

**ВЛИЯНИЕ СИМВАГЛИЗИНА НА ЭКСПРЕССИЮ И ИНГИБИРОВАНИЕ  
3-ГИДРОКСИ-3-МЕТИЛГЛУТАРИЛ КОЭНЗИМ А РЕДУКТАЗЫ В ПЕЧЕНИ КРЫС****Ю.И. Рагино<sup>1</sup>, В.А. Вавилин<sup>2</sup>, Е.М. Стахнева<sup>1</sup>, Н.Ф. Салахутдинов<sup>3</sup>, О.Г. Сафронова<sup>2</sup>,  
А.Б. Шинтяпина<sup>2</sup>, В.В. Ляхович<sup>2</sup>, Ю.П. Никитин<sup>1</sup>**<sup>1</sup>ФГБНУ «НИИ терапии и профилактической медицины»  
630089, Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1<sup>2</sup>ФГБНУ «НИИ молекулярной биологии и биофизики»  
630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2<sup>3</sup>ФГБНУ «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова» СО РАН  
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 9

Исследованы активность, содержание белка и мРНК 3-гидрокси-3-метилглутарил коэнзим А редуктазы (3-HMG-CoA-редуктазы) в печени крыс при введении симвастатина (СВ) и его комплексного соединения с глицирризиновой кислотой – симваглизина (СВГ). Получено снижение количества белка 3-HMG-CoA-редуктазы на 25 % в группе СВГ ( $p < 0,05$ ) через 24 ч после введения субстанции. Количество матричной РНК в группе СВГ значительно увеличивается по сравнению с контрольной группой. *In vitro* СВГ является бесконкурентным ингибитором 3-HMG-CoA-редуктазы,  $K_i = 94$  нМ. СВГ обретает свойства ингибитора в результате цитохром Р 450-зависимого метаболизма – добавление в суспензию микросом метирапона в концентрации 1 мМ полностью предотвращает ингибирование 3-HMG-CoA-редуктазы. В концентрации 300 нМ СВ и СВГ в одинаковой степени подавляют синтез мевалоната – на  $39,15 \pm 8,27$  и  $38,85 \pm 3,04$  % соответственно.

**Ключевые слова:** глицирризиновая кислота, симвастатин, комплексное соединение симваглизин, HMG-CoA-редуктаза.

Гиперхолестеринемия (ГХС) играет ключевую роль в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний атеросклеротического генеза. Ингибиторы ключевого фермента биосинтеза холестерина (ХС) 3-гидрокси-3-метилглутарил коэнзим А редуктазы (HMG-CoA-редуктазы) – статины – играют важнейшую роль в терапевтическом контроле ГХС [1, 2]. Длительная те-

рапия статинами сопровождается снижением эффективности, а увеличение суточной дозы приводит к более частому возникновению побочных эффектов. Таким образом, поиск способов улучшения фармакологических свойств статинов остается актуальным. Ранее нами показано, что комплексы статинов с глицирризиновой кислотой (ГК) обладают более выраженным

**Рагино Юлия Игоревна** – д-р мед. наук, проф., зав. лабораторией клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, e-mail: ragino@mail.ru

**Вавилин Валентин Андреевич** – д-р мед. наук, проф., зав. лабораторией метаболизма лекарств и фармакокинетики, e-mail: drugsmet@soramn.ru

**Стахнева Екатерина Михайловна** – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, e-mail: office@iimed.ru

**Салахутдинов Нариман Фаридович** – д-р хим. наук, зав. отделом медицинской химии, e-mail: anvar@nioch.nsc.ru

**Сафронова Ольга Геннадьевна** – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории метаболизма лекарств и фармакокинетики, e-mail: drugsmet@soramn.ru

**Шинтяпина Александра Борисовна** – канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории метаболизма лекарств и фармакокинетики, e-mail: drugsmet@soramn.ru

**Ляхович Вячеслав Валентинович** – д-р мед. наук, проф., академик РАН, директор, e-mail: drugsmet@soramn.ru

**Никитин Юрий Петрович** – д-р мед. наук, проф., академик РАН, e-mail: yuri-nikitin@ngs.ru

© Рагино Ю.И., Вавилин В.А., Стахнева Е.М., Салахутдинов Н.Ф., Сафронова О.Г., Шинтяпина А.Б., Ляхович В.В., Никитин Ю.П., 2015

гипохолестеринемическим эффектом [3–6]. Известно, что снижение содержания ХС в клетке приводит к SREBP-опосредованной активации транскрипции гена *HMGCR*, направленной на его восстановление [7, 8].

