и неполярных липидов [1]. В этой связи представляет практический интерес разделение липидов методом одномерной хроматографии в тонком слое силикагеля при последовательном применении двух систем растворителей [2]. В нашей работе этот метод использован для разделения липидов ЛВП высокой плотности (ЛВП) у лиц с нормо- и гиперлипидемией.

МЕТОДИКА. Исследования липидного состава ЛВП проведены у 53 пациентов с разными формами наследственной гиперлипопротеидемии (ГЛП). Контрольную группу составили 20 практически здоровых лиц из числа мужей и жен лиц с ГЛП, а также сотрудников РКНПК, обследованных в группе генетических исследований отдела плазмафереза института клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова РКНПК МЗ РФ. Формы наследственной ГЛП: полигенную гиперхолестеринемию (ПГХС), семейную гиперхолестеринемию (СГХС), семейную комбинированную гиперлипидемию (СКГЛ), семейную гипертриглицеридемию устанавливали в соответствии с общепринятыми критериями (СГТГ) [3,4].

Содержание липидов в сыворотке крови и ЛВП определяли ферментативными методами на автоанализаторе Technicon RA-XT и спектрофотометре фирмы Hospitex (табл. 1). Для выделения ЛВП апоВ-содержащие ЛП осаждали смесью фосфовольфрамовой кислоты и хлорида магния [5]. Далее аликвоту надосадочной жидкости экстрагировали 20-ти кратным объемом смеси хлороформ: метанол (1:1) и через 60 мин. фильтровали через бумажный фильтр. После выпаривания в токе азота липиды растворяли в смеси хлороформ: метанол (1:1) и наносили на предварительно активированные пластины с силикагелем (20x20 см, толщина слоя 0,25 мм) фирмы Merck, (Германия).

Таблица 1. Параметры обмена ЛП у лиц с нормолипидемией и у пациентов с разными формами наследственных ГЛП (M \pm m, ммоль/л)

	Контроль n=20	ПГХС n=16	СГХС n=8	СКГЛ n=17	СГТГ n=9
ХС	5,03 \pm 0,14	7,01 \pm 0,26*	10,25 \pm 0,97*	6,27 \pm 0,28*	5,35 \pm 0,4
ТГ	1,09 \pm 0,06	1,31 \pm 0,07	1,56 \pm 0,17*	2,97 \pm 0,48*	4,48 \pm 1,03*
ХС ЛВП	1,46 \pm 0,05	1,38 \pm 0,04	1,09 \pm 0,09*	1,21 \pm 0,04*	0,98 \pm 0,07*
ХС св. ЛВП	0,33 \pm 0,02	0,26 \pm 0,02*	0,25 \pm 0,02*	0,30 \pm 0,01	0,24 \pm 0,03*
Эфиры ХС ЛВП	1,12 \pm 0,05	1,11 \pm 0,05	0,84 \pm 0,1*	0,96 \pm 0,05*	0,79 \pm 0,08*
ХС св./ЭХС	0,29 \pm 0,03	0,23 \pm 0,03	0,29 \pm 0,05	0,30 \pm 0,03	0,29 \pm 0,05

* - $p < 0,5$ по сравнению с контрольной группой

Разделение липидов проводили последовательно в двух системах растворителей. Сначала для разделения полярных липидов применяли систему хлороформ: метанол: вода (65: 25: 4); хроматографию останавливали при подъеме фронта растворителя на 8 см от нижнего края пластины. Затем, после высыхания пластины для разделения нейтральных липидов применяли систему гексан:ацетон (100:1). Липидные пятна выявляли после опрыскивания пластины 20% раствором сульфата аммония и нагревания при 140 $^{\circ}$ С в течение 60 мин. Для идентификации липидных пятен применяли стандартные образцы нейтральных липидов и фосфолипидов производства фирмы Sigma, (США) (Рис.1).

Хроматограммы сканировали на денситометре CS-930 фирмы Shimadzu, (Япония) методом отражения при длине волны 520 нм. Результаты представлены в процентах площади каждой фракции липидов от суммы площадей всех пиков на

хроматограмме, рассчитанных автоматически. Статистическую обработку результатов проводили при помощи прикладных пакетов статистических программ SAS.

