

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.125:616.379-008.64:577.15.173

©Коллектив авторов

ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА ЛИПОПРОТЕИНОВ ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ, САХАРНОМ ДИАБЕТЕ ТИПА 2 И МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ

Г.Х. Божко, В.В. Соколик, В.С. Чурсина, Т.Г. Перцева

Институт неврологии, психиатрии и наркологии АМН Украины,
61068 Харьков, ул. Академика Павлова, 46;
тел.: +380 572 26 40 83; факс: +380 572 26 33 87; эл. почта: doctor@alc-help.com

В сыворотке крови больных артериальной гипертензией, сахарным диабетом типа 2 (СД-2) и метаболическим синдромом (МС) исследовали количество апоВ- и апоА-содержащих фракций липопротеинов (ЛП), активность свободной и связанной форм липопротеинлипаз (ЛПЛ) печени и внепеченочных тканей, а также активность лецитин-холестеролацилтрансферазы (ЛХАТ). Обнаружили, что наибольшими изменениями количества всех исследованных фракций ЛП по сравнению со здоровыми лицами и пациентами других исследованных групп характеризовались больные СД-2. Снижению уровня апоА-содержащих ЛП при СД-2 и МС соответствовало уменьшение активности ЛХАТ. На основании полученных данных предполагается, что одна из особенностей нарушений обмена ЛП у больных заключается в освобождении в кровотоке части липолитических ферментов, локализованных на эндотелии капилляров. Существенную роль в перераспределении ЛПЛ может играть гепарин, концентрация которого в клетках крови уменьшалась у всех больных.

Ключевые слова: липопротеины, сыворотка крови, липопротеинлипазы, лецитин-холестеролацилтрансфераза, метаболический синдром.

ВВЕДЕНИЕ. Комплекс симптомов, характеризующих метаболический синдром (МС), включает нарушение обмена липидов. Актуальность исследования механизмов метаболических отклонений в процессах превращения липопротеинов (ЛП) обусловлена тем, что они являются факторами риска различных сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). Обмен липидов в настоящее время интенсивно исследуется в рамках проблемы инсулинорезистентности (ИР) [1]. Несомненно, что ИР способствует индукции и утяжеляет течение ССЗ. Наблюдается достаточно типичная картина дислипидемий (ДЛП) - гипертриглицеридемия, снижение уровня ЛП высокой плотности (ЛВП), изменение состава некоторых фракций ЛП [2]. Между тем представления о механизмах превращения ЛП, включая процессы липолиза, изменения регуляторной функции инсулина и некоторые другие, неоднозначны [3].

Цель настоящей работы состояла в исследовании содержания основных фракций ЛП* плазмы крови, а также активности ферментов, которые принимают участие в механизмах их превращения, в сыворотке крови больных артериальной гипертензией (АГ), сахарным диабетом второго типа (СД-2) и МС.

* - Принятые сокращения: ХМ - хиломикроны, ЛОНП, ЛПП, ЛНП - липопротеины очень низкой, промежуточной и низкой плотности, соответственно; ЛВП_{2А}, ЛВП_{2В}, ЛВП₃ - фракции липопротеинов высокой плотности.

МЕТОДИКА. Исследовали сыворотку крови 40 больных обоего пола, в возрасте $56,3 \pm 3,2$ года. 14 из них страдали АГ без признаков сахарного диабета, 16 - СД-2 и 10 характеризовались наличием МС. Клинические признаки патологических проявлений подтверждались результатами лабораторных исследований - глюкозы в капиллярной крови натощак, нарушения толерантности к глюкозе, гликированного гемоглобина. Контрольную группу составили 10 здоровых добровольцев обоего пола, в возрасте $55,4 \pm 4,0$ года.

Сыворотку крови получали центрифугированием – 10 мин, 3000 об/мин при 4°C . Величину свободной активности ЛПЛ сыворотки крови определяли ранее описанным методом [4]. Активность ЛПЛ, связанной с эндотелием капилляров, оценивали после освобождения фермента при внутривенном введении гепарина в дозе 50 ЕД на 1 кг массы тела с экспозицией 15 мин. О величине активности ЛПЛ судили по приросту концентрации незэтерифицированных жирных кислот (НЭЖК) за 2 ч инкубации и выражали в нмоль НЭЖК, освобожденных из состава ТГ за 1 с инкубации в 1 л сыворотки крови. Величину связанной ЛПЛ активности рассчитывали как разность между активностями постгепариновой и свободной формами фермента. Активность внепеченочной и печеночной ЛПЛ (ВЛПЛ и ПТГЛ) дифференцировали в присутствии хлористого натрия, который добавляли в среду для инкубации (10 % альбумин, трис-НСI, pH 8,2) до конечной концентрации 1 моль/л.

