

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ СЕСКВИТЕРПЕНОВОГО γ -ЛАКТОНА АХИЛЛИНА НА УРОВЕНЬ ЛИПИДОВ И ЭКСПРЕССИЮ мРНК КЛЮЧЕВЫХ ГЕНОВ МЕТАБОЛИЗМА ЛИПИДОВ В КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ ГЕПАТОМЫ ЛИНИИ НТС

Пфаргер Ю.А.¹, Иванов В.В.¹, Ратькин А.В.¹, Кайдаш О.А.¹, Цыганов М.М.^{2,3},
Чучалин В.С.¹, Адекенов С.М.⁴, Новицкий В.В.¹, Рязанцева Н.В.⁵

¹Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России), 634050, Томск, ул. Московский тракт, 2.

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет» (НИ ТГУ), 634050, Томск, пр. Ленина, 36.

³Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский научно-исследовательский институт онкологии» (Томский НИИ онкологии), 634050, Томск, пер. Кооперативный, 5.

⁴Акционерное общество «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия», Республика Казахстан, г. Караганда, ул. М. Газалиева, 4.

⁵Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России), 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1.

АННОТАЦИЯ

Цель исследования. Изучить влияние сесквитерпенового γ -лактона ахиллина на содержание липидов и экспрессию мРНК ключевых генов метаболизма липидов в клетках гепатомы линии НТС при экспериментальной гиперлипидемии.

Пфаргер Юлия Андреевна – аспирант кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (г. Томск). *Сибирский государственный медицинский университет, Московский тракт 2, г. Томск, 634050, Российская Федерация.* E-mail: ipfarger@gmail.com

Иванов Владимир Владимирович – доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, кандидат биол. наук, доцент (г. Томск). *Сибирский государственный медицинский университет, Московский тракт 2, г. Томск, 634050, Российская Федерация.*

Ратькин Александр Валентинович – доцент кафедры фармацевтической технологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, кандидат фарм. наук, доцент (г. Томск). *Сибирский государственный медицинский университет, Московский тракт 2, г. Томск, 634050, Российская Федерация.* E-mail: ratkin@ssmu.ru

Кайдаш Ольга Александровна – ассистент кафедры фармакологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (г. Томск). *Сибирский государственный медицинский университет, Московский тракт 2, г. Томск, 634050, Российская Федерация.*

Цыганов Матвей Михайлович – младший научный сотрудник лаборатории онковирусологии Томского НИИ онкологии (г. Томск). *Томский научно-исследовательский институт онкологии, пер. Кооперативный 5, г. Томск, 634050, Российская Федерация;* младший научный сотрудник лаборатории трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины НИ ТГУ (г. Томск). *Национальный исследовательский Томский государственный университет, пр. Ленина 36, г. Томск, 634050, Российская Федерация.*

Чучалин Владимир Сергеевич – декан фармацевтического факультета, заведующий кафедрой фармацевтической технологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, доктор фарм. наук (г. Томск). *Сибирский государственный медицинский университет, Московский тракт 2, г. Томск, 634050, Российская Федерация.* E-mail: phitech@ssmu.ru

Адекенов Сергазы Мынжасарович – председатель правления АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия», академик НАН РК, доктор химических наук, профессор (г. Караганда, Республика Казахстан). *Акционерное общество «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия», ул. М. Газалиева 4, г. Караганда, Республика Казахстан.* E-mail: phyto_pio@mail.ru

Новицкий Вячеслав Викторович – заведующий кафедрой патофизиологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, академик РАН, доктор мед. наук, профессор (г. Томск). *Сибирский государственный медицинский университет, Московский тракт 2, г. Томск, 634050, Российская Федерация.*

Рязанцева Наталья Владимировна – профессор кафедры биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, доктор мед. наук, профессор (г. Красноярск). *Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, ул. Партизана Железняка 1, г. Красноярск, 660022.*

© Пфаргер Ю. А., Иванов В. В., Ратькин А. В., Кайдаш О. А., Цыганов М. М., Чучалин В. С., Адекенов С. М., Новицкий В. В., Рязанцева Н. В., 2016

Материалы и методы. Экспериментальную гиперлипидемию в культуре гепатомы моделировали добавлением в инкубационную среду жировой эмульсии липофундина МСТ/ЛСТ в конечной концентрации 0,05 %. Через 48 ч инкубации клеточной культуры НТС с ахиллином в концентрации 500 мкМ исследовали жизнеспособность клеток с помощью МТТ-теста и оценивали уровень в них общих липидов флуоресцентным методом с витальным красителем Nile Red и содержание триацилглицеролов (ТАГ) и холестерина ферментативным методом. РНК из клеток выделяли с помощью набора Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit («GE Healthcare»). Уровень экспрессии мРНК ключевых генов метаболизма липидов оценивали при помощи количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени по технологии TaqMan.

