

УДК 616.36-003.93-099:577.161.2.011

БИОХИМИЯ

## ХАРАКТЕРИСТИКА ЛЕЦИТИН-ХОЛЕСТЕРОЛ—АЦИЛТРАНСФЕРАЗНОЙ РЕАКЦИИ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ

*А. А. Чиркин, Н. Ю. Коневалова, Л. Г. Гидранович*

После частичной гепатэктомии у крыс снижается скорость образования эфиров холестерина в сыворотке крови в периоды быстрого восстановления массы печени. Этот эффект связан с изменениями количества и состава липопротеинов высокой плотности, а также кинетических характеристик лецитин-холестерол-ацилтрансферазы (ЛХАТ). В разные сроки регенерации печени этот фермент выделен из сыворотки крови и очищен в 28 500 раз. Сделано заключение о наличии обратной зависимости между выраженностью регенерационных процессов в печени и активностью ЛХАТ при высоких концентрациях неэтерифицированного холестерина в субстрате. Даны рекомендации для определения активности ЛХАТ при оценке выраженности восстановительных процессов в печени.

The rate of cholesterol ether formation in blood serum during the periods of rapid recovery of liver mass decreases after partial hepatectomy in rats. This effect is connected with the changes in quantity and composition of lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) as well the kinetic characteristics of lipoprotein of high density. This ferment was isolated from blood serum and purified in 28 500 times at different periods of liver regeneration. A conclusion concerning the presence of reverse dependence between the pronounced regeneration processes in liver and LCAT activity at high level of nonetherificated cholesterol in substrate has been drawn. Some recommendations for LCAT activity reducing processes in liver are given.

Лецитин-холестерол — ацилтрансфераза (ЛХАТ, КФ 2.3.1.43) секретируется гепатоцитами в кровь, где катализирует образование эфиров холестерина [8, 11]. Согласно кинетическим исследованиям [3, 5], в сыворотке крови фермент присутствует в виде нескольких молекулярных форм. После повреждения гепатоцитов в сыворотке крови снижается интенсивность процесса этерификации холестерина за счет резкого уменьшения пула субстратных липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) и активности ЛХАТ. Это приводит к относительному увеличению содержания неэтерифицированного холестерина, который может служить сигналом для запуска процесса деления гепатоцитов [4, 7].

Мы изучали систему этерификации холестерина в кровеносном русле на разных этапах регенерационной гипертрофии печени.

Объектом исследования служила сыворотка крови беспородных белых крыс-самцов средней массой 170 г. Из сыворотки крови выделяли ЛПВП и определяли в них содержание общего холестерина, эфиров холестерина и фосфолипидов по методам, описанным ранее [3]. Этерифицирующую холестерин активность сыворотки (ЭХАС) изучали радионизотопным методом [14]. Активность ЛХАТ определяли с помощью искусственного субстрата протеолипосом [1, 6]. Протеолипосомы готовили техникой холатного диализа. Они содержали лецитин и холестерин в молярном отношении 20:1 и суммарный препарат апопротеинов ЛПВП в количестве 0,29 мг на 1 мл протеолипосом [2]. Зависимость скорости ЛХАТ-реакции от концентрации субстрата оценивали в диапазоне концентраций неэтерифицированного холестерина протеолипосом. Определение проводили с помощью энзиматического метода, используя наборы фирмы «Boehringer Mannheim GmbH» (ФРГ), содержащие от 2,5 до 49,7 нмоль субстрата на пробу (125—2485 мкмоль/л).

Удаление 70 % массы печени производили по классическому методу Хиггинса и Андерсена. Животных декапитировали на 1, 2, 4, 6, 10 и 30-е сутки регенерационного процесса. Оценивали митотическую активность гепатоцитов, относительную массу органа и морфологическую картину ткани.

Для выделения и очистки ЛХАТ использовали плазму крови, полученную от интактных животных, а также от крыс на 2-е, 4-е и 10-е сутки регенерационного процесса. В каждой группе объединяли плазму от 80—100 животных. Выделение и очистку фермента производили по методу, предложенному для получения фермента из плазмы крови человека [10]. Метод был модифицирован только на последнем этапе, на котором колоночную хроматографию на гидроксипатите мы заменили хроматографией в объеме. Ферментный препарат, гомогенный при диск-электрофорезе, удалось очистить в 28 500 раз.

