

На правах рукописи

ЛИЗУНОВ

Алексей Владимирович

Изучение влияния крамизола на регуляцию экспрессии генов SR-B1, ApoA1, ApoC2 и PDIA2 в модели алиментарной гиперлипидемии у крыс

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Институт экспериментальной медицины».

Научные руководители:

Бычков Евгений Рудольфович – кандидат медицинских наук;

Денисенко Александр Дорوفеевич – доктор медицинских наук, профессор.

Официальные оппоненты:

Гайковая Лариса Борисовна – доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И.Мечникова" Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра биологической и общей химии им. В.В. Соколовского, заведующая;

Шаройко Владимир Владимирович – доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Научно-образовательный институт биомедицины, лаборатория биомедицинского материаловедения, ведущий научный сотрудник; кафедра общей и биоорганической химии, профессор.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится « » 2023 года в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.158.02 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (197376, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12) по адресу: 197022, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр., д. 71.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12 и на сайте <https://iemspsb.ru/external/lizunov-av/>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2023 года

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

Хныченко Людмила Константиновна

Актуальность исследования.

В связи с высокой медико-социальной значимостью, проблема профилактики и терапии атеросклероза вызывает пристальное внимание медиков, биологов и клиницистов во всем мире. По современным представлениям ведущей причиной развития атеросклероза является метаболическое нарушение – дислипидемия атерогенного характера. Это длительное повышение в крови липопротеинов (ЛП) и липидов: триглицеридов (ТГ), общего холестерина (ХС), атерогенных липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), а также снижение концентрации антиатерогенных липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) (Thompson G.R. et al., 2004; Su X. et al., 2020; Кухарчук В.В. и др., 2020). Наиболее эффективным фармакологическим подходом к решению проблемы профилактики и лечения атеросклероза является использование лекарственных средств, способных снижать уровень холестерина и общих липидов и нормализовать спектр липидов крови. К наиболее широко применяемым группам фармакологических средств, используемых в терапии дислипидемий и атеросклероза, относятся статины и фибраты (Nicholls S.J. et al., 2015; Viney, N.J. et al., 2016; Сергиенко И.В. и др., 2021). При этом до сих пор остаётся актуальным вопрос поиска новых молекулярно-биологических мишеней для фармакологического воздействия при атеросклерозе и создания новых биологически активных соединений гиполлипидемического профиля.

Степень разработанности темы исследования

Широким спектром фармакологической активности обладают вещества группы азолов: антибактериальным, противогрибковым, аналептическим, противоаллергическим, противовоспалительным и ранозаживляющим действием (Савченко Н.В. и др., 2016; Gsaller F. et al., 2016; Хныченко Л.К. и др., 2020; Ушаков Р.В. и др., 2021). Химические соединения на основе азолов и их производных нормализуют липидный спектр крови. В исследованиях на модели экспериментального холестерина атеросклероза у кроликов показано, что некоторые производные азолов способны снижать число липидных полосок и пятен в аорте у подопытных животных (Даутова Г.С. и др., 1998). В экспериментах *in vivo* также показано, что одно из производных азолов – бензолсульфонат 1-метил-3-этил, 4,5 (бис-N-метилкарбамоил) имидазолия (крамизол) проявляет гиполлипидемические свойства, действуя на процессы энергетического обмена в клетке (Ковалева В.Н. и др., 1983; Окуневич и др., 2016). Гиполлипидемическая активность крамизола продемонстрирована в исследованиях на острой и хронической моделях дислипидемии на крысах (Окуневич и др., 2016). Дальнейшее изучение молекулярных механизмов действия крамизола, таких, как его влияние на экспрессию генов, участвующих в липидном обмене, является важным направлением исследований в области поиска новых антиатерогенных препаратов.

В связи с этим в настоящей работе было проведено исследование влияния крамизола на экспрессию следующих генов, связанных с липидным обменом:

APOA1 (*apoA1* у крыс) – ген белка-переносчика липидов, являющегося основным аполипопротеином, формирующим липопротеины высокой плотности.

APOC2 (*ApoC2* у крыс) – ген белка-переносчика липидов липопротеинов низкой плотности, регулятор липопротеинлипазы.

PDIA2 (*Pdia2* у крыс) - ген протеин-дисульфид-изомеразы, транспортирующего АпоВ с присоединенными к нему липидами на наружную мембрану клетки.

SR-B1 (*Scarb1* у крыс) – ген скевэнджер рецептора В1, осуществляющего транспорт холестерина из липопротеинов высокой плотности в гепатоциты, связывающий окисленные липопротеиды.

LOX1 (*Lox1* у крыс) – ген скевэнджер рецептора окисленных липопротеидов низкой плотности.

CD36 (*Cd36* у крыс) – ген скевэнджер рецептора для липопротеинов низкой и высокой плотности.

Цель исследования

Целью исследования являлось изучение эффектов крамизола на экспрессию генов, связанных с липидным обменом, и их функциональную активность.

Задачи исследования

1. Изучить влияние крамизола на липидный профиль сыворотки крови у крыс в острой и хронической моделях дислипидемии.
2. Исследовать влияние крамизола на экспрессию генов липидного обмена (*apoA1*, *ApoC2*), сквэнджер-рецептора *Scarb1*, и фолдазы *Pdia2* в печени крыс при острой и хронической дислипидемии.
3. Изучить влияние крамизола на экспрессию генов сквэнджер-рецепторов ЛПНП (*Scarb1*, *Lox1*, *Cd36*) в культуре клеток перитонеальных макрофагов крысы.
4. Исследовать влияние крамизола на захват окисленных ЛПНП, содержание мРНК и белка сквэнджер-рецепторов (SR-B1, LOX1, CD36) и АПОА1 в культуре макрофагов человека THP-1, обработанных окисленными ЛПНП.

Научная новизна

Установлена связь между антиатерогенным эффектом крамизола и его влиянием на экспрессию генов липидного обмена.

Впервые показано, что крамизол усиливает экспрессию генов, участвующих в липидном обмене: *apoA1*, *ApoC2* и *Pdia2*.

Впервые установлено, что крамизол активирует экспрессию генов, участвующих в липидном обмене (*SR-B1*, *LOX1*, *CD36*) в культуральной модели макрофагов человека с использованием захвата окисленных ЛПНП (оксЛПНП).

Впервые показано, что крамизол увеличивает уровень поверхностных рецепторов SR-B1, LOX1, CD36 и захват оксЛПНП макрофагами человека.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Получены оригинальные данные о молекулярных механизмах антиатерогенного действия крамизола, связанных с экспрессией генов, участвующих в липидном обмене и повышающих захват окисленных ЛПНП макрофагами. Это подтверждено выявленной корреляцией между антиатерогенными эффектами крамизола в моделях дислипидемии у крыс и увеличением экспрессии генов, относящихся к антиатерогенным факторам (*apoA1*, *ApoC2*, *Pdia2*).

Кроме прямого антигиперлипидемического действия крамизола, связанного с активацией экспрессии генов липидного обмена, у него выявлен новый молекулярный механизм, вовлекающий повышение захвата окисленных ЛПНП макрофагами и усиление экспрессии факторов, связанных с атерогенезом, и их генов (*SR-B1*, *LOX1*, *CD36*).

Полученные данные будут способствовать пониманию механизма действия антиатерогенных препаратов и могут быть использованы для их лабораторного скрининга. Результаты исследования позволяют рекомендовать крамизол в качестве кандидатного гиполлипидемического препарата для клинических исследований.

Методология и методы исследования

Работа выполнена с применением современных фармакологических, биохимических и молекулярно-биологических методов, включающих моделирование острой дислипидемии с помощью введения детергента тритона, хронической дислипидемии, достигаемой с помощью гиперхолестериновой диеты, экстракции тотальной РНК, сепарации сыворотки крови, количественной спектрофотометрии белков, количественной спектрофотометрии РНК, обратной транскрипции РНК, ПЦР в реальном времени с продуктами проведенной обратной транскрипции, фармакологического анализа влияния крамизола при моделировании гиперлипидемии.

