

УДК 577.125:616.153.915/.922/.96:616.441-008.63:57.084

ПОКАЗАТЕЛИ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА И БЕЛКОВЫЙ СОСТАВ ЛИПОПРОТЕИНОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ГИПОТИРЕОИДНЫХ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ

¹Поляков Л.М., ²Лушникова Е.Л., ²Непомнящих Л.М., ¹Русских Г.С., ¹Биушкина Н.Г., ²Клиникова М.Г., ²Мжельская М.М., ²Непомнящих Р.Д., ²Пичигин В.И., ²Южик Е.И.

¹ФГБУ НИИ биохимии Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Новосибирск;

²ФГБУ НИИ региональной патологии и патоморфологии Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Новосибирск, e-mail: pathol@inbox.ru

Изучены показатели липидного обмена у гипотиреоидных и эутиреоидных крыс на модели экспериментальной гиперхолестеринемии. Для подавления функции щитовидной железы на фоне холестериновой диеты животные получали антитиреоидный препарат мерказолил. Показано, что холестериновая диета у гипотиреоидных животных (снижение концентрации тироксина в 2 раза) приводила к развитию выраженной гиперхолестеринемии за счет увеличения холестерина в составе липопротеинов высокой (33%) и особенно в составе фракции липопротеинов низкой и очень низкой плотности (55%). При этом концентрация в плазме крови аполипопротеина А-I увеличилась на 22%, а аполипопротеина В – на 71%. По данным электрофореза в линейном градиенте ПААГ у животных с гипотиреозом значительно изменился белковый состав фракции липопротеинов низкой и очень низкой плотности. Денситометрический анализ геля выявил увеличение в них содержания аполипопротеинов В-100, В-48, Е и С в 2,5–4,0 раза. Данная экспериментальная модель может быть использована для изучения молекулярно-клеточных механизмов атеросклеротических повреждений сердца и сосудов.

Ключевые слова: гипотиреоз, гиперхолестеринемия, липидный обмен, липопротеины плазмы крови, аполипопротеины

LIPID METABOLISM AND PROTEIN COMPOSITION OF LIPOPROTEINS IN BLOOD PLASMA IN HYPOTHYROID RATS AT EXPERIMENTAL HYPERCHOLESTEROLEMIA

¹Polyakov L.M., ²Lushnikova E.L., ²Nepomnyaschikh L.M., ¹Russkikh G.S., ¹Biushkina N.G., ²Klinnikova M.G., ²Mzhelskaya M.M., ²Nepomnyaschikh R.D., ²Pichigin V.I., ²Yuzhik E.I.

¹Research Institute of Biochemistry SB RAMS, Novosibirsk;

²Research Institute of Regional Pathology and Pathology, SB RAMS, Novosibirsk, e-mail: pathol@inbox.ru

We studied the parameters of lipid metabolism in hypothyroid and euthyroid rats in experimental hypercholesterolemia. To suppress thyroid function in the background cholesterol diet animals received antithyroid drug mercazolil. It is shown that cholesterol diet for hypothyroid animals (reducing the concentration of thyroxine in 2 times) led to development of severe hypercholesterolemia due to increase in cholesterol in the lipoprotein high (33%) and especially in the composition of the fractions of lipoproteins of low and very low density (55%). The concentration in plasma apolipoprotein A-I increased by 22%, and apolipoprotein B by 71%. According to electrophoresis in a linear gradient PAAG in animals with hypothyroidism had significantly changed protein composition fractions of lipoproteins of low and very low density. Densitometric analysis of the gel showed an increase in their content of apolipoprotein B-100, B-48, E and C 2.5–4.0 times. This experimental model can be used to study the molecular and cellular mechanisms of atherosclerotic lesions of the heart and blood vessels.