После удаления 70 % ткани печени восстановление массы органа происходило в два этапа: 1—4-е сутки за счет митотического деления гепатоцитов, 6—15-е сутки — преимущественно путем деления двудерных клеток и гипертрофии гепатоцитов [3]. Быстрый прирост массы печени — примерно на 2 г в пересчете на 100 г массы тела (табл. 1) — должен сопровождаться ощутимыми сдвигами содержания холестерина в сыворотке крови, поскольку 82 % холестерина у крыс образуется в печени и этот орган является основным местом выведения холестерина из кровотока [13].

Ранее было показано [3, 7], что оба этапа интенсивного восстановления печени сопряжены с уменьшением содержания холестерина в сыворотке крови. Этапам гипохолестеринемии соответствовали более низкие, чем в контроле, фракционная и молярная скорости этерификации холестерина в сыворотке крови (см. табл. 1). Уменьшение величин ЭХАС может быть обусловлено количеством и физико-химическими свойствами субстратных ЛПВП, а также свойствами ЛХАТ. Количество ЛПВП, о котором судили по содержанию общего холестерина, резко снижалось через 24 ч после частичной гепатэктомии и затем постепенно увеличивалось. Химический состав ЛПВП был изменен: спустя 24 ч этот класс липопротеинов обогащался эфирами холестерина и фосфолипидами, в интервале 4—10-е сутки доля эфиров холестерина в составе ЛПВП снижалась и незначительно преобладали фосфолипиды. Эти данные не позволили однозначно

Таблица 1. Состав ЛПВП и этерифицирующая холестерин активность сыворотки крови при регенерации печени у крыс

Вариант	Показатели регенерирующей печени		Состав ЛПВП				Отношение фосфолипиды/общий холестерин	ЭХАС	
	масса, г на 100 г массы тела	количество митозов, %/00	общий холестерин, мкмоль $\times$ л $^{-1}$	эфирин холестерина		фосфолипиды, мкмоль $\times$ л $^{-1}$		%	мкмоль $\cdot$ л $^{-1}$ $\times$ ч $^{-1}$
				мкмоль $\cdot$ л $^{-1}$	%				
До опыта	3,57 $\pm$ 0,11	0,30 $\pm$ 0,06	409 $\pm$ 22	206 $\pm$ 16	50,4	478 $\pm$ 16	1,17	7,50 $\pm$ 0,44	51,7 $\pm$ 5,15
Регенерация печени									
1-е сутки	1,70 $\pm$ 0,11*	5,60 $\pm$ 1,65*	40 $\pm$ 13*	33 $\pm$ 5*	82,5	227 $\pm$ 32*	5,67	2,96 $\pm$ 0,49*	21,8 $\pm$ 4,41*
2-е »	2,45 $\pm$ 0,06*	9,40 $\pm$ 1,65*	167 $\pm$ 15*	92 $\pm$ 12*	55,1	259 $\pm$ 24*	1,55	6,27 $\pm$ 1,19	35,5 $\pm$ 3,44*
4-е »	3,18 $\pm$ 0,07*	—	277 $\pm$ 46*	106 $\pm$ 16*	38,3	486 $\pm$ 32	1,75	7,48 $\pm$ 0,50	47,5 $\pm$ 6,01
6-е »	3,14 $\pm$ 0,011*	1,66 $\pm$ 0,58*	243 $\pm$ 15*	92 $\pm$ 10*	37,9	502 $\pm$ 32	2,07	4,59 $\pm$ 0,66*	32,8 $\pm$ 8,23
10-е »	3,73 $\pm$ 0,15	0,17 $\pm$ 0,07	307 $\pm$ 91	89 $\pm$ 5	29,0	486 $\pm$ 32	1,58	3,90 $\pm$ 0,81*	30,9 $\pm$ 0,20*
30-е »	4,02 $\pm$ 0,11*	0,22 $\pm$ 0,11	287 $\pm$ 31*	144 $\pm$ 41	50,2	365 $\pm$ 8*	1,27	6,85 $\pm$ 1,10	39,8 $\pm$ 3,41

\* В этой и следующей таблицах отмечено достоверное различие по сравнению с исходными данными.

объяснить двукратное снижение ЭХАС в ходе регенерационной гипертрофии печени.