Положения, выносимые на защиту

1. Крамизол в условиях острой и хронической дислипидемии модулирует экспрессию генов липидного обмена (*apoA1*, *ApoC2*, *Scarb1* и *Pdia2*).
2. В клеточной модели макрофагов человека THP-1 крамизол стимулирует захват окисленных ЛПНП макрофагами, повышая экспрессию генов *SR-B1*, *LOX1*, *CD36* и белков SR-B1, LOX1, и CD36 на поверхности клеток.
3. Крамизол нормализует липидный профиль крови в условиях острой и хронической дислипидемии, снижая уровень общего холестерина и триглицеридов сравнимо с эталонным антиатеросклеротическим препаратом – фенофибратом.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов определяется адекватным выбором используемых статистических методов, подходящим для данных методов размером выборок, рандомизацией при работе с животными (использование животных из каждого помета в контрольных и опытных группах, параллельное введение изучаемого вещества и препарата сравнения животным из разных групп и т.д.), использованием общепринятых методик для оценки относительного содержания мРНК (спектрофотометрия РНК) и методов статистической обработки результатов ОТ-ПЦР в реальном времени (метод $2^{Ct(\text{интактные})-Ct(\text{образец})}$, выравнивание опытных образцов по среднему геометрическому двух референсных генов).

Апробация работы

Материалы, вошедшие в диссертацию, доложены на следующих конференциях: «Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и патологии» (Санкт-Петербург, 2019), «Stress and Behavior» (Санкт-Петербург, 2019), «Инновации в здоровье нации» (Санкт-Петербург, 2019), «Фармакология гормональных систем» (Санкт-Петербург, 2020), «Stress and behavior» (Санкт-Петербург, 2020, 2021).

Публикации

Результаты диссертационного исследования опубликованы в 3 статьях в рецензируемых изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации для публикации результатов диссертационных исследований и в 7 тезисах в сборниках трудов научных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 117 страницах машинописного текста, состоит из введения, трех глав, разделенных на пять, четыре и четыре подглавы соответственно, заключения, выводов и списка литературы, включающего 170 источников, из которых 34 отечественных авторов и 136 – зарубежных. Диссертация иллюстрирована 24 таблицами и 14 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные и материалы. Эксперименты проведены на крысах-самцах, культуре изолированных перитонеальных макрофагов крысы и культуре клеток макрофагов человека (THP-1). Эксперименты *in vivo* выполнены в осенне-зимний период на 180 крысах самцах линии Wistar (масса 250-320г), полученных из питомника лабораторных животных “Рапполово” (Ленинградская область). Рацион питания животных включал специализированный для лабораторных крыс и мышей гранулированный корм.

Модели дислипидемии. Для оценки гиподислипидемического действия исследуемых веществ была использована модель острой гиперлипидемии, воспроизводимая у экспериментальных животных при введении неионного детергента тритона WR-1339 (Окуневич И.В. и др., 2016). При хронической модели дислипидемии животные получали диету с высоким содержанием холестерина и окисленных жиров в течение 4 недель. Состав диеты (в расчете на 1 кг корма): брикеты гранулированного корма (ГОСТ Р 50258-92) – 750 г, жир

свиной – 450 г, подсолнечное масло – 100 г, сухое молоко – 500 г, холестерин пищевой – 87 г, вода – 100 г (Хныченко Л.К. и др., 2016; Окуневич И.В. и др., 2019; Ключева Н.Н. и др., 2020). И в острой, и в хронической моделях гиперлипидемии крамизол подкожно животным вводили перорально в 1% растворе крахмала в дозировке 100мг/кг веса животного (при ЛД50=20000 мг) (Окуневич И.В. и др., 2016).

Определение уровня общего ХС, триглицеридов и ЛПВП сыворотке. Уровень общего ХС, ТГ и ХС ЛПВП в сыворотке крови определяли с помощью ферментативных наборов фирмы «Vital Diagnostics», Россия в соответствии с инструкцией производителя с помощью спектрофотометра SYNERGY 2 (BioТес).

Выделение РНК и ОТ-ПЦР. Из ткани печени крысы, клеток ТНР-1 или перитонеальных макрофагов крысы выделяли тотальную РНК по стандартному протоколу с помощью коммерческого реагента «Тризол». Концентрацию измеряли спектрофотометрически. Чистоту выделяемой РНК контролировали по отношению оптических плотностей при 260 и 280 нм ($D_{260}/D_{280} > 1,8$). Реакцию обратной транскрипции проводили по стандартному протоколу (прилагается к набору для проведения обратной транскрипции).

Полученные в результате обратной транскрипции образцы кДНК использовали для проведения реакций ПЦР в реальном времени. Реакцию проводили в объеме 20мкл, с использованием 10 кратного буфера для ДНК-полимеразы с добавленным флуоресцентным красителем SYBR-Green по стандартному протоколу (стандартный протокол прилагается к набору для проведения ПЦР производства биохим, Россия). В качестве референсных генов для ПЦР с кДНК, полученной из печени крысы и перитонеальных макрофагов крысы, были использованы гены домашнего хозяйства глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*Gapdh*) и бета-актина (*beta-actin*) (Vandesompele J. et al., 2002). В качестве референсных генов для ПЦР с кДНК, полученной из клеток культуры ТНР-1, были использованы гены домашнего хозяйства глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH*) и циклофилина А (*Cyclophilin A*) (Vandesompele J. et al., 2002). С помощью ПЦР в реальном времени анализировалась динамика экспрессии генов аполипопротеина А1 крысы (*apoA1*), рецептора липопротеинов SR-B1 крысы (*Scarb1*), аполипопротеина С2 крысы (*ApoC2*), транспортера PDIA2 (*Pdia2*), гена аполипопротеина А1 человека (*ApoA1*), гена рецептора липопротеинов SR-B1 человека (*SR-B1*), гена сквенджер рецептора человека *LOX1*, гена сквенджер рецептора CD36 (*CD36*).

Эксперименты на культуре клеток ТНР-1. Для оценки действия препарата на экспрессию генов интереса у человека на культуре ТНР-1 была проведена процедура культивирования клеток ТНР-1 с последовательным добавлением оксЛПНП и препарата крамизола в различных концентрациях (Tontonoz P. et al, 1998, Goldstein J.L. et al, 1979, Smith J.D. et al, 1995). Данный эксперимент моделировал атерогенные процессы, такие, как изменение интенсивности захвата окисленных ЛПНП (оксЛПНП), на материале клеток иммунной системы человека (YuJiao S. et al, 2020). Определение уровня белковых продуктов исследуемых генов определяли методом проточной цитометрии.

Выделение макрофагов из перитонеальной области крысы. Для получения культуры перитонеальных макрофагов крысы (линия Wistar, самцы) животных оперировали по следующей схеме: животное усыпляли эфиром, после чего располагали на операционном планшете, на холоде. В перитонеальную полость при помощи медицинского шприца объемом 50 мл вводили 30 мл раствора Хенкса. После этого производили массаж живота животного (1 минуту) и с помощью медицинского шприца введенную жидкость отбирали в стерильную пробирку. После этого полученную жидкость центрифугировали 7 мин при 1200g. Полученные клетки высевали на 24-луночный планшет для культивирования (Smith J.D. et al, 1995).

Инкубация клеток с препаратом крамизола. Клетки ТНР-1 и перитонеальных макрофагов крысы культивировали на 24 луночных планшетах для культивирования с концентрацией 2×10^5 клеток/мл в среде RPMI-1640 с глутамином, полимиксином и антибиотиками. Инкубацию проводили в CO₂-инкубаторе при температуре 35°C.