Холестерол-этерифицирующую способность сыворотки крови, которую обуславливает каталитическая активность ЛХАТ, определяли методом Stokke и Norum [5] и выражали в нмоль холестерина, подвергшегося этерификации в 1 л сыворотки за 1 с инкубации при 37°C – нмоль/(л·с).

ЛП определяли по методу, описанному в предыдущих работах [6, 7]. Гель-электрофорез проводили в течение 1,5 ч при постоянной силе тока 60 мА в вертикальных пластинах ($160 \times 140 \times 2$ мм) с линейным градиентом концентрации акриламида 2,5-10% (pH 8,9). Для стабилизации градиента концентрации акриламида добавляли сахарозу до конечной концентрации 10%. Использовали реактивы фирмы “Reanal” (Венгрия). Для идентификации ЛП, получаемых в результате электрофореза, параллельно с образцами сыворотки разделяли отдельные фракции ЛП, выделенные ультрацентрифугированием [6].

Электрофореграммы сканировали на денситометре ERI-65m (“Karl Zeiss”, Германия). Полученные денситограммы использовали для качественного анализа фракций липопротеинов. Цифровой материал вводили в персональный компьютер. В основу программного обеспечения входил алгоритм обработки цифрового материала, который включал подпрограммы поиска максимальных величин оптической плотности отдельных фракций по второй производной огибающей кривой денситограммы и вычисления площади пиков в мм^2 , а также оптимизации и сравнения расчетных величин с реальной интегральной кривой.

Полученные данные обрабатывали по методу Фишера-Стьюдента. В отдельных экспериментах достоверность различий определяли с помощью непараметрического критерия Вилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Данные, представленные в таблице 1, свидетельствуют, что у всех исследованных групп больных по сравнению с контролем наблюдалось увеличение содержания ХМ. Наибольшее возрастание этой фракции ЛП отмечалось при СД-2. Только эти больные характеризовались повышением уровня другой фракции ЛП, богатой триглицеридами, - ЛОНП. При АГ и МС концентрация этих частиц в сыворотке крови не изменялась. Статистически достоверно у них не отличалась по сравнению со здоровыми лицами и сумма триглицеролбогатых фракций. Эти данные находятся в соответствии с величиной активности постгепариновой ВЛПЛ, которая при АГ и МС не отличалась от контроля (табл. 2).

Таблица 1. Изменение количества липопротеинов у больных АГ, СД-2 и МС.

Фракции липопротеинов	Контроль	Б о л ь н ы е		
		Артериальная гипертензия	Сахарный диабет типа 2	Метаболический синдром
ХМ	66±2,0	88±2,6*	123±3,7*	95±2,8*
ЛОНП	188±7,5	212±10,6	284±11,4*	206±10,3
ЛПП	140±4,2	101±3,4*	68±2,0***	84±2,5*
ЛНП	396±11,9	520±20,8*	547±21,8*	392±15,7
Σ apoB	790±31,1	921±52,3	1020±59,7*	777±28,8
ЛВП _{2B}	145±7,2	142±7,2	52±2,6***	85±4,2*
ЛВП _{2A}	180±6,8	187±7,6	78±2,8***	89±3,5*
ЛВП ₃	166±6,6	139±7,0	67±2,6***	98±3,9*
Σ apoA	491±19,6	468±21,3	197±7,9*	272±10,8*
Σ всех фракций	1281±64	1389±69	1217±60	1049±52

Примечания: Количество фракций липопротеинов представлено в виде площади пиков денситограммы и выражено в мм². Здесь и в последующих таблицах: * - изменение статистически значимо по сравнению с контролем (p<0,05); ** - изменение статистически значимо по сравнению с другими группами больных (p<0,05).

