

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Пфаргер Юлия Андреевна

**МЕХАНИЗМЫ ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ
СЕСКВИТЕРПЕНОВОГО ЛАКТОНА АХИЛЛИНА**

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология
14.03.03 – патологическая физиология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:
академик РАН,
заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук,
профессор В.В. Новицкий
кандидат биологических наук,
доцент В.В. Иванов

Томск – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Патогенетическое обоснование основных мишеней и принципов гиполипидемического действия лекарственных средств.....	15
1.1.1. Метаболизм холестерина в физиологических условиях.....	15
1.1.2. Молекулярно-генетические механизмы поглощения и синтеза холестерина <i>de novo</i>	19
1.1.3. Молекулярно-генетическая регуляция синтеза жирных кислот и триацилглицеролов.....	25
1.1.4. Молекулярно-генетическая регуляция катаболизма жирных кислот.....	27
1.2. Экспериментальные модели гиперлипидемии.....	29
1.3. Терапия гиперлипидемии: современные подходы.....	37
1.3.1. Современные гиполипидемические средства.....	37
1.3.2. Сесквитерпеновые лактоны – перспективные соединения для профилактики и лечения гиперлипидемии.....	40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	45
2.1. Характеристика объекта исследования.....	45
2.2. Материал исследования.....	46
2.2.1. Культивирование клеточной культуры линии НТС.....	46
2.2.2. Исследования на крысах линии Wistar.....	47
2.3. Методы исследования.....	51
2.3.1. Определение жизнеспособности клеточной культуры линии НТС.....	52
2.3.2. Определение содержания липидов в клеточной культуре линии НТС, в сыворотке крови и печени крыс.....	53
2.3.2.1. Определение содержания липидов в клетках гепатомы флуоресцентным методом с красителем Nile Red.....	53
2.3.2.2. Окрашивание нейтральных липидов красителем Oil Red O.....	54

2.3.2.3. Определение содержания триацилглицеролов в клеточной культуре НТС, в сыворотке крови и печени крыс ферментативным методом.....	55
2.3.2.4. Определение содержания холестерина в клеточной культуре НТС, в сыворотке крови и печени крыс ферментативным методом.....	56
2.3.2.5. Определение содержания свободных жирных кислот в сыворотке крови крыс ферментативным методом.....	56
2.3.2.6. Определение содержания холестерина в липопротеинах низкой плотности в сыворотке крови крыс ферментативным методом.....	57
2.3.2.7. Определение содержания холестерина в липопротеинах высокой плотности в сыворотке крови крыс ферментативным методом.....	57
2.3.3. Определение концентрации белка в клеточной культуре линии НТС.....	58
2.3.4. Оценка величины экспрессии мРНК генов метаболизма липидов в клеточной культуре НТС и печени крыс.....	59
2.3.4.1. Выделение суммарной РНК из клеток гепатомы и печени крыс.....	59
2.3.4.2. Синтез комплементарной ДНК.....	61
2.3.4.3. Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени по технологии TaqMan.....	62
2.3.5. Определение уровня активных форм кислорода в клеточной культуре линии НТС флуоресцентным методом.....	64
2.3.6. Определение содержания восстановленного глутатиона в клеточной культуре линии НТС флуоресцентным методом.....	65
2.3.7. Визуализация внутриклеточного содержания липидов, активных форм кислорода и восстановленного глутатиона в клеточной культуре линии НТС методом микроскопии.....	66
2.3.8. Статистическая обработка результатов.....	68
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	69

3.1. Влияние сесквитерпенового лактона ахиллина на содержание триацилглицеролов и холестерина в клетках гепатомы линии НТС при экспериментальной гиперлипидемии, индуцированной липофундином.....	69
3.1.1. Оценка цитотоксичности ахиллина на клеточной культуре линии НТС.....	70
3.1.2 Влияние ахиллина на флуоресценцию Nile Red в клеточной культуре линии НТС.....	71
3.1.3. Моделирование экспериментальной гиперлипидемии <i>in vitro</i> в клеточной культуре линии НТС.....	74
3.1.4. Влияние ахиллина на содержание триацилглицеролов и холестерина в клеточной культуре линии НТС при экспериментальной гиперлипидемии, индуцированной липофундином.....	77
3.2. Влияние сесквитерпенового лактона ахиллина на величину экспрессии мРНК ключевых генов метаболизма липидов при экспериментальной гиперлипидемии на клеточной культуре линии НТС.....	82
3.2.1. Изучение влияния ахиллина на величину экспрессии мРНК гена рецептора к липопротеинам низкой плотности (<i>Ldlr</i>) в клеточной культуре линии НТС.....	82
3.2.2. Изучение влияния ахиллина на величину экспрессии мРНК гена фермента 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА редуктазы (<i>Hmgcr</i>) в клеточной культуре линии НТС.....	85
3.2.3. Изучение влияния ахиллина на величину экспрессии мРНК гена фермента ацетилКоА: холестеролацилтрансферазы (<i>Soat1</i>) в клеточной культуре линии НТС.....	87
3.2.4. Изучение влияния ахиллина на величину экспрессии мРНК гена фермента 7 α -гидроксилазы (<i>Cyp7a1</i>) в клеточной культуре линии НТС.....	88
3.2.5. Изучение влияния ахиллина на величину экспрессии мРНК генов ферментов карнитин-пальмитоилтрансферазы I (<i>Cpt1a</i>) и II (<i>Cpt2</i>) в клеточной культуре линии НТС.....	90

3.2.6. Изучение влияния ахиллина на величину экспрессии мРНК гена фермента ацетил-КоА-карбоксилазы (<i>Acaca</i>) в клеточной культуре линии НТС.....	92
3.3. Влияние ахиллина на уровень активных форм кислорода и содержание восстановленного глутатиона в клеточной культуре линии НТС при экспериментальной гиперлипидемии.....	95
3.4. Гиполипидемическое действие ахиллина на фоне острой экспериментальной гиперлипидемии, индуцированной этиловым спиртом.....	103
3.5. Гиполипидемическое действие ахиллина на фоне острой экспериментальной гиперлипидемии, индуцированной тритоном WR 1339.....	108
3.6. Гиполипидемическое действие ахиллина на фоне хронической экспериментальной гиперлипидемии, индуцированной атерогенной диетой.....	113
3.6.1. Влияние сесквитерпенового лактона ахиллина на величину экспрессии мРНК ключевых генов метаболизма липидов у крыс на модели гиперлипидемии, индуцированной атерогенной диетой.....	121
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	128
ВЫВОДЫ.....	138
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	140
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	141

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. В настоящее время большой проблемой практической медицины является увеличение числа заболеваний, в основе которых лежат дислипидемии. Нарушения в липидном спектре крови способствуют развитию социально-значимых заболеваний, таких как атеросклероз, неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП), сахарный диабет 2 типа, гипертоническая болезнь и метаболический синдром (Бутрова С. А., 2001; Miller M. et al., 2011; Никоноров А. А. и соавт., 2013; Nelson R. H., 2013; Ray K., 2013; Wei T. et al., 2014; Pawlak M. et al., 2015). Важная роль в патогенезе и прогрессировании этих заболеваний принадлежит окислительному стрессу (Valko M. et al., 2007; Силина Е. В. и соавт., 2011). Гиперпродукция активных форм кислорода (АФК) при окислительном стрессе приводит к пероксидации липидов, окислению липопротеинов, к увеличению уровней супероксидного радикала и пероксида водорода, что вызывает истощение антиоксидантных систем организма и усугубляет тяжесть течения данных заболеваний (Valko M. et al., 2007).

Несмотря на большое разнообразие синтетических препаратов с гиполипидемическим действием на фармацевтическом рынке, большинство представителей данного класса веществ могут провоцировать расстройства со стороны желудочно-кишечного тракта, нарушения со стороны дыхательной системы, астению (Adult treatment panel III, 2002; Bays H., 2006; Guyton J. R., 2006; Moutzouri E. et al., 2010), развитие миопатии вплоть до рабдомиолиза, активацию фибринолитической системы, повышение активности аминотрансфераз в сыворотке крови и уровня мочевой кислоты (Kim W. S. et al., 2001; Guyton J. R., 2006; Окуневи́ч И. В. и соавт., 2010). В отдельных случаях возможно развитие печеночной недостаточности, подагры, мигрени, импотенции и повышение нервной возбудимости (Adult treatment panel III, 2002; Российские рекомендации, 2009; Справочник Видаль, 2011).

На современном этапе одним из основных источников новых молекул, обладающих различной фармакологической активностью, являются природные соединения, преимущественно, растительного происхождения (Абышев А. З. и соавт., 2013; Дикусар Е. А. и соавт., 2014). Перспективным источником лекарственных средств с гиполипидемическим действием являются вещества с терпеноидной структурой (Krettli A. U. et al., 2001; Wagner S. et al., 2006; Bezie I. F. F., 2011), которые обладают достаточно высоким фармакотерапевтическим потенциалом, низким уровнем побочных эффектов и хорошей переносимостью (Kitson R. A. et al., 2009; Kumar D. et al., 2012).

Среди веществ этого класса, продуцируемых растениями, активно изучаются сесквитерпеновые лактоны. Они представляют собой обширную группу по количеству соединений и разнообразию углеродного скелета (Chaturvedi D., 2011; Zaghloul A. M., 2014; Ivanescu B. et al., 2015).

Степень разработанности темы исследования. Известно, что сесквитерпеновые лактоны, как и гиполипидемические лекарственные средства группы статинов, содержат лактонное кольцо в своей структуре (Hennekens C. H., 2001). Результаты исследований последних лет показали, что сесквитерпеновый лактон леукомизин и сесквитерпеноид фарнезол ингибируют активность ключевого фермента синтеза холестерина 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктазы (ГМГ-КоА-редуктазы) (Kuroda M. et al., 2007; Kaneko M. et al., 2011; Роднова Е. А. и соавт., 2011; 2012). А, как известно, гиполипидемический эффект статинов связан с ингибированием активности ГМГ-КоА-редуктазы, снижением уровня общего холестерина (ХС) и холестерина в липопротеинах низкой плотности (ХС-ЛПНП) (Задонченко В. С. и соавт., 2011).

Дополнительно показано, что леукомизин снижает содержание триациглицеролов (ТАГ) и ХС в сыворотке крови крыс, а также проявляет антиоксидантную активность (Роднова Е. А. и соавт., 2011; 2012; Адекенов С. М. и соавт., 2012). Способность понижать уровень ТАГ, ХС, ХС-ЛПНП и повышать содержание холестерина в липопротеинах высокой плотности (ХС-ЛПВП) показана также для сесквитерпеновых лактонов костунолида, агуерина Б,

гроссгемина, цинаропикрина и сеспендола (Shimoda H. et al., 2003; Uchida R. et al., 2006; Duraipandiyar V. et al., 2012). Таким образом, в настоящее время накоплен материал, указывающий на перспективность сесквитерпеновых лактонов в качестве основы для создания препаратов с гиполипидемической активностью.

Учеными АО Международный научно-производственный холдинг “Фитохимия” (г. Караганда, Казахстан) методом углекислотной экстракции из тысячелистника обыкновенного (*Achillea lanulosa* Nutt, *Achillea millefolium* L.), тысячелистника мелкоцветкового (*Achillea micrantha* Willd), полыни беловой (*Artemisia leucodes* Shrenk), посконника (*Eupatorium japonicum*.), хипохериса щетинистого (*Hypochaeris setosus*) и стевии (*Stevia alpina* Griseb.) выделен сесквитерпеновый лактон гваянового ряда ахиллин.

Цель исследования: дать патогенетическое обоснование использования сесквитерпенового лактона ахиллина при экспериментальной гиперлипидемии и установить молекулярные механизмы его гиполипидемического действия.

Задачи исследования:

1. Установить основные молекулярные звенья патогенеза гиперлипидемии и дать патогенетическое обоснование гиполипидемического действия сесквитерпенового лактона ахиллина.
2. Создать модель, воспроизводящую основные звенья патогенеза гиперлипидемии в клеточной культуре гепатомы линии НТС с использованием жировой эмульсии липофундина, и исследовать влияние сесквитерпенового лактона ахиллина на содержание триацилглицеролов и холестерина в клетках гепатомы при экспериментальной гиперлипидемии *in vitro*.
3. Оценить величину экспрессии мРНК ключевых генов метаболизма липидов при экспериментальной гиперлипидемии на клеточной культуре гепатомы линии НТС и влияние сесквитерпенового лактона ахиллина на экспрессию этих генов.
4. Оценить выраженность окислительного стресса в клетках гепатомы линии НТС и антиоксидантное действие сесквитерпенового лактона ахиллина при экспериментальной гиперлипидемии.

5. Установить особенности гиперлипидемии у крыс, индуцированной детергентом тритоном WR 1339 и этиловым спиртом, и гиполипидемического действия сесквитерпенового лактона ахиллина.
6. Изучить влияние сесквитерпенового лактона ахиллина при курсовом введении на содержание триацилглицеролов и холестерина в печени, сыворотке крови и экспрессию мРНК ключевых генов липидного обмена в печени крыс при хронической экспериментальной гиперлипидемии, индуцированной атерогенной диетой.

Научная новизна. На оригинальной модели гиперлипидемии на клеточной культуре гепатомы линии НТС впервые дано патогенетическое обоснование основных мишеней действия сесквитерпенового лактона ахиллина, гиполипидемический эффект которого обоснован в экспериментах *in vitro*, а также на моделях острой и хронической гиперлипидемии у крыс.

Принципиальную научную новизну имеют данные о механизмах гиполипидемического действия ахиллина в условиях экспериментальной гиперлипидемии, обусловленные его влиянием на величину экспрессии мРНК генов липидного обмена в печени. Показано, в частности, что повышение экспрессии мРНК генов карнитин-пальмитоилтрансферазы 1 и 2 (*Cpt1a* и *Cpt2*) уменьшает содержание ТАГ в печени и сыворотке крови экспериментальных животных. Обосновано также, что увеличение экспрессии мРНК гена рецептора к ЛПНП (*Ldlr*) способствует извлечению из циркуляции в крови атерогенных ЛПНП, а повышение экспрессии мРНК гена 7 α -гидроксилазы (*Cyp7a1*) и ингибирование экспрессии мРНК гена ацилКоА: холестеролацилтрансферазы (АХАТ) (*Soat1*) приводит к снижению уровня холестерина в печени и сыворотке крови экспериментальных животных.

Впервые показано также, что действие ахиллина снижает уровень АФК в клеточной культуре гепатомы линии НТС при окислительном стрессе в условиях экспериментальной гиперлипидемии вследствие повышения уровня восстановленного глутатиона в клетках.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты проведенного исследования носят фундаментальный характер и раскрывают механизмы гиполипидемического действия сесквитерпенового лактона ахиллина, связанные с его влиянием на экспрессию мРНК ключевых генов липидного обмена.

Разработана оригинальная модель, воспроизводящая основные звенья патогенеза гиперлипидемии на клеточной культуре гепатомы линии НТС, позволяющая изучать гиполипидемические эффекты лекарственных средств, которая может быть использована в скрининговых исследованиях.

Полученные данные определяют целесообразность проведения дальнейших доклинических исследований и обосновывают перспективность разработки гиполипидемического средства на основе ахиллина.

Написаны отчеты о результатах исследования гиполипидемического действия сесквитерпенового лактона ахиллина, включающие описание, результаты и статистический анализ данных (договоры на выполнение научно-исследовательских работ №216 от 25.10.2012 г. и №77/99 от 19.05.2015 г. между АО Международным научно-производственным холдингом “Фитохимия” (г. Караганда, Казахстан) и ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России).

Методология и методы исследования. Для реализации поставленных задач использованы высокоинформативные методы исследования, которые выполнялись на базе центральной научно-исследовательской лаборатории (руководитель лаборатории – доктор медицинских наук А. Н. Байков) ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

В качестве материала исследования использовали клетки гепатомы линии НТС, сыворотку крови и печень крыс. Основные методы исследования:

1. Культивирование клеточной культуры гепатомы линии НТС и моделирование экспериментальной гиперлипидемии *in vitro* путем добавления липофундина МСТ/ЛСТ в культуральную среду (культуральный метод).

2. Оценка жизнеспособности клеточной линии НТС с помощью МТТ-теста и с трипановым синим (спектрофотометрический анализ, метод световой микроскопии).
3. Определение содержания липидов, восстановленного глутатиона и уровня АФК в клетках гепатомы линии НТС (флуориметрический анализ и микроскопия).
4. Определение концентрации ТАГ, ХС, ХС-ЛПНП, ХС- ЛПВП, свободных жирных кислот (СЖК) в сыворотки крови и содержания ТАГ, холестерина в печени крыс (биохимический анализ).
5. Оценка уровня экспрессии мРНК ключевых генов метаболизма липидов (ГМГ-КоА-редуктазы, рецептора к ЛПНП, АХАТ, 7 α -гидроксилазы, ацетил-КоА-карбоксилазы, карнитин-пальмитоилтрансферазы 1 и 2) при помощи количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в реальном времени по технологии TaqMan (молекулярно-генетический анализ).
6. Статистический анализ результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Сесквитерпеновый лактон ахиллин в концентрации 0,5 мМ уменьшает содержание триацилглицеролов и холестерина в клеточной культуре гепатомы линии НТС при гиперлипидемии, индуцированной липофундином, что может быть связано с увеличением экспрессии мРНК генов карнитин-пальмитоилтрансферазы 1 (*Cpt1a*) и 2 (*Cpt2*), 7 α -гидроксилазы (*Cyp7a1*) и ингибированием экспрессии мРНК гена ацилКоА: холестеролацилтрансферазы (*Soat1*).
2. Ахиллин препятствует развитию окислительного стресса в клеточной культуре линии НТС при экспериментальной гиперлипидемии, индуцированной липофундином, повышая содержание восстановленного глутатиона в клетках.
3. На модели острой гиперлипидемии у крыс, индуцированных тритоном WR 1339 и этиловым спиртом, курсовое введение ахиллина в дозе 10 мг/кг в течение 7 дней препятствует увеличению содержания триацилглицеролов, общего

холестерола, свободных жирных кислот, холестерина в липопротеинах низкой плотности в сыворотке крови и уровня триацилглицеролов и холестерина в печени экспериментальных животных.

4. Снижение содержания триацилглицеролов и холестерина в печени и сыворотке крови на модели хронической гиперлипидемии у крыс, индуцированной атерогенной диетой, при курсовом введении ахиллина (10 мг/кг в течение 14 дней) может быть обусловлено увеличением экспрессии мРНК генов карнитин-пальмитоилтрансферазы 1 и 2 (*Cpt1a* и *Cpt2*), 7 α -гидроксилазы (*Cyp7a1*) и снижением экспрессии мРНК гена ацилКоА: холестеролацилтрансферазы (*Soat1*). Уменьшение уровня холестерина в липопротеинах низкой плотности под влиянием ахиллина связано с повышением экспрессии мРНК гена рецептора к липопротеинам низкой плотности (*Ldlr*).

Степень достоверности и апробация результатов. Полученные результаты имеют высокую степень достоверности, которая подтверждается изучением гиполипидемической активности сесквитерпенового лактона ахиллина согласно «Руководству по доклиническому исследованию лекарственных средств» (Миронов А. Н., 2012), применением современных методических приемов и высокоинформативных лабораторных методов исследования (культуральные методы, спектрофотометрический анализ, биохимический анализ, флуориметрический анализ, микроскопия, количественная ОТ-ПЦР в режиме реального времени по технологии TaqMan), использованием сертифицированного оборудования и адекватных критериев статистической обработки результатов.

Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на IV Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2014), 1-ой европейской конференции по биологии и медицинским наукам (Вена, 2014), международной научно-практической конференции «Достижения и перспективы развития фитохимии» (Караганда, 2015), XIII международной научно-практической конференции «Научные перспективы XXI века. Достижения и перспективы нового столетия» (Новосибирск, 2015), 9-й международной научно-

практической конференции «Перспективы развития научных исследований в 21 веке» (Махачкала, 2015), международной научно-практической конференции «Наука и образование – 2015» (Мурманск, 2015), международной научно-практической конференции «Наука, образование, общество» (Тамбов, 2016).

Работа выполнена на основе научно-исследовательских работ «Поиск перспективных источников гипополидеических средств на основе сесквитерпеновых лактонов и их производных» (договор на выполнение научно-исследовательских работ №216 от 25.10.2012 г.) и «Поиск и изучение гипополидеических средств на основе сесквитерпеновых лактонов, флавоноидов и их производных» (договор на выполнение научно-исследовательских работ №77/99 от 19.05.2015 г.) между АО Международный научно-производственный холдинг “Фитохимия” (г. Караганда, Казахстан) и ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

По материалам диссертации опубликовано 16 работ, из них 8 полнотекстовых статей в научных журналах, включенных в перечень российских рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В настоящее время профилактике и лечению нарушений обмена липидов уделяется пристальное внимание в различных областях медицины. Это обусловлено чрезвычайной распространенностью заболеваний, в патогенезе которых лежат дислипидемии (Бутрова С. А., 2001; Miller M. et al., 2011; Никоноров А. А. и соавт., 2013; Nelson R. H., 2013; Ray K., 2013; Wei T. et al., 2014; Pawlak M. et al., 2015).

Дислипидемия и ассоциированные метаболические заболевания включают в себя не только атеросклероз и ассоциированные с ним сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), но и сахарный диабет 2 типа, метаболический синдром, а также НАЖБП, которая объединяет различные клиничко-морфологические изменения в печени: стеатоз, неалкогольный стеатогепатит, фиброз и цирроз, не связанные с употреблением алкоголя (Ойроткинова О. Ш., Дедов Е. И., 2011).

Патогенез этих социально-значимых заболеваний сложен и включает большое количество патогенетических факторов. По современным данным, наиболее важным фактором является дислипидемия атерогенного характера, которая наиболее часто проявляется в виде сочетания гипертриацилглицеролемии, низкого уровня ХС-ЛПВП и высокого уровня ХС-ЛПНП (Thompson G. R., 2004; Буеверова Е. Л. и соавт., 2008; Евдокимова Г., 2009; Wang X. H. et al., 2009; Окуневич И. В. и соавт., 2010; Guo F. et al., 2011; Мельниченко Г. А. и соавт., 2012; Хавинсон В. Х. и соавт., 2014; Navar-Boggan A. M. et al., 2015). Важно подчеркнуть также, как было показано совсем недавно (Pirillo A. et al., 2014), развивающаяся при ССЗ, сахарном диабете 2 типа и ожирении постпрандиальная гипертриацилглицеролемия является одним из факторов морбидности пациентов.

В последние годы появляются данные о том, что в развитии дислипидемии и ассоциированных с ней метаболических заболеваниях существенную роль играет окислительный стресс, который сопровождается повышенной продукцией

АФК (Бабак О. Я., Топчий И. И., 2004; Беленков Ю. Н. и соавт., 2009; Шульпекова Ю. О., 2012; Иванов В. В. и соавт., 2013; Оганов О. Г., 2013; García-Ruiz I. et al., 2015). Считается, что окислительный стресс при данной группе патологий обусловлен метаболическими нарушениями, такими как гиперлипидемия и гипергликемия (Winer S. et al., 2009; Yin J. et al., 2009).

Таким образом, профилактика и лечение ССЗ, обусловленных атеросклерозом, а также НАЖБП, сахарного диабета 2 типа и других метаболических заболеваний, ассоциированных с гиперлипидемией, должны быть направлены на нормализацию метаболизма липидов. Несмотря на широкий спектр гиполипидемических препаратов на фармацевтическом рынке существует необходимость поиска и разработки новых лекарственных средств, нацеленных на разные патогенетические звенья обмена липидов (Ramsey S. et al., 2010).

1.1. Патогенетическое обоснование основных мишеней и принципов гиполипидемического действия лекарственных средств

Развитие гиперлипидемии обусловлено многими факторами. К их числу относятся как средовые (питание, физическая активность и др.), так и генетические (мутации и полиморфизмы). Систематизация данных генетических факторов выявила вовлечение более 200 генов в регуляцию метаболизма липидов и позволила установить ключевые факторы экспрессии генов, а также определить механизмы, контролирующие их активность (Колчанов Н. А. и др., 2006; Торшин И. Ю., Громова О. А., 2008; Колчанов Н. А. и др., 2013; Пальцев М. А. и соавт., 2013).

1.1.1. Метаболизм холестерина в физиологических условиях

Гомеостаз холестерина чрезвычайно сложен и регулируется через процессы поглощения, синтеза *de novo* и выведения из организма (Ru P. et al., 2013).

Поступление холестерина в клетки осуществляется путем рецептор-опосредованного эндоцитоза с участием рецепторов к ЛПНП (Колчанов Н. А. и соавт., 2006; Goldstein J. L. et al., 2006; Ikonen E., 2008; Ru P. et al., 2013). Рецепторы к ЛПНП присутствуют на плазматической мембране большинства клеток и связывают липопротеины, которые содержат аполипопротеины В и аполипопротеины Е, такие как ремнантные хиломикроны, липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП), липопротеины промежуточной плотности (ЛППП) и ЛПНП. С 1980-х годов известно, что ЛПНП связываются со своими трансмембранными рецепторами, которые находятся в клатрин-содержащих кавеолах на клеточной мембране и транспортируются в ранние сортирующие эндосомы.

Рецепторы к ЛПНП рециркулируют обратно к плазматической мембране, а сами ЛПНП доставляются в поздние эндосомы, где кислая липаза гидролизует эфиры холестерина (и ТАГ) до свободного холестерина. Затем неэтерифицированный холестерол выходит в эндосомальную систему для последующей транспортировки к плазматической мембране или эндоплазматическому ретикулуму (Ikonen E., 2008; Sato R., 2010). Высвобождение холестерина из поздних эндосом плохо изучено, несмотря на тот факт, что данный процесс ингибируется при удалении белков NPC1 и NPC2, которые обеспечивают внутриклеточный оборот холестерина. Поздние эндосомы чувствительны к внутриклеточному содержанию стеролов и к некоторым стерол-связывающим белкам, таким как MLN64 и ORP1. Некоторые Rab-ГТФазы, такие как Rab8 и Rab11 в рециркулирующих эндосомах и Rab7 и Rab9 в поздних эндосомах, также вовлечены в обогащение стеролами эндосом. Процесс высвобождения холестерина из эндосом происходит перед его доставкой в лизосомы, о чем свидетельствует накопление холестерина во внутренней мембране мультивезикулярных телец в большей степени, чем в лизосомах (Рисунок 1) (Matsuo H. et al., 2004; Kolter T., Sandhoff K., 2005; Le Blanc I. et al., 2005).

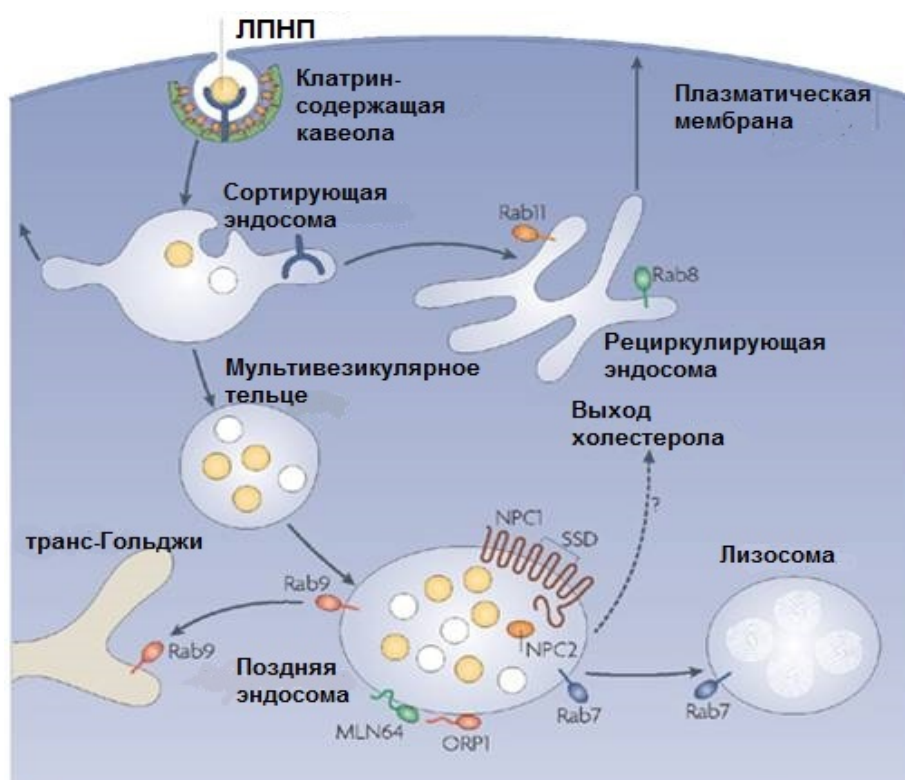


Рисунок 1. Рецептор-опосредованный пиноцитоз липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) (Ikonen E., 2008).

Примечание: SSD – стерол-чувствительный домен.

Все ядросодержащие клетки могут синтезировать холестерол из ацетил-КоА по мевалонатному пути, однако в наибольшей степени ген ключевого фермента синтеза холестерола ГМГ-КоА-редуктазы (*Hmgcr*) экспрессируется в печени (Wang Y. M. et al., 2010). Синтез холестерола протекает в цитозоле клеток и подразделяется на три основных этапа.

На первом этапе две молекулы ацетил-КоА конденсируются ферментом тиолазой с образованием ацетоацетила-КоА, затем фермент 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-синтаза (ГМГ-КоА-синтаза) присоединяет третий ацетильный остаток с образованием 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА (ГМГ-КоА). В ходе следующей реакции происходит восстановление ГМГ-КоА до мевалоната с использованием двух молекул НАДФН. Эта реакция, катализируемая ферментом ГМГ-КоА-редуктазой, является лимитирующей в метаболическом пути синтеза холестерола (Ikonen E., 2008; Sato R., 2010; Xiao X., Song B.-L., 2013).

На втором этапе синтеза холестерина *de novo* происходит превращение мевалоната в сквален через ряд последующих реакций, в ходе которых образуются промежуточные продукты: изопентенилпирофосфат, геранилпирофосфат и фарнезилпирофосфат.

На третьем этапе сквален превращается в молекулу ланостерола. Далее происходит 20 последующих реакций, в результате которых из ланостерола образуется холестерол (Рисунок 2) (Ikonen E., 2008).

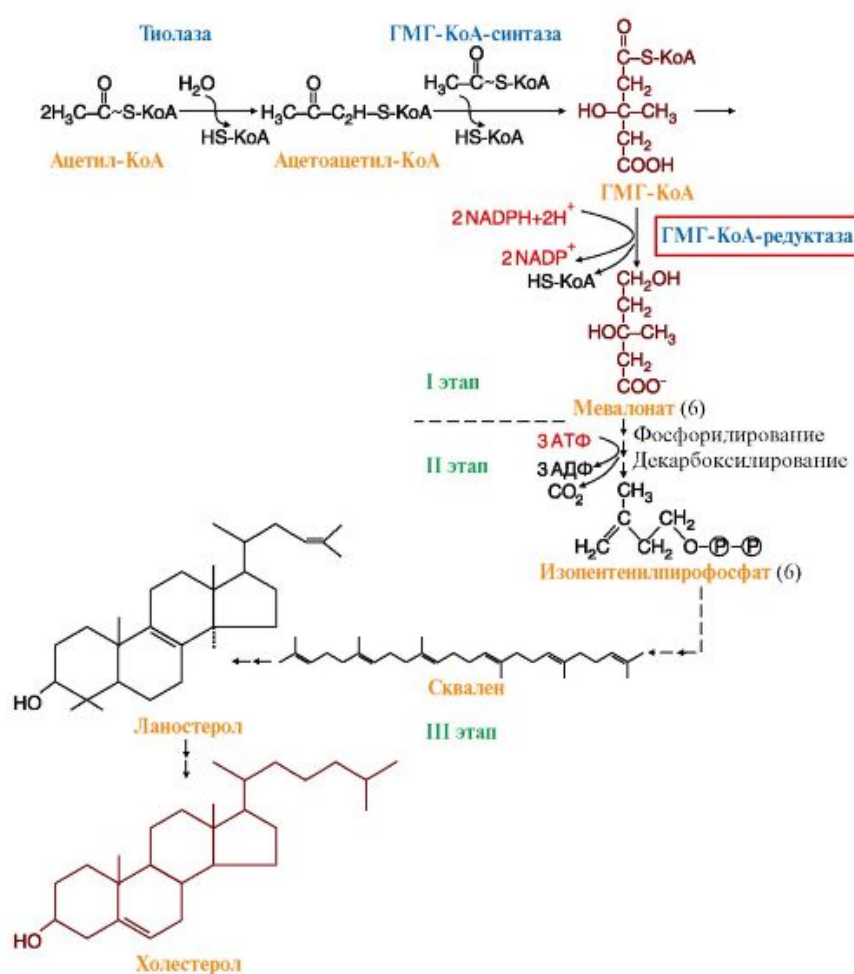


Рисунок 2. Синтез холестерина (Ikonen E., 2008).

Еще одним важным регулятором метаболизма холестерина является ген *Soat1* фермента АХАТ, который катализирует образование эфиров из холестерина (Lee M. K. et al., 2003).

Важным механизмом в поддержании гомеостаза холестерина является его выведение из организма. Печень устраняет избыток холестерина путем

непосредственной секреции его в желчь или после преобразования в желчные кислоты. Лимитирующим ферментом синтеза желчных кислот является 7 α -гидроксилаза (Chen Z. Y. . et al., 2008). Этот фермент, представляя собой одну из изоформ цитохрома P₄₅₀, катализирует реакцию гидроксилирования холестерина с образованием 7 α -гидроксихолестерола. Далее происходит восстановление двойной связи в положениях 5 и 6, окисление боковой цепи и образование двух типов желчных кислот: хенодезоксихолевой и холевой кислот (Marrapodi M., Chiang J., 2000; Gbaguidi G. F., Agellon L. B., 2004; Claudel Th. et al., 2011).

Известно, что конечные продукты метаболизма холестерина – желчные кислоты регулируют транскрипцию гена фермента 7 α -гидроксилазы (*Cyp7a1*) по механизму отрицательной обратной связи (Claudel Th. et al., 2011), в то же время у грызунов способностью регулировать экспрессию гена *Cyp7a1* обладает и сам холестерол, действуя по принципу обратной связи через ядерный фактор X-рецептор печени α (LXR α ; NR1H3) (Gbaguidi G. F., Agellon L. B., 2004; Claudel Th. et al., 2011). Это происходит за счет связывания LXR α с ретиноидным X-рецептором (RXR). Однако, в отличие от крыс и мышей у людей ген *Cyp7a1* не активируется окистеролами, поскольку промотор гена не взаимодействует с ретиноидным X-рецептором (Chiang J. Y. et al., 2001; Agellon L. B. et al., 2002).

1.1.2. Молекулярно-генетические механизмы поглощения и синтеза холестерина *de novo*

Ключевым регулятором метаболизма липидов являются транскрипционные факторы SREBPs (белки, связывающие стерол-регулирующие элементы). SREBPs активируют экспрессию более 30 генов, вовлеченных в синтез холестерина, ТАГ, жирных кислот, фосфолипидов и кофактора НАДФН, необходимого для синтеза этих липидов (Рисунок 3) (Horton J. D. et al., 2002; Ikonen E., 2008; Sato R., 2010; Xiao X., Song B.-L., 2013).

Геном млекопитающих кодирует три изоформы SREBPs: SREBP-1a, SREBP-1c и SREBP-2. SREBP-1a – важный активатор всех SREBP-респонсивных генов, включая гены, вовлеченные в синтез холестерина, жирных кислот и ТАГ. Роль SREBP-1c и SREBP-2 более узкая, чем SREBP-1a. SREBP-1c преимущественно усиливает транскрипцию генов, регулирующих синтез жирных кислот, а SREBP-2 – синтез холестерина (Рисунок 3).

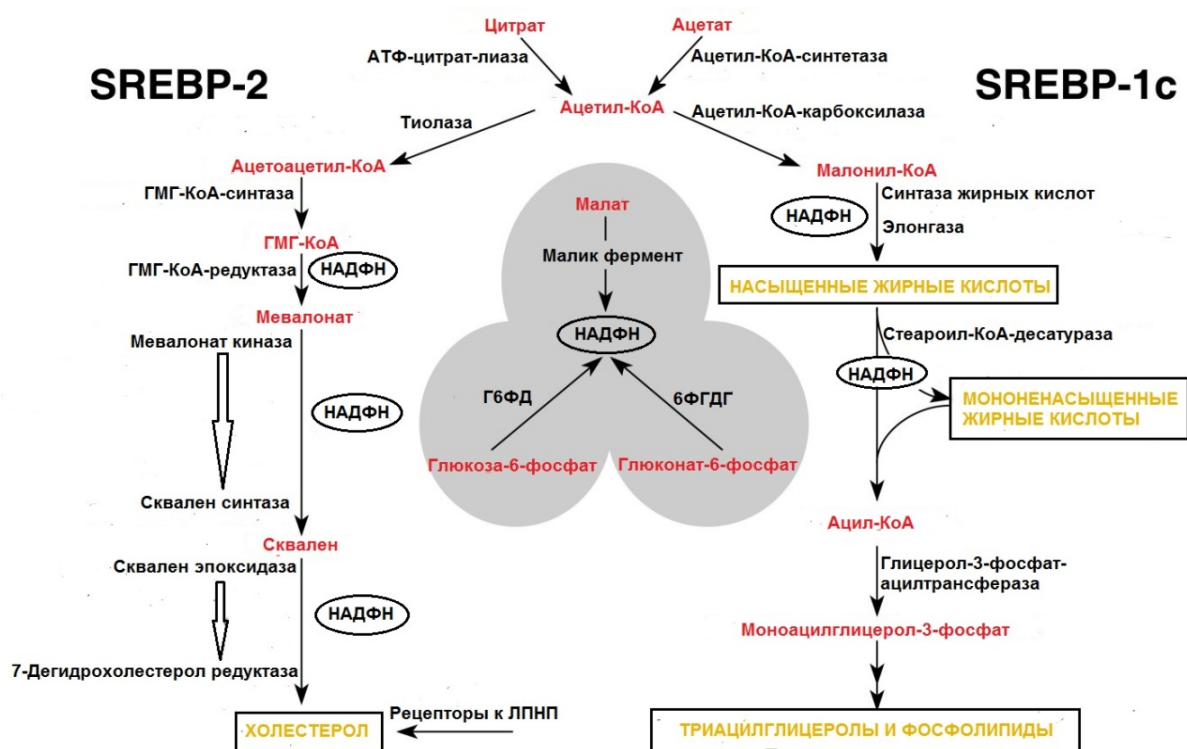


Рисунок 3. Гены, регулируемые белками, связывающими стерол-регулирующие элементы (SREBPs) (Horton J. D. et al., 2002).

Примечание: Г6ФД – глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа; 6ФГДГ – 6-фосфоглюконатдегидрогеназа.

Транскрипционные факторы SREBP-1a и SREBP-2 преобладают в большинстве культивируемых клеточных линиях, в то время как SREBP-1c и SREBP-2 доминируют в печени и в других тканях (Horton J. D. et al., 2002; Sato R., 2010). К SREBP-2-респонсивным генам биосинтеза холестерина относятся гены ферментов АТФ-цитрат-лиазы, ГМГ-КоА-синтазы, ГМГ-КоА-редуктазы, фарнезил-дифосфат синтазы и сквален-синтазы. SREBP-1c-респонсивные гены – это ацетил-КоА-синтетаза, продуцирующая ацетил-КоА, ацетил-КоА-карбоксилаза и синтаза жирных кислот, которые синтезируют пальмитат (C16:O). SREBP-1c кодирует также лимитирующий фермент синтеза жирных кислот

элонгазу, которая превращает пальмитат в стеарат (C18:O) (Moon Y.-A. et al., 2001), стеароил-КоА-десатуразу, превращающую стеарат в олеат (C18:O1) и глицерол-3-фосфат ацилтрансферазу (первый фермент на пути синтеза ТАГ и фосфолипидов) (Edwards P. A. et al., 2000). Кроме того, SREBP-1с и SREBP-2 активируют три гена, необходимых для продукции НАДФН, который идет на синтез липидов (Рисунок 3) (Horton J. D. et al., 2002).

Таким образом, транскрипционный фактор SREBP-1с регулирует метаболизм жирных кислот через гены ацетил-КоА-карбоксилазы (*ACC*) и синтазу жирных кислот (*FAS*) (Sato R., 2010; Xiao X., Song B.-L., 2013), а SREBP-2 в большей степени отвечает за гены, вовлеченные в синтез холестерина, такие как ГМГ-КоА-редуктаза (*Hmgcr*) и ген рецептора к ЛПНП (*Ldlr*) (Ikonen E., 2008; Moore K. J. et al., 2010).

Регуляция SREBPs осуществляется на двух уровнях – транскрипционном и посттранскрипционном. Посттранскрипционная регуляция связана со стерол-опосредованной супрессией перехода комплекса SCAP/SREBP из эндоплазматического ретикулума в аппарат Гольджи (Horton J. D. et al., 2002). Сначала транскрипционный фактор SREBP нарабатывается в клетке в форме неактивного предшественника pre-SREBP, который после синтеза накапливается в мембранах эндоплазматического ретикулума в комплексе со SCAP (белком, активирующим расщепление SREBP). Скорость перехода предшественника pre-SREBP в активную форму SREBP зависит от уровня холестерина. В условиях, когда уровень холестерина низкий, белок SCAP связывается с pre-SREBP, и комплекс SCAP–SREBP транспортируется в аппарат Гольджи, где происходит протеолитическое расщепление молекулы pre-SREBP с образованием SREBP.

Таким образом, активный SREBP проникает в ядро клетки, связывается со стерол-регуляторным элементом (SRE) и активирует экспрессию генов фермента ГМГ-КоА-редуктазы и рецепторов к ЛПНП (Колчанов Н. А. и др., 2013; Xiao X., Song B.-L., 2013). При повышении уровня холестерина в клетке выше нормы SCAP связывается с холестерином в эндоплазматическом ретикулуме, что приводит к связыванию с мембранным белком Insig. Комплекс Insig/SCAP/SREBP

прочно связывается с мембраной эндоплазматического ретикулума и это блокирует транспорт комплекса SCAP–SREBP в аппарат Гольджи, что приводит к снижению синтеза холестерина и жирных кислот (Рисунок 4) (Ikonen E., 2008; Motamed M. et al., 2011).

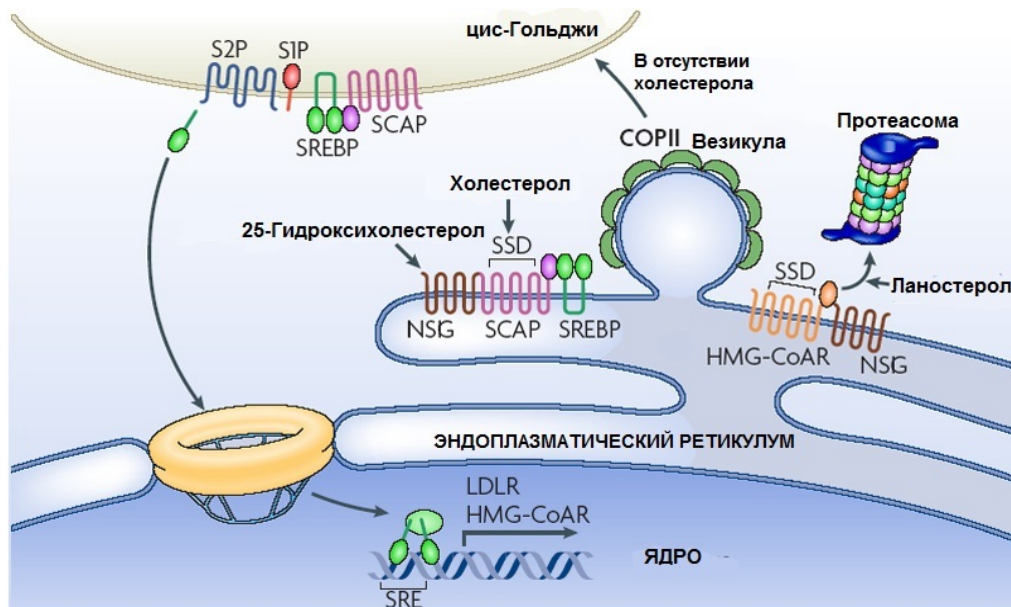


Рисунок 4. Регуляция метаболизма холестерина белком, связывающим стерол-регулирующий элемент (SREBP) [Ikonen E., 2008].

Примечание: COPII-покрытая везикула; HMG-CoAR – ген ГМГ-КоА-редуктазы; Ldlr – ген рецептора к липопротеинам низкой плотности; SCAP – белок, активирующий расщепление SREBP; S1P – участок 1 протеазы; S2P – участок 2 протеазы; SSD – стерол-чувствительный домен.

Insig, являясь резидентным белком мембраны эндоплазматического ретикулума, кроме задержки комплекса SCAP–SREBP в мембране ретикулума, регулирует деградацию ГМГ-КоА-редуктазы по принципу отрицательной обратной связи (Burg J. S., Espenshade P. J., 2011). В условиях низкого уровня холестерина в клетке Insig диссоциирует от *Hmgcr* и стабилизирует ее от убиквитинирования и дальнейшей деградации (Xiao X., Song B.-L., 2013).

Активация экспрессии гена рецепторов к ЛПНП (*Ldlr*) приводит к поглощению ЛПНП, в результате чего снижается уровень холестерина в плазме крови. Показано, что у трансгенных мышей с гиперэкспрессией SREBP в печени отмечаются более низкие значения холестерина и ТАГ в плазме крови по сравнению с таковыми у контрольных мышей, не смотря на то, что у этих мышей активно синтезируются жирные кислоты и холестерол. Это как раз и объясняется

тем, что наряду с синтезом липидов, активируется экспрессия гена *Ldlr*. В результате этого гепатоциты захватывают ЛПНП с помощью рецепторов, и уровень липидов в плазме крови понижается. У *Ldlr*-дефицитных мышей, трансгенных по *nSREBP-1a*, напротив, регистрируется 10-кратное увеличение уровней холестерина и ТАГ в плазме крови (Horton J. D., 2002).

Транскрипционная регуляция SREBPs намного сложнее. Одним из механизмов регуляции *SREBP-1c* и *SREBP-2* является регуляторный блок, который опосредуется присутствием стерол-регуляторных элементов в энхансерах/промоторах каждого гена. Через этот регуляторный блок *nSREBPs* активируют транскрипцию своих собственных генов (Horton J. D. et al., 2002).

Еще одним важным регулятором гомеостаза холестерина является X-рецептор печени, который регулирует SREBP на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях (Ru P. et al., 2013; Xiao X., Song B.-L., 2013). LXR состоит из двух ядерных рецепторов – $LXR\alpha$ и $LXR\beta$, которые образуют гетеродимеры с ретиноидным X-рецептором и активируются через оксистеролы (Ru P. et al., 2013). LXR способствует транскрипции SREBP в большей степени, поскольку на промоторе гена *SREBP-1c* имеются два LXR-респонсивных элемента (LXREs) (Yoshikawa T. et al., 2001), в то время как на других таргетных генах X-рецептора печени, таких как *ABCI* (АТФ-связывающего кассетного транспортера подсемейства A), *CETP* (белка, переносящего эфиры холестерина в плазме) и *CYP7A* (семейства цитохрома P₄₅₀ подсемейства 7), имеется только один единственный LXRE. Действительно, агонисты LXR или RXR могут значительно увеличивать транскрипцию *SREBP-1c* и индуцировать синтез жирных кислот, даже в условиях избыточного количества стеролов (Ye J., DeBose-Boyd R. A., 2011). В экспериментах *in vivo* и *in vitro* показано, что такие лиганды, как ненасыщенные жирные кислоты, ингибируют связывание гетеродимера $LXR\alpha/RXR\alpha$ с LXR-респонсивными элементами в промоторе гена *SREBP-1c* и это приводит к уменьшению уровня мРНК и снижению биосинтеза липидов (Horton J. D. et al., 2002; Xiao X., Song B.-L., 2013).

