

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ»

На правах рукописи

ЛИЗУНОВ Алексей Владимирович

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КРАМИЗОЛА НА РЕГУЛЯЦИЮ ЭКСПРЕССИИ  
ГЕНОВ SR-B1, АПОА1, АПОС2 и PDIA2 В МОДЕЛИ АЛИМЕНТАРНОЙ  
ГИПЕРЛИПИДЕМИИ У КРЫС

3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология

1.5.4. – Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

доктор медицинских наук, профессор

АЛЕКСАНДР ДОРОФЕЕВИЧ ДЕНИСЕНКО

кандидат медицинских наук

ЕВГЕНИЙ РУДОЛЬФОВИЧ БЫЧКОВ

Санкт-Петербург – 2022

## Оглавление

<b>Введение.....</b>	<b>5</b>
Актуальность и степень разработанности темы исследования.....	5
<b>Цели и задачи исследования.....</b>	<b>6</b>
Научная новизна .....	6
Теоретическая и практическая значимость исследования.....	7
Методология и методы исследования.....	8
Положения, выносимые на защиту.....	8
Степень достоверности и апробация результатов.....	9
Личный вклад автора.....	11
<b>1.ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>12</b>
1.1 Атеросклероз – механизмы.....	12
1.1.1 Атеросклероз – общие положения.....	12
1.1.2 Гиперлипидемии – классификация.....	13
1.1.3 Теории атерогенеза.....	15
1.1.4 Липидный обмен, липопротеины, аполипопротеины.....	18
1.1.5 Интерлейкины.....	20
1.2 Гены и факторы, связанные с липидным обменом.....	21
1.2.1 Гены аполипопротеинов.....	21
1.2.2 Гены скэвенджер рецепторов.....	28
1.3 Методы исследования эффективности антиатеросклеротических препаратов.....	33
1.4 Антиатеросклеротические лекарственные средства.....	34
1.5 Азолы и их производные, антиатеросклеротические свойства, применение... ..	40
<b>2. МЕТОДЫ.....</b>	<b>42</b>
2.1 Модели исследования и экспериментальные животные.....	42
2.1.1 Острая модель дислипидемии .....	43
2.1.2. Хроническая модель дислипидемии .....	44
2.2.1. Определение уровня общего ХС, триглицеридов и ЛПВП в выделенной сыворотке подопытных животных.....	45
2.2.2. Выделение РНК и ОТ-ПЦР.....	46

2.3. Эксперименты на культуре клеток макрофагов человека ТНР-1.....	51
2.3.1. Инкубация клеток с препаратом крамизола.....	52
2.3.2. Проточная цитометрия белков, участвующих в липидном обмене.....	53
2.3.3. Выделение РНК из культуры клеток ТНР1, ОТ-ПЦР.....	55
2.4 Эксперименты на перитонеальных макрофагах крысы.....	56
2.4.1. Выделение макрофагов из перитонеальной области крысы.....	56
2.4.2. Инкубация клеток с препаратом крамизола.....	57
<b>3. Результаты и их обсуждение.....</b>	<b>61</b>
3.1 Исследование гипополипидемических эффектов крамизола на острой модели дислипидемии.....	61
3.1.1. Влияние крамизола на липидный профиль крысы в острой модели дислипидемии.....	61
3.1.2. Влияние крамизола на активность генов крысы в острой модели дислипидемии.....	62
3.2. Исследование гипополипидемических эффектов крамизола на холестериновой модели дислипидемии.....	65
3.2.1. Влияние крамизола на липидный профиль крысы в холестериновой модели дислипидемии.....	66
3.2.2. Влияние крамизола на активность генов крысы в холестериновой модели дислипидемии.....	67
3.3 Изменение экспрессии белков, участвующих в липидном обмене, и их генов, в макрофагах человеческой культуры ТНР1.....	73
3.4 Изменение экспрессии белков в культуре перитонеальных макрофагов крысы.....	82
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>89</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>92</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>94</b>

## ВВЕДЕНИЕ.

Актуальность и степень разработанности темы 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; Nicholls, S.J. et. al., 2015; Viney, N.J. et. al., 2016; Окуневич и др., 2019; 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 гиполипидемического профиля.

Широким кругом 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]. В настоящее время показано, что химические соединения на основе азолов и их производных нормализуют липидный спектр крови. В исследованиях на модели экспериментального холестеринавого

атеросклероза у кроликов показано, что некоторые производные азолов характеризуются такими антиатерогенными эффектами, как снижением числа липидных полосок и пятен в аорте у подопытных животных [Даутова Г.С. и др., 1998]. В экспериментах *in vivo* показано, что одно из производных азолов – бензолсульфонат 1-метил-3-этил, 4,5 (бис-N-метилкарбамоил) имидазолия (крамизол) проявляет гиполипидемические свойства, действуя на процессы энергетического обмена в клетке [Ковалева В.Н. и др., 1983; Окуневи́ч и др., 2016]. Гиполипидемическая активность крамизола продемонстрирована в исследованиях на острой и хронической моделях дислипидемии на крысах [Окуневи́ч 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 сквэнджер рецептора В1, осуществляющего транспорт холестерина из липопротеинов высокой плотности в гепатоциты, связывающий окисленные липопротеиды.

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

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

### Цели и задачи исследования

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

Задачи, поставленные в данном исследовании:

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*), скевэнджер-рецептора *Scarb1*, и фолдазы *Pdia2* в печени крыс при острой и хронической дислипидемии.
3. Изучить влияние крамизола на экспрессию генов скевэнджер-рецепторов ЛПНП (*Scarb1*, *Lox1*, *Cd36*) в культуре клеток перитонеальных макрофагов крысы.
4. Исследовать влияние крамизола на захват окисленных ЛПНП, содержание мРНК и белка скевэнджер-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 активизирует 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 гиполипидемического 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 ТНР-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, поочередное введение препарата 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:

«Всероссийский терапевтический конгресс с международным участием: Боткинские чтения» по теме: «Исследование фенофибрата и кармизола на тритоновой модели гиперлипидемии и атеросклероза», 2019 г.

«Stress and Behavior» по теме «Effects of karmizole derivate on the expression of Apo A-I gene in the rat's hyperlipidemia model», 2019 г.

«Инновации в здоровье нации» по теме: «Влияние препарата крамизола при холестериновой диете на триглицериды», 2019 г.

«Фармакология гормональных систем» по темам: «Влияние крамизола на экспрессию генов аполипопротеина А1, аполипопротеина С2 и рецептора SR-B1 в модели алиментарной дислипидемии крыс» и «Влияние препарата крамизола и препарата сравнения фенофибрата при холестериновой диете на триглицериды», 2020г.

«European atherosclerosis congress» по теме: «Effects of kramizole on the expression of apo A-I, APOC2, and SR-B1 genes in the hypercholesterol diet-induced rat model», 2020.

«Stress and Behavior» по теме «Hypolipidemic effects of kramizole on the expression Pdia2 gene in the rat's hypercholesterol dyslipidemia model», 2021.

