

## ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК 616-01/-009:612.47-003

© Котюжинская С. Г., 2013.

### ОСОБЕННОСТИ СОСТОЯНИЯ ЛИПИДТРАНСПОРТНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПОГЕПАРИНЕМИИ

Котюжинская С. Г.

*Одесский национальный медицинский университет.*

sveta67kot@mail.ru

**Котюжинська С. Г.** Особливості стану ліпідтранспортної системи при експериментальній гіпогепаринемії // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2013. – Т. 8, № 3. – С. 44 – 49.

Вивчені особливості показників ліпідтранспортної системи у тварин при експериментальній гіперліпідемії в умовах гіпогепаринемії. При введенні блокатора гепарину протягом 21 доби у тварин було значне зниження активності ліпопротеїнліпази, рівень змін ліпідного спектру на цьому фоні носив більш атерогенний характер, порівняно з групою тварин, які знаходились тільки на атерогенній дієті. При цьому спостерігали значну гіперхолестеринемію й гіпертригліцеридемію, при зниженні вмісту антиатерогенних холестеринліпопротеїнліпідів високої щільності на фоні достовірного збільшення насичених жирних кислот та зниження поліненасичених, що свідчило про формування стійкої дисліпідемії у тварин.

Встановлено, що одним з важливих механізмів обміну ліпопротеїнів та порушень ліпідтранспортної системи є пригнічення активності ліпопротеїнліпази, зумовлене гіпогепаринемією, що призводить до розвитку атеросклеротичних змін в судинах.

**Ключові слова:** ліпідтранспортна система, ліпопротеїнліпаза, протамін сульфат, гепарин, атерогенна дієта.

**Котюжинская С. Г.** Особенности состояния липидтранспортной системы при экспериментальной гипогепаринемии // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2013. – Т. 8, № 3. – С. 44 – 49.

Изучены особенности показателей липидтранспортной системы у животных при экспериментальной гиперлипидемии в условиях гипогепаринемии. При введении блокатора гепарина в течение 21 дня у животных отмечалось выраженное снижение активности липопротеинлипазы, уровень изменений липидного спектра на этом фоне носил более атерогенный характер по сравнению с группой животных, находящейся только на атерогенной диете. При этом наблюдали выраженную гиперхолестеринемію и гипертриглицеридемію, при резком падении содержания антиатерогенных холестеринлипопротеинлипидов высокой плотности на фоне достоверного увеличения насыщенных жирных кислот и снижения полиненасыщенных, что свидетельствовало о формировании стойкой дислипидемии у данных животных.

Установлено, что одним из важных механизмов обмена липопротеинов и нарушений липидтранспортной системы является угнетение активности липопротеинлипазы, обусловленное гипогепаринемией, приводящие, в итоге, к развитию атеросклеротических изменений в сосудистой стенке.

**Ключевые слова:** липидтранспортная система, липопротеинлипаза, протамин сульфат, гепарин, атерогенная диета.

**Kotyuzhinskaya S.** Features of the state of lipid transport system with experimental hypoheparinemia // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2013. – Т. 8, № 3. – С. 44 – 49.

**Objective.** To investigate the changes of lipid and fat acid spectrum of blood at experimental hyperlipidemia at the conditions of hypoheparinemia. Results. It has been revealed that the injection of the blocker heparin resulted in a marked reduction in the activity of lipoprotein lipase within 21 days. The changes in lipid levels at this background had a more atherogenic character compared with a group of animals with only an atherogenic diet. Severe hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia at a sharp downfall in the content of antiatherogenic HDL against the background of significant increase in the NLC and reduction of PUFA, indicating that the formation of persistent dyslipidemia in these animals. It has been established that the important mechanisms of lipoproteins exchange and disorders of the lipid transport system is inhibition of the activity of lipoprotein lipase, which is caused by hypoheparinemia. This may lead to the development of atherosclerotic lesions in the vascular wall.