В опыте с клеточной культурой ТНР-1 было выделено 6 экспериментальных групп: негативный контроль (в культуру клеток ничего добавляли бычий сывороточный альбумин -

БСА), позитивный контроль (добавляли окисленные ЛПНП), «опыт 10» (добавляли оксЛПНП и 10 нмоль крамизола), «опыт 100» (добавляли оксЛПНП и 100 нмоль крамизола), «опыт 1000» (добавляли оксЛПНП и 1 мкмоль крамизола) и «опыт 10000» (добавляли оксЛПНП и 10 мкмоль крамизола). На четвертый день культивирования в клеточную культуру ТНР-1 добавляли раствор крамизола в соответствующих концентрациях и оксЛПНП в концентрации 100мкг/мл. На пятый день клетки снимали с планшета и помещали в пробирки емкостью 1,5 мл (каждая точка – в отдельную пробирку) в 200мкл PBS.

В опыте с культурой перитонеальных макрофагах крысы было выделено 2 экспериментальные группы: негативный контроль (в культуру клеток ничего не добавляли) и «опыт 100» (добавляли 100мкмоль крамизола). На вторые сутки после посева в часть клеток культуры перитонеальных макрофагов крысы добавляли раствор крамизола в концентрации 100 нмоль. На третьи сутки культивирования клетки снимали с планшета. Полученные клетки обрабатывали для выделения РНК и ОТ-ПЦР (по 2 лунки от каждой группы), а также для проточной цитометрии (по 4 лунки от каждой группы).

После инкубации с препаратами клетки снимали с планшета раствором аккютазы (0,25 %) и натрий-фосфатного буфера (PBS) (0,02%).

Проточная цитометрия белков, участвующих в липидном обмене. После инкубации с препаратом крамизола снятые с планшетов клетки инкубировали с антителами к белковым продуктам генов интереса. Суспензию клеток центрифугировали при 15000rpm в течение 5 минут. После надосадочную жидкость удаляли, клетки оставляли в 50мкл жидкости. После этого к суспензии клеток добавляли первичные антитела (для каждой пробы антитело к одному из изучаемых белков: АПОА1, Bio-Rad № 0650-0050; CD36, Abcam clone ab133625; LOX1, R&D clone331212; SR-B1, Abcam clone ab272003) и вторичные антитела, меченых флуоресцентной меткой (Alexa 647) по стандартному протоколу. Затем проводили проточную цитометрию (Хайдуков С.В. и др., 2012). Длины волн каналов при цитометрии составляли 647 нм и 488нм.

Статистический анализ. Уровень общего ХС, триглицеридов и ЛПВП рассчитывался по формуле с коэффициентами, рассчитанными по построенной для стандарт-титров калибровочной кривой. Для оценки атерогенности крови и степени развития ДЛП рассчитывали холестеринный коэффициент атерогенности (КА): ((общий ХС — ХС ЛПВП)/ХС ЛПВП).

Уровень мРНК генов интереса для ПЦР с кДНК, полученной из печени крыс и перитонеальных макрофагов крысы, рассчитывался как $2^{Ct(\text{интактные})-Ct(\text{образец})}$. Для статистической обработки выравнивание производилось по среднему геометрическому двух референсных генов (*Actb* и *Gapdh*) (Vandesompele J. et. al., 2002). Уровень мРНК генов интереса для кДНК, полученной из клеток культуры ТНР-1, рассчитывался как $2^{Ct(\text{интактные})-Ct(\text{образец})}$. Для статистической обработки выравнивание производилось по среднему геометрическому двух референсных генов (*Cyclophilin A* и *GAPDH*) (Vandesompele J. et. al., 2002).

Полученные данные подвергали компьютерной обработке с использованием стандартного пакета программ GraphPadPRISM 6.0, сравнивая данные с помощью метода дисперсионного анализа при уровне статистической значимости различий $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Влияние крамизола на липидный профиль крысы в острой модели дислипидемии.

В ходе исследования было показано, что внутрибрюшинное введение тритона WR-1339 крысам вызывало достоверное повышение уровней общего ХС, ТГ и наблюдалось увеличение расчётного показателя - холестеринного КА, отражающего степень развития ДЛП (таблица 1). Гиперлипидемия обусловлена способностью детергента тритона ингибировать активность фермента ЛПЛ, и таким образом препятствовать утилизации ЛП, богатых ТГ и ХС. Наряду с повышением общего ХС через 24 часа после введения тритона WR-1339 отмечалась тенденция к увеличению уровня ХС антиатерогенных ЛПВП. Введение фенофибрата и крамизола в течение 7-ми дней приводило к снижению повышенного уровня общего ХС, ТГ и расчётного холестеринного КА. Введение фенофибрата приводило к снижению общего ХС в 0,5 раз и снижению триглицеридов в 2,5 раза по сравнению с группой, которой вводили тритон WR-

1339. Введение крамизола также вызывало снижение уровня общего холестерина в 0,5 раз и снижение триглицеридов в 2 раза по сравнению с группой, которой вводили тритон WR-1339. Следует отметить, что эталонный и тестируемый препараты – фенофибрат и крамизол имели сходный профиль гиполипидемического действия (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние крамизола на уровень липидов сыворотки крови крыс и расчётный коэффициент атерогенности в условиях экспериментальной ДЛП, вызванной тритоном WR-1339

Группы животных Показатели	Группа 1 Контроль (интактные крысы) (n=8)	Группа 2 Тритон WR-1339 (n=8)	Группа 3 Фенофибрат + тритон WR-1339 (n=9)	Группа 4 Крамизол + тритон WR-1339 (n=8)
Общий ХС ммоль/л	1,08±0,09	2,81±0,42**	1,72±0,28#	1,64±0,13#
ТГ ммоль/л	0,63±0,06	4,92±0,51**	1,86±0,34* ##	1,91±0,41*##
ХС ЛПВП ммоль/л	0,72±0,08	0,86±0,09	0,67±0,06	0,69±0,05
КА отн.ед.	0,36±0,08	2,26±0,24*	1,56±0,6	1,37±0,3#

Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$ различия достоверны в сравнении с группой интактных животных; # – $p < 0,01$, ## – $p < 0,001$ различия достоверны в сравнении с группой крыс, получавших тритон WR-1339, КА – холестеринный коэффициент атерогенности. Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего арифметического. n – число животных в группе.

Влияние крамизола на активность генов крысы в острой модели дислипидемии. В наших опытах при молекулярно-генетическом исследовании у крыс на модели острой тритоновой ДЛП отмечалось резкое снижение экспрессии гена *apoA1* в печени на 70% по сравнению с интактной группой животных. Введение фенофибрата практически не повлияло на сниженный уровень экспрессии гена *ApoA1* после введения детергента. В тоже время введение крамизола нормализовало сниженный уровень экспрессии гена *ApoA1* в печени при экспериментально индуцированной ДЛП – по сравнению с контрольной группой детергента тритон WR-1339 экспрессия *ApoA1* возросла на 80%.