Результаты диссертационного исследования опубликованы в статьях в рецензируемых изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации для публикации результатов диссертационных исследований:

- Лизунов, А.В. Влияние крамизола на экспрессию гена Аполипопротеина А1 (АпоА1) в печени крыс при экспериментально индуцированной гиперлипидемии/ А.В. Лизунов, И.В. Окуневич, С.В. Орлов, А.А. Лебедев, Е.Р. Бычков, Л.Б.Пиотровский, П.Д. Шабанов // Биомедицинская химия – 2019 – Т.65(5) – С. 403-406. DOI: 10.18097/PBMC20196505403.
- «Biochemistry (Moscow) Supplement Series B Biomedical Chemistry Supplement Series B: Biomedical Chemistry, 2020, Vol. 14, No. 1, pp. 82–85» «The Effect of Cramizol on APOA1 Gene Expression in Rats with Experimental Hyperlipidemia». DOI: 10.1134/S1990750820010102
- «Биомедицинская химия 2020, том 66, вып. 4 с. 326-331» «Молекулярные Механизмы гиполипидемического действия цитопротектора крамизола при экспериментальной дислипидемии». DOI: 10.18097/PBMC20206604326
- «Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии 2021 том 19, вып. 3 с. 291-301» «Молекулярные механизмы действия

антиатеросклеротических

препаратов»

DOI:

<https://doi.org/10.17816/RCF193291-301>

Исследование выполнено в рамках государственного задания по теме «Фармакологический анализ действия нейротропных средств, изучение внутриклеточных мишеней и создание систем направленной доставки», шифр 0557-2019-0004.

#### Личный вклад автора

Личный вклад автора осуществлялся на всех этапах работы и состоял в планировании экспериментов, их непосредственном выполнении, обработке полученных результатов, обсуждении результатов, написании статей и тезисов, написании диссертации и автореферата. Участие автора в выполнении, сборе и анализе – 95%, статистической обработке – 100%, в написании статей и тезисов – 90%, написании диссертации и автореферата – 95%.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Атеросклероз – механизмы

#### 1.1.1 Атеросклероз – общие положения.

Атеросклероз (АС) – многофакторное, хроническое прогрессирующее сердечно-сосудистое заболевание, поражающее артерии эластического типа [Беленков Ю.Н. и др., 2010, Undas A. et al, 2005], которое характеризуется отложением в интиме сосудов липопротеинов (ЛП) низкой плотности (ЛПНП) и доставляемого ими холестерина (ХС). Следствием этого является возникновение атеросклеротических бляшек, что приводит к ишемии, некрозу и фиброзным изменениям в органах. АС – социально значимое, затратное заболевание, требующее адекватного лечения для снижения инвалидизации и смертности пациентов [Сусеков А. В. и др., 2019; Окуневи́ч И.В.и др., 2004]. Существует множество факторов риска в развитии АС. Эти факторы можно подразделить на внутренние или метаболические (дислипотеинемии, артериальная гипертензия, ожирение, сахарный диабет) и поведенческие (пищевые привычки, вредные привычки, двигательная активность, подверженность стрессам). Одним из главных перечисленных факторов риска развития АС являются метаболические нарушения – дислипотеинемии (ДЛП) атерогенного характера, которые, в общем, представляют собой патологическое повышение в крови уровня общего холестерина (ХС), ЛПНП и ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП) [Ахмеджанов Н.М. и др., 2015; Vaigent C. et.al.,2010; Ouweneel A. B. et.al., 2021; Mihaylova, B., 2012; Насонов Е.Л. и др., 2018; Su X. et al, 2020], которые включают триглицериды (ТГ) [Ray K.K., NCT02597127, 2016; Crossey E., 2015], а также снижение концентрации антиатерогенных липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) Из многих независимых факторов риска развития АС ДЛП относится к модифицируемым факторам [Nicholls, S.J., 2010; Jukema, J.W., 1995, Cannon, C.P., 2004; Окуневи́ч И.В. и др., 2007].

Развитие атеросклероза зависит не только от абсолютного уровня тех или иных классов липопротеинов, но и от соотношения липопротеинов с атерогенной

(вызывающей атеросклероз) и антиатерогенной (препятствующей возникновению заболевания) направленностью.

### 1.1.2. Гиперлипидемии – классификация.

По характеру нарушений липидного обмена и повышению уровня различных липопротеинов в плазме крови ДЛП (гиперлипидемии) подразделяют на следующие типы [Fredrickson D.S. et al., 1965]:

Гиперлипопротеинемия I типа – развивается при недостаточности липопротеинлипазы (ЛПЛ) или дефекте в белке-активаторе ЛПЛ — аполипопротеине С2 (АпоС2). Проявляется в повышенном уровне хиломикронов. Частота встречаемости в общей популяции составляет 0,1 % [Lusis A. J. et al., 2000; Thompson G.R. et.al., 2004].

Гиперлипопротеинемия II – характеризуется повышением холестерина ЛПНП. Подразделяется на типы IIa и IIb в зависимости от отсутствия или наличия высокого уровня концентрации триглицеридов в плазме крови. IIa – может быть спорадической (развивается в результате перенасыщенного ХС питания), полигенной или наследственной. Наследственная гиперлипопротеинемия IIa типа развивается в результате мутации гена ЛПНП-рецептора (LDLR) (0.2 % в популяции, вызывает снижение уровень рецептора LDLR, что снижает уровень захвата ЛПНП и увеличивает уровень ЛПНП в плазме крови), гена аполипопротеина В (APO B-100) 0.2 % популяции, доминантная мутация, из-за которой в рецепторсвязывающем домене белка один аргинин замещается на глутамин, эта замена снижает аффинность АпоВ к LDLR, что также снижает захват ЛПНП) [Thompson G.R. et.al., 2004; Soria L.F. et al., 1989] или гена пропротеиновой конвертазы субтилизин-кексинового типа 9 (PCSK9) (повышение экспрессии этого белка приводит к повышению связывания с EGF-А доменом LDLR, что приводит к снижению количества LDLR, и снижению захвата ЛПНП). Наследственная (семейная) форма проявляется ксантомами и ранним развитием сердечно-сосудистых заболеваний.

Наследственная гиперлипопротеинемия IIb типа – характеризуется повышенной концентрацией триглицеридов в крови в составе ЛПОНП. Высокий уровень ЛПОНП возникает из-за усиленного образования главного компонента ЛПОНП — триглицеридов, а также фермента ацетил-кофермента А и АРОВ, изоформа В-100 (АРОВ, АРОВ-100). Более редкой причиной этого нарушения может быть замедленный клиренс (удаление) ЛПНП. Частота встречаемости в популяции — 10 %. К этому подтипу относятся также наследственная комбинированная гиперлипопротеинемия и вторичная комбинированная гиперлипопротеинемия (как правило, при метаболическом синдроме) [Lusis A. J. et al., 2000; Thompson G.R. et.al., 2004].

Гиперлипопротеинемия III типа – характеризуется увеличением уровня хиломикрон и ЛППП. Наиболее частая причина — гомозиготность по одной из изоформ аполипопротеина Е (АПОЕ) — E2/E2, которая характеризуется нарушением связывания с ЛПНП-рецептором. Встречаемость в общей популяции — 0,02 % [Lusis A. J. et al., 2000; Thompson G.R. et.al., 2004].

Гиперлипопротеинемия IV типа (гипертриглицеридемия) – характеризуется повышенной концентрацией триглицеридов. Частота встречаемости в общей популяции — 1 % [Lusis A. J. et al., 2000; Thompson G.R. et.al., 2004].

Гиперлипопротеинемия V типа – схожа с I типом, но проявляется не только в высоком уровне хиломикрон, но и повышенным уровнем ЛПОНП [Lusis A. J. et al., 2000; Thompson G.R. et.al., 2004].

Наследственные варианты развития атеросклероза отмечаются в 5-10% случаев этого заболевания, что было показано во множестве исследований атеросклероза, как близнецовых, так и семейных.

Другая часть гиперлипопротеинемий относится к категории приобретенных. Причиной их возникновения является совокупность внешних факторов (характера питания, сопутствующих заболеваний). Сложный комплекс взаимодействий между указанными внешними и внутренними факторами может приводить к нарушению обмена липидов, и в итоге – к развитию атеросклероза.