**Keywords:** lipid transport system, lipoprotein lipase, protamine sulfate, heparin, atherogenic diet.

**Введение.** Согласно современным представлениям, атеросклероз является

общим заболеванием человека из группы расстройств обмена веществ и включает

различные сочетания изменений интимы артерий, проявляющиеся в виде очагового отложения липидов, сложных соединений углеводов, элементов крови и циркулирующих в ней продуктов, образования соединительной ткани и отложения кальция [1, 12].

Известно, что в норме липидтранспортная система, посредством липопротеинов, обеспечивает доставку к клеткам холестерина и обратный его отток к печени, предупреждая избыточное внутриклеточное накопление с развитием цитотоксического эффекта. Поэтому уровень холестерина в крови отражает адекватность функционирования системы транспорта липопротеинов, но не является самостоятельным физиологическим или патогенетическим фактором [3, 11, 13].

При этом следует отметить, что метаболизм липопротеинов – сложный динамический процесс, включающий в себя не только разнообразное перемещение липидов и апопротеинов между отдельными классами липопротеинов, но и ряд реакций, катализируемых ферментами. Эти взаимодействия приводят к рецепторно-опосредованному поступлению холестерина в клетку или к его удалению из клетки. Другими словами, в организме существует липидтранспортная система, обеспечивающая обмен липидов на должном уровне от потребностей организма [4, 14].

Ключевым механизмом использования липопротеинов в тканях является расщепление их под действием липопротеинлипазы, которая, расщепляя основные энергетически значимые липиды на жирные кислоты и глицерин, позволяет усваивать их тканями. Липопротеинлипаза (ЛПЛ) локализована на эндотелии сосудов, к которому «прикрепляется» протеогликановыми цепями гепаринсульфата. Известно, что этот этап, как минимум, зависит от двух составляющих – от количества субстрата для фермента, количества липопротеинлипазы и ее активности, которая, в свою очередь, определяется рядом факторов, из которых на первом месте стоит гепарин, основной активатор

фермента [2, 6, 15].

**Цель исследования** – изучить характер изменений липидного и жирнокислотного спектра крови при экспериментальной гиперлипидемии в условиях гипогепаринемии.

**Материалы и методы исследования.** Экспериментальные исследования проведены в соответствии с положениями Конвенции по биоэтике Совета Европы (1997), Хельсинской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации (1996), Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 1986), общих этических принципов экспериментов на животных, принятые Первым национальным конгрессом Украины по биоэтике (2001).

Изучение состояния липидтранспортной системы проводили в двух сериях эксперимента на 57 белых беспородных половозрелых крысах-самцах, массой тела 200-250 г, в течение 21 дня. Гиперлипидемию в эксперименте воспроизводили по методу В.Е. Рыжкова и В. Г. Макарова атерогенной диетой, содержащей 30 % подсолнечного масла, 2,5 % холестерина и 0,12 % метилурацила [7]. Животных I группы (n=25) содержали на атерогенном рационе питания, из расчета 1 г жировой нагрузки на 100 г массы тела. Животным II группы (n=22) на фоне алиментарной атерогенной диеты внутримышечно ежедневно вводили протамин сульфат (Protamine sulphate) фирмы «ИНДАР» (Украина) в дозе 1 мг/100 г массы тела по 2 раза на день (по А. М. Ульянову, Ю. А. Тарасову) [9].

Контрольные животные (n=10) получали 0,9 % раствор хлорида натрия в объеме доз экспериментальных групп и находились на стандартном рационе виария, имея свободный доступ к пище и воде.

По истечении срока животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом. Проводили забор крови, которую стабилизировали цитратом натрия.

Активность липопротеинлипазы (ЛПЛ) плазмы крови определяли титрованием по методу T. Olivecrona в

модификации В. Н. Титова [8]. Показателем активности фермента является количество освобожденных жирных кислот из триглицеридов в течение 1 часа (ммоль/л/ч). Содержание гепарина определяли по реакции с толуидиновым синим по методу Piercea в модификации А. П. Чернышовой [10].