Анализ состояния ЛПВП и величин ЭХАС позволил сделать следующие предположения. Через 24 ч после частичной гепатэктомии резкое уменьшение фракционной и молярной скоростей этерификации холестерина в сыворотке крови может быть связано с уменьшением количества ЛПВП и изменением их химического состава. Спустя 48 ч снижена только молярная скорость этерификации. Если признать, что в кровеносном русле циркулирует достаточное количество неизменного фермента, обеспечивающего нормальную скорость этерификации холестерина, то снижение молярной скорости этерификации будет зависеть от недостатка субстратных ЛПВП. Особый интерес представляет интервал 4—6-е сутки, когда прироста массы печени не наблюдается. По всей видимости, этот период является переходом от интенсивной клеточной пролиферации к созреванию и дифференцировке гепатоцитов. В это время молярная скорость этерификации холестерина статистически не отличалась от исходных значений, но нами отмечен высокий разброс данных. Скорость этерификации фракции холестерина либо соответствовала контрольному уровню (4-е сутки), либо незначительно, но достоверно снижалась (6-е сутки). В условиях недостатка субстратных ЛПВП, имеющих к тому же измененный химический состав, близкую к норме скорость этерификации холестерина может обеспечивать только более активный фермент. Аналогичное допущение можно сделать, исходя из данных, зарегистрированных на 10-е сутки регенераторного процесса. На 30-е сутки наблюдения химический состав ЛПВП приближался к исходному, но их количество оставалось сниженным. Однако, судя по скорости этерификации холестерина в сыворотке крови, этого количества ЛПВП достаточно для обеспечения субстратом ЛХАТ-реакции.

Наши предположения подтвердились при прямом определении активности ЛХАТ в сыворотке крови с помощью протеолипосом (табл. 2). В интервале 4—10-е сутки регенераторного процесса в сыворотке крови обнаружена достоверно более высокая, чем в контроле, активность фермента. При этом свойства фермента на 4-е и 6-е сутки не одинаковы. Анализ кинетических кривых ЛХАТ-реакции в сыворотке крови показал, что на 4-е сутки регенерации печени в сыворотке крови содержалось больше фермента с несколько менее выраженным сродством к субстрату по сравнению с ферментом у интактных крыс. На 6-е сутки восстановительного процесса в сыворотке крови обнаруживался более активный фермент с высоким сродством к субстрату. К 10-м суткам наблюдения проявлялась тенденция к нормализации показателей ЛХАТ-реакции. Следовательно, механизмы активации фермента в процессе регенерации печени могут изменяться. В связи с этим возникла необходимость выделе-

Т а б л и ц а 2. Кинетические характеристики ЛХАТ-реакции сыворотки крови и очищенного ферментного препарата при регенерации печени

Вариант	ЛХАТ-реакция сыворотки крови			Ферментный препарат		
	активность ЛХАТ, мкмоль·л <sup>-1</sup> × ч <sup>-1</sup>	K <sub>M</sub> , ммоль·л <sup>-1</sup>	V <sub>макс</sub> , ммоль·л <sup>-1</sup> × ч <sup>-1</sup>	активность мкмоль·л <sup>-1</sup> × ч <sup>-1</sup>	K <sub>M</sub> , ммоль·л <sup>-1</sup>	V <sub>макс</sub> , ммоль·л <sup>-1</sup> × ч <sup>-1</sup>
До опыта	46,7±9,3	0,60	0,158	55,4	0,525	0,146
Регенера- ция пече- ни						
2-е сут- ки	—	—	—	24,6	1,170	0,118
4-е »	124,7±4,5*	0,82	0,631	40,8	0,890	0,163
6-е »	157,7±22,7*	0,20	0,250	—	—	—
10-е »	80,8±15,1	0,50	0,217	31,9	0,800	0,121

ния, очистки фермента и характеристики его кинетических свойств.