Наряду с активацией гена *SREBP-1c*, X-рецептор печени может вызывать снижение уровня рецепторов к ЛПНП. Этот эффект выявляется при действии агониста GW3965. В результате этого происходит деградация рецепторов к ЛПНП через индукцию E3 убиквитинлигазы (по Idol-зависящему пути) (Рисунок 5) (Guo D. et al., 2011; Zelcer N. et al., 2009).

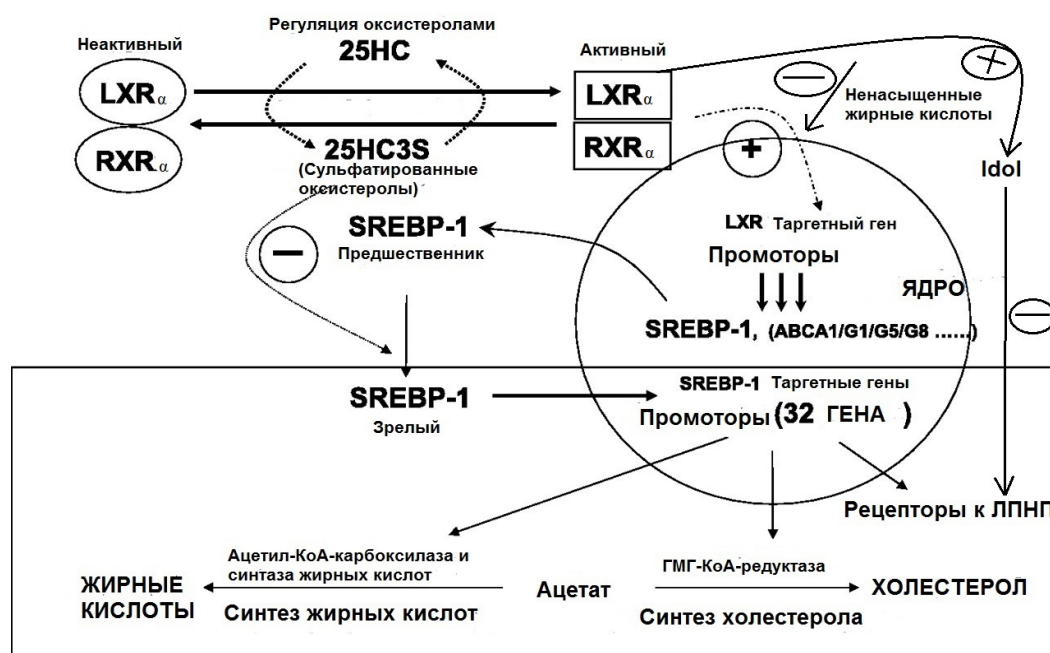


Рисунок 5. Эффект X-рецептора печени (LXR) на транскрипционный фактор SREBP (Ru P. et al., 2013; Xiao X., Song B.-L., 2013).

Примечание: ABCA, G – АТФ-связывающий кассетный транспортер подсемейства А и G; LXR – X-рецептор печени; RXR – ретиноидный X-рецептор; 25HC – 25-гидроксихолестерол; SREBP – белок, связывающий стерол-регуляторный элемент.

Таким образом, активация X-рецептора печени стимулирует: 1) экспрессию SREBPs, вызывая синтез жирных кислот и холестерина; 2) экспрессию ABCA1, способствуя высвобождению холестерина из гепатоцитов; 3) снижение уровня рецепторов к ЛПНП через активацию деградации рецепторов по Idol-зависящему пути.

Резюмируя вышесказанное, можно утверждать, что биосинтез и поглощение холестерина гепатоцитами контролируется по принципу отрицательной обратной связи. Когда клетки накапливают избыточное количество стеролов, активность ГМГ-КоА-редуктазы уменьшается и количество рецепторов к ЛПНП также снижается. И, напротив, при уменьшении внутриклеточного содержания

холестерола гепатоциты поддерживают высокую активность этого фермента и экспрессируют большое количество рецепторов к ЛПНП на своей поверхности. К тому же, поскольку в печени идет синтез желчных кислот из холестерина, то и сами желчные кислоты подавляют активность гена ГМГ-КоА-редуктазы, выступая в роли регуляторов этого гена. Все эти данные указывают на то, что биосинтез холестерина – это сложный процесс, который контролируется как на транскрипционном уровне (через SREBPs, LXR транскрипционные факторы), так и на посттранскрипционном уровне (через процессы фосфорилирования/дефосфорилирования) (Goldstein J. L. et al., 2006).

1.1.3. Молекулярно-генетическая регуляция синтеза жирных кислот и триацилглицеролов

Биосинтез жирных кислот начинается с карбоксилирования ацетил-КоА и превращения его в малонил-КоА, который является важным предшественником синтеза жирных кислот. Ключевым ферментом этой реакции является ацетил-КоА-карбоксилаза, которая ковалентно связана с биотином. Активность фермента ацетил-КоА-карбоксилазы определяет скорость всех последующих реакций синтеза жирных кислот, а малонил-КоА играет важную роль в регуляции β -окисления жирных кислот в митохондриях за счет ингибирования фермента карнитин-пальмитоилтрансферазы 1 (Munday M. R., Hemingway Ch. J., 1999).

Экспрессия генов, продукты которых участвуют в регуляции уровня жирных кислот и ТАГ, контролируется транскрипционными факторами SREBP-1c, PPAR γ и LXR α (Shimano H., 2002; Колчанов Н. А. и соавт., 2006; Sato R., 2010; Xiao X., Song B.-L., 2013). Как было упомянуто выше, транскрипционные факторы SREBP синтезируются в виде неактивных предшественников pre-SREBP. Далее, в результате процессинга происходит созревание SREBP до активной формы. Этот процесс зависит от уровня холестерина и находится под контролем

белков Insig (Колчанов Н. А. и соавт., 2006). Среди транскрипционных факторов этого семейства SREBP-1c контролирует синтез жирных кислот и ТАГ через такие таргетные гены ферментов, как синтаза жирных кислот (*FAS*) и ацетил-КоА-карбоксилаза (*ACC*) (Horton J. D. et al., 2002; Колчанов Н. А. и соавт., 2006; Mihaylova M. M., Shaw R. J., 2012; Xiao X., Song B.-L., 2013). SREBP-1c сам способен активировать экспрессию транскрипционного фактора PPAR γ , относящегося к семейству рецепторов, активируемых пероксисомными пролифераторами (Колчанов Н. А. и соавт., 2006). Этот транскрипционный фактор активируется лигандами, такими как жирные кислоты и некоторыми лекарственными веществами, например, фибратами, флавоноидами (De Filippis B. et al., 2011; Wei T. et al., 2014).

Повышение внутриклеточного уровня жирных кислот в результате активации биосинтеза *de novo* и/или поступления в клетку усиливает экспрессию генов, регулируемых факторами PPAR γ (в адипоцитах) и PPAR α (в гепатоцитах) (Sanguino E. et al., 2004; De Filippis B. et al., 2011; Pawlak M. et al., 2015), таких как LXR α и INSIG-1, которые контролируют экспрессию транскрипционного фактора SREBP-1c (Repa J. et al., 2000; Juvet L. et al., 2003). С другой стороны, PPAR γ активирует экспрессию транспортных белков FATP и CD36, которые переносят жирные кислоты из внеклеточного пространства и активируют ген ключевого фермента глицеронеогенеза в адипоцитах фосфоенолпируват-карбоксилазу (*PEPCK-C*). Таким образом, при активации PPAR γ эндогенный синтез жирных кислот снижается и одновременно активируется система генов, контролирующая поступление свободных жирных кислот в клетки и депонирование их в форме ТАГ (Колчанов Н. А. и соавт., 2006).

Биосинтез жирных кислот контролируется и процессами фосфорилирования/дефосфорилирования (Munday M. R., Hemingway Ch. J., 1999). В последнее время активно изучают роль АМФ-активируемой протеинкиназы (АМФК) в регуляции метаболизма жирных кислот. АМФК непосредственно фосфорилирует ГМГ-КоА-редуктазу и ацетил-КоА-карбоксилазу, что приводит к ингибированию данных ферментов. Кроме того, АМФК фосфорилирует SREBP-

1, что вызывает стойкое ингибирование ACC1 и ACC2 (Mullen P. J., 2011; Mihaylova M. M., Shaw R. J., 2012). Известно, что АМФК фосфорилирует и транскрипционный фактор, чувствительный к глюкозе, ChREBP, который контролирует экспрессию генов липогенеза, находящихся под контролем SREBP-1 (Kawaguchi T. et al., 2002; Dentin R. et al., 2005).

1.1.4 Молекулярно-генетическая регуляция катаболизма жирных кислот

Катаболизм жирных кислот происходит в матриксе митохондрий и называется β -окислением. Эта реакция протекает только в аэробных условиях и заканчивается образованием ацетил-КоА (Bonnetfont J.-P. et al., 2004). Жирные кислоты с длинной углеводородной цепью переносятся через внутреннюю мембрану митохондрий с помощью карнитина. На внешней мембране митохондрий находится фермент карнитин-пальмитоилтрансфераза I, которая катализирует реакцию с образованием ацилкарнитина. Образовавшийся ацилкарнитин проходит через межмембранное пространство к наружной стороне внутренней мембраны и транспортируется с помощью карнитинацилкарнитинтранслоказы на внутреннюю поверхность внутренней мембраны митохондрий, где фермент карнитин-пальмитоилтрансфераза II катализирует перенос ацила на внутримитохондриальный КоА. После этого ацил-КоА включается в реакции β -окисления жирных кислот (Linden D., 2002; Bonnetfont J.-P. et al., 2004; Wei T. et al., 2014; De Filippis B. et al., 2015).

Несмотря на многочисленные факторы, контролирующие экспрессию генов карнитин-пальмитоилтрансферазы, главными регуляторами считаются PPARs (Bonnetfont J.-P. et al., 2004; Sanguino E. et al., 2004; De Filippis B. et al., 2011, 2015; Park J. S. et al., 2015).

Семейство PPARs включает три изоформы: PPAR α (NR1C1), PPAR γ (NR1C3) и PPAR δ/β (NR1C2), которые кодируются разными генами (Pawlak M. et

al., 2015). Транскрипционные факторы PPARs поддерживают гомеостаз липидов и глюкозы и контролируют гены, вовлеченные в их метаболизм (Robinson E., Grieve D. J., 2009). PPARs образуют гетеродимеры с другими транскрипционными факторами, такими как ретиноидный X-рецептор и соответствующими ответными элементами (PPRE) (De Filippis B. et al., 2015; Pawlak M. et al., 2015).

Таким образом, в присутствии лигандов к PPARs усиливается β -окисление жирных кислот в матриксе митохондрий за счет повышения экспрессии ферментов карнитин-пальмитоилтрансферазы I и II (Рисунок 6) (Pawlak M. et al., 2015).

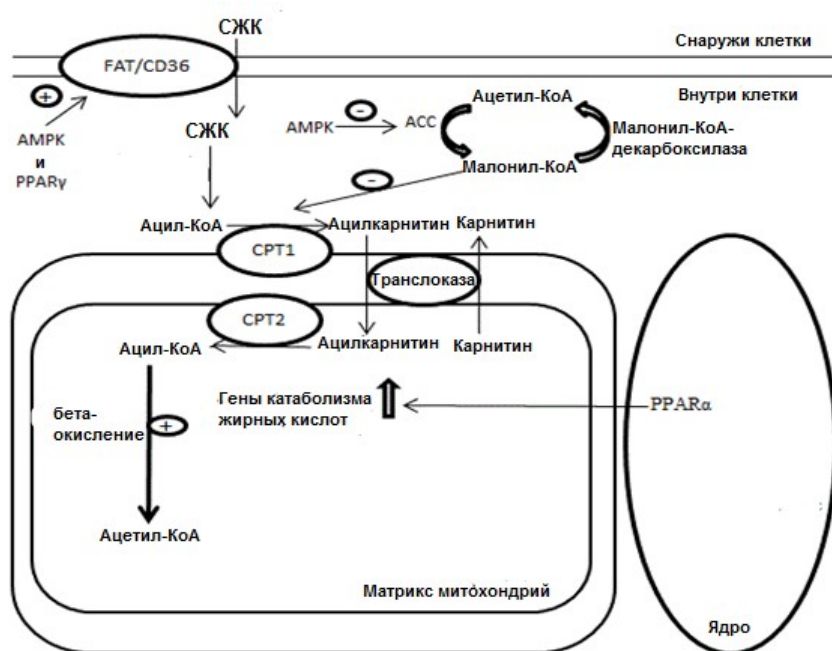


Рисунок 6. Регуляция биосинтеза и катаболизма жирных кислот рецепторами, активируемыми пероксисомными пролифераторами (PPARs) и АМФ-активируемой протеинкиназой (АМРК).

Примечание: ACC – ацетил-КоА-карбоксилаза; CPT1 и CPT2 – карнитин-пальмитоилтрансфераза I и II; FAT/CD36 – транспортный белок жирных кислот.

Резюмируя сказанное, можно утверждать, что для поиска мишеней и вскрытия механизма действия гиполипидемических лекарственных средств необходимо исследовать экспрессию мРНК ключевых генов метаболизма холестерина, а именно гена *Hmgcr* – фермента синтеза холестерина (ГМГ-КоА-редуктазы), гена *Ldlr* – рецептора к ЛПНП, гена *Soat1* – фермента синтеза эфиров холестерина (ацилКоА: холестеролацилтрансферазы) и гена *Cyp7a1* – фермента

работа с ними не обременена этическими ограничениями (Макаров М. С., 2013; Takahashi J. et al., 2013). Клетки используют как для фундаментальных исследований, так и для разработки тест-систем, эксперименты на которых дают первичное представление об эффективности и токсичности вещества, а также способствуют снижению сроков и себестоимости разработки лекарственных средств (Сенявина Н. В. и соавт., 2013).

Одним из подходов моделирования экспериментальной гиперлипидемии *in vitro* является культивирование клеток с жирными кислотами в комплексе с альбумином (Joshi-Barve S. et al., 2007; Kojima K. et al., 2011; Niu Yu. et al., 2012). Добавление жирных кислот в инкубационную среду к клеткам приводит к накоплению в них ТАГ, холестерина и сопровождается развитием окислительного стресса (Wang X. H. et al., 2009; Garcia-Ruiz I. et al., 2015). Однако такой подход не применим *in vivo*, поскольку для увеличения содержания жирных кислот в плазме крови необходимо внутривенное введение, которое может привести к высокой локальной концентрации жирных кислот (в месте инъекции) и вызвать гемолиз эритроцитов. Кроме того, инъекция жирных кислот в связанной с альбумином форме чревата опасностью введения в кровяное русло чужеродного белка. В связи с этим повышение содержания жирных кислот в плазме крови вызывают введением ТАГ, которые под действием липопротеинлипазы способствуют высвобождению жирных кислот (Ньюсхолм Э., Старт К., 1977). Поэтому другим подходом моделирования экспериментальной гиперлипидемии *in vitro* и *in vivo* является введение жировой эмульсии липофундина (Plan E. et al., 2005, Tirosh O. et al., 2009; Delgado Roche L. et al., 2010; 2012).

Липофундин МСТ/ЛСТ – это жировая эмульсия для парентерального питания, которая содержит соевое масло, среднецепочечные ТАГ, фосфатиды яичного желтка, глицерол и токоферол. В состав соевого масла входят нейтральные ТАГ, состоящие преимущественно из ненасыщенных жирных кислот. Среднецепочечные триацилглицеролы являются смесью нейтральных ТАГ, содержащих в основном каприловую (около 60 %) и каприковую (около 40 %) кислоты (Burrin D. G. et al., 2014).

Культивирование первичных гепатоцитов и клеточной культуры гепатокарциномы крыс линии FaO с жировой эмульсией липофундином приводит к повышению содержания липидов в клетках (Plan E. et al., 2005, Tirosh O. et al., 2009). Н. Jellinek с коллегами еще в 1982 году продемонстрировали, что введение липофундина приводит к образованию атеросклеротических бляшек у кроликов, а L. Delgado Roche и соавторы (2012) подтвердили, что введение липофундина кроликам и крысам стимулирует увеличение ХС, ТАГ, ХС-ЛПНП и ХС-ЛПВП (Delgado Roche L. et al., 2012). Исследователи S. Hailer и G. Wolfram (1986) показали, что жировая эмульсия липофундина вызывает гипертриацилглицеролемию у людей (Gura K. et al., 2007; Delgado Roche L., 2012). Гиперлипидемия развивается за счет увеличения содержания ТАГ и холестерина, а также снижения уровня неатерогенных ЛПВП (Riemens S. C. et al., 1999). Высокое содержание экзогенных ТАГ способствуют синтезу холестерина, ApoB100 и образованию ЛПОНП. В действительности, липофундин в концентрации 10 % вызывает у людей после парентерального питания увеличение общего холестерина на 60 % (Delgado Roche L. et al., 2012).

Введение липофундина способствует также развитию окислительного стресса (Delgado Roche L. et al., 2012, Plan E. et al., 2005, Tirosh O. et al., 2009). У крыс, принимавших липофундин, был зарегистрирован высокий уровень малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови. Повышение уровня МДА является не только маркером окислительного стресса, но также биохимическим маркером развития атеросклероза и других заболеваний, ассоциированных с высоким содержанием сывороточных липидов (Delgado L. et al., 2010). Обращает на себя внимание также, что у крыс увеличивалась активность супероксиддисмутазы, каталазы и содержание окисленных белков, что указывает на образование АФК и развитие окислительного стресса в организме (Delgado Roche L. et al., 2012). Продукция АФК, индуцированная введением липофундина, приводит к истощению антиоксидантных систем, повреждению клеток и развитию окислительного стресса. Действительно, введение липофундина кроликам приводит к существенному снижению содержания глутатиона в

сыворотке крови, что подтверждает снижение антиоксидантной активности (Delgado Roche L. et al., 2012, Maiese K. et al., 2010).

О. Tirosh с коллегами (2009) в экспериментах *in vitro* показали, что гибель клеток гепатокарциномы при добавлении липофундина в культуральную среду связана с повышением уровня внутриклеточных АФК (Tirosh O. et al., 2009). Высокий уровень АФК приводит к гибели клеток путем некроза или апоптоза (Han D. et al., 2006). Возможными механизмами, с помощью которых АФК могут истощать антиоксидантный потенциал клеток и вызывать дисфункцию митохондрий являются повышение активности НАДФН оксидазы, пероксисом и цитохрома P450 (Finkel T., Holbrook N. J., 2000). Действительно, на клеточной культуре гепатокарциномы было показано, что добавление в культуральную среду ротенона (ингибитора митохондриального комплекса I) или дифенилгидонииума (ингибитора НАДФН оксидазы) приводит к существенному снижению уровня АФК, индуцированных липофундином (Tirosh O. et al., 2009). Известно также, что липофундин вызывает некроз клеток за счет уменьшения содержания негистонового хромосомного белка (HMGB1) (Tirosh O. et al., 2009), который является маркером клеток, погибающих путем некроза (Scaffidi P. et al., 2002; Rovere-Querini P. et al., 2004).

Таким образом, при введении липофундина формируется порочный круг. Липофундин индуцирует внутриклеточное образование АФК (Delgado Roche L. et al., 2012, Han E. et al., 2005, Tirosh O. et al., 2009), а продукция АФК в митохондриях может способствовать накоплению ТАГ и развитию стеатоза печени за счет активации SREBP транскрипционных факторов через PI3K-Akt сигнальный путь (Kohli R. et al., 2007; Ru P. et al., 2013). Данные результаты указывают на потенциальный механизм гиперлипидемического действия липофундина.

Повреждающий эффект ТАГ, который они оказывают на функцию митохондрий, удивителен, поскольку происходит истощение аденозинтрифосфата (АТФ), хотя липиды являются источником энергии. Следует учесть также, что

снижение уровня АТФ за счет окислительного стресса способствует развитию некроза клеток (Kim J. S. et al., 2003).

В экспериментах *in vitro* было показано, что добавление липофундина в инкубационную среду к клеткам линии FaO приводит к фосфорилированию АМФК (Tirosh O. et al., 2009), которая чувствительна к повышению соотношения АДФ/АТФ (Luiken J. J. et al., 2003). АМФК входит в семейство серин/треонин протеиновых киназ и является триггером катаболических путей и ингибитором анаболических процессов, требующих расхода АТФ (Залевская А. Г., Патракеева Е. М., 2008), таких как синтез жирных кислот, ТАГ и холестерина (Mihaylova M. M., Shaw R. J., 2012). Активация АМФК приводит к уменьшению содержания предшественника биосинтеза жирных кислот малонил-КоА вследствие инактивации ацетил-КоА-карбоксилазы и активирования малонил-КоА-декарбоксилазы. Кроме того, введение крысам липофундина в течение 6-ти дней приводит к уменьшению экспрессии мРНК генов *SREBP1c* и *ACCα* в печени (Anavi S. et al., 2010).

Таким образом, введение липофундина приводит к фосфорилированию АМФ-активируемой протеинкиназы, которая, в свою очередь, инактивирует ферменты ацетил-КоА-карбоксилазу и ГМГ-КоА-редуктазу, в результате чего уменьшается уровень малонил-КоА и блокируется эндогенная продукция жирных кислот, ТАГ и холестерина гепатоцитами (Рисунок 8) (Anavi S. et al., 2010). В то же время в экспериментах *in vivo* и *in vitro* показано, что введение липофундина приводит к накоплению ТАГ в гепатоцитах. Это обусловлено активацией SREBP транскрипционных факторов через PI3K-Akt сигнальный путь (Kohli R. et al., 2007; Ru P. et al., 2013) и поступлением ТАГ в клетки из жировой эмульсии путем пиноцитоза или диффузии (Рисунок 8) (Tirosh O. et al., 2009). В подтверждение последнего показано, что добавление в культуральную среду ингибитора липазы (параоксона) не уменьшает накопление липидов в клетках и не препятствует ему (Tirosh O. et al., 2009).

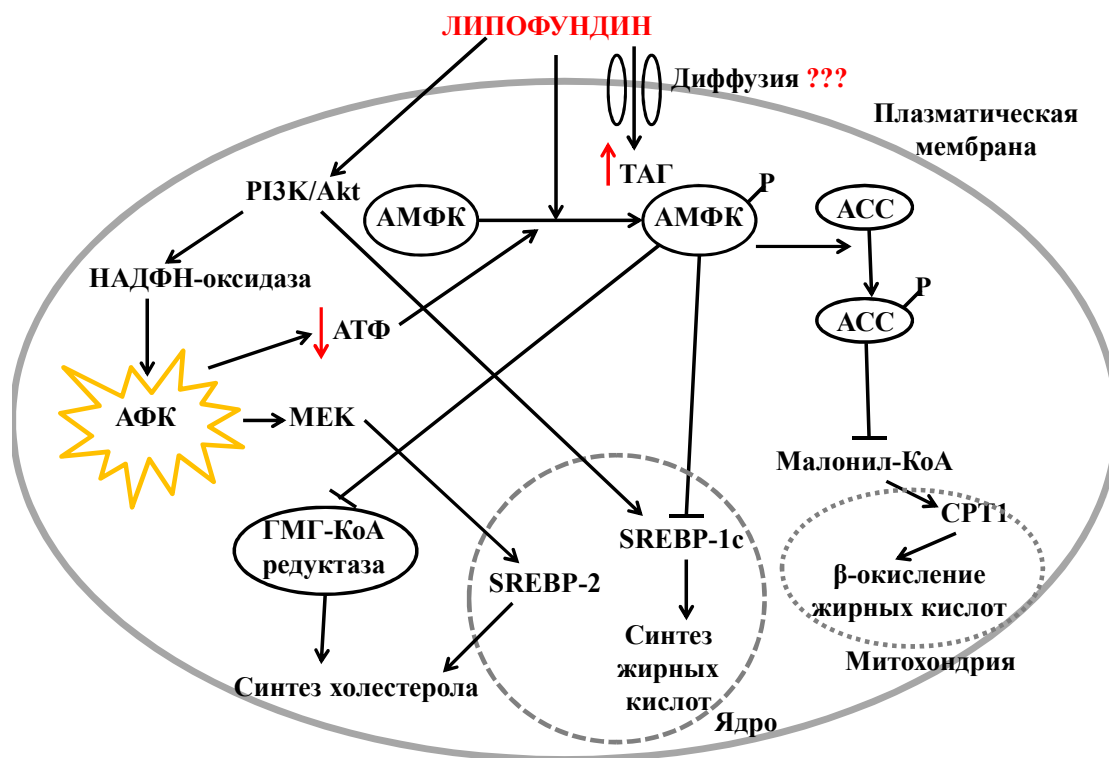


Рисунок 8. Липофундин-опосредованное развитие гиперлипидемии и окислительного стресса в клетках *in vitro*.

Примечание: АТФ – аденозинтрифосфат; АФК – активные формы кислорода; ТАГ – триацилглицеролы; АМФК – АМФ-активируемая протеинкиназа; АМФК-Р – фосфорилированная АМФ-активируемая протеинкиназа; АСС – ацетил-КоА-карбоксилаза; АСС-Р – фосфорилированная ацетил-КоА-карбоксилаза; СРТ1 – карнитин-пальмитойлтрансфераза 1; MEK – митоген-активируемая протеинкиназа/киназа, регулируемая экстраклеточным сигналом (MAPK/ERK); PI3K/Akt – фосфоинозитол-3-киназа/протеинкиназа B; SREBP – белок, связывающий стерол-регуляторный элемент; → активация; —| ингибирование.

Исходя из вышеизложенного, можно заключить, что моделирование экспериментальной гиперлипидемии и окислительного стресса *in vitro* путем добавления жировой эмульсии липофундина в культуральную среду является адекватной моделью для исследования гипOLIпидемической активности лекарственных средств.

В организме человека и животных лекарства подвергаются абсорбции, распределению, метаболизму и экскреции (принцип АРМЭ). Эти процессы определяют концентрацию лекарства в кровотоке и тканях с течением времени (Сенявина Н. В. и соавт., 2013). Инкубирование клеток в культуральных флаконах не создает микроокружение, аналогично таковому в целом организме, которое

участвует в процессах АРМЭ (Esch M. B. et al., 2011). Поэтому следующей стадией после тестирования лекарственного вещества на клеточных культурах являются испытания на животных. Выделяют модели острой и хронической гиперлипидемии *in vivo* (Миронов А. Н., 2012).

Острую гиперлипидемию у животных моделируют однократным внутривенным введением детергентов тритона WR 1339 или твина 80 (Окуневич И. В. и соавт., 2010). Данная модель характеризуется мощным развитием гиперлипидемии у крыс. На поверхности ЛПОНП образуется слой, препятствующий образованию энзимо-субстратного комплекса с липопротеинлипазой. Это препятствует утилизации липопротеинов, богатых ТАГ, и способствует их накоплению в крови экспериментальных животных (Хабриев Р. У., 2005; Короленко Т. А. и др., 2010; Окуневич И. В. и соавт., 2010). Наряду с этим детергент вызывает внутрипеченочный холестаз вследствие резкого увеличения синтеза холестерина в печени за счет активации ГМГ-КоА-редуктазы (Окуневич И. В. и соавт., 2010), повышает экспрессию рецепторов, участвующих в метаболизме ЛПНП (Millar J. S. et al., 2005), уменьшает клиренс липопротеинов (Короленко Т.А. и соавт., 2010). Тритоновая модель гиперлипидемии характеризуется значительным увеличением концентрации проатерогенных фракций и субфракций липопротеинов и является адекватной для изучения влияния гиполипидемических средств (Логинова В. М., 2011).

Другим подходом к моделированию острой гиперлипидемии является однократное введение перорально крысам и мышам 40-50 %-го раствора этанола (5-6 г/кг) (Sapronov N. S. et al., 2006). Этанол стимулирует выработку адреналина надпочечниками, что приводит к резкой активации липолиза с последующим повышением уровня жирных кислот в крови и усиленному депонированию ТАГ в печени (Хабриев Р. У., 2005; Окуневич И. В. и соавт., 2010). В то же время увеличение концентрации ТАГ в печени при введении этилового спирта обусловлено в большей степени и снижением окисления жирных кислот в митохондриях. Известно, что при метаболизме этанола образуется большое количество НАДН, который ингибирует активность ферментов цикла

трикарбоновых кислот и окисление свободных жирных кислот, что приводит к развитию гиперлипидемии [Yao P. et al., 2007; Dahiru D., Obidoa O., 2009].

Спектры липидов и липопротеинов экспериментальных животных разных видов отличаются друг от друга. У морских свинок почти весь холестерол находится в атерогенных липопротеинах, а у крыс – в антиатерогенных ЛПВП, поэтому крысы более устойчивы к индукции экспериментальной гиперлипидемии (Окуневич И. В. и соавт., 2010).

Для изучения гиполипидемической активности новых лекарственных веществ широко используется модель хронической гиперлипидемии с помощью длительного (от 2 недель до 3 месяцев) кормления экспериментальных животных высокожировой пищей, богатой холестеролом (Миронов А. Н., 2012). Для создания данной модели у крыс необходимо к диете, содержащий холестерол, добавлять тиреоидсупрессорный агент – 6-метил тиюрацил (Окуневич И. В. и соавт., 2010).

Наиболее часто для моделирования гиперлипидемии у грызунов применяют диету, основанную на высоком содержании в пище насыщенных жирных кислот и холестерола. Содержание жира в пище варьирует от 20 до 60 %. Жиры представлены жирами животного (говяжье, свиное сало) и растительного (оливковое, кокосовое масло) происхождения. Такая диета приводит к увеличению массы тела, нарушению толерантности к глюкозе, способствует повышению содержания циркулирующего в сыворотке ХС-ЛПНП. Для ускорения развития гиперхолестеролемии к жировой диете добавляют холевую кислоту (0,1–0,5 %). Холевая кислота способствует всасыванию холестерола и других жиров и по механизму обратной связи подавляет образование желчных кислот из холестерола (Окуневич И. В. и соавт., 2010).

Разработанная диета позволяет выявить у новых соединений не только гиполипидемический эффект, но и определить степень липидоза аорты, индекс атерогенности, позволяющий оценить защитные свойства лекарственных средств (Sapronov N. S. et al., 2006).

Таким образом, использование традиционных тест-систем, таких как клеточные линии *in vitro*, и проведение исследований на моделях острой и хронической гиперлипидемии *in vivo* позволяет выявить вещества с потенциальной гиполипидемической активностью и установить их механизмы.

1.3. Терапия гиперлипидемии: современные подходы

1.3.1 Современные гиполипидемические средства

В настоящее время для терапии гиперлипидемий используют достаточно большое количество лекарственных средств, обладающих различными механизмами действия. Наиболее эффективным подходом к решению проблемы профилактики и лечения гиперлипидемии является использование лекарственных средств, способных снижать уровень холестерина, общих липидов и нормализовать спектр липидов крови (Хабриев Р. У., 2005).

Согласно Всемирной организации здравоохранения, гиполипидемические препараты классифицируются: 1) статины (ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы); 2) фибраты; 3) секвестранты желчных кислот; 4) производные никотиновой кислоты; 5) препараты с другими механизмами действия; 6) различные комбинации ингибиторов ГМГ-КоА-редуктазы и других лекарственных средств (Таблица 1) (ВОЗ, 2016).

Однако, несмотря на широкий спектр синтетических гиполипидемических препаратов на фармацевтическом рынке, проблема профилактики и терапии атеросклероза, ассоциированных с ним ССЗ, а также НАЖБП, сахарного диабета 2 типа, метаболического синдрома не решена (Ramsey S. et al., 2010). К тому же некоторые препараты из данного класса лекарственных средств характеризуются недостаточно высокой активностью и вызывают серьезные побочные эффекты (Сквиззато А. и соавт., 2011; Kim W. S. et al., 2001; Guyton J. R., 2006).

Таблица 1

**Классификация гиполипидемических средств согласно
Всемирной организации здравоохранения**

	Наименование класса лекарственных средств	Наименование лекарственного препарата
Лекарственные средства, снижающие концентрацию холестерина и ТАГ в сыворотке крови, монокомпонентные	Ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы	Симвастатин, ловастатин, правастатин, флувастатин, аторвастатин, церивастатин, розувастатин, питавастатин.
	Фибраты	Клофибрат, безафибрат, алюминия клофибрат, гемфиброзил, фенофибрат, симфибрат, ронифибрат, ципрофибрат, этофибрат, клофибрид, холина фибрат
	Секвестранты желчных кислот	Холестирамин, коlestипол, колекстран, колесевелам
	Никотиновая кислота и ее производные	Ницеритрол, никотиновая кислота, никофураноза, алюминия никотинат, никотиниловый спирт, аципимокс
	Прочие препараты, снижающие концентрацию холестерина и ТАГ в сыворотке крови	Декстротироксин, пробукол, тиаденол, меглутол, омега-3-триглицериды, магния пиридоксаль 5-фосфат глутамат, поликосанол, эзетимиб, алипогентипарвовек, мипомерсен
Лекарственные средства, снижающие концентрацию холестерина и ТАГ в сыворотке крови, комбинации	Ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы в комбинации с другими гиполипидемическими средствами	Ловастатин и никонитовая кислота, симвастатин и эзетимиб, правастатин и фенофибрат
	Ингибиторы ГМГ КоА-редуктазы в комбинации с другими лекарственными средствами	Симвастатин и ацетилсалициловая кислота, правастатин и ацетилсалициловая кислота, аторвастатин и амлодипин, симвастатин, ацетилсалициловая кислота и рамиприл

Исследования, проведенные в разных странах мира, показывают, что терапия статинами может приводить к развитию миопатии. При этом с увеличением дозы препарата риск возникновения этого заболевания возрастает вплоть до рабдомиолиза – крайней степени миопатии (Kim W. S. et al., 2001; Guyton J. R., 2006; Окуневич И. В. и соавт., 2010). Назначение статинов в сочетании с некоторыми лекарственными средствами, а также при

паренхиматозных заболеваниях печени, вызывает побочные реакции со стороны гепатобилиарной системы (Bays H., 2006; Guyton J. R., 2006).

Терапия гиполипидемическими средствами группы фибратов может вызвать гепатомегалию (Окуневич И. В. и соавт., 2010) с увеличением активности трансаминаз, повышением содержания креатинина и мочевины в сыворотке крови, диспепсические явления, а также нарушения дыхательной системы, астению, потерю волос (Adult treatment panel III, 2002; Moutzouri E. et al., 2010).

Секвестранты желчных кислот вызывают повышение уровня ТАГ в сыворотке крови, что приводит к компенсаторному увеличению синтеза эндогенных ЛПОНП (Beysen C. et al., 2012). Показано также, что применение препаратов этой группы вызывает побочные эффекты со стороны желудочно-кишечного тракта – изжогу, метеоризм, запор и неприятные вкусовые ощущения (Adult treatment panel III, 2002).

Лекарственные средства из группы никотиновой кислоты также обладают рядом нежелательных эффектов: активируют фибринолитическую систему, вызывают покраснение кожи за счет вазодилатации периферических сосудов и выброса простагландинов, повышают активность трансаминаз в сыворотке крови и увеличивают уровень мочевой кислоты. В отдельных случаях возможно развитие печеночной недостаточности, подагры. Кроме того, прием лекарственных средств этой группы может вызывать неспецифические симптомы, такие как головокружение, тошнота, рвота, холестаз, мигрень, повышение нервной возбудимости и импотенцию (Российские рекомендации, 2009; Справочник Видаль, 2011; Adult treatment panel III, 2002).

Исходя из изложенного выше, можно сделать вывод, что, несмотря на большое разнообразие синтетических гиполипидемических лекарственных средств на фармацевтическом рынке, существует необходимость поиска новых лекарственных средств этой группы, которые будут обладать высокой эффективностью в сочетании с хорошей переносимостью и низкой стоимостью.

1.3.2 Сесквитерпеновые лактоны – перспективные соединения для профилактики и лечения гиперлипидемии

Перспективным источником гиполипидемических лекарственных средств являются вещества растительного происхождения с терпеноидной структурой (Krettlі A. U. et al., 2001; Wagner S. et al., 2006; Bezie I. F. F., 2011), которые обладают достаточно высокой фармакотерапевтической активностью, низким уровнем побочных эффектов и хорошей переносимостью (Kitson R. A. et al., 2009; Kumar D. et al., 2012).

Среди терпеноидов, продуцируемых растениями, активно изучаются сесквитерпеновые лактоны. Они представляют собой обширную группу как по количеству соединений, так и по разнообразию углеродного скелета и обладают высокой биологической активностью (Chaturvedi D., 2011; Zaghloul A. M., 2014; Ivanescu B. et al., 2015). В наибольшем количестве сесквитерпены присутствуют в растениях семейства Астровых (Asteraceae), Кизиловых (Cornaceae), Рутовых (Rutaceae) и Магнолиевых (Magnoliaceae) (Племенков В. В., 2006).

Растения семейства Сложноцветных (Compositae) содержат α -метилен- γ -лактоны, которые обладают широким спектром биологической активности. Этими соединениями обусловлены противовоспалительные, противоопухолевые, цито- и фитотоксические, антибактериальные, противовирусные, противомаларийные и противогрибковые действия (Таблица 2) (Вайнсон В. В. и соавт., 2005; Рахимов К. Д., 2005; Zhang S. et al., 2005; Arantes F. et al., 2011; Chaturvedi D., 2011; Ivanescu B. et al., 2015).

В экспериментах *in vitro* показано, что сесквитерпеновый лактон партенолид, выделенный из пиретрума девичьего (*Tanacetum parthenium*), ингибирует пролиферацию и вызывает апоптоз опухолевых клеток гепатомы, холангиокарциномы, опухолевых клеток поджелудочной железы (Wyrebska A. et al., 2012; 2013).

Таблица 2

Распределение различных классов сесквитерпеновых лактонов семейства
Сложноцветных (Compositae) в зависимости от структуры

Род растений (№ рода)	№ рода сесквитерпеновых лактонов	Тип присутствующих лактонов
Посконниковые (Eupatorieae) (50)	4	Гермакранолиды Элеманолиды Гваянолиды Амбросанолиды Секо-амбросанолиды
Верониевые (Vernonia) (50)	4	Гермакранолиды Элеманолиды Гваянолиды
Астровые (Astereceae) (100)	1	Гермакранолиды Гваянолиды Элеманолиды
Девясилловые (Inuleae) (100)	5	Гваянолиды Ксантанолиты Амбросанолиды Геленанолиды Секо-эвдесманолиты Секо-амбросанолиды Гермакранолиды
Подсолнечниковые (Heliantheae) (250)	24	Элеманолиды Гваянолиды Эвдесманолиты Ксантанолиты Амбросанолиды Геленанолиды Секо-эвдесманолиты Секо-амбросанолиды Секо-геленанолиды
Крестовниковые (Senecioneae) (50)	4	Гермакранолиды Ксантанолиты Эремофиланолиты Геленанолиды Баккенолиды
Тысячелистниковые (Anthemideae) (50)	10	Гермакранолиды Элеманолиды Гваянолиды Геленанолиды Кадинанолиды Хриморанолиты
Календуловые (Arcototeae- Calenduleae) (50)	1	Гваянолиды

Продолжение Таблицы 2

Артишоковые (Cynareae) (50)	8	Гермакранолиды Элеманолиды Гваянолиды Эвдесманолиды
Мутисиевые (Mutisieae) (55)	1	Эвдесманолиды
Латуковые (Lactucae) (75)	7	Гермакранолиды Эвдесманолиды Гваянолиды

При этом гибель клеток путем апоптоза опосредованно α -метилен- γ -лактоновым скелетом партенолида и связана с ингибированием транскрипционного фактора NF-kB (Yip-Schneider M. T. et al., 2005; Saadane A. et al., 2007; Chaturvedi D., 2011), дисфункцией митохондрий и увеличением уровня АФК (Wen J. et al., 2002; Chaturvedi D., 2011). Партенолид снижает также экспрессию мРНК, уровень белков металлопротеиназы 9 и урокиназного активатора плазминогена, проявляя антиметастатический эффект (Wyrebska A. et al., 2012).

Сесквитерпеновые лактоны этого же семейства Сложноцветных (или Астровых), выделенные из тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium*), обладают противовоспалительным, противоотечным и спазмолитическим действием при заболеваниях желудочно-кишечного тракта (Glasl S., 2002). Противовоспалительный эффект сесквитерпеновых лактонов растений рода полыни (*Artemisia*) семейства Астровых (*Asteraceae*) проявляется за счет ингибирования NO-синтазы и циклооксигеназы-2 через инактивацию NF-kB сигнального пути (Wagner S. et al., 2006; Emami S. A. et al., 2010). Противовоспалительным эффектом обладают также сесквитерпены, выделенные из *Cyclolepis genistoides* (Sosa A. et al., 2011), сферантуса индийского (*Sphaeranthus indicus*), который, в том числе, обладает гепатопротективным, антиоксидантным и гиполипидемическим действием (Galani V. J. et al., 2010; Mahesh A. et al., 2010).

Выделенный из полыни однолетней (*Artemisia annua*) сесквитерпеновый лактон артемизинин и его производные обладают противомаларийной и противовирусной активностью, а лактоны вернодалин, вернолид, алантолактон,

изоалантолактон – антибактериальной активностью (Kitson R. A. et al., 2009; Chaturvedi D., 2011).

Наряду с перечисленными видами фармакологической активности в литературе имеются немногочисленные сведения о гиполипидемическом эффекте отдельных сесквитерпеновых лактонов (Аксартов Р. М., 2004; Роднова Е. А., 2012; 2013; Shimoda H. et al., 2002; Eliza J. et al., 2009).

Так, показано, что сесквитерпеновые лактоны тысячелистника Вильгельмса (*Achillea wilhelmsii*) снижают уровень ХС, ХС-ЛПНП и повышают содержание ХС-ЛПВП (Asgary S. et al., 2000).

Костунолид – сесквитерпеновый лактон, выделенный из малайского имбиря (*Costus speciosus*), также проявляет гиполипидемическую активность в сочетании с гипогликемическим эффектом. Биологические эффекты костунолида обусловлены снижением уровня ХС, ТАГ, ХС-ЛПНП и содержания гликозилированного гемоглобина в сыворотке крови. Кроме того, костунолид стимулирует выработку инсулина β -клетками островков Лангерганса, подавляя экспрессию NO-синтазы (Duraipandiyan V. et al., 2012).

Механизм гиполипидемического действия сесквитерпенов агуерина Б, гроссгемина и цинаропикрина обусловлен снижением уровня ТАГ в сыворотке крови (Shimoda H. et al., 2003), а сеспендола – за счет ингибирования синтеза холестерина в макрофагах мышей (Uchida R. et al., 2006).

В экспериментах *in vivo* показано, что сесквитерпеновые лактоны ванилосмин и костунолид снижают интенсивность перекисного окисления липидов и повышают активность ферментов антиоксидантной защиты – СОД, каталазы и глутатионпероксидазы (Eliza J. et al., 2009).

Введение мышам сесквитерпеновых лактонов, выделенных из одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale*), вызывает снижение активности трансаминаз, щелочной фосфатазы и уровня общего билирубина, что говорит о его гепатопротективном действии. Дополнительно проявляется антиоксидантное действие за счет повышения содержания глутатиона в печени (Mahesh A. et al., 2010).

Сравнительно недавно было показано, что сесквитерпеноид фарнезол ингибирует ГМГ-КоА-редуктазу в культуре *S. aureus*, вызывая гиполипидемический эффект (Kuroda M. et al., 2007; Kaneko M. et al., 2011).

Способность снижать активность фермента ГМГ-КоА-редуктазы показана для сесквитерпенового лактона леукомизина в экспериментах на крысах. Кроме того леукомизин снижает содержание ТАГ и ХС в сыворотке крови крыс, а также проявляет антиоксидантное действие за счет снижения уровня ТБК-реактивных продуктов, диеновых конъюгатов, гидроперекисей липидов и повышения активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы (Роднова Е. А. и соавт., 2011, 2012; Адекенов С. М. и соавт., 2012).

Сесквитерпеновые лактоны подобно гиполипидемическим препаратам группы статинов содержат в своей структуре лактонное кольцо (Hennekens С. Н., 2001). Предполагается также, что гиполипидемическое действие сесквитерпеновых лактонов гваянового типа обусловлено наличием кислорода в функциональных группах на 3- и 8-позициях и экзо-метиленовым фрагментом в α -метилен- γ -бутиролактоновом кольце (Shimoda Н. et al., 2003). В связи с этим большой интерес, на наш взгляд, представляет поиск гиполипидемических средств именно среди соединений указанного класса.

Сесквитерпеновый лактон ахиллин по строению углеродного скелета относится к 2-оксо-гваянолидам, который содержит кислород в функциональной группе на 2-позиции и γ -бутиролактоновое кольцо. Ахиллин наиболее часто экстрагируют из семейства Астровых (Asteraceae) из тысячелистника (*Achillea*), полыни (*Artemisia*), пижмы (*Tanacetum*) и одуванчика (*Taraxacum*) (Glasl S., 2002; Modzelewska A., 2005). По данным литературы известно, что ахиллин обладает противоопухолевым и противовоспалительным эффектами (Kim Y. S., 2008), а также противоаллергическим действием за счет ингибирования у крыс фермента β -гексозаминидазы, высвобождаемой тучными клетками (Glasl S., 2002).

Резюмируя сказанное, можно сделать вывод, что сесквитерпеновый лактон ахиллин является перспективным веществом растительного происхождения для изучения его гиполипидемического действия.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика объекта исследования

Ахиллин (3R,3aS,9aS,9bS)-3,6,9-триметил-3,3а,4,5,9а,9b-гексагидро-азулено [4,5-b]фуран-2,7-дион) – сесквитерпеновый лактон и по строению углеродного скелета относится к гвайановому ряду (Рисунок 9) (Glasl S., 2002; Zaghloul A. M., 2014).

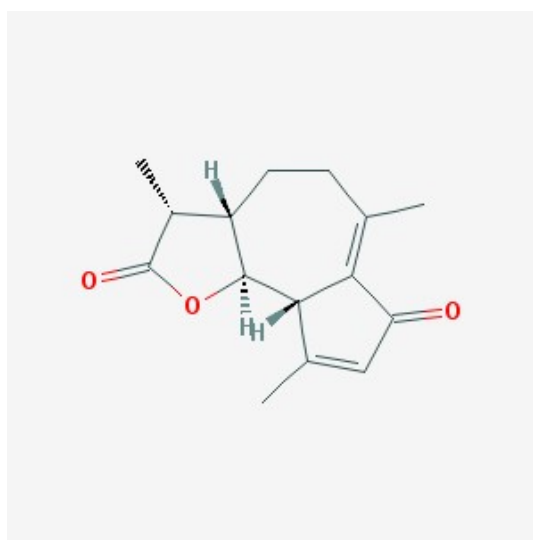


Рисунок 9. Структурная формула ахиллина.

Ахиллин был получен методом углекислотной экстракции из тысячелистника обыкновенного (*Achillea lanulosa* Nutt, *Achillea millefolium* L.), тысячелистника мелкоцветкового (*Achillea micrantha* Willd), полыни беловойтой (*Artemisia leucodes* Shrenk), посконника (*Eupatorium japonicum*), хипохериса щетинистого (*Hypochaeris setosus*) и стевии (*Stevia alpina* Griseb.) учеными АО «Международный научно-производственный холдинг “Фитохимия”» (г. Караганда, Казахстан), количественное содержание ахиллина в серии исследуемой субстанции составляло 99,7 %.

Лактон представляет собой мелкокристаллический порошок белого цвета, без запаха, с горьким вкусом, легко растворимый в хлороформе, бензоле, этаноле, диметилсульфоксиде (ДМСО) и практически не растворимый в воде.