Содержание в плазме крови липопротеинов определяли на автоанализаторе «Dixion Torus» (Россия) с помощью ферментативных диагностических наборов фирмы «Cormay Diana» (Польша). Определение триглицеридов (ТГ) в сыворотке крови энзиматическим колориметрическим методом М. Флетчера [5]. Концентрацию общего холестерина (ОХС) определяли стандартным ферментативным методом. Уровень холестерина в липопротеинах высокой плотности (ХС ЛПВП) определяли в супернатанте после осаждения из плазмы липопротеинов низкой (ХС ЛПНП) и очень низкой плотности (ХС ЛПОНП) смесью фосфоровольфрамата натрия с 0,5 М хлоридом магния тем же методом, что и ОХС. Содержание ХС ЛПНП и ХС ЛПОНП вычисляли по формуле W.T. Friedwald et al. [5]. Для оценки степени риска атеросклероза рассчитывали коэффициент атерогенности (КА) по формуле А. Н. Климова [5].

Жирнокислотный состав крови оценивали по содержанию пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой, арахидоновой,  $\alpha$ -линоленовой, эйкозапентаеновой (ЭПК) и докозагексаеновой (ДГК) кислот (метод газовой хроматографии по методике F. Marangoni (2004) на хромато-масс-спектрометре Agilent MS D 1100 («Hewlett Packard», США) [7].

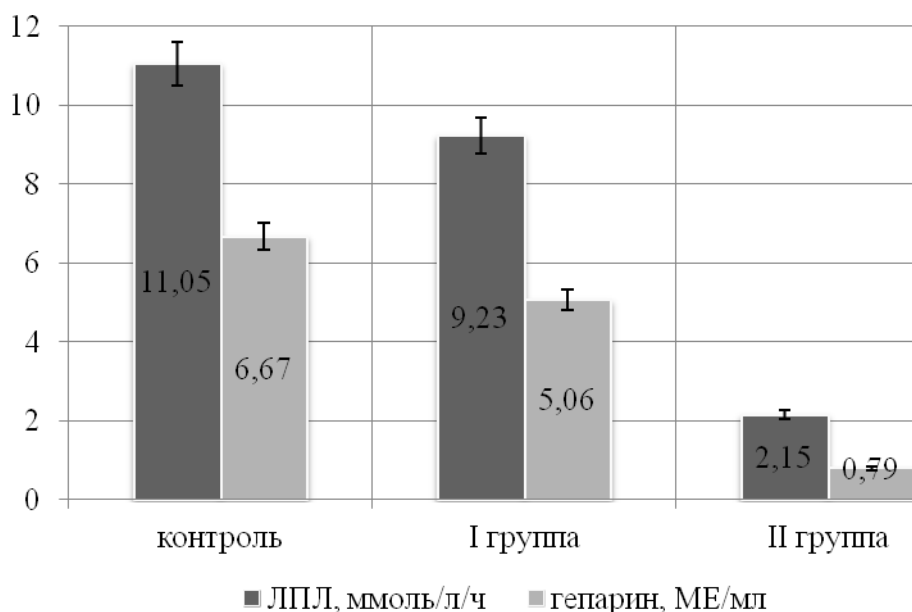
Статистический анализ цифровых результатов исследований проводили по общепринятым в экспериментальной медицине методам с использованием пакета программ «Microsoft Excel-2000». Результаты обрабатывали параметрическими

методами вариационной статистики, они представлены в виде средних арифметических значений и ошибки средних значений ( $M \pm m$ ). Достоверность различий между средними значениями в группах определяли по t-критерию Стьюдента, оценивая вероятность полученных результатов на уровне значимости не менее 95 % ( $p < 0,05$ ).