Цель данного исследования – сравнение влияния нового молекулярного комплекса симваглизин (СВГ) и его исходных компонентов на экспрессию HMG-CoA-редуктазы, включая активность, содержание белка и мРНК, а также на ингибирование HMG-CoA-редуктазы в печени крыс, как возможного механизма наблюдаемых различий в фармакологической эффективности.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использованы дитиотрейтол (ICN, США), глюкозо-6-фосфат (ICN, США), глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа (Sigma, США), NADPH (Gerbu, Германия), трис-гидроксиметиламинометан (Serva, Германия), ЭДТА-Na (Serva, Германия), MgCl<sub>2</sub> (Serva, Германия), 3-гидрокси-3-метил-[3-<sup>14</sup>C]-глутарил-CoA (Amersham, Великобритания), DL-3-гидрокси-3-метил-глутарил-CoA (Fluka, Германия), другие реактивы квалификации ХЧ.

Эксперимент выполнен на самцах крыс Вистар массой 180–200 г, которые содержались в клетках по 6 крыс на стандартной лабораторной диете, со свободным доступом к воде и пище. В течение 5 дней 24 животным вводили субстанции в 1%-й крахмальной суспензии *per os* в объеме 200 мкл. Группа 1 получала ГК 600 мкг/кг/сут, группа 2 – симвастатин (СВ) 66 мкг/кг/сут, группа 3 – СВГ 666 мкг/кг/сут, группа 4 – контрольная, без фармакологического воздействия. За 12 ч до забоя животных лишали пищи, сохраняя свободный доступ к воде. На шестой день животных забивали путем декапитации.

Шесть крыс, использованных в экспериментах по ингибированию 3-HMG-CoA симваглизином *in vitro*, содержали только на стандартной лабораторной диете.

Экспериментальная субстанция СВГ была предоставлена Новосибирским институтом органической химии им. Н.Н. Ворожцова.

Выделение микросом из печени проводили общепринятым методом дифференциального центрифугирования в среде: 20 мМ трис-HCl, pH 7,4, 1,15 % KCl. Конечный осадок – фракцию микросом – ресуспендировали в среде, содержащей 0,1 М КН<sub>2</sub>Р<sub>4</sub>, 20 % глицерин, pH 7,4. Концентрацию белка определяли методом Лоури.

Активность HMG-CoA-редуктазы измеряли спектрофотометрически по методу F.H. Hulcher и W.H. Oleson. Содержание HMG-CoA-редуктазы в микросомах определяли Вестерн-блот-ана-

лизом с использованием антител против HMG-CoA-редуктазы (Millipore, USA).

Общую РНК из гомогената печени выделяли с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA), ее концентрацию измеряли на флуориметре Qubit (USA) с использованием наборов Quant-iT RNA Assay kit (Invitrogen, USA). Обратную транскрипцию 2 мкг РНК проводили с использованием Master Mix High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, USA). Концентрацию кДНК измеряли на флуориметре Qubit с использованием наборов Quant-iT dsDNA HS Assay kit (Invitrogen, USA). Для определения экспрессии гена *HMGCR* проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с детекцией в реальном времени на амплификаторе CFX 96 (Bio-Rad, USA), используя стандартный набор реагентов (Синтол, Россия) для одновременного определения фрагментов кДНК гена *HMGCR* (*HMGCR* – праймеры + зонд (R6G)) и референсного гена *GAPDH* (*GAPDH* – праймеры + зонд (FAM)) крысы согласно инструкции фирмы производителя. Обработку результатов проводили с помощью стандартного метода 2-<sup>-ΔΔCt</sup>.