2.2. Материал исследования

2.2.1. Культивирование клеточной культуры линии HTC

Исследования *in vitro* проводили на перевиваемой клеточной культуре гепатомы линии HTC, полученной из банка клеточных культур ФГБУН Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург, Россия).

Клеточную культуру HTC в количестве $0,25 \times 10^6$ клеток культивировали в 24-луночных планшетах («TPP», Швейцария) в 1 мл питательной среды DMEM с L-глутамином («Биолот», Россия) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («РАА Laboratories», Австрия), инактивированной при 56 °C 30 мин на водяной бане, 50 мкг/мл гентамицина («ПанЭко», Россия) (полная питательная среда DMEM) при +37 °C в CO₂-инкубаторе MCO-5AC («SANYO», Япония) в атмосфере 95 % воздуха и 5 % CO₂ и 100 % влажности (стандартные условия) до 70-80 % конфлюэнтного монослоя (субконфлюэнтный монослой).

В качестве положительного контроля (препарата сравнения) для оценки гипополипидемического действия ахиллина в экспериментах *in vitro* использовали гипополипидемическое средство группы фибратов гемфиброзил («Sigma-Aldrich», США) (Goto D. et al., 1997; Zhu D., 2002). Исследуемый лактон ахиллин и гемфиброзил вносили в культуральную среду в виде раствора в ДМСО («ПанЭко», Россия). Конечная концентрация растворителя в инкубационной среде составляла не более 0,5 %. В качестве негативного контроля использовали ДМСО.

После достижения клетками гепатомы субконфлюэнтного монослоя среду аккуратно аспирировали и клетки выдерживали на бессывороточной среде DMEM

1 ч для синхронизации клеточной культуры. Далее клеточную линию НТС культивировали в полной питательной среде DMEM в присутствии ахиллина или гемфиброзила в концентрациях от 0,25 до 5,0 мМ в стандартных условиях в течение 48 ч.

Моделирование гиперлипидемии на клеточной культуре гепатомы линии НТС

Гиперлипидемию на клеточной культуре НТС индуцировали жировой эмульсией липофундином МСТ/ЛСТ (Илан Е. et al., 2005; Tirosh O. et al., 2009).

Липофундин («Б. Браун Медикал», Россия) добавляли в инкубационную среду в конечных концентрациях от 0,01 до 0,1 % на 48 ч после достижения клетками субконфлюэнтного монослоя перед внесением сесквитерпенового лактона ахиллина или препарата сравнения гемфиброзила.

На клеточной культуре гепатомы проводили оценку цитотоксичности сесквитерпенового лактона ахиллина, препарата сравнения гемфиброзила и жировой эмульсии липофундина, определяли в клетках гепатомы содержание ТАГ, холестерина, восстановленного глутатиона и уровень АФК, а также исследовали экспрессию ключевых генов метаболизма липидов с помощью количественной ОТ-ПЦР в реальном времени по технологии TaqMan.

2.2.2. Исследования на крысах линии Wistar

Эксперименты *in vivo* выполнены на 112 белых аутбредных крысах самцах сток Wistar массой 280-350 г. Животные были получены из отдела экспериментальных биологических моделей НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ (г. Томск, Россия), имеется сертификат здоровья.

Животных содержали в условиях вивария на естественном световом режиме, при свободном доступе к пище и воде (температура воздуха в виварии 20 ± 2 °С, влажность – не более 50 %). Кормление животных осуществляли

специальными гранулами с минеральными и витаминными добавками «ПроКорм» для лабораторных крыс фирмы ЗАО «БиоПро» (г. Новосибирск, Россия), имеющими сбалансированный витаминный, макро- и микроэлементный состав, соответствующий ГОСТ Р 50258-92.

Содержание и все манипуляции (взвешивание, введение препаратов, декапитацию) осуществляли с 9 до 12 ч с целью исключения суточных влияний на метаболизм исследуемых соединений. Эксперименты на животных выполняли в соответствии с рекомендациями «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Миронов А. Н., 2012).

Исследования на крысах проводили согласно Правилам надлежащей лабораторной практики (GLP), утвержденными Приказом Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23.08.2010 г. №708 г. и требованиям Федерального закона «О защите животных от жестокого обращения» от 01.09.1997 г., а также конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, принятой Европейским союзом в 1986 г., и директивы 86/609 ЕЭС, основанные на тексте соглашения «Dr. Robert Hubrecht, Current EU Legislation Controlling Animal Experiments».

После карантина для проведения экспериментов формировались группы по 9 крыс (модели острой гиперлипидемии) и 8 крыс (модель хронической гиперлипидемии) в каждой методом случайной выборки из особей, имеющих близкую массу, контролируруемую ежедневным взвешиванием для коррекции количества вводимых препаратов (Таблица 3).

Моделирование острой гиперлипидемии этиловым спиртом у крыс

Острую гиперлипидемию у крыс индуцировали введением этанола (Sapronov N. S. et al., 2006).

Экспериментальным животным вводили внутрижелудочно сесквитерпеновый лактон ахиллин (10 мг/кг) или препарат сравнения никотиновую кислоту (25 мг/кг) («Sigma-Aldrich», США) (Couturier A. et al.,

2014) в виде суспензии на 0,5 %-й крахмальной слизи в течение 7 дней. Контрольная и интактная группы животных получали эквивалентные количества 0,5 %-го раствора крахмальной слизи.

Таблица 3

Распределение экспериментальных животных по группам

Группы животных	Режим назначения препаратов
МОДЕЛЬ ОСТРОЙ ГИПЕРЛИПИДЕМИИ, ИНДУЦИРОВАННОЙ ЭТИЛОВЫМ СПИРТОМ	
Интактные животные	0,5 %-й раствор крахмальной слизи внутрижелудочно 1 раз/сут 7 суток
Этанол (контроль)	40 %-й раствор этанола (5 г/кг в пересчете на чистый этанол) внутрижелудочно однократно на 7 сутки
Этанол + ахиллин	Ахиллин 10 мг/кг внутрижелудочно однократно 1 раз/сут 7 суток, этанол (5 г/кг в пересчете на чистый этанол)
Этанол + никотиновая кислота	Никотиновая кислота 25 мг/кг внутрижелудочно 1 раз/сут 7 суток, этанол (5 г/кг в пересчете на чистый этанол)
МОДЕЛЬ ОСТРОЙ ГИПЕРЛИПИДЕМИИ, ИНДУЦИРОВАННОЙ ТРИТОНОМ WR 1339	
Интактные животные	0,5 %-й раствор крахмальной слизи внутрижелудочно 1 раз/сут 7 суток, на 8 сутки 0,9 %-й раствор натрия хлорида внутривентрально однократно
Тритон WR 1339 (контроль)	Тритон WR 1339 200 мг/кг внутривентрально однократно на 8 сутки
Тритон WR 1339 + ахиллин	Ахиллин 10 мг/кг внутрижелудочно 1 раз/сут 7 суток, тритон WR 1339 (200 мг/кг)
Тритон WR 1339 + фенофибрат	Фенофибрат 100 мг/кг внутрижелудочно 1 раз/сут 7 суток, тритон WR 1339 (200 мг/кг)
МОДЕЛЬ ХРОНИЧЕСКОЙ ГИПЕРЛИПИДЕМИИ, ИНДУЦИРОВАННОЙ АТЕРОГЕННОЙ ДИЕТОЙ	
Интактные животные	Стандартная лабораторная диета 42 суток, с 29 по 42 сутки 0,5 %-й раствор крахмальной слизи внутрижелудочно 1 раз/день
Модель атерогенной диеты (контроль)	Диета с высоким содержанием животного жира и холестерина 42 суток, с 29 по 42 сутки 0,5 %-й раствор крахмальной слизи внутрижелудочно 1 раз/день
Атерогенная диета + ахиллин	Диета с высоким содержанием животного жира и холестерина 42 суток, с 29 по 42 сутки ахиллин 10 мг/кг внутрижелудочно 1 раз/день
Атерогенная диета + фенофибрат	Диета с высоким содержанием животного жира и холестерина 42 суток, с 29 по 42 сутки фенофибрат 100 мг/кг внутрижелудочно 1 раз/день
Атерогенная диета + розувастатин	Диета с высоким содержанием животного жира и холестерина 42 суток, с 29 по 42 сутки розувастатин 10 мг/кг внутрижелудочно 1 раз/день

Для моделирования острой гиперлипидемии экспериментальным животным на 7-е сутки через 2 ч после введения ахиллина и никотиновой кислоты внутрижелудочно вводили 40 %-й раствор этанола (5 г/кг в пересчете на чистый этанол). Через 6 ч крыс умерщвляли CO_2 -асфиксией с использованием стандартной камеры. В сыворотке крови определяли уровень ТАГ, СЖК, ХС, ХС-ЛПНП и ХС-ЛПВП, рассчитывали индекс атерогенности. В ткани печени оценивали содержание ТАГ и холестерина.

Моделирование острой гиперлипидемии тритоном WR 1339

Острую гиперлипидемию у крыс индуцировали введением детергента тритона WR 1339 (Короленко Т. А. и соавт., 2010; Логинова В. М. и соавт., 2011).

Экспериментальные животные в течение 7 дней получали внутрижелудочно сесквитерпеновый лактон ахиллин (10 мг/кг) или препарат сравнения фенофибрат (100 мг/кг) («Sigma-Aldrich», США) (Kopf T. et al., 2014; Ferreira A. V. et al., 2006) в виде суспензии на 0,5 %-й крахмальной слизи. Контрольная и интактная группы животных получали эквивалентные количества 0,5 %-го раствора крахмальной слизи. На 8-й день через час после введения ахиллина, фенофибрата и крахмальной слизи экспериментальным животным всех групп, кроме интактной, внутрибрюшинно вводили тритон WR 1339 (200 мг/кг) («Sigma-Aldrich», США) (Короленко Т. А. и соавт., 2010; Zanwar A. A. et al., 2012), растворенный в 0,9 %-м растворе NaCl. Через 24 ч крыс умерщвляли CO_2 -асфиксией с использованием стандартной камеры.

В сыворотке крове определяли содержание ТАГ, СЖК, ХС, ХС-ЛПНП и ХС-ЛПВП, рассчитывали индекс атерогенности. В ткани печени оценивали содержание ТАГ и холестерина.

Моделирование хронической гиперлипидемии атерогенной диетой у крыс

Для приготовления корма, обеспечивающего 45 % энергии за счет животного жира и содержащего 2,5 % холестерина, 0,5 % холевой кислоты,

0,1 % 2-тиоурацила (атерогенная диета), брали 20 г топленого масла (98 % животного жира) и растворяли 2,5 г холестерина, 0,5 г холевой кислоты («Sigma-Aldrich», США) (для улучшения всасывания холестерина в желудочно-кишечном тракте) и 0,1 г 2-тиоурацила (для подавления функции щитовидной железы), затем смешивали с 77 г стандартного корма вышеуказанного состава. Калорийность полученного корма составляла 545 ккал на 100 г.

Лабораторные животные в течение 28 дней получали атерогенную диету. После этого животным экспериментальной группы, продолжавшим получать атерогенную диету, в течение двух недель вводили внутрижелудочно сесквитерпеновый лактон ахиллин (10 мг/кг) или препараты сравнения фенофибрат (100 мг/кг) (Kopf T. et al., 2014; Ferreira A. V. et al., 2006) и розувастатин кальция (10 мг/кг) («Sigma-Aldrich», США) (Ferreira E. S. et al., 2012) в виде раствора в 0,5 %-й крахмальной слизи. Животным контрольной группы на фоне атерогенной диеты в течение 14-ти дней вводили эквивалентные количества 0,5 %-го раствора крахмальной слизи. Интактная группа животных на фоне стандартного питания в течение 14 дней получала эквивалентные количества 0,5 %-го раствора крахмальной слизи.

Через 14 дней введения исследуемого вещества и положительных контролей, после 12-часового голодания крыс умерщвляли CO₂-асфиксией.

В сыворотке крови определяли уровень ТАГ, СЖК, ХС, ХС-ЛПНП и ХС-ЛПВП, рассчитывали индекс атерогенности. В ткани печени оценивали содержание ТАГ, холестерина и величину экспрессии ключевых генов метаболизма липидов с помощью количественной ОТ-ПЦР в реальном времени по технологии TaqMan.

Исследование осуществляли на основе протоколов, одобренных локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (заключение №-3219 от 25.02.2013 г.).

2.3. Методы исследования

2.3.1. Определение жизнеспособности клеточной культуры линии НТС

Определение жизнеспособности клеток гепатомы МТТ-тестом

Для оценки токсического действия сесквитерпенового лактона ахиллина, гемфиброзила и липофундина на монослойной клеточной культуре НТС *in vitro* использовали МТТ-тест (Shen Ch. et al., 2009; Giri Sh. et al., 2010).

Принцип метода основан на способности живых клеток восстанавливать с помощью ферментов дегидрогеназ митохондриальной дыхательной цепи желтые соли 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ) до нерастворимых в воде темно-фиолетовых гранул формазана. После растворения кристаллы формазана дают окрашивание, определяемое спектрофотометрически.

Ход работы: после инкубирования клеточной культуры НТС с ахиллином, гемфиброзилом и липофундином среду аккуратно аспирировали, клетки снимали механическим способом. Далее клетки собирали в стерильные пробирки и осаждали центрифугированием при 200 g в течение 2 мин на центрифуге «Sky Line CM-6M» («ELMI», Латвия), после центрифугирования надосадок удаляли. Клетки 1 раз отмывали в однократном ФСБ (фосфатно-солевом буфере) (pH 7,4) путем центрифугирования 2 мин при 200 g, далее надосадочную жидкость сливали и к осадку добавляли 1:8 стоковый раствор МТТ на ФСБ (1,15 мг МТТ реагента/1 мл 1хФСБ) и инкубировали 3 ч при +37 °C в стандартных условиях. После инкубирования клетки центрифугировали 2 мин при 200 g, чтоб удалить раствор МТТ и добавляли к каждой пробе по 1,5 мл 96 %-го изопропанола («Экос-1», Россия), чтобы растворить гранулы формазана. Количество восстановленного продукта измеряли на спектрофотометре «СФ-2000» («ОКБ-Спектр», Россия) при длине волны (λ) 570 нм.

Контрольная культура клеток оценивалась в 100 %-й базовый сигнал жизнеспособных клеток.

Определение жизнеспособности клеток гепатомы с трипановым синим

Жизнеспособность клеточной культуры НТС при действии ахиллина, гемфиброзила и липофундина определяли путем окрашивания клеток 0,4 %-м раствором трипанового синего (Герасимов И. Г., Попандопуло А. Г., 2007).

Принцип метода основан на исключении красителя, поскольку цитоплазматическая мембрана живых клеток не проницаема для трипанового синего, а мертвые проницаемы и окрашиваются в синий цвет.

Ход работы: для проведения теста с трипановым синим клетки также снимали с пластика механическим способом и отмывали 1 раз в однократном ФСБ (рН 7.4). Затем окрашивали клетки с 0,4 %-м раствором трипанового синего в течение 5 мин при комнатной температуре. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева под световым микроскопом «МИКМЕД-1» (Россия) с увеличением (7 ок. х 9 об.) в 4-х больших (учетверенных) угловых квадратах. Подсчет производили по формуле, учитывая фактор делюции, т.е. количество живых клеток (клетки/мл) = $(A/B) \times 10^4$, где А – число живых клеток; В – число больших (учетверенных) угловых квадратов. Жизнеспособность (%) = $(A/A+B) \times 100$, где А – число живых клеток; В – число мертвых клеток.

2.3.2. Определение содержания липидов в клеточной культуре линии НТС, в сыворотке крови и ткани печени крыс

2.3.2.1. Определение содержания липидов в клетках гепатомы флуоресцентным методом с красителем Nile Red

Содержание липидов в клетках гепатомы определяли флуоресцентным методом с витальным липофильным красителем Nile Red (Shen Ch. et al., 2009).

Принцип метода основан на взаимодействии красителя Nile Red с липидами в цитозоле клеток.

Ход работы: после инкубирования с ахиллином, гемфиброзилем и липофундином клетки снимали с пластика, далее отмывали 1 раз в однократном ФСБ (рН 7.4). Надосадочную жидкость аккуратно аспирировали и клетки инкубировали в темноте в течение 30 мин с реактивом Nile Red («Sigma-Aldrich», США) в конечной концентрации 3 мкМ. Затем клетки отмывали в однократном ФСБ (рН 7,4) и детектировали флуоресценцию Nile Red на микропланшетном ридере Infinite 200PRO («Tecan», Швейцария) при λ (возбуждения)=580 нм и λ (эмиссии)=630 нм.

2.3.2.2. Окрашивание нейтральных липидов красителем Oil Red O

Окрашивание нейтральных липидов в клетках гепатомы и в атеросклеротических бляшках в аортах крыс проводили с красителем Oil Red O (Xu S. et al., 2010).

Принцип метода основан на взаимодействии красителя Oil Red O с нейтральными липидами в цитозоле клеток и в атеросклеротических бляшках в аортах крыс.

Ход работы: для анализа клетки гепатомы и образцы аорт крыс фиксировали 10 мин в 10 % забуференном растворе формалина («Biovitrum», Россия). Далее образцы отмывали в однократном ФСБ (рН 7,4) в течение 1 мин и в 60 %-м растворе изопропилового спирта в течение 15 сек и окрашивали рабочим раствором Oil Red O (6:4) при 37 °С в течение 1 мин в темноте. Не связавшийся с липидами краситель отмывали в течение 15 сек в 60 %-м изопропиловом спирте, затем 3 раза по 3 мин в однократном ФСБ (рН 7,4) и фотографировали на микроскопе («Биомед», Россия) (об. 25 х ок. 10), оснащенном цифровой камерой DCM 510.

2.3.2.3. Определение содержания триацилглицеролов в клеточной культуре НТС, в сыворотке крови и ткани печени крыс ферментативным методом

Содержание ТАГ в клетках гепатомы, в сыворотке крови и ткани печени крыс определяли ферментативным методом с использованием набора «Triglycerides» («Chronolab», Испания).

Принцип метода: при расщеплении ТАГ ферментом липопротеинлипазой происходит образование глицерола и СЖК. В присутствии глицеролкиназы (К.Ф. 2.7.30) при взаимодействии с АТФ глицерин превращается в глицерин-3-фосфат, который под действием глицерин-3-фосфатоксидазы превращается в дигидроксиацетонфосфат и пероксид водорода. При взаимодействии перекиси водорода с 4-аминофеназоном и п-хлорфенолом в присутствии пероксидазы (К.Ф. 1.11.1.7) образуется хинониминный краситель. Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна количеству ТАГ.

Ход работы: перед проведением анализа клетки гепатомы снимали с пластика и отмывали 1 раз в однократном ФСБ (рН 7,4). Концентрацию ТАГ в клеточной культуре НТС и в ткани печени крыс (навеска 250 мг) оценивали после экстракции липидной фракции смесью хлороформ-метанола (2:1) по методу J. Folch (1957) (Folch J. et al., 1957). Перед проведением анализа к хлороформной фазе добавляли 20 %-й раствор детергента Thesit («Sigma-Aldrich») в хлороформе. Хлороформ удаляли потоком воздуха и к эмульгированным липидам добавляли рабочий реагент из набора «Triglycerides». Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре «СФ-2000» при $\lambda=505$ нм. Количество ТАГ в клеточной культуре НТС выражали в мг/ 10^7 клеток и в нмоль/мг белка, в сыворотке крови крыс - в ммоль/л, а в ткани печени крыс - в мг/г.

2.3.2.4. Определение содержания холестерина в клеточной культуре НТС, в сыворотке крови и ткани печени крыс ферментативным методом

Содержание холестерина в клеточной культуре НТС, в сыворотке крови и ткани печени крыс определяли ферментативным методом с использованием набора «Cholesterol» («Chronolab», Испания) аналогично определению ТАГ набором «Triglycerides».

Принцип метода основан на проведении сопряженных реакций, в которых холестерол из состава эфиров высвобождается при действии фермента холестеролэстеразы (К.Ф. 3.1.1.13). Далее холестерол окисляется при действии фермента холестеролоксидазы (К.Ф. 1.1.3.6), образующаяся перекись водорода способствует при участии фермента пероксидазы окислительному азосочетанию 4-амино-антипирина и фенола с образованием окрашенного соединения (хинониминового красителя). Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна содержанию холестерина в клетках. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре «СФ-2000» при $\lambda=505$ нм. Количество холестерина выражали в клетках гепатомы в мг/10⁷ клеток, в сыворотке крови крыс – в моль/л, а в ткани печени крыс – в мг/г.

2.3.2.5. Определение содержания свободных жирных кислот в сыворотке крови крыс ферментативным методом

Концентрацию СЖК в сыворотке крови крыс определяли спектрофотометрически с помощью ферментативного набора «NEFA» («RANDOX», Великобритания).

Принцип метода основан на взаимодействии СЖК при действии фермента ацил-КоА-синтетазы с коэнзимом А в присутствии аденозинтрифосфата. Образующийся ацил-КоА далее окисляется ферментом ацил-КоА-оксидазой (К.Ф.

1.3.3.6) до еноил-КоА с образованием перекиси водорода. При взаимодействии перекиси водорода с 4-аминоантипирином п-хлорфенолом в присутствии пероксидазы (К.Ф. 1.11.1.7) образуется хинониминный краситель. Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна количественному содержанию СЖК в сыворотке крови. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре «СФ-2000» при $\lambda=505$ нм. Концентрацию СЖК в сыворотке крови крыс выражали в ммоль/л.

2.3.2.6 Определение содержания холестерина в липопротеинах низкой плотности в сыворотке крови крыс ферментативным методом

Содержание ХС-ЛПНП в сыворотке крови крыс определяли спектрофотометрически с помощью ферментативного набора «LDLCholesterol» («Chronolab», Испания).

Принцип метода: в ходе реакции эфиры холестерина при действии холестеролэстеразы (К.Ф. 3.1.1.13) расщепляются с образованием ХС-ЛПВП и жирных кислот. Далее холестерол окисляется холестеролоксидазой (К.Ф. 1.1.3.6) до 4-холестенона и перекиси водорода. Затем при действии фермента пероксидазы (К.Ф. 1.11.1.7) перекись водорода взаимодействует с N-(2-гидрокси-3-сульфопропил)-3,5-диметоксиаланином и 4-аминоантипирином. В результате образуется хинониминный краситель, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации ХС-ЛПНП в сыворотке крови крыс. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре «СФ-2000» при $\lambda=600$ нм. Концентрацию ХС-ЛПНП в сыворотке крови крыс выражали в ммоль/л.

2.3.2.7. Определение содержания холестерина в липопротеинах высокой плотности в сыворотке крови крыс ферментативным методом

Содержание ХС-ЛПВП в сыворотке крови крыс определяли спектрофотометрически с помощью ферментативного набора «LDLCholesterol» («Chronolab», Испания).

Принцип метод: основан на избирательной солюбилизации ХС-ЛПВП детергентом. ХС-ЛПВП вступает в последующие реакции с холестеролэстеразой (К.Ф. 3.1.1.13), холестериноксидазой (К.Ф. 1.1.3.6) и хромогеном с образованием хинониминового красителя (другие фракции липопротеинов не вступают в эти реакции вследствие адсорбции детергента на их поверхности). Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна концентрации ХС-ЛПВП в сыворотке крови крыс. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре «СФ-2000» при $\lambda=600$ нм. Концентрацию ХС-ЛПВП в сыворотке крови крыс выражали в ммоль/л.

2.3.3. Определение концентрации белка в клеточной культуре линии НТС

Количество белка в клетках гепатомы определяли по методу М. Bradford (1976) (Bradford M.M., 1976).

Принцип метода: основан на реакции красителя Кумасси голубого G-250 с аргинином и гидрофобными аминокислотными остатками. Молекулы свободного красителя существуют в растворе в красной форме, которая имеет максимум поглощения при $\lambda=495$ нм. В результате образования комплекса с белком красная форма переходит в синюю с максимумом поглощения при $\lambda=595$ нм. Увеличение абсорбции раствора при данной длине волны пропорционально количеству белка в растворе.

Ход работы: для проведения анализа предварительно готовили лизаты клеток (Rahman I., 2006). Для этого к 100 мкл клеточной суспензии ($\approx 3-5 \times 10^5$ клеток) добавляли 900 мкл холодного раствора 0,1 %-го тритона X-100 («Sigma-Aldrich», США). Затем лизаты разводили в 2 раза однократным ФСБ (pH 7.4) и к

100 мкл лизата ($\approx 3-5 \times 10^3$ клеток) добавляли 900 мкл раствора Bradford (Kruger N., 1994). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре «СФ-2000» при $\lambda=595$ нм.

2.3.4. Оценка величины экспрессии мРНК генов метаболизма липидов в клеточной культуре НТС и печени крыс

2.3.4.1. Выделение суммарной РНК из клеток гепатомы и печени крыс

Ход работы: выделение суммарной РНК из клеточной культуры гепатомы линии НТС и печени крыс проводили с помощью набора Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit («GE Healthcare», Великобритания).

Клеточный осадок и гомогенаты печени хорошо перемешивали с лизирующим буфером с добавлением 3,5 мкл β -меркаптоэтанола на вортексе Microspin FV-2400 («Biosan», Латвия). Для уменьшения вязкости и очистки лизаты фильтровали через колонки RNAspin Mini Filter units и центрифугировали при 11000 g в течение 1 мин на микроцентрифуге Minispin («Eppendorf», Германия). Далее фильтраты переносили в 1,5 мл микроцентрифужные пробирки («Axugen», США). Для связывания РНК к лизатам добавляли 350 мкл 70 %-го этанола и смешивали на вортексе 2 раза по 5 сек. Далее лизаты пипетировали 2-3 раза и переносили на колонки RNAspin Mini column, центрифугировали при 8000 g в течение 30 сек и перемещали колонки в новые собирательные пробирки, далее добавляли по 350 мкл MDB (буфер обессоливающий мембрану), затем центрифугировали при 11000 g в течение 1 мин. Жидкость, профильтрованную через колонку, удаляли и колонку возвращали обратно в пробирку. Для разрушения ДНК добавляли 95 мкл реакционной смеси, содержащей ДНК-азу, на мембрану колонки и инкубировали при комнатной температуре 15 мин. После инкубации мембрану колонок промывали три раза. Первый раз добавляли 200 мкл

буфера RA2, затем центрифугировали при 11000 g в течение 1 мин и перемещали колонки в новые собирательные пробирки. Буфер RA2 инактивировал ДНК-азу I. При второй промывке добавляли 600 мкл буфера RA3, колонки RNAspin Mini column центрифугировали 1 мин при 11000 g. Профильтрованную жидкость удаляли и колонки возвращали в пробирки. При третьей промывке добавляли 250 мкл буфера RA3 к колонкам RNAspin Mini column, центрифугировали при 11000 g в течение 2 мин. Затем колонки переносили в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, не содержащие нуклеаз.

РНК элюировали в 100 мкл H₂O и центрифугировали при 11000 g в течение 1 мин. Элюированную РНК немедленно помещали на лед для предотвращения деградации. Изолированную РНК хранили при -80 °С в низкотемпературном морозильнике («Sanyo», Япония).

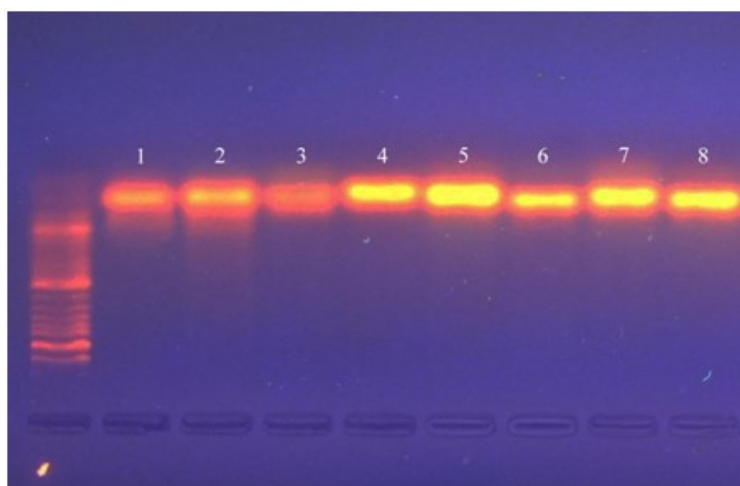


Рисунок 10. Электрофореграмма ампликонов исследуемых генов липидного обмена и гена рефери (*Actb*).

Примечание: 1 – 7 α -гидроксилаза (*Cyp7a1*), 2 – рецептор к ЛПНП (*Ldlr*), 3 – карнитин-кальмитоилтрансфераза II (*Cpt2*), 4 – АХАТ (*Soat1*), 5 – ацетил-КоА-карбоксилаза (*Acaca*), 6 – ГМГ-КоА-редуктаза (*Hmgcr*), 7 – карнитин-кальмитоилтрансфераза I (*Cpt1a*), 8 – бета-актин (*Actb*).

Концентрацию и чистоту выделенной РНК определяли на спектрофотометре Nano Drop-2000 («Thermo Scientific», США). Концентрация изолированной РНК в пробах составляла от 100 до 500 нг/мкл, $A_{260}/A_{280} = 1,95-2,05$; $A_{260}/A_{230} = 1,90-2,31$.

Целостность РНК оценивали при помощи капиллярного электрофореза на приборе Tape Station («Agilent Technologies», США) и набора R6K Screen Tape

(«Agilent Technologies», США). При этом показатель целостности РНК – RIN (RNA Integrity Number) составлял от 5,6 до 9,0.

Выделенную РНК использовали для оценки экспрессии генов метаболизма липидов при помощи количественной ОТ-ПЦР в реальном времени по технологии TaqMan. После проведения ОТ-ПЦР, проверку чистоты ПЦР-продуктов проводили с использованием электрофореза в 2,5 %-м агарозном геле с 0,2 %-м бромистым этидием (Рисунок 10).

2.3.4.2. Синтез комплементарной ДНК

Для синтеза комплементарной ДНК (кДНК) на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit («Fermentas», Литва).

Ход работы: в тонкостенные пробирки «Maxum Recovery» типа Эппендорф для ПЦР на 200 мкл («Ахуген», США) вносили по 12 мкл «смеси 1» из расчета на 1 образец: 11 мкл РНК, 1 мкл случайных гексамерных праймеров («Fermentas», Литва). Образцы инкубировали при температуре 65 °С в течение 5 мин.

«Смесь 2» готовили из расчета на один образец: 1 мкл RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase («Fermentas», Литва) в концентрации 200 ед/мкл, 4 мкл 5х буфера («Fermentas», Литва), 2 мкл дНТФ (10 мМ) («Fermentas», Литва), 1 мкл ингибитора RiboLock RNase («Fermentas», Литва) в концентрации 20 ед/мкл. Перемешивали аккуратно на вортексе, затем вносили «смесь 2» в Эппендорфы к «смеси 1». Пробирки помещали в амплификатор «Терцик» («ДНК-технология», Россия) и инкубировали по программе: 5 мин при 25 °С, затем 60 мин при 42 °С. Останавливали реакцию при нагревании 70 °С в течение 5 мин. кДНК хранили при -20 °С для последующего анализа.

2.3.4.3. Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени по технологии TaqMan

Уровень экспрессии мРНК генов метаболизма липидов оценивали при помощи количественной ОТ-ПЦР в реальном времени по технологии TaqMan на амплификаторе «RotorGene-6000» («Corbett Research», Австралия). Праймеры и зонды (FAM-BHQ1) были подобраны с использованием программы Vector NTI Advance 11.5, Oligo 7,5 и базы данных NCBI (Nucleotide Database) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>) (Таблица 4).

Таблица 4

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

Actb NM_031144.3 Ампликон 71 п.о.	F 5'-GAAAAGATGACCCAGATCATGT-3'
	R 5'-AACACAGCCTGGATGGCTA-3'
	Зонд 5'-AGACCTTCAACACCCCAGCCAT-3'
Acaca NM_022193.1 Ампликон 94 п.о.	F 5'-CGCAGGCATCAGAAGATCA-3'
	R 5'-TGGCAAGTTTACAGCACACT-3'
	Зонд 5'-ACCCAGCAGTATTTGAACACATG-3'
Cpt1a NM_031559.2 Ампликон 98 п.о.	F 5'-CATTGACCTCCGCCTGA-3'
	R 5'-TGATGCCATTCTTGAACCG-3'
	Зонд 5'-CCACGAAGCCCTCAAACAGAT-3'
Cpt2 NM_012930.1 Ампликон 104 п.о.	F 5'-GCTGTTACGATGACTGGATAG-3'
	R 5'-TCGAAAATGTCTTCCAAGCA-3'
	Зонд 5'-ACGCAATGCCCGAGAGTTTC-3'
Cyp7a1 NM_012942.2 Ампликон 103 п.о.	F 5'-CTGATGCTCTCCTGCTTTGA-3'
	R 5'-CATGTAGTGGTGGCAAAATTC-3'
	Зонд 5'-TGTGGAGAGCCAAGTCAAGTGTC-3'
Hmgcr NM_013134.2 Ампликон 106 п.о.	F 5'-GCTTGAGATCATGTGCTGCTT-3'
	R 5'-CCGAGAAAGCTCTAGGACCA-3'
	Зонд 5'-CTGTATGTCCGTGCTTGCCAACT-3'
Ldlr NM_175762.2 Ампликон 95 п.о.	F 5'-GCCATCTATGAGGACAAAGTGT-3'
	R 5'-GCCACCAAATTCACATCTGA-3'
	Зонд 5'-AGGCGGTTGGCACTGAAAATG-3'
Soat1 NM_031118.1 Ампликон 79 п.о.	F 5'-GTGCTCGTGTCTGCTGCC-3'
	R 5'-AAGGCAAAGAACGAAAGGAA-3'
	Зонд 5'-AGCACACCTGGCAAGATGGAGTT-3'

Примечание: все пробы – FAM →BHQ1; NM – номер последовательности РНК в базе данных NCBI (Nucleotide Database) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>); п.о. – пара оснований; F – прямой праймер; R – обратный праймер.

Ход работы: ПЦР ставили в дублях в объеме 15 мкл. Готовили реакционную «смесь 1» для каждого гена в расчете на один образец: 1,5 мкл 1x SE буфера

(67 mM Tris–HCl pH 8,8 при 25 °C, 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01 %-й Tween-20) («Sibenzyme», Россия), 1,5 мкл дНТФ (250 мкМ «Sibenzyme», Россия), 0,75 мкл MgCl₂ (2,5 mM «Sibenzyme», Россия), 0,1 мкл Tag ДНК-полимеразу (5 Еа/мкл «Sibenzyme», Россия), 1 мкл синтезированной кДНК (50 нг) и 7,15 мкл деионизованной воды.

Смесь перемешивали на вортексе. При подготовке «смеси 2» для каждого гена в расчете на один образец брали по 1 мкл прямого, обратного праймеров и зонда (300 нМ прямого и обратного праймеров и 200 нМ зонда «ДНК-Синтез», Россия). В тонкостенные пробирки «Махумит Recovery» типа Эппендорф для ПЦР на 200 мкл вносили по 3 мкл «смеси 2», затем добавляли по 12 мкл «смеси 1» и сверху - минеральное масло.

ПЦР проводили на амплификаторе «RotorGene-6000». Двухшаговая программа амплификации включала 1 цикл – 94 °C в течении 2 мин (предварительная денатурация); 40 циклов – 1-й шаг 94 °C, 6 сек и 2-й шаг 10 сек, 60,5 °C (отжиг праймеров).

Уровень экспрессии каждого целевого гена выражали в условных единицах по отношению к контролю и гену-рефери фермента *Actb* (*Rattus norvegicus actin, beta*).

Относительная экспрессия генов метаболизма липидов была оценена с помощью метода M. W. Pfaffl; для того, чтобы определить отношение экспрессии между образцом и калибратором использовалась следующая формула:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta Ct, \text{target}(\text{calibrator} - \text{test})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta Ct, \text{ref}(\text{calibrator} - \text{test})}},$$

где E – эффективность реакции, Ct – пороговый цикл генов мишеней (target) и гена-реферри (ref). $\Delta Ct, \text{target}(\text{calibrator} - \text{test})$ – Ct гена мишени в калибраторе минус Ct гена мишени в опытном образце; $\Delta Ct, \text{ref}(\text{calibrator} - \text{test})$ – Ct гена-реферри в калибраторе минус Ct гена-реферри в опытном образце (Pfaffl M.W., 2001).

2.3.5. Определение уровня активных форм кислорода в клеточной культуре линии НТС флуоресцентным методом

Уровень активных форм кислорода в клетках гепатомы исследовали с помощью флуоресцентного зонда – 2,7-дихлородигидрофлуоресцеина диацетата (ДХФДА) (Wang H., 1999; Halliwell B., Whiteman M., 2004; Мартинович Г. Г., 2005; Саенко Ю. В., 2011; Prieto A. M., 2013).

Принцип метода основан на способности ДХФДА легко проникать в цитоплазму клеток и деэстерифицироваться под действием внутриклеточных эстераз. 2,7-дихлородигидрофлуоресцеин не способен транспортироваться из клеток и является слабо флуоресцирующим агентом, но в реакциях с окислителями превращается в сильно флуоресцирующий продукт – дихлорфлуоресцеин (ДХФ). При повышении внутриклеточного уровня оксидантов увеличивается скорость окисления 2,7-дихлородигидрофлуоресцеина. Таким образом, активация внутриклеточного окисления сопровождается увеличением флуоресценции.

Ход работы: для оценки уровня АФК клетки гепатомы в количестве 1×10^4 клеток/лунку рассеивали в темные 96-луночные планшеты и добавляли сесквитерпеновый лактон ахиллин и липофундин. Клеточную культуру инкубировали в среде DMEM с L-глутамином (без фенолового красного), 50 мкг/мл гентамицина и без ЭТС в стандартных условиях. Далее среду аккуратно аспирировали и к контрольным клеткам вносили по 200 мкл раствора Хэнкса («ПанЭко», Россия), в пробы вносили рабочий раствор ДХФДА на Хэнксе в конечной концентрации 10 мкМ и инкубировали 30 мин в темноте в стандартных условиях. После этого среду аккуратно аспирировали, клетки отмывали 1 раз раствором Хэнкса и во все лунки добавляли по 200 мкл раствора Хэнкса. В образцы (положительный контроль и пробы) вносили H_2O_2 в конечной концентрации 0,5 мМ и немедленно детектировали флуоресценцию ДХФ на микропланшетном ридере Cary Eclipse Microplate Reader («Agilent Technologies»,

США) при λ (возбуждения)=485 нм и λ (эмиссии)=535 нм, содержание АФК выражали в единицах флуоресценции.

В эксперименте использовали следующие образцы:

- 1) отрицательный контроль (-ахиллин/липофундин, -ДХФДА, -H₂O₂);
- 2) контроль на аутофлуоресценцию (+ахиллин/липофундин, -ДХФДА, -H₂O₂);
- 3) контроль на ДХФ/контроль на эндогенную продукцию АФК клетками (-ахиллин/липофундин, +ДХФДА, -H₂O₂);
- 4) контроль на продукцию АФК исследуемыми веществами (+ахиллин/липофундин, +ДХФДА, -H₂O₂);
- 5) положительный контроль (-ахиллин/липофундин, +ДХФДА, +H₂O₂);
- 4) пробы (+ахиллин/липофундин, +ДХФДА, +H₂O₂).

2.3.6. Определение содержания восстановленного глутатиона в клеточной культуре линии НТС флуоресцентным методом

Широко используемым методом для определения восстановленного глутатиона (GSH) в жизнеспособных клетках является тест с добавлением флуоресцентного красителя монохлоробимана (mCB) (Kamencic H., 2000; Sebastia J., 2003; Саенко Ю.В., 2011).

Принцип метода основан на образование флуоресцирующего аддукта mCB с GSH при действии внутриклеточной глутатион-S-трансферазы (К.Ф. 2.5.1.18).

Ход работы: для данного анализа клеточную культуру НТС рассеивали в количестве 1×10^4 клеток/лунку в 96-луночные темные планшеты, затем добавляли ахиллин, липофундин и инкубировали клетки гепатомы в полной питательной среде DMEM в CO₂-инкубаторе в стандартных условиях. Далее среду аккуратно аспирировали, к клеткам гепатомы добавляли рабочий раствор mCB на Хэнксе в конечной концентрации 50 мкМ и инкубировали 30 мин в

темноте в стандартных условиях. Затем среду аспирировали, клетки отмывали раствором Хэнкса и добавляли по 200 мкл раствора Хэнкса в каждую лунку. Флуоресценцию детектировали на микропланшетном ридере Cary Eclipse Microplate Reader при λ (возбуждения)=380 нм и λ (эмиссии)=461 нм. Внутриклеточное содержание восстановленного глутатиона выражали в единицах флуоресценции по отношению к интенсивности флуоресценции красителя Hoechst, который отражает содержание ДНК в клетках (O'Brien P.J. et al., 2006).

Принцип метода основан на способности красителя Hoechst проникать через ядерную мембрану клеток и встраиваться вдоль малой бороздки двойной спирали ДНК. Связанные с ДНК молекулы красителя сильно флуоресцируют в синей области спектра при освещении УФ-светом.

Ход работы: для определения содержания ДНК в клеточной культуре НТС добавляли флуоресцентный реагент Hoechst 33342 («Sigma-Aldrich», США) в конечной концентрации 1 мг/мл ДМСО. Клетки гепатомы инкубировали 30 мин в темноте в стандартных условиях и детектировали флуоресценцию Hoechst на микропланшетном ридере Cary Eclipse Microplate Reader при λ (возбуждения)=340 нм и λ (эмиссии)=450 нм.

2.3.7. Визуализация внутриклеточного содержания липидов, активных форм кислорода и восстановленного глутатиона в клеточной культуре линии НТС методом микроскопии

Внутриклеточные уровни липидов, активных форм кислорода и глутатиона в клетках НТС регистрировали по флуоресценции соответствующих зондов методом микроскопии (Xu H. et al., 2015).

Ход работы: для проведения анализа перевиваемую клеточную линию НТС в количестве 1×10^5 клеток/лунку рассеивали на покровные стекла, помещенные в 6-луночные планшеты. Покровные стекла предварительно стерилизовали и

обрабатывали поли-L-лизином (Protocols online) для улучшения адгезии клеток на стеклах.

Через сутки среду аккуратно аспирировали из каждой лунки и к клеткам добавляли ахиллин, липофундин и инкубировали клеточную культуру НТС в полной питательной среде DMEM в стандартных условиях. Далее среду аккуратно аспирировали, к клеткам гепатомы добавляли рабочие растворы Nile Red, ДХФДА на Хэнксе и mCB на Хэнксе в конечных концентрациях 3 мкМ, 10 мкМ и 50 мкМ, соответственно. Далее проводили пробоподготовку, как описано выше.

Визуализацию внутриклеточного содержания липидов, активных форм кислорода и глутатиона в клеточной культуре линии НТС проводили на микроскопе Axioimager Z1 с насадкой для улучшения контрастности Apotome и программным обеспечением AxioVision 4.7.1 («Carl Zeiss», Германия), увеличение 40 х, с использованием светофильтров: λ (возбуждения)=580 нм, λ (эмиссии)=630 нм (для зонда Nile Red), λ (возбуждения)=485 нм, λ (эмиссии)=535 нм (для зонда ДХФДА) и λ (возбуждения)=380 нм, λ (эмиссии)=461 нм (для зонда mCB).

Для лучшей визуализации клеток проводили окрашивание ядер клеточной культуры гепатомы с помощью красителя DAPI (Xu H. et al., 2015).

Принцип метода: основан на способности голубого флуоресцентного красителя DAPI проникать через ядерную мембрану клеток и связываться с малой бороздкой двойной спирали ДНК. При этом происходит усиление интенсивности флуоресценции в 20 раз.

Ход работы: перед микроскопией к клеткам добавляли краситель DAPI («Sigma-Aldrich», США) в конечной концентрации 1 мкг/мл на 15 мин. Далее флуоресценцию зонда DAPI регистрировали на микроскопе Axioimager Z1 с использованием светофильтров: λ (возбуждения)=365 нм, λ (эмиссии)=445 нм.

2.3.8. Статистическая обработка результатов

Результаты исследования обрабатывали с использованием программ Microsoft Excel (2007), GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, США) и SPSS Statistics 17.0 (IBM, США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием общепринятых подходов, результаты представлены в виде выборочного среднего (M) и ошибки среднего (m); медианы (Me), характеризующей центральную тенденцию, и верхнего и нижнего квартилей, характеризующие разброс значений показателя у 50 % образцов ($Q_1 - Q_3$), где Q_1 — 25 % перцентиль, Me — 50 % перцентиль, Q_3 — 75 % перцентиль.

Для определения соответствия распределения количественных признаков в группах сравнения нормальному закону распределения использовали критерий Шапиро-Уилка. Для проверки значимости различий между исследуемыми группами использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни для малых групп и t-критерий Стьюдента для одной выборки. Статистически значимые считали различия при уровне значимости $p < 0,05$ и $p < 0,001$ (Гланц С., 1998; Власов В. В., 2001; Гмурман В. Е., 2006).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Влияние сесквитерпенового лактона ахиллина на содержание триацилглицеролов и холестерина в клетках гепатомы линии НТС при экспериментальной гиперлипидемии, индуцированной липофундином

Перспективным источником гиполипидемических лекарственных средств являются вещества растительного происхождения с терпеноидной структурой (Krettli A. U. et al., 2001; Wagner S. et al., 2006; Bezie I. F. F., 2011), поскольку они обладают достаточно высоким фармакотерапевтическим потенциалом, низким уровнем побочных эффектов и хорошей переносимостью (Kitson R. A. et al., 2009; Kumar D. et al., 2012).

Среди веществ терпеноидов, продуцируемых растениями, активно изучаются сесквитерпеновые лактоны, которые представляют собой обширную группу, как по количеству соединений, так и по разнообразию углеродного скелета, и обладают высокой биологической активностью (Chaturvedi D., 2011; Zaghloul A. M., 2014; Ivanescu B. et al., 2015). Известно, что сесквитерпеновые лактоны в зависимости от их структуры обладают цитотоксическим действием и изучаются как противоопухолевые лекарственные средства (Вайнсон В. В. и соавт., 2005; Рахимов К. Д., 2005; Kim Y. S., 2008; Chaturvedi D., 2011; Wyrebska A. et al., 2012; 2013). Поэтому для исследования *in vitro* фармакологической активности предварительно проводили оценку жизнеспособности клеток гепатомы при инкубации их в среде с различными концентрациями сесквитерпенового лактона ахиллина и положительного контроля гемфиброзила.

3.1.1. Оценка цитотоксичности ахиллина на клеточной культуре линии НТС

В результате экспериментов установлено, что жизнеспособность клеток гепатомы при культивировании с ахиллином в концентрации от 0,25 до 1,5 мМ не изменялась по сравнению с таковой в контрольной культуре и составляла при использовании метода окраски с трипановым синим не менее $97,1 \pm 1,5 \%$, а МТТ-теста – не менее $88,9 \pm 4,9 \%$ ($p > 0,05$). При повышении концентрации до 2,0 мМ ахиллин действовал на клетки гепатомы цитотоксически, и жизнеспособность клеток гепатомы снижалась на 23,5 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (клетки культивировали с ДМСО) (Таблица 5).

Таблица 5

Влияние сесквитерпенового лактона ахиллина и препарата сравнения гемфиброзила на жизнеспособность клеточной культуры гепатомы линии НТС ($M \pm m$), оцениваемую с применением МТТ-теста

Концентрация вещества (мМ)	n	Количество живых клеток (%)
Ахиллин		
0,25	4	$107,4 \pm 1,2$
0,5	4	$97,3 \pm 2,5$
1,0	4	$91,4 \pm 3,8$
1,5	4	$88,9 \pm 4,9$
2,0	4	$76,5 \pm 5,17$ $p < 0,05$
2,5	4	$37,0 \pm 2,5$ $p < 0,001$
5,0	4	$17,3 \pm 2,6$ $p < 0,001$
Гемфиброзил		
0,25	4	$98,8 \pm 4,9$
0,5	4	$81,8 \pm 2,2$
1,0	4	$16,0 \pm 2,5$ $p < 0,001$
1,5	4	0,0 $p < 0,001$

Примечание: жизнеспособность клеток в контроле принимали за 100 %, n – количество измерений, p – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателем в контрольной культуре.