### 1.1.3. Теории атерогенеза.

Нарушения процессов регуляции транспорта липидов (дислипидемий) являются механизмом, объясняющим “холестериновую” или «инфильтрационную» теорию (Н. Н. Аничкова и С.С. Халатова). Эта теория стала базой для дальнейшего изучения механизмов развития заболевания с позиций современных знаний. Она заключается в том, что липиды (прежде всего в составе ЛПНП) проникают в стенку сосудов свободно и в норме восполняют потребности клеток сосудов в липидах, тогда как излишки удаляются через систему лимфатических сосудов. Но при избытке липидов происходит накопление липидов в стенке сосудов, что приводит к развитию липидоза. Это подтверждается наличием корреляции между уровнем ЛПНП и риском развития атеросклероза у людей. Но эта теория, при всей её логичности, не объясняет многих аспектов развития атеросклероза. В частности, не объясняет очаговость атеросклеротических поражений сосудов и возрастного характера заболевания [Карагодин В.П. и др., 2014]. Поэтому, в настоящее время развитие получили теория атеросклероза, как воспалительного процесса, и теория повреждения эндотелия.

В настоящее время АС рассматривают как иммунное воспаление в интимае сосудов, связанное с «патологической» активацией врожденного и приобретенного иммунитета, и характеризующееся отложением липидов, лейкоцитарной инфильтрацией и пролиферацией сосудистых гладкомышечных клеток. Воспаление играет фундаментальную роль на всех стадиях прогрессирования атеросклеротического процесса и определяет развитие сердечно-сосудистых поражений и летальности [Карагодин В.П. и др., 2014; Насонов Е.Л. и др., 2018]. Хотя воспалительный процесс не обязательно является «первичным» механизмом развития атеросклероза, но имеет решающее значение

в реализации «атерогенных» эффектов классических сердечно-сосудистых факторов риска. Молекулярные механизмы, определяющие роль сердечно-сосудистых факторов риска в формировании «воспалительного компонента» патогенеза АС, до последнего времени вызывают множество вопросов, несмотря на многочисленные исследования, посвященные этой теме [Карагодин В.П. и др., 2014]. Важнейший аспект этой проблемы связан с механизмами, определяющими причины формирования атеросклеротического повреждения стенки сосудов [Карагодин В.П. и др., 2014; Насонов Е.Л. и др., 2018]. Липидная гипотеза гласит, что нативные ЛПНП проникают в интиму сосудов путем активного трансцитоза и сохраняются там. Улавливаться в интиме сосудов они могут за счет взаимодействия протеогликанов внеклеточного матрикса эндотелия и белка АРО В-100, который является основным белком ЛПНП и обладает сродством к протеогликанам [Zhang X. et al, 2018]. Моноциты в норме подходят к стенке сосуда и прилипают к ним за счет молекул клеточной адгезии (VCAM) [Карагодин В.П. и др., 2014; Lusis A. J. et al., 2000]. Затем они, дифференцируясь в макрофаги, проникают через эндотелий сосудов в ткани, становясь резидентными макрофагами. Корреляция отложения липидов в интиме артерий и проникновения макрофагов в стенку сосуда была многократно показана на экспериментальных моделях *in vitro* и при исследованиях у людей [Аймагамбетова А.О. и др., 2016; Lusis A. J. et al., 2000]. В норме макрофаги захватывают нативные ЛПНП через LDLR, для экспрессии которого существует механизм отрицательной обратной связи с поглощением ЛПНП [Goldstein J.L. et al., 1979;]. Этот механизм основывается на факторах транскрипции SREBP1,2 [Goldstein J.L. et al., 2009]. Регуляция через SREBP1,2 важна как механизм действия гиполипидемических препаратов, в частности статинов [Goldstein J.L. et al., 2009; Hopkins P.N. et al., 2013]. Поэтому в норме макрофаги не поглощают ЛПНП избыточно. Но, если ЛПНП частица подвергается модификации, в первую очередь окислению (что и было показано для атеросклеротического поражения), то окисленные ЛПНП начинают захватываться не через рецептор LDLR, а через скэвенджер рецепторы (SR-A, SR-B1,2, CD36, LOX1), для которых не существует механизмов

отрицательной обратной связи [Карагодин В.П. и др., 2014; Lusis A. J. et al., 2000; Hopkins P.N. et al., 2013]. Это приводит к тому, что макрофаги, реагируя на окисленные ЛПНП (oxLDL) как на патоген, начинают поглощать их в избыточном количестве и превращаются в клетки, перегруженные эфирами ХС – пенистые клетки. Поскольку свободный ХС токсичен, при поглощении макрофагом ХС ЛПНП этерифицируется и запасается в виде эфиров ХС. Пенистые клетки скапливаются в интиме сосудов. При этом макрофаги начинают выделять активные радикалы, провоспалительные цитокины, хемокины, модифицирующие (главным образом окисляющие) другие нативные ЛПНП и превращающие их в окисленные ЛПНП. Это приводит к еще более активной инфильтрации макрофагов в интиму сосудов, еще большему развитию процессов иммунного воспаления и ещё большим поглощением макрофагами новых oxLDL с превращением их в пенистые клетки. Совокупность этих процессов и приводит к первому этапу формирования атеросклеротической бляшки [Карагодин В.П. и др., 2014; Аймагамбетова А.О. и др., 2016; Lusis A. J. et al., 2000]. Первичное окисление ЛПНП, вызывающее всю цепь событий, может быть результатом иммунного ответа на инфекции, что может происходить и в русле сосуда, с последующим проникновением окисленных ЛПНП в интиму сосуда [Карагодин В.П. и др., 2014; Hopkins P.N. et al., 2013].

Также одна из гипотез связана с повреждением эндотелия сосудов. При повреждении сосуда в результате инфекции и иммунного ответа на инфекцию, либо механических повреждений из-за столкновения турбулентных потоков в месте его изгиба сосуда, происходит выделение факторов роста и цитокинов из моноцитов. Это приводит к разрушению эластина и коллагена и, миграции гладкомышечных клеток в интиму сосудов. Вследствие этого, согласно данной гипотезе, развивается адгезия тромбоцитов к субэпителиальному слою, и начало иммунного ответа с участием лимфоцитов, тромбоцитов и моноцитов. Следствием этих процессов является массовое окисление нативных ЛПНП свободными радикалами, которые выделяются макрофагами [Карагодин В.П. и др., 2014; Lusis A. J. et al., 2000]. После этого происходит усиленное поглощение

макрофагами окисленных ЛПНП с превращением макрофагов в пенистые клетки [Карагодин В.П. и др., 2014; Аймагамбетова А.О. и др., 2016; Lusis A. J. et al., 2000].

Атеросклеротические поражения могут коррелировать с развитием других заболеваний и взаимно повышать риск развития друг друга. Например, у многих больных при ревматоидном артрите уровни ХС и ХС ЛПНП ниже, чем в популяции, и негативно коррелируют с активностью воспаления [Насонов Е.Л. и др., 2018]. Эти факты свидетельствуют о существовании «воспалительного» субтипа атеросклеротического поражения сосудов и соответствует концепции о «резидуальном воспалительном риске» (residual inflammatory risk) в общей популяции пациентов с атеросклеротическим поражением сосудов, имеющих (на фоне лечения статинами) нормальный уровень ХС ЛПНП [Насонов Е.Л. и др., 2018].

