

## **Сравнительная характеристика изменений функциональной активности липопротеинов высокой плотности белых беспородных лабораторных крыс при экспериментальном перитоните и септицемии**

*Витебский государственный медицинский университет, ЦНИЛ и кафедра общей и клинической биохимии Республика Беларусь г. Витебск*

В эксперименте на белых беспородных лабораторных крысах самцах обнаружили, что функциональная активность ЛПВП зависит от способа активации воспалительного процесса. В ранние сроки экспериментального перитонита увеличивается активность ЛХАТ и содержание холестерина ЛПВП. Происходит разделение эфиров холестерина на 2 функциональных пула. В ранние сроки экспериментальной септицемии снижается содержание холестерина ЛПВП и отсутствует четкое деление эфиров холестерина на 2 функциональных пула. Ключевые слова: перитонит, септицемия, ЛПВП, холестерол, жирные кислоты. Сепсис и септический шок являются одними из наиболее значительных причин смертности в клинике интенсивной терапии [10], в том числе и хирургической практики. Ранее считалось, что липопротеины высокой плотности (ЛПВП) обеспечивают лишь функцию обратного транспорта холестерина. В настоящее время, круг их функциональных обязанностей значительно расширен. В частности, ЛПВП осуществляют транспорт полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) [8], обладают антиоксидантной активностью [12], регулируют активность глюкокортикоидов [6]. Вместе с тем, основные работы по функциональной активности этого класса липопротеинов касаются процессов атерогенеза и мало освещена роль ЛПВП в генерализованных воспалительных процессах, таких как сепсис и перитонит. Ранее нами были описаны изменения функциональной активности ЛПВП в ранние сроки экспериментального перитонита. [4,5]. Целью настоящей работы было сравнение функциональной активности ЛПВП в ранние сроки развития экспериментального перитонита и септицемии.

### **Материал и методы**

В эксперименте использовались белые лабораторные беспородные крысы самцы со средней массой тела 180 – 200 гр. Бактериемию моделировали однократным введением  $6 \times 10^9$  микробных тел *E. Coli* (штамм O-26) в хвостовую вену 16 животным. Перитонит вызывали внутрибрюшинным введением  $4 \times 10^9$  микробных тел *E. Coli* (штамм O-26) 15 крысам самцам. Контролем служили 12 интактных животных. Экспериментальных животных декапитировали через 4 часа после инъекции *E. Coli* под эфирным наркозом. После вскрытия брюшной полости, надпочечники отделяли от окружающей ткани и замораживали до обработки в жидком азоте. Для извлечения липидной фракции, железы взвешивались и гомогенизировались в гомогенизаторе Поттера-Эльвехейма (Potter-Elvehjem) в смеси хлороформа и метанола (соотношение 2:1 по объему). Количество холестерина исследовали с помощью реакции Либермана-Бурхарда. Из плазмы выделяли ЛПВП методом химической преципитации апо-В-содержащих липопротеинов под действием гепарина в присутствии ионов марганца ???. Холестерол (ХС) определяли наборами, предоставленными коммерческой фирмой

Анализ-Х (Белорусский государственный университет), принцип действия которых основан на реакции Либермана-Бурхарда. Липидную фракцию ЛПВП экстрагировали смесью хлороформ: метанол (2:1). Общие фосфолипиды (ОФЛ) ЛПВП определяли после их минерализации по неорганическому фосфату в реакции с молибденовокислым аммонием в присутствии аскорбиновой кислоты. Фосфолипиды разделяли двумерной тонкослойной хроматографией [1], собирали в огнеупорные пробирки и минерализовали в хлорной кислоте при температуре 220 – 240°C. Процентное содержание оценивали по неорганическому фосфату [14]. Для определения спектра жирных кислот эфиров холестерина (ЭХС) ЛПВП, липидный экстракт разделяли мономерной тонкослойной хроматографией в системе растворителей гексан (73мл): диэтиловый эфир (25 мл): ледяная уксусная кислота (2мл). Фракции ЭХС собирали в вials, метилировали 0,75N серной кислотой в метаноле при температуре 65°C в течение 24 часов. Метилловые эфиры жирных кислот экстрагировали гексаном. Экстракт упаривали досуха в токе азота, немедленно растворяли в ацетоне и анализировали на газовом хроматографе Цвет 500М (колонка длиной 2 м, набита реоплекс 400, скорость потока газа-носителя (He) – 30 мл/мин, детектирование пламенно-ионизационным детектором по стандартам метилловых эфиров жирных кислот (Sigma)). Соотношения детектированных жирных кислот рассчитывали по площади пиков и выражали в процентах. Для исследования активности лецитин:холестерол-ацилтрансферазы (ЛХАТ) использовались коммерческие наборы Immunotech Чехия. Принцип метода определения активности ЛХАТ основан на измерении скорости включения 14С-холестерола в состав эфиров холестерина исследуемой плазмы после их выделения методом мономерной тонкослойной хроматографии. Активность фермента выражали в мкмоль образованного холестерина на 1 л плазмы в час. Количество кортизола определяли радиоиммунологическими наборами предоставленными “хозрасчетным опытным производством Института биоорганической химии Академии наук Беларуси”. Результаты обрабатывались статистически с использованием t-критерия Стьюдента с помощью компьютерной программы Excel.