Keywords: hypothyroidism, hypothyroidism, lipid metabolism, lipoproteins, apo-lipoprotein

В настоящее время используются различные модели атеросклеротического поражения стенки сосудов. Они могут быть вызваны самыми различными факторами: механическими, химическими, иммунологическими, а также диетой [7]. Модели на животных позволяют изучать не только стадии развития атеросклеротического процесса, начиная от самой ранней, но и возможности управления этим процессом. Наиболее популярной является модель экспериментальной гиперхолестеринемии, вызванной путем

скармливания животным диеты с избыточным количеством холестерина и насыщенных жирных кислот [2, 3, 8].

У грызунов (мышей и крыс), в отличие от человека, в плазме крови отсутствует белок, переносящий эфиры холестерина с липопротеинов высокой плотности на липопротеины низкой и очень низкой плотности (cholesteryl ester transfer protein, CETP), и это является одной из главных причин их резистентности к развитию атеросклеротического процесса [15]. Отсутствие белка –

передатчика эфиров холестерина не является единственным отличием метаболизма липопротеинов у грызунов по сравнению с человеком, грызуны имеют и другие особенности метаболизма липопротеинов: высокий уровень циркулирующих липаз [5] и специфического белка – переносчика фосфолипидов (specific phospholipid transfer protein, PLTP) [10], что и объясняет их устойчивость к атеросклерозу. Однако у гипотиреоидных мышей и крыс эта устойчивость резко снижается, что позволяет получать информацию о факторах, способствующих развитию атеросклеротического процесса, а также о возможности разработки новых диагностических и терапевтических стратегий.

Цель исследования – изучение показателей липидного обмена и спектральных характеристик белкового состава липопротеинов плазмы крови у гипотиреоидных и эутиреоидных крыс на модели экспериментальной гиперхолестеринемии.

Материал и методы исследования

Эксперимент продолжительностью 68 сут выполнен на 18 крысах-самцах Вистар массой 390–560 г. Животных содержали в индивидуальных клетках, они имели свободный доступ к воде. Крысы I группы получали атерогенную диету (модель алиментарной гиперхолестеринемии): холестерин (Panreac Química SA, Испания) в дозе 25 мг/100 г массы тела, добавленный в стандартный лабораторный рацион. Крысы II группы получали ту же атерогенную диету и анти-тиреоидный препарат мерказолил («Акрихин», Россия) в дозе 1 мг/100 г массы тела, добавленные в стандартный лабораторный корм. Кормление животных происходило по схеме: один день – атерогенная диета (группа I) или атерогенная диета с добавлением мерказолила (группа II); второй день – голодание; вода *ad libitum* каждый день. Контрольную группу составили крысы, содержащиеся в стандартных условиях вивария и получавшие стандартный рацион каждый день. В каждой группе было по 6 крыс, все животные дожили до конца эксперимента. В отношении экспериментальных животных были соблюдены все правила и рекомендации Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных работах.

Показатели липидного обмена в плазме крови: общий холестерин (ОХС), холестерин липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП), холестерин фракции липопротеинов низкой и очень низкой плотности (ХС-ЛПНП + ХС-ЛПОНП), триглицериды (ТГ) определяли энзиматическим методом с использованием наборов «Bioson» (Германия) на биохимическом анализаторе «Labsystem» (Финляндия). Оценку тиреоидного статуса – концентрацию тироксина (T_4) и трийодтиронина (T_3), проводили иммунохемилюминесцентным методом с использованием наборов фирмы «Immunotech» (Чехия) на люминометре LM-01A (Bekman Coulter Company). Твердофазный иммуноферментный анализ (тИФА) аполипопротеинов А-I и В (апоА-I и апоВ) выполняли непрямой методом, описанным нами ранее [4]. Индекс атерогенности

рассчитывали как отношение (ОХС – ХС-ЛПВП)/ХС-ЛПВП, индекс Авогаро – как отношение концентрации апоА-I к концентрации апоВ (апоА-I/апоВ) [6].