#### 1.1.4. Липидный обмен, липопротеины, аполипопротеины.

Липопротеины подразделяются по соотношению липидов к белкам, по плотности и осаждению при центрифугировании на хиломикроны, липопротеиды очень низкой плотности (ЛПОНП), липопротеины низкой плотности (ЛПНП), липопротеиды промежуточной плотности (ЛППП), и липопротеиды высокой плотности (ЛПВП) [Reynolds K.R. et al., 2021]. Ярким выраженным атерогенным эффектом обладают ЛПНП и ЛПОНП, в то время как ЛПВП демонстрируют антиатерогенные свойства [Lusis A. J. et al., 2000; Thompson G.R. et al., 2004].

Каждая группа липопротеинов очень неоднородна по размерам частиц, а также, по содержанию апопротеинов и липидов. Апопротеины – белки-переносчики, являющиеся белковым структурным компонентом (каркасом) липопротеинов, с которым связываются переносимые липиды. В результате образуется частица с гидрофобным ядром и гидрофильной наружной частью из белков, фосфолипидов и свободного ХС (гидродильные головки фосфолипидов и свободного ХС при этом образуют наружную поверхность, гидрофобные хвостики обращены к ядру). Соответственно, функцией апопротеинов, входящих в состав липопротеинов, является повышение растворимости (в плазме крови)

эфиров холестерина, триглицеридов и фосфолипидов, регуляция и кооперация взаимодействия липидов с ферментами (в процессе биохимических реакций) и связь с рецепторами при транспорте липидов в клетки тканей [Reynolds K.R. et al., 2021]. Холестерин переносится различными липопротеинами. В отличие от ХС, эндогенные триглицериды транспортируются преимущественно в составе ЛПОНП [Reynolds K.R. et al., 2021].

Внутриклеточный и тканевой метаболизм липопротеинов разных классов можно представить следующим образом. Хиломикроны, которые образуются в тонкой кишке из липидов пищи, поступают через лимфу в плазму крови. Под действием ферментов плазмы крови, прежде всего липопротеинлипазы (ЛПЛ) хиломикроны распадаются на более мелкие комплексы (ремнанты), которые и захватываются клетками печени – гепатоцитами. Хиломикроны состоят из основного белка АРОВ, форма АРОВ48, и липидов (триглицеридов и ХС). Поскольку хиломикроны обладают наибольшим соотношением липидной составляющей к белковой составляющей, они обладают наименьшей плотностью среди липопротеидных частиц [Reynolds K.R. et al., 2021]. ЛПОНП состоят из основного белка АРОВ-100, других апобелков, холестерина, а также триглицеридов. ЛПОНП синтезируются в печени из захваченных ремнантов хиломикронов. Циркулирующие в плазме липопротеины промежуточной плотности (ЛППП) и ЛПОНП утилизируются клетками различных тканей, в которых подвергаются действию фермента липопротеинлипазы (ЛПЛ). При этом происходит отщепление части триглицеридов от ЛПОНП, в результате чего получают ЛППП [Reynolds K.R. et al., 2021]. Частицы ЛПОНП и ЛППП подвергаются разложению в различных тканях с полным отщеплением триглицеридов от липопротеидных частиц и превращением их в ЛПНП, которые также утилизируются клетками различных тканей [Reynolds K.R. et al., 2021]. ЛПНП состоят в основном из белка АРОВ, аллельная форма АРОВ-100, и ХС.

ЛПВП формируются в клетках печени из холестерина и, в большей части, фосфолипидов. Частицы ЛПВП устроены сложнее, чем ЛПНП и ЛПОНП. ЛПВП образуются из нескольких белковых молекул – малых аполипопротеинов

(АПОА1,2,4,5, АпоЕ, АпоС1,2,3,4), которые образуют сложный комплекс с фосфолипидами. К ядру из малых аполипопротеинов и фосфолипидов, в свою очередь, присоединяются холестерин и его производные. Малые аполипопротеины также называются обменными, так как они способны становиться частью ЛПНП и ЛПОНП и переносить ХС с ЛПНП и ЛПОНП на ЛПВП. Малые аполипопротеины осуществляют обратный транспорт липидов из русла крови в печень через взаимодействие с АТФ-связывающим кассетными белками ABCA1 и ABCB1 [Reynolds K.R. et al., 2021; Su X. et al, 2020]. ЛПВП обладают антиатерогенными свойствами, в частности было показано, что ЛПВП могут частично выводить ХС из oxLDL в интима сосудов [Reynolds K.R. et al., 2021; Hopkins P.N. et al., 2013]

#### 1.1.5.Интерлейкины.

Интерлейкин ИЛ-1 играет важную роль в развитии многих иммуновоспалительных заболеваний. Он является медиатором воспаления, связанного с активацией врожденного иммунитета, и усиливает провоспалительную активность ИЛ-6, хемокинов, а также усиливает экспрессию молекул адгезии в эндотелиальных клетках. Именно это является важным фактором для развития атеросклероза [Насонов Е.Л. и др., 2018]. Рассматривая молекулярные механизмы развития воспаления как проатерогенные, необходимо отметить данные о способности кристаллов ХС (возникающих при распаде пенистых клеток), повышать экспрессию ИЛ-1, запускающего усиление клеточной адгезии и процессов воспаления [Аймагамбетова А.О. и др., 2016; Насонов Е.Л. и др., 2018]. Одним из важных механизмов, проатерогенного действия ИЛ-1 является активация интерлейкина ИЛ-6. ИЛ-6 – плеiotропный цитокин, регулирующий острую фазу иммунного ответа, переключение механизмов врожденного и приобретенного иммунитета. Связь ИЛ-6 с атерогенными процессами обусловлена активацией негликозилированного циркулирующих белков пентраксина и С-реактивного белка (СРБ), что коррелирует с атеросклеротическим поражением сосудов у пациентов

[Аймагамбетова А.О. и др., 2016; Насонов Е.Л. и др., 2018]. Данные, полученные в эпидемиологических исследованиях подтверждают важность увеличения продукции ИЛ-6 для развития атеросклероза и, как следствие, для прогнозирования развития сердечно-сосудистых заболеваний. Высокий уровень экспрессии ИЛ-6 больше коррелирует со стенокардией, чем высокий уровень СРБ [Аймагамбетова А.О. и др., 2016; Насонов Е.Л. и др., 2018].

## 1.2 Гены, связанные с липидным обменом.

Генетические дефекты ключевых ферментов липидного обмена и рецепторов к ЛП, белков, являются важными факторами развития атеросклероза [Торшин И. Ю. et. al., 2008].

Рассматривая вопрос об увеличении уровня ЛПВП и генов, на экспрессию которых могут непосредственно или опосредованно влиять гиполипидемические и антисклеротические препараты, необходимо выделить следующие мишени: гены аполипопротеина А1 (*АПОА1*), аполипопротеина Е (*АПОЕ*) и аполипопротеина С2 (*АПОС2*), скэвенджер рецептора В1 (*SR-B1*).

### 1.2.1. Гены аполипопротеинов.

Малые аполипопротеины разделяются на собственно малые или обменные аполипопротеины (*АПОА1*, *АРОА2*, *АРОА4*, *АРОА5*, *АРОЕ*, *АРОС1*, *АРОС2*, *АРОС3*) и липокалины (*АРОL*, *АРОМ*). Они являются разными семействами белков и различаются по структуре [Wen-Hsiung L. et.al., 1988]. Все обменные аполипопротеины структурно состоят из 11-аминокислотных амфипатных повторов, образующих во вторичной структуре  $\alpha$ -спирали. Часть белка состоит из 22-аминокислотных остатков, состоящих из двух 11-аминокислотных сегментов [Wen-Hsiung L. et.al., 1988]. 22-аминокислотный домен, состоящий из них, начинается с пролина. 22-аминокислотные домены являются базовой структурой для липид-связывающих доменов - амфипатных  $\alpha$ -спиралей. Ряд работ по структуре и функциям аполипопротеинов отмечают четкую привязанность структуры аполипопротеинов к вариациям их основных или дополнительных функций.