Микросомальный метаболизм 3-HMG-CoA проводили по описанию D.A. Kleinsek и соавт. [9] с небольшими модификациями. В среду инкубации 0,1М КН<sub>2</sub>Р<sub>4</sub>, pH 7,0, 4mM DTT, 10mM ЭДТА, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM NADPH, 4mM Гл-6-Ф, 2 ЕД Гл-6-ФДГ добавляли суспензию микросом и 2 мин преинкубировали при комнатной температуре. Затем вносили равные объемы СВГ для создания конечных концентраций 75, 150, 300 и 600 нМ и NADPH-генерирующую систему и инкубировали 8 мин при температуре 37 °С и постоянном встряхивании для наработки метаболита – ингибитора 3-HMG-CoA-редуктазы. После этого добавляли меченый субстрат 3-НМ[3-<sup>14</sup>C]G-CoA в конечных концентрациях 28 или 47 мкМ. Общий объем реакционной смеси составлял 100 мкл, содержание белка – 0,24 мг. Реакция продолжалась в течение 10 мин и останавливалась добавлением 10 мкл 2,4 М HCl и охлаждением реакционной смеси на льду. Сравнение силы ингибирования 3-HMG-CoA-редуктазной реакции изучаемыми соединениями провели с эквимоллярной по симвастатину концентрацией симваглизина, равной 300 нМ.

Подготовку проб к хроматографии начинали спустя 1 ч после остановки реакции, необходимой для конверсии мевалоновой кислоты в форму лактона [10]. К пробам добавляли 1,5 мкл 10 М КОН для их частичной нейтрализации до величины pH 3,5–4,5, затем центрифугировали при 3000g в течение 5 мин. На колонку наносили 50 мкл надосадка. Разделение продукта (меvalo-

Таблица 1

Содержание белка HMG-CoA-редуктазы в микросомах печени крыс,  $M \pm m$ 

Показатель	Контроль	СВ	СВГ	ГК
HMG-CoA-редуктаза/b-actin, ед.	2,61±0,1	2,32±0,08	1,95±0,09	2,74±0,3
%	100	89	75**	105

Примечание. \*\* – сравнение с контролем при  $p < 0,015$ .

ната) и субстрата (3-HMG-CoA) реакции проводили методом ион-парной обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии по методу H. Scharnagi и соавт. [11] на колонке Нуклеосил  $C_{18}$  5 мкм 250×2 мм с предколонкой Vydac  $C_{18}$  30–40 мкм, 30×2 мм. Мобильной фазой служил 53%-й водный раствор метанола (V/V) и 50 мМ тетрабутиламмоний фосфат, pH 5,1, скорость потока – 150 мкл/мин. Детекцию осуществляли по поглощению на длине волны 254 нм. Для количественной оценки продукта реакции в виалы собирали 4-минутные хроматографические фракции. Содержимое виал высушивали в токе воздуха при комнатной температуре, сухой остаток растворяли в 7 мл диоксанового сцинтиллятора, содержащего ПОПОП 300 мг/л, ППО 7 г/л и нафталин 100 г/л. Измерения радиоактивности в пробах проводили на бета-счетчике Delta 300 (Голландия). Реконструкция радиохроматографической картины и ее совмещение с UV-региструемой картиной показали, что полное время выхода пика мевалоната укладывается с 4 по 8 минуту хроматографии, а 3-HMG-CoA – с 20 по 28 минуту.

Константы ингибирования рассчитывали в программе Excel. Статистическая обработка результатов проводилась в программе SPSS for Windows (версия 12.0) с применением критерия Стьюдента, корреляционного, линейного регрессионного анализа и дисперсионного анализа (One-Way ANOVA) с использованием критерия Даннета для множественного сравнения. Статистически достоверными считали различия с  $p < 0,05$ .