Результаты и обсуждение

Через 4 часа в ЛПВП крыс с экспериментальным перитонитом достоверно увеличивалось содержание ХС (таблица 1) за счет увеличения активности ЛХАТ ( $p=0,0007$ ,  $0,0006$ ). Увеличение активности ЛХАТ закономерно сопровождалось увеличением содержания продукта этой реакции лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) ( $p<0,0001$ ) и снижением содержания субстратов фосфатидилхолинов (ФХ) ( $p<0,0001$ ) и фосфатидилэтаноламинов (ФЭА) ( $0,03$ ), что приводило к уменьшению содержания ОФЛ ( $p=0,0007$ ). Одним из факторов, способствовавших увеличению активности ЛХАТ, было снижение содержания сфингомиелинов (СФМ) ( $p=0,006$ ), способных специфически ингибировать этот фермент [9]. Исследование жирнокислотного спектра ЭХС ЛПВП показало увеличение содержания пальмитиновой (С16:0) ( $p=0,02$ ) и дигомо-?-линоленовой (ДГЛК)(С20:3) ( $0,004$ ) кислот, а так же тенденцию к увеличению содержания линолевой (С18:2) кислоты ( $p=0,06$ ). При этом содержание миристиновой (С14:0), гептадекановой (С17:0), гептадеценовой (С17:1), олеиновой (С18:1) и арахидоновой (С20:4) кислот было снижено ( $p=0,0005$ ,  $0,015$ ,  $0,009$ ,  $0,0007$  соответственно), а содержание стеариновой кислоты (С18:0) имело тенденцию к более низким, чем у интактных животных значениям ( $p=0,07$ ). Таким образом, обращает на себя

внимание разделению ЭХС на 2 пула. Первый этерифицирован преимущественно пальмитиновой кислотой (66,29%), а второй-преимущественно ДГЛК (24,6%). Исследование содержания ХС надпочечников (таблица 1) продемонстрировало увеличение его количества в группе экспериментального перитонита ( $p=0,017$ ). Известно, что у крыс поставка ХС надпочечникам осуществляется в составе ЛПВП и эфиры холестерина переносящие белки (ЭХПБ) в норме не экспрессированы [2]. Однако, при воспалительном процессе, происходит снижение продукции альбумина и даже у крыс экспрессируется ЭХПБ [15], одной из функций которых является транспорт ПНЖК [8]. Вместе с тем ЭХПБ не способны переносить ЭХС этерифицированные насыщенными жирными кислотами [8]. Таким образом, исходя из сказанного можно предположить, что обнаруженные 2 пула ЭХС ЛПВП имеют различное функциональное предназначение. Пул, обогащенный пальмитиновой кислотой, предназначен для поставки ХС надпочечникам, а пул этерифицированный ДГЛК призван обеспечить замещение арахидоновой кислоты в составе фосфолипидов тканей с целью обеспечения продукции простаноидов первого ряда, обладающих менее выраженной провоспалительной активностью, чем простаноиды второго ряда продуцирующиеся из арахидоновой кислоты [11].

Таблица 1

Липидный спектр ЛПВП и надпочечников крыс, активность ЛХАТ.