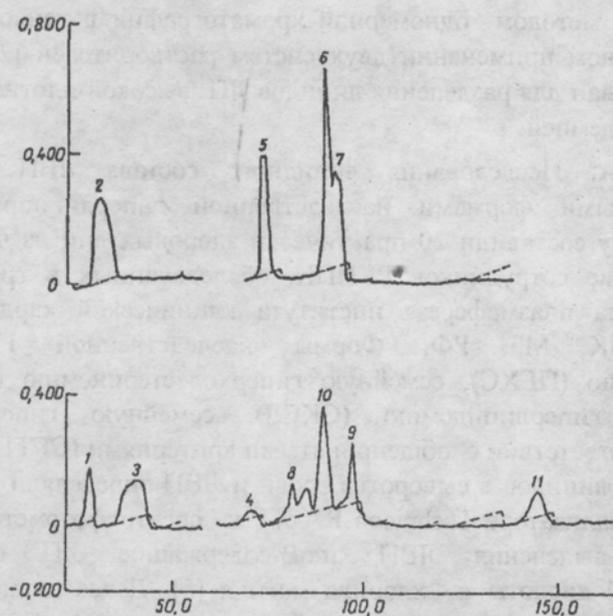


Рисунок 1.

Денситограммы стандартов. По оси X - длина пробега в мм; по оси Y - единицы оптической плотности. Стандартные образцы фосфолипидов: 1- ЛФХ, 2 - СФ, 3 - ФХ, 4 - ФЭ; смесь стандартных образцов (5-7): 5 - монопальмитин, 6 - дипальмитин, 7 - трипальмитин; смесь стандартных образцов (8-11): 8 -олеиновая кислота; 9 - триолеин; 10- холестерин свободный, - 11холестерин олеат.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Применение одномерной хроматографии в тонком слое силикагеля с использованием двух систем растворителей для разделения липидного экстракта ЛВП позволило выявить 10 фракций липидов (рис. 2). Метод позволяет выделить 4 фракции ФЛ: 3 основных - фосфатидилхолин (ФХ), лизофосфатидилхолин (ЛФХ) и сфингомиелин (СФ) и одну из минорных - фосфатидилэтаноламин (ФЭ). В составе липидов ЛВП присутствуют свободный ХС и эфиры ХС, выделены 3 фракции глицеридов - моно-, ди- и триглицериды (соответственно МГ, ДГ и ТГ), а также свободные жирные кислоты (СЖК).

Компьютерная денситометрия хроматограмм позволила оценить соотношение отдельных классов липидов в составе ЛВП у лиц с нормо- и гиперлипидемией (табл. 2). Полученные данные показывают, что во всех группах обследованных основными липидами ЛВП являются фосфатидилхолин и эфиры ХС; значительную часть липидов ЛВП составляют различные глицериды. Обращает на себя внимание соотношение фракций глицеридов: ДГ значительно превышают содержание ТГ, сопоставимое с содержанием МГ. При сопоставлении соотношений отдельных классов липидов в составе ЛВП у лиц с нормо- и гиперлипидемией можно отметить (табл.2), что при всех формах наследственной ГЛП имеет место увеличение ЛФХ и снижение ФЭ. Снижение содержания свободного ХС выявлено при ПГХС и СГТГ ($p < 0,05$).

Несмотря на многолетнее изучение липидов ЛВП, основное внимание уделялось составу фосфолипидов и свободному и этерифицированному ХС, и только в единичных работах исследован полный липидный состав ЛВП. Полученные нами данные о составе ФЛ ЛВП и соотношении отдельных ФЛ совпадают с данными полученными ранее при разделении ФЛ двумерной хроматографией и определением содержания неорганического фосфата в каждом из липидных пятен [6]. Наши результаты также совпадают с данными, полученными при разделении ФЛ одномерной