Результаты. Инкубация клеток с липофундином МСТ/ЛСТ (0,05 %) приводило к увеличению интенсивности флуоресценции Nile Red в клетках и повышению в них уровня ТАГ. Ахиллин в концентрации 500 мкМ не оказывал цитотоксического действия на клеточную культуру НТС и приводил к уменьшению содержания холестерина и ТАГ в клетках при гиперлипидемии индуцированной липофундином. Это сопровождалось снижением интенсивности флуоресценции красителя Nile Red в клетках. В культуре гепатомы ахиллин повышал экспрессию мРНК генов карнитин-пальмитоилтрансферазы 1 (*Cpt1a*) и 2 (*Cpt2*), 7-альфа-гидроксилазы (*Cyp7a1*) и 3-гидрокси-3-метилглутарил КоА редуктазы (*Hmgcr*). На экспрессию гена ацилКоА холестерол ацилтрансферазы (*Soat1*) ахиллин оказывал ингибирующее влияние.

Заключение. Снижение содержания холестерина, ТАГ и интенсивности флуоресценции Nile Red в клетках гепатомы при экспериментальной гиперлипидемии под действием ахиллина в концентрации 500 мкМ может быть обусловлено увеличением экспрессии генов карнитин-пальмитоилтрансферазы 1 и 2; 7-альфа-гидроксилазы, что способствует увеличению транспорта жирных кислот в митохондрии и синтезу из холестерина желчных кислот. Наряду с этим, ингибирование гена ацилКоА холестерол ацилтрансферазы способствует уменьшению образования эфиров холестерина и их накоплению в гепатоцитах.

Ключевые слова: сесквитерпеновый γ -лактон ахиллин, гемфиброзил, культура гепатомы линии НТС, МТТ-тест, Nile Red, экспрессия мРНК, гены метаболизма липидов.

Возникновение и развитие сердечно-сосудистых заболеваний связано с нарушением метаболизма липидов. Атерогенная дислипидемия, которая проявляется в виде гипертриацилглицеридемии и гиперхолестеролемии, является наиболее важным фактором риска развития и прогрессирования сердечно-сосудистых патологий, таких как атеросклероз, инфаркт миокарда, гипертония [1].

Поиск лекарственных веществ, молекулярными мишенями действия которых являются гены метаболизма липидов, позволит открыть новые лекарственные препараты, способные успешно предотвращать развитие гиперлипидемии.

В АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия» (г. Караганда, Республика Казахстан) из *Achillea lanulosa* Nutt, *Achillea micrantha* Willd., *Achillea millefolium* L., *Artemisia leucodes* Shrenk, *Hypochaeris setosus* и *Stevia alpina* Griseb выделен сесквитерпеновый γ -лактон ахиллин, который относится к группе вторичных метаболитов растений – терпеноидов предшественников синтеза холестерина [2].

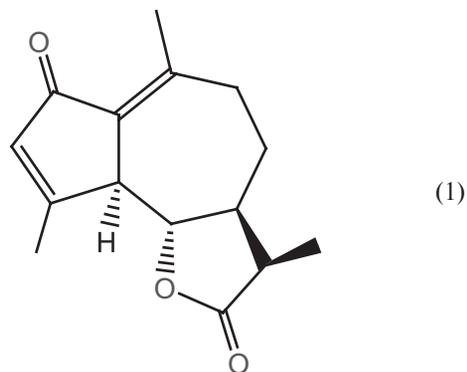
Ранее нами было показано, что курсовое введение крысам ахиллина на фоне острой гиперлипидемии, вызванной этанолом, приводит к снижению в плазме крови экспериментальных животных уровней ТАГ, свободных жирных кислот и холестерина в атерогенных липопротеинах низкой плотности (ЛПНП) [3].

Известно, что печень является органом, определяющим гомеостаз липидов в целом организме

[1]. Поэтому целью настоящей работы явилось исследование влияния сесквитерпенового γ -лактона ахиллина на содержание липидов и экспрессию мРНК ключевых генов метаболизма липидов в клетках гепатомы крыс линии НТС при экспериментальной гиперлипидемии, индуцированной липофундином.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании использовали ахиллин – сесквитерпеновый лактон гваянового типа (1), выделенный в АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия» [2]. Субстанция зарегистрирована на территории Республики Казахстан, исследуемый образец соответствует требованиям ФС РК 42-1909-08, количественное содержание – 99,7%.



Перевиваемую клеточную культуру гепатомы крыс линии НТС, полученную из Банка клеточных культур ФГБУН Института цитологии РАН (Санкт-Петербург), культивировали в культуральных флаконах («SPL life science») до 70–80% конфлюэнтного монослоя (субконфлюэнтный монослой) в среде, содержащей 90% DMEM с L-глутамином («Биолот»), 10% ЭТС («PAA Laboratories»), 50 мкг/мл гентамицина («ПанЭко») (полная среда DMEM) в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂, влажность 95%).