К аполипопротеинам относится главный белок ЛПВП аполипопротеин А1 (АПОА1) [Gibson С.М., 2016]. Известно, что АПОА1 - переносчик липидов в русле крови, являющийся основным аполипопротеином (апо-ЛП), формирующим ЛПВП. АПОА1 связывается с рецепторами на гепатоцитах и увеличивает обратный транспорт ХС в печень [Mahley, R. W. et. al., 1984]. При двойной делеции генов *АПОА1* и *АпоЕ* у мышей существенно повышается уровень образования атеросклеротических бляшек и соотношение ЛПОНП/ЛПНП в плазме крови. При этом нокауты по *apoE* показывают значительное увеличение атеросклеротических бляшек, и при этом показывают более высокое соотношение ЛПОНП/ЛПНП по сравнению с диким типом. Нокауты по *АПОА1* при этом не показывают высокий уровень атеросклеротических бляшек, но показывают более высокое соотношение ЛПОНП/ЛПНП по сравнению с диким типом [Fitz N. F. et. al., 2015]. Мыши с нокаутом по АПОА1 не проявляют признаков атерогенеза за счет того, что функции АПОА1 компенсируют действие АпоЕ. Также при нокауте по АпоЕ у мышей потеря его антиатеросклеротических функций компенсируется другими молекулярными механизмами [Collins R.G. et. al., 2000]. Двойные нокауты демонстрируют развитие атеросклероза в острой форме и полное нарушение липидного обмена, как было сказано выше. Также у мышей с двойным нокаутом по АПОА1/АпоЕ наблюдается нарушение очищения  $\beta$ -амилоидов [Fitz N. F. et. al., 2015, Shih D.M. et. al., 2000; Knowles J.W. et. al. ,2000; Gupta S. et. al., 1997]. Белок АпоЕ также активно влияет на белки синапсов, что делает АпоЕ фактором при развитии болезни Альцгеймера [Fitz N. F. et. al., 2015].

АПОА1 также связан с антиоксидантными и противовоспалительными процессами за счет участия в механизме ингибирования гена *PON3* [Tomas M. et. al., 2004]. Влияние АПОА1 на воспаление осуществляется через ингибирование продукции IL-1 и TNF $\alpha$  [Burger D. et. al., 2002, ShavvaV. S. et.al, 2017]. Показано, что повышение экспрессии гена *АПОА1* в печени связано со снижением риска развития АС, что может быть обусловлено повышением уровня ЛПВП и снижением уровня холестерина в крови [Mahley R. W. et. al, 1984]. Отдельные исследования, посвященные свойствам АПОА1, как отдельно, так и в составе

ЛПВП, показали, что АПОА1 обладает протективными свойствами, способствующими защите от развития атеросклероза [Srivastava R.A. et. al, 2009]. Так, показано, что мутации по АПОА1 ведут к нарушению липидного обмена [Lopez-Miranda J. et al., 1994]. Исключение составляет так называемая «Миланская мутация», которая заключается в замене Arg на Cys (173 позиция). Люди с «Миланской мутацией» не демонстрируют никаких нарушений в липидном обмене. Единственное отличие – это пониженный уровень ЛПВП. В данном случае это свидетельствует о более эффективном поглощении липидов из тканей с мутантным АПОА1, чем с диким типом АПОА1. Здесь важно указать, что повышение уровня ЛПВП является антиатерогенным признаком только до определенного уровня и в сочетании с другими показателями. Так, если снижается уровень триглицеридов и хиломикрон, то повышение уровня ЛПВП вместе с понижением уровня триглицеридов говорит о снижении атерогенности. Но многократно повышенный уровень ЛПВП свидетельствует, скорее, о слабом транспорте липидов из ЛПВП-частиц и о снижении интенсивности процессов их метаболизма. Таким образом, повышение уровня ЛПВП является значимым при одновременной большей активности усвоения и метаболизма липидов. Далее, работы по введению эндогенного АПОА1 в плазму крови показали, что курсовое введение эндогенного белка АПОА1 снижает показатели атерогенности и способствует регрессии холестериновых бляшек у больных атеросклерозом [Srivastava R.A. et. al, 2009]. Важно отметить, что и экспрессия *АПОА1* человека и экспрессия *АПОА1* грызунов уменьшаются с возрастом [Томас М. et. al, 2004]. При анализе мРНК *АПОА1* в печени мышей и крыс было установлено ее уменьшение, прогрессирующее с возрастом животного. Подобная тенденция наблюдается и для человека – у больных атеросклерозом показана обратная линейная зависимость количества мРНК *АПОА1* в печени от возраста. Это коррелирует с увеличением риска развития атеросклероза с возрастом [Томас М. et. al, 2004; Cohen J.C. et. al., 1994]. Также в экспериментах по искусственному получению дислипидемии у крыс у старых крыс эффект воздействия атерогенных факторов оказывается выше, чем у более молодых особей.

Ген, кодирующий белок АПОА1 расположен на 11 хромосоме в одном кластере с генами *ApoA4*, *ApoA5* и *ApoC3*. Экспрессия гена *АПОА-1* регулируется его 5'-регуляторной областью и общим кластерным энхансером, расположенным в 5'-регуляторном районе гена *apoC-III*. Тканеспецифическая транскрипция в эпителии тонкого кишечника в основном контролируется общим кластерным энхансером. Экспрессия гена *АПОА1* в клетках печени регулируется гепацитарным энхансером. Гепатоцитарный энхансер состоит из трех основных сайтов: А (-214...-192), В (-169...-146) и С (-134...-119). Сайты А и С содержат цис-элементы, специфически взаимодействующие с ядерными рецепторами (HNF4 $\alpha$ , PPAR $\alpha$ , LXR-1). Они активируют транскрипцию гена *АПОА1* в гепатоцитах. LXR, FXR и PPAR $\gamma$  угнетают промотор гена *АПОА-1*. Сайт В содержит последовательности, специфически связывающиеся с факторами транскрипции семейства Forkhead – FOXA1-3 и FOXO1. Существует альтернативный промотор *АПОА1*. мРНК *АПОА1*, синтезируемые с альтернативных промоторов, содержат дополнительный 5'-концевой участок [Могиленко и др., 2019].

Регуляция экспрессии *АПОА1* осуществляется за счет нескольких механизмов. Так, одним из регуляторов экспрессии *АПОА1* является транскрипционный фактор PPAR- $\alpha$ . В результате активации гена, кодирующего PPAR- $\alpha$  происходит увеличение экспрессии гена *АПОА1* и синтеза препропротеина АПОА1 из-за наличия в гепацитарном энхансере гена *АПОА1* специфического сайта, с которым взаимодействует PPARalpha [ShavvaV. S. et.al, 2017; ShavvaV. S. et.al, 2018]. В частности, это лежит в основе действие препаратов группы фибратов у человека [Burri L. et. al., 2010; Debin L. et. al., 2005, Хорольская В.Г.и др., 2019]. Регуляторами экспрессии гена *АПОА1* также являются транскрипционные факторы группы X рецепторов печени LXRalpha и LXRbeta. LXR, FXR и PPAR $\gamma$  угнетают промотор гена *apoA-I* и его экспрессию в гепатоцитах. Для макрофагов и моноцитов было показано как взаимодействие LXRalpha и LXRbeta с гепацитарным энхансером, так и повышение уровня мРНК гена *АПОА1* при обработке культур макрофагов и моноцитов агонистами