Показатель	Группа	Интактные	Опытные	
			4 часа	
			Септицемия	Перитонит
Активность ЛХАТ, $\text{мкМ/л}^1/\text{ч}^2$		$3,77 \pm 1,87$	$5,88 \pm 2,26^*$	$16,88 \pm 8,94^{**}/^{**}/$
Холестерин ЛПВП, $\text{мм/л}$		$1,47 \pm 0,19$	$1,18 \pm 0,28^{**}$	$1,65 \pm 0,05^{**}/^{**}/$
ОФЛ ЛПВП, $\text{мм/л}$		$3,42 \pm 0,77$	$3,83 \pm 0,77$	$2,37 \pm 0,12^{**}/^{**}/$
Спектр фосфолипидов (%)	ЛФ	$33,12 \pm 2,76$	$31,05 \pm 2,42$	$38,66 \pm 1,04^{**}/^{**}/$
	СФМ	$11,74 \pm 2,11$	$14,58 \pm 1,93^{**}$	$9,08 \pm 1,7^{**}/^{**}/$
	ФХ	$44,22 \pm 2,5$	$41,19 \pm 2,53^{**}$	$40,03 \pm 1,68^{**}$
	ФЗА	$6,38 \pm 1,11$	$5,86 \pm 0,99$	$5,2 \pm 1,1^{**}$
	ПГФ	$5,21 \pm 1,55$	$7,3 \pm 3,95$	$7,01 \pm 2,62^*$
ХС надпочечников $\text{мкМ/г}$		$44,45 \pm 7,6$	$18,84 \pm 3,95^{**}$	$60,15 \pm 14,5^{**}/^{**}/$
Кортизол ЛПВП, $\text{нМ/л}$		$1,5 \pm 0,65$	$5,09 \pm 3,0^{**}$	$1,85 \pm 1,18/^{**}/$

Примечания: \*\*-достоверно, по сравнению с интактными животными; /\*\*/-достоверно по сравнению с септическими животными; \* и /\*/, соответственно, изменения на уровне тенденции.

В группе экспериментальной септицемии содержание ХС ЛПВП достоверно снижалось ( $p=0,03$ ). При этом содержание ингибитора ЛХАТ СФМ было выше, чем у интактных животных ( $p=0,02$ ), что, вероятно, явилось причиной отсутствия достоверного увеличения активности ЛХАТ. Снижение содержания ФХ ( $p=0,05$ ) вероятнее всего обусловлено нарушением их продукции в печени. Исследование спектра жирных кислот ЭХС ЛПВП продемонстрировало значительное увеличение содержания стеариновой (С18:0) кислоты, увеличение содержания ДГЛК ( $p=0,0008, 0,012$  соответственно) и снижение содержания арахидоновой (С20:4) кислоты ( $p=0,01$ ) а так же снижение, до следовых количеств, содержания олеиновой (С18:1)

и линолевой (С18:2) кислот. Таким образом, пул ЭХС этерифицированный НЖК составил 94,47% и значительно превосходил пул ЭХС этерифицированных ПНЖК. Исследование содержания ХС надпочечников продемонстрировало уменьшение его количества ( $p=0,0001$ ), вместе с тем содержание кортизола, связанного с ЛПВП превосходило нормальные значения ( $p=0,034$ ). Такая картина может свидетельствовать о том, что основная часть ЛПВП крыс с экспериментальной септицемией осуществляет поставку ХС надпочечникам с целью обеспечения продукции глюкокортикоидов, а так же, связываясь с синтезированными кортикостероидами, возможно, как это отмечалось в работах Л.Е.Панина и соавторов [6], потенцирует их активность.

Сопоставление исследуемых показателей у животных обеих экспериментальных групп показало, что в группе с экспериментальной септицемией содержание ХС ЛПВП было ниже, чем у животных с экспериментальным перитонитом ( $p=0,0006$ , таблица 1). Это отличие было обусловлено, с одной стороны более высокой активностью ЛХАТ в группе экспериментального перитонита ( $p=0,0006$ ), а с другой стороны, более интенсивным потреблением надпочечниками ХС ЛПВП в группе экспериментальной септицемии. В пользу более высокой активности потребления ХС ЛПВП свидетельствует достоверное отличие в содержании ХС надпочечников ( $p=0,0002$ ) и более высокие значения связанного с ЛПВП кортизола ( $p=0,021$ ).

Сопоставление фосфолипидного спектра ЛПВП показало, что в ЛПВП животных с экспериментальным перитонитом содержание ОФЛ было ниже, чем в ЛПВП животных с экспериментальной септицемией ( $p=0,0002$ ). Это отличие было обусловлено более низким содержанием СФМ ( $p=0,0001$ ). Активность ЛХАТ у животных с экспериментальным перитонитом превосходила таковую в группе животных с экспериментальной септицемией, что закономерно приводило и к более высоким значениям содержания ЛФХ ( $p=0,023$ ,  $<0,0001$ ). В спектре жирных кислот ЭХС ЛПВП определялись следующие отличия (таблица 2). У животных с экспериментальной септицемией ЭХС на 94,47% в основном за счет миристиновой (С14:0) и стеариновой (С18:0) кислот были этерифицированы насыщенными жирными кислотами и лишь на оставшиеся 5,53% моно-и ПНЖК. При этом количество олеиновой (С18:1) и линолевой (18:2) кислот, являющихся предшественниками  $\omega 9$  и  $\omega 6$  ПНЖК [3] было снижено до следовых количеств, что свидетельствует о выраженном дефиците ПНЖК.