**Результаты исследования и их обсуждение.** В ходе исследований в экспериментальных группах нами были выявлены нарушения со стороны функциональной активности ЛПЛ, что было сопряжено, по нашим данным, с уровнем гепарина в крови у животных (рис.). Как видно, степень снижения активности ЛПЛ составила в I опытной группе 14,48 %, по сравнению с показателями контрольной группы, на фоне уменьшения содержания гепарина на 24,14 % в этой группе. При этом следует отметить, что при введении протамин сульфата животным активность ЛПЛ снижалась более, чем в 5 раз ( $p < 0,05$ ), относительно данных контрольной группы, а содержание гепарина в плазме крови носило следовые величины.

Такая динамика изменений концентрации гепарина влечет за собой нарушения функционирования ЛПЛ, что, на наш взгляд, может обуславливать развивающиеся нарушения со стороны липидтранспортной системы на фоне индуцированной гиперлипидемии в данной группе животных.

Изучение липидного спектра плазмы крови крыс, содержащихся на атерогенной диете, выявило изменения в липидном профиле крови (таблица 1). Так, у животных I группы отмечали увеличение уровня ОХС на 45,85 %, а ТГ – в 1,3 раза, по отношению к данным контрольной группы. Следует отметить, что при этом изменялся профиль содержания холестерина, а именно, достоверно увеличивалось количество ХС ЛПНП и ХС ЛПОНП (на 42,02 % и 32,75 %, соответственно).



**Рис.** Соотношение изменений динамики активности липопротеинлипазы и гепарина в исследуемых группах животных.

**Таблица 1.** Показатели липидного обмена у крыс опытных групп, (M±m)

Показатели, ммоль/л	Контроль (n=10)	I группа (n=25)	II группа (n=21)
ОХС	1,57±0,31	2,29±0,27	2,94±0,04*
ТГ	1,15±0,02	1,55±0,08	2,66±0,14*
ХС-ЛПВП	0,73±0,04	0,55±0,03*	0,36±0,03*
ХС-ЛПНП	0,69±0,03	0,98±0,11*	0,84±0,09*
ХС-ЛПОНП	0,58±0,02	0,77±0,12	1,14±0,13*
КА, ед.	1,15±0,14	3,16±0,07*	7,17±0,55*

**Примечание:** \* –  $p \leq 0,05$  – достоверность различий по сравнению с контрольной группой.

Во II группе животных характер изменений липидного состава плазмы крови носил более выраженный характер. Концентрация ТГ возрастала более, чем в 2 раза, по сравнению с интактными животными, наблюдалось и достоверное повышенное содержание ОХС. При этом распределение ХС по фракциям было следующим: уровень ХС ЛПНП увеличился на 21,73 %, в то время как титр ХС ЛПОНП возрастал на 96,55 %, по отношению к контрольной группе животных.

Содержание холестерина в атерогенной фракции ЛПВП у животных, содержащихся на атерогенной диете, достоверно уменьшалось на 25 %, по сравнению с интактными животными, в то время как на фоне введения протамина сульфата уровень ХС ЛПВП снижался более, чем в 2 раза.

КА полностью отражал атерогенные изменения липидного состава крови опытных животных. Так, в I группе его уровень увеличивался в 2,7 раза, по сравнению с контрольными величинами, а во II группе возрастал в 6,2 раза, по сравнению с показателем контроля, что свидетельствовало о более тяжелой степени нарушений.

Так как конечным результатом липолитической активности в организме является образование и накопление свободных жирных кислот, мы провели анализ состояния жирнокислотного спектра крови крыс при алиментарной гиперлипидемии и на фоне блокады гепарина. Результаты исследования показали, что уровень НЖК в опытных группах увеличивается (таблица 2). В основном, повышение титра НЖК происходит за счет

увеличения фракции пальмитиновой кислоты в обеих группах (на 24,88 % и в 2,3 раза, соответственно), по сравнению с контрольными данными, в отличие от изменений со стороны стеариновой кис-

лоты, где в I группе отмечали лишь тенденции к увеличению ее концентрации, а во II группе повышение уровня составило 51,71 %.