Экспериментальную гиперлипидемию на клеточной культуре НТС индуцировали путем добавления жировой эмульсии липофундина МСТ/ЛСТ («Б. Браун Медикал») в конечной концентрации 0.05% [4, 5]. Ахиллин и препарат сравнения гемфибозил («Sigma-Aldrich») добавляли в культуральную среду в конечных концентрациях 500 мкМ и 250 мкМ, соответственно. Через 48 ч оценивали жизнеспособность клеток методом МТТ-тестом [6]. Содержание липидов в клеточной культуре НТС определяли флуоресцентным методом с витальным липофильным красителем Nile Red, который окрашивает капли липидов в цитозоле [6]. Интенсивность флуоресценции Nile Red детектировали на микропланшетном ридере «Infinite 200PRO» («Tecan») при длине волны возбуждения 580 нм и эмиссии 630 нм. Содержание ТАГ и холестерина в клеточной культуре НТС определяли ферментативным методом с помощью набора фирмы «Chronolab». Предварительно липиды экстрагировали из клеток по методу J. Folch смесью хлороформ-метанола (2:1) [7]. Перед проведением анализа к хлороформной фазе был добавлен 20% раствор детергента Thesit («Sigma-Aldrich») в хлороформе. Хлороформ был удален потоком воздуха и к эмульгированным липидам были добавлены рабочие реагенты из соответствующих наборов. Количество ТАГ и холестерина выражали в мг/10⁷ клеток.

РНК из клеточной культуры выделяли с помощью набора Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit («GE Healthcare») в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию и чистоту выделенной РНК определяли на спектрофотометре Nano Drop-2000 («Thermo Scientific»). Концентрация РНК составляла от 100 до 500 нг/мкл, A₂₆₀/A₂₈₀ = 1,85–1,95; A₂₆₀/A₂₃₀ = 1,90–2,10. Целостность РНК оценивали при помощи капиллярного электрофореза на приборе TapeStation («Agilent Technologies») и набора R6K ScreenTape («Agilent Technologies»).

Уровень экспрессии мРНК генов оценивали при помощи количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени по технологии TaqMan на амплификаторе RotorGene-6000 («Corbett Research»). кДНК получали с помощью набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit («Fermentas»). ПЦР ставили в трех репликах в объеме 15 мкл, содержащем 250 мкМ дНТФ («Sibenzyme»),

300 нМ прямого и обратного праймеров, 200 нМ зонда, 2,5 мМ MgCl₂ («Sibenzyme»), 1xSE буфера (67 мМ Tris – HCl pH 8,8 при 25°C, 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween-20) («Sibenzyme»), 2,5 ед. Tag ДНК-полимеразы (5 Еа/мкл, «Sibenzyme») и 50 нг кДНК. Двухшаговая программа амплификации включала 1 цикл – 94°C, 2 мин – предварительная денатурация; 40 циклов – 1 шаг 94°C, 6 сек и 2 шаг 10 сек – при температуре 60,5°C. Праймеры и зонды (FAM-BHQ1) были подобраны с использованием программы VectorNTI Advance 11.5 и базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pucscore>) (Таблица 1).

Проверку чистоты ПЦР-продуктов проводили с использованием электрофореза в 2,5% агарозном геле с 0,2% бромистым этидием. Уровень экспрессии каждого целевого гена выражали в условных единицах по отношению к контролю (клетки инкубировали с DMSO) и гену-рефери фермента *Actb* (*Rattus norvegicus* actin, beta). Относительная экспрессия генов метаболизма липидов была оценена с помощью метода Pfaffl [8].

Результаты исследования обрабатывали с использованием программ Microsoft Excel (2007), GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, США) и SPSS Statistics 17.0 (IBM, США). Результаты представлены в виде выборочного среднего (*M*) и ошибки среднего (*m*). Для проверки нормальности распределения показателей использовали критерий Шапиро-Уилка. Для проверки значимости различий между исследуемыми группами использовали t-критерий Стьюдента для одной выборки и непараметрический U-критерий Манна-Уитни для малых групп. Статистически значимые считали различия при уровне значимости *p*<0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культивирование клеток гепатомы в течение 48 ч с липофундином в конечной концентрации 0,05% приводило к повышению содержания липидов в клеточной культуре в 4 раза, о чем свидетельствует увеличение флуоресценции Nile Red с 10928,4±967,3 до 48534,7±1924 ед. флуоресценции (*p*<0,05) (рис. 1). Повышение уровня липидов в клетках при добавлении липофундина в культуральную среду обусловлено преимущественно увеличением содержания ТАГ с 0,896±0,115 до 2,64±0,084 мг/10⁷ клеток (*p*<0,05) (рис. 2а). Накопление ТАГ и свободных жирных кислот при добавлении липофундина наблюдалось также и в клеточной культуре гепатокарциномы линии FaO и в первичных крысиных гепатоцитах [4, 5].

При культивировании клеток гепатомы линии НТС с ахиллином в концентрации 500 мкМ и гемфибозилом (250 мкМ) в течение 48 ч жизнеспособность клеток НТС, оцененная в МТТ-тесте, не изменялась и составляла 97,3±2,5% и 98,8±4,9%, соответствен-

но, по сравнению с контролем ($p > 0,05$). В этих же концентрациях исследуемые вещества уменьшали интенсивность флуоресценции Nile Red в клетках на 27,5% ($35187 \pm 582,4$ ед. флуоресценции) и на 63,5% ($17714,9 \pm 1795$ ед. флуоресценции), соответственно, по сравнению с контролем ($48534,7 \pm 1924$ ед. флуоресценции) ($p < 0,05$) (рис. 1), что отражает снижение содержания липидов в клетках.