LXRalpha и LXRbeta [Shavva V. S. et.al, 2018]. Было показано, что LXR рецепторы в макрофагах повышают уровень экспрессии гена *АПОА1* и уровень ЛПВП независимо от экспрессии ABCA-1 [Shavva V. S. et.al, 2018; Kannisto K. et al., 2014]. При этом повышение уровня ЛПВП и экспрессии гена *АПОА1*, стимулируемые LXR, коррелируют с понижением уровня экспрессии *SR-B1* [Kannisto K. et al., 2014]. Также регуляция экспрессии гена *АПОА1* происходит за счет ядерного рецептора PPARgamma. Его активация приводит к снижению и уровня мРНК *АПОА1* и синтеза АПОА1, а также к повышению уровня LXRalpha и LXRbeta, что снижает уровень PPARalpha. Таким образом, PPARgamma является антагонистом экспрессии *АПОА1* [Shavva V. S. et.al, 2017]. Также нужно отметить, что регуляция экспрессии гомологов *АПОА1* у человека и грызунов различаются. В частности, это связано с делецией сайта связывания с PPAR $\alpha$  в гепатоцитарном энхансере генов *АПОА1* грызунов. Если, как было описано выше, в организме человека регуляция экспрессии *АПОА1* происходит за счет механизма влияния PPAR $\alpha$  на этот специфический сайт в энхансере *АПОА1*, то у грызунов этот сайт делетирован [Shavva V. S. et.al, 2018]. Также регуляция уровня АПОА1 в плазме крови осуществляется через микроРНК – miR-33. При подавлении экспрессии miR-33 в печени наблюдается увеличение АПОА1 в плазме крови, а также общее увеличение концентрации ЛПВП в плазме крови. Также у самого белка АПОА1 есть жесткая посттрансляционная регуляция. АПОА1 транслируется в виде препро-АПОА1 размерами 267 а.к., в ходе секреции от подвергается протеолизу, превращаясь в зрелый АПОА1 (243 а.к.). В клетках печени мРНК АПОА1 находится длительное время. При этом транслированный прото-АПОА1 находится в печени ограниченное время. Если АПОА1 не проходит модификацию в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР), он подвергается лизису. При этом в шероховатом ЭПР происходит расщепление препро-АПОА1, не секретированного в плазму крови за счет механизма аутофагии [Georgila K. et al., 2020]. Таким образом происходит регуляция количества АПОА1 в плазме крови не только на уровне мРНК, но и на уровне секреции белка. Из этого можно предположить, что динамика экспрессии *АПОА1*

на уровне мРНК и экспрессии самого белка АПОА1 связаны нелинейно [Xia Z. et al., 2001].

Аполипопротеин Е также является одним из липопротеинов ЛПВП, формирующим собственный тип ЛПВП. АПОЕ является и компонентом ЛПНП, он обеспечивает поглощение холестерина через АпоВ,Е - рецепторы, способствует поглощению ЛПОНП печенью, активирует ЛПЛ и лицетинхолинацилтрансферазу (ЛХАТ) [Yujiao S. et al., 2020, Титова Г.В. et al., 1980], участвует в формировании богатых эфирами холестерина ЛПНП и перераспределении липидов в тканях [Yujiao S. et al., 2020, Титова Г.В. et al., 1980]. Ген, кодирующий белок АПОЕ, расположен на 19 хромосоме. Его размер составляет 3.700 пар нуклеотидов. Ген содержит четыре экзона (области гена, кодирующие синтез белка). Ген *АПОЕ* расположен вместе с генами *АРОС-I* и *АРОС-II*, а также с геном рецептора ЛПНП [Bolanos-Garcia, V. M. et al., 2003; Davignon, J. et al., 1988]. Три аллеля -  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  и  $\epsilon 4$  наследуются кодоминантно. Генетический полиморфизм АПОЕ связан с рисками возникновения гиперлипипропротеинемии и развития атеросклероза [Yujiao S. et al., 2020, Desumont C. et al., 2000]. Вследствие существования трех различных аллелей, белок апо Е представлен несколькими изоформами. Наиболее распространенные аллельные варианты: апо Е2 (Cys112, Cys158); апо Е3 (Cys112, Arg158) и апо Е4 (Arg112, Arg158) и формируемые ими генотипы: три гомозиготных ( $\epsilon 4/\epsilon 4$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 2$ ) и три гетерозиготных ( $\epsilon 3/\epsilon 4$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 4$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 3$ ). Промоторная область гена АПОЕ обладает полиморфизмом (-491 А/Т), за счет которого может повышаться или понижаться риск развития нейродегенеративных заболеваний и инфаркта миокарда. Частота аллелей гена АПОЕ различается в популяциях. В человеческой популяции наиболее распространен аллель  $\epsilon 3$ , его частота составляет от 0,60 до 0,88. Частота аллеля  $\epsilon 2$  подвержена значительным колебаниям, его относительная частота 0,02 - 0,14 в некоторых популяциях. Аллель  $\epsilon 4$  также обладает вариабельной частотой, он может встречаться как редко (0,06), так и весьма часто (0,23) в популяциях различных народов в разных регионах. В отношении

полиморфизма гена АПОЕ –491А/Т также существуют различия в частотах аллелей между популяциями.

Как было сказано ранее, АпоЕ дублирует функции АПОА1, при этом АпоЕ связан с транспортом липопротеинов в яйцеклетки и в жировую ткань. Что касается других апо-ЛП, то АпоС2 является одним из апо-ЛП в ЛПОНП, ЛПНП, и ЛПВП. Его функция – связывания липидов на поверхности ЛПНП и ЛПВП частиц [Wolska A. et al.,2017]. Его роль заключается также в регуляции активности ЛПЛ [Cohen J.C. et. al., 1994; Wittrup Н.Н. et. al., 2006, Wolska A. et al.,2017]. В этом плане, по функциям и механизму, АПОС2 является кофактором ЛПЛ. Важность гена *APOC2* для активации фермента ЛПЛ показана на примере пациентов с генетическими дефектами в экспрессии *ApoC2* или продукции белка АпоС2. Для таких пациентов показаны повышенные уровни триглицеридов в плазме крови [Wittrup Н.Н. et. al., 2006]. Пациенты с дефектами экспрессии *APOC2* фенотипически не отличаются от пациентов с недостаточной активностью липопротеинлипазы. Нарушения могут приводить и к альтернативному сплайсингу мРНК *ApoC2*, приводящей к низкому уровню белка АпоС2 в плазме крови, и к возникновению поврежденной формы АпоС2, которая быстро выводится из циркуляции [Wolska A. et al.,2017]. Белок АПОС2 экспрессируется в основном в печени, но также он экспрессируется в энтероцитах, макрофагах и других клетках [Gabriel D. et al.,2020]. Мутации АпоС2 с уменьшением экспрессии и итогового уровня белка в плазме крови были обнаружены у женщин, больных панкреатитом в хронической и тяжелой форме [Gabriel D. et al.,2020]. Недостаток АпоС2 приводит к симптому хиломикронемии. Белки АПОС1 и АПОС2 ингибируют АПОЕ – зависимый путь связывания ЛПОНП клетками печени. Это показано и на культуре гепатоцитов человека и на изолированных клетках печени крысы. АпоС2 распределяется между липопротеинами в зависимости от их липидного наполнения и поверхностного натяжения [Gabriel D. et al.,2020]. При увеличении концентрации липидов у поверхности липопротеидной частицы увеличивается и липид-связывающая активность АпоС2 за счет выхода большего числа липид-связывающих доменов на поверхность

липопротеиновой частицы. Также следует отметить, что увеличение фракции диацилглицерола также активирует АпоС2, что приводит и к активации липопротеинлипазы.