Из объединенной плазмы крови крыс был выделен частично очищенный фермент в группе интактных животных, а также животных на 2-е, 4-е и 10-е сутки регенерации печени с удельной активностью 2,22, 2,25, 1,64 и 3,20 мкмоль·л<sup>-1</sup>·ч<sup>-1</sup> соответственно. В качестве субстрата для кинетических исследований ферментного препарата мы использовали не активатор апопротеин А1, а смесь апопротеинов ЛПВП, чтобы приблизить модельную ферментативную реакцию к реальным условиям сыворотки крови. Установлено, что зависимость скорости ЛХАТ-реакции от концентрации субстрата носит сложный характер. В области значений концентрации незтерифицированного холестерина протеолипосом 2,5—18,6 нмоль на пробу (125—970 мкмоль·л<sup>-1</sup>), т. е. близких к концентрациям стероида в сыворотке крови, форма кинетических кривых подчиняется уравнению Михаэлиса — Ментен. При дальнейшем повышении концентрации незтерифицированного холестерина протеолипосом кинетическая кривая приобретала вид пика с максимумом при 24,9 нмоль на пробу (1245 мкмоль·л<sup>-1</sup>) для ферментного препарата интактных крыс (рис. 1). Такая форма кривой может быть объяснена наличием как минимум двух молекулярных форм ЛХАТ [5]. Первая характеризуется гиперболической зависимостью скорости реакции от концентрации субстрата, для второй характерна S-образная зависимость. Первая молекулярная форма функционирует при физиологических концентрациях субстрата, вторая — при гиперхолестеринемии [7]. Наличие двух молекулярных форм ЛХАТ согласуется с представлениями о синтезе печенью α- и β-ЛХАТ [9]. При использовании в качестве субстрата липосом без препарата апопротеинов ЛПВП обнаружены резкое уменьшение активности фермента и отсутствие

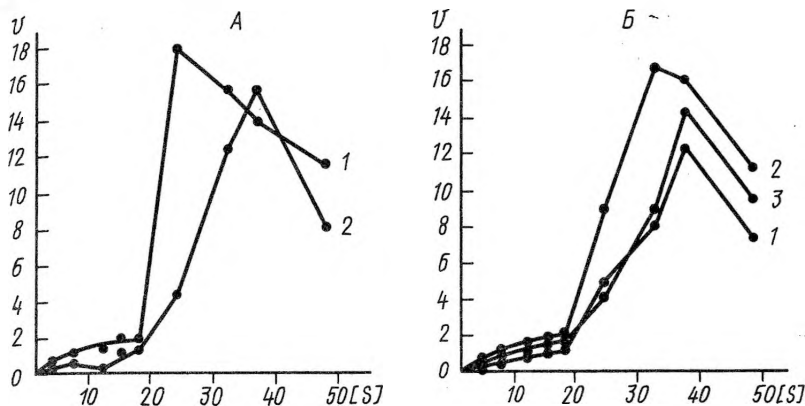


Рис. 1. Зависимость скорости ЛХАТ-реакции ( $V$ ) очищенного ферментного препарата от концентрации незатерифицированного холестерина протеолипосом  $[S]$  у интактных крыс (А) и в разные сроки регенерации печени у крыс (Б): А: 1 — субстрат протеолипосомы, 2 — липосомы; Б: 1 — 2-е сутки, 2 — 4-е сутки, 3 — 10-е сутки;  $V$  — ммоль на пробу за 1 ч ( $\times 5 \cdot 10^{-2}$  ммоль  $\cdot$  л $^{-1}$   $\cdot$  ч $^{-1}$ );  $[S]$  — ммоль незатерифицированного холестерина протеолипосом в пробе ( $\times 5 \cdot 10^{-2}$  ммоль  $\cdot$  л $^{-1}$ )

гиперболической зависимости в левой части кинетической кривой. В правой части кривой величины активности фермента были также ниже, а пик кривой переместился в область более высоких концентраций незатерифицированного холестерина липосом — 37,3 ммоль на пробу (1865 мкмоль  $\cdot$  л $^{-1}$ ). Следовательно, можно предположить, что препарат апопротеинов ЛПВП необходим для активации обеих молекулярных форм ЛХАТ.

Для получения кинетических кривых ферментных препаратов ЛХАТ из сыворотки крови крыс после частичной гепатэктомии в качестве субстрата использовали протеолипосомы. В левой части кривых зарегистрирована гиперболическая зависимость, в правой части кривые напоминали кинетические кривые, характеризующие фермент интактных крыс в случае использования липосом в качестве субстрата. При этом пики активности фермента на 2-е и 10-е сутки регенерации фермента приходились на концентрацию незатерифицированного холестерина протеолипосом 37,3 ммоль на пробу (1865 мкмоль  $\cdot$  л $^{-1}$ ), на 4-е сутки — 31,1 ммоль на пробу (1555 мкмоль  $\cdot$  л $^{-1}$ ). В целом величины пиков в правой части кривой были ниже таковых интактных крыс. Исходя из формального анализа кинетических кривых, можно предположить, что в периоды быстрого прироста массы печени в сыворотке крови функционирует фермент, частично потерявший чувствительность к конечному активирующему действию апопротеинов ЛПВП. При этом активирующее действие при физиологических концентрациях незатерифицированного

холестерина протеолипосом сохраняется. В рамках концепции о множественных молекулярных формах ЛХАТ возможно также допущение, что чувствительность отдельных молекулярных форм фермента к апопротеинам А1 и АП1 отличается.