**Таблица 2.** Жирнокислотный состав крови у крыс с гиперлипидемией, (M±m)

Жирные кислоты, %	Контроль (n=10)	I группа (n=25)	II группа (n=21)
Пальмитиновая	15,11±1,16	18,87±1,12*	34,97±1,83*
Стеариновая	18,39±2,03	18,66±1,73	27,90±1,95*
Олеиновая	15,33±0,27	16,56±0,60*	9,54±0,60*
Арахидоновая	10,94±0,73	8,25±0,64*	6,47±0,41*
Линолевая	25,38±0,84	24,66±1,03	12,30±1,07*
А-линоленовая	9,35±0,44	8,99±0,37	7,01±0,29*
Эйкозопентаеновая	0,13±0,01	0,10±0,02	0,07±0,02*
Докозагексаеновая	5,46±0,26	3,91±0,14*	1,74±0,09*

**Примечание:** \* – p < 0,05 – достоверность различий с контрольной группой.

Противоположную динамику наблюдали со стороны МНЖК. Если для I группы был характерен рост уровня олеиновой кислоты, то во II группе происходило падение ее концентрации в 1,6 раза, относительно показателей интактной группы.

Со стороны ПНЖК отмечали тенденцию к уменьшению содержания, причем как  $\omega$ -6 кислот, так и группы  $\omega$ -3 кислот, при этом степень выраженности изменений была выше во II группе. Так, в группе  $\omega$ -6 ПНЖК происходило достоверное уменьшение со стороны арахидоновой кислоты на фоне на порядок ниже – линолевой кислоты (на 24,59 % и 2,84 %, соответственно), по отношению к титру в контрольной группе.

Уровень  $\omega$ -3 ПНЖК также снижался, однако степень уменьшения титра кислот, по отношению к контрольным данным, была неоднозначной среди кислот. Наибольшим изменениям подвергался уровень ДГК, который достоверно снижался на 28,39 %, в то время как уменьшение концентрации ЭПК и  $\alpha$ -линоленовой кислоты были недостоверны. Величина отношения кислот  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 в экспериментальной группе была выше и составила 2,53 усл. ед. против 2,43 усл. ед.

Поскольку ПНЖК участвуют в синтезе биологически активных молекул регуляторного действия, можно полагать, что у крыс опытных группы нарушаются

процессы гуморальной регуляции, что может обуславливать развитие наблюдаемых морфологических изменений в сосудах.

**Выводы.** Таким образом, можно констатировать, что при введении блокатора гепарина у животных отмечалось выраженное снижение активности ЛПЛ, а уровень изменений липидного спектра на этом фоне носил более атерогенный характер, по сравнению с группой, находящейся только на атерогенной диете. При этом наблюдались гиперхолестеринемия и гипертриглицеридемия с увеличением ХС ЛПНП и ХС ЛПОНП при резком падении содержания антиатерогенных ХС ЛПВП. Достоверно увеличивалась концентрация НЖК, при этом количество олеиновой и линолевой кислот, являющихся предшественниками  $\omega$ -3 и  $\omega$ -6 ПНЖК, было значительно сниженным, что свидетельствует о выраженном дефиците ПНЖК. Данная динамика изменений соотношения фракций ХС и рост содержания ТГ свидетельствует о формировании стойкой дислипидемии у данных животных.

Таким образом, установлено, что одним из важных механизмов обмена липопротеидов и нарушений липидтранспортной системы является угнетение активности липопротеинлипазы, обусловленной гипогепаринемией.

Вышеизложенное позволяет полагать, что нарушения липидтранспортной системы, вследствие снижения активно-

сти липопротеинлипазы, могут обуславливать развитие атеросклеротических изменений в сосудистой стенке.