Уменьшение содержания липидов в клеточной культуре НТС под действием ахиллина обусловлено снижением содержания ТАГ на 20% ($2,11 \pm 0,136$ мг/ 10^7 клеток) и холестерина на 26,5% ($0,207 \pm 0,023$ мг/ 10^7 клеток) ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (ТАГ – $2,64 \pm 0,084$ мг/ 10^7 клеток, холестерол – $0,282 \pm 0,019$ мг/ 10^7 клеток) (рис. 2). Гемфибризол на модели гиперлипидемии оказал более выраженное влияние на уровень ТАГ в клетках, снижая их содержание на 49,3% ($1,34 \pm 0,117$ мг/ 10^7 клеток) ($p < 0,05$) (рис. 2а).

Для исследования механизма гипополипидемического действия ахиллина определяли экспрессию ключевых генов метаболизма липидов в клеточной культуре линии НТС. Одним из процессов, определяющих уровень внутриклеточного холестерина, является его поступление в клетку в составе частиц ЛПНП путем рецептор-опосредованного пиноцитоза, осуществляемого с участием рецепторов к ЛПНП (*Ldlr*), расположенных на плазматической мембране гепатоцитов [9]. В результате экспериментов было установлено, что инкубация клеток гепатомы с препаратом сравнения гемфибризолом приводила к увеличению экспрессии мРНК гена *Ldlr* в 2,5 раза ($2,51 \pm 0,25$ усл. ед., $p < 0,05$) (рис. 3а). Ахиллин не оказывал влияния на экспрессию гена *Ldlr* и величина экспрессии составляла $1,06 \pm 0,06$ усл. ед. ($p > 0,05$) (рис. 3б).

Фермент 3-гидрокси-3-метилглутарил КоА редуктаза (ГМГ-КоА редуктаза) локализован на эндоплазматическом ретикулуме и пероксисомах и

Таблица 1

Последовательности праймеров и зондов, используемых в исследовании экспрессии мРНК генов метаболизма липидов

<i>Actb</i> NM_031144.3 Ампликон 71 bp	F 5' – GAAAAGATGACCCAGATCATGT-3' R 5' – AACACAGCCTGGATGGCTA-3' Probe 5' – AGACCTTCAACACCCCAGCCAT-3'
<i>Acaca</i> NM_022193.1 Ампликон 94 bp	F 5' – CGCAGGCATCAGAAGATCA-3' R 5' – TGGCAAGTTTTACAGCACACT-3' Probe 5' – ACCCCAGCAGTATTTGAACACATG-3'
<i>Cpt1a</i> NM_031559.2 Ампликон 98 bp	F 5' – CATTGACCTCCGCCTGA-3' R 5' – TGATGCCATTCTTGAACCG-3' Probe 5' – CCACGAAGCCCTCAAACAGAT-3'
<i>Cpt2</i> NM_012930.1 Ампликон 104 bp	F 5' – GCTGTTACGATGACTGGATAG-3' R 5' – TCGAAAATGTCTTCCAAGCA-3' Probe 5' – ACGCAATGCCCGAGAGTTTC-3'
<i>Cyp7a1</i> NM_012942.2 Ампликон 103 bp	F 5' – CTGATGCTCTCCTGCTTTGA-3' R 5' – CATGTAGTGGTGGCAAAATTC-3' Probe 5' – TGTGGAGAGCCAAGTCAAGTGTC-3'
<i>Hmgcr</i> NM_013134.2 Ампликон 106 bp	F 5' – GCTTGAGATCATGTGCTGCTT-3' R 5' – CCGAGAAAGCTCTAGGACCA-3' Probe 5' – CTGTATGTCCGTGCTTGCCAACT-3'
<i>Ldlr</i> NM_175762.2 Ампликон 95 bp	F 5' – GCCATCTATGAGGACAAAGTGT-3' R 5' – GCCACCAAATTCACATCTGA-3' Probe 5' – AGGCGGTTGGCACTGAAAATG-3'
<i>Soat1</i> NM_031118.1 Ампликон 79 bp	F 5' – GTGCTCGTGTCCCTGGTCC-3' R 5' – AAGGCAAAGAACGAAAGGAA-3' Probe 5' – AGCACACCTGGCAAGATGGAGTT-3'

Оригинальный дизайн

Примечание: все пробы – FAM→BHQ1; NM – номер последовательности РНК в NCBI Nucleotide Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>); bp – пара оснований (base pair); F – прямой праймер; R – обратный праймер; Probe – зонд.