В опытах при молекулярно-генетическом исследовании у крыс на модели острой тритоновой ДЛП отмечалось резкое снижение экспрессии генов *Apoc2* и *Scarb1* в печени в 100 раз по сравнению с интактной группой. Фактически, экспрессия генов *Apoc2* и *Scarb1* в печени после введения детергента снизилась до нулевого уровня. Курсовое введение фенофибрата практически не повлияло на сниженный уровень экспрессии генов *Apoc2* и *Scarb1* после введения детергента. Введение крамизола также не повлияло на сниженный уровень экспрессии генов *Apoc2* и *Scarb1* в печени при экспериментально индуцированной ДЛП. *Scarb1* при введении фенофибрата и крамизола повышался в 22 и 15,3 раза соответственно по сравнению с группой детергента тритон WR-1339. При этом различия были статистически недостоверны. Экспрессия *Apoc2* и *Pdia2* после введения детергента тритон WR-1339 падала до нуля, введение и фенофибрата и крамизола не повышало экспрессии *Apoc2* и *Pdia2*, оставляя ее на нулевом уровне. Данные по экспрессии генов интереса представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Влияние крамизола на экспрессию генов липидного обмена в печени крыс при экспериментальной острой гиперлипидемии, вызванной тритоном WR-1339

Группы животных Показатели	Группа 1 Контроль (интактные крысы) (n=8)	Группа 2 Тритон WR-1339 (n=8)	Группа 3 Фенофибрат + тритон WR-1339 (n=9)	Группа 4 Крамизол + тритон WR-1339 (n=8)
<i>apoA1</i> , мРНК	1,000±0,216	0,213±0,026*	0,149±0,020#	1,113±0,246#@
<i>Scarb1</i> , мРНК	1,000±0,632	0,014±0,010	0,309±0,167	0,215±0,142
<i>ApoC2</i> , мРНК	1,000±0,480	–	–	–
<i>Pdia2</i> , мРНК	1,000±0,506	–	–	–

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к группе интактных животных; # – $p < 0,05$ по отношению к группе крыс, получавших тритон WR-1339; @ – $p < 0,05$ по отношению к группе крыс, получавших тритон WR-1339 и фенофибрат. Данные выражены в условных единицах и нормированы к уровню экспрессии генов бета-актина (*Actb*) и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*Gapdh*) и рассчитаны в относительных единицах по отношению к средней величине экспрессии изучаемого гена в группе контроля. Данные представлены как арифметическое \pm стандартная ошибка среднего арифметического. n – число животных в группе.

Влияние крамизола на липидный профиль крысы в хронической модели дислипидемии. В данном исследовании было показано, что кормление крыс пищей, перенасыщенной ХС, вызывало повышение уровней общего ХС на 56%, ТГ на 104% и величину холестерина КА, отражающего степень развития ДЛП, на 358%, а также снижение уровня ЛПВП на 65% (таблица 3). Гиперлипидемия зависит от обилия липидов, ХС и жиров в диете, которую получали подопытные животные в течение месяца. Следует подчеркнуть, что наряду с повышением общего ХС при кормлении ГХС диетой отмечалось снижение уровня ХС атерогенных ЛПВП. Таким образом, кормление пищей, перенасыщенной липидами и ХС, не только повышает уровень атерогенных форм ХС и липидов в крови, но и отрицательно влияет на общий обмен липидов, снижая факторы, препятствующие атерогенезу. Курсовое введение препарата сравнения фенофибрата и тестируемого средства крамизола в течение 30-и дней при кормлении ГХС диетой - пищей, насыщенной ХС, приводило к снижению повышенного уровня общего ХС. Введение препарата сравнения фенофибрата снижало уровень общего ХС на 35%. В то же время введение тестируемого вещества крамизола снижало уровень общего ХС на 45% (таблица 3). Важно подчеркнуть, что введение крамизола при кормлении ГХС диетой приводило к снижению повышенного в условиях моделирования уровня ТГ на 70% (таблица 3). При этом введение препарата сравнения фенофибрата при кормлении ГХС диетой не привело к достоверным изменениям уровня ТГ. Введение препарата сравнения фенофибрата и изучаемого средства при кормлении ГХС диетой также привело к повышению уровня ХС ЛПВП. Введение препарата сравнения фенофибрата повышало уровень ХСЛПВП на 200%. Введение тестируемого вещества крамизола повышало уровень ХСЛПВП на 333% (таблица 3).

Таблица 3 – Влияние крамизола на уровень липидов сыворотки крови крыс и расчётный коэффициент атерогенности в условиях экспериментальной ДЛП, вызванной холестериновой диетой

Группы животных Показатели	Группа 1 Контроль интактные крысы (n=9)	Группа 2 Гипер холестериновая диета (n=6)	Группа 3 Фенофибрат + Гипер холестериновая диета (n=8)	Группа 4 Крамизол + Гипер холестериновая диета (n=9)
Общий ХС ммоль/л	1,63±0,23	2,55±0,21*	1,68±0,12##	1,43±0,15##
ТГ ммоль/л	0,69±0,13	1,41±0,14**	1,87±0,25	0,45±0,19##
ХС ЛПВП ммоль/л	0,43±0,08	0,15±0,01**	0,45±0,07##	0,65±0,11##
КА отн.ед.	3,63±1,18	16,61±1,79**	2,38±0,90##	1,88±0,48##

Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ различия достоверны в сравнении с группой интактных животных; ## – $p < 0,01$ различия достоверны в сравнении с группой крыс, получавших гиперхолестериновую диету, КА – холестеринный коэффициент атерогенности. n – число особей в группе. Данные представлены как среднее арифметическое \pm стандартная ошибка среднего арифметического.

Влияние крамизола на активность генов крысы в хронической модели дислипидемии. В опытах при молекулярно-генетическом исследовании у крыс на модели хронической холестериновой ДЛП, проводимых в рамках данной работы, не отмечалось значимого изменения экспрессии гена *apoA1* в печени по сравнению с интактной группой животных, значение которой было принято за 1. Курсовое введение фенофибрата не изменило уровень экспрессии гена *apoA1* по сравнению с группой ГХС диеты. В тоже время курсовое введение крамизола повышало нормальный уровень экспрессии гена *apoA1* в печени на 328% по сравнению с группой ГХС диеты в условиях экспериментально индуцированной хронической ДЛП.

В опытах при молекулярно-генетическом исследовании у крыс на модели хронической холестериновой ДЛП наблюдалась тенденция к снижению экспрессии гена *Scarb1* на 26% в группе ГХС диеты по сравнению с группой интактного контроля.

Экспрессия гена *Scarb1* в опытах при молекулярно-генетическом исследовании у крыс на модели хронической холестериновой ДЛП для экспрессии гена *Scarb1* была показана тенденция к снижению на 26%. Экспрессия гена *Scarb1* снизилась на 45% в группе фенофибрата по сравнению с группой ГХС диеты. В то же время экспрессия гена *Scarb1* снизилась на 64% в группе крамизола по сравнению с группой ГХС диеты в условиях экспериментально индуцированной хронической ДЛП.

У группы с ГХС диетой отмечено повышение экспрессии гена *ApoC2* в печени на 124%. Курсовое введение фенофибрата снизило уровень экспрессии гена *ApoC2* на 45% по сравнению с группой ГХС диеты. В то же время курсовое введение крамизола увеличило уровень экспрессии гена *ApoC2* в печени на 156% по сравнению с группой ГХС диеты при экспериментально индуцированной хронической ДЛП.

У группы с ГХС диетой отмечено понижение экспрессии гена *Pdia2* в печени на 59%. Курсовое введение фенофибрата достоверно не изменило уровень экспрессии гена *Pdia2* по сравнению с группой ГХС диеты. В то же время курсовое введение крамизола увеличило уровень экспрессии гена *Pdia2* в печени на 243% по сравнению с группой ГХС диеты при экспериментально индуцированной хронической ДЛП.

Важно отметить снижение уровня *Scarb1* в группе крамизола и в группе фенофибрата. Таким образом, профиль действия крамизола в плане динамики экспрессии *SR-B1* также схож с действием фенофибрата (Webb N.R. et al, 2002).