Основным белком липопротеинов низкой плотности ЛПНП является АпоВ. Апо В отличается наличием высокой степени  $\beta$ -складчатости (установлено по первичной структуре белка) [Wen-Hsiung L. et al, 1988, Babin P. J. et al, 1999]. В настоящее время, путем сравнительного анализа аминокислотных последовательностей, а также вторичной и третичной структуры белков, установлено, что АПОВ гомологичен аполипофоринам насекомых *ApoLpI*, *ApoLpII* [Smith A. F. et al, 1994, Bolanos-Garcia V. M. et al, 2003, Babin P. J. et al, 1999, Rodenburg K. W. et al, 2005]. Экспрессия АпоВ находится на постоянном уровне, но сама секреция ЛПНП-частиц, в составе которых и находится АпоВ, регулируется за счет экспрессии белков модификаторов и транспортеров. Одна из главных ролей в секреции ЛПНП-частиц принадлежит микросомальному белку-переносчику триглицеридов (МТТР). Он осуществляет посадку триглицеридов на частицы ЛПНП при их сборке. За счет регуляции экспрессии гена *MTTP* осуществляется регуляция секреции ЛПНП, и, соответственно, АпоВ [Zysk C. et al., 2020; Reynolds K.R. et al., 2021]. Также транспорт белка АпоВ из клетки регулируется за счет гена протеин дисульфид изомеразы (PDIA2). Это многофункциональный белок, играющий роль в посттрансляционной модификации секретируемых белков. Он осуществляет транспорт АпоВ с присоединенными к нему липидами из внутриклеточного компартмента на наружную мембрану клетки. Таким образом, одним из механизмов регуляции количества АпоВ и ЛПНП в плазме крови является регуляция экспрессии PDIA2, как на уровне синтеза и посттрансляционной модификации белка, так и на уровне модуляции синтеза мРНК. [Wen-Hsiung L. et al, 1988, Babin P. J. et al, 1999, Zysk C. et al., 2020].

### 1.2.2. Гены скэвенджер рецепторов.

Скэвэнджер рецептор В, один из белков семейства скэвэнджер рецепторов, и наряду с другими скэвэнджер рецепторами (скэвэнджер рецептором А – SR-A; скэвэнджер рецептором Е – SR-E или LOX1; скэвэнджер рецептором CD36) участвует в липидном обмене и связывании липидных частиц макрофагами. Установлено, что рецептор SR-B1 селективно осуществляет транспорт холестерина из ЛПВП в гепатоциты. Это определяет важную роль рецептора SR-B1 (ген *Scarb1* в геноме крысы) в метаболизме липидов, связанном с атерогенезом [Febbraio M. et al, 2000; Rhainds D. et al, 2004; Traugher C. A. et al, 2020]. Лигандами для SR-B1 являются как нативные, так и химически модифицированные липиды. SR-B1 способен связывать липопротеины всех типов – ЛПОНП, ЛПНП, ЛПВП. Также SR-B1 связывает окисленные ЛПНП и ацетилированные ЛПНП, восстановленные липопротеидные частицы, содержащие АПОА1, АПОА2 и АПОС3, белки АПОА1 и АпоА2, связанные с липидами, и свободный от липидов АПОЕ, что было показано экспериментально [Sam L. et al, 2010, Wen- Jun S. et al, 2018]. При этом наибольшее сродство SR-B1 показывает именно к ЛПВП. Более того, сродство к очищенному АПОА1 оказалось еще выше, чем к нативным ЛПВП [Sam L. et al, 2010]. Белок SR-B1 широко экспрессируется в различных тканях. Это было показано и на грызунах и на культурах тканей человека. При этом наибольший уровень экспрессии наблюдается в адипоцитах, гепатоцитах, надпочечниках, семенниках и яичниках [Rhainds, D. et al, 2004]. В предыдущих исследованиях показано, что при кормлении крыс кормом с повышенным содержанием холестерина уже после двух недель кормления уровень SR-B1 в паренхимальных клетках печени снижается. Белок-рецептор SR-B1 также участвует в поглощении гепатоцитами окисленных ЛПНП и окисленных ЛПВП, и в фагоцитозе микобактерий и ряда других патогенов макрофагами, препятствует формированию провоспалительного фенотипа у макрофагов, обработанных липополисахаридом грамотрицательных бактерий (LPS), и снижает выраженность системного воспалительного ответа [Гусев Е.Ю. и др., 2020].

Регуляция экспрессии гена *SR-B1* происходит по нескольким путям.

Первый путь осуществляется с помощью регуляторного белка *sterol regulator element-binding protein* – SREBP-1. В 5'-нетранслируемой области человеческого *SR-B1* существуют сайты связывания для SREBP-1. Регуляторный белок SREBP-1 вызывает повышение экспрессии *SR-B1* в клетках печени. Также два сайта связывания для SREBP-1 показаны для 5'-нетранслируемой области гомолога *SR-B1* (*scarb1*) крыс.

Второй путь: в промоторе человеческого *SR-B1* присутствуют сайты связывания с транскрипционными факторами LXR $\alpha$  и LXR $\beta$ , которые взаимодействуют напрямую с LXR $\alpha$  и LXR $\beta$ , что индуцирует экспрессию *SR-B1* в клетках печени. Сайты связывания для LXR $\alpha$  и LXR $\beta$  также присутствуют и в промоторе гомологов *SR-B1* (*scarb1*) грызунов. Для клеток гепатомы мыши была показана активация *SR-B1* с помощью LXR $\alpha$ . Также активация экспрессии *SR-B1* человека с помощью LXR $\alpha$  показана для культуры человеческих клеток гепатомы HepG2 [DiMarco D. M. et al, 2015]. Для промотора *scarb1* крыс также характерно наличие четырех эстрогеновых сайтов (ERE) [Wen- Jun S. et al, 2018]. Надо отметить и регуляцию экспрессии *SR-B1* посредством белка LHR-1, который связывается со специфическим сайтом на промоторе гена *SR-B1*, осуществляя его активацию. Эта активация происходит независимо от экспрессии LXR $\alpha$  и в LXR $\beta$ , и может быть подавлена взаимодействием с сайтом связывания LHR-1 белка NR0B2 [Wen- Jun S. et al., 2018].

У людей также существует альтернативный сплайсинг *SR-B1* за счет 2 и 3 экзонов. При этом возникает укороченный SR-B1 с более коротким внеклеточным доменом. Функция этого короткого мембранного белка неизвестна. У мышей, крыс, коров и людей 12 экзон также может удаляться при альтернативном сплайсинге, образуя альтернативный рецептор SR-B2. Матричная РНК SR-B2 составляет 22% общей мРНК SR-B1 и SR-B2 в гепатоцитах человека (HepG2), 33% в клетках клеток макрофагов человека (THP-1); у мышей: 30% в клетках надпочечников, 40% в клетках печени. По профилю экспрессии и характеру альтернативного сплайсинга *SR-B1* схож с геном *CD36*. Для *SR-B1* и *АПОА1* показана корегуляция [Wen- Jun S. et al, 2018].

*SR-B1* регулируется посредством микроРНК miR-96, miR-185 и miR-223. miR-96, miR-185 и miR-223 подавляют экспрессию *SR-B1 in vitro* и посредством этого регулирует захват холестерина и гепатоцитами и макрофагами. Ген *SR-B1* содержит сайт связывания miR-223, который консервативен у всех позвоночных, но отсутствует у мышей. У людей miR-223 репрессирует экспрессию *SR-B1*. Кроме того, miR-223 влияет и на уровень самого белка *SR-B1* и у людей и у мышей.