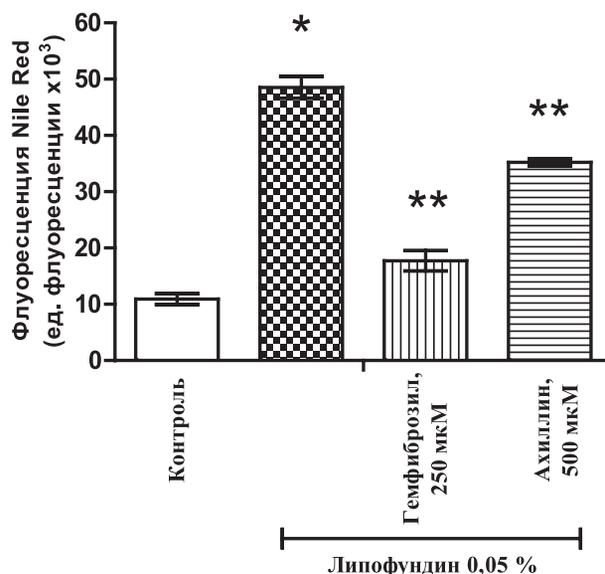


Рис. 1. Влияние ахиллина (500 мкМ) и гемфиброзила (250 мкМ) на флуоресценцию Nile Red в клеточной культуре гепатомы линии НТС при культивировании клеток НТС с 0,05% липофундином, $M \pm m$, $n=6$.
* – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$); ** – статистически значимые различия по сравнению с липофундином ($p < 0,05$).

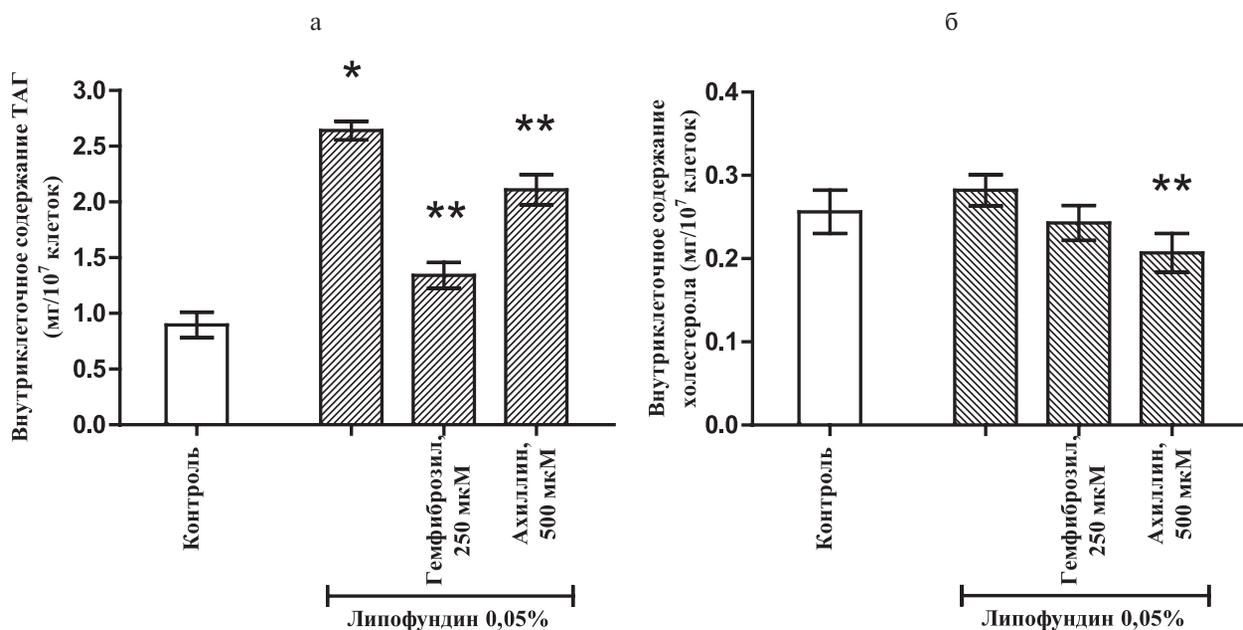


Рис. 2. Влияние ахиллина (500 мкМ) и гемфиброзила (250 мкМ) на содержание триацилглицеролов (ТАГ) (а) и холестерина (б) в клеточной культуре гепатомы линии НТС при культивировании клеток НТС с 0,05 % липофундином, $M \pm m$, $n=5$.
* – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$); ** – статистически значимые различия по сравнению с липофундином ($p < 0,05$).

лимитирует скорость биосинтеза холестерина [10]. В результате экспериментов было установлено, что экспрессия мРНК гена *Hmgcr* увеличилась в 1,4 раза ($1,41 \pm 0,14$ усл. ед., $p < 0,05$) при инкубации клеток гепатомы с ахиллином (рис. 3б), гемфиброзил

($0,97 \pm 0,06$ усл. ед., $p > 0,05$) не оказывал существенного влияния на экспрессию гена *Hmgcr* по сравнению с контролем (рис. 3а). Известно, что конечный продукт метаболического пути – холестерин регулирует скорость транскрипции гена ГМГ-КоА-редуктазы

по принципу отрицательной обратной связи. Однако регуляция активности фермента ГМГ-КоА редуктазы – это сложный процесс, который контролируется как на транскрипционном уровне (через SREBPs транскрипционные факторы), так и на посттранскрипционном (через процессы фосфорилирования/дефосфорилирования) [9]. Поэтому можно предполагать, что увеличение экспрессии гена ГМГ-КоА-редуктазы, обнаруженное в наших экспериментах, обусловлено снижением содержания холестерина под действием ахиллина.