Препарат сравнения гемфиброзил в концентрации от 0,25 до 0,5 мМ не влиял на жизнеспособность клеток культуры НТС, а в концентрации 1,0 мМ оказывал цитотоксическое действие на клетки гепатомы, жизнеспособность которых снижалась на 84 % ($p < 0,05$) от контроля (Таблица 5).

Полученные нами результаты сопоставимы с данными S.-P. Tam (1991), который показал, что добавление гемфиброзила в концентрации до 0,32 мМ в инкубационную среду не вызывало цитотоксического эффекта, и жизнеспособность клеточных культур гепатом линий HepG2 и Hep3B не изменялась по сравнению с контролем (Tam S.-P., 1991).

Таким образом, сесквитерпеновый лактон ахиллин не снижал жизнеспособность клеточной культуры гепатомы линии НТС в концентрации от 0,25 до 1,5 мМ и проявлял менее выраженное цитотоксическое действие, чем препарат сравнения гемфиброзил.

3.1.2 Влияние ахиллина на флуоресценцию Nile Red в клеточной культуре линии НТС

В последнее время широко исследуется гипополидемическое действие сесквитерпеновых лактонов (Shimoda H. et al., 2002; Аксартон Р. М., 2004; Eliza J. et al., 2009; Роднова Е. А., 2013). Показано, что сесквитерпеновые лактоны, выделенные из тысячелистника Вильгельмса, малайского имбиря, полыни беловой, снижают уровень ХС, ТАГ, ХС-ЛПНП и повышают содержание ХС-ЛПВП (Asgary S. et al., 2000; Shimoda H. et al., 2003; Роднова Е. А. и соавт., 2011, 2012; Адекенов С. М. и соавт., 2012; Duraipandiyar V. et al., 2012). Поскольку печень является органом, определяющим гомеостаз липидов в целом организме (Буеверова Е. Л. и соавт., 2008), нами было исследовано гипополидемическое действие сесквитерпенового лактона ахиллина на клеточной культуре гепатомы линии НТС.

Для регистрации содержания липидов, клетки гепатомы были предварительно нагружены флуоресцентным зондом Nile Red (3 мкМ), который взаимодействует с липидами в цитозоле с образованием флуоресцирующего продукта.

В результате проведенных экспериментов было установлено, что добавление ахиллина к культуре НТС приводило к дозозависимому снижению интенсивности флуоресценции Nile Red с $75,3 \pm 1,3 \%$ до $35,6 \pm 2,8 \%$ ($p < 0,05$) при концентрации от 0,5 до 5,0 мМ и гемфиброзила – с $99,2 \pm 1,9 \%$ до $57,9 \pm 4,9 \%$ ($p < 0,05$) при концентрации от 0,25 до 1,0 мМ по сравнению с контролем (Таблица 6).

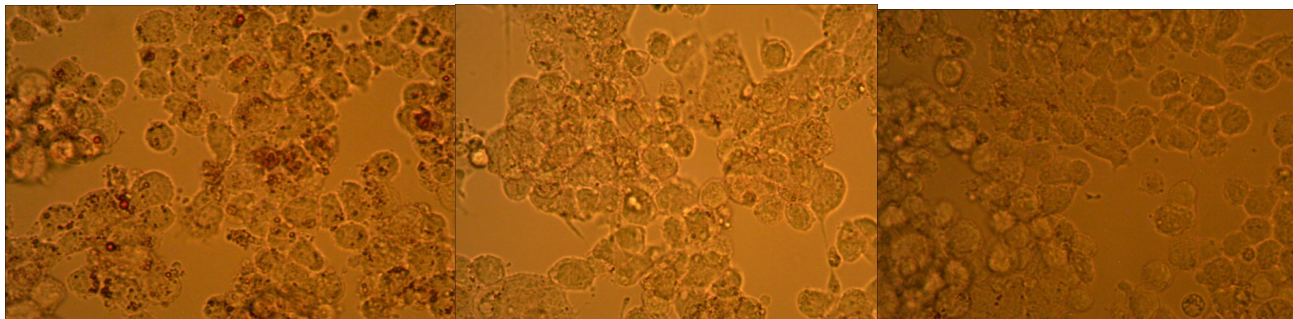
Таблица 6

Влияние сесквитерпенового лактона ахиллина и препарата сравнения гемфиброзила на флуоресценцию Nile Red в клеточной культуре гепатомы линии НТС ($M \pm m$)

Концентрация вещества (мМ)	n	Интенсивность флуоресценции Nile Red (%)
Ахиллин		
0,5	5	$75,3 \pm 1,3$
1,0	5	$71,4 \pm 3,9$ $p < 0,05$
1,5	5	$65,7 \pm 0,9$ $p < 0,05$
2,0	5	$56,8 \pm 3,8$ $p < 0,05$
2,5	5	$55,1 \pm 2,0$ $p < 0,05$
5,0	5	$35,6 \pm 2,8$ $p < 0,05$
Гемфиброзил		
0,25	5	$99,2 \pm 1,9$
0,5	5	$65,1 \pm 2,3$ $p < 0,05$
1,0	5	$57,9 \pm 4,9$ $p < 0,05$

Примечание: флуоресценцию Nile Red в контроле принимали за 100 %, n – количество измерений, p – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателем в контрольной культуре.

Статистически значимое уменьшение интенсивности флуоресценции Nile Red в клетках гепатомы отмечалось при концентрации ахиллина 1,0 мМ и гемфиброзила 0,5 мМ, что отражает снижение содержания липидов в клеточной культуре НТС (Таблица 6).



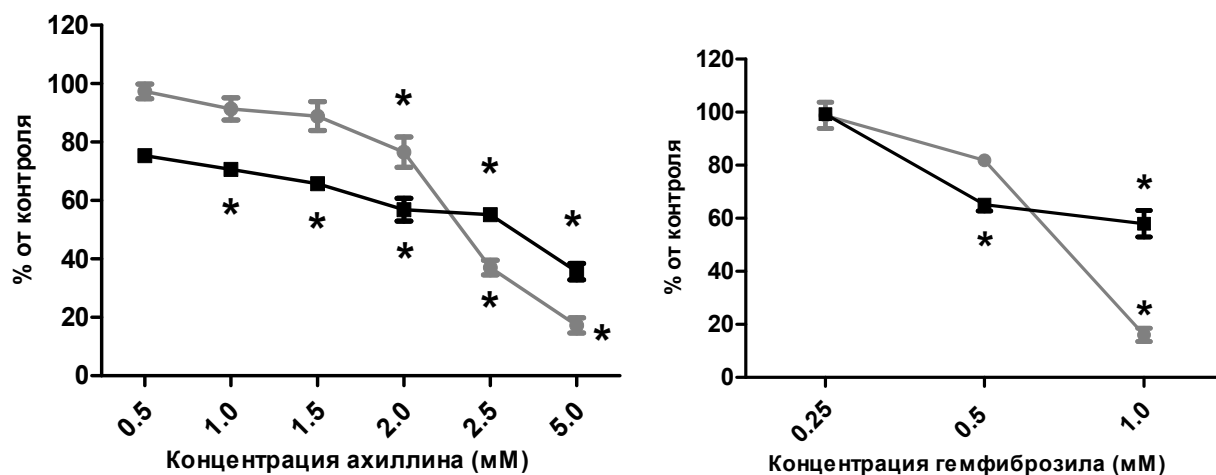
А – контроль

Б – 1,0 мМ ахиллин

В – 0,5 мМ гемфиброзил

Рисунок 11. Микрофотографии клеточной культуры гепатомы линии НТС после культивирования со сесквитерпеновым лактоном ахиллином и препаратом сравнения гемфиброзилом.

Примечание: гранулы липидов, окрашенные красителем Oil Red O, красного цвета; увеличение (об. 25 х ок. 10).



А – ахиллин

Б - гемфиброзил

Рисунок 12. Влияние различных концентраций ахиллина (А) и гемфиброзила (Б) на жизнеспособность клеток (●) с применением МТТ-теста и на флуоресценцию Nile Red (■) в клеточной культуре гепатомы линии НТС ($M \pm m$).

Примечание: жизнеспособность клеток и флуоресценцию Nile Red в контроле принимали за 100 %. * – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателем в контрольной культуре при $p < 0,05$.

Полученные результаты подтверждаются данными микроскопии клеток после окрашивания нейтральных липидов в клеточной культуре НТС с красителем Oil Red O. При действии ахиллина (1,0 мМ) и гемфиброзила (0,5 мМ)

в клетках гепатомы снижалось содержание липидных капель, окрашенных Oil Red O, по сравнению с контролем (Рисунок 11).

Полученные данные позволяют утверждать, что для исследования гиполипидемического действия на модели гиперлипидемии *in vitro* сесквитерпеновый лактон ахиллин и препарат сравнения гемфиброзил целесообразно использовать в концентрациях от 0,5 до 1,5 мМ и от 0,25 до 0,5 мМ, соответственно. Поскольку при этих концентрациях жизнеспособность клеток значимо не изменялась по сравнению с контролем. В тоже время отмечалось снижение флуоресценции Nile Red, что отражает уменьшение содержания липидов в клетках гепатомы (Рисунок 12).

3.1.3. Моделирование экспериментальной гиперлипидемии *in vitro* в клеточной культуре линии НТС

Жировая эмульсия липофундин применяется для парентерального питания. Липофундин является источником энергии и содержит ненасыщенные жирные кислоты, среднецепочечные ТАГ, фосфатиды яичного желтка, глицерол и токоферол (Burrin D. G. et al., 2014). Введение липофундина пациентам и экспериментальным животным приводит к развитию гиперлипидемии (Gura K. et al., 2007; Delgado Roche L., 2012) за счет увеличения уровня ХС, ТАГ, ХС-ЛПНП, при снижении содержания ХС-ЛПВП (Riemens S. C. et al., 1999; Delgado Roche L. et al., 2012). Следует подчеркнуть также, что высокие уровни экзогенных ТАГ способствуют синтезу холестерина, ApoB100 и образованию ЛПОНП (Delgado Roche L. et al., 2012).

В результате проведённых нами экспериментов установлено, что при культивировании клеток гепатомы с липофундином в конечных концентрациях от 0,01 до 0,1 %, жизнеспособность клеток не уменьшалась по сравнению с соответствующим показателем в контрольной культуре и составляла не менее

$97 \pm 1,2 \%$ (методом с трипановым синим) и $96,5 \pm 1,4 \%$ (методом МТТ-теста) ($p > 0,05$) (Таблица 7).

Таблица 7

Влияние липофундина на жизнеспособность клеточной культуры гепатомы линии НТС ($M \pm m$)

Концентрация липофундина (%)	n	Количество живых клеток (%) p
0,01	5	$96,5 \pm 1,4$ $p > 0,05$
0,05	5	$98,9 \pm 2,9$ $p > 0,05$
0,1	5	$97,2 \pm 1,6$ $p > 0,05$

Примечание: жизнеспособность клеток в контроле принимали за 100 %, n – количество измерений, p – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателем в контрольной культуре.

Инкубация клеток гепатомы в течение 48 ч в присутствии липофундина 0,01 % приводила к увеличению содержания в них ТАГ в 1,5 раза – с 1,91 (1,72 – 1,98) до 2,99 (2,87 – 3,05) нмоль/мг белка ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. При добавлении липофундина 0,05 % содержание ТАГ увеличивалось в 3 раза – до 5,68 (5,54 – 5,75) нмоль/мг белка ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. При добавлении липофундина 0,1 % исследуемый показатель возрастал в 2,4 раза до 4,57 (4,4 – 4,68) нмоль/мг белка ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (Рисунок 13).

Таким образом, культивирование клеточной культуры линии НТС в присутствии липофундина приводило к накоплению в клетках ТАГ в зависимости от концентрации жировой эмульсии в инкубационной среде. При этом максимальное увеличение содержания ТАГ в клетках гепатомы отмечалось при концентрации липофундина в инкубационной среде 0,05 %. Полученный результат подтверждался также при количественной оценке интенсивности флуоресценции Nile Red, которая повышалась в 4,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (с $10928,4 \pm 967,3$ до $48534,7 \pm 1924$ ед. флуоресценции) (Рисунок 15).

Повышение уровня липидов в клетках гепатомы при добавлении липофундина в инкубационную среду было обусловлено увеличением уровня

ТАГ в 3 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (Таблица 8). Внутриклеточное содержание холестерина значимо не увеличивалось по сравнению с таковым в контроле ($p > 0,05$) (Таблица 8).

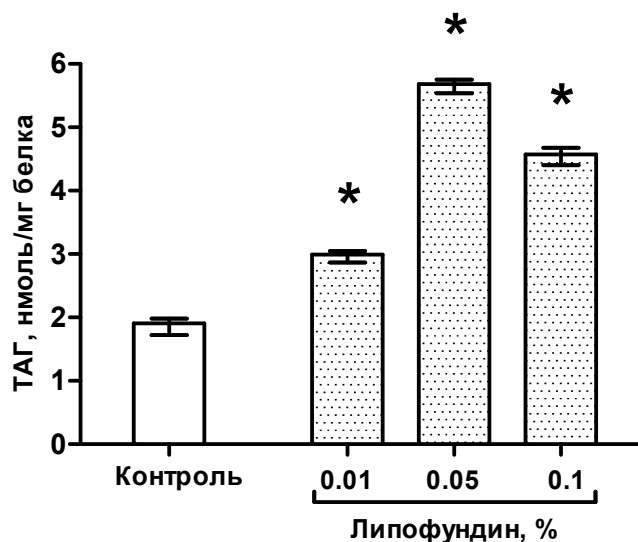


Рисунок 13. Влияние липофундина на уровень ТАГ в клеточной культуре гепатомы линии НТС (Ме ($Q_1 - Q_3$)).

Примечание: ТАГ – триацилглицеролы, * – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателем в контрольной культуре при $p < 0,05$.

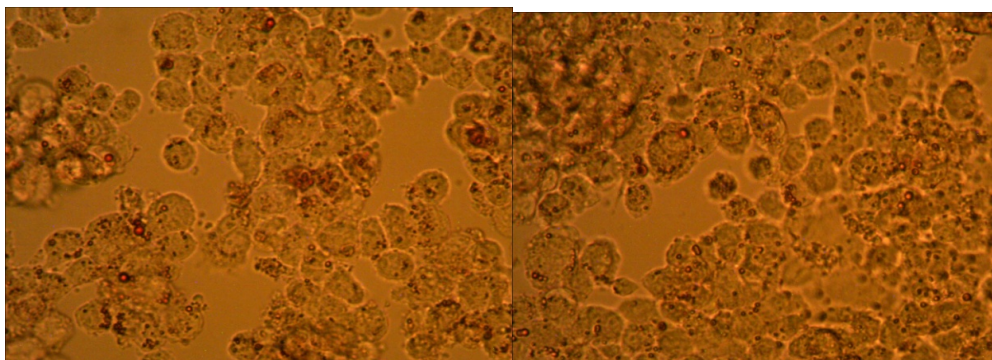
Таблица 8

Внутриклеточное содержание ТАГ и холестерина в клеточной культуре гепатомы линии НТС при культивировании без и с липофундином 0,05 % ($M \pm m$)

Исследуемая группа	n	Внутриклеточное содержание ТАГ (мг/ 10^7 клеток)	Внутриклеточное содержание холестерина (мг/ 10^7 клеток)
Контроль	5	$0,896 \pm 0,115$	$0,256 \pm 0,026$
Липофундин 0,05 %	5	$2,64 \pm 0,084$ $p < 0,05$	$0,282 \pm 0,019$

Примечание: ТАГ – триацилглицеролы, n – количество измерений, p – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями в контрольной культуре.

Полученные нами результаты сопоставимы с данными Е. Ilan (2005) и О. Tirosh (2009), которые с коллегами показали, что при добавлении липофундина к клеточной культуре гепатокарциномы линии FaO и к первичным гепатоцитам крыс происходит накопление ТАГ и СЖК (Ilan E. et al., 2005; Tirosh O. et al., 2009).



А – контроль

Б – липофундин 0,05 %

Рисунок 14. Микрофотографии клеточной культуры гепатомы линии НТС при культивировании без (А) и с липофундином 0,05 % (Б).

Примечание: гранулы липидов, окрашенные красителем Oil Red O, красного цвета; увеличение (об. 25 х ок. 10).

Накопление липидов в культуре НТС в присутствии липофундина подтверждается данными микроскопии клеток после окрашивания нейтральных липидов с красителем Oil Red O (Рисунок 14). На рисунке 14Б (культивирование клеток с липофундином в конечной концентрации 0,05 %) отмечалось больше гранул липидов, окрашенных Oil Red O, чем в контрольной культуре (Рисунок 14А).

3.1.4. Влияние ахиллина на содержание триацилглицеролов и холестерина в клеточной культуре линии НТС при экспериментальной гиперлипидемии, индуцированной липофундином

На экспериментальной модели гиперлипидемии, вызванной жировой эмульсией липофундином, сесквитерпеновый лактон ахиллин и гемфиброзил также дозозависимо снижали уровень липидов в клетках гепатомы. При этом ахиллин уменьшал интенсивность флуоресценции Nile Red в культуре клеток с $35187,6 \pm 582,4$ до $30140,0 \pm 1019,3$ ед. флуоресценции ($p < 0,05$) при концентрации от 0,5 до 1,5 мМ, а гемфиброзил – с $17715,2 \pm 1795,8$ до $14317,7 \pm 1553,1$ ед. флуоресценции ($p < 0,05$) при концентрации от 0,25 до 0,5

мМ, соответственно, по сравнению с показателем в культуре с 0,05 % липофундином ($48534,7 \pm 1924$ ед. флуоресценции) (Рисунок 15).

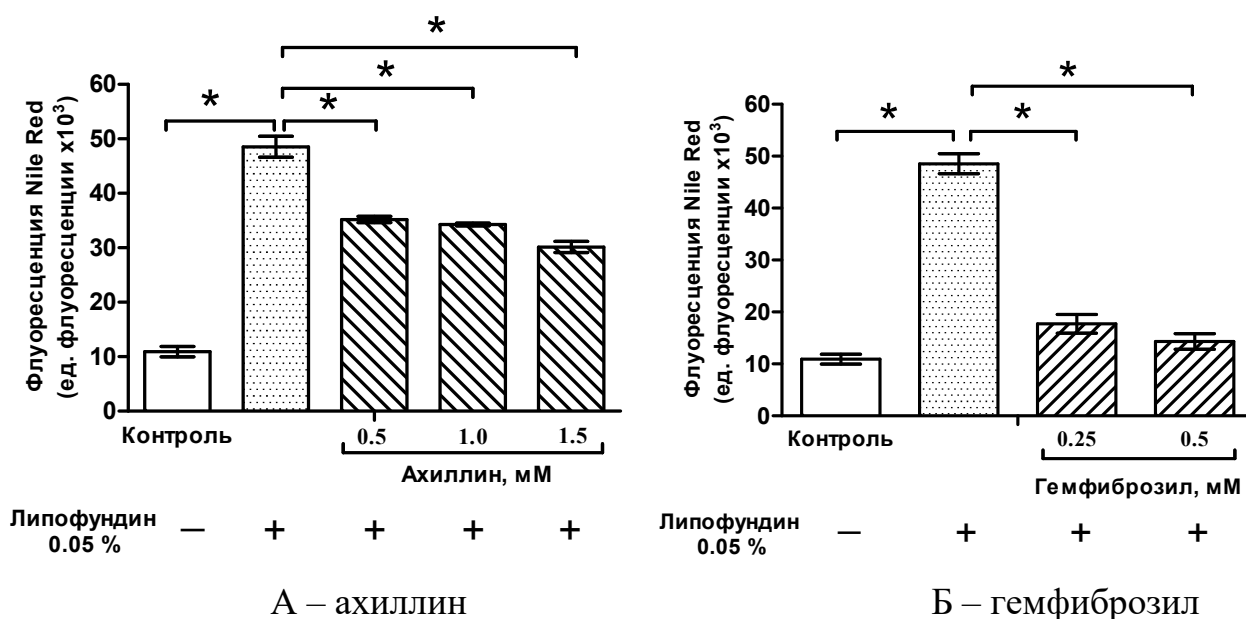


Рисунок 15. Влияние ахиллина (А) и гемфиброзила (Б) на флуоресценцию Nile Red в клеточной культуре гепатомы линии НТС при культивировании с 0,05 % липофундином ($M \pm m$).

Примечание: * – уровень статистической значимости различий по сравнению с клетками гепатомы соответствующей группы при $p < 0,05$.

При этом ахиллин проявлял способность понижать уровень липидов в клетках гепатомы уже в концентрации 0,5 мМ (сопоставимой с концентрацией препарата сравнения гемфиброзила) и снижал интенсивность флуоресценции Nile Red на 27,5 % ($35187,6 \pm 582,4$ ед. флуоресценции, $p < 0,05$) по сравнению с соответствующим показателем в культуре с 0,05 % липофундином ($48534,7 \pm 1924$ ед. флуоресценции) (Рисунок 16). Гемфиброзил более выражено уменьшал содержание липидов в клетках линии НТС на экспериментальной модели гиперлипидемии - на 63,5 % ($17715,2 \pm 1795,8$ ед. флуоресценции, $p < 0,05$) при концентрации 0,25 мМ (Рисунок 16).

Уменьшение содержания липидов в клеточной культуре НТС при действии ахиллина было обусловлено снижением содержания ТАГ на 20 % ($p < 0,05$) – $2,11 \pm 0,136$ мг/ 10^7 клеток и холестерина на 26,5 % ($p < 0,05$) – $0,207 \pm 0,023$ мг/ 10^7 клеток, по сравнению с аналогичным показателем в культуре с 0,05 % липофундином (ТАГ – $2,64 \pm 0,084$ мг/ 10^7 клеток, холестерол –

$0,282 \pm 0,019$ мг/ 10^7 клеток) (Рисунок 17). Гемфиброзил на модели гиперлипидемии оказывал более выраженное влияние на уровень ТАГ в клетках, снижая их содержание на 49,3 % ($1,34 \pm 0,117$ мг/ 10^7 клеток, $p < 0,05$) (Рисунок 17А).

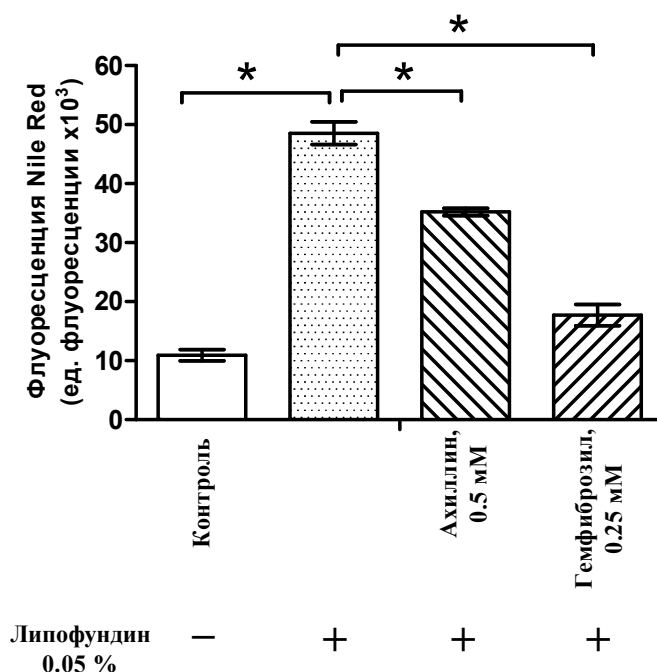


Рисунок 16. Влияние ахиллина (0,5 мМ) и гемфиброзила (0,25 мМ) на флуоресценцию Nile Red в клеточной культуре гепатомы линии НТС при культивировании с 0,05 % липофундином ($M \pm m$).

Примечание: * – уровень статистической значимости различий по сравнению с клетками гепатомы соответствующей группы при $p < 0,05$.

На внутриклеточное содержание холестерина гемфиброзил существенного влияния не оказал ($p > 0,05$) (Рисунок 17Б).

Для регистрации содержания липидов клетки гепатомы были предварительно нагружены флуоресцентным зондом Nile Red (3 мкМ), который взаимодействует с липидами в цитозоле с образованием флуоресцирующего продукта. Флуоресценцию Nile Red в клеточной культуре НТС регистрировали на микроскопе Axioimager Z1 с насадкой для улучшения контрастности Apotome и программным обеспечением AxioVision 4.7.1. («Carl Zeiss», Германия), увеличение 40х, с использованием светофильтров: $\lambda=580$ нм – возбуждение, $\lambda=630$ нм – эмиссия (Рисунок 18).

Моделирование экспериментальной гиперлипидемии *in vitro* путем добавления липофундина в конечной концентрации 0,05 % в инкубационную среду приводило к достоверному увеличению содержания липидов в клетках: интенсивность флуоресценции зонда Nile Red составляла $48534,7 \pm 1924$ ед. флуоресценции, что оказалось в 4,4 раза выше такового в контрольной культуре ($10928,4 \pm 967,3$ ед. флуоресценции) (Рисунок 18).

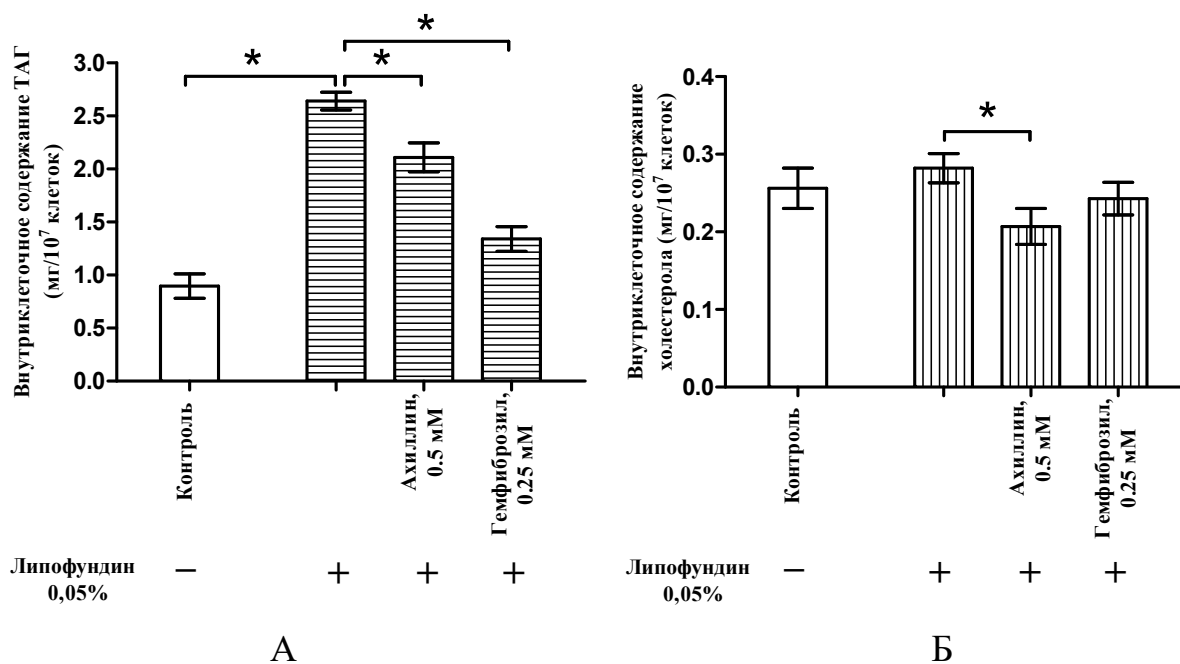


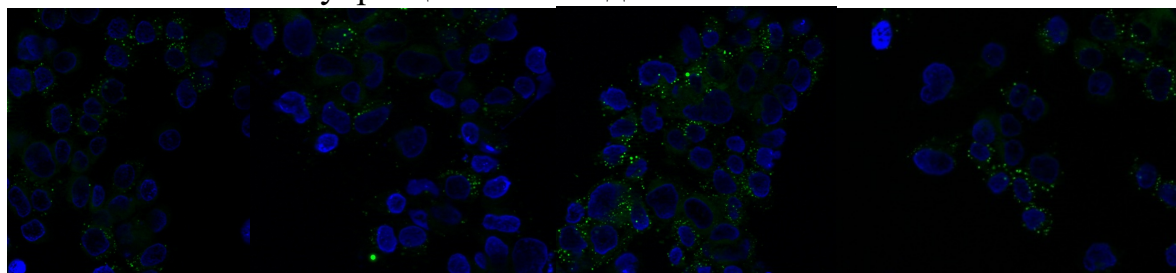
Рисунок 17. Влияние ахиллина (0,5 мМ) и гемфиброзила (0,25 мМ) на содержание триацилглицеролов (ТАГ) (А) и холестерина (Б) в клеточной культуре гепатомы линии НТС при культивировании с 0,05 % липофундином ($M \pm m$).

Примечание: * – уровень статистической значимости различий по сравнению с клетками гепатомы соответствующей группы при $p < 0,05$.

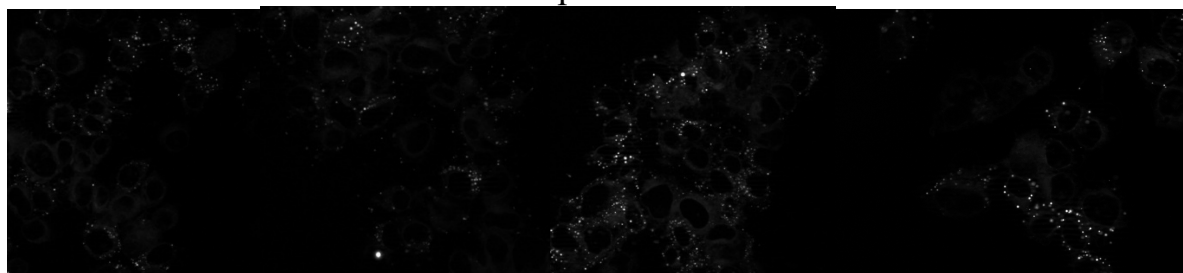
Добавление в инкубационную среду ахиллина в концентрации 0,5 мМ на модели гиперлипидемии *in vitro* приводило к достоверному снижению интенсивности флуоресценции Nile Red ($35187,6 \pm 582,4$ ед. флуоресценции) в клетках гепатомы, нагруженных зондами Nile Red (на липиды) и DAPI (на ядра) (Рисунок 18).

Таким образом, нами установлено, что сесквитерпеновый лактон ахиллин в экспериментальной модели гиперлипидемии *in vitro*, индуцированной жировой эмульсией липофундином, проявил гиполипидемическую активность, которая обусловлена снижением уровня липидов, о чем свидетельствует уменьшение

Флуоресцентные зонды Nile Red и DAPI



Фазовый контраст Nile Red



Фазовый контраст DAPI

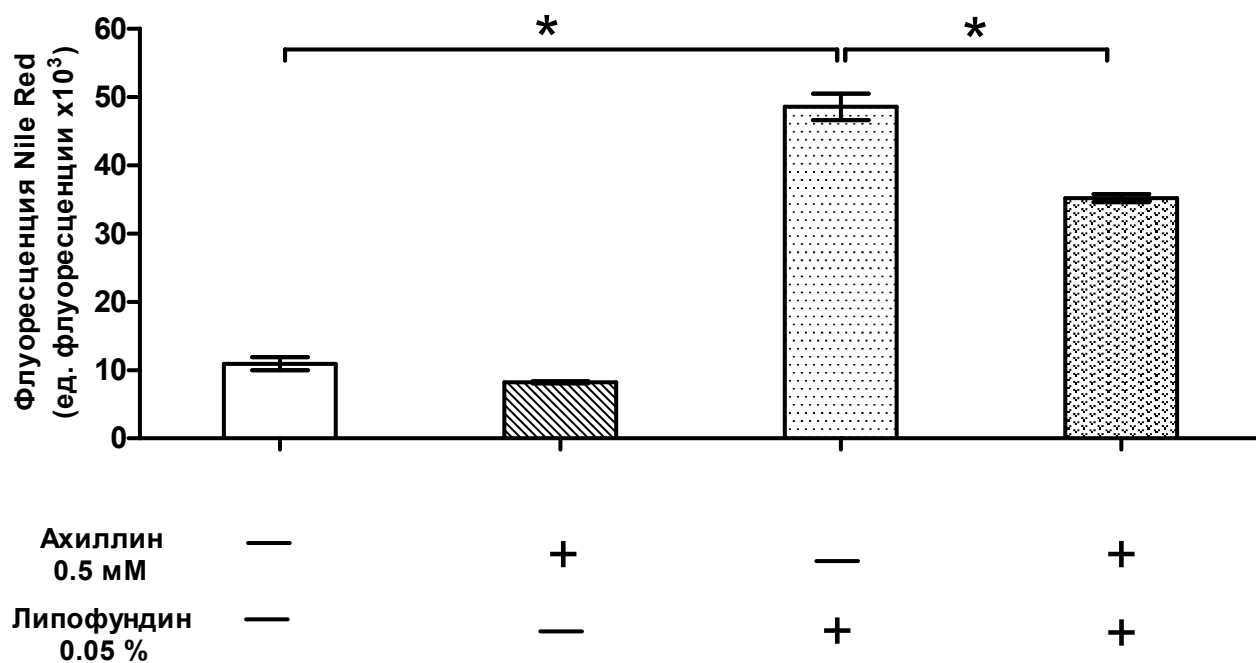
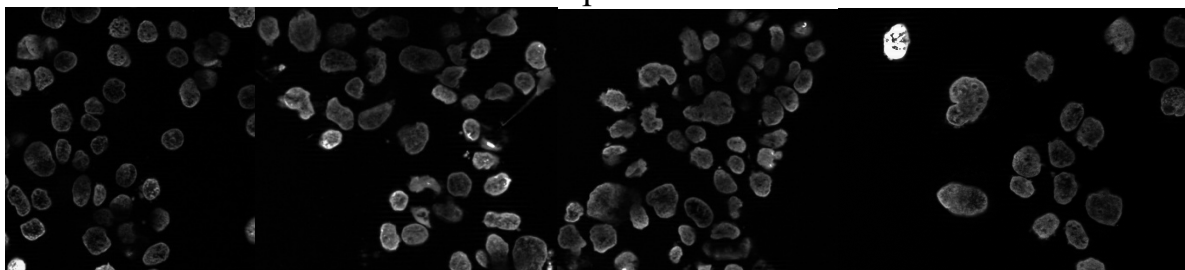


Рисунок 18. Флуоресценция липидов и ядер клеток гепатомы линии HTC, нагруженных зондами Nile Red и DAPI, при действии 0,5 мМ ахиллина и липофундина 0,05 % ($M \pm m$).

Примечание: зонд Nile Red окрашивает липиды в цитозоле клеток в зеленый цвет, зонд DAPI окрашивает ядра клеток в синий цвет; увеличение 40х. * – уровень статистической значимости различий по сравнению с клетками гепатомы соответствующей группы при $p < 0,05$.

интенсивности флуоресценции Nile Red, снижение уровня ТАГ и холестерина в клеточной культуре гепатомы линии НТС.

Однако механизм, с помощью которого ахиллин снижает содержание липидов в клетках гепатомы, неизвестен. Поэтому для установления механизмов гиполипидемического действия сесквитерпенового лактона ахиллина в экспериментальной модели гиперлипидемии на клеточной культуре НТС, необходимо исследовать экспрессию мРНК ключевых генов метаболизма липидов.

3.2. Влияние сесквитерпенового лактона ахиллина на величину экспрессии мРНК ключевых генов метаболизма липидов при экспериментальной гиперлипидемии в клеточной культуре гепатомы линии НТС

3.2.1. Изучение влияния ахиллина на величину экспрессии мРНК гена рецептора к липопротеинам низкой плотности (*Ldlr*) в клеточной культуре линии НТС

Одним из процессов, определяющим уровень внутриклеточного холестерина, является его поступление в клетку в составе частиц ЛПНП путем рецептор-опосредованного пиноцитоза, осуществляемого с участием рецепторов к ЛПНП, расположенных на плазматической мембране гепатоцитов (Goldstein J. L. et al., 2006).

В результате проведенных нами экспериментов было установлено, что добавление в инкубационную среду липофундина 0,05 % приводило к ингибированию экспрессии мРНК гена рецептора к ЛПНП (*Ldlr*) на 57 % ($0,43 \pm 0,09$ усл. ед., $p < 0,05$) (Рисунок 19). Препарат сравнения гемфиброзил, напротив, увеличивал в 2,5 раза величину экспрессии гена *Ldlr* ($2,51 \pm 0,25$ усл. ед., $p < 0,05$) (Рисунок 19). Сесквитерпеновый лактон ахиллин не оказывал

влияния на экспрессию гена *Ldlr* и величина экспрессии составляла $1,06 \pm 0,06$ усл. ед. ($p > 0,05$) (Рисунок 19).

Анализ изученной литературы позволяет говорить о том, что ключевым регулятором экспрессии гена рецептора к ЛПНП (*Ldlr*) являются транскрипционные факторы – SREBPs, которые образуются из предшественника pre-SREBP (Wang X. et al., 1994; Колчанов Н. А. и др., 2006). Скорость перехода предшественника в активную форму зависит от концентрации холестерина и при его высоком уровне эта реакция подавляется (Yang T. et al., 2002). Неактивный предшественник pre-SREBP накапливается в мембранах эндоплазматического ретикулума в комплексе с белком SCAP. При низком уровне холестерина белок SCAP обеспечивает транспорт белка pre-SREBP в аппарат Гольджи, где происходит протеолитическое расщепление молекулы pre-SREBP с образованием активного белка SREBP. Активный SREBP проникает в ядро клетки и активирует экспрессию генов, контролирующих биосинтез холестерина и его поглощение из внеклеточного пространства (De Souza M. O. et al., 2012; Lee S. M. et al., 2012).

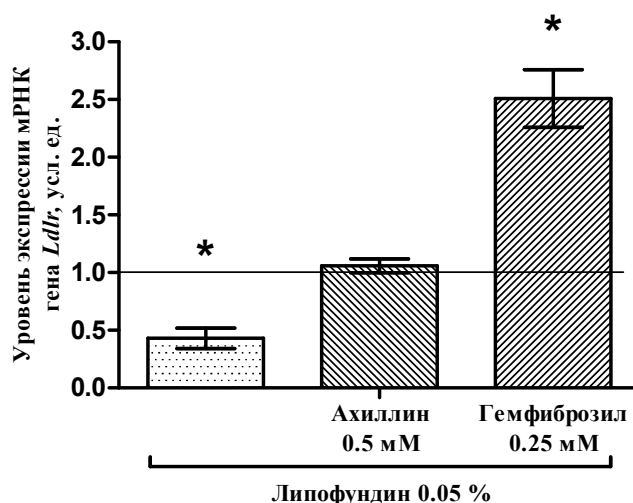


Рисунок 19. Влияние липофундина (0,05 %), ахиллина (0,5 мМ) и гемфиброзила (0,25 мМ) на величину экспрессии мРНК гена рецептора к липопротеинам низкой плотности (*Ldlr*) в клеточной культуре гепатомы линии НТС ($M \pm m$).

Примечание: величина экспрессии мРНК генов выражена в усл. ед. и нормализована по гену-рефери β -актину (*Actb*) и контролю (клетки инкубировали с растворителем ДМСО). *Ldlr* – рецептор к липопротеинам низкой плотности. Относительная экспрессия мРНК гена в контроле принята за единицу; * – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателем в контрольной культуре при $p < 0,05$.

В итоге активация SREBP приводит к увеличению транскрипции рецептора к ЛПНП – трансмембранного гликопротеида, имеющего апоВ- и апоЕ- лиганды. Рецепторы к ЛПНП опосредуют перенос в клетку холестеринсвязывающих липопротеинов путем эндоцитоза, контролируя уровень холестерина в клетках и плазме (Ikonen E., 2008; Sato R., 2010).

Обсуждаемое нами ингибирование экспрессии гена рецептора к ЛПНП при инкубировании клеток гепатомы с липофундином может быть обусловлено фосфорилированием АМФ-активируемой протеинкиназы. Подтверждением этого могут служить данные O.Tiresh с коллегами (2009), показавших в экспериментах *in vitro*, что добавление липофундина в клеточную культуру гепатокарциномы линии FaO приводит к фосфорилированию АМФК (Tiresh O. et al., 2009). В то же время известно, что активная (фосфорилированная) АМФК фосфорилирует транскрипционные факторы SREBPs. В результате ингибируются процессы транспорта белка pre-SREBP в аппарат Гольджи и проникновения активного SREBP в ядро клетки. Это приводит к подавлению экспрессии SREBP-1c и SREBP-2 респонсивных генов, контролирующих биосинтез жирных кислот, ТАГ и холестерина, а также поступление холестерина в составе ЛПНП с помощью рецепторов к ЛПНП (Li Y. et al., 2011).

Из литературы известно, что фибраты повышают экспрессию гена *Ldlr* в гепатоме мышей линии AML12 и увеличивают связывание ЛПНП с культивируемыми клетками (Huang Z. et al., 2008). Индукция экспрессии гена *Ldlr* фенофибратом зависит от PPAR- α и SRE. В основе механизма повышения экспрессии гена *Ldlr* лежит фосфорилирование протеинкиназы В (Akt) и обусловленная SREBP-2 транскрипция гена (Huang Z. et al., 2008).

В то же время нельзя исключить механизм повышения экспрессии мРНК гена *Ldlr* под влиянием гемфиброзила в культуре гепатомы линии HepG2 вследствие увеличения стабилизации (периода полураспада) мРНК гена *Ldlr* (Goto D. et al., 1997). Подобная активация экспрессии гена *LDLR* через посттрансляционный механизм стабилизации мРНК описана для алкалоида

берберина Huanglian (*Coptis chinensis*), обладающего выраженным гипохолестеролемическим действием (Kong W. et al, 2004).

Таким образом, увеличение экспрессии мРНК гена рецептора к ЛПНП (*Ldlr*) под влиянием гемфиброзила может быть обусловлено активацией транскрипционных факторов SREBP и PPAR- α . Сесквитерпеновый лактон ахиллин не оказывает существенного влияния на величину экспрессии мРНК гена *Ldlr* в клеточной культуре гепатомы линии НТС при экспериментальной гиперлипидемии, индуцированной жировой эмульсией липофундином.

3.2.2. Изучение влияния ахиллина на величину экспрессии мРНК гена фермента 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА редуктазы (*Hmgcr*) в клеточной культуре линии НТС

Фермент ГМГ-КоА-редуктаза локализован на эндоплазматическом ретикулуме и пероксисомах и лимитирует скорость биосинтеза холестерина. Этот фермент экспрессируется во всех тканях, но в наибольшем количестве в печени, которая играет центральную роль в регуляции метаболизма холестерина и его концентрации в плазме крови (Wang Y. M. et al., 2010).

В результате экспериментов было установлено, что экспрессия мРНК гена *Hmgcr* при действии липофундина (0,05 %) уменьшилась на 45 % по сравнению с контролем - $0,55 \pm 0,07$ усл. ед. ($p < 0,05$) (Рисунок 20).

Ахиллин, напротив, увеличивал экспрессию гена *Hmgcr* в 1,4 раза ($1,41 \pm 0,14$ усл. ед., $p < 0,05$) (Рисунок 20), а гемфиброзил ($0,97 \pm 0,06$ усл. ед., $p > 0,05$) не оказывал существенного влияния на экспрессию гена *Hmgcr* по сравнению с контролем (Рисунок 20).

Известно, что конечный продукт метаболического пути – холестерол, 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 уровне (через процессы фосфорилирования/дефосфорилирования) (Goldstein J. L. et al., 2006).

SREBPs – мембраносвязанные транскрипционные факторы, которые транскрипционно регулируют экспрессию гена *Hmgcr* и другие ферменты пути биосинтеза холестерина вместе с генами, кодирующими рецептор к ЛПНП, и сам SREBP-2 (Roglans N. et al., 2001).

Возможный механизм снижения уровня мРНК гена *Hmgcr* при культивировании клеточной культуры линии НТС с липофундином может быть обусловлен фосфорилированием АМФК, которая ингибирует, как сам фермент ГМГ-КоА-редуктазу (Anavi S. et al., 2010), так и транскрипционный фактор SREBP-2 (Li Y. et al., 2011). В результате этого блокируется эндогенный синтез холестерина в клетках.

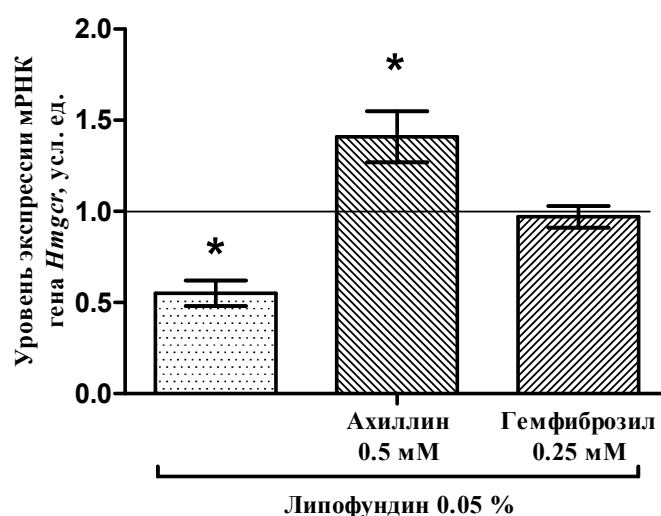


Рисунок 20. Влияние липофундина (0,05 %), ахиллина (0,5 мМ) и гемфиброзила (0,25 мМ) на величину экспрессии мРНК гена фермента ГМГ-КоА-редуктазы (*Hmgcr*) в клеточной культуре гепатомы линии НТС ($M \pm m$).

Примечание: величина экспрессии мРНК генов выражена в усл. ед. и нормализована по гену-рефери β -актину (*Actb*) и контролю (клетки инкубировали с растворителем ДМСО). *Hmgcr* – 3-гидрокси-3-метилглутарил КоА редуктаза. Относительная экспрессия мРНК гена в контроле принята за единицу; * – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателем в контрольной культуре при $p < 0,05$.

Для гиполипидемического препарата симвастатина показано, что конкурентное ингибирование фермента ГМГ-КоА редуктазы в культуре гепатомы человека запускает скоординированную регуляцию экспрессии генов, кодирующих ГМГ-КоА редуктазу и рецептор к ЛПНП. Ингибирование ГМГ-КоА-редуктазы *in vivo* статинами вызывает комплексный ответ, сопровождающийся повышением экспрессии генов *Hmgcr* и рецепторов к ЛПНП (Goldstein J. L. et al., 2006). Повышение количества рецепторов к ЛПНП способствует увеличению захвата богатых холестерином ЛПНП из кровеносного русла и по механизму отрицательной обратной связи - снижению экспрессии гена *Hmgcr*. В отличие от этого, в экспериментах *in vitro* при культивировании клеток гепатомы в среде, не содержащей сыворотку, уровень холестерина в клетках определяется только эндогенным синтезом, и снижение холестерологенеза при действии препаратов приводит к быстрой индукции рецепторов к ЛПНП. В экспериментах *in vivo* другие факторы, такие как снижение образования ЛПНП или усилении поглощения клетками ЛПНП, вносят свой вклад в гипохолестеролемический эффект препаратов (Qin W. et al., 1992).

Можно предполагать, что увеличение экспрессии гена ГМГ-КоА-редуктазы, обнаруженное в наших экспериментах при инкубации клеток гепатомы с ахиллином, обусловлено снижением содержания холестерина при действии ахиллина, что, собственно, и подтверждается полученными результатами (Рисунок 17Б). Известно, что снижение уровня холестерина по принципу отрицательной обратной связи приводит к увеличению экспрессии гена данного фермента (Goldstein J. L. et al., 2006).