Таблица 2. Изменение липопротеинлипазной активности сыворотки крови (нмоль/(л·с)) у больных АГ, СД-2 и МС.

Фракция фермента		Контроль	Б о л ь н ы е		
			Артериаль- ная гипертензия	Сахарный диабет типа 2	Метаболический синдром
Висцеральная липопротеинлипаза	Постгенартери- нозная	11,1±0,3	11,6±0,3	14,9±0,4*	12,4±0,4
	Свободная	2,8±0,2	4,3±0,2*	4,2±0,2*	4,4±0,2*
	Связанная	8,3±0,4	7,3±0,3	10,7±0,5*	8,0±0,4
Печеночная липопротеинлипаза	Постгенартери- нозная	6,6±0,2	10,9±0,3*	10,8±0,3*	18,8±0,6*
	Свободная	1,0±0,05	2,6±0,13*	2,40,13*	5,1±0,26*
	Связанная	5,6±0,2	8,3±0,4*	8,4±0,4*	13,7±0,6*

ОБМЕН ЛИПОПРОТЕИНОВ ПРИ ПАТОЛОГИИ

У всех пациентов наблюдалось уменьшение по сравнению с контролем концентрации ЛПП. При этом, наибольшим изменением характеризовались больные СД-2 (табл. 1). Содержание ЛПП у них было меньше при сопоставлении с больными АГ и МС.

Известно, что гидролиз триглицеролов (ТГ) в составе ЛПП катализирует преимущественно ПТГЛ [8]. Данные, представленные в таблице 2, свидетельствуют, что активность этого фермента у всех пациентов возрастала. На этом основании можно предположить, что снижение уровня ЛПП обусловлено повышением функции ПТГЛ, хотя у разных групп больных отсутствует пропорциональность между величиной снижения ЛПП и повышения активности ПТГЛ.

У больных СД-2 (табл. 1), наряду с повышенным содержанием ТГ-богатых фракций ЛП, наблюдался наиболее высокий уровень ЛНП. Эти частицы количественно преобладают среди апоВ-содержащих ЛП и, как правило, определяют значение их суммы. В итоге, обнаружилось, что общее количество апоВ-содержащих ЛП при АГ и МС не отличалось от контроля, в то время как при СД-2 было на 29% больше.

При рассмотрении апоА-содержащих фракций ЛП (табл. 1) обращает на себя внимание отсутствие изменений их количества при АГ. Наблюдалась лишь статистическая тенденция к уменьшению ЛВП₃ ($0,05 < p < 0,1$). Между тем больные СД-2 и МС характеризовались значительным понижением уровня всех исследованных субфракций апоА-содержащих ЛП. При этом, изменение больше выражено у пациентов с СД-2 по сравнению с больными МС. Полученные результаты вполне согласуются с данными литературы, которые свидетельствуют, что одним из характерных признаков синдрома ИР является низкий уровень ХС ЛВП [9]. Эта особенность нарушения обмена ЛП при данной патологии крайне стабильна и фигурирует как один из компонентов “липидной триады” [10]. На основании совокупности приведенных данных приходим к заключению, что нарушения обмена ЛП при развитии синдрома ИР в наибольшей степени выражены у больных СД-2.

Как видно из данных, приведенных в таблице 3, исследованные больные характеризовались уменьшением активности ЛХАТ. Наряду с этим у них наблюдалась низкая концентрация свободного холестерина (ХС). Таким образом, понижение ХС-этерифицирующей активности крови может быть связано с дефицитом субстрата. Вместе с тем известно, что недостаточность ЛХАТ ассоциируется с низким уровнем ХС ЛВП [10]. Следовательно, можно полагать, что снижение количества апоА-содержащих ЛП объясняется угнетением ХС-этерифицирующей способности сыворотки крови.

Таблица 3. Изменение холестерол-этерифицирующей способности сыворотки крови (нмоль/(л·с)) и концентрации свободного холестерола (ммоль/л) у исследованных групп больных по сравнению с контролем.