Полученные данные свидетельствуют, что возможными механизмами комплексного действия исследуемого средства крамизола на липидный обмен являются: повышение уровня экспрессии гена *apoA1* на уровне мРНК, снижение транспорта липидов от ЛПВП к гепатоцитам опосредуемое уменьшением уровня экспрессии гена *Scarb1* и повышение экспрессии гена *ApoC2*. Повышение количества мРНК *apoA1* позволяет сохранять необходимый уровень ЛПВП в плазме крови и повышать его. Это позволяет реагировать на хроническое повышение липидов в плазме крови при ГХС диете (таблица 2) (Mahley R. W. et al, 1984). Понижение уровня экспрессии гена *Scarb1* ведет к понижению оттока липидов из ЛПВП в гепатоциты, что сохраняет уровень ЛПВП на высоком уровне и препятствует появлению новых частиц хиломикрон (Rhains D. et al, 2004). Повышение экспрессии гена *ApoC2* может влиять на разные пути липидного обмена. АпоС2 является аполипопротеином ЛПНП, увеличение его экспрессии повышает поглощение липидов этими липопротеиновыми частицами. С другой стороны, АпоС2 активирует ЛПЛ, что способствует увеличению активности липазы и активации расщепления липидов, в том числе липидов плазмы крови (Wolska A. et al, 2017). Как можно заключить из полученных нами данных, это и приводит к понижению уровня триглицеридов в плазме крови при введении крамизола подопытным животным. Данные по экспрессии генов интереса представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Влияние крамизола на экспрессию генов *apoA1*, *Scarb1*, *ApoC2* и *Pdia2* в печени крыс при экспериментальной хронической гиперлипидемии, вызванной холестериновой диетой

Группы животных Показатели	Группа 1 Контроль интактные крысы (n=9)	Группа 2 Гипер холестериновая диета (n=6)	Группа 3 Фенофибрат + Гипер холестериновая диета (n=8)	Группа 4 Крамизол + Гипер холестериновая диета (n=9)
<i>apoA1</i> , мРНК	1,000±0,208	0,958±0,206	1,040±0,303	4,113±0,669##
<i>Scarb1</i> , мРНК	1,000±0,173	0,741±0,071	0,410±0,117#	0,265±0,027##
<i>ApoC2</i> , мРНК	1,000±0,293	2,243±0,329*	1,236±0,298#	5,740±0,870#
<i>Pdia2</i> , мРНК	1,000±0,257	0,407±0,096*	0,363±0,119	1,394±0,244#

Примечание: * – $p < 0,05$ различия достоверны по отношению к группе интактных животных; # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$ различия достоверны в сравнении с группой крыс, получавших гиперхолестериновую диету. Данные выражены в условных единицах и нормированы к уровню экспрессии генов бета-актина (*Actb*) и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*Gapdh*) и рассчитаны в относительных единицах по отношению к средней величине экспрессии генов интереса в группах. Выравнивание производилось по среднему геометрическому двух референсных генов (*Actb* и *Gapdh*). Уровень экспрессии в группе интактных животных был принят за 1. *n* – число особей в группе. Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего арифметического.

Изменение экспрессии белков, участвующих в липидном обмене, и их генов, в макрофагах человеческой культуры (ТНР-1). В ходе исследований была проведена проточная цитометрия с антителами к белкам АПОА1, SR-B1, LOX1, CD36. Клетки культуры ТНР-1 были обработаны, в разных пробах, бычьим сывороточным альбумином (БСА, контроль), окисленными ЛПНП человека, окисленными ЛПНП человека и препаратом крамизола в концентрациях 10 нМ, 1 мМ и 10 мМ. Также были проведены реакции РТ-ПЦР с РНК, выделенной из обработанных клеток каждой из экспериментальных групп.

В ходе опыта по проточной цитометрии было показано, что во всех использованных концентрациях (10 нМ, 1 мМ, 10 мМ) крамизол приводил к существенному повышению уровня захвата окисленных ЛПНП макрофагами ТНР-1. Данные представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Влияние крамизола на уровень захвата ЛПНП в культуре клеток макрофагов ТНР-1 при обработке окисленными ЛПНП

Группы животных	Группа 1 Контроль	Группа 2 оксЛПНП	Группа 3 Крамизол 10нМ + оксЛПНП	Группа 5 Крамизол 1мМ + оксЛПНП	Группа 6 Крамизол 10мМ + оксЛПНП
Захват оксЛПНП	0,37±0,01	13,17±0,62*	21,31±0,63#	18,49±0,56#	28,29±0,63#

Примечание: * – $p < 0,05$ различия достоверны по отношению к группе контроля; # – $p < 0,05$ различия достоверны в сравнении с группой, обработанной окисленными ЛПНП (оксЛПНП). Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего арифметического.

Экспрессия гена *SR-B1* в культуре клеток ТНР-1 при обработке клеток окисленными ЛПНП проявляет тенденцию к понижению в 1,4 раза по сравнению с необработанными клетками. При одновременном добавлении к клеткам крамизола наблюдалось дозозависимое повышение уровня мРНК гена *SR-B1* в 4,4 раза относительно клеток, инкубированных с окисленными ЛПНП, при максимальных концентрациях крамизола (табл. 6).

Таблица 6 – Влияние крамизола на экспрессию гена *SR-B1* в культуре клеток макрофагов ТНР-1 при обработке окисленными ЛПНП

Гены	Группа 1 Контроль	Группа 2 оксЛПНП	Группа 3 Крамизол 10нМ + оксЛПНП	Группа 4 Крамизол 100нМ + оксЛПНП	Группа 5 Крамизол 1мМ + оксЛПНП	Группа 6 Крамизол 10мМ + оксЛПНП
<i>SR-B1</i> , мРНК	1,000± 0,237	0,730± 0,045	0,818± 0,135	1,169± 0,150#	1,355± 0,236##	3,202± 1,031#

Примечание: # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$ различия достоверны в сравнении с группой, обработанной окисленными ЛПНП (оксЛПНП). Данные выражены в условных единицах и нормированы к уровню экспрессии генов циклофилина А (*Cyclophilin A*) и 60S кислого рибосомального белка Р0 (*RPLP0*) и рассчитаны в относительных единицах по отношению к средней величине экспрессии гена *SR-B1* в контрольной группе. Выравнивание производилось по среднему геометрическому двух референсных генов (*Cyclophilin A* и *RPLP0*). Уровень экспрессии в группе контроля был принят за 1. Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего арифметического.

Уровень влияния крамизола на уровень поверхностных SR-B1 оценивали методом проточной цитометрии. Установлено, что при обработке культуры макрофагов ТНР-1 окисленными ЛПНП уровень поверхностных SR-B1 падает на треть по сравнению с клетками, обработанными БСА. При этом инкубация с крамизолом приводила к повышению уровня поверхностных SR-B1 по сравнению с клетками, обработанными только ЛПНП. Но дозозависимости данного эффекта не регистрировалось. Данные представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Влияние крамизола на уровень белка SR-B1 в культуре клеток макрофагов ТНР-1 при обработке окисленными ЛПНП

Белки	Группа 1 Контроль	Группа 2 оксЛПНП	Группа 3 Крамизол 10 нМ+ оксЛПНП	Группа 5 Крамизол 1 μМ + оксЛПНП	Группа 6 Крамизол 10 μМ + оксЛПНП
SR-B1	0,62±0,03	0,46±0,05*	1,50±0,04#	1,05±0,03#	1,15±0,08#

Примечание: * – $p < 0,05$ различия достоверны по отношению к группе контроля; # – $p < 0,05$ различия достоверны в сравнении с группой, обработанной окисленными ЛПНП (оксЛПНП). Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего арифметического.

При обработке культуры макрофагов ТНР-1 окисленными ЛПНП не наблюдалось существенных изменений уровня мРНК гена *LOX1*. При одновременном добавлении к клеткам окисленных ЛПНП и крамизола в концентрациях 10 нМ, 1 μМ и 10 μМ значимое повышение экспрессии наблюдалось только при максимальной концентрации 10 μМ – 2,5 раза по сравнению с клетками, обработанными только окисленными ЛПНП. При остальных концентрациях изменения были недостоверны (табл. 8).