3.2.3. Изучение влияния ахиллина на величину экспрессии мРНК гена фермента ацетилКоА: холестеролацилтрансферазы (*Soat1*) в клеточной культуре линии НТС

АХАТ (*Soat1*) – фермент, катализирующий образование эфиров холестерина из холестерина (Lee M. K. et al., 2003).

Проведенное исследование позволило установить, что культивирование клеточной культуры НТС с липофундином приводило к снижению величины экспрессии мРНК гена *Soat1* на 62 % – $0,38 \pm 0,05$ усл. ед. ($p < 0,05$), а ахиллин и гемфиброзил ингибировали экспрессию гена на 50 и 45 % – $0,50 \pm 0,06$ и $0,55 \pm 0,05$ усл. ед. ($p < 0,05$), соответственно (Рисунок 21).

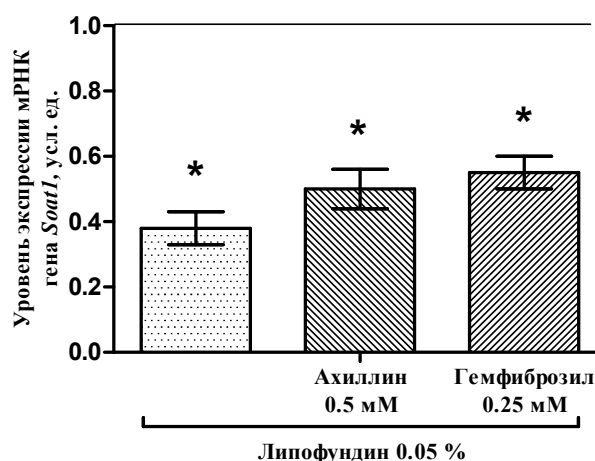


Рисунок 21. Влияние липофундина (0,05 %), ахиллина (0,5 мМ) и гемфиброзила (0,25 мМ) на величину экспрессии мРНК гена фермента АХАТ (*Soat1*) в клеточной культуре гепатомы линии НТС ($M \pm m$).

Примечание: величина экспрессии мРНК генов выражена в усл. ед. и нормализована по гену-рефери β-актину (*Actb*) и контролю (клетки инкубировали с растворителем ДМСО). *Soat1* – АХАТ. Относительная экспрессия мРНК гена в контроле принята за единицу; * – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателем в контрольной культуре при $p < 0,05$.

Известно, что ингибиторы АХАТ снижают уровень холестерина в плазме, уменьшая абсорбцию холестерина, поступающего с пищей, и подавляя образование и секрецию аполипопротеин В содержащих липопротеинов, таких как ЛПОНП в печени и хиломикронов в кишечнике (Miyazaki A. et al., 2003).

3.2.4. Изучение влияния ахиллина на величину экспрессии мРНК гена фермента 7α-гидроксилазы (*Cyp7a1*) в клеточной культуре линии НТС

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*) (Chen Z. Y. et al., 2008).

Культивирование клеток с липофундином приводило к ингибированию экспрессии гена *Cyp7a1* на 75 % и величина экспрессии составляла $0,25 \pm 0,06$ усл. ед. ($p < 0,05$) (Рисунок 22). Гемфиброзил также снижал величину экспрессии мРНК гена *Cyp7a1*, но на 27 % ($0,73 \pm 0,09$ усл. ед., $p < 0,05$) (Рисунок 22). Действительно, ранее было показано, что фибраты, в том числе гемфиброзил, уменьшают экспрессию мРНК гена *Cyp7a1* у пациентов с гиперлипидемией (Marrapodi M. et al., 2000; Roglans N. et al., 2004) и в клеточной культуре гепатомы HepG2 (Gbaguidi G. F. et al, 2004). 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 (Roglans N. et al, 2004). Поэтому гемфиброзил противопоказан больным с желчнокаменной болезнью.

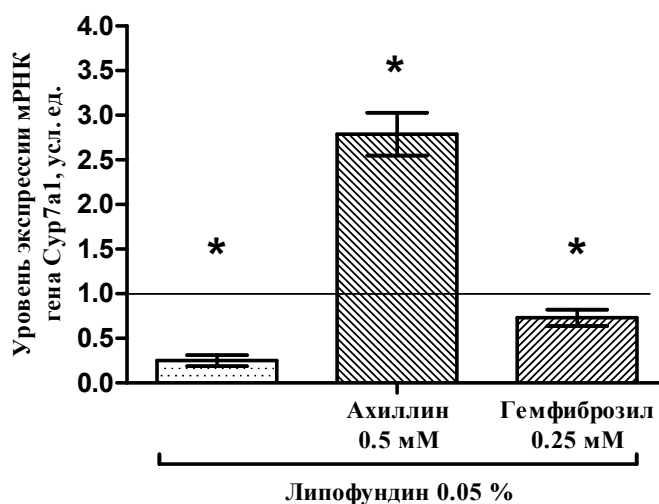


Рисунок 22. Влияние липофундина (0,05 %), ахиллина (0,5 мМ) и гемфиброзила (0,25 мМ) на величину экспрессии мРНК гена фермента 7 α -гидроксилаза (*Cyp7a1*) в клеточной культуре гепатомы линии НТС ($M \pm m$).

Примечание: величина экспрессии мРНК генов выражена в усл. ед. и нормализована по гену-рефери β -актину (*Actb*) и контролю (клетки инкубировали с растворителем ДМСО). *Cyp7a1* – 7 α -гидроксилаза. Относительная экспрессия мРНК гена в контроле принята за единицу; * – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателем в контрольной культуре при $p < 0,05$.

Ахиллин, напротив, повышал экспрессию мРНК гена *Cyp7a1* в 2,8 раза ($2,79 \pm 0,24$ усл. ед., $p < 0,05$) (Рисунок 22), что способствовало устранению избытка холестерина из организма путем секреции его в желчь или преобразования холестерина в желчные кислоты (Chen Z. Y. et al., 2008).

3.2.5. Изучение влияния ахиллина на величину экспрессии мРНК генов ферментов карнитин-пальмитоилтрансферазы I (*Cpt1a*) и II (*Cpt2*) в клеточной культуре линии НТС

Жирные кислоты с длинной углеводородной цепью переносятся через внутреннюю мембрану митохондрий с помощью карнитина. Карнитин-пальмитоилтрансфераза I (*Cpt1a*) является ферментом, регулирующим скорость окисления длинноцепочечных жирных кислот в митохондриях. Этот фермент расположен на внешней мембране митохондрий и осуществляет транспорт длинноцепочечных жирных кислот в митохондрии, катализируя реакцию с образованием ацилкарнитина (Bonnetfont J. P. et al, 2004). Образовавшийся ацилкарнитин проходит через межмембранное пространство к наружной стороне внутренней мембраны и транспортируется с помощью карнитин-ацилкарнитинтранслоказы на внутреннюю поверхность внутренней мембраны митохондрий, где фермент карнитин-пальмитоилтрансфераза II (*Cpt2*) катализирует перенос ацила на пул внутримитохондриального КоА (Bonnetfont J. P. et al, 2004).

Поэтому нами была исследована экспрессия обоих генов ферментов, участвующих в катаболизме жирных кислот. При культивировании клеток НТС с гемфиброзилем и ахиллином величина экспрессии гена *Cpt1a* увеличивалась в 3,7 ($3,73 \pm 0,21$ усл. ед., $p < 0,05$) и в 1,5 раза ($1,51 \pm 0,08$ усл. ед., $p < 0,05$), соответственно (Рисунок 23А). На величину экспрессии мРНК гена *Cpt1a* липофундин влияния не оказывал ($1,06 \pm 0,28$ усл. ед.) ($p > 0,05$) (Рисунок 23А),

однако ингибировал экспрессию гена *Cpt2* на 41 % ($p < 0,05$), при этом величина экспрессии гена составила $0,59 \pm 0,11$ усл. ед. (Рисунок 23Б). На величину экспрессии гена *Cpt2* гемфиброзил оказывал менее выраженное влияние ($2,24 \pm 0,3$ усл. ед., $p < 0,05$) (Рисунок 23Б), в то время как ахиллин повышал величину экспрессии мРНК гена *Cpt2* в 1,7 раза ($1,68 \pm 0,06$ усл. ед., $p < 0,05$) (Рисунок 23Б).

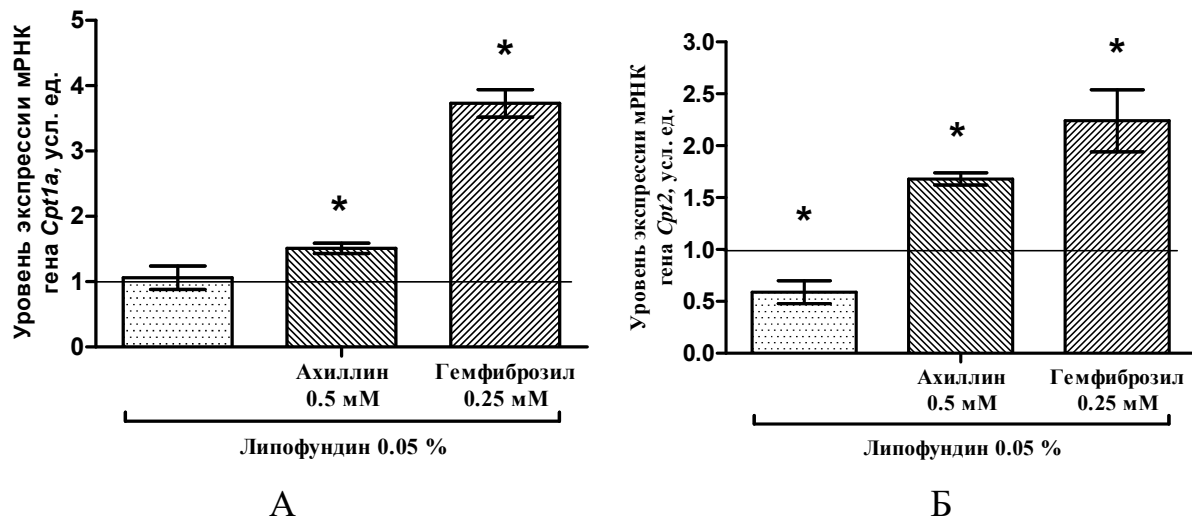


Рисунок 23. Влияние липофундина (0,05 %), ахиллина (0,5 мМ) и гемфиброзила (0,25 мМ) на величину экспрессии мРНК генов ферментов карнитин-пальмитоилтрансферазы I (*Cpt1a*) (А) и II (*Cpt2*) (Б) в клеточной культуре гепатомы линии НТС ($M \pm m$).

Примечание: величина экспрессии мРНК генов выражена в усл. ед. и нормализована по гену-рефеи β -актину (*Actb*) и контролю (клетки инкубировали с растворителем ДМСО). *Cpt1a* – карнитин-пальмитоилтрансфераза 1. *Cpt2* – карнитин-пальмитоилтрансфераза 2. Относительная экспрессия мРНК гена в контроле принята за единицу; * – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателем в контрольной культуре при $p < 0,05$.

Известно, что липофундин МСТ/ЛСТ содержит в своем составе соевое масло, которое преимущественно состоит из ненасыщенных жирных кислот (Burrin D. G. et al., 2014). Культивирование клеточной культуры гепатомы линии HepG2 с олеиновой кислотой (мононенасыщенной жирной кислотой) приводит к снижению экспрессии мРНК и белка PPAR- α (Kang O. H. et al., 2013). В то же время известно, что PPAR- α увеличивает экспрессию генов ферментов, вовлеченных в окисление длинноцепочечных жирных кислот (Staeles B. et al., 1995). Следовательно, снижение экспрессии гена фермента карнитин-

пальмитоилтрансферазы II, выявленное при инкубировании клеток гепатомы с липофундином, могло быть связано с ингибированием PPAR α .

Гемфиброзил является агонистом PPAR α (Ozansoy G. et al., 2004), поэтому отмечается увеличение экспрессии генов ферментов карнитин-пальмитоилтрансферазы 1 и 2, ответственных за катаболизм жирных кислот и снижение накопления триацилглицеролов в печени (Wang Y. M. et al., 2010). Можно предположить, что и ахиллин повышает экспрессию генов *Cpt1a* и *Cpt2* за счет активации PPARs.

3.2.6. Изучение влияния ахиллина на величину экспрессии мРНК гена фермента ацетил-КоА-карбоксилазы (*Acaca*) в клеточной культуре линии НТС

Ацетил-КоА-карбоксилаза (*Acaca*) – ключевой фермент синтеза жирных кислот, катализирующий карбоксилирование ацетил-КоА с образованием малонил-КоА (Munday M. R., Hemingway Ch. J., 1999).

В результате проведённых нами исследований установлено, что липофундин ингибировал экспрессию гена *Acaca* на 50 % ($p < 0,05$), при этом величина экспрессии составляла $0,50 \pm 0,03$ усл. ед. (Рисунок 24). Гемфиброзил увеличивал экспрессию мРНК гена фермента ацетил-КоА-карбоксилазы в клетках гепатомы НТС в 1,4 раза ($1,43 \pm 0,15$ усл. ед., $p < 0,05$) (Рисунок 24). Ахиллин не оказывал влияния на экспрессию исследуемого гена ($1,03 \pm 0,08$ усл. ед., $p > 0,05$) (Рисунок 24).

Увеличение экспрессии мРНК гена *Acaca* при действии гемфиброзила могло быть обусловлено снижением содержания субстрата ацетил-КоА, необходимого для синтеза малонил-КоА, поскольку увеличение экспрессии генов *Cpt1a* и *Cpt2* (Рисунок 23) усиливает β -окисление жирных кислот (Munday M. R et al., 1999).

Уменьшение экспрессии гена ацетил-КоА-карбоксилазы обнаруженное в условиях наших экспериментов при инкубировании клеток гепатомы с липофундином сопоставимо с результатами S. Anavi (2010), который показал, что введение липофундина крысам приводит к снижению экспрессии мРНК гена ацетил-КоА-карбоксилазы в печени (Anavi S. et al., 2010).

Возможным механизмом с помощью которого липофундин подавляет экспрессию гена *Acaca* может быть, на наш взгляд, нарушение связывания гетеродимера LXR α /RXR α с LXR-респонсивными элементами в промоторе гена *SREBP-1c* за счет ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав липофундина (Horton J. D. et al., 2002; Xiao X., Song B.-L., 2013). Известно, что транскрипционный фактор *SREBP-1c* является главным регулятором биосинтеза жирных кислот и ТАГ (Horton J. D. et al., 2002; Ikonen E., 2008; Sato R., 2010; Xiao X., Song B.-L., 2013).

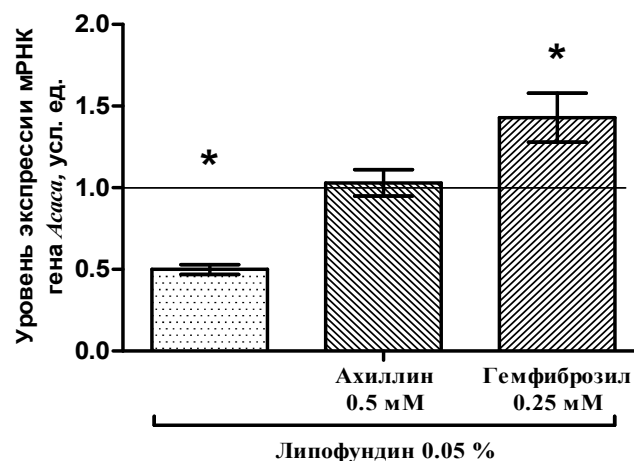
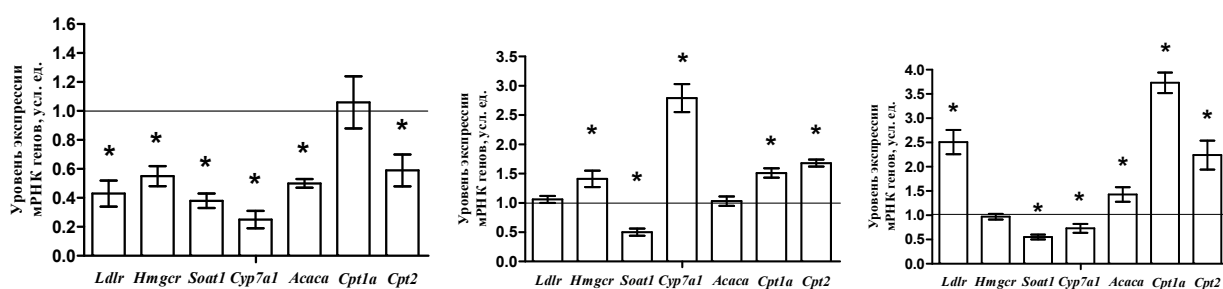


Рисунок 24. Влияние липофундина (0,05 %), ахиллина (0,5 мМ) и гемфиброзила (0,25 мМ) на величину экспрессии мРНК гена фермента ацетил-КоА-карбоксилазы (*Acaca*) в клеточной культуре гепатомы линии НТС ($M \pm m$).

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

Резюмируя сказанное можно заключить, что с одной стороны культивирование клеток гепатомы с липофундином вызывает блокирование

эндогенной продукции жирных кислот, ТАГ и холестерина, о чем свидетельствует ингибирование экспрессии мРНК генов ГМГ-КоА-редуктазы (*Hmgcr*) и ацетил-КоА-карбоксилазы (*Acaca*) (Рисунок 25А). С другой стороны, ингибирование экспрессии генов фермента карнитин-пальмитоилтрансферазы 2 приводит к снижению катаболизма жирных кислот, а ингибирование генов фермента АХАТ (*Soat1*) и рецептора к ЛПНП (*Ldlr*) - к уменьшению образованию эфиров холестерина и снижению захвата атерогенных ЛПНП (Рисунок 25А), что способствует накоплению ТАГ в печени.



А – липофундин 0,05 %

Б – ахиллин 0,5 мМ

В – гемфиброзил 0,25 мМ

Рисунок 25. Влияние липофундина (0,05 %) (А), ахиллина (0,5 мМ) (Б) и гемфиброзила (0,25 мМ) (В) на величину экспрессии мРНК ключевых генов метаболизма липидов в клеточной культуре гепатомы линии НТС (М±m).

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 различий по сравнению с показателями в контрольной культуре при $p < 0,05$.

Обозначение генов: *Ldlr* – рецептор к ЛПНП; *Hmgcr* – 3-гидрокси-3-метилглутарил КоА редуктаза; *Soat1* – АХАТ; *Cyp7a1* – 7α-гидроксилаза; *Acaca* – ацетил-КоА-карбоксилаза; *Cpt1a* – карнитин-пальмитоилтрансфераза 1; *Cpt2* – карнитин-пальмитоилтрансфераза 2.

Из литературы известно также, что липофундин может воздействовать на SREBP транскрипционные факторы через PI3K-Akt сигнальный путь (Kohli R. et al., 2007; Ru P. et al., 2013), вызывая гиперлипидемию в экспериментах *in vitro* (Ilan E. et al., 2005, Tirosh O. et al., 2009), и *in vivo* (Gura K. et al., 2007; Delgado Roche L. et al., 2012). Кроме того, O.Tirosh с коллегами (2009) показал, что липиды поступают в клетки из липофундина в виде ТАГ путем пиноцитоза или диффузии (Tirosh O. et al., 2009).

Гемфиброзил относится к дериватам фиброевой кислоты – группе гиполипидемических средств, влияющих преимущественно на обмен

липопротеиновых частиц, богатых ТАГ (хиломикроны, ЛПОНП и ЛППП). Фибраты являются агонистами PPAR α (Tenenbaum A. et al., 2012) и проявляют гиполипидемическое действие (Staels B. et al, 1998).

Нами было установлено, что на клеточной культуре гепатомы гемфиброзил индуцирует β -окисление жирных кислот, о чем свидетельствует увеличение экспрессии мРНК генов *Cpt1a* и *Cpt2* (Рисунок 25В). Ингибирование экспрессии гена фермента АХАТ (*Soat1*) приводит к уменьшению образования эфиров холестерина; увеличение экспрессии гена рецепторов к ЛПНП (*Ldlr*) способствует извлечению из циркуляции в крови атерогенных ЛПНП (Рисунок 25В).

В то же время, снижение экспрессии гена фермента 7α -гидроксилазы (*Cyp7a1*) (Рисунок 25В) приводит к уменьшению синтеза и секреции желчных кислот, что может привести к развитию желчнокаменной болезни, и, как следствие, ограничению применения фибратов (Roglans N. et al, 2004).

Возможным механизмом гиполипидемического действия сесквитерпенового лактона ахиллина может быть увеличение 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 7α -гидроксилазы (*Cyp7a1*) и со снижением накопления эфиров холестерина за счет ингибирования экспрессии гена фермента АХАТ (*Soat1*). Увеличение экспрессии гена ГМГ-КоА-редуктазы (*Hmgcr*) может быть вызвано снижением уровня холестерина в клетках гепатомы по механизму отрицательной обратной связи (Рисунок 25Б).

3.3. Влияние ахиллина на уровень активных форм кислорода и содержание восстановленного глутатиона в клеточной культуре линии НТС при экспериментальной гиперлипидемии

В настоящее время важная роль в патогенезе и прогрессировании дислипидемии и ассоциированных с ней метаболических заболеваний принадлежит окислительному стрессу (Бабак О. Я., Топчий И. И., 2004; Valko M. et al., 2007; Беленков Ю. Н. и соавт., 2009; Силина Е. В. и соавт., 2011; Шульпекова Ю. О., 2012; Иванов В. В. и соавт., 2013; Оганов О. Г., 2013; García-Ruiz I. et al., 2015). Гиперпродукция АФК, выявляемая при окислительном стрессе, приводит к пероксидации липидов, окислению липопротеинов, белков, нуклеиновых кислот, к увеличению уровней свободных радикалов, что вызывает истощение антиоксидантных систем организма и усугубляет течение данных заболеваний (Valko M. et al., 2007; Winer S. et al., 2009; Yin J. et al., 2009).

Антиоксидантное действие сесквитерпенового лактона ахиллина в настоящей работе исследовали в экспериментах *in vitro* на клеточной культуре гепатомы линии НТС по способности ингибировать образование АФК в клетках при стимуляции свободнорадикального окисления H_2O_2 в конечной концентрации 0,5 мМ.

Для регистрации уровня АФК клетки гепатомы были предварительно нагружены флуоресцентным зондом ДХФДА (10 мкМ), который после его деэстерификации внутриклеточными эстеразами способен взаимодействовать с окислителями с образованием флуоресцирующего продукта – ДХФ (Wang H., 1999; Halliwell B., Whiteman M., 2004; Мартинович Г. Г., 2005; Саенко Ю. В., 2011; Prieto A. M., 2013).

В результате эксперимента было установлено, что клетки гепатомы и исследуемое вещество ахиллин не обладали аутофлуоресценцией (Рисунок 26). Инкубация клеточной культуры НТС в течение 4 ч с ахиллином в конечной концентрации 0,5мМ не приводила к достоверному снижению уровня АФК ($p > 0,05$) (Рисунок 26).

Добавление прооксиданта H_2O_2 (0,5 мМ) в культуру клеток гепатомы вызывало повышение интенсивности флуоресценции ДХФ в 3,6 раза ($p < 0,05$) ($250,0 \pm 8,0$ ед. флуоресценции) по сравнению с контролем ($69,9 \pm 4,4$ ед. флуоресценции) (Рисунок 26). В клетках, которые предварительно инкубировали

с ахиллином, интенсивность флуоресценции ДХФ при добавлении H_2O_2 уменьшалась на 40,0 % ($p < 0,05$) ($150,4 \pm 7,6$ ед. флуоресценции) по сравнению с контролем (Рисунок 26).

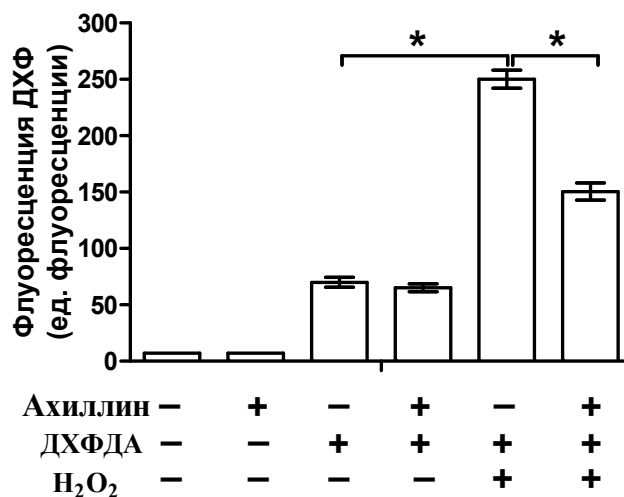


Рисунок 26. Уровень АФК после 4-х часовой инкубации с ахиллином (0,5 мМ) в клеточной культуре гепатомы линии НТС ($M \pm m$).

Примечание: ДХФ – дихлорофлуоресцеин, ДХФДА – 2,7-дихлородигидрофлуоресцеин, * – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями в соответствующей группе при $p < 0,05$.

Экспериментальная гиперлипидемия, индуцированная липофундином *in vitro*, приводила к увеличению уровня АФК в клетках: интенсивность флуоресценции ДХФ составляла $125,0 \pm 8,4$ ед. флуоресценции, что оказалось в 1,7 раза ($p < 0,05$) выше таковых значений в контрольной культуре ($69,9 \pm 4,4$ ед. флуоресценции) (Рисунок 27).

Из литературы известно, что инкубирование клеток гепатокарциномы с липофундином приводит к существенному повышению уровня АФК (Tirosh O. et al., 2009). Липофундин вызывал развитие окислительного стресса и у экспериментальных животных (Delgado Roche L. et al., 2012). При введении жировой эмульсии крысам в сыворотке крови экспериментальных животных повышался уровень МДА, увеличивалась активность СОД, каталазы и содержание окисленных белков. Это указывает на образование АФК и развитие окислительного стресса в организме крыс (Delgado Roche L. et al., 2012).

Добавление в инкубационную среду ахиллина в концентрации 0,5 мМ (на 48 ч) на модели гиперлипидемии, индуцированной липофундином, на клеточной культуре линии НТС приводило к снижению интенсивности флуоресценции ДХФ ($81,2 \pm 4,6$ ед. флуоресценции, $p < 0,05$), что может свидетельствовать о снижении уровня АФК в клетках гепатомы (Рисунок 27).

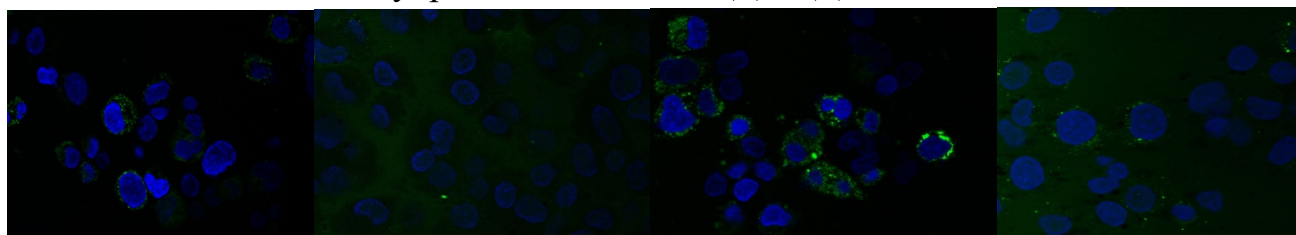
Таким образом, сесквитерпеновый лактон ахиллин оказывает выраженное антиоксидантное действие, о чём свидетельствует снижение интенсивности флуоресценции зонда на АФК в клеточной культуре НТС при стимуляции свободнорадикального окисления H_2O_2 и липофундином (Рисунок 26; 27).

Важную роль в антиоксидантной защите организма и поддержании окислительно-восстановительного баланса играет глутатион. Основной антиоксидантный эффект глутатиона реализуется посредством его участия в работе ферментативных антиоксидантов. Являясь субстратом для глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы, он выступает донором атомов водорода для восстановления H_2O_2 и липидных перекисей (Кулинский В. И., 2011). Вместе с тем GSH и SH-содержащие белки являются ингибиторами АФК и стабилизаторами биологических мембран (Janssen-Heininger Y. M. et al., 2013).

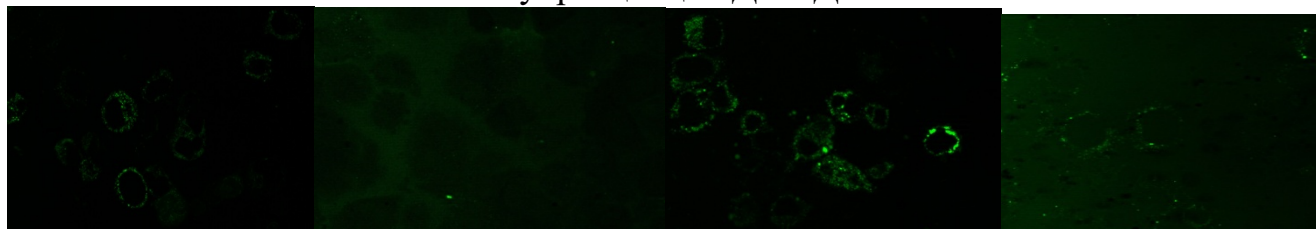
Основную потребность в глутатионе клетки решают за счёт эндогенного синтеза, поэтому восстановление уровня глутатиона в клетках обусловлено его биосинтезом *de novo*. GSH синтезируется с помощью двух последовательных АТФ-зависимых реакций, катализируемых глутамат цистеин лигазой и глутатионсинтетазой (Lu S. C., 1999). Глутамат цистеин лигаза (глутамилцистеинсинтетаза) катализирует первую и лимитирующую стадию в биосинтезе GSH (Кулинский В. И., 2011).

Сказанное определило целесообразность исследования влияния ахиллина на содержание восстановленного глутатиона в клетках гепатомы линии НТС. Для регистрации содержания GSH клетки гепатомы были предварительно нагружены флуоресцентным зондом на трипептид – mCB (50 мкМ). Реакцию образования аддукта глутатиона с mCB (GSH - mCB), который обладает флуоресценцией,

Флуоресцентные зонды ДХФДА и DAPI



Флуоресценция ДХФДА



Флуоресценция DAPI

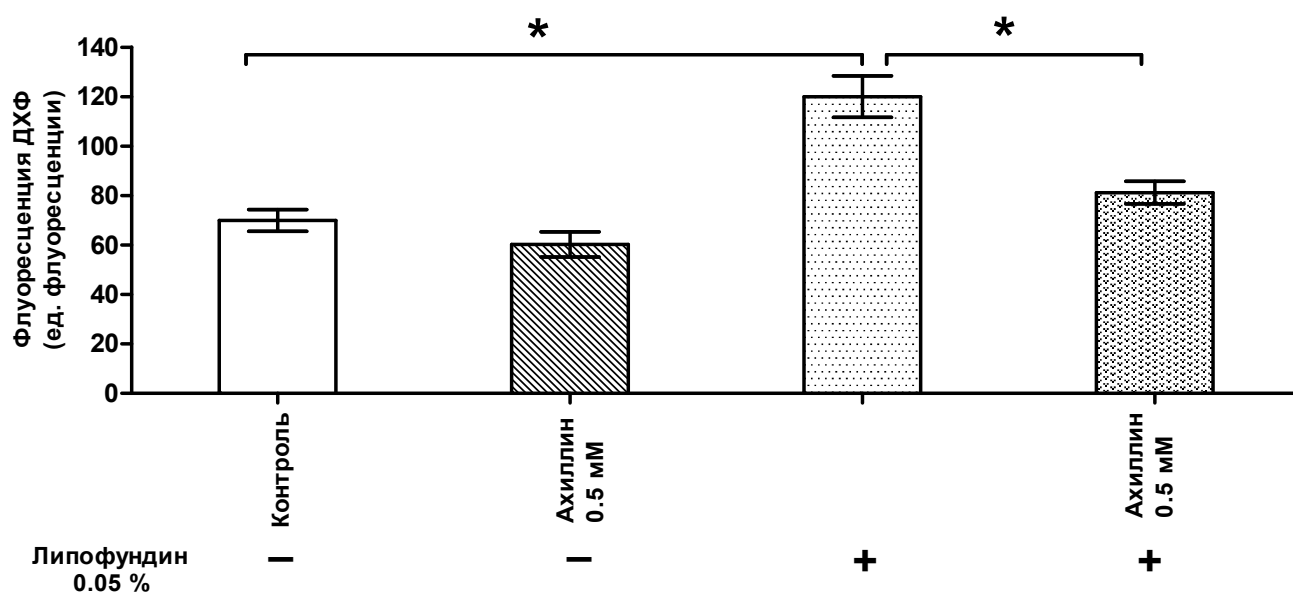
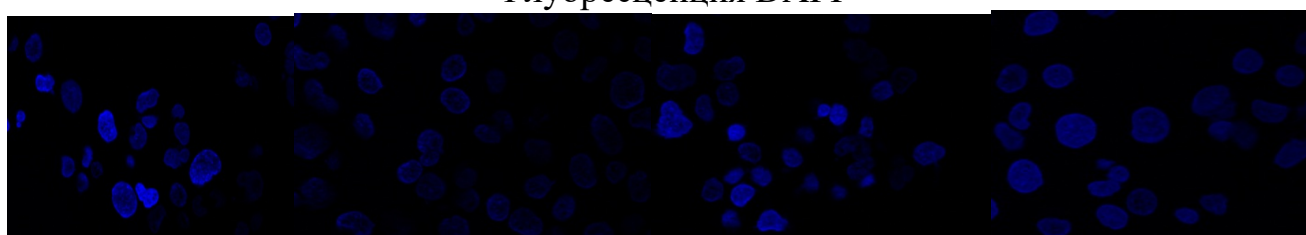


Рисунок 27. Уровень АФК в клеточной культуре гепатомы линии НТС, нагруженной зондами 2,7 – дихлородигидрофлуоресцеином диацетатом (ДХФДА) и DAPI, при действии 0,5 мМ ахиллина и липофундина 0,05 % ($M \pm m$).

Примечание: ДХФ – дихлорфлуоресцеин, ДХФДА окрашивает активные формы кислорода в цитозоле клеток в зеленый цвет, зонд DAPI окрашивает ядра клеток в синий цвет, * – уровень статистической значимости различий по сравнению с клетками гепатомы соответствующей группы при $p < 0,05$.

катализирует внутриклеточная глутатион-S-трансфераза (Kamencic H., 2000; Sebastia J., 2003; Саенко Ю.В., 2011).

В результате проведённых нами экспериментов было установлено, что после инкубации клеток с ахиллином в течение 48 ч интенсивность флуоресценции аддукта GSH-mCB составляла $819,63 \pm 67,4$ ед. флуоресценции/ДНК в клетках (в контроле $765,4 \pm 34,5$ ед. флуоресценции/ДНК в клетках) ($p > 0,05$) (Рисунок 28).

Добавление липофундина в инкубационную среду к клеточной культуре НТС приводило к снижению содержания восстановленного глутатиона на 47,5 % ($402,0 \pm 38,4$ ед. флуоресценции/ДНК в клетках, $p < 0,05$), по сравнению с контролем (Рисунок 28).

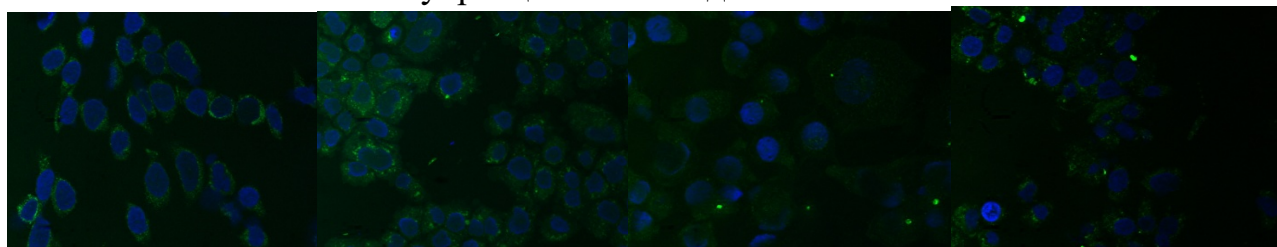
Таким образом, индуцированный липофундином окислительный стресс в культуре НТС сопровождается снижением содержания GSH – основного антиоксиданта клеток гепатомы. Ранее в экспериментах *in vivo* было показано, что введение липофундина кроликам приводит к существенному уменьшению содержания глутатиона в сыворотке крови, что подтверждает снижение антиоксидантного потенциала (Delgado Roche L. et al., 2012, Maiese K. et al., 2010).

Культивирование клеток гепатомы с исследуемым сесквитерпеновым лактоном при экспериментальной гиперлипидемии, индуцированной липофундином, вызывало увеличение интенсивности флуоресценции GSH-mCB в 1,5 раза ($p < 0,05$) ($590,0 \pm 46,1$ ед. флуоресценции/ДНК в клетках), по сравнению с величиной данного показателя в клеточной культуре с липофундином (Рисунок 28). Это свидетельствует об увеличении содержания восстановленного глутатиона в клетках гепатомы под влиянием ахиллина.

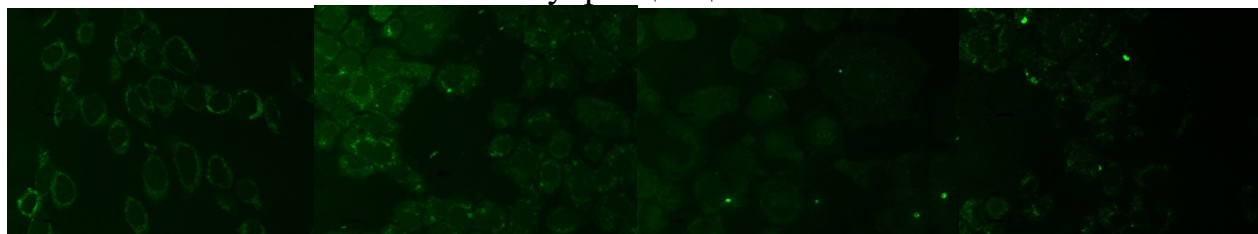
Известно, что некоторые сесквитерпеновые лактоны обладают антиоксидантным действием (Eliza J. et al., 2009; Galani V.J. et al., 2010; Mahesh A. et al., 2010; Роднова Е.А. и соавт., 2011, 2012; Адекенов С.М. и соавт., 2012).

Показана высокая антиоксидантная активность для сферантуса индийского (*Sphaeranthus indicus*) (Galani V.J. et al., 2010; Mahesh A. et al., 2010). Сесквитерпеновые лактоны ванилосмин и костунолид снижают интенсивность перекисного окисления липидов и повышают активность ферментов антиоксидантной защиты – СОД, каталазы и глутатионпероксидазы

Флуоресцентные зонды mCB и DAPI



Флуоресценция mCB



Флуоресценция DAPI

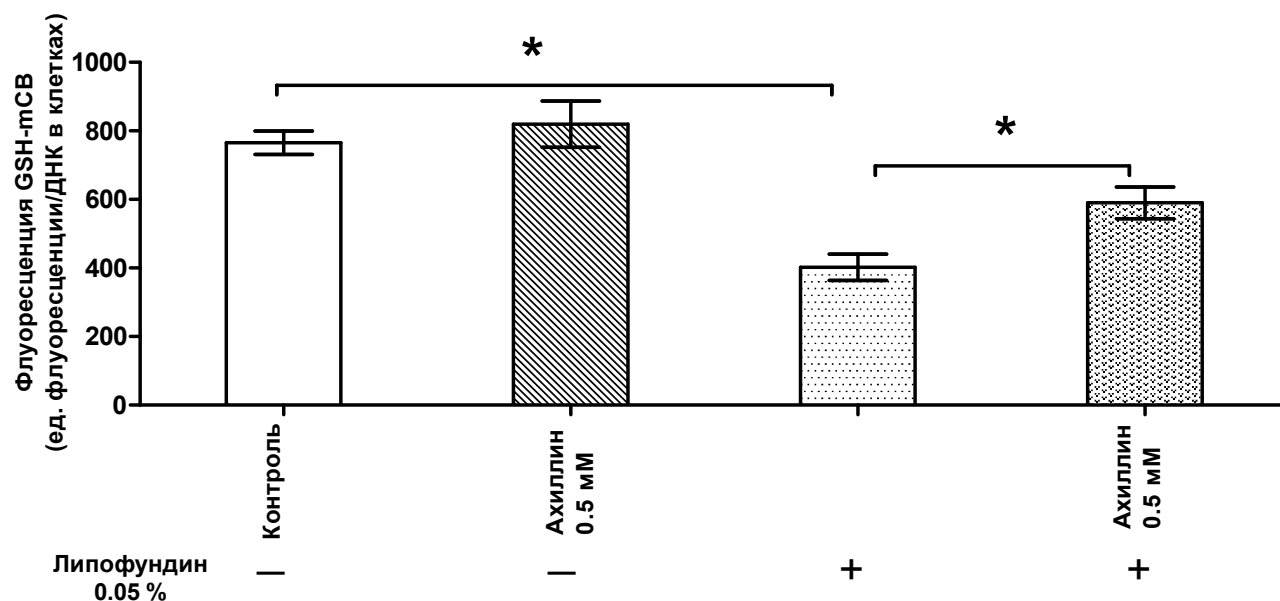
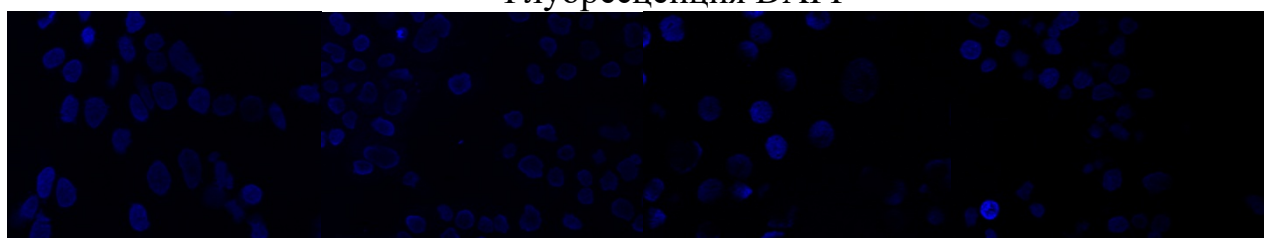


Рисунок 28. Содержание восстановленного глутатиона (GSH) в клеточной культуре гепатомы линии HTC, нагруженной зондами монохлоробиманом (mCB) и DAPI, при действии 0,5 мМ ахиллина и липофундина 0,05 % ($M \pm m$).

Примечание: монохлоробиман окрашивает восстановленный глутатион в цитозоле клеток в зеленый цвет, зонд DAPI окрашивает ядра клеток в синий цвет, * – уровень статистической значимости различий по сравнению с клетками гепатомы соответствующей группы при $p < 0,05$.

(Eliza J.etal.,2009). Выделенные из одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale*) сесквитерпеновые лактоны проявляют антиоксидантное действие за

счет повышения уровня глутатиона в печени мышей (Mahesh A. et al., 2010). Сесквитерпеновый лактон леукомизин проявляет антиоксидантную активность за счет снижения содержания ТБК-реактивных продуктов, диеновых конъюгатов и гидроперекисей липидов и повышает активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы (Роднова Е.А. и соавт., 2011, 2012; Адекенов С.М. и соавт., 2012).

АФК действуют на клетки путем изменения активности редокс-чувствительных транскрипционных факторов (Меньщикова Е. Б.и соавт., 2010). Особое место среди них занимает сигнальный путь Keap1/Nrf2, активирующий экспрессию генов за счет взаимодействия транскрипционного фактора Nrf2 с антиоксидант-респонсивным элементом, который контролирует в клетках млекопитающих более двухста генов, в том числе ключевой фермент синтеза глутатиона – глутамилцистеинсинтетазу (Меньщикова Е. Б. и соавт., 2006; Halliwell B., 2012). Многие фенолы природного происхождения, в том числе флавоноиды, проявляют способность активировать транскрипцию генов, регулируемых с участием антиоксидант-респонсивного элемента (Меньщикова Е. Б. и соавт., 2010).

Повышение содержания GSH в клетках гепатомы под влиянием ахиллина может быть обусловлено его взаимодействием с антиоксидант-респонсивным элементом и индукцией ключевого фермента синтеза глутатиона – γ -глутамилцистеинсинтетазы, что требует дальнейшего изучения.

Таким образом, экспериментальная гиперлипидемия, индуцированная липофундином, сопровождается увеличением уровня АФК и развитием окислительного стресса в клетках гепатомы. Ахиллин препятствует развитию окислительного стресса в клеточной культуре линии НТС, оказывая не прямое антиоксидантное действие за счет повышения содержания восстановленного глутатиона.

В организме человека и животных лекарства подвергаются абсорбции, распределению, метаболизму и экскреции (принцип АРМЭ). Эти процессы определяют концентрацию лекарства в кровотоке и тканях с течением времени

(Сенявина Н. В. и соавт., 2013). Инкубирование клеток в культуральных флаконах не воссоздает микроокружение, как в целом организме, которое участвует в процессах АРМЭ (Esch M. B. et al., 2011). Поэтому следующей стадией после тестирования лекарственных веществ на клеточных культурах являются испытания на экспериментальных животных.

3.4. Гиполипидемическое действие ахиллина на фоне острой экспериментальной гиперлипидемии, индуцированной этиловым спиртом

Для выявления гиполипидемической активности, в соответствии с рекомендациями «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Миронов А. Н., 2012), были проведены опыты на крысах с курсовым введением в течение 7 суток сесквитерпенового лактона ахиллина в дозе 10 мг/кг в условиях экспериментальной гиперлипидемии.

Модель гиперлипидемии воспроизводили у экспериментальных животных при однократном введении этилового спирта в дозе 5 г/кг в виде 40 %-го раствора. Введение этанола стимулирует выработку адреналина надпочечниками, что приводит к повышенному липолизу в жировой ткани, увеличению захвата СЖК из крови при участии транспортного связывающего белка, ускорению синтеза жирных кислот и их этерификации в ТАГ (Sapronov N. S. et al., 2006).

Кроме того, этиловый спирт стимулирует синтез холестерина и его эфиров и параллельно тормозит β -окисление жирных кислот в митохондриях (Sapronov N.S. et al., 2006). Таким образом, введение этанола стимулирует липолиз в жировой ткани, повышает депонирование ТАГ в печени, что приводит к развитию гиперлипидемии (Хабриев Р.У., 2005).

Через 6 ч после однократного введения этилового спирта у экспериментальных крыс уровень ТАГ и СЖК в сыворотке крови повышался в 1,9 ($p < 0,05$) – до $1,55 \pm 0,13$ ммоль/л и в 3,2 раза ($p < 0,05$) – до $2,73 \pm 0,30$ ммоль/л

по сравнению с соответствующими показателями у контрольных животных ($0,83 \pm 0,07$; $0,85 \pm 0,07$ ммоль/л, соответственно) (Таблица 9). Действительно, одним из механизмов развития острой гиперлипидемии, вызванной этанолом, является активация липолиза, приводящая к значительному повышению уровня СЖК в сыворотке крови, которые в печени участвуют в синтезе ТАГ и способствуют развитию гиперлипидемии (Хабриев Р. У., 2005). Известно, что уровень СЖК повышается в крови за счет снижения их окисления на фоне избыточного образования восстановленных форм пиридиннуклеотидов (НАДН и НАДФН) в алкогольдегидрогеназной реакции (Song B. J., 2014).

Введение этанола крысам также вызывало увеличение концентрации ХС-ЛПНП в 1,7 раза ($p < 0,05$) ($0,36 \pm 0,02$ ммоль/л) по сравнению с таковой в контроле ($0,21 \pm 0,02$ ммоль/л) (Таблица 9). Это приводило к уменьшению отношения неатерогенного ХС-ЛПВП к атерогенному ХС-ЛПНП на 51 % ($p < 0,05$) ($2,56 \pm 0,22$) по сравнению с контролем ($5,21 \pm 0,25$) (Таблица 9).