Исследованный параметр	Контроль	Больные		
		Артериальная гипертензия	Сахарный диабет типа 2	Метаболический синдром
ЛХАТ	10,2±0,3	7,4±0,2*	7,0±0,2*	6,1±0,2*
Свободный холестерол	1,9±0,05	1,5±0,04*	1,5±0,04*	1,21±0,04*

У всех обследованных больных наблюдалось повышение практически в равной степени активности свободной формы ВЛПЛ (табл. 2). Это происходило на фоне одинаковой в контроле, а также у больных АГ и МС активности постгепариновой (общей) ВЛПЛ. При СД-2 ее величина возрастала. На основании приведенных данных можно предположить, что одна из особенностей патологических состояний, связанных с ИР, заключается в освобождении в кровотоке части липолитических ферментов, локализованных на эндотелии капилляров периферических по отношению к печени тканей.

Функция свободной формы липаз печеночного происхождения возрастала даже больше, чем ВЛПЛ (табл. 2). Между тем это сопровождалось значительным повышением уровня и связанной с эндотелием формы энзима. Сопоставление этих результатов позволяет предположить не только усиленное высвобождение ПТГЛ из связи с эндотелием капилляров печени, но и активацию ее молекул как в свободной, так и в связанной формах. Возможно, также, происходит усиление синтеза фермента.

Существенную роль в перераспределении активности между свободной и связанной формами липолитических ферментов в условиях ИР может играть гепарин. Данные литературы свидетельствуют, что сродство этого гликозаминогликана больше к ВЛПЛ по сравнению с ПТГЛ [11]. Результаты настоящей работы подтверждают данный вывод, поскольку у здоровых лиц содержание свободной формы ПТГЛ составляло 15% относительно общей фракции, в то время как доля свободной ВЛПЛ равнялась 25%. Относительное содержание свободной ВЛПЛ было неизменно выше, чем ПТГЛ в сыворотке крови у всех исследованных групп больных.

Концентрация гепарина в клетках крови больных значительно уменьшалась, что может свидетельствовать об увеличении поступления его в плазму крови. Это предположение согласуется с наблюдением обратной пропорциональной зависимости между величиной активности свободной формы ПТГЛ в ряду - здоровые лица, больные АГ, СД-2 и МС и соответствующим изменением концентрации внутриклеточного гепарина - 0,27; 0,15; 0,13; 0,10 ЕД/мл в контроле, у больных АГ, СД-2 и МС соответственно. Наибольшей активности свободной ПТГЛ у больных МС соответствовало самое низкое содержание внутриклеточного гепарина.

Одна из каталитических функций ВЛПЛ заключается в расщеплении ТГ в составе ЛОНП. Между тем у больных СД-2 наблюдалось сочетание повышенной активности ВЛПЛ и высокой концентрации ЛОНП (табл. 1, 2). Для объяснения механизмов этого явления используют данные о белках-переносчиках эфиров ХС (БПЭХ) [12]. Одна из фракций этих белков катализирует реакцию обмена ЭХС на ТГ между апоВ-содержащими ЛП. При этом, ТГ из состава ЛОНП переносятся на ЛНП взамен эквивалентного количества ЭХС. Следствием этой реакции является изменение структуры ЛНП. В кровотоке образуется подфракция мелких, плотных ЛНП "фенотипа В" [13]. Результаты настоящей работы подтверждают возможность модификации частиц ЛНП в сыворотке крови больных СД-2. Как видно на рисунке 1, подвижность при электрофорезе этих частиц при СД-2 существенно выше, чем в контроле. К тому же, в спектре ЛНП больных СД-2 наблюдается особенность в виде "плеча", что указывает на вероятность присутствия дополнительной субфракции этих ЛНП. Таким образом, высокий уровень ЛОНП у больных СД-2 может формироваться не только за счет усиления их синтеза и секреции в кровь. Вероятно, он отражает также обратный перенос ЭХС в направлении ЛНП→ЛОНП.