АцилКоА холестерол ацилтрансфераза (*Soat1*) – фермент, катализирующий образование эфиров холестерола из холестерола [11]. Установлено, что культивирование клеточной культуры НТС с гемфиброзилем и ахиллином приводило к снижению экспрессии мРНК гена *Soat1* на 50% – $0,55 \pm 0,05$ и $0,50 \pm 0,06$ усл. ед. ($p < 0,05$), соответственно (рис. 3). Известно, что ингибиторы ацилКоА холестерол ацилтрансферазы снижают уровень холестерола в плазме, уменьшая абсорбцию холестерола, поступающего с пищей, и подавляя образование и секрецию аполипопротеин В (апоВ) содержащих липопротеинов, таких как ЛПОНП в печени и хиломикронов в кишечнике [12].

Печень устраняет избыток холестерина из организма путем непосредственной секреции в желчь или после преобразования его в желчные кислоты. Лимитирующим ферментом синтеза желчных кислот является холестерин 7 α -гидроксилаза (*Cyp7a1*) [13]. Культивирование клеток с гемфиброзилем приводило к снижению экспрессии мРНК гена *Cyp7a1* на 67% и величина экспрессии составляла $0,73 \pm 0,09$ усл. ед. ($p < 0,05$) (рис. 3а). Действительно, ранее было показано, что фибраты, в том числе гемфиброзил, уменьшают экспрессию мРНК гена *Cyp7a1* у пациентов с гиперлипидемией [14] и в клеточной культуре гепатомы HepG2 [15]. Уменьшение экспрессии мРНК гена *Cyp7a1* способствует снижению синтеза и секреции желчных кислот, что приводит к повышению литогенности желчи, то есть к риску образования желчных камней [14]. Поэтому гемфиброзил противопоказан больным с желчнокаменной болезнью. Ахиллин, напротив, повышал экспрессию мРНК гена *Cyp7a1* в 2,8 раза ($2,79 \pm 0,24$ усл. ед., $p < 0,05$) (рис. 3б).

Жирные кислоты с длинной углеводородной цепью переносятся через внутреннюю мембрану митохондрий с помощью карнитина. Карнитин-пальмитоилтрансфераза 1 (*Cpt1a*) – фермент, расположенный на внешней мембране митохондрий

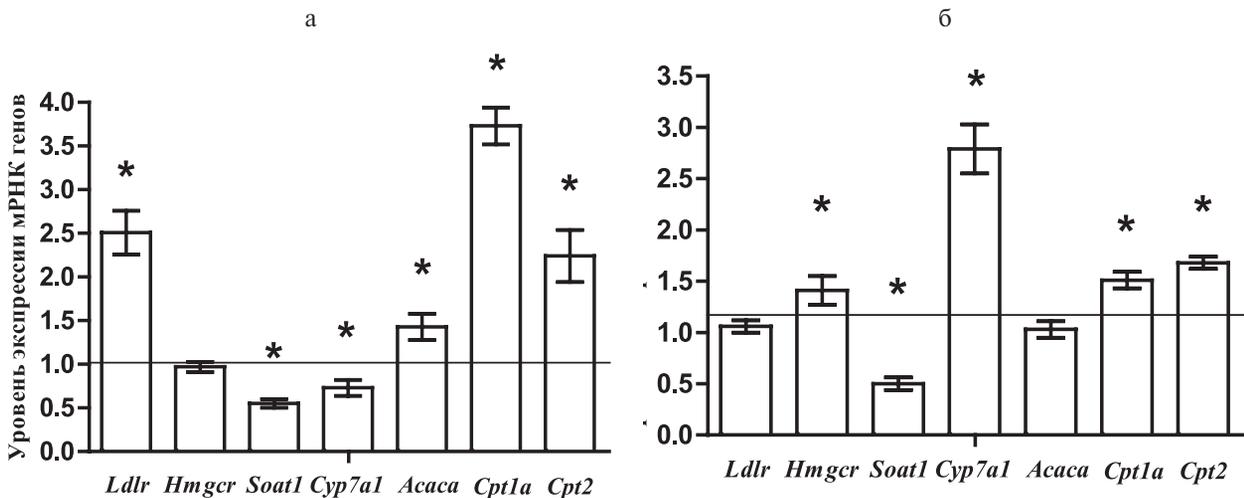


Рис. 3 – Влияние гемфиброзила (250 мкМ) (а) и ахиллина (500 мкМ) (б) на экспрессию мРНК генов метаболизма липидов в клеточной культуре гепатомы линии НТС.

Примечание: величина экспрессии мРНК генов выражена в усл. ед. и нормализована по гену-рефери β -актину (*Actb*) и контролю (клетки инкубировали с растворителем ДМСО). Относительная экспрессия мРНК генов в контроле принята за единицу; * – уровень статистической значимости по сравнению с контролем, $p < 0,05$;

Обозначение генов: *Ldlr* – рецептор к ЛПНП; *Hmgcr* – 3-гидрокси-3-метилглутарил КоА редуктаза; *Soat1* – ацилКоА холестерол ацилтрансфераза; *Cyp7a1* – α -гидроксилаза; *Cpt1a* – карнитин-пальмитоилтрансфераза 1; *Cpt2* – карнитин-пальмитоилтрансфераза 2; *Acaca* – ацетил-КоА карбоксилаза.