Развитие острой гиперлипидемии у экспериментальных животных после однократного введения этилового спирта подтверждается повышением содержания липидов в печени крыс. При этом уровень холестерина в печени увеличивался в 1,8 раза ($p < 0,05$) и составлял $3,63 \pm 0,25$ мг/г, а уровень ТАГ – в 2 раза ($p < 0,05$) и соответствовал $10,26 \pm 0,4$ мг/г по сравнению с контрольными величинами (холестерол – $1,94 \pm 0,06$ мг/г; ТАГ – $4,87 \pm 0,33$ мг/г) (Таблица 9). Увеличение содержания ТАГ и холестерина в печени было обусловлено усилением поглощения печенью циркулирующих в крови липопротеинов, уменьшением окисления и увеличением биосинтеза СЖК, повышением продукции холестерина и его эфиров.

Полученные результаты свидетельствуют о развитии острой гиперлипидемии у экспериментальных животных на фоне однократного введения этилового спирта в дозе 5 г/кг в виде 40 %-го раствора.

Курсовое введение ахиллина на фоне острой гиперлипидемии у крыс, индуцированной этиловым спиртом, вызывало снижение уровня ТАГ, ХС и СЖК на 49,8 ($0,77 \pm 0,08$ ммоль/л, $p < 0,05$), 14,6 ($1,64 \pm 0,07$ ммоль/л, $p < 0,05$) и 42,1 %

($1,58 \pm 0,20$ ммоль/л, $p < 0,05$), соответственно. Никотиновая кислота (положительный контроль) понижала уровень ТАГ, ХС и СЖК на 42,4 ($0,89 \pm 0,08$ ммоль/л, $p < 0,05$), 17,2 ($1,59 \pm 0,07$ ммоль/л, $p < 0,05$) и 67,9 % ($1,19 \pm 0,24$ ммоль/л, $p < 0,05$), соответственно (Таблица 9).

Таблица 9

Влияние сесквитерпенового лактона ахиллина на показатели липидного обмена при экспериментальной острой гиперлипидемии, индуцированной этанолом ($M \pm m$, $n=9$)

Показатели	Экспериментальные группы			
	I	II	III	IV
	Контроль	Этанол	Ахиллин+этанол	Никотиновая кислота +этанол
ТАГ, ммоль/л	$0,83 \pm 0,07$	$1,55 \pm 0,13$ $p_{II-I} < 0,05$ +86 %	$0,77 \pm 0,08$ $p_{III-II} < 0,05$ -49,8 %	$0,89 \pm 0,08$ $p_{IV-II} < 0,05$ -42,4 %
ХС, ммоль/л	$2,08 \pm 0,11$	$1,92 \pm 0,06$	$1,64 \pm 0,07$ $p_{III-II} < 0,05$ -14,6 %	$1,59 \pm 0,07$ $p_{IV-II} < 0,05$ -17,2 %
СЖК, ммоль/л	$0,85 \pm 0,07$	$2,73 \pm 0,30$ $p_{I-II} < 0,05$ +220 %	$1,58 \pm 0,20$ $p_{III-II} < 0,05$ -42,1 %	$1,19 \pm 0,24$ $p_{IV-II} < 0,05$ -67,9 %
ХС-ЛПНП, ммоль/л	$0,21 \pm 0,02$	$0,36 \pm 0,02$ $p_{I-II} < 0,05$ +71 %	$0,30 \pm 0,02$ $p_{III-II} < 0,05$ -15,8 %	$0,30 \pm 0,01$ $p_{IV-II} < 0,05$ -15,7 %
ХС-ЛПВП, ммоль/л	$1,08 \pm 0,07$	$0,90 \pm 0,06$	$0,95 \pm 0,05$	$0,94 \pm 0,07$
Индекс атерогенности	$0,99 \pm 0,1$	$1,22 \pm 0,17$	$0,73 \pm 0,06$ $p_{III-II} < 0,05$ -39,9 %	$0,81 \pm 0,21$
ХС-ЛПВП/ХС-ЛПНП	$5,21 \pm 0,25$	$2,56 \pm 0,22$ $p_{I-II} < 0,05$ -51 %	$3,29 \pm 0,29$ $p_{III-II} < 0,05$ +28,7 %	$3,13 \pm 0,23$ $p_{IV-II} < 0,05$ +22,1 %
ТАГ в печени, мг/г	$4,87 \pm 0,33$	$10,26 \pm 0,4$ $p_{I-II} < 0,05$ +110 %	$5,44 \pm 0,36$ $p_{III-II} < 0,05$ -46,9 %	$6,71 \pm 0,39$ $p_{IV-II} < 0,05$ -34,6 %
ХС в печени, мг/г	$1,94 \pm 0,06$	$3,63 \pm 0,25$ $p_{I-II} < 0,05$ +87 %	$2,81 \pm 0,30$ $p_{III-II} < 0,05$ -22,7 %	$2,96 \pm 0,19$ $p_{IV-II} < 0,05$ -18,7 %

Примечание: СЖК – свободные жирные кислоты, ТАГ- триацилглицеролы, ХС – общий холестерол, ХС-ЛПВП- холестерол в липопротеинах высокой плотности, ХС-ЛПНП- холестерол в липопротеинах низкой плотности, n – количество экспериментальных животных в группе; p – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателем в соответствующей экспериментальной группе.

Уменьшение уровня СЖК в сыворотке крови лежит в основе гиполипидемического эффекта никотиновой кислоты и обусловлено торможением липолиза в жировой ткани, синтезом ТАГ и ЛПОНП в печени (Bodor E. T., 2008; Ren N. et al., 2011). Таким образом, сесквитерпеновый лактон ахиллин подобно никотиновой кислоте проявлял гиполипидемическую активность на фоне острой гиперлипидемии, индуцированной этанолом.

Известно, что холестерол локализуется в сыворотке крови преимущественно во фракциях ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП. При этом высокий уровень ХС-ЛПНП способствует развитию атеросклероза, а высокий уровень ХС-ЛПВП оказывает антиатерогенное действие. У крыс холестерол в сыворотке крови находится преимущественно во фракции ЛПВП (Хабриев Р. У., 2005). В связи с этим нами было исследовано влияние ахиллина на уровень холестерола во фракциях ЛПНП и ЛПВП на модели острой гиперлипидемии, вызванной введением этанола.

В результате проведенных исследований было показано, что курсовое введение ахиллина и никотиновой кислоты крысам на фоне острой гиперлипидемии, индуцированной этанолом, снижало уровень ХС-ЛПНП на 15,8 ($0,30 \pm 0,02$ ммоль/л, $p < 0,05$) и 15,7 % ($0,30 \pm 0,01$ ммоль/л, $p < 0,05$), соответственно (Таблица 9). На ХС-ЛПВП ахиллин, как и никотиновая кислота влияния не оказывали.

На основе полученных данных было вычислено отношение ХС-ЛПВП/ХС-ЛПНП, а так же индекс атерогенности по формуле: индекс атерогенности=(общий ХС – ХС-ЛПВП)/ХС-ЛПВП (Haglund O. et al., 1991). Индекс атерогенности является наиболее простым и информативным показателем интегральной характеристики липидного спектра крови.

Установлено, что курсовое введение ахиллина и никотиновой кислоты приводило к увеличению отношения ХС-ЛПВП к ХС-ЛПНП при острой гиперлипидемии у крыс, индуцированной введением этанола, на 28,7 ($3,29 \pm 0,29$, $p < 0,05$) и 22,1 % ($3,13 \pm 0,23$, $p < 0,05$), соответственно (Таблица 9).

Рассчитанный по формуле О. Haglund (1991) индекс атерогенности на фоне гиперлипидемии, индуцированной введением этанола, снижался на 39,9 %

($p < 0,05$) при курсовом введении ахиллина и составлял $0,73 \pm 0,06$ по сравнению с таковым у крыс с гиперлипидемией ($1,22 \pm 0,17$) (Таблица 9). Введение экспериментальным животным никотиновой кислоты не приводило к достоверному снижению индекса атерогенности.

Сесквитерпеновый лактон ахиллин при курсовом введении снижал содержание ТАГ в печени крыс в условиях острой гиперлипидемии, индуцированной введением этанола, на 46,9 % ($5,44 \pm 0,36$ мг/г, $p < 0,05$) (Таблица 9), при этом никотиновая кислота понижала уровень ТАГ в печени крыс лишь на 34,6 % ($6,71 \pm 0,39$ мг/г, $p < 0,05$) (Таблица 9). Кроме того, ахиллин снижал содержание холестерина в печени экспериментальных крыс на 22,7 % ($2,81 \pm 0,30$ мг/г, $p < 0,05$), в то время как действие никотиновой кислоты приводило к уменьшению величины этого показателя лишь на 18,7 % ($2,96 \pm 0,19$ мг/г печени, $p < 0,05$) по сравнению с контролем (Таблица 9).

Таким образом, при оценке способности ахиллина влиять на липидный обмен на модели острой гиперлипидемии, индуцированной этиловым спиртом, нами было установлено, что сесквитерпеновый лактон на 49,8 % ($p < 0,05$) снижал повышенный этанолом уровень ТАГ в сыворотки крови экспериментальных животных (Таблица 9). Обнаруженное нами увеличение концентрации ТАГ в сыворотки крови у крыс в 1,8 раза (с $0,83 \pm 0,07$ до $1,55 \pm 0,13$ ммоль/л, $p < 0,05$) на данной модели было обусловлено повышением их синтеза в печени из СЖК, концентрация которых повышалась в 3,2 раза (с $0,85 \pm 0,07$ до $2,73 \pm 0,30$ ммоль/л, $p < 0,05$) вследствие активации липолиза в жировой ткани под влиянием этилового спирта (Таблица 9).

Снижение содержания ХС и ТАГ в сыворотки крови крыс при действии ахиллина могло быть обусловлено ингибированием их синтеза в печени. Действительно, ахиллин понижал повышенный этанолом уровень холестерина и ТАГ в печени крыс на 22,7 % и 46,9 % ($p < 0,05$), соответственно (Таблица 9). Причиной уменьшения синтеза ТАГ может быть обнаруженное нами снижение концентрации СЖК в сыворотке крови крыс при действии исследуемого лактона на 42,1 % ($p < 0,05$) (Таблица 9).

Уменьшение концентрации холестерина при действии ахиллина приводило к снижению уровня ХС-ЛПНП на 15,8 % ($p < 0,05$) при уменьшении индекса атерогенности на 39,9 % ($p < 0,05$) и повышении отношения антиатерогенного ХС-ЛПВП к атерогенному ХС-ЛПНП на 28,7 % ($p < 0,05$) по сравнению с соответствующими показателями у экспериментальных животных на фоне гиперлипидемии (Таблица 9).

Подобное гиполипидемическое действие показано ранее для сесквитерпеновых лактонов леукомизина, гроссгемина и гроссмизина на модели острой гиперлипидемии, индуцированной этиловым спиртом (Роднова Е. А., 2013; Раткин А. В. и соавт., 2014).

Исходя из выше сказанного, можно заключить, что сесквитерпеновый лактон ахиллин обладает гиполипидемическим действием на фоне острой гиперлипидемии, индуцированной этиловым спиртом. Ахиллин нормализует уровень ТАГ, ХС, СЖК и ХС-ЛПНП в сыворотке крови, индекс атерогенности и отношение антиатерогенного ХС-ЛПВП к атерогенному ХС-ЛПНП, а также содержание ТАГ и холестерина в печени.

3.5. Гиполипидемическое действие ахиллина на фоне острой экспериментальной гиперлипидемии, индуцированной тритоном WR 1339

Для оценки гиполипидемического действия сесквитерпенового лактона ахиллина нами была использована модель липемии, воспроизводимая у экспериментальных животных при введении тритона WR 1339, являющегося неионным детергентом. Данная модель характеризуется простотой воспроизведения, при этом низкая токсичность тритона и зависимость эффекта от концентрации детергента позволяет воспроизводить гиперлипидемию разной степени выраженности (Короленко Т. А. и соавт., 2010).

Таблица 10

Влияние сесквитерпенового лактона ахиллина на показатели липидного обмена при экспериментальной острой гиперлипидемии, индуцированной тритоном WR 1339 ($M \pm m$, $n=9$)

Показатели	Экспериментальные группы			
	I	II	III	IV
	Контроль	Тритон WR 1339	Ахиллин+тритон WR 1339	Фенофибрат+тритон WR 1339
ТАГ, ммоль/л	0,84±0,13	24,27±2,96 $p_{II-I} < 0,05$ +2790 %	0,77±0,08 $p_{III-II} < 0,05$ -49,8 %	3,98±0,32 $p_{IV-II} < 0,05$ -83,6 %
ХС, ммоль/л	2,13±0,19	6,35±0,67 $p_{II-I} < 0,05$ +200 %	4,28±0,18 $p_{III-II} < 0,05$ -32,5 %	2,21±0,14 $p_{IV-II} < 0,05$ -65,1 %
СЖК, ммоль/л	1,01±0,04	1,71±0,19 $p_{I-II} < 0,05$ +70 %	1,45±0,06	0,91±0,07 $p_{IV-II} < 0,05$ -46,9 %
ХС-ЛПНП, ммоль/л	0,21±0,02	1,9±0,29 $p_{I-II} < 0,05$ +800 %	0,41±0,03 $p_{III-II} < 0,05$ -78,3 %	0,34±0,01 $p_{IV-II} < 0,05$ -82,1 %
ХС-ЛПВП, ммоль/л	1,08±0,07	1,76±0,24 $p_{I-II} < 0,05$ +60 %	1,63±0,12	1,21±0,06 $p_{IV-II} < 0,05$ -31,2 %
Индекс атерогенности	0,99±0,1	2,86±0,36 $p_{I-II} < 0,05$ +190 %	1,71±0,20 $p_{III-II} < 0,05$ -40,2 %	0,84±0,10 $p_{IV-II} < 0,05$ -70,6 %
ХС-ЛПВП/ХС-ЛПНП	5,21±0,25	1,0±0,1 $p_{I-II} < 0,05$ -81 %	4,14±0,43 $p_{III-II} < 0,05$ +314 %	3,56±0,18 $p_{IV-II} < 0,05$ +256 %
ТАГ в печени, мг/г	4,87±0,33	7,02±0,22 $p_{I-II} < 0,05$ +40 %	4,09±0,44 $p_{III-II} < 0,05$ -41,7 %	3,43±0,39 $p_{IV-II} < 0,05$ -51,1 %
ХС в печени, мг/г	1,94±0,06	2,25±0,12 +16 %	1,9±0,07 $p_{III-II} < 0,05$ -15,6 %	1,43±0,05 $p_{IV-II} < 0,05$ -36,5 %

Примечание: СЖК – свободные жирные кислоты, ТАГ- триацилглицеролы, ХС – общий холестерол, ХС-ЛПВП- холестерол в липопротеинах высокой плотности, ХС-ЛПНП- холестерол в липопротеинах низкой плотности, n – количество экспериментальных животных в группе; p – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателем в соответствующих экспериментальных группах.

Моделирование острой гиперлипидемии, индуцированной тритоном WR 1339, основано на ингибировании детергентом активности липопротеинлипазы

(Короленко Т. А. и соавт., 2010). Данная модель характеризуется значительным увеличением концентрации проатерогенных фракций и субфракций холестерина в липопротеинах и является перспективной для тестирования гиполипидемических препаратов (Логинова В. М. и соавт., 2011).

Нами было показано, что однократное внутрибрюшинное введение тритона WR 1339 в дозе 200 мг/кг крысам приводило через 24 ч к увеличению уровня ТАГ в сыворотке крови экспериментальных животных, который в 29 раз ($24,27 \pm 2,96$ ммоль/л, $p < 0,05$) превышал соответствующий показатель контрольной группы ($0,84 \pm 0,13$ ммоль/л).

Значительное повышение уровня ТАГ при однократном введении тритона свидетельствует о выраженной гиперлипидемии. Схожие результаты отмечались ранее при введении в близких дозах тритона крысам, мышам, кроликам и морским свинкам (Хабриев Р. У., 2005; Короленко Т. А. и др., 2010; Окуневич И. В. и соавт., 2010).

Известно, что детергент WR 1339 ингибирует активность липопротеинлипазы, что препятствует утилизации липопротеинов и способствует накоплению ТАГ в сыворотке крови экспериментальных животных (Хабриев Р. У., 2005; Короленко Т. А. и др., 2010; Окуневич И. В. и соавт., 2010).

Содержание ХС и СЖК в сыворотке крови под влиянием тритона WR 1339 увеличивалось в 3 ($6,35 \pm 0,67$ ммоль/л, $p < 0,05$) и 1,7 раза ($1,71 \pm 0,19$ ммоль/л, $p < 0,05$) по сравнению с соответствующими показателями у интактных животных ($2,13 \pm 0,19$; $1,01 \pm 0,04$ ммоль/л, соответственно) (Таблица 10).

Увеличение концентрации ХС в сыворотке крови при воздействии на животных детергента может быть связано, на наш взгляд, с его повышенной абсорбцией из кишечника, усилением синтеза эндогенного холестерина или снижением выведения в составе липопротеинов, в первую очередь в составе ЛПНП, из сыворотки крови. Показано, что тритон WR 1339, с одной стороны усиливает синтез холестерина в клетках печени (Frantz I. D., Hinkelman B. T., 1955), а с другой, – снижает клиренс липопротеинов (Короленко Т. А. и соавт., 2010).

Введение тритона крысам также вызывало значимое увеличение концентрации ХС-ЛПНП – в 9 раз ($1,9 \pm 0,29$ ммоль/л, $p < 0,05$) по сравнению с таковой у контрольной группы ($0,21 \pm 0,02$ ммоль/л), что приводило к уменьшению отношения неатерогенного ХС-ЛПВП к атерогенному ХС-ЛПНП на 81 % ($1,0 \pm 0,1$, $p < 0,05$) по сравнению с контролем ($5,21 \pm 0,25$) (Таблица 10).

Индекс атерогенности, рассчитанный по формуле О. Haglund (1991), на фоне гиперлипидемии, индуцированной введением детергента, увеличивался в 3 раза ($p < 0,05$) и составлял $2,86 \pm 0,36$ при $0,99 \pm 0,1$ в контроле (Таблица 10).

Развитие острой гиперлипидемии у экспериментальных животных после однократного внутрибрюшинного введения тритона WR 1339 (200 мг/кг) подтверждалось повышением содержания ТАГ в печени крыс. При этом уровень ТАГ возрастал в 1,4 раза ($p < 0,05$) и составлял $7,02 \pm 0,22$ мг/г при $4,87 \pm 0,33$ мг/г у интактных животных (Таблица 10). Увеличение уровня ТАГ в печени под влиянием детергента WR 1339 было обусловлено ингибированием активности липопротеинлипазы, снижением клиренса липопротеинов, что способствовало накоплению ТАГ в печени экспериментальных животных. Содержание холестерина в печени экспериментальных животных после введения детергента значимо не изменялось (Таблица 10).

Полученные результаты свидетельствуют о развитии острой гиперлипидемии у экспериментальных животных на фоне однократного внутрибрюшинного введения тритона WR 1339 в дозе 200 мг/кг.

Курсовое введение ахиллина на фоне острой гиперлипидемии у крыс, индуцированной тритоном, вызывало снижение уровня ТАГ и ХС на 49,8 ($0,77 \pm 0,08$ ммоль/л, $p < 0,05$) и 32,5 % ($4,28 \pm 0,18$ ммоль/л, $p < 0,05$), соответственно. Фенофибрат «положительный контроль» понижал уровень ТАГ и ХС на 83,6 ($3,98 \pm 0,32$ ммоль/л, $p < 0,05$) и 65,1 % ($2,21 \pm 0,14$ ммоль/л, $p < 0,05$), соответственно (Таблица 10). Содержание СЖК в сыворотки крови экспериментальных животных после курсового введения ахиллина значимо не изменялось. Фенофибрат снижал уровень СЖК на 46,9 % ($0,91 \pm 0,07$ ммоль/л, $p < 0,05$) (Таблица 10).

В результате проведенных исследований было показано, что курсовое введение ахиллина и фенофибрата крысам на фоне острой гиперлипидемии, индуцированной тритоном WR 1339, снижало уровень ХС-ЛПНП на 78,3 ($0,41 \pm 0,03$ ммоль/л, $p < 0,05$) и 82,1 % ($0,34 \pm 0,01$ ммоль/л, $p < 0,05$), соответственно (Таблица 10). На содержание ХС-ЛПВП ахиллин статистически значимого влияния не оказывал, а фенофибрат снижал его на 31,2 % ($0,21 \pm 0,06$ ммоль/л, $p < 0,05$) (Таблица 10).

Установлено, что курсовое введение ахиллина и фенофибрата приводило к увеличению отношения ХС-ЛПВП к ХС-ЛПНП при острой гиперлипидемии у крыс, индуцированной введением детергента, в 4 раза ($4,14 \pm 0,43$, $p < 0,05$) и в 3,5 раза ($3,56 \pm 0,18$, $p < 0,05$), соответственно (Таблица 10).

Рассчитанный по формуле О. Naglund (1991) индекс атерогенности на фоне гиперлипидемии, индуцированной введением тритона, снижался на 40,2 % ($1,71 \pm 0,20$, $p < 0,05$) и 70,6 % ($0,84 \pm 0,10$, $p < 0,05$) при курсовом введении ахиллина и фенофибрата, соответственно (Таблица 10).

Сесквитерпеновый лактон ахиллин при курсовом введении снижал содержание ТАГ и холестерина в печени крыс в условиях острой гиперлипидемии, индуцированной введением тритона WR 1339, на 41,7 % ($4,09 \pm 0,44$ мг/г, $p < 0,05$) и 15,6 % ($1,9 \pm 0,07$ мг/г, $p < 0,05$), соответственно (Таблица 10), при этом фенофибрат понижал уровень ТАГ и холестерина в печени крыс на 51,1 ($3,43 \pm 0,39$ мг/г, $p < 0,05$) и 36,5 % ($1,43 \pm 0,05$ мг/г, $p < 0,05$), соответственно (Таблица 10).

Таким образом, при оценке способности ахиллина влиять на липидный обмен на модели острой гиперлипидемии, индуцированной тритоном WR 1339, нами было показано, что сесквитерпеновый лактон на 49,8 % ($p < 0,05$) снижал повышенный детергентом уровень ТАГ в сыворотки крови экспериментальных животных (Таблица 10). Выявленное в результате проведенных исследований увеличение концентрации ТАГ в сыворотки крови крыс в 29 раз (с $0,84 \pm 0,13$ до $24,27 \pm 2,96$ ммоль/л) ($p < 0,05$) на данной модели было обусловлено, по всей видимости, ингибированием активности липопротеинлипазы, что препятствует

утилизации липопротеинов и способствует накоплению ТАГ в сыворотке крови экспериментальных животных (Хабриев Р. У., 2005; Короленко Т. А. и др., 2010; Окуневич И. В. и соавт., 2010).

Снижение содержания ХС и ТАГ в сыворотки крови крыс при действии ахиллина (10 мг/кг) могло быть обусловлено ингибированием их синтеза в печени. Действительно, ахиллин понижал повышенный тритоном уровень ТАГ и холестерина в печени крыс на 41,7 и 15,6 % ($p < 0,05$), соответственно (Таблица 10).

Уменьшение концентрации холестерина при действии ахиллина приводило к снижению уровню ХС-ЛПНП на 78,3 % ($p < 0,05$), а также уменьшению индекса атерогенности на 40,2 % ($p < 0,05$) и к повышению отношения антиатерогенного ХС-ЛПВП к атерогенному ХС-ЛПНП в 4 раза ($p < 0,05$) (Таблица 10).

Подобное гиполипидемическое действие было показано также для сесквитерпеновых лактонов леукомизина и гроссмизина на модели острой гиперлипидемии, индуцированной детергентами (Твином 80, тритоном WR 1339). Леукомизин и гроссмизин проявляют гиполипидемическое действие, снижая уровень ХС, ТАГ в сыворотке крови экспериментальных животных, что обусловлено снижением их синтеза в печени (Роднова Е. А., 2013; Иванов В. В. и соавт., 2015).

Исходя из выше сказанного, можно заключить, что сесквитерпеновый лактон ахиллин обладает гиполипидемическим действием на фоне острой гиперлипидемии, вызванной введением тритона WR 1339. Ахиллин нормализует уровень ТАГ и ХС в сыворотке крови, индекс атерогенности и отношение антиатерогенного ХС-ЛПВП к атерогенному ХС-ЛПНП, а также содержание ТАГ и холестерина в печени.

3.6. Гиполипидемическое действие ахиллина на фоне хронической экспериментальной гиперлипидемии, индуцированной атерогенной диетой

Для оценки гипополипидемического действия сесквитрепенового лактона ахиллина нами была использована модель хронической гиперлипидемии, воспроизводимая у экспериментальных животных при введении атерогенной диеты.

Экспериментальные животные в течение 4 недель получали высокожировую диету (45 % энергии за счет животного жира), содержащую 2,5 % холестерина, 0,5 % холевой кислоты, участвующей в эмульгировании жира в кишечнике, что способствует усвоению экзогенного жира, и 0,1 % 2-тиоурацила для подавления функции щитовидной железы (Окуневич И. В. и соавт., 2010).

Введение в рацион питания экспериментальных животных корма с повышенным содержанием холестерина вызывало увеличение уровня ТАГ в сыворотке крови в 1,5 раза ($1,36 \pm 0,13$ ммоль/л, $p < 0,05$) по сравнению с таковым у интактных животных ($0,90 \pm 0,13$ ммоль/л) (Таблица 11). Увеличение уровня ТАГ при атерогенной диете обусловлено повышенным содержанием в ней животных жиров (45 % калорийности; в контроле – 4 % калорийности). Наряду с этим, содержание в диете холевой кислоты (0,5 %), участвующей в эмульгировании жира в кишечнике, также способствует усвоению экзогенного жира.

Добавление атерогенной диеты крысам вызывало также повышение уровня СЖК в сыворотке крови в 1,4 раза ($1,21 \pm 0,04$ ммоль/л, $p < 0,05$) по сравнению с соответствующим показателем у контрольных крыс ($0,89 \pm 0,06$ ммоль/л) (Таблица 11). Поскольку животные перед забором крови голодали в течение 12 ч, можно предполагать, что повышенный в сыворотке крови уровень СЖК при атерогенной диете не был обусловлен экзогенными жирными кислотами и отражал в определенной мере интенсивность липолиза в жировой ткани.

У грызунов, в отличие от людей, низкий уровень ХС-ЛПНП, что препятствует развитию атеросклероза и дислипидемий (Pellizzon M. A., 2008). Добавление в диету холевой кислоты подавляет превращение холестерина в желчные кислоты (Ando H., 2005). Кроме того, присутствие холевой кислоты в

диете оказывает влияние на транскрипцию факторов, которые регулируют гены, участвующие в регуляции метаболизма липопротеинов и воспаления, которое играет важную роль в возникновении гиперлипидемии и атеросклероза. Наличие в диете ингибитора синтеза гормонов щитовидной железы 2-тиоурацила обязательно, так как его отсутствие, несмотря на повышение уровня ХС и холестерина в атерогенных ЛПНП, не приводит к развитию гиперлипидемии и атеросклероза (Pellizzon M. A., 2008).

Как показали проведённые нами исследования, у животных, получавших атерогенную диету в течение 4 недель, в крови отмечалось значительное повышение ХС, и его уровень составлял $8,49 \pm 1,39$ ммоль/л ($p < 0,05$), что оказалось в 5,2 раза больше, чем у крыс, получавших стандартный корм ($1,62 \pm 0,25$ ммоль/л) (Таблица 11).

Атерогенность используемой диеты подтверждалась наличием липидных бляшек в аорте, выявленных окрашиванием нейтральных липидов с красителем Oil Red O (Xu S., 2010) (Рисунок 29).



А

Б

Рисунок 29. Окрашенные красителем Oil Red O липидные бляшки в аорте крыс, получавших в течение 4-х недель атерогенную диету (45 % калорийности – животный жир; 2,5 % холестерина; 0,5 % хелевой кислоты; 0,1 % 2-тиоурацила). Примечание: А – стандартная диета; Б – атерогенная диета.

Введение атерогенной диеты крысам вызывало существенное увеличение концентрации ХС-ЛПНП – почти в 6 раз ($1,17 \pm 0,17$ ммоль/л) ($p < 0,05$) по сравнению с таковой в контроле ($0,20 \pm 0,01$ ммоль/л). Это приводило к увеличению индекса атерогенности в 3,7 раза ($3,96 \pm 0,37$) ($p < 0,05$) по сравнению с контролем ($1,07 \pm 0,18$) (Таблица 11).

Таблица 11

Влияние сесквитерпенового лактона ахиллина на показатели липидного обмена при экспериментальной хронической гиперлипидемии, индуцированной атерогенной диетой ($M \pm m$, $n=8$)

Показатели	Экспериментальные группы				
	I	II	III	IV	V
	Контроль	Атерогенная диета	Ахиллин + атерогенная диета	Фенофибрат + атерогенная диета	Розувастатин + атерогенная диета
ТАГ, ммоль/л	0,90±0,13	1,36±0,13 $p_{II-I} < 0,05$ +51,8 %	0,62±0,11 $p_{III-II} < 0,05$ -54,2 %	0,58±0,09 $p_{IV-II} < 0,05$ -57,2 %	0,70±0,13 $p_{V-II} < 0,05$ -48,4 %
ХС, ммоль/л	1,62±0,25	8,49±1,39 $p_{II-I} < 0,05$ +423,2 %	4,18±0,36 $p_{III-II} < 0,05$ -50,7 %	4,38±0,20 $p_{IV-II} < 0,05$ -48,4 %	3,37±0,40 $p_{V-II} < 0,05$ -60,3 %
СЖК, ммоль/л	0,89±0,06	1,21±0,04 $p_{I-II} < 0,05$ +35,37 %	0,64±0,07 $p_{III-II} < 0,05$ -47,3 %	0,71±0,05 $p_{IV-II} < 0,05$ -40,9 %	0,75±0,07 $p_{V-II} < 0,05$ -37,6 %
ХС-ЛПНП, ммоль/л	0,20±0,01	1,17±0,17 $p_{I-II} < 0,05$ +479,3 %	0,75±0,06 $p_{III-II} < 0,05$ -35,9 %	0,94±0,08	0,43±0,04 $p_{V-II} < 0,05$ -63,2 %
ХС-ЛПВП, ммоль/л	0,76±0,07	1,91±0,22 $p_{I-II} < 0,05$ +149,5 %	1,20±0,16 $p_{III-II} < 0,05$ -36,8 %	2,19±0,17	1,40±0,14
Индекс атерогенности	1,07±0,18	3,96±0,37 $p_{I-II} < 0,05$ +188,2 %	2,64±0,36	1,2±0,21 $p_{IV-II} < 0,05$ -70,6 %	1,41±0,16 $p_{V-II} < 0,05$ -64,4 %
ТАГ в печени, мг/г	5,56±0,59	29,94±0,65 $p_{I-II} < 0,05$ +535,1 %	21,53±0,44 $p_{III-II} < 0,05$ -28,1 %	21,42±0,55 $p_{IV-II} < 0,05$ -28,5 %	20,94±0,16 $p_{V-II} < 0,05$ -30,1 %
ХС в печени, мг/г	2,75±0,22	102,57±8,78 $p_{I-II} < 0,05$ +3724,5 %	84,10±4,3 $p_{III-II} < 0,05$ -18 %	65,53±8,60 $p_{IV-II} < 0,05$ -36,1 %	61,6±6,71 $p_{V-II} < 0,05$ -39,9 %

Примечание: СЖК – свободные жирные кислоты, ТАГ- триацилглицеролы, ХС – общий холестерол, ХС-ЛПВП- холестерол в липопротеинах высокой плотности, ХС-ЛПНП- холестерол в липопротеинах низкой плотности, n – количество экспериментальных животных в группе; p – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателем в соответствующих экспериментальных группах.

Полученные результаты свидетельствуют о развитии хронической гиперлипидемии у экспериментальных животных на фоне введения атерогенной диеты. Развитие хронической гиперлипидемии у экспериментальных животных

после 4 недель приема атерогенного корма подтверждалось повышением содержания липидов в печени крыс. При этом уровень ТАГ возрастал в 5 раз ($p < 0,05$) и составлял $29,94 \pm 0,65$ мг/г, а уровень холестерина – в 37 раз ($p < 0,05$) и соответствовал $102,5 \pm 8,78$ мг/г, по сравнению с контрольными животными (ТАГ – $5,56 \pm 0,59$ мг/г печени; холестерол – $2,75 \pm 0,22$ мг/г печени) (Таблица 11). Увеличение уровня ТАГ в печени при высококалорийной атерогенной диете (45 % калорийности за счет животного жира) было обусловлено повышенным уровнем циркулирующих в крови СЖК, которые захватываются печенью и используются для синтеза ТАГ.

Курсовое введение препаратов сравнения фенофибрата и розувастатина вызывало снижение повышенного уровня ТАГ на фоне высокожировой атерогенной диеты. При этом фенофибрат оказывал более выраженное гиполипидемическое действие и уменьшал содержание ТАГ в сыворотке крови на 57,2 % ($0,58 \pm 0,09$ ммоль/л) ($p < 0,05$), а розувастатин – на 48,4 % ($0,70 \pm 0,13$ ммоль/л) ($p < 0,05$) (Таблица 13).

Основным механизмом гиполипидемического действия фибратов, в том числе фенофибрата, является снижение синтеза ТАГ и увеличение их гидролиза (Ozansoy G., Akin F. B., 2004; Umeda Y. et al., 2001). Фибраты, являясь агонистами PPAR, действуют на ядерные рецепторы, увеличивая экспрессию генов, которые регулируют синтез ключевых ферментов липидного обмена и белков метаболизма липопротеинов (Wyrebska A. et al., 2012). Снижение синтеза ТАГ происходит за счет ингибирующего влияния фенофибрата на активность микросомальной диацилглицерол-ацилтрансферазы. К тому же, фенофибрат активирует деградацию АпоВ, что приводит к снижению секреции ЛПОНП (Zhu D. et al., 2002).

В условиях проведённых нами экспериментов курсовое введение сесквитерпенового лактона ахиллина, подобно фенофибрату и розувастатину, существенно снижало уровень ТАГ в сыворотке крови экспериментальных животных на фоне развития хронической гиперлипидемии, индуцированной атерогенной диетой. Ахиллин понижал повышенный в результате атерогенной

диеты уровень ТАГ в сыворотке крови крыс на 54,2 % ($0,62 \pm 0,11$ ммоль/л, $p < 0,05$).

Поскольку ТАГ в крови преимущественно находятся в составе ЛПОНП, можно предполагать, что уменьшение уровня ТАГ в сыворотке крови крыс на фоне высокожировой диеты при действии сесквитерпенового лактона ахиллина было обусловлено снижением синтеза и/или секреции ЛПОНП печенью.

Курсовое введение сесквитерпенового лактона ахиллина также приводило к понижению уровня СЖК в сыворотке крови экспериментальных животных на 47,3 % ($0,64 \pm 0,07$ ммоль/л) ($p < 0,05$), а препараты сравнения фенофибрат и розувастатин уменьшали уровень СЖК лишь на 40,9 ($0,71 \pm 0,05$ ммоль/л) ($p < 0,05$) и 37,6 % ($0,75 \pm 0,07$ ммоль/л) ($p < 0,05$), соответственно (Таблица 11).

Известно, что ингибирование липолиза лежит в основе гипополипидемического действия никотиновой кислоты, что приводит к уменьшению уровня СЖК в сыворотке крови, снижению синтеза ТАГ в печени и секреции ЛПОНП гепатоцитами (Bodor E. T., Offermanns S., 2008). Для сесквитерпенового лактона леукомизина также показана способность ингибировать липолиз жировой ткани (Роднова Е. А. и др., 2012).

Полученные в результате проведённых нами экспериментов данные позволяют предполагать, что снижение уровня ТАГ в сыворотке крови крыс на фоне атерогенной диеты при действии исследуемого сесквитерпенового лактона ахиллина происходило в результате снижения содержания СЖК и могло быть обусловлено, в определенной мере, ингибированием липолиза в жировой ткани.

Курсовое введение розувастатина вызывало достоверное снижение повышенного в результате диеты содержания ХС в сыворотке крови экспериментальных животных на 60,3 % ($3,37 \pm 0,40$ ммоль/л) ($p < 0,05$), фенофибрат оказывал менее выраженное действие и снижал уровень ХС на 48,4 % ($4,38 \pm 0,20$ ммоль/л) ($p < 0,05$) (Таблица 11).

Известно, что снижение уровня холестерина под влиянием розувастатина определяется главным образом ингибированием ключевого фермента его биосинтеза ГМГ-КоА-редуктазы. В то же время на фоне повышенного

поглощения экзогенного холестерина при атерогенной диете, содержащей 2,5 % холестерина, этот механизм, по-видимому, не играет ключевую роль в его снижении. Наряду с ингибированием ГМГ-КоА-редуктазы, снижение уровня холестерина статинами может быть обусловлено увеличением его экскреции с фекалиями (Farvin K. H. S, 2009).

Уменьшение уровня холестерина под влиянием фенофибрата на модели хронической гиперлипидемии может быть обусловлено ингибированием синтеза и/или секреции печенью ЛПОНП – предшественников атерогенных ЛПНП. Кроме того, фибраты препятствуют абсорбции холестерина в кишечнике, что может вносить существенный вклад в снижение его уровня в сыворотке крови на модели гиперхолестеролемии, вызываемой поступлением экзогенного холестерина (Umeda Y., 2001).

Курсовое введение ахиллина также приводило к значимому снижению повышенного уровня ХС в сыворотке крови экспериментальных животных на 50,7 % ($4,18 \pm 0,36$ ммоль/л) ($p < 0,05$) (Таблица 11). К тому же, ахиллин снижал содержание ХС-ЛПНП на 35,9 % ($0,75 \pm 0,06$ ммоль/л) ($p < 0,05$). При этом препарат сравнения розувастатин понижал уровень ХС-ЛПНП на 63,2 % ($0,43 \pm 0,04$ ммоль/л) ($p < 0,05$), а фенофибрат не оказывал значимого влияния на величину этого показателя (Таблица 11). Розувастатин и фенофибрат статистически значимого влияния на содержание ХС-ЛПНП не оказывали, а ахиллин снижал его на 36,8 % ($1,2 \pm 0,16$ ммоль/л) ($p < 0,05$) (Таблица 11).

Рассчитанный по формуле О. Naglund (1991) индекс атерогенности на фоне гиперлипидемии, индуцированной атерогенной диетой при курсовом введении фенофибрата и розувастатина, снижался на 70,6 ($1,2 \pm 0,21$, $p < 0,05$) и 64,4 % ($1,41 \pm 0,16$, $p < 0,05$) соответственно (Таблица 11). Ахиллин не оказывал статистически значимого влияния на индекс атерогенности.

Курсовое введение сесквитерпенового лактона ахиллина, подобно фенофибрату и розувастатину, приводило к уменьшению содержания ТАГ в печени крыс в условиях острой гиперлипидемии, индуцированной атерогенной диетой. При этом ахиллин снижал уровень ТАГ в печени крыс на 28,1 %

($21,35 \pm 0,44$ мг/г, $p < 0,05$), а фенофибрат и розувастатин на 28,5 % ($21,42 \pm 0,55$ мг/г, $p < 0,05$) и 30,1 % ($20,94 \pm 0,16$ мг/г, $p < 0,05$), соответственно (Таблица 11).

Содержание холестерина в печени крыс при введение ахиллина на фоне атерогенной диеты уменьшалось на 18 % ($84,10 \pm 4,3$ мг/г, $p > 0,05$). Курсовое введение фенофибрата приводило к уменьшению уровня холестерина в печени крыс на 36,1 % ($65,53 \pm 8,6$ мг/г, $p < 0,05$), а розувастатина – на 39,9 % ($61,6 \pm 6,71$ мг/г, $p < 0,05$) (Таблица 11).

Таким образом, при оценке способности ахиллина влиять на липидный обмен на модели хронической гиперлипидемии, индуцированной атерогенной диетой, нами было установлено, что сесквитерпеновый лактон на 54,2 % ($p < 0,05$) снижал повышенный атерогенной диетой уровень ТАГ в сыворотке крови экспериментальных животных (Таблица 11). Увеличение концентрации ТАГ в сыворотке крови крыс в 1,5 раза (с $0,90 \pm 0,13$ до $1,36 \pm 0,13$ ммоль/л) ($p < 0,05$) на данной модели было обусловлено повышением их синтеза в печени из СЖК, концентрация которых повышалась в 1,4 раза (с $0,89 \pm 0,06$ до $1,21 \pm 0,04$ ммоль/л) ($p < 0,05$) (Таблица 11). Поскольку животные перед забором крови голодали в течение 12 ч, можно предполагать, что повышенный в сыворотке крови уровень СЖК при атерогенной диете не обусловлен экзогенными жирными кислотами и отражает, в определенной мере, интенсивность липолиза в жировой ткани.

Выявленное в результате проведённых исследований снижение содержания ХС и ТАГ в сыворотки крови крыс при действии ахиллина (10 мг/кг) могло быть обусловлено ингибированием их синтеза в печени. Действительно, ахиллин понижал повышенный атерогенной диетой уровень ТАГ в печени крыс на 28,1 % ($p < 0,05$), а холестерина – на 18 % ($p < 0,05$) (Таблица 11). Причиной уменьшения синтеза ТАГ могло быть обнаруженное нами снижение концентрации СЖК в сыворотке крови крыс при действии исследуемого лактона на 47,3 % ($p < 0,05$) (Таблица 11).

Уменьшение концентрации холестерина на 50,7 % ($p < 0,05$) в сыворотке крови крыс при действии ахиллина приводило к снижению уровню ХС-ЛПНП на 35,9 % ($p < 0,05$) по сравнению с таковым у животных на фоне гиперлипидемии (Таблица 11).

Резюмируя сказанное, можно заключить, что сесквитерпеновый лактон ахиллин обладает гиполипидемическим действием на фоне хронической гиперлипидемии, вызванной атерогенной диетой. Ахиллин нормализует уровень ТАГ, ХС, СЖК и ХС-ЛПНП в сыворотке крови, а также содержание ТАГ в печени.

Таким образом, сесквитерпеновый лактон ахиллин на моделях острой и хронической гиперлипидемии *in vivo* проявил гиполипидемическую активность, которая обусловлена нормализацией уровня ТАГ, ХС, СЖК, ХС-ЛПНП в сыворотке крови экспериментальных крыс, а также снижением содержания ТАГ и холестерина в печени крыс. Однако вопрос о механизме, с помощью которого ахиллин снижает содержание липидов в сыворотке крови и в печени крыс, остаётся открытым. Поэтому для установления механизмов гиполипидемического действия сесквитерпенового лактона ахиллина в экспериментальной модели гиперлипидемии, индуцированной атерогенной диетой, было проведено исследование по изучению экспрессии ключевых генов метаболизма липидов.

3.6.1. Влияние сесквитерпенового лактона ахиллина на величину экспрессии мРНК ключевых генов метаболизма липидов у крыс на модели гиперлипидемии, индуцированной атерогенной диетой

Для установления механизмов гиполипидемического действия сесквитерпенового лактона ахиллина нами была исследована экспрессия мРНК ключевых генов метаболизма липидов в печени крыс на модели хронической гиперлипидемии, индуцированной атерогенной диетой.

В результате проведённых экспериментов было установлено, что на фоне атерогенной диеты у крыс отмечалось ингибирование экспрессии мРНК гена рецептора к ЛПНП (*Ldlr*) на 60 % ($0,40 \pm 0,04$ усл. ед., $p < 0,05$), гена ключевого фермента синтеза холестерина ГМГ-КоА-редуктазы (*Hmgcr*) – на 30 % ($0,71 \pm 0,08$ усл. ед., $p < 0,05$), гена ключевого фермента синтеза желчных кислот 7 α -гидроксилазы (*Cyp7a1*) – на 25 % ($0,75 \pm 0,06$ усл. ед., $p < 0,05$), гена фермента карнитин-пальмитоилтрансферазы 1 (*Cpt1a*) – на 30 % ($0,71 \pm 0,10$ усл. ед., $p < 0,05$) и гена карнитин-пальмитоилтрансферазы 2 (*Cpt2*) – на 25 % ($0,74 \pm 0,08$ усл. ед., $p < 0,05$) по сравнению с соответствующими показателями у интактных животных (Рисунок 30А). При этом обращает на себя внимание увеличение экспрессии гена фермента АХАТ (*Soat1*) в 3 раза ($3,17 \pm 0,31$ усл. ед., $p < 0,05$) относительно соответствующей величины у крыс, принимавших стандартный корм (Рисунок 30А).

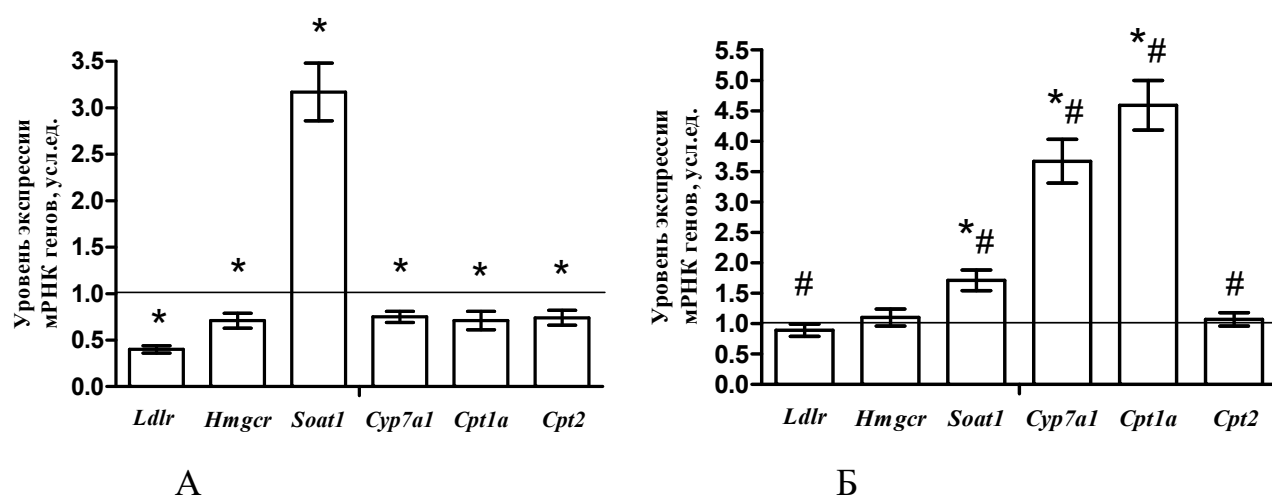


Рисунок 30. Влияние атерогенной диеты (А) и ахиллина (10 мг/кг) (Б) на величину экспрессии мРНК ключевых генов метаболизма липидов в печени крыс на фоне атерогенной диеты ($M \pm m$).

Примечание: величина экспрессии мРНК генов выражена в усл. ед. и нормализована по гену-рефери β -актину (*Actb*) и контролю (интактные крысы). Относительная экспрессия мРНК генов в контроле принята за единицу; * – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями у интактных крыс при $p < 0,05$; # – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями у крыс на фоне атерогенной диеты при $p < 0,05$

Обозначение генов: *Ldlr* – рецептор к ЛПНП; *Hmgcr* – 3-гидрокси-3-метилглутарил КоА редуктаза; *Soat1* – ацилКоА: холестерол ацилтрансфераза; *Cyp7a1* – 7 α -гидроксилаза; *Cpt1a* – карнитин-пальмитоилтрансфераза 1; *Cpt2* – карнитин-пальмитоилтрансфераза 2.