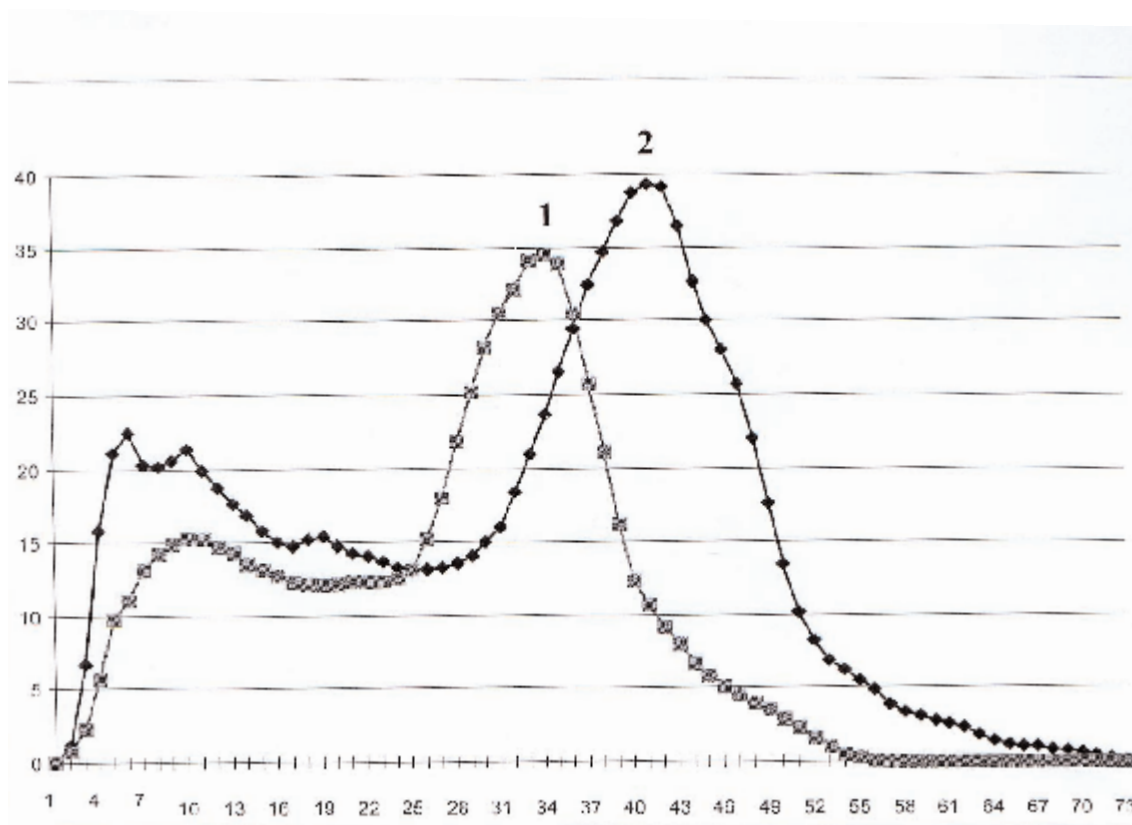


Рисунок 1.

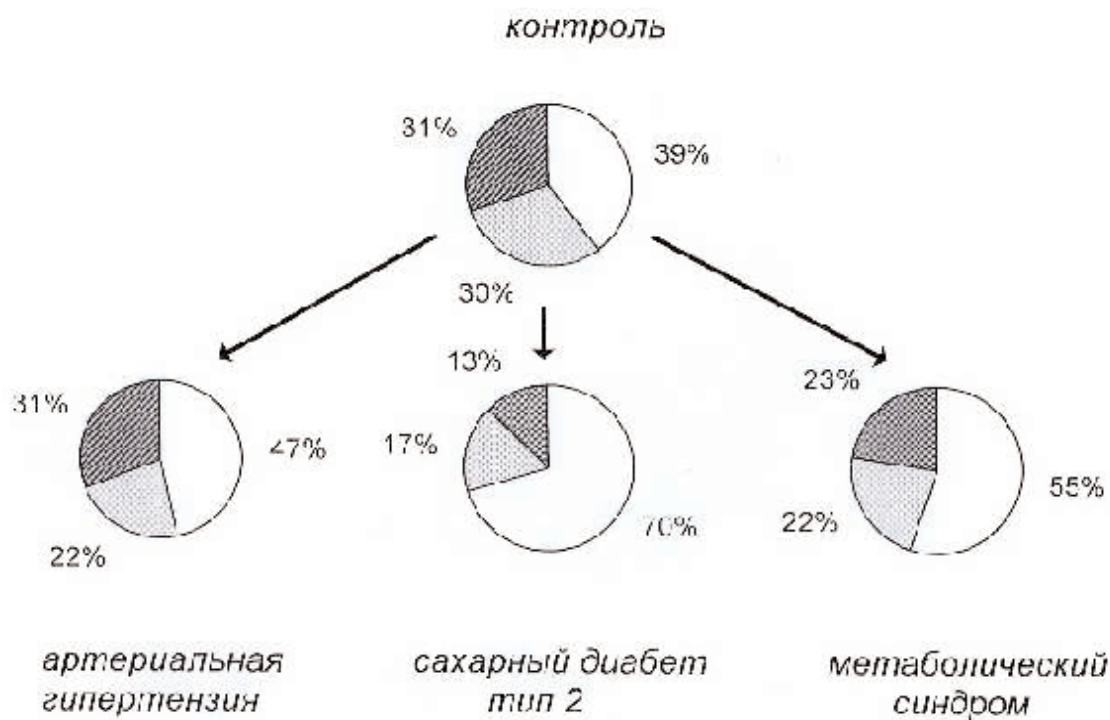
Денситограмма липопротеинов низкой плотности здоровых лиц и больных сахарным диабетом типа 2. По оси ординат – оптическая плотность ($\lambda = 560$ нм).