высокоэффективной ТСХ, после которой концентрацию каждой из фракций определяли денситометрией [7]. В нашей работе, основную долю ФЛ ЛВП составляет ФХ, далее, (в порядке уменьшения концентрации) представлены СФ, ЛФХ, ФЭ. Мы полагаем, что невозможность оценить содержание минорных фракций ФЛ - фосфатидилсерина и фосфатидилинозита не оказывает существенного влияния на

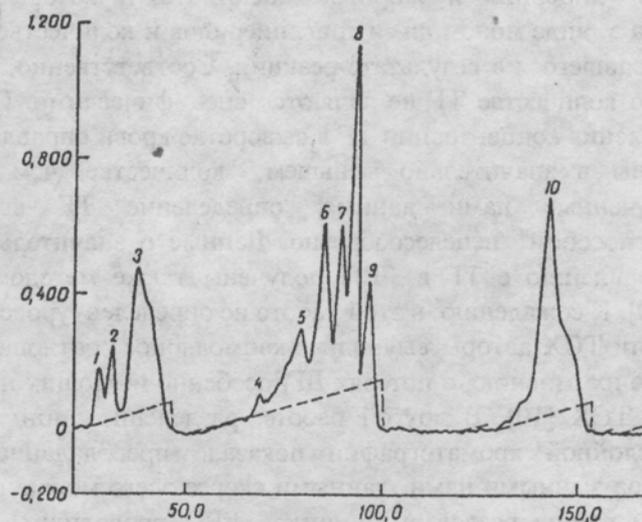


Рисунок 2.

Денситограмма липидов ЛВП. Фракции липидов: 1 - ЛФХ, 2 - СФ, 3 - ФХ, 4 - ФЭ, 5 - МГ, 6 - СЖК, 7 - ХС свободный, 8 - ДГ, 9 - ТГ, 10 - эфиры ХС.

Таблица 2. Содержание липидов в ЛВП. Результаты представлены в виде % площади от суммы площадей всех пиков, $M \pm m$.

	Контроль n=20	ПГХС n=19	СГХС n=8	СКГЛ n=17	СГТГ n=9
ЛФХ	1.31±0.24	2.65±0.26*	3.40±0.95*	3.28±0.9*	2.67±0.22*
СФ	2.36±0.2	2.42±0.24	2.1±0.58	2.17±0.42	1.40±0.51
ФХ	26.9±2.34	26.7±2.26	25.4±4.42	22.8±1.37	30.1±4.94
ФЭ	0.85±0.24	0.32±0.08*	0.28±0.09*	0.30±0.1*	0.47±0.22
МГ	5.92±2.0	2.60±0.50	3.90±1.21	7.33±2.12	3.60±1.85
СЖК	8.0±0.69	4.56±0.48	5.66±1.66	6.91±1.19	6.37±1.84
ДГ	20.4±2.6	25.0±2.27	28.4±3.5	21.6±3.23	17.4±1.7
ТГ	4.10±1.05	5.38±0.78	3.20±1.27	3.13±0.58	5.36±0.12
ХС св.	6.70±0.71	2.44±0.29*	4.26±1.99	5.97±1.18	3.36±0.42*
ХС эфиры	25.7±1.55	25.8±2.62	23.4±2.60	27.0±5.10	29.8±2.81
ХС св. / ХС эфиры	0.26±0.02	0.10±0.02*	0.24±0.03	0.22±0.03	0.11±0.01*

*- $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

соотношение липидных фракций ЛВП, поскольку по данным Торховской и соавт. [6] суммарное содержание фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина, фосфатидилинозита и полиглицерофосфатов составляло от 1 до 6% ФЛ ЛВП и практически не отличалось у лиц с нормо-, гипо- и гиперальфахолестеринемией.

Для определения свободного и этерифицированного ХС в ЛВП, обычно используют ферментативные наборы для определения общего и свободного ХС, после чего концентрацию эфиров ХС определяют вычитанием. Согласно данным литературы, соотношение свободный ХС: эфиры в ЛВП составляет 0,19-0,34 [8,9]. В нашей работе результаты определения соотношения фракций ХС предложенным

методом ТСХ и общепринятым ферментативным методом определения свободного ХС совпадают во всех группах, кроме ПГХС и СГТГ (табл. 1,2).