Таблица 8 – Влияние крамизола на экспрессию гена *LOX1* в культуре клеток макрофагов ТНР 1 при обработке окисленными ЛПНП

Гены	Группа 1 Контроль	Группа 2 оксЛПНП	Группа 3 Крамизол 10нМ + оксЛПНП	Группа 4 Крамизол 100нМ + оксЛПНП	Группа 5 Крамизол 1μМ + оксЛПНП	Группа 6 Крамизол 10μМ + оксЛПНП
<i>LOX1</i> , мРНК	1,000± 0,528	0,881± 0,391	0,999± 0,218	2,041± 0,460	1,322± 0,383	2,479± 0,566#

Примечание: # – $p < 0,05$, различия достоверны в сравнении с группой, обработанной окисленными ЛПНП (оксЛПНП). Данные выражены в условных единицах и нормированы к уровню экспрессии генов циклофилина А (*Cyclophilin A*) и 60S кислого рибосомального белка Р0 (*RPLP0*) и рассчитаны в относительных единицах по отношению к средней величине экспрессии генов интереса в группах. Выравнивание производилось по среднему геометрическому двух референсных генов (*Cyclophilin A* и *RPLP0*). Уровень экспрессии в группе контроля был принят за 1. Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего арифметического.

Установлено, что при обработке культуры макрофагов ТНР-1 окисленными ЛПНП уровень поверхностных рецепторов *LOX1* возрастает на треть по сравнению с клетками, обработанными БСА. При этом обработка крамизолом в концентрации 10 нМ и 1 μМ приводила к дозозависимому повышению уровня поверхностных *LOX1* по сравнению с клетками, обработанными только окисленными ЛПНП. Инкубация клеток с крамизолом в концентрации 10 μМ приводила к резкому падению уровня поверхностных рецепторов *LOX1* до уровня контрольных клеток, обработанных БСА. Данные представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Влияние крамизола на уровень белка LOX1 в культуре клеток макрофагов ТНР-1 при обработке окисленными ЛПНП

Белки	Группа 1 контроль	Группа 2 оксЛПНП	Группа 3 Крамизол 10 нМ + оксЛПНП	Группа 5 Крамизол 1 μМ + оксЛПНП	Группа 6 Крамизол 10 μМ + оксЛПНП
LOX1	0,62±0,03	0,86±0,11*	1,19±0,07#	1,32±0,03#	0,58±0,04#

Примечание: * – $p < 0,05$ различия достоверны по отношению к группе контроля; # – $p < 0,05$ различия достоверны в сравнении с группой, обработанной окисленными ЛПНП (оксЛПНП). Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего арифметического.

При добавлении к культуре макрофагов ТНР-1 окисленных ЛПНП не наблюдалось значимых изменений уровня мРНК гена *CD36* по сравнению с необработанными клетками. При одновременном добавлении к клеткам крамизола в концентрациях 10 нМ, 100 нМ, 1 μМ и 10 μМ и окисленных ЛПНП наблюдалось повышение уровня мРНК гена *CD36*. Максимум это повышение достигало при максимальной концентрации крамизола 10 μМ – в 3,5 раза по сравнению с клетками, обработанными только окисленными ЛПНП. Но дозозависимого эффекта не наблюдалось (табл. 10).

Установлено, что при обработке культуры макрофагов ТНР-1 окисленными ЛПНП уровень поверхностных рецепторов CD36 возрастает по сравнению с клетками, обработанными БСА. При этом обработка крамизолом только в концентрации 1 μМ приводила к повышению уровня поверхностных CD36 по сравнению с клетками, обработанными только окисленными ЛПНП. Данные представлены в таблице 11.

Таблица 10 – Влияние крамизола на экспрессию гена *CD36* в культуре клеток макрофагов ТНР-1 при обработке окисленными ЛПНП

Гены	Группа 1 Контроль	Группа 2 оксЛПНП	Группа 3 Крамизол 10 нМ + оксЛПНП	Группа 4 Крамизол 100нМ + оксЛПНП	Группа 5 Крамизол 1μМ + оксЛПНП	Группа 6 Крамизол 10 μМ + оксЛПНП
<i>CD36</i> , мРНК	1,000± 0,140	0,743± 0,050	1,230± 0,067##	1,123± 0,151#	1,087± 0,122#	3,859± 1,095##

Примечание: # – $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$ различия достоверны в сравнении с группой, обработанной окисленными ЛПНП (оксЛПНП). Данные выражены в условных единицах и нормированы к уровню экспрессии генов циклофилина А (*Cyclophilin A*) и 60S кислого рибосомального белка Р0 (*RPLP0*) и рассчитаны в относительных единицах по отношению к средней величине экспрессии генов интереса в группах. Выравнивание производилось по среднему геометрическому двух референсных генов (*Cyclophilin A* и *RPLP0*). Уровень экспрессии в группе контроля был принят за 1. Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего арифметического.

Таблица 11 – Влияние крамизола на уровень белка CD36 в культуре клеток макрофагов ТНР-1 при обработке окисленными ЛПНП

Белки	Группа 1 контроль	Группа 2 оксЛПНП	Группа 3 Крамизол 10нМ + оксЛПНП	Группа 5 Крамизол 1 μМ + оксЛПНП	Группа 6 Крамизол 10 μМ + оксЛПНП
CD36	1,58±0,03	11,44±0,26*	10,17±0,30#	12,91±0,36#	11,38±0,37

Примечание: * – $p < 0,05$ различия достоверны по отношению к группе контроля; # – $p < 0,05$ различия достоверны в сравнении с группой, обработанной окисленными ЛПНП (оксЛПНП). Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего арифметического.

Экспрессия гена *АПОА1* в культуре клеток ТНР-1 при обработке клеток окисленными ЛПНП проявляла тенденцию к повышению по сравнению с контрольной группой. При обработке культуры клеток ТНР-1 крамизолом в концентрациях 10 нМ, 100 нМ, 1 μМ и 10 μМ вместе с обработкой окисленными ЛПНП проявлялась тенденция к снижению экспрессии *АПОА1* по сравнению с клетками, обработанными окисленными ЛПНП. При этом с ростом концентрации крамизола наблюдалось повышение уровня экспрессии, не выходящее при этом на уровень группы окисленных ЛПНП. Достоверное понижение экспрессии *АПОА1* по сравнению с клетками, обработанными окисленными ЛПНП наблюдалось при концентрации 10нМ и 1μМ (табл. 12).

Таблица 12 – Влияние крамизола на экспрессию гена *АРОА1*, в культуре клеток макрофагов ТНР 1 при обработке оксЛПНП

Гены	Группа 1 контроль	Группа 2 оксЛПНП	Группа 3 Крамизол 10 нМ + оксЛПНП	Группа 4 Крамизол 100 нМ + оксЛПНП	Группа 5 Крамизол 1 μМ + оксЛПНП	Группа 6 Крамизол 10 μМ + оксЛПНП
<i>АПО А1, мРНК</i>	1,000± 0,235	1,229± 0,311	0,096± 0,016##	0,638± 0,153	0,414± 0,145#	1,045± 0,263

Примечание: * – $p < 0,05$ различия достоверны по отношению к группе контроля; # – $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$ различия достоверны в сравнении с группой, обработанной окисленными ЛПНП (оксЛПНП). Данные выражены в условных единицах и нормированы к уровню экспрессии генов циклофилина А (*Cyclophilin A*) и 60S кислого рибосомального белка Р0 (*RPLP0*) и рассчитаны в относительных единицах по отношению к средней величине экспрессии генов интереса в группах. Выравнивание производилось по среднему геометрическому двух референсных генов (*Cyclophilin A* и *RPLP0*). Уровень экспрессии в группе контроля был принят за 1. Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего арифметического.

В ходе опыта по проточной цитометрии было показано, что окисленные ЛПНП человека повышают уровень белка АПОА1 по сравнению с клетками, обработанными БСА. При обработке культуры клеток ТНР-1 крамизолом в концентрациях 10 нМ, 100 нМ, 1 μМ и 10 μМ вместе с обработкой окисленными ЛПНП не изменяют уровень белка АПОА1 по сравнению с клетками, обработанными окисленными ЛПНП. Данные представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Влияние крамизола на уровень белка АПОА1, в культуре клеток макрофагов ТНР-1 при обработке окисленными ЛПНП

Белки	Группа 1 контроль	Группа 2 оксЛПНП	Группа 3 Крамизол 10нМ + оксЛПНП	Группа 5 Крамизол 1 μМ + оксЛПНП	Группа 6 Крамизол 10 μМ + оксЛПНП
<i>АПОА1</i>	0,66±0,013	0,75±0,020*	0,72±0,015	0,81±0,056	0,74±0,028

Примечание: * – $p < 0,05$ различия достоверны по отношению к группе контроля. Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего арифметического.