Липопротеины выделяли из плазмы крови методом изоплотного ультрацентрифугирования в растворах KBr в присутствии 3 мМ ЭДТА- Na_2 на центрифуге «Optima L-90K» («Beckman Coulter») с использованием углового ротора 70.1 Ti при 105000 г в течение 24 ч [11]. Получали две основные фракции липопротеинов: ЛПОНП + ЛПНП ($0,94 < d < 1,063$ г/мл) и ЛПВП ($1,063 < d < 1,21$ г/мл). Электрофоретический анализ состава белкового компонента суммарной фракции ЛПНП и ЛПОНП проводили после делипидирования липопротеинов в полиакриламидном геле (ПААГ) в линейном градиенте (4–20%) с D_2 -Na [12]. Белковые полосы визуализировали 0,1% Кумасси G-250 в смеси метанола и 10% уксусной кислоты (1:1). В качестве маркеров использовали наборы низкомолекулярных белков-стандартов: альбумин, 67 кДа; овалбумин, 43 кДа; карбоангидраза, 30 кДа; лизоцим, 14,4 кДа («Pharmacia», Швеция). Денситометрический анализ электрофореграммы проводили с помощью компьютерной программы TotalLab (BioSistemica, New Horizons in gel imaging and analysis).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программы Statistica 6; для оценки значимости различий при нормальном распределении использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Холестериновая диета у крыс не влияла на тиреоидный статус, содержание тироксина и трийодтиронина практически не изменялось (таблица). Включение в рацион анти-тиреоидного препарата мерказолила не оказывало заметного влияния на содержание T_3 в плазме крови у крыс II группы по сравнению с контрольной группой и группой I, однако содержание T_4 под действием мерказолила снизилось почти в 2 раза, что свидетельствует об адекватности модели гипотиреоидного состояния.

К окончанию эксперимента в группе животных, получавших только экзогенный холестерин, наблюдался дефицит массы тела по сравнению с контролем (394 ± 13 против 539 ± 19 г, $p < 0,05$), т.е. произошло снижение на 27%. В группе животных с гипотиреозом разница массы тела по сравнению с контролем была не так значительна (456 ± 8 , $p < 0,05$), однако и она была на 16% ниже контроля. Снижение массы тела животных, находящихся на холестеринной диете, может быть связано с заметным уменьшением количества потребляемой пищи в этих группах.

Атерогенная диета на протяжении всего срока эксперимента практически не оказывала влияния на показатели липидного обмена у животных с нормальной функцией щитовидной железы. В этой группе содержание в плазме крови ОХ, ХС

в составе ЛПВП, ХС суммарной фракции ЛПНП + ЛПОНП, а также содержание ТГ имело лишь тенденцию к повышению по сравнению с контролем.

Показатели липидного обмена и тиреоидный статус плазмы крови крыс при экспериментальной гиперхолестеринемии (M ± m)

Биохимические маркеры	Экспериментальные группы		
	контроль	группа I	группа II
Общий холестерин, ммоль/л	2,42 ± 0,15	2,64 ± 0,09	3,35 ± 0,19*
Холестерин ЛПВП, ммоль/л	1,28 ± 0,09	1,40 ± 0,07	1,69 ± 0,10*
Холестерин ЛПНП, ммоль/л	1,13 ± 0,06	1,24 ± 0,04	1,76 ± 0,10***#
Индекс атерогенности	0,89 ± 0,02	0,90 ± 0,05	0,98 ± 0,03**#
Аполипопротеины А-I, мг %	107 ± 6,3	112 ± 5,6	131 ± 4,8**#
Аполипопротеины В, мг %	91 ± 5,2	106 ± 6,7	156 ± 7,4***#
Индекс Авогаро	1,17 ± 0,06	1,06 ± 0,07	0,84 ± 0,05**#
Триглицериды, ммоль/л	1,16 ± 0,09	1,34 ± 0,10	0,99 ± 0,07##
Трийодтиронин (Т ₃), нмоль/л	1,98 ± 0,057	1,96 ± 0,082	2,29 ± 0,079
Тироксин (Т ₄), нмоль/л	58,95 ± 4,73	64,52 ± 6,43	34,03 ± 2,40***#

Примечания: * – p < 0,05, ** – p < 0,01, *** – p < 0,001 при сравнении с контролем; # – p < 0,05, ## – p < 0,01 при сравнении с группой I.