## ЛІТЕРАТУРА:

1. **Калинкин М.Н.** Атеросклероз: патофизиология, лечение, первичная профилактика / **М.Н. Калинкин, В.С. Волков, В. В. Заварин.** – Тверь: РИЦ ТГМА, 2009. – 215 с.
2. **Ким Л. Б.** Роль гепарина в регуляции трансапиллярного обмена и перекисного окисления липидов у больных ишемической болезнью сердца / **Л. Б. Ким, В. Ю. Куликов, В. Н. Мельников** // Бюллетень СО РАМН. – 2010. – № 1. – С. 72-77.
3. **Коваленко В. Н.** Холестерин и атеросклероз: традиционные взгляды и современные представления / **В. Н. Коваленко, Т. В. Талаева, В.В. Братусь** // Український кардіологічний журнал. – 2010. – № 3. – С. 3-12.
4. **Максименко А. В.** Функции и состояние эндотелиального гликокаликса в норме и патологии / **А. В. Максименко, А.Д. Турашев** // Атеросклероз и дислипидемии. – 2011. – № 2. – С. 4-17.
5. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / Под ред. **М. И. Прохоровой.** – Л.: Изд. Ленинградского ун-та, 1982. – 272 с.
6. Роль активности липопротеидлипазы, гиперинсулинемии и уровня неэстерифицированных жирных кислот в развитии дислипидемий / **Н. С. Зайцева, Т.В. Виноградова, И.А. Олейник [и др.]** // Медицинский академический журнал – 2005. – Т. 5, № 4. – С. 43-49.
7. **Рыжов В. Е.** Методические указания по изучению гиполлипидемического и антиатеросклеротического действия фармакологических веществ / **В. Е. Рыжов, В. Г. Макаров** // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению фармакологических веществ: под ред. **Р. У. Хабриева.** – М.: Медицина, 2005. – С. 455-456.
8. **Титов В.Н.** Атеросклероз как патология полиеновых жирных кислот. Биологические основы теории атеросклероза / **В.Н. Титов.** – Москва, 2002. – 495 с.
9. **Ульянов А. М.** Инсулярная система животных при хроническом дефиците гепарина / **А. М. Ульянов, Ю. А. Тарасов** // Вопросы медицинской химии. – 2000. – Т. 46, № 2. – С. 149-154.
10. **Чернышова А.П.** Основные ферментативные процессы в патологии и клинике ревматизма / **А.П. Чернышова** // Труды НГМИ. – Новосибирск, 1960. – С. 430-437.
11. Changes of blood biochemistry in the rabbit animal model in atherosclerosis research; a time or stress-effect / **I. A. Dontas, K. A. Marinou, D. Piopoulos [et al.]** // Lipids Health Dis. – 2011. – Vol. 10. – P. 139-144.
12. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis / **A. V. Khera, M. Cuchel, M. de la Llera-Moya [et al.]** // N. Engl. J. Med. – 2011. – Vol. 364, N 2. – P. 127-135.
13. HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis / **A. R. Tall, L. Yvan-Charvet, N. Terasaka [et al.]** // Cell Metab. – 2008. – Vol. 7, N 5. – P. 365-375.
14. **Tsutsumi K.** Lipoprotein Lipase and Atherosclerosis / **K. Tsutsumi** // Current Vascular Pharmacology. – 2003. – № 1. – P. 11-17.
15. **Yasuda T.** Update on the role of endothelial lipase in high-density lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport, and atherosclerosis / **T. Yasuda, T. Ishida, D. J. Rader** // Circ. J. – 2010. – Vol. 74. – P. 2263–2270.

УДК 591.147.1+591.471.36]:613.29

© Лузин В.И., Савенко Л.Д., Чурилин О.О., 2013.

## ОРГАНОМЕТРИЯ МОЗЖЕЧКА БЕЛЫХ КРЫС ПОСЛЕ ИНТОКСИКАЦИИ ПИЩЕВЫМ КОНСЕРВАНТОМ БЕНЗОАТОМ НАТРИЯ

Лузин В.И., Савенко Л.Д., Чурилин О.О.

ДЗ «Луганський державний медичний університет».

Лузін В.І., Савенко Л.Д., Чурилін О.О. Органометрія мозочка білих щурів після інтоксикації харчовим консервантом бензоатом натрію // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2013. – Т. 8, № 3. – С. 49 – 53.

Метою даної роботи було дослідження змін органометричних показників мозочка білих щурів після