Полученные ранее данные о липидном составе ЛВП показывают, что помимо ФЛ и ХС эта фракция ЛП содержит определенное количество ТГ [7,8]. Однако, данные о наличии глицеридов в ЛВП получены в основном при применении ферментативных наборов для определения ТГ в сыворотке крови. Эти методы основаны на полном гидролизе эфиров глицерина и жирных кислот (ЖК), которые представлены в организме человека в виде моно-, ди- и триглицеридов и количественном определении глицерина, образовавшегося в результате реакции. Соответственно, получаемые таким способом данные о количестве ТГ не являются специфическими. Применение такого метода для определения концентрации ТГ в сыворотке крови оправдано, поскольку МГ и ДГ представлены в значительно меньшем количестве, чем ТГ. Однако, как показывают полученные нами данные, определение ТГ во фракции ЛВП ферментативным способом нецелесообразно. Данные о значительно более высоком уровне ДГ по сравнению с ТГ в ЛВП получены также методом газо-жидкостной хроматографии [10]. К сожалению, в этой работе не определен уровень МГ. Интересно, что при применении ТСХ авторы выявили эквимольное соотношение ДГ и ТГ, что свидетельствует, по их мнению, о потерях ДГ, особенно имеющих ненасыщенные ЖК, при применении ТСХ [10]. В другой работе, разделение липидов ЛВП методом двумерной тонкослойной хроматографии показало преобладание ТГ [11]. Такое несоответствие с полученными нами данными скорее всего можно объяснить тем, что в рассматриваемой работе разделение липидов ЛВП проводили в других условиях, используя последовательно 4 системы растворителей, одна из которых насчитывала 8 составляющих; концентрацию фракций глицеридов определяли методом Карлсона после экстракции липидных пятен [12]. Поскольку применение стандартов в выполненной нами работе не оставляет сомнения в идентификации отдельных классов глицеридов, а количественные данные компьютерной денситометрии согласуются с данными, полученными высокоспецифичным методом газо-жидкостной хроматографии можно предположить, что упомянутая методика [11,12] не позволяет разделить или идентифицировать ди- и триглицериды разного состава.

Известно, что ДГ являются физиологическим регулятором протеинкиназы С [10,13]. Как показано в экспериментах *in vitro*, этот фермент способствует перемещению внутриклеточного ХС к мембране выхода ХС из клетки [13]. Согласно экспериментам с панкреатической липазой, ДГ, содержащие длинноцепочечные ЖК, находятся на поверхности частицы, тогда как ДГ, содержащие ЖК 16-18, преимущественно расположены в ядре ЛВП [10]. Происхождение ДГ в ЛВП до конца не ясно. Предположено, что они являются продуктом активности липопротеидлипазы и накапливаются вследствие слабой активности печеночной триглицеридлипазы, для которой ДГ не являются предпочтительным субстратом [10]. Возможно, нахождение ДГ в ЛВП связано с процессом переноса эфиров ХС. Известно, что при инкубации сыворотки крови человека имеет место переход эфиров ХС от ЛВП к ЛП очень низкой и низкой плотности (ЛОНП и ЛНП), который сопровождается движением ТГ от ЛОНП к ЛВП [14]. Учитывая преобладание ДГ во фракции ЛВП, можно предположить, что при переносе эфиров ХС именно ДГ, а не ТГ переходят на ЛВП от ЛОНП в обмен на эфиры ХС, однако в литературе эти данные пока не имеют подтверждений. Для выяснения этого вопроса мы провели хроматографию липидов ЛВП при определении активности переноса эфиров ХС по методу Fielding и соавт. [15], основанном на измерении динамики уменьшения эфиров ХС в ЛВП при инкубации сыворотки крови в присутствии 5,5'-дитиобис - 2 - нитробензойной кислоты (ДТНБ), ингибитора активности лецитин-холестерин ацилтрансферазы (ЛХАТ). Сопоставление денситограмм липидного экстракта ЛВП до и через 2 часа после инкубации сыворотки крови - позволяет видеть параллельное снижение эфиров ХС и нарастание ДГ в ЛВП (Рис.3).