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Соединение симваглизин является молекулярным комплексом СВ с ГК в соотношении 1:4, которое стабильно в растворе при концентрациях ГК выше 0,2 мМ [3]. Для определения содержания белка HMG-CoA-редуктазы в микросомах печени крыс применили Western-blot-анализ. В результате оценки содержания белка

Таблица 2

Активность HMG-CoA-редуктазы в микросомах печени крыс,  $M \pm m$ 

Показатель	ГК	СВ	СВГ	Контроль
Активность HMG-CoA-редуктазы, пмоль/мин/мг белка	19,33±3,3	10,82±5,0	16,64±5,4	15,94±6,2
Сравнение с контролем, %	121	68	104	100

HMG-CoA-редуктазы (в соотношении к  $\beta$ -актину) получили, что группа животных, получавших ГК, не имеет различий с контрольной, а у крыс, получавших СВГ, происходит статистически значимое снижение белка на 25 % (табл. 1).

Известно, что снижение уровня ХС в клетке запускает механизмы усиления транскрипции гена *HMGCR*, что приводит к увеличению количества HMG-CoA-редуктазы и восстановлению его концентрации [7]. В нашем исследовании мы наблюдали значимое снижение количества HMG-CoA-редуктазы у крыс, получавших СВГ, в сравнении с группой ГК. Статистически значимых различий в активности HMG-CoA-редуктазы между группами не наблюдалось (табл. 2), однако тенденции изменений активности в сравнении с контролем находились в соответствии с изменениями содержания белка. В настоящем исследовании в группе СВ активность HMG-CoA-редуктазы снизилась на 32 %.

Полученные результаты, вероятно, являются следствием действия двух факторов – фармакологического эффекта статинов и развивающейся реакции на голодание. По данным исследований, воздействие статинов приводит к увеличению содержания белка и усилению экспрессии *HMGCR*, но снижению активности HMG-CoA-редуктазы в печени. Голодание приводит к снижению и белка, и активности фермента, и экспрессии *HMGCR* [7, 12, 13]. В нашем эксперименте введение животным последней дозы каждой испытуемой субстанции и время забоя разделяли 24 ч, а длительность голодания составляла к этому времени 14–16 ч. У симвастина период полувыведения составляет 1,9 ч, но ингибирующая активность в отношении HMG-CoA-редуктазы сохраняется около 20–30 ч благодаря наличию активных метаболитов [14]. Фармакокинетика ГК при внутривенном введении отличается двухэтапностью: малый пик через 30 мин и большой пик через 11,4 ч [15, 16]. При введении ГК 10 мг/кг *per os* определяют только большой пик по содержанию в крови ос-

новного метаболита ГК глицирретовой кислоты через 15,6 ч [17]. Концентрация ГК в сыворотке крови крыс медленно снижается в течение 24 ч и более [15, 16, 18].

ПЦР анализ выявил увеличение экспрессии гена *HMGCR* во всех экспериментальных группах. Максимальное увеличение в сравнении с контролем в 4,38 получено в группе животных, получавших ГК ( $p < 0,05$ ). В группах СВ и СВГ экспрессия гена *HMGCR* увеличилась в 3,10 и 1,82 раза соответственно ( $p < 0,05$ ). В группе СВ увеличение составило на 41 % больше, чем в группе СВГ.

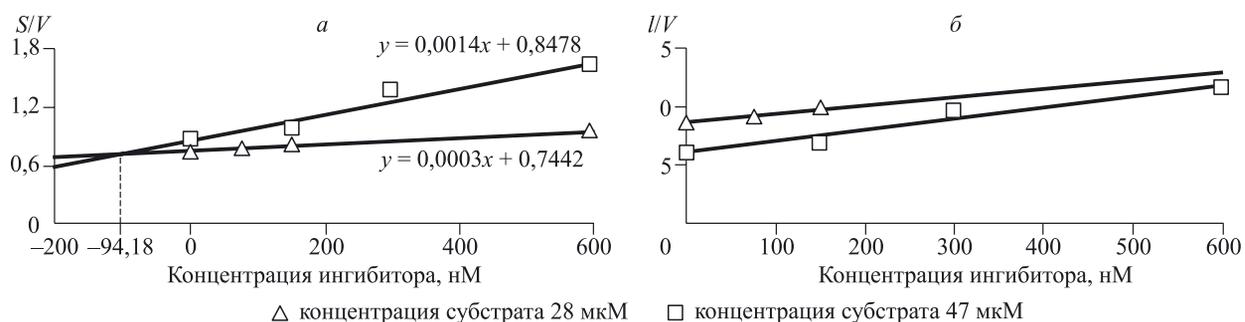
Таким образом, эффект статинов доминировал в условиях нашего эксперимента. Существенно отметить, что СВ приводил к более выраженному повышению содержания мРНК HMG-CoA-редуктазы в сравнении с соответствующим комплексом с ГК. Это указывает на менее выраженную активацию транскрипции гена *HMGCR* при введении животным комплекса СВГ по сравнению со свободным СВ.