Известно, что гипотиреоз часто сопровождается повышенной концентрацией холестерина в плазме крови. Гиперхолестеринемия, связанная с гипотиреозом, у человека и животных в значительной степени, как правило, происходит за счет увеличения содержания ХС в составе ЛПНП и ЛПОНП, хотя имеются отдельные сообщения и об увеличении концентрации ЛПВП [13]. В нашем эксперименте гипотиреозидное состояние, вызванное включением в атерогенный рацион мерказолила, также сопровождалось значительными изменениями липидного состава плазмы крови (см. таблицу). Увеличение содержания ОХС составило 38%, ХС-ЛПВП – 33%, а ХС во фракции ЛПНП и ЛПОНП – 55%. За счет выраженной гиперхолестеринемии резко повысился и индекс атерогенности по сравнению как с контрольной, так и с эутиреоидной группой животных (p < 0,05).

Соответствующие параллельные изменения обнаружены в содержании апоА-I – основного структурообразующего белкового компонента ЛПВП, а также апоВ – главного белка в составе ЛПНП и ЛПОНП плазмы крови. Так, по данным тИФА (твердофазного иммуноферментного анализа), содержание апоА-I в плазме крови повысилось на 22%, а содержание апоВ – на 71%. Достоверно по отношению к обеим группам изменилась и величина такого информативного показателя обмена липопротеинов в организме, как индекс Авогаро.

Значительно более детальное представление об изменении структуры фракции ЛПНП и ЛПОНП плазмы крови при

гиперхолестеринемии дал электрофоретический анализ полного состава белковых компонентов. По данным электрофореза, в линейном градиенте ПААГ (4–20%) холестериновая диета практически не влияла на содержание фракционного состава апоВ в суммарной фракции ЛПНП и ЛПОНП, выделенной с помощью препаративного ультрацентрифугирования. Обращает на себя внимание резкое повышение содержания апоВ (как В-100, так и В-48) в группе животных с гипотиреозом. Однако наиболее выраженное увеличение в составе ЛПНП и ЛПОНП обнаружено для апоЕ. По данным денситометрического анализа, увеличение составляло 3,5–4 раза по сравнению с контролем. Интерес вызывает и повышение в составе суммарной фракции апоС, а также апоА-IV, который в группе эутиреоидного контроля присутствовал лишь в следовых количествах.

Таким образом, по результатам иммуноферментного анализа и электрофореза в ПААГ, полученным в настоящей работе, гиперхолестеринемия у гипотиреозидных крыс приводила к повышению содержания апоВ (В-100 и В-48), апоЕ и апоС в составе фракции ЛПНП и ЛПОНП, что может быть обусловлено повышением синтеза этих белков в печени. Другой механизм такой гиперхолестеринемии, по-видимому, обусловлен снижением скорости элиминации ЛПНП и ЛПОНП и, прежде всего, за счет снижения активности и количества В/Е-рецепторов в печени. Подтверждением этому являются исследования, выполненные на крысиных гепатоцитах, которые свиде-

тельствуют об увеличении рецептор-опосредованного эндоцитоза ЛПНП и ЛПОНП под влиянием тиреоидных гормонов [14]. Точный механизм, посредством которого гормоны щитовидной железы влияют на экспрессию печеночных В/Е-рецепторов, неизвестен, однако на сегодняшний день существуют прямые доказательства их участия в активации ядерных тиреоидных рецепторов класса $\beta 1$ (TR $\beta 1$) [9], повышении селективного поглощения ЛПНП и ЛПОНП в печени и поддержания уровня холестерина в плазме крови [13].