По оси абсцисс – длина электрофоретического пути (мм).

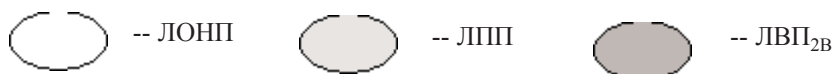
1 – контроль, 2 – больные СД - 2 .

Известно, что ТГ-богатые ЛП выступают в качестве предшественников формирования ЛНП и части апоА-содержащих фракций [14]. Механизмы этих процессов сопряжены с липолизом ТГ.

Анализ системы субстрат-продукт, состоящей из ЛОНП, ЛПП и ЛВП_{2в} (рис. 2), показывает, что у всех больных доля ЛОНП относительно суммы больше, чем у здоровых. В контроле относительно суммы компонентов образуется равное количество ЛПП и ЛВП_{2в}. У больных АГ наблюдается незначительное преобладание формирования ЛВП_{2в} над ЛПП. Самое существенное среди исследованных больных нарушение перераспределения фракций происходит при СД-2. Относительное содержание ЛПП и ЛВП_{2в} по сравнению с ЛОНП резко уменьшалось. Качественно подобным, однако выраженным в меньшей степени изменением, характеризовались больные МС. Таким образом, несмотря на высокое абсолютное содержание ЛОНП и повышенную активность ВЛПЛ у больных СД-2, наблюдается относительный дефицит ЛВП_{2в} и ЛПП.

**Рисунок 2.**

Соотношение (в % к сумме фракций) между ЛОНП и продуктами его превращения у здоровых и больных лиц.



В русле крови частицы ЛВП_{2А}, также как ЛОНП, превращаются по двум направлениям. В результате формирования ЛВП_{2В} заканчивается цикл метаболизма ЛП вследствие утилизации их в печени. Другой путь превращения ЛВП_{2А} катализирует БПЭХ. В результате, около 75% ЭХС переносится на ЛПП, т.е. возвращается в кругооборот липидов [15]. Данные, представленные на рисунке 3, свидетельствуют, что у здоровых лиц относительно суммы (ЛВП_{2А}+ЛПП+ЛВП_{2В}) происходит равномерное распределение между ЛПП и ЛВП_{2В}. У больных АГ на фоне слегка повышенной относительно суммы фракций доли ЛВП_{2А} замедлен перенос липидов на ЛПП. В то же время при СД-2 и МС, как в контроле, наблюдается достаточно равномерное распределение фракций относительно их суммы.

Таким образом, можно предположить, что в условиях значительных количественных изменений ЛП и активности ферментов, которые принимают участие в процессах их превращения, отдельные стадии транспорта липидов у исследованных больных остаются относительно сбалансированными.

Обнаруженные нарушения обмена ЛП у исследованных групп больных суммированы в схеме (рис. 4). На основании полученных результатов и данных литературы можно предположить, что механизмы увеличения количества апоВ-содержащих ЛП у исследованных групп больных подобны и могут заключаться, с одной стороны, в усилении процессов их новообразования в печени. С другой стороны, возможно замедление их поступления в периферические ткани, что в совокупности способствует длительной циркуляции и последующей модификации в кровотоке ЛНП. Увеличение количества апоВ-содержащих ЛП сопряжено с реципрокным, резко выраженным при МС и СД-2 снижением в сыворотке крови уровня апоА-содержащих фракций. Механизмы нарушения обмена ЛП в русле крови связаны с изменением активности ферментов, катализирующих их превращение.