Таким образом, можно сделать вывод, что крамизол в разной концентрации активирует в макрофагах разные скевэнджер рецепторы. Активация экспрессии генов скевэнджер рецепторов, по-видимому, является механизмом стимуляции реакции захвата макрофагами оксЛПНП при обработке клеток крамизолом. Полученные данные также позволяют предположить, что за увеличение захвата оксЛПНП при разных концентрациях крамизола преимущественно отвечают отдельные скевэнджер рецепторы: SR-B1 для концентрации 10нМ, LOX1 для концентраций 1 μМ. CD36, по-видимому, одинаково активен при всех концентрациях, но наиболее выраженный эффект наблюдается при концентрации 1 μМ. Следует отметить, что повышение уровня мРНК генов скевэнджер рецепторов и повышение содержания самих скевэнджер рецепторов на поверхности клеток связаны нелинейно, что, возможно, свидетельствует о различных механизмах регуляции крамизолом активности скевэнджер рецепторов на посттранскрипционном и посттрансляционном уровнях.

Изменение экспрессии белков в культуре перитонеальных макрофагов крысы.

Эксперименты по обработке культуры клеток перитонеальных макрофагов крысы крамизолом на проточной цитометрии показали следующее.

Экспрессия *Scarb1* в культуре перитонеальных макрофагов крысы при обработке клеток крамизолом в концентрации 100 нМ понижается в 2 раза по сравнению с необработанными клетками.

Экспрессия *Lox1* в культуре перитонеальных макрофагов крысы, обработанных крамизолом в концентрации 100 нМ повышается по сравнению с необработанными клетками.

Экспрессия *Cd36* в культуре перитонеальных макрофагов крысы при обработке клеток крамизолом в концентрации 100 нМ повышается по сравнению с необработанными клетками (табл. 14).

Таблица 14 – Влияние крамизола на уровень экспрессии белков *Scarb1*, *Lox1*, и *Cd36* в культуре клеток перитонеальных макрофагов крысы

Белки	Группа 1 Контроль	Группа 2 Крамизол 100нМ
<i>Scarb1</i>	5,5±0,055	2,75±0,025*
<i>Lox1</i>	4,93±0,044	6,41±0,027*
<i>Cd36</i>	5,75±0,054	7,75±0,056*

Примечание: * – $p < 0,05$ различия достоверны по отношению к группе изотипа. Данные выражены в условных единицах и представлены как среднее значение, выровненное по медиане.

Таким образом, из наших данных можно сделать вывод, что в целом, на макрофаги грызунов и человека крамизол действует как активатор экспрессии генов скевэнджер

рецепторов. Однако различия наблюдаются в экспрессии гена *SR-B1*. У грызунов его гомолог *Scarb1* репрессируется крамизолом, но в культуре клеток человека он проявляет тенденцию к слабому повышению экспрессии. Различия в регуляции активности скевэнджер рецепторов крамизолом может влиять на клиренс модифицированных липопротеинов из кровеносного русла и препятствовать развитию дислипидемии и процессов, связанных с атеросклерозом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют, что возможными механизмами комплексного действия исследуемого препарата крамизола на липидный обмен являются: повышение уровня экспрессии гена *АПОА1* на уровне мРНК, снижение транспорта липидов от ЛПВП к гепатоцитам, опосредуемое уменьшением уровня экспрессии гена *Scarb1* и повышение экспрессии гена *ApoC2*. Повышение количества мРНК *АПОА1* позволяет сохранять необходимый уровень ЛПВП в плазме крови. Это обуславливает реакцию системы липидного обмена на хроническое повышение липидов в плазме крови при ГХС диете (таблица 2). Крамизол обладает гиполипидемическим действием. Крамизол на модели острой ДЛП, индуцированной тритоном WR-1339, снижает содержание общего ХС и ТГ в крови. По выраженности липид снижающего действия крамизол близок к эффектам известного гиполипидемического препарата фенофибрата. Крамизол восстанавливает до нормальных значений экспрессию гена *apoA1* у крыс с экспериментально индуцированной острой ДЛП, что, возможно, также привносит свой вклад в его гиполипидемическое действие. (Mahley R.W. et al., 1984). Понижение уровня экспрессии гена *Scarb1* (на модели хронической ДЛП у крыс) ведет к понижению оттока липидов из ЛПВП в гепатоциты, что сохраняет концентрацию ЛПВП на высоком уровне и препятствует появлению новых частиц хиломикрон (Rhains D. et al, 2004). При этом нужно отметить, что в макрофагах человека наблюдается тенденция к увеличению экспрессии гена *SR-B1*. Известно, что фенофибрат является агонистом ядерных α -рецепторов, активирующих пролиферацию пероксисом (PPAR- α). В результате активации PPAR- α происходит увеличение экспрессии гена фермента ЛПЛ и снижение экспрессии гена *ApoC3* – ингибитора фермента ЛПЛ, за счёт чего увеличивается липолиз ЛП (Tenenbaum A. et al, 2012). В отличие от человека, у грызунов PPARalpha не увеличивает синтез АПОА1 из-за мутации в гепатоцитарном энхансере гена *АПОА1*, с которым взаимодействует PPARalpha. Таким образом, можно предположить, что у человека эффект фенофибрата на экспрессию гена *АПОА1* будет выше, чем у крыс за счет регуляции PPARalpha (Burri L. et al., 2010, Debin L. et al., 2005). Также необходимо отметить, что фенофибрат является активатором не только гена *АПОА1*, но и генов *АПОЕ* и *ApoC3* (Tenenbaum A. et al, 2012), что может обуславливать повышение уровня ЛПВП без увеличения уровня экспрессии *АПОА1* в нашем эксперименте.

Повышение экспрессии гена *АПОС2*, отмеченное в наших экспериментах при введении крамизола, может влиять на разные пути липидного обмена. АпоС2 является аполипопротеином ЛПНП, увеличение его экспрессии повышает поглощение липидов этими липопротеиновыми частицами. С другой стороны, АпоС2 активирует ЛПЛ, что способствует увеличению активности липазы и активации расщепления липидов, в том числе липидов плазмы крови (Wolska A. et al, 2017). Это и приводит к понижению уровня триглицеридов в плазме крови при введении крамизола подопытным животным.

При обработке культуры перитонеальных макрофагов крысы крамизолом в концентрации 100 нМ экспрессия *Scarb1* снижается в 2 раза по сравнению с необработанными клетками. Это согласуется с данными, полученными в опытах на хронической и острой моделях ДЛП, о снижении уровня экспрессии *Scarb1* в гепатоцитах крысы под влиянием крамизола.

Из результатов, полученных на клеточных культурах, можно сделать вывод, что на макрофаги крамизол действует как модулятор экспрессии генов, что является общим и для человека, и для грызунов. Это показывает, что крамизол в организме человека будет работать как модулятор антиатерогенных генетических факторов в непосредственных участках атерогенеза – в интиме кровеносных сосудов при образовании пенных клеток из макрофагов. Тенденция к повышению экспрессии рецепторов, таких как SR-B1, LOX1 и CD36, и их генов:

SR-B1 и *CD36* – дискуссионный момент. *CD36*, *SR-B1* и *LOX1* осуществляют захват окисленных ЛПНП, поэтому усиление экспрессии их генов связано с повышением захвата окисленных ЛПНП макрофагами (Maiolino G. et. al, 2013). Это можно трактовать и как проатерогенный фактор, и как фактор, модулирующий атерогенез. Данные, опубликованные по этому вопросу, неоднозначны и во многом противоречивы (Stephen S. L. et. al, 2010; Maiolino G. et. al, 2013). Захват макрофагами ЛПНП является частью нормального процесса очищения сосудов от модифицированных (окисленных, ацетилированных и.т.д.) атерогенных форм ЛПНП. Видимо, это зависит от стадии, на которой происходит захват. Если процессы воспаления, ведущие к атеросклерозу, еще не запущены, то захват окисленных ЛПНП будет вести к предотвращению запуска каскада проатерогенных воспалительных процессов.