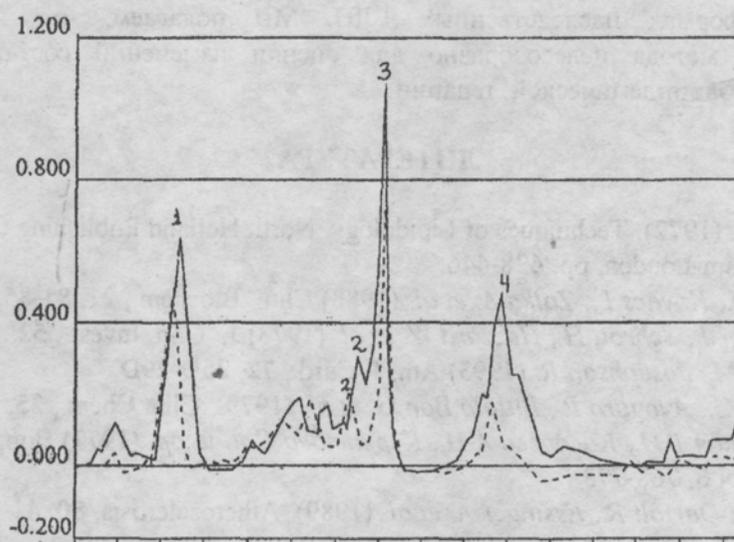


Рисунок 3.

Денситограмма липидов ЛВП до (сплошная линия) и после (пунктир) 2 часов инкубации сыворотки крови при 37°C в присутствии ДТНБ. 1 - ФХ, 2 - свободный ХС, 3 - ДГ, 4 - эфиры ХС.

Снижение способности частиц ЛВП к акцепции ХС из клеток гепатомы печени крыс при уменьшении в них молярного отношения ФЛ/ХС своб. свидетельствует о значительной роли липидного состава ЛВП в этом процессе [16]. Тем не менее, в наших исследованиях, при разных формах наследственной ГЛП в ЛВП можно видеть снижение доли свободного ХС и увеличение ЛФХ. Изменение соотношения липидов ЛВП, выявленное нами при всех формах наследственных ГЛП соответствует выявленным ранее особенностям липидного состава ЛВП у больных ИБС. Увеличение абсолютного количества ЛФХ в ЛВП, также как и его процентного содержания от общих ФЛ отмечено как единственное отличие состава ФЛ ЛВП у больных ИБС и здоровых лиц [7]. Показано также снижение свободного ХС в ЛВП у больных ИБС по сравнению со здоровыми [9, 11]. Исследования *in vitro* предоставляют противоречивые данные роли ЛФХ в процессе обмена ХС между ЛВП и клетками сосудов. Присутствие ЛФХ в инкубационной среде усиливало выход ХС из макрофагов и пенных клеток мыши [17]. Обработка ЛФХ не только снижала содержание ХС в этих клетках, но и увеличивала секрецию аполипопротеина (апо)Е. На основании этих данных предположено, что увеличение ЛФХ в ЛВП может замедлять развитие атеросклероза или способствовать регрессии атеросклеротических поражений, стимулируя образование ЛП, содержащих апо Е, в пенных клетках, образованных из моноцитов и макрофагов, и т.о. способствуя выходу ХС из клеток [17]. С другой стороны, согласно исследованиям на культуре клеток эндотелия [18], возрастание ЛФХ в ЛВП вследствие обработки фосфолипазой А, приводит к увеличению захвата эфиров ХС из этих ЛВП клетками, и, следовательно, накоплению ХС. Учитывая однонаправленность изменений липидного состава ЛВП и совпадение их с данными литературы, мы полагаем, что увеличение ЛФХ, также как и снижение свободного ХС в ЛВП может отражать нарушение способности этих ЛП к акцепции ХС из клеток периферических тканей, и, следовательно нарушение процесса обратного транспорта ХС.