ГК в дозе 100 мг/кг приводит к снижению накопления липидов в некоторых липид-запасующих тканях (печень, сердце, почки, скелетная мускулатура) у крыс, находящихся на высокожировой диете, что является следствием активации ГК альфа-формы рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом (PPAR $\alpha$ ) [19]. Кроме того, ГК в дозе 100 мг/кг увеличивает экспрессию мРНК PPAR $\gamma$  в жировой ткани, скелетной мышце, печени крыс [20]. То есть фармакологический эффект комплекса симвастатина с глицирризиновой кислотой может складываться из ингибирования HMG-CoA-редуктазы и PPAR-опосредованной регуляции экспрессии гена *HMGCR*. Вероятно, этим объясняется наблюдавшаяся нами его более высокая в сравнении со свободным статином фармакологическая эффективность [3].

Известно, что СВ подвергается превращению в многочисленные продукты. С участием эс-

тераз или путем неферментативного гидролиза образуется гидрокси-кислота симвастатина [21, 22], являющаяся более сильным ингибитором 3-HMG-CoA-редуктазы, чем исходное соединение, и именно ей приписывают гипохолестеринемический эффект СВ. Кроме того, в результате главным образом цитохром P450 3A4- и 3A5-зависимого метаболизма СВ превращается в три основных (3'-гидрокси-СВ, 6'-гидрокси-СВ и 3',5'-дигидродиол-СВ) и несколько минорных метаболитов, некоторые из них также образуют гидрокси-кислоты, ингибирующие 3-HMG-CoA-редуктазу [23]. С целью установить связь ингибиторных свойств синтезированного комплекса с предшествующим метаболизмом, нами проведены эксперименты по ингибированию синтеза мевалоната в присутствии 300 нМ симваглизина и нарастающих концентраций метирапона – ингибитора цитохрома P450. Результаты показали, что ингибирование уменьшается с увеличением концентрации метирапона и составляет без него 37,7 %, при его концентрации 10 мкМ – 18,7 %, и вовсе отсутствует при концентрации 1 мМ. Таким образом, СВГ обретает свойства ингибитора в результате цитохром P450-, но не эстераза-зависимого метаболизма.

Определение типа и константы ингибирования проведено с использованием двух концентраций субстрата, равных 28 и 47 мкМ, и четырех концентраций СВГ, равных 75, 150, 300 и 600 нМ. Анализ типа ингибирования графическим методом Корниш–Боудена (рисунком, а) в координатах «отношение концентрации субстрата к скорости реакции – концентрация ингибитора» дал величину  $K_i = 94,18$  нМ и свидетельствовал о бесконкурентном типе ингибирования. Однозначным подтверждением бесконкурентного типа ингибирования являются параллельные прямые (рисунок, б) для различных концентраций субстрата, получаемые в обратных координатах «обратная скорость реакции – концентрация ингибитора» по методу Диксона, поскольку



Графическое определение константы ингибирования 3HMG-CoA-редуктазы исследуемым соединением СВГ по методу Корниш–Боудена (а), ингибирование 3HMG-CoA-редуктазы исследуемым соединением СВГ по бесконкурентному типу – графический анализ по методу Диксона (б)

для такого типа ингибирования максимальная скорость реакции и константа Михаэлиса меняются одинаковое число раз.