Гомеостаз холестерина чрезвычайно сложен и регулируется через процессы поглощения, синтеза *de novo* и выведения из гепатоцитов (Ru P. et al., 2013). Ключевым регулятором метаболизма холестерина является транскрипционный фактор SREBP-2, который регулирует экспрессию гена фермента синтеза холестерина ГМГ-КоА-редуктазу (*Hmgcr*) и гена рецептора к ЛПНП (*Ldlr*) (Ikonen E., 2008; Moore K. J. et al., 2010). Известно, что поступление холестерина в клетку осуществляется путем рецептор-опосредованного эндоцитоза с участием рецепторов к ЛПНП (Колчанов Н. А. и соавт., 2006; Goldstein J. L. et al., 2006; Ikonen E., 2008; Ru P. et al., 2013).

Скорость перехода предшественника pre-SREBP в активную форму SREBP зависит от уровня холестерина. В условиях, когда уровень холестерина низкий, белок SCAP связывается с pre-SREBP и комплекс SCAP–SREBP транспортируется в аппарат Гольджи, где происходит протеолитическое расщепление молекулы pre-SREBP с образованием SREBP. Активный SREBP проникает в ядро клетки, связывается со SRE и активирует экспрессию генов фермента ГМГ-КоА-редуктазы и рецепторов к ЛПНП (Goldstein J. L. et al., 2006; Колчанов Н. А. и др., 2013; Xiao X., Song B.-L., 2013).

Повышенный уровень холестерина в печени приводит к ассоциации SCAP с мембранным белком Insig. Комплекс Insig/SCAP/SREBP прочно связывается с мембраной эндоплазматического ретикулума и блокирует транспорт комплекса SCAP–SREBP в аппарат Гольджи, что приводит к уменьшению экспрессии генов ГМГ-КоА-редуктазы (*Hmgcr*) и рецептора к ЛПНП (*Ldlr*) (Motamed M. et al., 2011). Действительно, высокий уровень холестерина в печени крыс на фоне атерогенной диеты (Таблица 11) может быть одной из причин обнаруженного нами ингибирования экспрессии генов *Hmgcr* (на 30 %, $p < 0,05$) и *Ldlr* (на 60 %, $p < 0,05$) (Рисунок 32А). Эти данные сопоставимы с результатами J. Pang (2008) с коллегами, которые показали, что высокожировая диета (40 % энергии за счет животного жира) вызывает у крыс уменьшение величины экспрессии гена фермента ГМГ-КоА-редуктазы в висцеральной жировой ткани (Pang J. et al., 2008).

Выявленное в условиях проведённых нами экспериментов снижение экспрессии гена рецептора к ЛПНП (*Ldlr*) на 60 % ($p < 0,05$) (Рисунок 30А) у крыс на фоне высококалорийной диеты приводило к уменьшению поглощения ЛПНП почти в 6 раз ($p < 0,05$) по сравнению с соответствующими значениями в контроле (Таблица 11). В результате этого повышался уровень ХС в сыворотке крови в 5,2 раза относительно такового у крыс, получавших стандартный корм (Таблица 11). Действительно, у *Ldlr*-дефицитных мышей трансгенных по *nSREBP-1a*, напротив, наблюдалось 10-кратное увеличение уровней холестерина и ТАГ в плазме крови (Horton J. D., 2002).

Резюмируя сказанное, можно отметить, что биосинтез и поглощение холестерина гепатоцитами контролируется по принципу отрицательной обратной связи. Когда клетки накапливают избыточное количество стеролов, активность ГМГ-КоА-редуктазы уменьшается и количество рецепторов к ЛПНП также снижается. Однако, биосинтез холестерина – это сложный процесс, который контролируется как на транскрипционном (через SREBPs, LXR транскрипционные факторы), так и на посттранскрипционном (через процессы фосфорилирования/дефосфорилирования) уровне (Goldstein J. L. et al., 2006).

Еще одним важным механизмом в поддержании гомеостаза холестерина является его выведение из организма. Печень устраняет избыток холестерина путем непосредственной секреции его в желчь или после преобразования в желчные кислоты. Лимитирующим ферментом синтеза желчных кислот является холестерин 7α -гидроксилаза (Chen Z.Y. . et al., 2008).

В ходе экспериментов было показано, что высококалорийная диета вызывала у экспериментальных животных ингибирование в печени экспрессии гена фермента 7α -гидроксилазы (*Cyp7a1*) на 25 % ($p < 0,05$) по сравнению с таковой у интактных животных (Рисунок 30А). Вследствие этого, печень не может удалять избыток холестерина путем непосредственной секреции его в желчь в виде желчных кислот.

На фоне атерогенной диеты у экспериментальных животных отмечалось повышение в печени экспрессии гена фермента АХАТ (*Soat1*) в 3 раза ($p < 0,05$)

(Рисунок 30А), который катализирует образование эфиров холестерина (Lee M. K. et al., 2003). Известно, что этерификация холестерина, обусловленная АХАТ, играет важную роль в упаковке, продукции и секреции ЛПОНП печенью (Burnett J.R. et al., 2005). АХАТ модулирует катаболизм холестерина в гепатоцитах и его концентрацию в плазме, уменьшая уровень свободного холестерина в клетках печени, что способствует снижению экспрессии и активности 7α -гидроксилазы. При атерогенной диете повышение активности АХАТ способствует увеличению секреции гепатоцитами ЛПОНП. Для лечения гиперлипидемий применяют ингибиторы фермента АХАТ, которые снижают уровень холестерина в плазме, уменьшают абсорбцию холестерина, поступающего с пищей, и подавляют образование и секрецию апоВ-содержащих липопротеинов. Ингибиторы этого фермента увеличивают синтез желчных кислот через повышение экспрессии холестерина 7α -гидроксилазы (Miyazaki A. et al., 2003).

Таким образом, повышение экспрессии *Soat1* может способствовать снижению экспрессии фермента 7α -гидроксилазы и развитию гиперхолестеринемии при атерогенной диете [Roberts C.K. et al, 2004].

Высокожировая диета у крыс сопровождается ингибированием в печени экспрессии генов *Cpt1a* и *Cpt2* на 30 и на 25 % ($p < 0,05$), соответственно (Рисунок 30А).

Одним из ключевых регуляторов β -окисления жирных кислот является АМФК, которая регулирует внутриклеточное окисление жирных кислот инактивируя ацетил-КоА-карбоксилазу через фосфорилирование, что приводит к уменьшению содержания малонила-КоА (Linden D., 2002; Bonnefont J.-P. et al., 2004; Liu Y. et al., 2006; Wei T. et al., 2014; De Filippis B. et al., 2015).

Действительно, на хронической экспериментальной модели гиперлипидемии, индуцированной высокожировой диетой, у крыс регистрируется снижение экспрессии и фосфорилирования (активирования) АМФК (Liu Y. et al., 2006; Pang J. et al., 2008). Это может быть одной из причин обнаруженного нами снижения величины экспрессии генов *Cpt1a* и *Cpt2* в печени крыс при атерогенной диете.

Резюмируя сказанное, можно заключить, что хроническое употребление высококалорийной пищи включает адаптивные механизмы в организме человека и животных, направленные на ограничение дальнейшего депонирования жиров (Pang J. et al., 2008).

Курсовое введение сесквитерпенового лактона ахиллина (10 мг/кг) крысам на фоне высокожировой диеты приводило, как показали проведённые нами эксперименты, к увеличению величины экспрессии гена рецептора к ЛПНП (*Ldlr*) в 2,2 раза ($0,89 \pm 0,10$, $p < 0,05$) по сравнению с таковой у крыс, принимавших атерогенный корм (Рисунок 30Б). Активация экспрессии гена *Ldlr* способствует извлечению из циркуляции в крови атерогенных ЛПНП. Действительно, курсовое введение ахиллина крысам вызывало уменьшение содержания ХС-ЛПНП в сыворотке крови на 35,9 % ($p < 0,05$) по сравнению с таковым у крыс на фоне атерогенной диеты (Таблица 11). На величину экспрессии гена фермента ГМГ-КоА-редуктазы (*Hmgcr*) ахиллин статистически значимого влияния не оказывал (Рисунок 30Б).

Введение ахиллина крысам вызывало ингибирование экспрессии гена фермента АХАТ (*Soat1*) на 46 % ($1,71 \pm 0,17$ усл. ед., $p < 0,05$) относительно соответствующих значений у крыс, принимавших атерогенную диету (Рисунок 30Б).

Курсовое введение ахиллина повышало величину экспрессии гена *Cyp7a1* почти в 5 раз ($3,67 \pm 0,36$ усл. ед., $p < 0,05$) по сравнению с таковой у животных, получавших высококалорийную диету (Рисунок 30Б). Это может способствовать устранению избытка холестерина из организма путем секреции его в желчь и/или преобразования холестерина в желчные кислоты (Chen Z. Y. et al., 2008).

Кроме того, ахиллин увеличивал величину экспрессии генов карнитин-пальмитоилтрансферазы 1 (*Cpt1a*) и карнитин-пальмитоилтрансферазы 2 (*Cpt2*) в 6,5 ($4,59 \pm 0,41$ усл. ед., $p < 0,05$) и в 1,5 раза ($1,07 \pm 0,11$ усл. ед., $p < 0,05$), соответственно (Рисунок 30Б). Эти ферменты регулируют катаболизм жирных кислот и снижают накопление ТАГ в печени (Wang Y. M. et al., 2010). Действительно, курсовое введение ахиллина крысам вызывало уменьшение

содержания ТАГ в печени на 28,1 % ($p < 0,05$) по сравнению с уровнем его у крыс на фоне атерогенной диеты (Таблица 11).

Таким образом, на хронической экспериментальной модели гиперлипидемии у крыс, индуцированной атерогенной диетой, снижение содержания ТАГ и холестерина в печени и сыворотке крови при курсовом введении ахиллина было обусловлено увеличением величины экспрессии генов карнитин-пальмитоилтрансферазы 1 и 2 (*Cpt1a* и *Cpt2*), 7α -гидроксилазы (*Cyp7a1*) и ингибированием экспрессии гена АХАТ (*Soat1*). Снижение уровня холестерина в ЛПНП под влиянием ахиллина могло быть обусловлено повышением величины экспрессии гена рецептора к ЛПНП (*Ldlr*), что способствовало извлечению атерогенных ЛПНП из циркуляции в крови.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время накоплены данные, указывающие на перспективность использования сесквитерпеновых лактонов для разработки гиполипидемических лекарственных средств (Asgary S. et al., 2000; Shimoda H. et al., 2002; Аксартов Р. М., 2004; Uchida R. et al., 2006; Kuroda M. et al., 2007; Eliza J. et al., 2009; Mahesh A. et al., 2010; Kaneko M. et al., 2011; Duraipandiyan V. et al., 2012; Роднова Е. А., 2012; 2013;).

Для исследования фармакологической активности новых лекарственных веществ в настоящее время широко применяются модели на клеточных линиях (Макаров М. С., 2013; Takahashi J. et al., 2013). Клетки используют как для фундаментальных исследований, так и для разработки тест-систем, эксперименты на которых дают первичное представление об эффективности и токсичности вещества, а также способствуют снижению сроков и себестоимости разработки лекарственных средств. Однако в организме человека и животных лекарства подвергаются процессам абсорбции, распределению, метаболизму и экскреции (Сенявина Н. В. и соавт., 2013). Сказанное дало основание для проведения нами комплексного анализа гиполипидемического действия сесквитерпенового лактона ахиллина на экспериментальных моделях гиперлипидемии *in vitro* и *in vivo* согласно рекомендациям «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Миронов А. Н., 2012).

Известно, что сесквитерпеновые лактоны в зависимости от их структуры обладают цитотоксическим действием и изучаются как противоопухолевые средства (Вайнсон В. В. и соавт., 2005; Рахимов К. Д., 2005; Kim Y. S., 2008; Chaturvedi D., 2011; Wyrebska A. et al., 2012; 2013). Поэтому для исследования *in vitro* фармакологической активности в настоящей работе предварительно проводили оценку жизнеспособности клеток гепатомы при инкубации их в среде с различными концентрациями сесквитерпенового лактона ахиллина.

В результате проведённых нами экспериментов было установлено, что ахиллин в концентрациях до 1,5 мМ на клеточной культуре гепатомы линии НТС не обладает цитотоксическим действием (Таблица 5). Цитотоксическое действие сесквитерпеновых лактонов связывают с присутствием α -метилена- γ -лактоновым скелетом в структурной формуле (Chaturvedi D., 2011; Wyrebska A. et al., 2012; 2013). Так, сесквитерпеновый лактон арглабин содержит α -метилена- γ -лактоновый фрагмент, изучается как противоопухолевое средство (Вайнсон В. В. и соавт., 2005) и обладает цитотоксическим действием на клеточную культуру гепатомы НТС в концентрации 50 мкМ (Ратькин А. В. и соавт., 2015). Исследуемый нами сесквитерпеновый лактон ахиллин не содержит α -метиленовый фрагмент в γ -лактоновом кольце и проявляет цитотоксическое действие лишь в концентрациях свыше 1,5 мМ на клетках гепатомы (Рисунок 9, Таблица 5).

Внесение ахиллина в инкубационную среду к клеточной линии НТС приводило к дозозависимому уменьшению интенсивности флуоресценции Nile Red, что отражало снижение содержания липидов в клетках. Уменьшение интенсивности флуоресценции Nile Red зарегистрировано при концентрации ахиллина 1 мМ и выше (Таблица 6). При этих же концентрациях лактон снижал содержание липидных капель, окрашенных красителем Oil Red O, в цитозоле клеток гепатомы (Рисунок 11).

Таким образом, сесквитерпеновый лактон ахиллин в экспериментах *in vitro* в концентрации от 0,5 до 1,5 мМ не снижал жизнеспособность клеток гепатомы и проявлял гиполипидемическое действие.

Одним из подходов моделирования экспериментальной гиперлипидемии *in vitro* является культивирование клеток с жировой эмульсией липофундином (Ilan E. et al., 2005; Tirosh O. et al., 2009). Добавление липофундина в концентрации 0,05 % в инкубационную среду в условиях наших экспериментов приводило к увеличению интенсивности флуоресценции Nile Red в 4,4 раза, что отражало повышение содержания липидов в клеточной культуре НТС (Рисунок 15). Подобные результаты были получены ранее при культивировании клеток гепатокарциномы линии FaO и первичных крысиных гепатоцитов с

липофундином (Pan E. et al., 2005; Tirosh O. et al., 2009). В ходе выполнения настоящего исследования было показано, что повышение уровня липидов в клетках при добавлении липофундина в культуральную среду обусловлено преимущественно увеличением содержания ТАГ (Таблица 8).

Сесквитерпеновый лактон ахиллин на экспериментальной модели гиперлипидемии, индуцированной липофундином, также проявлял гиполипидемическое действие и уже в концентрации 0,5 мМ уменьшал интенсивность флуоресценции Nile Red, что отражало снижение уровня липидов в клетках гепатомы (Рисунок 16). После экстракции липидов с использованием ферментативного метода было установлено, что гиполипидемический эффект ахиллина на модели гиперлипидемии *in vitro* обусловлен уменьшением содержания ТАГ и холестерина в культуре клеток (Рисунок 17).

Уменьшение уровня ТАГ при действии ахиллина могло быть связано с увеличением транспорта и окисления длинноцепочечных жирных кислот в митохондриях, о чем свидетельствовало повышение величины экспрессии мРНК генов карнитин-пальмитоилтрансферазы 1 (*Cpt1a*) и 2 (*Cpt2*). Снижение содержания холестерина могло быть связано с повышенным синтезом желчных кислот из холестерина, вследствие повышенной экспрессии гена 7 α -гидроксилазы (*Cyp7a1*) и со снижением накопления эфиров холестерина за счет ингибирования экспрессии гена фермента АХАТ (*Soat1*) (Рисунок 25Б).

В настоящее время важная роль в патогенезе и прогрессировании дислипидемии и ассоциированных с ней метаболических заболеваний отводится окислительному стрессу (Бабак О. Я., Топчий И. И., 2004; Valko M. et al., 2007; Беленков Ю. Н. и соавт., 2009; Силина Е. В. и соавт., 2011; Шульпекова Ю. О., 2012; Иванов В. В. и соавт., 2013; Оганов О. Г., 2013; Garcia-Ruiz I. et al., 2015). Гиперпродукция АФК при окислительном стрессе приводит к пероксидации липидов, окислению липопротеинов, модификации белков, нуклеиновых кислот, к увеличению уровней свободных радикалов, что вызывает истощение антиоксидантных систем организма и усугубляет течение данных заболеваний (Valko M. et al., 2007; Winer S. et al., 2009; Yin J. et al., 2009).

Известно, что некоторые сесквитерпеновые лактоны обладают антиоксидантным действием (Eliza J. et al., 2009; Galani V.J. et al., 2010; Mahesh A. et al., 2010; Роднова Е.А. и соавт., 2011, 2012; Адекенов С.М. и соавт., 2012). В связи с этим, нами была исследована антиоксидантная активность сесквитерпенового лактона ахиллина в экспериментах *in vitro* на клеточной культуре гепатомы линии НТС по способности ингибировать образование АФК в клетках при стимуляции свободнорадикального окисления H_2O_2 (0,5 мМ) и на модели гиперлипидемии, индуцированной липофундином в конечной концентрации 0,05 %.

Установлено, что добавление липофундина в инкубационную среду к клеткам гепатомы вызывало достоверное увеличение интенсивности флуоресценции клеток, нагруженных зондом ДХФДА (10 мкМ), что свидетельствует о повышении продукции АФК. Действительно, из литературы известно, что инкубирование клеток гепатокарциномы с липофундином приводит к существенному повышению уровня АФК (Tirosh O. et al., 2009). Показано также, что введение липофундина экспериментальным животным повышает уровень МДА, увеличивает активность СОД, каталазы и содержание окисленных белков. Это отражает развитие окислительного стресса в организме крыс (Delgado Roche L. et al., 2012).

Сесквитерпеновый лактон ахиллин, как показали результаты наших экспериментов, оказывает выраженное антиоксидантное действие, что обусловлено снижением интенсивности флуоресценции зонда на АФК в клеточной культуре НТС при стимуляции свободнорадикального окисления H_2O_2 в конечной концентрации 0,5 мМ и на модели гиперлипидемии, индуцированной липофундином в конечной концентрации 0,05 % (Рисунок 27).

Важную роль в антиоксидантной защите организма и поддержании окислительно-восстановительного баланса играет глутатион. Основной антиоксидантный эффект глутатиона реализуется посредством его участия в работе ферментативных антиоксидантов. Являясь субстратом для глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы, он выступает донором атомов

водорода для восстановления H_2O_2 и липидных перекисей (Кулинский В. И., 2011). Вместе с тем, GSH и SH-содержащие белки являются ингибиторами АФК и стабилизаторами биологических мембран (Janssen-Heininger Y. M. et al., 2013).

АФК воздействуют на клетки путем изменения активности редокс-чувствительных транскрипционных факторов (Меньщикова Е. Б. и соавт., 2010). Особое место среди них занимает сигнальный путь Keap1/Nrf2, активирующий экспрессию генов за счет взаимодействия транскрипционного фактора Nrf2 с антиоксидант-респонсивным элементом, который контролирует в клетках млекопитающих более двухсот генов, в том числе ключевой фермент синтеза глутатиона – глутамилцистеинсинтетаза (Меньщикова Е. Б. и соавт., 2006; Halliwell B., 2012). Многие фенолы природного происхождения, в том числе флавоноиды, проявляют способность активировать транскрипцию генов, регулируемых с участием антиоксидант-респонсивного элемента (Меньщикова Е. Б. и соавт., 2010).

В связи с этим в специальной серии экспериментов мы исследовали влияние ахиллина на содержание восстановленного глутатиона в клетках гепатомы линии НТС. Для регистрации содержания GSH клетки гепатомы были предварительно нагружены флуоресцентным зондом mCB (50 мкМ).

При этом было показано, что экспериментальная гиперлипидемия, индуцированная липофундином, сопровождается увеличением уровня АФК и развитием окислительного стресса в клетках гепатомы. Ахиллин препятствует развитию окислительного стресса в клеточной культуре линии НТС, оказывая не прямое антиоксидантное действие за счет повышения содержания восстановленного глутатиона (Рисунок 28). Это может быть обусловлено взаимодействием ахиллина с антиоксидант-респонсивным элементом и индукцией ключевого фермента синтеза глутатиона – γ -глутамилцистеинсинтетазы, что требует дальнейшего изучения.

Для выявления гиполипидемической активности в соответствии с рекомендациями «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Миронов А. Н., 2012), были проведены опыты на крысах

с курсовым введением сесквитерпенового лактона ахиллина в дозе 10 мг/кг на моделях острой и хронической гиперлипидемии. Одним из подходов моделирования острой гиперлипидемии *in vivo* является однократное введение этилового спирта экспериментальным крысам. Введение этанола стимулирует выработку адреналина надпочечниками, что приводит к липолизу в жировой ткани, увеличению захвата СЖК из крови при участии транспортного связывающего белка, ускорению синтеза жирных кислот и их этерификации в ТАГ (Sapronov N. S. et al., 2006). Кроме того, этиловый спирт стимулирует синтез холестерина и его эфиров и параллельно тормозит β -окисление жирных кислот в митохондриях (Sapronov N.S. et al., 2006). Таким образом, введение этанола стимулирует липолиз в жировой ткани, повышает депонирование ТАГ в печени, что приводит к развитию гиперлипидемии (Хабриев Р.У., 2005).

Острая гиперлипидемия, вызванная тритоном WR 1339, обусловлена другим механизмом. Данная модель основана на ингибировании детергентом активности липопротеинлипазы (Короленко Т. А. и соавт., 2010). Экспериментальная гиперлипидемия характеризуется значительным увеличением концентрации проатерогенных фракций и субфракций холестерина в липопротеинах (Логинова В. М. и соавт., 2011).

Наряду с этим, для моделирования нарушений метаболизма липидов в организме экспериментальных животных может быть использована модель хронической гиперлипидемии, индуцированная атерогенной диетой. При данной модели экспериментальные животные в течение 4 недель получали высокожировую диету (45 % энергии за счет животного жира), содержащую 2,5 % холестерина, 0,5 % холевой кислоты, участвующей в эмульгировании жира в кишечнике, что способствует усвоению экзогенного жира, и 0,1 % 2-тиоурацила для подавления функции щитовидной железы (Окуневич И. В. и соавт., 2010).

Исходя из этого, нами была изучена гиполипидемическая активность сесквитерпенового лактона ахиллина на моделях острой гиперлипидемии, индуцированной этанолом и тритоном WR 1339, а также на модели хронической гиперлипидемии, вызванной высокожировой диетой.

На моделях острой гиперлипидемии ахиллин достоверно снижал повышенный этанолом и тритоном WR 1339 уровень ТАГ в сыворотке крови экспериментальных животных (Таблицы 9; 10). Увеличение концентрации ТАГ в сыворотке крови крыс было обусловлено повышением их синтеза в печени из СЖК, концентрация которых повышалась вследствие активации липолиза в жировой ткани под влиянием этилового спирта (Таблица 9). На модели гиперлипидемии, индуцированной детергентом, повышение уровня ТАГ было связано с ингибированием активности липопротеинлипазы, что препятствовало утилизации липопротеинов и способствовало накоплению ТАГ в сыворотке крови экспериментальных животных (Хабриев Р. У., 2005; Короленко Т. А. и др., 2010; Окуневич И. В. и соавт., 2010).

Снижение содержания ХС и ТАГ в сыворотке крови крыс при действии ахиллина могло быть обусловлено ингибированием их синтеза в печени. Действительно, ахиллин существенно понижал повышенный действием этанола и тритона WR 1339 уровень холестерина и ТАГ в печени крыс (Таблицы 9; 10).

Подобное гиполипидемическое действие показано для сесквитерпеновых лактонов леукомизина, гроссгемина и гроссмизина на моделях острой гиперлипидемии, индуцированной этиловым спиртом и детергентами (Твином 80, тритоном WR 1339) (Роднова Е. А., 2013; Ратькин А. В. и соавт., 2014; Иванов В. В. и соавт., 2015). Причиной уменьшения синтеза ТАГ может быть обнаруженное нами снижение концентрации СЖК в сыворотке крови крыс при действии ахиллина на фоне гиперлипидемии, вызванной этанолом (Таблица 9).

На модели хронической гиперлипидемии, индуцированной атерогенной диетой, нами было установлено, что ахиллин снижает повышенный высокожировой диетой уровень ТАГ в сыворотке крови экспериментальных животных (Таблица 11). Увеличение концентрации ТАГ в сыворотке крови крыс на данной модели было обусловлено повышением их синтеза в печени из СЖК (Таблица 11). Поскольку животные перед забором крови голодали в течение 12 ч, логично предположить, что повышенный в сыворотке крови уровень СЖК при

атерогенной диете не был обусловлен экзогенными жирными кислотами и отражал в определенной мере интенсивность липолиза в жировой ткани.

Снижение содержания ХС и ТАГ в сыворотке крови крыс при действии ахиллина могло быть обусловлено ингибированием их синтеза в печени. Действительно, ахиллин понижал повышенный атерогенной диетой уровень ТАГ и ХС в печени крыс (Таблица 11).

Причиной уменьшения синтеза ТАГ могло быть обнаруженное нами снижение концентрации СЖК в сыворотке крови крыс при действии исследуемого лактона (Таблица 11). Кроме того, ахиллин увеличивал экспрессию генов ключевых ферментов β -окисления жирных кислот – карнитин-пальмитоилтрансферазы 1 (*Cpt1a*) и карнитин-пальмитоилтрансферазы 2 (*Cpt2*) (Wang Y. M. et al., 2010) (Рисунок 30Б).

Снижение содержания холестерина в печени и сыворотке крови крыс могло быть обусловлено, как показали проведённые нами исследования, ингибированием экспрессии гена фермента АХАТ (Рисунок 30Б). Известно, что ингибиторы АХАТ снижают уровень холестерина в плазме, уменьшая абсорбцию холестерина, поступающего с пищей, и подавляя образование и секрецию апоВ-содержащих липопротеинов, таких как ЛПОНП в печени и хиломикронов в кишечнике (Miyazaki A. et al., 2003). Кроме того, как показали проведённые нами эксперименты, курсовое введение ахиллина повышало экспрессию гена *Cyp7a1* (Рисунок 30Б), что способствовало устранению избытка холестерина из организма путем секреции его в желчь или преобразования холестерина в желчные кислоты (Chen Z. Y. et al., 2008).

Снижение уровня холестерина в ЛПНП под влиянием ахиллина может быть обусловлено повышением экспрессии гена рецептора к ЛПНП (*Ldlr*), что способствовало извлечению атерогенных ЛПНП из циркуляции в крови (Рисунок 30Б, Таблица 11).

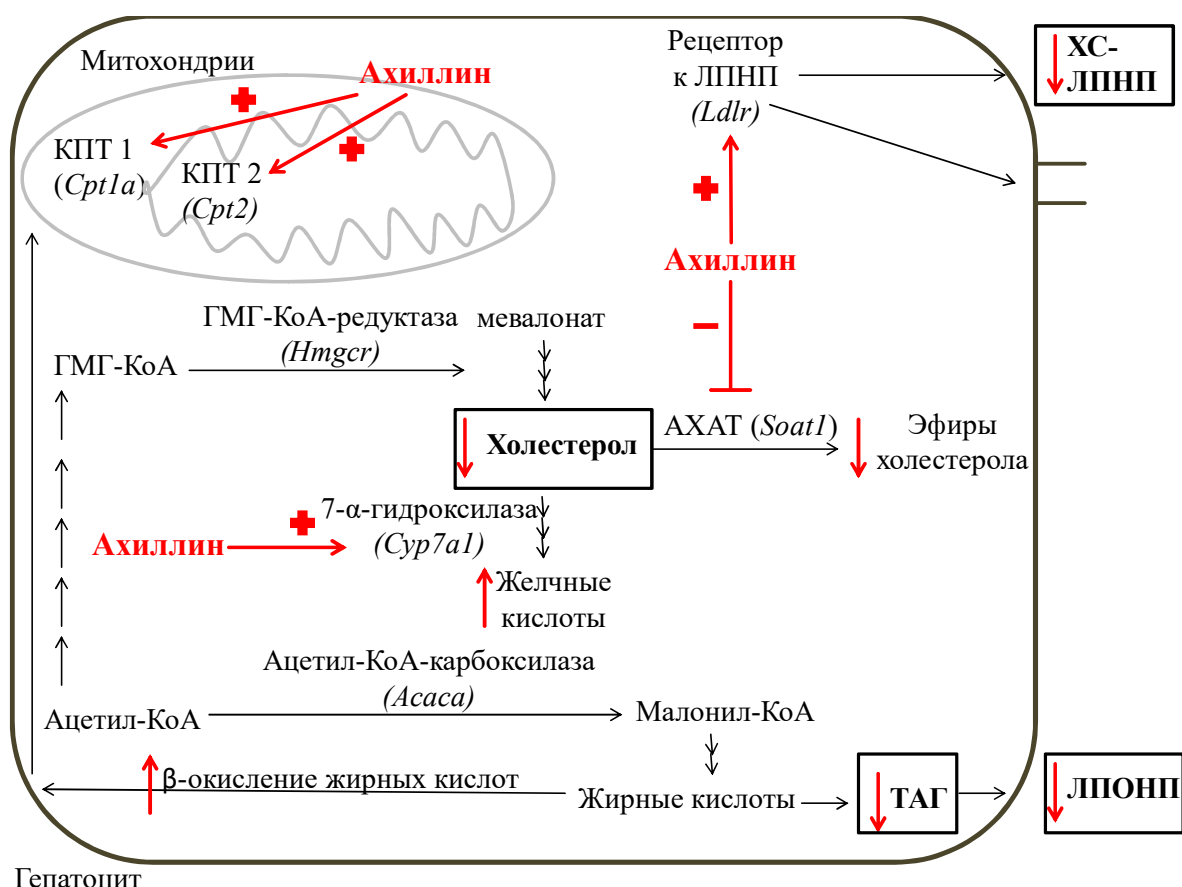


Рисунок 31. Механизмы гиполипидемического действия сесквитерпенового лактона ахиллина.

Примечание: АХАТ – ацилКоА: холестеринацилтрансфераза; ГМГ-КоА – 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА; КПТ 1 и КПТ 2 – карнитин-пальмитоилтрансфераза I и II; ЛПНП – липопротеины низкой плотности. —→ активация; —+ ингибирование.

Исходя из сказанного, можно заключить, что сесквитерпеновый лактон ахиллин обладает выраженным гиполипидемическим действием в условиях экспериментальной гиперлипидемии на клеточной культуре гепатомы линии НТС и на экспериментальных крысах, которое наиболее вероятно обусловлено механизмами, представленными на рисунке 31. К ним относятся: во-первых, повышение величины экспрессии мРНК генов карнитин-пальмитоилтрансферазы 1 (*Cpt1a*) и 2 (*Cpt2*), что уменьшает содержание ТАГ; во-вторых, увеличение величины экспрессии мРНК гена рецептора к ЛПНП (*Ldlr*), что способствует извлечению из циркуляции в крови атерогенных ЛПНП; в-третьих, повышение величины экспрессии мРНК гена 7α-гидроксилазы (*Cyp7a1*) и ингибирование экспрессии мРНК гена АХАТ (*Soat1*) приводит к снижению уровня холестерина в печени и сыворотке крови экспериментальных животных. Обосновано также, что

ахиллин препятствует развитию окислительного стресса в клеточной культуре линии НТС при экспериментальной гиперлипидемии, индуцированной липофундином, оказывая не прямое антиоксидантное действие, за счет повышения содержания восстановленного глутатиона и снижения уровня АФК в клетках.

ВЫВОДЫ

1. Основными молекулярными звеньями патогенеза гиперлипидемии, индуцированной липофундином в клеточной культуре линии НТС, являются гены ферментов липидного обмена (ГМГ-КоА-редуктаза (*Hmgcr*), карнитин-пальмитоилтрансфераза 1 (*Cpt1a*) и 2 (*Cpt2*), 7 α -гидроксилаза (*Cyp7a1*), ацилКоА: холестеролацилтрансфераза (*Soat1*) и ацетил-КоА-карбоксилаза (*Acaca*)) и ген рецептора к липопротеинам низкой плотности (*Ldlr*), которые выступают мишенями гиполипидемического эффекта сесквитерпенового лактона ахиллина.
2. Моделирование экспериментальной гиперлипидемии в клеточной культуре гепатомы линии НТС при инкубации клеток с жировой эмульсией липофундина (0,05 %) приводит к повышению уровня триацилглицеролов в клетках. Ахиллин (0,5 мМ) уменьшает содержание триацилглицеролов и холестерина в клетках гепатомы при экспериментальной гиперлипидемии *in vitro*.
3. Снижение содержания триацилглицеролов и холестерина в клетках гепатомы при действии ахиллина (0,5 мМ) на экспериментальной модели гиперлипидемии *in vitro* связано с увеличением величины экспрессии мРНК генов карнитин-пальмитоилтрансферазы 1 (*Cpt1a*) и 2 (*Cpt2*), 7 α -гидроксилазы (*Cyp7a1*) и ингибированием экспрессии мРНК гена ацилКоА: холестеролацилтрансферазы (*Soat1*).
4. Экспериментальная гиперлипидемия, индуцированная липофундином, на клеточной культуре гепатомы линии НТС сопровождается развитием окислительного стресса (повышение уровня активных форм кислорода и снижение содержания восстановленного глутатиона). Сесквитерпенового лактон ахиллин оказывает антиоксидантное действие, которое обусловлено повышением содержания восстановленного глутатиона.
5. Курсовое применение ахиллина в дозе 10 мг/кг в течение 7 дней препятствует увеличению содержания триацилглицеролов, общего холестерина, свободных жирных кислот, холестерина в липопротеинах низкой плотности в

сыворотке крови и уровня триацилглицеролов и холестерина в печени крыс при острой гиперлипидемии, индуцированной тритоном WR 1339 и этиловым спиртом.

6. Курсовое введение ахиллина в дозе 10 мг/кг в течение 14 дней крысам с хронической гиперлипидемией, индуцированной атерогенной диетой, снижает содержание триацилглицеролов и холестерина в сыворотке крови и печени. Это обусловлено увеличением величины экспрессии мРНК генов карнитин-пальмитоилтрансферазы 1 (*Cpt1a*) и 2 (*Cpt2*), 7 α -гидроксилазы (*Cyp7a1*) и ингибированием экспрессии мРНК гена ацетилКоА: холестеролацилтрансферазы (*Soat1*). Снижение уровня холестерина в липопротеинах низкой плотности под влиянием ахиллина связано с повышением экспрессии мРНК гена рецептора к липопротеинам низкой плотности (*Ldlr*).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

АХАТ – ацилКоА: холестеролацилтрансфераза

ГМГ-КоА – 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА

ГМГ-КоА-редуктаза – 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктаза

ГМГ-КоА-синтаза – 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-синтаза

ДМСО – диметилсульфоксид

ДХФ – дифлорофлуоресцеин

ДХФДА – 2,7-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

ЛПВП – липопротеины высокой плотности

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

ЛПОНП – липопротеины очень низкой плотности

ЛППП – липопротеины промежуточной плотности

МДА – малоновый диальдегид

НАЖБП – неалкогольная жировая болезнь печени

ОТ-ПЦР – количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

СЖК – свободные жирные кислоты

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ХС – общий холестерол

ХС-ЛПВП – холестерол в липопротеинах высокой плотности

ХС-ЛПНП – холестерол в липопротеинах низкой плотности

GSH – восстановленный глутатион

mCB – монохлоробиман

SREBPs – белки, связывающие стерол-регулирующие элементы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аксартов, Р. М. Гиполипидемические свойства и фармакокинетика сесквитерпенового лактона леукомизина : автореф. дис. ...канд. мед. наук : 14.00.25 / Аксартов Рустам Менделевич. – Астана, 2004. – 29 с.
2. Активная защита при окислительном стрессе. Антиоксидант-респонсивный элемент (обзор) / В. В. Ляхович, В. А. Вавилин, Н. К. Зенков, Е. Б. Меньщикова // Биохимия. – 2006. – Т. 71, № 9. – С. 1183-1198.
3. Бабак, О. Я. Окислительный стресс, воспаление и эндотелиальная дисфункция – ключевые звенья патогенеза сердечно-сосудистой патологии при прогрессирующих заболеваниях почек / О. Я. Бабак, И. И. Топчий // Украинский терапевтический журнал. – 2004. – № 4. – С. 4-17.
4. Буеверова, Е. Л. Атерогенная дислипидемия и печень / Е. Л. Буеверова, О. М. Драпкина, В. Т. Ивашкин // Рос. мед. вести. – 2008. – Т. 13, № 1. – С. 17-23.
5. Бутрова, С. А. Висцеральное ожирение – ключевое звено метаболического синдрома / С. А. Бутрова, Ф. Х. Дзгоева // Ожирение и метаболизм. – 2004. – №1. – С. 10-16.
6. Бутрова, С. А. Метаболический синдром: патогенез, клиника, диагностика, подходы к лечению / С. А. Бутрова // Русский медицинский журнал. – 2001. – №9. – С. 56-60.
7. Вайнсон, А. А. Изучение радиомодифицирующего действия препарата арглабин при локальном облучении перевивных опухолей и нормальной ткани (кожи) мышей / А. А. Вайнсон, В. В. Мещерикова, Н. Н. Касаткина // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, № 2. – С. 32-34.
8. Взаимодействие оксимапиностробина и леукомизина с активными формами кислорода в модельных системах / Е. А. Роднова, В. В. Иванов, В. С. Чучалин и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – № 5. – С. 95-100.

9. Власов, В. В. Введение в доказательную медицину / В. В. Власов. – Москва : Медиа Сфера, 2001. – 392 с.
10. Влияние аторвастатина на липиды сыворотка крови мышей при экспериментальной липемии / В. М. Логинова, Ф. В. Тузиков, Н. А. Тузикова и др. // Бюллетень СО РАМН. – 2011. – Т. 31, № 2. – С. 133-137.
11. Влияние леукомизина – сесквитерпенового лактона полыни беловой (Artemisia leucodes Schrenk) на липолиз в изолированных адипоцитах крыс / Е. А. Роднова, В. В. Иванов, В. С. Чучалин и др. // Вестник новых медицинских технологий. – 2012. – Т. XIX, № 4. – С. 114-115.
12. Генные сети / Н. А. Колчанов, Е. В. Игнатьева, О. А. Подколотная и др. // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17, № 4/2. – С. 833-850.
13. Генные сети липидного метаболизма / Н. А. Колчанов, М. И. Воевода, Т. Н. Кузнецова и др. // Бюллетень СО РАМН. – 2006. – № 2 (120). – С. 29-42.
14. Герасимов, И. Г. Оценка жизнеспособности клеток по их морфометрическим параметрам на примере культивируемых фибробластов / И. Г. Герасимов, А. Г. Попандопуло // Цитология. – 2007. – Т. 49, № 3. – Р. 204-209.
15. Гиполипидемический эффект арглабина в клеточной культуре гепатомы / А. В. Ратькин, Ю. А. Пфаргер, В. В. Иванов и др. // Сибирское медицинское обозрение. – 2015. – Т. 5, № 89. – С. 43-48.
16. Гиполипидемическое действие грассмизина в экспериментах *in vivo* и *in vitro* / В. В. Иванов, А. В. Ратькин, Ю. А. Пфаргер и др. // Сибирское медицинское обозрение. – 2015. – Т. 5, № 89. – С. 43-48.
17. Гланц, С. Медико – биологическая статистика / С. Гланц. – Пер. с англ. – М. : Практика, 1998. – 459 с.
18. Гмурман, В. Е. Теория вероятности и математическая статистика / В. Е. Гмурман. – Москва : Высшая школа, 2006. – 284 с.

19. Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза. Российские рекомендации (IV пересмотр), 2009. – 80 с.
20. Евдокимова, Г. Дислипидемия как фактор риска развития сердечно-сосудистых заболеваний и осложнений / Г. Евдокимова // *Consilium medicum*. – 2009. – №. 10.
21. Закономерности течения свободнорадикальных процессов и прогноз ишемического и геморрагического инсульта / Е. В. Силина, С. А. Румянцева, С. Б. Болевич, Н. И. Меньшова // *Журнал неврологии и психиатрии*. – 2011. – Т. 12, № 2. – С.36-42.
22. Залевская, А. Г. Метаболическая регуляция и цАМФ-зависимая протеинкиназа (АМРК): враг или союзник? / А. Г. Залевская, Е. М. Патракеева // *Сахарный диабет*. – 2008. – Т. 4. – С. 12-17.
23. Иванов, В. В. Адипоциты. Сахарный диабет. Окислительный стресс / В. В. Иванов, Е. В. Шахристова, Е. А. Степовая, Т. С. Фёдорова, В. В. Новицкий. – Томск : Печатная мануфактура, 2013. – 112 с.
24. Изменения фракционного состава липопротеинов сыворотки крови мышей и крыс при липемии, вызванной тритоном WR 1339 / Т. А. Короленко, Ф. В. Тузиков, Е. Д. Васильева, М. С. Черканова, Н. А. Тузикова // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2010. – Т. 149, № 5. – С. 499-502.
25. К механизму гипохолестеролемического действия сесквитерпенового лактона леукомизина / С. М. Адекенов, Е. А. Роднова, В. В. Иванов и др. // – 2012. – № 2-3. – С. 50-53.
26. Комшилова, К. А. Ожирение и неалкогольная жировая болезнь печени: метаболические риски и их коррекция / К. А. Комшилова, Е. А. Трошина // *Ожирение и метаболизм*. – 2015. – Т. 12, № 2. – С. 35-39.
27. Макаров, М. С. Флюоресценция в исследовании клеток: пути и возможности / М. С. Макаров // *Молекулярная медицина*. – 2013. – № 4. – С. 10-14.

28. Мартинович, Г. Г. Утилизация пероксида водорода эпителиальными клетками амниона человека / Г. Г. Мартинович, С. Н. Черенкевич // Биомедицинская химия. – 2005. – Т. 51, № 6. – С. 626-633.
29. Мельниченко, Г. А. Распространенность неалкогольной жировой болезни печени при ожирении и ее взаимосвязь с факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний и сахарного диабета 2-типа / Г. А. Мельниченко, А. Ю. Елисеева, М. В. Маевская // РЖГГИ. – 2012. – Т. 2. – С. 45-52.
30. Меньщикова, Е. Б. Редокс-чувствительная сигнальная система NRF2/ARE ее роль при воспалении / Е. Б. Меньщикова, В. О. Ткачев, Н. К. Зенков // Молекулярная биология. – 2010. – Т. 44, № 3. – С. 389-404.
31. Методический подход к изучению ожирения в эксперименте / А. А. Никоноров, А. А. Тиньков, Л. М. Железнов, В. В. Иванов // – Оренбург : ОАО «ИПК «Южный Урал», 2013. – 240 с.
32. Молекулярные аспекты антиатеросклеротического действия коротких пептидов / В. Х. Хавинсон, Н. С. Линькова, Е. В. Елашкина и др. // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2014. – № 3. – С. 185-189.
33. Ньюсхолм, Э. Регуляция метаболизма / Э. Ньюсхолм, К. Старт. – Москва : Мир, 1977. – 407 с.
34. Оганов, О. Г. Сердечно-сосудистые заболевания в начале XXI века : медицинские, социальные, демографические аспекты и пути профилактики / О. Г. Оганов // Медицина труда, восстановительная и профилактическая медицина. – 2013. – С. 257-264.
35. Ожирение: молекулярные механизмы и оптимизация таргетной терапии / М. А. Пальцев, И. М. Кветной, А. Н. Ильницкий и др. // Молекулярная медицина. – 2013. – № 2. – С. 3-12.
36. Ойноткинова, О. Ш. Дислипидемия и ассоциированные метаболические заболевания / О. Ш. Ойноткинова, Е. И. Дедов // Архив внутренней медицины. – 2011. – № 1. – С. 67-73.

37. Оксидативный стресс при хронической сердечной недостаточности. Возможности фармакологической коррекции / Ю. Н. Беленков, Е. В. Привалова, Ю. А. Данилогорская и др. // Лекция. – 2009. – № 1. – С. 4-9.
38. Окуневич, И. В. Антиатеросклеротическое действие милдроната в эксперименте / И. В. Окуневич, В. Е. Рыженков // Пат. физиол. exper. тер. – 2002. – Т. 2. – С. 24-27.
39. Окуневич, И. В. Гиполпидемическое и антиатеросклеротическое действие симпатолитика резерпина: экспериментальные данные / И. В. Окуневич, Л. К. Хныченко, Н. С. Сапронов // Артериальная гипертензия. – 2007. – Т. 12, № 2. – С. 136-140.
40. Особенности фармакологических и клинических свойств розувастатина / В. С. Задонченко, Н. Б. Шахрай, Г. Г. Шехян и др. // Русский медицинский журнал. – 2011. – Т. 19, № 12. – С. 772-778.
41. Племенков, В. В. Химия изопреноидов. Глава 4. Гемитерпены / В. В. Племенков // Химия растительного сырья. – 2005. – № 4. – С. 93-103.
42. Племенков, В. В. Химия изопреноидов. Глава 6. Сесквитерпены / В. В. Племенков // Химия растительного сырья. – 2006. – № 4. – С. 59-86.
43. Применение простых и сложных эфиров: современные аспекты молекулярного дизайна – от душистых веществ и биологически активных соединений до применения в медицинских нанотехнологиях / Е. А. Дикусар, В. И. Поткин, Н. Г. Козлов и др. // Химия растительного сырья. – 2014. – № 3. – С. 61-84.
44. Противовирусная активность соединений кумаринового ряда (Часть 1) / А. З. Абышев, Р. А. Абышев, С. В. Гадзиковский и др. // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2013. – Т. 5, № 1. – С. 34-41.
45. Рахимов, К. Д. Фармакологическое и доклиническое изучение нового противоопухолевого препарата арглабина / К. Д. Рахимов // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, № 2. – С. 15-17.
46. Роднова, Е. А. Влияние леукомизина – сесквитерпенового лактона полыни беловой (Artemisia leucodes Schrenk) на липолиз в изолированных

адипоцитах крыс / Е. А. Роднова, В. В. Иванов, В. С. Чучалин и др. // Вестник новых медицинских технологий. – 2012. – Т. XIX, № 4. – С. 114-115.

47. Роднова, Е. А. Механизмы гипополипидемического действия сесквитерпенового лактона ахиллина : дис. ... канд. биол. наук : 14.03.06 / Роднова Екатерина Александровна. – Томск, 2013. – 98 с.

48. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / под ред. А. Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.

49. Саенко, Ю. В. Исследование динамики радиационно-индуцированного оксидативного стресса в культуре клеток лейкемии / Ю. В. Саенко, А. М. Шутов // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. – 2011. – № 3 (19). – С. 30-41.

50. Семендяева, М. Е. Неалкогольная жировая болезнь печени как медицинская и социальная проблема / М. Е. Семендяева // Клиническая практика. – 2012. – № 2. – С. 71-80.

51. Сердечно-сосудистые заболевания [Электронный ресурс] / Всемирная организация здравоохранения. – Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/ru/#>.

52. Современные технологии тестирования лекарств in vitro: использование микробиореакторов / Н. В. Сенявина, Е. В. Трушкин, А. Л. Русанов и др. // Технология биопрепаратов. – 2013. – № 1. – С. 51-58.

53. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России. – М., АстраФармСервис, 2011 г. – 1728 с.

54. Средство, обладающее гипополипидемическими свойствами : пат. 239233 Рос. Федерация : МПК А 61 К 31/185, А 61 К 31/132, А 61 Р 3/06 / И.В. Окуневич. – № 2008129863/15 ; заявл. 18.07.2008 ; опубл. 27.06.2010.

55. Статины, фибраты и венозная тромбоземболия: метаанализ / А. Сквиззато, М. Галли, Э. Ромуалди и др. // Серцева недостатність. – 2011. – № 2. – С. 107-116.