Ранее было показано, что повышенный уровень холестерина в крови в сочетании с подавлением функции щитовидной железы обусловил значительные повреждения мышечных клеток сердца, эндотелиоцитов и гладкомышечных клеток интрамуральных сосудов, эритроцитов животных I и II групп в отсутствие формирования атеросклеротических бляшек и без развития ишемии миокарда [1, 3]. Совокупность данных о структурных преобразованиях миокарда и изменениях липидного метаболизма у крыс при диетарной гиперхолестеринемии на фоне гипотиреоидного статуса свидетельствует об адекватности применения данной экспериментальной модели для изучения молекулярно-клеточных механизмов атеросклеротических повреждений сердца и сосудов.

Список литературы

1. Клиникова М.Г., Пичигин В.И., Южик Е.И., Непомнящих Р.Д., Лущникова Е.Л. Роль дислипидемий в модификациях энергетических и пластических процессов в кардиомиоцитах // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – № 4 (3). – С. 634–640.
2. Клиникова М.Г., Южик Е.И., Пичигин В.И., Лущникова Е.Л. Ремоделирование миокарда крыс при хронической дислипидемии и введении верапамила // *Бюл. экспер. биол.* – 2014. – Т. 158, № 7. – С. 108–115.
3. Непомнящих Л.М., Лущникова Е.Л., Поляков Л.М., Молодых О.П., Клиникова М.Г., Русских Г.С., Потеряева О.Н., Непомнящих Р.Д., Пичигин В.И. Структурные реакции миокарда и липидный спектр сыворотки крови при моделировании гиперхолестеринемии и гипотиреоза // *Бюл. экспер. биол.* – 2013. – Т. 155, № 5. – С. 647–652.
4. Поляков Л.М., Потеряева О.Н., Панин Л.Е. Определение апопротеина А-1 методом иммуноферментного анализа // *Вопр. мед. химии*. – 1991. – Т. 37, № 1. – С. 89–92.
5. Applebaum-Bowden D., Kobayashi J., Kashyap V.S. et al. Hepatic lipase gene therapy in hepatic lipase-deficient mice. Adenovirus-mediated replacement of a lipolytic enzyme to the vascular endothelium // *J. Clin. Invest.* – 1996. – Vol. 97, № 3. – P. 799–805.
6. Avogaro P., Bon G.B., Gazzolato G., Quinci G.B. Are apolipoproteins better discriminators than lipids for atherosclerosis? // *Lancet*. – 1979. – Vol. 313, № 8122. – P. 901–903.
7. Drew A.F. Animal models of diet-induced atherosclerosis // *Methods Mol. Med.* – 2001. – Vol. 52. – P. 1–6.
8. Getz G.S., Reardon C.A. Diet and murine atherosclerosis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – Vol. 26, № 2. – P. 242–249.
9. Gullberg H., Rudling M., Forrest D., Angelin B., Vennström B. Thyroid hormone receptor beta-deficient mice show complete loss of the normal cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A) response to thyroid hormone but display enhanced resistance to dietary cholesterol // *Mol. Endocrinol.* – 2000. – Vol. 14, № 11. – P. 1739–1749.