Математический анализ гиперболических зависимостей в левой части кинетических кривых показал, что в отличие от ЛХАТ-реакции сыворотки крови ферментные препараты ЛХАТ подопытных крыс характеризуются более низкой активностью и более высокими значениями  $K_M$  (см. табл. 2). Следовательно, в процессе регенерации печени в сыворотке крови находится фермент, обладающий меньшим сродством к искусственному субстрату, чем фермент сыворотки крови интактных животных. На высоте митотической активности гепатоцитов в кровеносном русле циркулирует наиболее измененный фермент: его активность уменьшена более чем в 2 раза, значение  $V_{\max}$  снижено,  $K_M$  повышено. В период гипертрофии гепатоцитов в сыворотке крови присутствует также измененный фермент, но его сродство к субстрату ближе к исходному значению, хотя и не достигает его.

Общий анализ результатов исследования процесса этерификации холестерина в кровеносном русле после частичной гепатэктомии показал хорошее совпадение величин молярной скорости ЭХАС и активности ЛХАТ ферментного препарата. Повышенная активность ЛХАТ в сыворотке крови может быть связана с необходимостью поддержания объема этерификации холестерина в условиях дефицита субстратных ЛПВП.

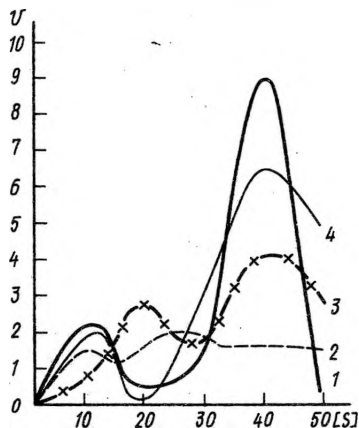
В основе увеличения активности ЛХАТ-реакции в сыворотке крови лежит, вероятно, взаимодействие фермента с апопротеинами ЛПВП [12]. Если это предположение верно, то реальным путем управления скоростью и объемом процесса этерификации холестерина в кровеносном русле при патологии печени представляется воздействие на биосинтез апопротеинов ЛПВП с целью создания их оптимального соотношения для протекания ЛХАТ-реакции.

Интерес представляют данные о снижении величины пика в правой части кинетических кривых ЛХАТ-реакции при регенерации печени. В связи с этим было проведено изучение зависимости скорости ЛХАТ-реакции сыворотки крови от концентрации субстрата (протеолипосомы) у доноров, а также у людей, в печени которых имеются признаки физиологической (новорожденные) и репаративной (инфекционный гепатит, метастазы опухолей в печень) регенерации (рис. 2). Установлено, что по величине пика в правой части кинетических кривых все обследованные лица распределяются в следующей последовательности: доноры > инфекционный гепатит > метастазы опухолей в печень > новорожденные.

Следовательно, можно сделать предварительное заключение о наличии обратной зависимости между выраженностью регенера-

Рис. 2. Зависимость скорости ЛХАТ-реакции ( $V$ ) от концентрации незэтерифицированного холестерина протеолипосом  $[S]$  у людей с различным функциональным состоянием печени:

1 — доноры, 2 — новорожденные, 3 — метастазы опухолей в печень, 4 — инфекционный гепатит



торных процессов в печени и величиной пика ЛХАТ-реакции при высоких концентрациях незэтерифицированного холестерина протеолипосом.