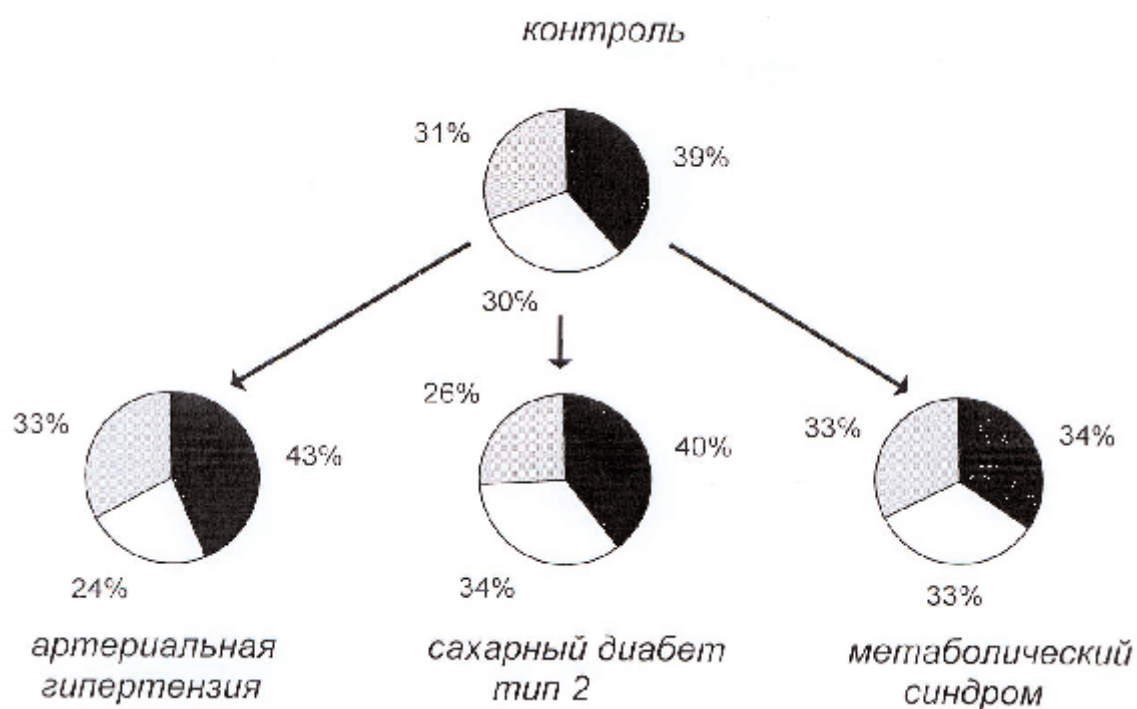


Рисунок 3.

Соотношение (в % к сумме фракций) между ЛВП_{2А} и продуктами его превращения у здоровых и больных лиц.