Сравнение силы ингибирования 3-НМГ-СоА-редуктазы симваглизином и симвастатином в концентрации 300 нМ, которая находится в интервале опубликованных величин  $IC_{50}$  для СВ от 100 до 300 нМ [24], показало, что оба соединения оказывают равный по силе эффект и подавляют реакцию на  $39,15 \pm 8,27$  (СВ) и  $38,85 \pm 3,04$  (СВГ).

Полученный результат является удивительным с точки зрения измеренной в настоящей работе стабильности комплекса СВГ в этих условиях. Разбавление водного или водно-спиртового раствора до концентраций ниже 0,1 мМ должно однозначно привести к частичной диссоциации комплекса. Зная стехиометрию и константу стабильности комплекса, легко оценить его мольную долю в растворе при концентрации СВГ 300 нМ:

$$\frac{[СВГ]}{[СВ]} = 3 \times 10^{14} \times [ГК]^4 = 6 \times 10^{-10}.$$

При этом мы учитывали, что при стехиометрии комплекса 1:4 концентрация ГК = 4[СВГ]. То, что комплекс работает при столь малых концентрациях, может означать, что его терапевтическая активность существенно превышает активность исходного СВ.

Полученные в условиях *in vitro* результаты о том, что СВГ снижает и  $K_m$ , и  $V_{max}$  синтеза мевалоната, делали целесообразным оценки его возможного гипохолестеринемического эффекта в условиях *in vivo*.

Как показано ранее, сам СВ является конкурентным ингибитором 3-НМГ-СоА-редуктазы [23, 25]. Структурную основу такого типа ингибирования составляет оккупация этим и другими статинами части участка связывания 3-НМГ-СоА и затруднения его доступа к активному центру фермента [26]. Физико-химической основой изменения типа ингибирования с конкурентного, присущего СВ, на бесконкурентный, выявленный для СВГ, по-видимому, является увеличение размера комплекса в сравнении с исходной молекулой СВ и наличие несущих заряд функциональных групп у остатков глицерризиновой кислоты, что усиливает взаимодействие. Последнее, вероятно, проявляется увеличением времени распада комплекса «фермент–продукт» – кинетической основы бесконкурентного типа ингибирования [27]. Ожидаемым фармакокинетическим следствием этого должно быть замедление скорости элиминации комплекса в сравнении с симвастатином.

Таким образом, симваглизин является ингибитором 3-НМГ-СоА-редуктазы бесконкурент-

ного типа. Фармакологический эффект комплекса симвастатина с глицерризиновой кислотой может складываться из ингибирования НМГ-СоА-редуктазы и PPAR-опосредованной регуляции экспрессии гена *HMGCR*. Вероятным благоприятным следствием такого двойного механизма действия симваглизина может быть снижение выраженности «синдрома отмены» статинов, наблюдаемого в терапевтической практике.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза // Кардиоваск. тер. проф. 2009. Т. 6. Прил. 3. Р. 6–37.
2. **Вавилин В.А., Стахнева Е.М., Салахутдинов Н.Ф., Рагино Ю.И., Макарова С.И.** Современный взгляд на молекулярные механизмы действия статинов // Молекуляр. медицина. 2011. № 3. С. 17–23.
3. **Вавилин В.А., Салахутдинов Н.Ф., Рагино Ю.И. и др.** Гипохолестеринемические свойства комплексного соединения симвастатина с глицерризиновой кислотой (симваглизина) в экспериментальных моделях // Биомед. хим. 2008. Т. 54 (3). С. 301–313.
4. **Рагино Ю.И., Вавилин В.А., Салахутдинов Н.Ф., Макарова С.И., Стахнева Е.М., Сафронова О.Г., Никитин Ю.П., Толстиков Г.А.** Изучение холестеринснижающего эффекта и безопасности симваглизина на модели гиперхолестеринемии у кроликов // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2008. Т. 145, № 3. С. 285–288.
5. **Стахнева Е.М., Вавилин В.А., Салахутдинов Н.Ф., Сафронова О.Г., Макарова С.И., Иванова М.В., Рагино Ю.И.** Липидснижающий и антиоксидантный эффекты симваглизина при экспериментальной гиперхолестеринемии // Региональное кровообращение и микроциркуляция. 2008. Т. 7, № 2 (26). С. 52–54.
6. **Рагино Ю.И., Вавилин В.А., Салахутдинов Н.Ф., Макарова С.И., Стахнева Е.М., Сафронова О.Г., Ляхович В.В., Никитин Ю.П., Толстиков Г.А.** Изучение антиоксидантного и нормализующего функцию эндотелия эффектов симваглизина на модели гиперхолестеринемии у кроликов // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2008. Т. 146, № 8. С. 171–175.
7. **Espenshade P.J., Hughes A.L.** Regulation of Sterol Synthesis in Eukaryotes // Annu. Rev. Genet. 2007. Vol. 41. P. 401–27.
8. **Horton J.D., Goldstein J.L., Brown M.S.** SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver // J. Clin. Invest. 2002. Vol. 109. P. 1125–1131.
9. **Kleinsek D.A., Jabalquinto A.M., Porter J.W.** *In vivo* and *in vitro* mechanisms regulating rat liver beta-hydroxy-beta-methylglutaryl coenzyme A reductase activity // J. Biol. Chem. 1980. Vol. 10. N 255(9). P. 3918–3923.
10. **Jemal M., Schuster A., Whigan D.B.** Liquid chromatography/tandem mass spectrometry methods for quantitation of mevalonic acid in human plasma and urine: method validation, demonstration of using a