В заключение следует остановиться на особенностях исследования активности ЛХАТ при регенерации печени. Согласно кинетическим кривым (см. рис. 2), оптимальной концентрацией субстрата для ЛХАТ из сыворотки крови доноров, новорожденных и больных, страдающих инфекционным гепатитом, является концентрация незэтерифицированного холестерина протеолипосом 6,2 нмоль на пробу. Активность ЛХАТ при этой концентрации субстрата равна 62—66 мкмоль  $\cdot$  л $^{-1}$   $\cdot$  ч $^{-1}$ . Для определения активности ЛХАТ в сыворотке крови онкологических больных с метастазами в печень такая концентрация субстрата недостаточна, так как при низких концентрациях субстрата (2,5—6,2 нмоль на пробу) на кинетической кривой отмечался лаг-период. Для оптимального действия фермента необходима более высокая концентрация субстрата: в наших опытах при его концентрации 12,4 нмоль на пробу активность ЛХАТ составляла 73,5 мкмоль  $\cdot$  л $^{-1}$   $\cdot$  ч $^{-1}$ . Для фермента из сыворотки крови доноров, новорожденных и больных с диагнозом инфекционный гепатит при этой концентрации отмечалась наивысшая активность ЛХАТ: 103,4, 94,0, 118,5 мкмоль  $\cdot$  л $^{-1}$   $\cdot$  ч $^{-1}$  соответственно. При дальнейшем увеличении концентрации субстрата активность фермента в этих группах обследуемых лиц снижалась и второй пик активности регистрировался при концентрации незэтерифицированного холестерина протеолипосом 37,3 нмоль на пробу. Таким образом, исследование этерифицирующей холестерин активности сыворотки крови следует дополнять изучением ЛХАТ-реакции при разных концентрациях субстрата. Это позволит избежать ошибки при оценке функционального состояния печени.



## Литература

1. Иванова Е. М., Никифорова А. А., Алкснис Е. Г. Получение протеолипосом — искусственного субстрата для измерения скорости лецитин-холестерин-ацилтрансферазной реакции в цельной плазме крови. — *Вопр. мед. химии*, 1985, т. 31, № 6, с. 123—127.
2. Коневалова Н. Ю., Белиженко В. Д., Чиркин А. А. Искусственный субстрат для определения активности лецитин-холестерин-ацилтрансферазы в сыворотке крови. — *Лабораторное дело*, 1988, № 8, с. 12—14.
3. Коневалова Н. Ю., Чиркина И. А., Чиркин А. А. Действие факторов, стимулирующих пролиферацию гепатоцитов, на процесс этерификации холестерина в сыворотке крови при регенерации печени. — *Вопр. мед. химии*, 1989, т. 35, № 2, с. 37—42.
4. Лопухин Ю. М., Арчаков А. И. и др. Холестериноз. М.: Медицина, 1983.
5. Никифорова А. А., Иванова Е. М., Алкснис Е. Г. Некоторые кинетические свойства лецитин-холестерин-ацилтрансферазы плазмы крови лиц с гиперальфалипотемией. — *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, 1985, т. 29, № 2, с. 158—161.
6. Chen C. H., Albers J. J. Characterization of proteoliposomes containing apoprotein A—I: a new substrate for the measurement of lecithin: cholesterol acyltransferase activity. — *Journ. Lipid. Res.*, 1982, v. 23, p. 680—691.
7. Chirkin A. A., Konavalova N. Yu. Definition of lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) in the liver regeneration. — 14th International Congress of Biochemistry. Prague, 1988, v. 4, p. 214.
8. Glomset I. A. High-density lipoproteins in human health and disease. — *Adv. Intern. Med.*, 1980, v. 25, p. 91—116.
9. Holmquist L., Carlson L. A., Lloyk J. K. Substrate specificity of plasma lecithin: cholesterol acyltransferase in abetalipoproteinemia. — *Acta Med. Scand.*, 1988, v. 224, p. 135—139.
10. Kitabataki K., Piran U. et al. Purification of human plasma lecithin: cholesterol acyltransferase and its specificity towards the acyl acceptor. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, v. 573, p. 145—154.
11. Lima V. L., McIntyre N., Owen J. S. Secretion of lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) by the human hepatoma cell line, Hep 6-2/M. — *Biochem. Soc. Trans.*, 1988, v. 16, p. 155—156.
12. Nayak S., Remani A. et al. Serum apoproteins A and B and the lecithin: cholesterol acyltransferase activities in liver cirrhosis and hepatic coma patients. — *Biochem. Med. a. Metabol. Biol.*, 1988, v. 40, p. 299—304.
13. Robins S. J., Fasulo J. M. et al. Cholesterol exchange and synthesis in the liver rat. — *Journ. Lipid Res.*, 1985, v. 26, p. 1230—1240.
14. Stokke K. J., Norum K. R. Determination of lecithin: cholesterol acyltransferase in human blood plasma. — *Scand. Journ. Clin. Lab. Invest.*, 1971, v. 27, p. 21—27.

*Рекомендована кафедрой биохимии Витебского медицинского института. Поступила 13 декабря 1989 г.*