и осуществляющий транспорт длинноцепочечных жирных кислот в митохондрии, катализируя реакцию с образованием ацилкарнитина, фермент карнитин-пальмитоилтрансфераза 2 (*Cpt2*) катализирует перенос ацила на пул внутримитохондриального КоА [16]. Поэтому нами была исследована экспрессия мРНК обоих генов ферментов, участвующих в катаболизме жирных кислот. При культивировании клеток НТС с гемфибозилом и ахиллином экспрессия гена *Cpt1a* увеличивалась в 3,7 раза ($3,73 \pm 0,21$ усл. ед.) и в 1,5 раза ($1,51 \pm 0,08$ усл. ед.) ($p < 0,05$), соответственно (рис. 3). На экспрессию мРНК гена *Cpt2* гемфибозил оказывал менее выраженное влияние ($2,24 \pm 0,3$ усл. ед., $p < 0,05$) (рис. 3а), в то время как ахиллин повышал величину экспрессии мРНК гена *Cpt2* в 1,7 раза ($1,68 \pm 0,06$ усл. ед., $p < 0,05$) (рис. 3б).

Ацетил-КоА-карбоксилаза (*Acaca*) – ключевой фермент синтеза жирных кислот, катализирующий карбоксилирование ацетил-КоА с образованием малонил-КоА. Увеличение экспрессии мРНК гена *Acaca* под действием гемфибозила может быть обусловлено снижением субстрата ацетил-КоА, необходимого для синтеза малонил-КоА, поскольку увеличение экспрессии генов *Cpt1a* и *Cpt2* (рис. 3а) усиливает β -окисление жирных кислот [17]. Установлено, что гемфибозил увеличивал экспрессию мРНК гена фермента ацетил-КоА-карбоксилазы в клетках гепатомы НТС в 1,4 раза ($1,43 \pm 0,15$ усл. ед., $p < 0,05$) (рис. 3а). Ахиллин не оказывал влияния на экспрессию исследуемого гена ($1,03 \pm 0,08$ усл. ед., $p > 0,05$) (рис. 3б).

Таким образом, возможный механизм гиполипидемического действия ахиллина может быть обусловлен увеличением транспорта и окисления длинноцепочечных жирных кислот в митохондриях, о чем свидетельствует повышение экспрессии мРНК генов карнитин-пальмитоилтрансферазы 1 (*Cpt1a*) и 2 (*Cpt2*). Снижение уровня холестерина может быть связано с повышенным синтезом желчных кислот из холестерина, вследствие повышенной экспрессии гена 7-альфа-гидроксилазы (*Cyp7a1*), а ингибирование экспрессии гена ацилКоА холестерол ацилтрансферазы (*Soat1*) может приводить к снижению накоплению эфиров холестерина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Буеверова Е.Л., Драпкина О.М., Ивашкин В.Т. Атерогенная дислипидемия и печень // Рос. мед. вести. 2008. Т. 13, № 1. С. 17–23.
2. Адекенов С.М., Гафуров Н.М., Турмухамбетов А.Ж., Ивлев В.И. Терпеноиды *Achillea micrantha* // Химия природных соединений. 1987. № 2. С. 305–306.
3. Раткин А.В., Кайдаш О.А., Пфаргер Ю.А. и др. Гиполипидемическое действия сесквитерпеновых лактонов арглабина и ахиллина на модели острой