- surrogate analyte, and demonstration of unacceptable matrix effect in spite of use of a stable isotope analog internal standard. // *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 2003. Vol 17(15). P. 1723–1734.
11. Scharnagl H., März W., Schliack M., Löser R., Gross W. A novel assay for cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase activity using reversed-phase ion-pair chromatography: demonstration that Lifibrol (K12.148) modulates the enzyme activity // *J. Lipid Res.* 1995. Vol. 36 (3). P. 622–627.
  12. Conde K., Roy S., Freake H.C. et al. Atorvastatin and Simvastatin Have Distinct Effects on Hydroxy Methylglutaryl-CoA Reductase Activity and mRNA Abundance in the Guinea Pig // *Lipids.* 1999. Vol. 34, N 12. P. 1327–1332.
  13. Ness G.C., Chambers C.M., Lopez D. Atorvastatin action involves diminished recovery of hepatic HMG-CoA reductase activity // *J. Lipid Res.* 1998. Vol. 39. P. 75–84.
  14. Толстикова Г.А., Балтина Л.А., Гранкина В.П. и др. Солюдка: биоразнообразие, химия, применение в медицине. Новосибирск: Гео, 2007. 311 с.
  15. Gao Q.T., Chen X.H., Bi K.S. Comparative Pharmacokinetic Behavior of Glycyrrhetic Acid after Oral Administration of Glycyrrhetic Acid and Gancao-Fuzi-Tang // *Biol. Pharm. Bull.* 2004. Vol. 27 (2). P. 226–228.
  16. Zhao W.J., Wang D.J., Wei C.M. et al. Determination of glycyrrhetic acid in human plasma by HPLC-MS method and investigation of its pharmacokinetics // *J. Clin. Pharm. Ther.* 2008. Vol. 33. P. 289–294.
  17. Takeda S., Ishihara K., Wakui Y. et al. Bioavailability Study of Glycyrrhetic Acid after Oral Administration of Glycyrrhizin in Rats; Relevance to the Intestinal Bacterial Hydrolysis // *J. Pharm. Pharmacol.* 1996. Vol. 48. P. 902–905.
  18. Ozaki Y., Noguchi M., Kamakura H., Harada M. Studies on concentration of glycyrrhizin in plasma and its absorption after oral administration of licorice extract and glycyrrhizin // *Yakugaku Zasshi.* 1990. Vol. 110 (1). P. 77–81.
  19. Eu C., Lim W., Ton S., Kadir Kh. Glycyrrhizic acid improved lipoprotein lipase expression, insulin sensitivity, serum lipid and lipid deposition in high-fat diet-induced obese rats // *Lipids in Health and Disease.* 2010. Vol. 9. P. 81.
  20. Yin C.Y., Ha T.S., Kadir K.A. Effects of Glycyrrhizic Acid on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR $\gamma$ ), Lipoprotein Lipase (LPL), Serum-Lipid and HOMA-IR in Rats // *PPAR Research.* 2010. Article ID 530265. 6 pages doi:10.1155/2010/530265.
  21. Prueksaritanont T., Gorham L.M., Ma B., Liu L., Yu X., Zhao J.J., Slaughter D.E., Arison B.H., Vyas K.P. *In vitro* metabolism of simvastatin in humans [SBT] identification of metabolizing enzymes and effect of the drug on hepatic P450s // *Drug. Metab. Dispos.* 1997. Vol. 25 (10). P. 1191–1199.
  22. Prueksaritanont T., Ma B., Yu N. The human hepatic metabolism of simvastatin hydroxy acid is mediated primarily by CYP3A, and not CYP2D6 // *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2003. Vol. 56 (1). P. 120–124.
  23. Vickers S., Duncan C.A., Vyas K.P., Kari P.H., Arison B., Prakash S.R., Ramjit H.G., Pitzenger S.M., Stokker G., Duggan D.E. *In vitro* and *in vivo* biotransformation of simvastatin, an inhibitor of HMG CoA reductase // *Drug. Metab. Dispos.* 1990. Vol. 18 (4). P. 476–483.
  24. Dansette P.M., Jaoen M., Pons C. HMG-CoA reductase activity in human liver microsomes: comparative inhibition by statins // *Exp. Toxicol. Pathol.* 2000. Vol. 52 (2). P. 145–148.
  25. Hoffman W.F., Alberts A.W., Anderson P.S., Chen J.S., Smith R.L., Willard A.K. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors. 4. Side chain ester derivatives of mevinolin // *J. Med. Chem.* 1986. Vol. 29 (5). P. 849–852.
  26. Istvan E.S. Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase // *Am. Heart J.* 2002. Vol. 144 (6 Suppl). P. S27–S32.
  27. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1979. 280 с.