Таким образом, из вышеизложенного можно сделать вывод, что крамизол можно рассматривать как потенциальное гиполипидемическое средство с оригинальным механизмом действия.

ВЫВОДЫ

1. Крамизол снижает уровень общего холестерина, триглицеридов и общий коэффициент атерогенности в плазме крови в острой и хронической моделях дислипидемии крыс до показателей, сравнимых с аналогичными показателями эталонного препарата – фенофибрата.

2. Крамизол в острой модели дислипидемии увеличивает экспрессию гена *apoA1* в печени крыс, при хронической алиментарной модели дислипидемии повышает экспрессию генов *apoA1*, *ApoC2* и *Pdia2* и снижает экспрессию гена *Scarb1* в печени крыс.

3. В клеточной модели перитонеальных макрофагов крыс крамизол повышает количество скевэнджер рецепторов *Lox1* и *Cd36* и снижает экспрессию скевэнджер рецептора *Scarb1* на поверхности клеток.

4. В клеточной модели макрофагов человека ТНР-1 крамизол усиливает захват клетками окисленных ЛПНП, который коррелирует с повышением количества скевэнджер рецепторов *SR-B1*, *LOX1* и *CD36* на поверхности клеток и с повышением экспрессии генов *SR-B1*, *LOX1* и *CD36*.

5. Полученные данные позволяют рассматривать крамизол как перспективное соединение для использования в качестве возможного гиполипидемического препарата с оригинальным механизмом действия.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

Работы, опубликованные в журналах списка ВАК

1. Лизунов, А.В. Влияние крамизола на экспрессию гена Аполипопротеина А1 (АпоА1) в печени крыс при экспериментально индуцированной гиперлипидемии / А.В. Лизунов, И.В. Окуневи́ч, С.В. Орлов, А.А. Лебедев, Е.Р. Бычков, Л.Б.Пиотровский, П.Д. Шабанов // Биомедицинская химия. – 2019. – Т.65 (5) – С. 403-406. [Lizunov, A. V. The Effect of Cramizol on ApoA1 Gene Expression in Rats with Experimental Hyperlipidemia/ A. V. Lizunov, I. V. Okunevich, S. V. Orlov, A. A. Lebedev, E. R. Bychkov, L. B. Piotrovskiy, P. D. Shabanov // Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry. – 2020. – Vol. 14. – P.82–85.]
2. Лизунов, А.В. Молекулярные механизмы гиполлипидемического действия цитопротектора крамизола при экспериментальной дислипидемии/ А.В. Лизунов, И.В. Окуневи́ч, А.А. Лебедев, Е.Р. Бычков, Л.Б. Пиотровский, П.Д. Шабанов // Биомедицинская химия. – 2020. – Т.66(4). – С. 326-331.
3. Лизунов, А.В. Молекулярные механизмы действия антиатеросклеротических препаратов / А.В. Лизунов, Е.Р. Бычков // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2021. – Т.19(3). – С. 291-301.

Работы, опубликованные в сборниках научно-практических работ

1. Косякова, Г.П. Исследование фенофибрата и кармизола на тритоновой модели гиперлипидемии и атеросклероза/ Г.П. Косякова, А.В. Лизунов, П.В. Шаляпин // Всероссийский терапевтический конгресс с международным участием: Боткинские чтения, Сборник тезисов – 2019. – С.131-132.
2. Косякова, Г.П. Влияние препарата крамизола при холестериновой диете на триглицериды/ Г.П. Косякова, А.В. Лизунов, В.А. Михайлова // Инновации в здоровье нации: Сборник материалов VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием – 2019. – С.22-26.
3. Lizunov, A.V. Effects of karmizole derivatе on the expression of Apo A-I gene in the rat's hyperlipidemia model/ A.V. Lizunov, I.V. Okunevich, P.D. Shabanov // Medical Academic Journal – 2019. – Vol.19(S) – P.211-212.
4. Лизунов А.В. Влияние крамизола на экспрессию генов аполипопротеина А1, аполипопротеина С2 и рецептора SR-B1 в модели алиментарной дислипидемии крыс / Лизунов А.В., Окуневи́ч И.В., Г.П. Косякова, Л.Б. Пиотровский, П.Д. Шабанов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии – 2020. – Т.18(спецвыпуск 1) – С. 47-48.
5. Лизунов, А.В. Влияние препарата крамизола и препарата сравнения фенофибрата на триглицериды при холестериновой диете / А.В. Лизунов, Г.П. Косякова, А.А. Князева // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии – 2020. – Т.18(спецвыпуск 1) – С. 46-47.
6. Lizunov, A.V. Effects of kramizole on the expression of apo A-I, APOC2, and SR-B1 genes in the hypercholesterol diet-induced rat model/ A.V. Lizunov, I.V. Okunevich, L.B. Pyotrovskiy, P.D. Shabanov // Atherosclerosis – 2020. – Vol.315 – E186-E187.
7. Lizunov, A.V. Hypolipidemic effects of kramizole on the expression Pdia2 gene in the rat's hypercholesterol dyslipidemia model / A.V. Lizunov, I.V. Okunevich, G.P. Kosyakova, L.B. Piotrovskiy, P.D. Shabanov // Stress and behaviour conference abstracts collection 2021. – 2021. – P.11.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АПОА1 – ген аполипопротеина А1 человека
 АпоЕ – аполипопротеин Е
 АПОЕ – аполипопротеин Е
 АпоС2 – аполипопротеин С2
 АПОС2 – аполипопротеин С2

АПОС2 – ген аполипопротеина С2 крысы
АпоС3 – аполипопротеин С3
АС – атеросклероз
АЦБ – антитела к цитруллинированным белкам
ДЛП – дислипопротеинемия
ИБС – ишемическая болезнь сердца
ИВЗ – иммуновоспалительные заболевания
ЛП – липопротеины
ЛПВП, HDL – липопротеины высокой плотности
ЛПНП, LDL – липопротеины низкой плотности
ЛПОНП, VLDL- липопротеины очень низкой плотности
ЛППП – липопротеины промежуточной плотности
РФ – ревматоидный фактор
ТГ – триглицериды
ХС – общий холестерин
АроС3 – аполипопротеин С3
Cd36 – ген скэвенджер рецептора CD 36 крысы
Cd36 - скэвенджер рецептор CD 36 крысы
CD36 - скэвенджер рецептор CD 36 человека
CD36 - скэвенджер рецептора CD 36 человека
Lox1 – ген скэвенджер рецептора LOX1 крысы
LOX1 – скэвенджер рецептор E1 (LOX1)
Lox1 - скэвенджер рецептор LOX1 крысы
LOX1 - скэвенджер рецептора LOX1 человека
PDIA2 – протеиндисульфидизомераза A2
Pdia2 – протеиндисульфидизомераза A2 крысы
Scarb1 – ген скэвенджер рецептор B1 крыс
Scarb1 – ген скэвенджер рецептора B1 крысы
Scarb1 - скэвенджер рецептор B1 крыс
SR-B1 – ген скэвенджер рецептора B1 человека
SR-B1 – скэвенджер рецептор B1
АПОА1 – аполипопротеин А1
АПОА1 – аполипопротеин А1
АПОА1 – ген аполипопротеина А1 крысы