- гиперлипидемии // Сиб. мед. обоз. 2014. Т. 5, № 89. С. 40–43.
4. Ilan E., Tirosh O., Madar Z. Triacylglycerol-mediated oxidative stress inhibits nitric oxide production in rat isolated hepatocytes // J. Nutr. 2005. Vol. 135, N 9. P. 2090–2095.
5. Tirosh O., Ilan E., Anavi S. et al. Nutritional lipid-induced oxidative stress leads to mitochondrial dysfunction followed by necrotic death in FaO hepatocytes // Nutrition. 2009. Vol. 25. P. 200–208.
6. Shen Ch., Meng Q., Schmelzer E., Bader A. Gel entrapment culture of rat hepatocytes for investigation of tetracycline-induced toxicity // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2009. Vol. 238. P. 178–187.
7. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues // J. Biol. Chem. 1957. Vol. 226. P. 497–509.
8. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // Nucleic. Acids. Res. 2001. Vol. 29, N 9. P. e45.
9. Goldstein J.L., Bose-Boyd R.A., Brown M.S. Protein sensors for membrane sterols // Cell. 2006. Vol. 124. P. 35–46.
10. Wang Y.M., Zhang B., Xue Y. et al. The mechanism of dietary cholesterol effects on lipids metabolism in rats // Lipids Health. Dis. 2010. Vol. 9, N. 4. P. 1–6.
11. Lee M.K., Moon S.S. et al. Naringenin 7-O-cetyl ether as inhibitor of HMG-CoA reductase and modulator of plasma and hepatic lipids in highcholesterol-fed rats // Bioorg. Med. Chem. 2003. Vol. 11, № 3. P. 393–398.
12. Miyazaki A., Sakai M., Sakamoto Y., Horiuchi S. Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase inhibitors for controlling hypercholesterolemia and atherosclerosis // Curr. Opin. Investig. Drags. 2003. Vol. 4, N 9. P. 1095–1099.
13. Chen Z.Y., Jiao R., Ma K.Y. Cholesterol-lowering nutraceuticals and functional foods // J. Agric. Food Chem. 2008. Vol. 56, N 19. P. 8761–8773.
14. Roglans N., Peris C., Verd J.C. et al. Increase in hepatic expression of SREBP 2 by gemfibrozil administration to rats // Biochem. Pharmacol. 2001. Vol. 62, N 6. P. 803–809.
15. Gbaguidi G.F., Agellon L.B. The inhibition of the human cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) promoter by fibrates in cultured cells is mediated via the liver x receptor alpha and peroxisome proliferator-activated receptor alpha heterodimer // Nucleic. Acids Res. 2004. Vol. 32, № 3. P. 1113–1121.
16. Bonnefont J.P. et al. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects // Mol. Aspects Med. 2004. Vol. 24, N 5–6. P. 495–520.
17. Munday M.R., Hemingway C.J. The regulation of acetyl-CoA carboxylase--a potential target for the action of hypolipidemic agents // Adv. Enzyme. Regul. 1999. Vol. 39. P. 205–234.

EFFECT OF SESQUITERPENE γ -LACTONE ACHILLIN
ON LEVEL OF LIPIDS AND EXPRESSION mRNA
OF KEY GENES OF LIPID METABOLISM
IN HEPATOMA TISSUE CULTURE (HTC)

Pfarger Iu.A.¹, Ivanov V.V.¹, Ratkin A.V.¹, Kaidash O.A.¹, Tsyganov M.M.^{2,3},
Chuchalin V.S.¹, Adekenov S.M.⁴, Novitsky V.V.¹, Ryazantseva N.V.⁵

¹Siberian State Medical University, 2 Moskovsky trakt, Tomsk, 634050.

²Tomsk State University, 36 Lenina av., Tomsk, 634050.

³Tomsk Cancer Research Institute, 5 Kooperativny st., Tomsk, 634050.

⁴JSC "International scientific- industrial holding" Phytochemistry",
Karaganda, Kazakhstan, st. M. Gazaliyev 4.

⁵Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky,
1 Partisan Zheleznyak, Krasnoyarsk, 660022.

Annotation

Objective. To study the effect of sesquiterpene γ -lactone achillin on the lipid content and mRNA expression of key genes of lipid metabolism in the hepatoma tissue cell line HTC in the experimental hyperlipidemia.

Materials and methods. The experimental hyperlipidaemia in HTC cells simulated by adding fat emulsion Lipofundin MCT/LCT at a final concentration 0.05 % to the incubation medium. After 48 h of incubating cell culture with achillin at the final concentration 500 μ M the cell viability was investigated by using the MTT assay and assessed level of lipids by fluorescent vital stain Nile Red and the content of triacylglycerols (TAG) and cholesterol by enzymatic method. RNA was isolated from cells using the set Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit («GE Healthcare»). The level of mRNA expression of key genes in lipid metabolism was assessed using a real-time quantitative polymerase chain reaction with reverse transcription by TaqMan technology.

Results. Incubation cells with Lipofundin MCT/LCT (0.05%) resulted in an increase in the fluorescence intensity of Nile Red and increase the levels of TAG in cells. Achill (500 μ M) had no cytotoxic effect on HTC cell and led to reduction of cholesterol and TAG in cells with hyperlipidemia induced by Lipofundin. This was accompanied by a decrease in fluorescence intensity of Nile Red dye in the cells. In the hepatoma culture achillin increased gene expression of carnitine palmitoyltransferase 1 (*Cpt1a*) and 2 (*Cpt2*), 7- α -hydroxylase (*Cyp7a1*) and 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (*Hmgcr*). On expression of gene acetyl-CoA cholesterol acyltransferase (*Soat1*) achill had an inhibitory effect.

Conclusion. Lowering of cholesterol, TAG and Nile Red fluorescence intensity in hepatoma cells in experimental hyperlipidemia under the action of achillin in the final concentration 500 μ M could be caused by increase of gene expression carnitine palmitoyltransferase 1 and 2; 7- α -hydroxylase, which contributes to increase the transport of fatty acids into the mitochondria, and synthesis of bile acids from cholesterol. In addition, inhibition of acetyl-CoA cholesterol acyltransferase helps to reduce the formation of cholesterol esters and their accumulation in the hepatocytes.

Keywords: sesquiterpene γ -lactone achillin, gemfibrozil, hepatoma tissue culture (HTC), MTT assay, Nile Red, mRNA expression, genes of lipid metabolism.

Статья поступила 26 ноября 2015 г.
Принята в печать 5 февраля 2016 г.