10. Guyard-Dangremont V., Desrumaux C., Gambert P., Lallemand C., Lagrost L. Phospholipid and cholesteryl ester transfer activities in plasma from 14 vertebrate species. Relation to atherogenesis susceptibility // *Comp. Biochem. Physiol. Part B*. – 1998. – Vol. 120, № 3. – P. 517–525.
11. Hatch F.T. Practical method for plasma lipoprotein analysis // *Adv. Lipid. Res.* – 1968. – Vol. 6. – P. 1–68.
12. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680–685.
13. Pedrelli M., Pramfalk C., Parini P. Thyroid hormones and thyroid hormone receptors: Effects of thyromimetics on reverse cholesterol transport // *World. J. Gastroenterol.* – 2010. – Vol. 16, № 47. – P. 5958–5964.
14. Salter A.M., Hayashi R., al-Seeni M., Brown N.F., Bruce J., Sorensen O., Atkinson E.A., Middleton B., Bleackley R.C., Brindley D.N. Effects of hypothyroidism and high-fat feeding on mRNA concentrations for the low-density-lipoprotein receptor and on acyl-CoA:cholesterol acyltransferase activities in rat liver // *Biochem. J.* – 1991. – Vol. 276, Pt 3. – P. 825–832.
15. Tanigawa H., Billheimer J.T., Tohyama J., Zhang Y., Rothblat G., Rader D.J. Expression of cholesteryl ester transfer protein in mice promotes macrophage reverse cholesterol transport // *Circulation*. – 2007. – Vol. 116, № 11. – P. 1267–1273.

References

1. Klinnikova M.G., Pichigin V.I., Yuzhik E.I., Nepomnyashchikh R.D., Lushnikova E.L. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2014. no 4 (4). pp. 634–640.
2. Klinnikova M.G., Yuzhik E.I., Pichigin V.I., Lushnikova E.L. *Bulleten eksperimental'noi biologii i meditsiny*. 2014. no 7. pp. 108–115.
3. Nepomnyashchikh L.M., Lushnikova E.L., Polyakov L.M., Molodykh O.P., Klinnikova M.G., Russkikh G.S., Poteryaeva O.N., Nepomnyashchikh R.D., Pichigin V.I. *Bulleten eksperimental'noi biologii i meditsiny*. 2013. no 5. pp. 647–652.
4. Polyakov L.M., Poteryaeva O.N., Panin L.E. *Voprosy meditsinskoy khimii*. 1991. no 1. pp. 89–92.
5. Applebaum-Bowden D., Kobayashi J., Kashyap V.S. et al. *J. Clin. Invest.* 1996. Vol. 97. no 3. pp. 799–805.
6. Avogaro P., Bon G.B., Gazzolato G., Quinci G.B. *Lancet*. 1979. Vol. 313. no 8122. pp. 901–903.
7. Drew A.F. *Methods Mol. Med.* 2001. Vol. 52. pp. 1–6.
8. Getz G.S., Reardon C.A. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006. Vol. 26. no 2. pp. 242–249.
9. Gullberg H., Rudling M., Forrest D., Angelin B., Vennström B. *Mol. Endocrinol.* 2000. Vol. 14. no 11. pp. 1739–1749.
10. Guyard-Dangremont V., Desrumaux C., Gambert P., Lallemand C., Lagrost L. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*. 1998. Vol. 120. no 3. pp. 517–525.
11. Hatch F.T. *Adv. Lipid. Res.* 1968. Vol. 6. pp. 1–68.
12. Laemmli U.K. *Nature*. 1970. Vol. 227. no 5259. pp. 680–685.
13. Pedrelli M., Pramfalk C., Parini P. *World. J. Gastroenterol.* 2010. Vol. 16. no 47. pp. 5958–5964.
14. Salter A.M., Hayashi R., al-Seeni M., Brown N.F., Bruce J., Sorensen O., Atkinson E.A., Middleton B., Bleackley R.C., Brindley D.N. *Biochem. J.* 1991. Vol. 276. Pt 3. pp. 825–832.
15. Tanigawa H., Billheimer J.T., Tohyama J., Zhang Y., Rothblat G., Rader D.J. *Circulation*. 2007. Vol. 116. no 11. pp. 1267–1273.

Рецензенты:

Горчаков В.Н., д.м.н., профессор, зав. лабораторией функциональной морфологии лимфатической системы, ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии» Сибирского отделения РАМН, г. Новосибирск;

Сидорова Л.Д., д.м.н., профессор кафедры внутренних болезней Новосибирского государственного медицинского университета МЗ РФ, г. Новосибирск.

Работа поступила в редакцию 10.09.2014.