Таблица 2

Спектр жирных кислот эфиров холестерина ЛПВП

ЖК	Интактные, %	Опытные	
		4 часа	
		Септицемия, %	Перитонит, %
14:0	15,4±2,44	10,18±2,7*	1,25±0,2**/**/
15:0	1,04±0,49	Следы	0,38±0,18
16:0	50,04±5,2	50,38±0,37	66,29±6,57**/**/
17:0	0,82±0,3	0,68±0,18	0,15±0,05**/**/
17:1	0,73±0,19	0,85±0,32	0,19±0,05**/**/
18:0	5,6±1,47	33,23±5,09**	3,27±0,84**/**/
18:1	8,29±1,06	Следы	2,35±0,31**
18:2	0,66±0,22	Следы	1,47±0,49*
20:3	0,01±0,003	4,43±1,79**	24,61±7,58**/**/
20:4	17,35±4,0	0,23±0,07**	Следы

Примечания: \*\*-достоверно, по сравнению с интактными животными; /\*\*/-достоверно по сравнению с септическими животными; \* и /\*/, соответственно, изменения на уровне тенденции.

Таким образом, сопоставление изменений состава и функциональной активности ЛПВП у крыс с экспериментальным перитонитом и сепсисом позволяет сделать следующие выводы:

1. Изменения функциональной активности и состава ЛПВП зависят от пути попадания возбудителя.
2. При экспериментальном перитоните увеличивается содержание ХС ЛПВП за счет активации ЛХАТ – реакции, вероятно с целью поставки ХС надпочечникам с одной стороны и поставки ДГЛК тканям с целью ограничения активности воспалительного процесса – с другой стороны.
3. При экспериментальной септицемии снижается содержание ХС ЛПВП по причине увеличения потребления ЛПВП надпочечниками. Отмечается увеличение активности связывания кортизола с ЛПВП, вероятно с целью потенцирования его активности.

## Литература

1. Кейтс М. Техника липидологии. Москва.: "Мир," 1975. 358с.
2. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. (1995) Липиды, липопротеиды и атеросклероз. С.-Петербург.
3. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэл В. Биохимия человека. т1. Москва.: "Мир" 1993 381с.
4. Осочук С.С., Коневалова Н.Ю. Динамика изменений липидтранспортной системы в первые сутки экспериментального перитонита у крыс //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины №11, 2004, Стр. 508-511.
5. Осочук С.С., Коневалова Н.Ю. Изменения липидного спектра надпочечников при экспериментальном перитоните у крыс//Здравоохранение 2003 №12. стр.16-18.
6. Панин Л.Е. Кузьменко Д.И., Колпаков А.Р. Влияние апобелков липопротеинов крови на функциональное состояние митохондрий печени крыс // Вопр. Мед. Химии 1983. – Т29, №3. – С.92-95

7. Современные методы исследования липопротеинов высокой плотности (методические рекомендации) /Под ред. Н.В.Перовой М.: -1983.175с.
8. Титов В.Н. Филогенез и становление транспорта в клетки жирных кислот //Клин. Лаб. Диагностика – 1999. №3. – С.3-7
9. Jonas Ana Lecithin cholesterol acyltransferase //Biochimica et Biophysica Acta 1529 (2000) 245-256
10. Henk J.van Leeuwen, Andre P. van Beek, Geesje M.Dallinga-Thie et al The role of high density lipoprotein in sepsis // The Netherlands Journal of medicine 2001. V59.-P. 102-110.
11. Li Zhou and Eke Nilsson Sources of eicosanoid precursor fatty acid pools in tissues //Journal of Lipid Research, Vol. 42, 1521-1542, October 2001
12. Mohamad Navab, Susan Y. Hama, G. M. Anantharamaiah et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3 //Journal of Lipid Research, Vol. 41, 1495-1508, September 2000
13. Timo J. Nevalainen; Markku M. Haapamaki, Juha M. Gronroos Roles of secretory phospholipases A2 in inflammatory diseases and trauma //Biochimica et Biophysica Acta 1488 (2000) 83-90
14. Vaskowsky V.E. et al. A universal reagent for fosfolipids analisis //J.Chromatogr. 1975. Vol.114, P.129-141.
15. van Tol F., Jansen E.H., Koomans H.A., Joles J.A. Hyperlipoproteinemia in Nagase analbuminemic rats: effects of pravastatin on plasma (apo)lipoproteins and lecithin:cholesterol acyltransferase activity. // J Lipid Res. 1991 Nov;32(11):1719-28.