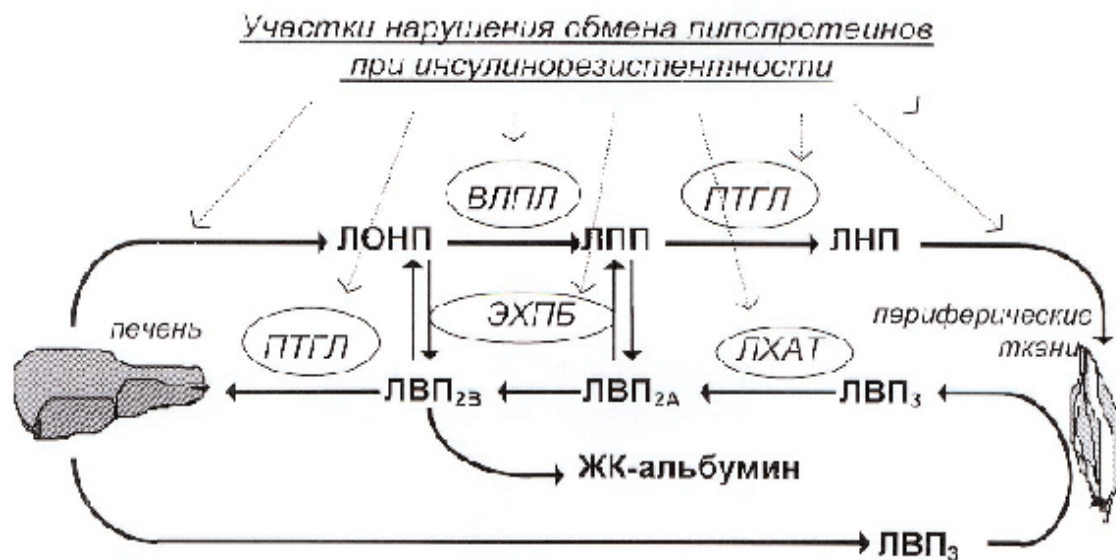


Рисунок 4.

Схема обмена липопротеинов и его нарушений (указаны пунктирными стрелками) в условиях инсулинорезистентности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Valdez P.A., Hazura H.P. (1992) *Diabetes*, **41**, 715-722.
2. Beck-Nielsen H. (1999) *Drugs*, **58**, Suppl. 1, 75-82.
3. Grundy C.M. (1999) *Amer. J. Cardiol.*, **83**, 25-29.
4. Deekelbaum R.L., Ramakrishnan R., Eisenberg S. (1992) *Biochemistry*, **31**, 8544-8551.
5. Stokke K.T., Norum K.R. (1971) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **27**, 21-27.
6. Божко Г.Х., Кулабухов В.М. (1993) *Биохимия*, **58**, 1594-1603.
7. Божко Г.Х., Артмчук А.Ф., Чурсина В.С. (2002) *Укр. биохим. журн.*, **74**, 48-51.
8. de Faria E., Fong L.J., Komaromy H. (1996) *J. Lipid. Res.*, **37**, 197-209.
9. Кузин А.А., Чередникова М.А., Васильев А.А. (2003) *Артериальная гипертензия*, **9**, 67-69.
10. Робинс С. Дж. (2001) *Коррекция липидных нарушений (пер. с англ.)*, Медицина, М.
11. Woll J., Jansen H., Smith L.C. (1993) *J. Lipid. Res.*, **34**, 2169-2176.
12. Lagrost L. (1994) *Biochim. Biophys. Acta*, **1215**, 209-236.
13. Доборджгинидзе Л.М., Грацианский Н.А. (2001) *Проблемы эндокринологии*, **47**, 35-40.
14. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. (1999) *Обмен липидов и липопротеинов и его нарушения*, "Питер", С.-Петербург.
15. Титов В.Н., Кухарчук В.В. (2001) *Артериальная гипертензия*, **7**, 11-20.

Поступила: 13. 09. 2004.

THE LIPOPROTEIN METABOLISM IN ARTERIAL HYPERTENSION, TYPE II DIABETES MELLITUS, AND METABOLIC SYNDROME

G.Kh. Bozhko, V.V. Sokolyk, V.S. Chursina, T.G. Pertseva

Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of the AMS of Ukraine
Akademika Pavlova ul., 46, Kharkiv 61068, Ukraine;
tel.: +380 572 26 40 83; fax: +380 572 26 33-87; e-mail: doctor@alc-help.com

The apoA- and apoB-containing lipoprotein (LP) fractions, activity of free and linked forms of lipoprotein lipases (LPL) of liver and extrahepatic tissues, and also activity of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) were examined in the blood serum of patients with arterial hypertension, type II diabetes mellitus (DM-II), and metabolic syndrome (MS). Patients with DM-II had the most pronounced changes of all investigated LP fractions compared with healthy persons and patients of other groups examined. Decrease of LCAT activity corresponded to declining level of apoA-containing LP in DM-II and MS. Based on these data obtained we suppose, that one of peculiarities of LP metabolic disorders in the patients is a releasing of a part of lipolytic enzymes, located on the capillary endothelium, into blood flow. Heparin may have an important role in LPL redistribution, as its concentration in blood cells was declined in all the patients.

Key words: lipoproteins, blood serum, lipoprotein lipases, lecithin:cholesterol acyltransferase, metabolic syndrome.