Таким образом, использованная в настоящей работе одномерная ТСХ при последовательном применении двух систем растворителей позволяет выявить 10 классов липидов в составе ЛВП. Соотношение отдельных фракций ФЛ и ХС в ЛВП, полученное при компьютерной денситометрии хроматограмм, совпадает с данными, полученными общепринятыми методами, а соотношение фракций глицеридов - с данными высокоспецифичного метода ГЖХ. Применение такого способа определения липидного состава ЛВП позволило установить особенности липидного состава ЛВП

при разных формах наследственных ГЛП. Мы полагаем, что использование предложенного метода целесообразно для оценки изменений состава ЛВП при проведении гиполипидемической терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Kates M.* (1972). *Techniques of Lipidology*. North Holland Publishing Company, Amsterdam-London, pp. 428-446.
2. *Pucsek J., Kovacs L., Zalka A. et al.* (1988) *Clin. Biochem.*, **21**, 81-85.
3. *Goldstein J., Schrott H., Hazzard W. et al.* (1973) *J. Clin. Invest.*, **52**, 1544-1568.
4. *Hayden M., Josephson R.* (1993) *Am. J. Card.*, **72**, 25D-29D.
5. *Kostner G., Avogaro P., Bittolo Bon G. et al.* (1979) *Clin. Chem.*, **25**, 939-942.
6. *Торховская Т.И., Колдаева А.П., Курчатова С.А. и др.* (1977) *Вопр. мед. химии*, N 6, 768-773.
7. *Bovet P., Darioli R., Essinger A. et al.* (1989) *Atherosclerosis*, **80**, 41-47.
8. *Ahnadi C., Berthezene F., Ponsin G.* (1993) *Atherosclerosis*, **99**, 219-228.
9. *Moshides J.* (1987) *Arteriosclerosis*, **7**, 262-266.
10. *Vieu C., Jaspard R., Barbaras R. et al.* (1996) *J. Lipid Res.*, **37**, 1153-1161.
11. *Kunz F., Pechlaner C., Erhart R. et al.* (1994) *Arterioscler. Thromb.*, **14**, 1146-1150.
12. *Kunz F., Zwerzina W., Hotnagel H.* (1983) *Atherosclerosis*, **49**, 195-202.
13. *Schmidt G., Lackner K.* (1993) *Curr. Opin. Lipidol.*, **4**, 392-400.
14. *Bruce C., Tall A.* (1995) *Curr Opin Lipidol.*, **6**, 306-311.
15. *Feilding P., Fielding C., Havel R. et al.* (1983) *J. Clin. Invest.*, **71**, 449-460.
16. *Jonson W., Bamberger M., Latta R., Rapp P. et al.* (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 5766-5776.
17. *Hara S., Shike T., Takasu N. et al.* (1997) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **17**, 1258-1266.
18. *Collet X., Perret B., Chollet F. et al.* (1988) *Biochim. Biophys. Acta*, **958**, 81-92.

HIGH DENSITY LIPOPROTEIN LIPID COMPOSITION AT HEREDITARY HYPERLIPOPROTEINEMIA

M.G. TVOROGOVA, P.N. VASIN, T.A. ROZHKOVA, V.V. KUKHARCHUK, V.N. TITOV

Institute of Clinical Cardiology, Cardiology Research Complex.
121552, 3rd Cherepkovskaya str. 15A,
Moscow, fax (095) 4152962

The lipid composition of high density lipoproteins was studied in 53 patients with various forms of hereditary hyperlipoproteinemia. 20 healthy individuals formed control group. One-dimensional thin-layer chromatography on silica gel with two solvent systems was used to separate lipid fractions of high density lipoproteins. Ten fractions were identified: four phospholipids (phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine, sphingomyelin, phosphatidylethanolamine) mono-, di-, and triglycerides, free cholesterol, cholesterol esters and free fatty acids. Proportion of HDL phospholipid and cholesterol fraction got by Shimadzu (CS-930) chromato-scanner corresponds to data received with the use of traditional methods. Comparison of high density lipoproteins lipid classes proportions for the individuals with normo- and hyperlipoproteinemia demonstrates increase of lysophosphatidylcholine and decrease of phosphatidylethanolamine for all hereditary hyperlipoproteinemia forms investigated in the study.

Key words: high density lipoprotein, hereditary hyperlipoproteinemia, cholesterol, phospholipids.