56. Терпеноиды *Achillea micrantha* / С. М. Адекенов, Н. М. Гафуров, А. Ж. Турмухамбетов, В. И. Ивлев // Химия природных соединений. – 1987. – № 2. – С. 305-306.
57. Торшин, И. Ю. Сосудистые заболевания сердца, мозга и молекулярные гены. Часть 2: роль молекулярных генов в системе гемостаза и формировании атеросклероза / И. Ю. Торшин, О. А. Громова // Трудный пациент. – 2008. – Т. 6, № 4. – С. 5-11.
58. Трошков, В. В. Получение синтетических эквивалентов 3R-3-гидроксиглутарильного и липофильного синтонов для синтеза статиноподобных соединений с терпеноидным фрагментом / В. В. Трошков, В. В. Фоменко, Н. Ф. Салахутдинов // Химия и технология растительных веществ: Тезисы докладов V Всероссийской научной конференции 8-12 июня 2008 г. – Уфа. – 2008. – С. 291.
59. Хабриев, Р. У. Доклинические исследования эффективности лекарственных средств, предназначенных для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы / Р. У. Хабриев // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р. У. Хабриева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Медицина, 2005. – Ч. 2. – С. 393-476.
60. Цитотоксические и гиполипидемические свойства арглабина на культуре клеток гепатомы крыс / А. В. Ратькин, Ю. А. Пфаргер, В. В. Иванов и др. // В мире научных открытий. – 2015. – Т. 8.2 (68). – С. 774-790.
61. Шульпекова, Ю. О. Неалкогольная жировая болезнь печени: патогенез, диагностика, лечение / Ю. О. Шульпекова / Фарматека. – 2007. – № 6. – С. 48-53.
62. Шульпекова, Ю. О. Патогенетическое значение липидов при неалкогольной жировой болезни печени / Ю. О. Шульпекова / РЖГГИ. – 2012. – Т. 1. – С. 45-56.
63. Эффекты грассгемина и грассмизина при модели острой гиперлипидемии, индуцированной этанолом / А. В. Ратькин, О. А. Кайдаш,

В. В. Иванов и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 67-72.

64. A quantum chemical and chemometric study of sesquiterpene lactones with cytotoxicity against tumor cells / F. Arantes, L. Barbosa, C. Maltha et al. // J. Chemometrics. – 2011. – Vol. 25. – P. 401-407.

65. A review on hyperlipidemic / K. Harikumar, S. A. Althaf, B. Kishore kumar, M. Ramunaik et al. // International journal of novel trends in pharmaceutical sciences. – 2013. – Vol. 3, N 4. – P. 59-71.

66. Ablation of gp78 in liver improves hyperlipidemia and insulin resistance by inhibiting SREBP to decrease lipid biosynthesis / T. F. Liu, J. J. Tang, P. S. Li et al. // Cell Metab. – 2012. – Vol. 16. – P. 213-225.

67. Acute and chronic effects of a 24-hour intravenous triglyceride emulsion challenge on plasma lecithin: cholesterol acyltransferase, phospholipid transfer protein, and cholesteryl ester transfer protein activities / S. C. Riemens, A. Van Tol, W. J. Sluiter, R. P. Dullaart // J. Lipid. Res. – 1999. – Vol. 43. – P. 1459-1466.

68. Adiels, M. Fatty Liver, Insulin Resistance, and Dyslipidemia / M. Adiels, M.-R. Taskinen, J. Boren // Disorders of lipid metabolism. – 2008. – Vol. 8. – P. 60-64.

69. Aldehyde oxidase 1 is highly abundant in hepatic steatosis and is downregulated by adiponectin and fenofibric acid in hepatocytes in vitro / M. Neumeier, J. Weigert, A. Schaffler et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2006. – Vol. 350. – P. 731-735.

70. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice / Y. Li, S. Xu, M. M. Mihaylova et al. // Cell Metab. – 2011. – Vol. 13, N 4. – P. 376-388.

71. An in vitro assay system for antihyperlipidemic agents by evaluating lipoprotein profiles from human intestinal epithelium-like cells / J. Takahashi, K. Ogiwara, Y. Naya et al. // Biotech. – 2013. – Vol. 3. – P. 213-218.

72. An LXR agonist promotes GBM cell death through inhibition of an EGFR/AKT/SREBP-1/LDLR-dependent pathway / D. Guo, F. Reinitz, M. Youssef et al. // Cancer. Discov. – 2011. – Vol. 1. – P. 442-456.

73. Anticancer activity of new synthetic α -methylene- δ -lactones on two breast cancer cell lines / A. Wyrezbska, K. Gach, U. Lewandowska et al. // Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. – 2013. – Vol. 113, N 6. – P. 391-400.
74. Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones: bioactivity and molecular mechanisms / S. Zhang, Y. K. Won, C. N. Ong, H. M. Shen // Curr. Med. Chem. Anticancer Agents. – 2005. – Vol. 5. – P. 239-249.
75. Antidiabetic and antilipidemic effect of eremanthin from *Costus speciosus* (Koen.) Sm., in STZ-induced diabetic rats / J. Eliza, P. Daisy, S. Ignacimuthu, V. Duraipandiyan // Chem. Biol. Interact. – 2009. – Vol. 182, N 1. – P. 67-72.
76. Anti-hyperlipidemic sesquiterpenes and new sesquiterpene glycosides from the leaves of artichoke (*Cynara scolymus* L.): structure requirement and model of action / H. Shimoda, K. Ninomiya, N. Nishida // Bioorganic and medicinal chemistry letters. – 2003. – Vol. 13. – P. 223-228.
77. Antihypertensive and antihyperlipidemic effects of *Achillea wilhelmsii* / S. Asgary, G. H. Naderi, N. Sarrafzadegan et al. // Drugs Exp. Clin. Res. – 2000. – Vol. 26, N 3. – P. 89-93.
78. Anti-inflammatory properties from isolated compounds of *Cyclolepis genistoides* / A. Sosa, M. R. Fusco, P. Rossomando et al. // Pharm. Biol. – 2011. – Vol. 49, N 7. – P. 675-678.
79. Antimicrobial activity of sesquiterpene lastones isolated from traditional medicinal plant, *Costus speciosus* (Koen ex. Retz.) Sm. / V. Duraipandiyan, N. A. Al-Harbi, S. Ignacimuthu, C. Muthukumar / BMC Complement. Altern. Med. – 2012. – Vol. 12, N 13. – doi: 10.1186/1472-6882-12-13.
80. Apoptosis-mediated cytotoxic effects of parthenolide and the new synthetic analog MZ-6 on two breast cancer cell lines / A. Wyrebska, J. Szyman'ski, K. Gach et al. // Mol. Biol. Rep. – 2013. – Vol. 40. – P. 1655-1663.
81. Assessment of the chemopreventive effect of casearin B, a clerodane diterpene extracted from *Casearia sylvestris* (Salicaceae) / A. M. Prieto, A. G. dos Santos, A. P. Oliveira, A. J. Cavaleiro et al. // Food Chem. Toxicol. – 2013. – Vol. 53. – P. 153-159.

82. Association of plasma level of malondialdehyde-modified low-density lipoprotein with coronary spastic angina: implication of acute coronary events / S. Tani, K. Nagao, T. Anazawa et al. // *Int. J. Cardiol.* – 2009. – Vol. 135. – P. 202-206.
83. Atherosclerosis – Diet-induce atherosclerosis/hypercholesterolemia in rodent models [Электронный ресурс] / edited by M. A. – 2008. – Режим доступа: <http://www.researchdiets.com/product-literature>.
84. Bays, H. Statin safety: an overview and assessment of the data 2005 / H. Bays // *Am. J. Cardiol.* – 2006. – Vol. 97. – P. 6-27.
85. Bodor, E. T. Nicotinic acid: an old drug with a promising future / E. T. Bodor, S. Offermanns // *Br. J. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 153, N 1. – P. 68-75.
86. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.
87. Buger, N. J. The Bradford method for protein quantitation / N. J. Buger // *Methods in molecular biology.* – 1994. – Vol. 32. – P. 9-15.
88. Burg, J. S. Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast / J. S. Burg, P. J. Espenshade // *Prog. Lipid Res.* – 2011. – Vol. 50. – P. 403-410.
89. β -conglycinin combined with fenofibrate or rosuvastatin have exerted distinct hypocholesterolemic effects in rats / E. S. Ferreira, M. A. Silva, A. Demonte et al. // *Lipids Health Dis.* – 2012. – Vol. 11, N 11. – P. 1-8.
90. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2 : biochemical, molecular and medical aspects / J. P. Bonnefont, F. Djouadi , C. Prip-Buus et al. // *Mol. Aspects Med.* 2004. Vol. 25, N 5-6. P. 495-520.
91. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2 : biochemical, molecular and medical aspects / J. P. Bonnefont, F. Djouadi , C. Prip-Buus et al. // *Mol. Aspects Med.* 2004. Vol. 25, N 5-6. P. 495-520.
92. Chaturvedi, D. Sesquiterpene lactones : structural diversity and their biological activities / D. Chaturvedi // *Opportunity, challenge and scope of natural products in medicinal chemistry.* – 2011. – P. 313-334.

93. Chen, Z. Y. Cholesterol-lowering nutraceuticals and functional foods / Z. Y. Chen, R. Jiao, K. Y. Ma // J. Agric. Food Chem. – 2008. – Vol. 56, N 19. – P. 8761-8773.
94. Chiang, J. Y. Regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXR α) / J. Y. Chiang, R. Kimmel, D. Stroup // Gene. – 2001. – Vol. 262. – P. 257-265.
95. Cholesterol metabolism and expression of its relevant genes in cultured steatotic hepatocytes / X. H. Wang, Y. Tian, Z. J. Guo et al. // Journal of digestive diseases. – 2009. – Vol. 10. – P. 310-314.
96. Classification of different cholesterol and triglyceride reducing medicines [Электронный ресурс] / WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. – Режим доступа:
http://www.whocc.no/atc_ddd_index/?code=C&showdescription=yes.
97. Comparison of anti-invasive activity of parthenolide and 3-isopropyl-2-methyl-4-methyleneisoxazolidin-5-one (MZ-6) – a new compound with α -methylene- γ -lactone motif – on two breast cancer cell lines / A. Wyrezbska, K. Gach, J. Szemraj et al. // Chem. Biol. Drug Des. – 2012. – Vol. 79. – P. 112-120.
98. Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling / J. J. Luiken, S. L. Coort, J. Willems et al. // Diabetes. – 2003. – Vol. 52. – P. 1627-1634.
99. Curcumin decreases oleic acid-induced lipid accumulation via AMPK phosphorylation in hepatocarcinoma cells / O. H. Kang, S. B. Kim, Y. S. Seo et al. // European review for medical and pharmacological sciences. – 2013. – Vol. 17. – P. 2578-2586.
100. Dahiru, D. Effect of Aqueous Extract of Ziziphus mauritiana Leaf on Cholesterol and Triglyceride Levels in Serum and Liver of Rats Administered Alcohol / D. Dahiru, O. Obidoa // Pakistan Journal of Nutrition. – 2009. – Vol. 8, N 12. – P. 1884-1888.

101. De Souza, M. O. The hypocholesterolemic activity of açai (Euterpe oleracea Mart.) is mediated by the enhanced expression of the ATP-binding cassette, subfamily G transporters 5 and 8 and low-density lipoprotein receptor genes in the rat / M. O. de Souza, L. Souza E Silva, C. L. de Brito Magalhães, B. B. de Figueiredo, D. C. Costa, M. E. Silva, M. L. Pedrosa // *Nutr. Res.* – 2012. – Vol. 32, N 12. – P. 976-984.
102. Delgado Roche, L. Oxidative stress: the dark side of soybean-oil-based emulsions used in parenteral nutrition / L. Delgado Roche // *Oxid. Antioxid. Med. Sci.* – 2012. – Vol. 1, N 1. – P. 11-14.
103. Dentin, R. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver / R. Dentin, J. Girard, C. Postic // *Biochimie.* – 2005. – Vol. 87. – P. 81-86.
104. Determining hepatic triglyceride production in mice: comparison of poloxamer 407 with Triton WR-1339 / J. S. Millar, D. A. Cromley, M. G. McCoy et al. // *J. Lipid. Res.* – 2005. – Vol. 46, N 9. – P. 2023-2028.
105. Development of a structural model for NF-kappaB inhibition of sesquiterpene lactones using self-organizing neural networks / S. Wagner, A. Hofmann, B. Siedle et al. // *J. Med. Chem.* – 2006. – Vol. 49, N 7. – P. 2241-2252.
106. Dietary cholesterol fails to stimulate the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) in transgenic mice / L. B. Agellon, V. A. Drover, S. K. Cheema et al. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 20131-20134.
107. Discovery of gemfibrozil analogues that activate PPAR α and enhance the expression of gene CPT1A involved in fatty acids catabolism / B. De Filippis, A. Giancristofaro, A. Ammazalorso et al. // *European Journal of Medicinal Chemistry.* – 2011. – Vol. 46. – P. 5218-5224. – doi : 10.1038/nrgastro.2013.197.
108. Effect of bile acid sequestrants on glucose metabolism, hepatic de novo lipogenesis, and cholesterol and bile acid kinetics in type 2 diabetes : a randomized controlled study / C. Beysen, E. J. Murphy, K. Deines et al. // *Diabetologia.* – 2012. – Vol. 55, N 2. – P. 432-442.

109. Effect of gemfibrozil on apolipoprotein B secretion and diacylglycerol acyltransferase activity in human hepatoblastoma (HepG2) cells / D. Zhu, Sh. H. Ganji, V. S. Kamanna, M. L. Kashyap // *Atherosclerosis*. – 2002. – Vol. 164. – P. 221-228.
110. Effect of lipopolysaccharide on the hemocyte apoptosis of *Eriocheir sinensis* H. Xu, S. Lyu, J. Xu et al. / *J. Zhejiang Univ.-Sci. B (Biomed & Biotechnol)*. – 2015. – Vol. 16, N 12. – P. 971-979.
111. Effects of fenofibrate on lipid metabolism in adipose tissue of rats / A. V. Ferreira, G. G. Parreira, A. Green, L. M. Botion // *Metabolism*. – 2006. – Vol. 55, N 6. – P. 731-735.
112. Effects of hypoxic exercise training on microRNA expression and lipid metabolism in obese rat livers / Y.-li Lu, W. Jing, L.-shi Feng et al. // *J. Zhejiang. Univ. Sci. B*. – 2014. – Vol. 15, N 9. – P. 820-829.
113. Emami, S. A. Sesquiterpene lactone fraction from *Artemisia khorassanica* inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression through the inactivation of NF- κ B / S. A. Emami, S. Z. Taghizadeh Rabe, M. Iranshahi // *Immunopharmacol. Immunotoxicol*. – 2010. – Vol. 32, N 4. – P. 688-695.
114. Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids / I. Le Blanc et al. // *Nature Cell Biol*. – 2005. – Vol. 7. – P. 653-664.
115. Esch, M. B. The role of body-on-a-chip devices in drug and toxicity studies / M. B. Esch, T. L. King, M. L. Shuler // *Ann. Rev. Biomed. Eng*. – 2011. – Vol. 13. – P. 55-72.
116. Evaluation of fluorescent dyes for measuring intracellular glutathione content in primary cultures of human neurons and neuroblastoma SH-SY5Y / J. Sebastia, R. Cristofol, M. Martin et al. // *Cytometry A*. – 2003. – Vol. 51, N 1. – P. 16-25.
117. Evaluation of foam cell formation in cultured macrophages: an improved method with Oil Red O staining and Dil-oxLDL uptake / S. Xu, Y. Huang, Y. Xie et al. // *Cytotechnology*. – 2010. – Vol. 62. – P. 473-481.

118. Farvin, K. H. S. Synergistic effect of squalen and simvastatin on fecal cholesterol excretion in rats / K. H. S. Farvin, A. Surendraraj, R. Anandan // *Asian J. of Clin. Nutr.* – 2009. – Vol. 1, N 2. – P. 102-106.
119. Fenofibrate activates Nrf2 through p62-dependent Keap1 degradation / J. S. Park, D. H. Kang, D. H. Lee, S. H. Bae // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2015. – Vol. 465, N 3. – P. 542-547.
120. Finkel, T. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing / T. Finkel , N.J. Holbrook // *Nature.* – 2000. – Vol. 408. – P. 239-247.
121. Flavonoid ingredients of Ginkgo biloba leaf extract regulate lipid metabolism through Sp1-mediated carnitine palmitoyltransferase 1A up-regulation / T. Wei, F. Xiong, Sh. Wang et al. // *Journal of biomedical science.* – 2014. – Vol. 21, N 87. – P. 1-11.
122. Folch, J. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues / J. Folch, M. Lees, G. H. Sloane Stanley // *J. Biol. Chem.* – 1957. – Vol. 226. – P. 497-509.
123. Frantz, I. D. Acceleration of hepatic cholesterol synthesis by triton WR-339 / I. D. Frantz, B. T. Hinkelman // *JEM.* – Vol. 101, N 3. – P. 225-232.
124. Fredrickson, D. S. A system for phenotyping hyperlipoproteinemia / D. S. Fredrickson, R. S. Lees // *Circulation.* – 1965. – Vol. 31. – P. 321-327.
125. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease / M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol et al. // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2007. – Vol. 39. – P.44-84.
126. Galani, V. J. Sphaeranthus indicus Linn.: a phytopharmacological review / V. J. Galani, B. G. Patel, D. G. Rana // *Int. J. Ayuveda. Res.* – 2010. – Vol. 1, N 4. – P. 247-253.
127. Gbaguidi, G. F. The inhibition of the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) promoter by fibrates in cultured cells is mediated via the liver x receptor alpha and peroxisome proliferator-activated receptor alpha heterodimer // G. F. Gbaguidi, L.B. Agellon // *Nucleic. Acids Res.* – 2004. – Vol. 32, N 3. – P. 1113-1121.

128. Gel entrapment culture of rat hepatocytes for investigation of tetracycline-induced toxicity / Ch. Shen, Q. Meng, E. Schmelzer, A. Bader // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 238. – P. 178-187.
129. Ginkgo biloba extract prevents ethanol induced dyslipidemia / P. Yao, F. Song, K. Li et al. // *Am J Chin Med.* – 2007. – Vol. 35, № 4. – P. 643-652.
130. Ginsberg, H.N. New perspectives on atherogenesis: role of abnormal triglyceride-rich lipoprotein metabolism / H. N. Ginsberg // *Circulation.* – 2002. – Vol. 106. – P. 2137-2142.
131. Goldstein, J. L. Protein sensors for membrane sterols / J. L. Goldstein, R. A. Bose-Boyd, M. S. Brown // *Cell.* – 2006. – Vol. 124. – P. 35-46.
132. Goto, D. Upregulation of low density lipoprotein receptor by gemfibrozil, a hypolipidemic agent, in human hepatoma cells through stabilization of mRNA transcripts / D. Goto, T. Okimoto, M. Ono et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 1997. – Vol. 17, N 11. – P. 2707-2712.
133. Guyton, J. R. Benefit versus risk in statin treatment / J. R. Guyton // *Am. J. Cardiol.* – 2006. – Vol. 97. – P. 96-99.
134. Haglund, O. The effects of fish oil on triglycerides, cholesterol, fibrinogen and malondialdehyde in humans supplemented with vitamin E / O. Haglund, R. Luostarinen, R. Wallin // *J. Nutr.* – 1991. – Vol. 121. – P.165-169.
135. Halliwell, B. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? / B. Halliwell, M. Whiteman // *British J. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 142. – P. 231-255.
136. Hennekens, C. H. Current perspectives on lipid lowering with statins to decrease risk of cardiovascular disease / C. H. Hennekens // *Clin. Cardiol.* – 2001. – Vol. 24, N 7. – P. 2-5.
137. Hepatocurative potential of sesquiterpene lactones of *Taraxacum officinale* on carbon tetrachloride induced liver toxicity in mice / A. Mahesh, R. Jeyachandran, L. Cindrella // *Acta Biol. Hung.* – 2010. – Vol. 61, N 2. – P. 175-190.

138. Hepatocyte growth factor protects rat RINm5F cell line against free fatty acid-induced apoptosis by counteracting oxidative stress / C. Santangelo, P. Matarrese, R. Masella, M. C. Di Carlo et al. // *J. Mol. Endocrinol.* – 2007. – Vol. 38. – P. 147-158.
139. Herbal medicine: biomolecular and clinical aspects, second edition / editors I.F.F. Bezie, S. Wachtel-Galor. – CRC Press. – 2011. – 499 p.
140. High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening / P. J. O'Brien, W. Irwin, D. Diaz, E. Howard-Cofield et al. // *Organ toxicity and mechanisms.* – 2006. – Vol. 80. – P. 580-604.
141. High levels of lipid peroxidation induced by Lipofundin administration correlates with atherosclerotic lesions in rabbits / L. Delgado, E. Acosta, Y. Hernández-Matos, M. A. Bécquer et al. // *Pharmacologyonline.* – 2010. – Vol. 3. – P. 727-736.
142. High-fat diet feeding impairs both the expression and activity of AMPK α in rats' skeletal muscle / Y. Liu, Q. Wan, Q. Guan et al. // *BBRC.* – 2006. – Vol. 339. – P. 701-707.
143. HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells / P. Rovere-Querini, A. Capobianco, P. Scaffidi et al. // *EMBO Rep.* – 2004. – Vol. 5. – P. 825-830.
144. Horton, J. D. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver / J. D. Horton, J. L. Goldstein, M. S. Brown // *J. Clin. Invest.* – 2002. – Vol. 109, N 9. – P. 1125-1131.
145. Huang, Z. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α in mice induces expression of the hepatic low-density lipoprotein receptor / Z. Huang, X. Zhou, A. C. Nicholson et al. // *Br. J. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 155, N 4. – P. 596-605.
146. Hyperlipidemia in early adulthood increases long-term risk of coronary heart disease / A. M. Navar-Boggan, E. D. Peterson, R. B. D'Agostino et al. // *Circulationaha.* – 2015. – doi: 10.1161/circulationaha.114.012477.

147. Hyperlipidemia-a deadly pathological condition / A. Rohilla, N. Dagar, S. Rohilla // *International journal of current pharmaceutical research*. – 2012. – Vol. 4, N 3. – P. 15-18.
148. Identification of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by sterol regulatory element—binding proteins / Y.-A. Moon, N. A. Shah, S. Mohapatra et al. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 45358-45366.
149. Identification of liver X receptor-retinoid X receptors as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter / T. Yoshikawa, H. Shimano, M. Amemiya-Kudo et al. // *Mol. Cell. Biol.* – 2001. – Vol. 21. – P. 2991-3000.
150. Identification of luminal Loop 1 of Scap protein as the sterol sensor that maintains cholesterol homeostasis / M. Motamed, Y. Zhang, M. L. Wang et al. // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286. – P. 18002-18012.
151. Ikonen, E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization / E. Ikonen // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2008. – Vol. 9, N 2. – P. 125–138.
152. Ilan, E. Triacylglycerol-mediated oxidative stress inhibits nitric oxide production in rat isolated hepatocytes / E. Ilan, O. Tirosh, Z. Madar // *J. Nutr.* – 2005. – Vol. 135, N 9. – P. 2090-2095.
153. Impact of new-generation lipid emulsions on cellular mechanisms of parenteral nutrition-associated liver disease / D. G. Burrin, K. Ng, B. Stoll, M. Saenz De Pipaon // *Adv. Nutr.* – 2014. – Vol. 5. – P. 82-91.
154. In vitro treatment of HepG2 cells with saturated fatty acids reproduces mitochondrial dysfunction found in nonalcoholic steatohepatitis / I. García-Ruiz, P. Solís-Muñoz, D. Fernández-Moreira et al. // *Disease models and mechanisms*. – 2015. – Vol. 8. – P. 183-191.
155. Influence of fenofibrate treatment on triacylglycerides, diacylglycerides and fatty acids in fructose fed rats / T. Kopf, H. L. Schaefer, M. Troetzmueller et al. // *PLoS. One*. – 2014. – Vol. 9, N 9. – e106849.

156. Infusion of a lipid emulsion modulates AMPK and related proteins in rat liver, muscle, and adipose tissues / S. Anavi, E. Ilan, O. Tirosh, Z. Madar // *Obesity*. – 2010. – Vol. 18, N 6. – P. 1108-1115.
157. Inhibition of 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene-induced mouse skin carcinogenesis by *Artemisia capillaries* / Y. S. Kim, K. N. Bang, C. K. Hah, H. I. Gang, Y. L. Ha // *Journal of food science*. – 2008. – Vol. 73, N 1. – P. 16-20.
158. Inhibition of SREBP by a small molecule, betulin, improves hyperlipidemia and insulin resistance and reduce atherosclerotic plaques / J. J. Tang, J. G. Li, W. Qi et al. // *Cell Metab.* – 2011. – Vol. 13. – P. 44-56.
159. Introduction to hyperlipidemia and its management: a review / P. Phogat, A. Deep, P. Chander Sharma, S. K. Mittal et al. // *Pharmacologyonline*. – 2010. – Vol. 2. – P. 251-266.
160. Ivanescu, B. Sesquiterpene lactones from *Artemisia* genus: biological activities and methods of analysis / B. Ivanescu, A. Miron, A. Corciova // *Journal of analytical methods in chemistry*. – 2015. – doi: 10.1155/2015/247685.
161. Kaneko, M. Effect of farnesol on mevalonate pathway of *Staphylococcus aureus* / M. Kaneko, N. Togashi, H. J. Hamashima // *Antibiot. (Tokyo)*. – 2011. – Vol. 64, N 8. – P. 547-549.
162. Kanuri, G. In vitro and in vivo models of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) / G. Kanuri, I. Bergheim // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – Vol. 14. – P. 11963-11980.
163. Kim, J. S. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis / J. S. Kim, L. He, J. J. Lemasters // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – Vol. 304. – P. 463-470.
164. Kolter, T. Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids / T. Kolter, K. Sandhoff // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* – 2005. – Vol. 21. – P. 81-103.
165. Kontush, A. Antiatherogenic small, dense HDL-guardian angel of the arterial wall? / A. Kontush, M. J. Chapman // *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* – 2006. – Vol. 3. – P. 144-153.

166. Lack of hypotriglyceridemic effect of gemfibrozil as a consequence of age-related changes in rat liver PPAR α / E. Sanguino, M. Ramo'n, L. Michalik et al. // *Biochemical pharmacology*. – 2004. – Vol. 67. – P. 157-166.
167. Lactones 43. New biologically active lactones: β -cyclocitral derivatives / M. Mazur, W. Gładkowski, M. Podkowik et al. // *Pest. Manag. Sci.* – 2014. – Vol. 70, N 2. – P. 286-294.
168. Laxmi, M. V. Nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk / M. V. Laxmi, K. Mouen, C. Naga // *Curr. Gastroenterol. Rep.* – 2009. – Vol. 11. – P. 50-55.
169. Lee, S. M. Onion peel extract increases hepatic low-density lipoprotein receptor and ATP-binding cassette transporter A1 messenger RNA expressions in Sprague-Dawley rats fed a high-fat diet / S. M. Lee, J. Moon, H. J. Do, J. H. Chung, K. H. Lee, Y. J. Cha, M. J. Shin // *Nutr. Res.* – 2012. – Vol. 32, N 3. – P. 210-217.
170. Linden, D. Growth hormone and PPAR α in the regulation of lipoprotein metabolism : dis. ... Ph.D. / D. Linden. – Goteborg, 2002. – 62 p.
171. Lipofundin 20 % induces hyperlipidemia and oxidative stress in male Sprague Dawley rats / L. Delgado Roche, A. Fraga Perez, M. A. BequerViart, Y. Hernandez-Matos // *Vet. World.* – 2012. Vol. 5, N 3. – P. 133-137.
172. Lipofundin-induced hyperlipidemia promotes oxidative stress and atherosclerotic lesions in New Zealand white rabbits / L. Delgado Roche, E. Acosta Medina, A. Fraga Perez et al. // *Int. J. Vasc. Med.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 1-7.
173. LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor / N. Zelcer, C. Hong, R. Boyadjian et al. // *Science*. – 2009. – Vol. 325. – P. 100-104.
174. Mahesh, A. Hepatocurative potential of sesquiterpene lactones of *Taraxacum officinale* on carbone tetrachloride induced liver toxicity in mice / A. Mahesh, R. Jeyachandran, L. Cindrella // *Acta. Biol. Hung.* – 2010. – Vol. 61, N 2. – P. 175-190.
175. Maiese, K. Oxidative stress: Biomarkers and novel therapeutic pathways / K. Maiese, Z. Z. Chong, Y. C. Shang // *Exp. Gerontol.* – 2010. – Vol. 45. – P. 217-234.

176. Management of dislipidemias with fibrates, alone and in combination with statins: role of delayed-release fenofibric acid / E. Moutzouri, A. Kei, M. S. Elisaf, H. J. Milionis // *Vasc. Health Risk Manag.* – 2010. – Vol. 6. – P. 525-539.

177. Mangiferin decreases plasma free fatty acids through promoting its catabolism in liver by activation of AMPK / Y. Niu, S. Li, L. Na et al. // *PloS One.* – 2012. – Vol. 7, N 1. – P. E30782.

178. Marrapodi, M. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) and agonist inhibit cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription / M. Marrapodi, J. Y. Chiang // *J. Lipid. Res.* – 2000. – Vol. 41, N 4. – P. 514-520.

179. Maternal ethanol consumption during pregnancy enhances bile acid–induced oxidative stress and apoptosis in fetal rat liver / M. J. Perez, E. Velasco, M. Monte et al. // *Toxicology.* – 2006. – Vol. 225. – P. 183-194.

180. McBride, P. Triglycerides and risk for coronary artery disease / P. McBride // *Current Atherosclerosis Reports.* – 2008. – Vol. 10. – P. 386-390.

181. Mechanism for fatty acid “sparing” effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive elementbinding protein by AMP-activated protein kinase / T. Kawaguchi, K. Osatomi, H. Yamashita et al. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 3829-3835.

182. Mechanisms of liver injury. III. Role of glutathione redox status in liver injury / D. Han, N. Hanawa, B. Saberi, N. Kaplowitz // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* – 2006. – Vol. 241. – P. G1-7.

183. MicroRNAs and cholesterol metabolism / K. J. Moore, K. J. Rayner, Y. Saurez, C. Fernandez-Hernando // *Trends. Endocrinol. Metab.* – 2010. – Vol. 21. – P. 699-706.

184. Mihaylova, M. M. The AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway coordinates cell growth, autophagy, and metabolism / M. M. Mihaylova, R. J. Shaw // *Nat. Cell. Biol.* – 2012. – Vol. 13, N 9. – P. 1016-1023.

185. Mitochondrial dysfunction and tissue injury by alcohol, high fat, nonalcoholic substances and pathological conditions through post-translational protein

modifications / B. J. Song, M. Akbar, M. A. Abdelmegeed et al. // *Redox. Biol.* – 2014. – Vol. 3. – P. 109-123.

186. Mitochondrial reactive oxygen species signal hepatocyte steatosis by regulating the PI 3-kinase cell survival pathway / R. Kohli, X. Pan, P. Malladi et al. // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282. – P. 21327-21336.

187. Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase inhibitors for controlling hypercholesterolemia and atherosclerosis / A. Miyazaki, M. Sakai, Y. Sakamoto, S. Horiuchi // *Curr. Opin. Investig. Drugs.* – 2003. – Vol. 4, N 9. – P. 1095-1099.

188. Models to study atherosclerosis: a mechanistic insight / V. Singh, R. L. Tiwari, M. Dikshit, M. K. Barthwal // *Current Vascular Pharmacology.* – 2009. – Vol. 7. – P. 75-109.

189. Monochlorobimane fluorometric method to measure tissue glutathione / H. Kamencic, A. Lyon, Ph. G. Paterson et al. // *Analytical biochemistry.* – 2000. – Vol. 286. – P. 35-37.

190. Mullen, P. J. Molecular mechanisms of statin-induced myotoxicity : dis. ... Ph.D. / P. J. Mullen. – Basel, 2011. – 107 p.

191. Multi-omic profiles of human non-alcoholic fatty liver disease tissue highlight heterogenic phenotypes / W. Wruck, K. Kashofer, S. Rehman // *Sci. Data.* – 2015. – doi: 10.1038/sdata.2015.68.

192. Munday, M. R. The regulation of acetyl-CoA carboxylase – potential target for the action of hypolipidemic agents / M. R. Munday, Ch. J. Hemingway // *Advan. Enzyme Regul.* – 1999. – Vol. 39. – P. 205-234.

193. Naringenin 7-O-cetyl ether as inhibitor of HMG-CoA reductase and modulator of plasma and hepatic lipids in highcholesterol-fed rats / M. K. Lee, S. S. Moon et al. // *Bioorg. Med. Chem.* – 2003. – Vol. 11, N 3. – P. 393-398.

194. Nelson, R. H. Hyperlipidemia as a risk factor for cardiovascular disease / R. H. Nelson // *Prim. Care.* – 2013. – Vol. 40, N 1. – P. 3195–211.

195. Neural networks as valuable tools to differentiate between sesquiterpene lactones' inhibitory activity on serotonin release and on NF-kappaB / S. Wagner, R. Arce, R. Murillo et al. // *J. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 51, N 5. – P. 1324-1332.

196. New cytotoxic sesquiterpene lactones from *Anthemis scrobicularis* / A. M. Zaghloul, H. S. Yusufoglu, M. A. Salkini, A. Alam // *Journal of Asian Natural Products Research*. – 2014. – Vol. 16, N 9. – P. 922-929.
197. Nonalcoholic fatty liver disease / E. M. Brunt, V. W.-S. Wong, V. Nobili // *Nat. Rev. Disease Primers*. – 2015. – doi:10.1038/nrdp.2015.80.
198. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy / S. Winer, Y. Chan, G. Paltser et al. // *Nat. Med.* – 2009. – Vol. 15, N 8. – P. 921-929.
199. Nutritional lipid-induced oxidative stress leads to mitochondrial dysfunction followed by necrotic death in FaO hepatocytes / O. Tirosh, E. Ilan, S. Anavi et al. // *Nutrition*. – 2009. – Vol. 25. – P. 200-208.
200. On the role of liver X receptors in lipid accumulation in adipocytes / L. Juvet, S. Andresen, G. Schuster et al. // *Mol. Endocrinol.* – 2003. – Vol. 17, N 2. – P. 172-182.
201. Oxidative stress-mediated apoptosis. The anticancer effect of the sesquiterpene lactone parthenolide / J. Wen, K. R. You, S. Y. Lee et al. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 38954-38964.
202. Ozansoy, G. Effects of gemfibrozil treatment on vascular reactivity of streptozotocin-diabetic rat aorta / G. Ozansoy, F. B. Akin // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 56. – P. 241-246.
203. Palmitic acid induces production of proinflammatory cytokine interleukin-8 from hepatocytes / S. Joshi-Barve, S. S. Barve, K. Amancherla et al. // *Hepatology*. – 2007. – Vol. 46, N 3. – P. 823-830.
204. Pang, J. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: potential role of AMPK in the visceral adipose tissue / J. Pang, Y. Choi, T. Park // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2008. – Vol. 476. – P. 178-185.
205. Parthenolide and sulindac cooperate to mediate growth suppression and inhibit the nuclear factor-kappa B pathway in pancreatic carcinoma cells / M. T. Yip-Schneider, H. Nakshatri, C. J. Sweeney et al. // *Mol. Cancer. Ther.* – 2005. – Vol. 4. – P. 587-594.

206. Parthenolide inhibits I κ B kinase, NF- κ B activation, and inflammatory response in cystic fibrosis cells and mice / A. Saadane, S. Masters, J. DiDonato et al. // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 36. – P. 728-736.
207. Pawlak, M. Molecular mechanism of PPAR α action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease / M. Pawlak, Ph. Lefebvre, B. Staels // *Journal of hepatology.* – 2015. – Vol. 62. – P. 720-733.
208. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR / M. W. Pfaffl // *Nucleic. Acids. Res.* – 2001. – Vol. 29, N 9. – P. e45.
209. Pharmacological doses of niacin stimulate the expression of genes involved in carnitine uptake and biosynthesis and improve the carnitine status of obese Zucker rats / A. Couturier, R. Ringseis, E. Most, K. Eder // *BMC Pharmacol. Toxicol.* – 2014. – Vol. 15, N 37. – P. 1-9.
210. Phase II study of high-dose lovastatin in patients with advanced gastric adenocarcinoma / W. S. Kim, M. M. Kim, H. J. Choi et al. // *Invest. New Drugs.* – 2001. – Vol. 19, N 1. – P. 81-83.
211. Phenolic acids suppress adipocyte lipolysis via activation of the nicotinic acid receptor GRP109A (HM74a/PUMA-G) / N. Ren, R. Kaplan, M. Hernandez et al. // *J. Lipid Res.* – 2011. – Vol. 50, N 5. – P. 908-914.
212. Polylysine-coated tissue culture surfaces [Электронный ресурс] // *Protocols online.* – Режим доступа: <http://protocolsonline.com/recipes/stock-solutions/polylysine-coated-tissue-culture-surfaces/>.
213. Postprandial lipemia as a cardiometabolic risk factor / A. Pirillo, G. D. Norata, A. L. Catapano // *Curr. Med. Res. Opin.* – 2014. – Vol. 30, N 8. – P. 1489-1503.
214. Potential antiatherosclerotic drugs: novel N-substituted taurinamide derivatives / N. S. Sapronov, L. K. Khnychenko, I. V. Okunevich, L. K. Gavrovskaya // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2006. – Vol. 583. – P. 515-521.
215. PPAR α agonists based on stilbene and its bioisosteres: biological evaluation and docking studies / B. De Filippis, M. Agamennone, A. Ammazalorso et al. // *Med. Chem. Comm.* – 2015. – doi: 10.1039/c5md00151j.

216. Preventive effect of geniposide on metabolic disease status in spontaneously obese type 2 diabetic mice and free fatty acid-treated HepG2 cells / K. Kojima, T. Shimada, Y. Nagareda et al. // *Biol. Pharm. Bull.* – 2011. – Vol. 34, N 10. – P. 1613-1618.
217. Qin, W. Regulation of HMG-CoA reductase, apoprotein B and LDL receptor gene expression by the hypocholesterolemic drugs simvastatin and ciprofibrate in Hep G2, human and rat hepatocytes // W. Qin, J. Infante et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1992. – Vol. 1127, N 1. – P. 57-66.
218. Rahman, I. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method / I. Rahman, A. Kode, S. K. Biswas // *Nature protocols.* – 2006. – Vol. 1, N 6. – P. 3159-3165.
219. Ramsey, S. A. A systems biology approach to understanding atherosclerosis / S. A. Ramsey, E. S. Gold, A. Aderem // *EMBO Mol. Med.* – 2010. – Vol. 2. – P. 79–89.
220. Ray, K. NAFLD-the next global epidemic / K. Ray // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* – 2013. – Vol. 10, N 11. – 621 p.
221. Regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase mRNA expression in C57BL/6 mice fed an atherogenic diet / H. Ando, S. Tsuruoka, H. Yamamoto et al. // *Atherosclerosis.* – 2005. – Vol. 178, N 2. – P. 265-269.
222. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP / P. A. Edwards, D. Tabor, H. R. Kast, A. Venkateswaran // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* – 2000. – Vol. 1529. – P. 103-113.
223. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXR α and LXR α / J. Repa, G. Liang, J. Ou et al. // *Genes and development.* – 2000. – Vol. 14. – P. 2818-2830.
224. Robinson, E. Significance of peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system in health and disease / E. Robinson, D. J. Grieve // *Pharmacol.* – 2009. – Vol. 122. – P. 246-263.

225. Roglans, N. Fibrates modify the expression of key factors involved in bile-acid synthesis and biliary-lipid secretion in gallstone patients / N. Roglans, M. Vázquez-Carrera et al. // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 59, N 12. – P. 855-861.

226. Roglans, N. Increase in hepatic expression of SREBP 2 by gemfibrozil administration to rats / N. Roglans, C. Peris, J. C. Verd, M. Alegret et al. // *Biochem. Pharmacol.* – 2001. – Vol. 62, N 6. – P. 803-809.

227. Role of hypoxia in obesity-induced disorders of glucose and lipid metabolism in adipose tissue / J. Yin, Z. Gao, Q. He et al. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2009. – Vol. 296. – P. E333-E342.

228. Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization / H. Matsuo et al. // *Science.* – 2004. – Vol. 303. – P. 531-534.

229. Role of nuclear receptors for bile acid metabolism, bile secretion, cholestasis, and gallstone disease / Th. Claudel, G. Zollner, M. Wagner, M. Trauner // *Biochimica et biophysica acta.* – 2011. – Vol. 1812. – P. 867-878.

230. Sato, R. Sterol metabolism and SREBP activation / R. Sato // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2010. – Vol. 501. – P. 177-181.

231. Scaffidi, P. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation / P. Scaffidi, T. Misteli, M. E. Bianchi // *Nature.* – 2002. – Vol. 418. – P. 191-195.

232. Suspendole, a new inhibitor of lipid droplet synthesis in macrophages, produced by *Pseudobotrytis terrestris* FKA-25 / R. Uchida, Y. P. Kim, I. Namatame et al. // *J. Antibiot. (Tokyo).* – 2006. – Vol. 59, N 2. – P. 93-97.

233. Sesquiterpene farnesol as a competitive inhibitor of lipase activity of *Staphylococcus aureus* / M. Kuroda, S. Nagasaki, R. Ito et al. // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2007. – Vol. 273, N 1. – P. 28-34.

234. Sesquiterpenes and Flavonoid Aglycones from a Hungarian Taxon of the *Achillea millefolium* Group / S. Glasl, P. Mucaji, I. Werner, A. Presser, J. Jurenitsch // *Z. Naturforsch.* – 2002. – Vol. 57. – P. 976-982.

235. Sesquiterpenes: natural products that decrease cancer growth / A. Modzelewska, S. Sur, S. K. Kumar, S. R. Khan // *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*. – 2005. – Vol. 5, N 5. – P. 477-499.
236. Sex differences in the hepatic cholesterol sensing mechanisms in mice / G. Lorbek, M. Perse, S. Horvat et al. // *Molecules*. – 2013. – Vol. 18. – P. 11067-11085.
237. Shimano, H. Sterol regulatory element-binding protein family as global regulators of lipid synthetic genes in energy metabolism / H. Shimano // *Vitam. Horm.* – 2002. – Vol. 65. – P. 167-194.
238. Sing, C. F. Genetic of atherosclerosis / C. F. Sing, P. P. Moll // *Annu. Rev. Genet.* – 1990. – Vol. 24. – P. 171-187.
239. Staels, B. Therapeutic roles of peroxisome proliferator –activated receptor agonists / B. Staels, J. C. Fruchart // *Diabetes*. – 2005. – Vol. 54. – P. 2460-2270.
240. Sterol dependent regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 expression by sterol-regulatory element binding protein-2 / H. J. Jeong, H. S. Lee, K. S. Kim et al. // *J. Lipid Res.* – 2008. – Vol. 49. – P. 399-409.
241. Tam, S.-P. Effects of gemfibrozil and ketoconazole on human apolipoprotein AI, B and E levels in two hepatoma cell lines, HepG2 and Hep3B / S.-P. Tam // *Atherosclerosis*. – 1991. – Vol. 91. – P. 51-61.
242. Telomerase activity and hepatic functions of rat embryonic liver progenitor cell in nanoscaffold-coated model bioreactor / Sh. Giri, K. Nieber, A. Acikgoz, S. Pavlica et al. // *Mol. Cell. Biochem.* – 2010. – Vol. 336. – P. 137-149.
243. Tenenbaum, A. Fibrates are an essential part of modern anti-dyslipidemic arsenal: spotlight on atherogenic dyslipidemia and residual risk reduction / A. Tenenbaum, E. Z. Fisman // *Cardiovasc. Diabetol.* – 2012. – Vol. 11, N 125. – P. 1-10.
244. The mechanism of dietary cholesterol effects on lipids metabolism in rats / Y. M. Wang, B. Zhang, Y. Xue et al. // *Lipids Health. Dis.* – 2010. – Vol. 9, N 4. – P. 1-6.

245. The renaissance of α -methylene- γ -butyrolactones: new synthetic approaches / R. R. A. Kitson, A. Millemaggi, R. J. K. Taylor // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2009. – Vol. 48. – P. 9426-9451.

246. The role of an intravenous fat emulsion composed of fish oil in a parenteral nutrition-dependent patient with hypertriglyceridemia / K. Gura, R. Strijbosch, S. Arnold et al. // *Nutr. Clin. Pract.* – 2007. – Vol. 22. – P. 664-672.

247. The Scap/SREBP pathway is essential for developing diabetic fatty liver and carbohydrate-induced hypertriglyceridemia in animals / Y. A. Moon, G. Liang, X. Xie et al. // *Cell Metab.* – 2012. – Vol. 15. – P. 240-246.

248. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a review / A. U. Krettli, V. F. Andrade-Neto, M. G. Brandao, W. M. Ferrari // *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* – 2001. – Vol. 96, N 8. – P. 1033-1042.

249. Third report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult treatment panel III) final report / NIH publication. – 2002. – Vol. 106, N 25. – P. 3143-3421.

250. Thompson, G. R. Management dislipidaemia / G. R. Thompson // *Annu. Rev. Genet.* – 2004. – Vol. 24. – P. 171-187.

251. TLC and HPLC characteristics of desacetylmatricarin, leucodin, achillin and their 8α -angeloxy-derivatives / S. Glasl, P. Mucaji, I. Werner, J. Jurenitsch // *Pharmazie.* – 2003. – Vol. 58, N 7. – P. 487-490.

252. Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the american heart association / M. Miller, N. J. Stone, C. Ballantyne et al. // *Circulation.* – 2011. – Vol. 123. – P. 2292-2333.

253. Tumor metabolism of malignant gliomas / P. Ru, T. M. Williams, A. Chakravarti, D. Guo // *Cancers.* – 2013. – Vol. 5. – P. 1469-1484.

254. Inhibitory action of gemfibrozil on cholesterol absorption in rat intestine / Y. Umeda, Yu. Kako, K. Mizutani et al. // *The J. of Lipid Res.* – 2001. – Vol. 42. – P. 1214-1219.

255. Upregulation of low density lipoprotein receptor by gemfibrozil, a hypolipidemic agent, in human hepatoma cells through stabilization of mRNA transcripts / D. Goto, T. Okimoto, M. Ono, H. Shimotsu et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 1997. – Vol. 17, N 11. – P. 2707-2712.

256. Vaziri, N. D. Molecular mechanisms of lipid disorders in nephrotic syndrome / N. D. Vaziri // *Kidney International.* – 2003. – Vol. 63. – P. 1964-1976.

257. Wang, H. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplatereader / H. Wang, J. A. Joseph // *Free Radic. Biol. Med.* – 1999. – Vol. 27. – P. 612-616.

258. Wang, X. SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis / X. Wang, R. Sato, M. S. Brown et al. // *Cell.* – 1994. – Vol. 77, N 1. – P. 53-62.

259. Xiao, X. SREBP: a novel therapeutic target / X. Xiao, B.-L. Song // *Acta. Biochim. Biophys. Sin.* – 2013. – Vol. 45, N 1. – P. 2-10.

260. Yang, T. Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER / T. Yang, P. J. Espenshade, M. E. Wright et al. // *Cell.* – 2002. – Vol. 110, N 4. – P. 489-500.

261. Ye, J. Regulation of cholesterol and fatty acid synthesis / J. Ye, R. A. DeBose-Boyd // *Cold Spring Harb. Perspect.* – 2011. – Vol. 3. – Pii. A004754.

262. Zanzwar, A. A. Antihyperlipidemic effect of Flax Lignan concentrate in triton induced hyperlipidemic rats / A. A. Zanzwar, M. V. Hegde, S. L. Bodhankar // *Int. J. of Pharm.* – 2012. – Vol. 8. – P. 355-363.