#### INFLUENCE OF SIMVAGLYZIN ON EXPRESSION AND INHIBITION OF HMG-COA REDUCTASE IN RATS LIVER

Yu.I. Ragino<sup>1</sup>, V.A. Vavilin<sup>2</sup>, E.M. Stakhneva<sup>1</sup>, N.F. Salakhtudinov<sup>3</sup>, O.G. Safronova<sup>2</sup>, A.B. Shintyapina<sup>2</sup>, V.V. Lyakhovich<sup>2</sup>, Yu.P. Nikitin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Internal and Preventive Medicine, 630089, Novosibirsk, Boris Bogatkov str., 175/1*

<sup>2</sup>*Institute of Molecular Biology and Biophysics, 630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

<sup>3</sup>*Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, 630090, Novosibirsk, Akademik Lavrentjev av., 9*

Activity, level of protein and mRNA HMG-CoA reductase were investigated in rats liver treated with simvastatin (SV), its complex compound with glycyrrhizic acid – simvaglyzin (SVG) and glycyrrhizic acid alone. Level of protein HMG-CoA reductase was reduced on 25 % in SVG group ( $p < 0.05$ ) 24 hours after introduction the last dose. Level of mRNA was significantly increased in experimental group in compared to control. *In vitro* SVG was uncompetitive inhibitor of HMG-CoA reductase ( $K_i = 94$  nM). SVG gain the inhibitor properties following cytochrome P450-dependent metabolism. The addition of 1mM methyrapone in incubation medium fully prevented the inhibition of 3-HMG-CoA reductase. SV and SVG in concentrations of 300 nM inhibited of mevalonate synthesis rate by  $39.15 \pm 8.27$  % and  $38.85 \pm 3.04$  %, respectively.

**Keywords:** glycyrrhizic acid, simvastatin, complex compound simvaglyzin, HMG-CoA reductase.

Статья поступила 7 мая 2015 г.