Ключевым рецептором для oxLDL на эндотелиоцитах и сосудистых миоцитах является рецептор окисленных липопротеидов низкой плотности LOX-1 (SR-E1). Высокая концентрация oxLDL, а также некоторых цитокинов (TNF $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) провоцирует повышенную экспрессию LOX-1 на поверхности этих клеток [Kattoor, A. J. et. Al, 2019]. LOX-1 запускает генерацию ROS за счет активации NADPH-зависимых оксидаз с последующей стимуляцией редокс-зависимых белков, таких как MAPK (p38, JNK) и NF- $\kappa$ B, а также способствует биосинтезу многих белков, участвующих в атерогенезе [Kattoor, A. J. et. Al, 2019]. Кроме того, взаимодействие LOX-1 с oxLDL может запустить в клетках процесс апоптоза и повреждение эндотелиальной выстилки. LOX-1 способствует нарушению барьерной функции эндотелия и проникновению oxLDL и моноцитов (предшественников пенистых клеток) в интиму магистральных артерий [Kattoor, A. J. et. Al, 2019]. Также было обнаружено, что мыши с отсутствием экспрессии LOX-1 имели лучшую выживаемость в модели сепсиса (лигирование и пункция слепой кишки). У этих мышей были снижены показатели системного воспалительного ответа (например, TNF $\alpha$ ) в сыворотке крови и степень повреждения внутренних органов. По крайней мере, отчасти, патологические явления при сепсисе связаны с высоким уровнем в крови oxLDL и повышением экспрессии LOX-1 [Гусев Е.Ю. и др., 2020]. Это свидетельствует о взаимосвязи LOX-1, захвата окисленных ЛПНП макрофагами и превращении макрофагов в пенистые клетки. Роль захвата окисленных ЛПНП макрофагами, как и роль пенистых клеток в атерогенезе, дискуссионны [Stephen S. L. et. al, 2010; Maiolino G. et. al, 2013]. Но, как минимум, экспрессия LOX-1 коррелирует с изменением

захвата окисленных ЛНП макрофагами и превращением макрофагов в пенистые клетки.

Белок CD36, кодируемый геном *CD36* и его гомологами, является скэвенджер рецептором, высокоспецифичным для нативных ЛПВП, ЛПНП и ЛПОНП. Он близок по структуре и свойствам к SR-B1 [Mineo C. et al, 2020, Febbraio, M. et al, 2000, Schönbeck, U. Et al, 2000]. Экспрессия *CD36* происходит в клетках, связанных с метаболизмом липидов: гепатоцитах, скелетной мускулатуре, сердечной мышце, клетках сосудистого эпителия, клетках стенки матки, адипоцитах. Также *CD36* экспрессируется в макрофагах и связан с трансформацией макрофагов в пенистые клетки. Показано, что моноциты, дифференцирующиеся в фагоцитирующие макрофаги, экспрессируют рецептор CD36 [Wen- Jun S. et al, 2018, Garbacz, W.G. et al, 2016, Leeuwena E. M. et al, 2018]. Таким образом, CD36 является фактором фагоцитоза и трансформации моноцитов в активные макрофаги. Это играет важную роль при захвате липопротеидных частиц макрофагами. При том, что CD36 функционирует, как рецептор, захватывающий ЛПВП, ЛПНП и ЛПОНП, он более активно захватывает окисленные ЛПВП и ацилированные ЛПНП. При этом возрастает сродство CD36 к липопротеиновым частицам. В экспериментах *in vitro* было показано сродство CD36 к нативным ЛПВП, ЛПНП и ЛПОНП [Leeuwena E. M. et al, 2018]. При этом степень сродства была дозо-зависимой. В тех же экспериментах обработка культуры клеток окисленными ЛПВП и ацилированными ЛПНП выявила большее сродство к ним CD36 по сравнению с, соответственно, нативными ЛПВП и ЛПНП. CD36 связан с захватом и метаболизмом длинных жирных кислот в адипоцитах. В экспериментах на крысах показано, что в адипоцитах захват меченых длинных жирных кислот происходит при гибридизации с CD36. При этом в различных отделах кишечника крысы *CD36* экспрессируется на разных уровнях, в зависимости от всасывания длинных жирных кислот. В эксперименте при добавлении жирных кислот в диету подопытных крыс увеличивалась экспрессия *CD36*. В опытах по трансгенезу мышей подопытные животные, трансгенные по *CD36* показывали сверхэкспрессию *CD36* в печени. Это

приводило к таким симптомам как гипогликемия и истощения запасенного в печени гликогена. После стрессирования животных трансгенных по *CD36* уровень триглицеридов у них оказывался выше, чем у дикого типа. Но, через 16 часов после стрессирования уровень триглицеридов у трансгенных по *CD36* мышей оказывался выше, чем у дикого типа. Причем это снижение не было связано со значительным снижением ЛПОНП. Гликоген истощался за более короткое время – 6 часов [Garbacz, W.G. et al, 2016]. Также трансгенные по *CD36* мыши оказались устойчивы к стеатозу печени, вызванному гиперхолестериновой диетой [Garbacz, W.G. et al, 2016]. Одновременно, в других работах было показано снижение уровня липидов в крови у мышей – нокаутов по *CD36*. Для трансгенных по *CD36* мышей характерно увеличение синтеза гликогена. При этом *CD36* подавляет синтез простагландинов. Известно, что простагландины могут стимулировать повышение ЛПОНП. Поэтому, повышение экспрессии *CD36* может оказывать воздействие на снижение ЛПОНП через ингибирование простагландинов [Garbacz, W.G. et al, 2016]. В общем, *CD36* выступает, как регулятор метаболизма гликогена, ускоряющего развитие гипополидемии. Предполагается, что *CD36* выступает своеобразным анализатором наличия жирных кислот в печени. При гиперлипидемии и вызванном ей метаболическом стрессе увеличение экспрессии *CD36* является ответом на стрессирующие факторы [Гусев Е.Ю. и др., 2020]. На основании этих данных можно сделать вывод, что *CD36* важен как регулятор липидного обмена как в печени, так и в клетках крови и стенках сосудов. Повышение его экспрессии можно отнести к антиатерогенным факторам. При этом нужно отметить, что основным антиатерогенным фактором *CD36*, скорее всего, не является. Это демонстрирует отсутствие его влияния на ЛПОНП [Garbacz, W.G. et al, 2016].

### 1.3 Методы исследования эффективности гиполипидемических препаратов.

На сегодняшний день наиболее применяемы в исследовании АС на животных это модели нокаутов у мышей и кроликов. Модели мышинных нокаутов отдельно по АПОЕ или по LDLR, а также нокауты мышей по PCSK9 и двойные

нокауты мышей по АПОЕ/Fbn1 являются широко используемым модельным объектом для изучения наследственных патологий, приводящих к развитию ДЛП. Также применяются мыши, являющиеся двойными нокаутами по АПОЕ и LDLR. Эти модели использовались прежде всего для изучения наследственных ДЛП и базовых молекулярных механизмов, связанных с липидным обменом [Veseli B.E. et al, 2017]. Модели с использованием кроликов стали реже применяться после появления мышиных нокаутов. Несмотря на это, модели с использованием кроликов применяют из-за различия в особенностях регуляции липидного обмена у грызунов и у человека. [Burri L. et al, 2010, Debin L. et al, 2005]. Особенности липидного профиля у кроликов при этом ближе к липидному профилю людей. Поэтому модели с использованием кроликов чаще применяются в исследованиях с применением хронической модели ДЛП.

Для моделирования приобретенной ДЛП и оценки гиполипидемической активности фармакологических препаратов широко применяют острые и хронические модели индуцированной ДЛП. Эти модели применяются не на животных - нокаутах по генам липидного обмена, а на нативных животных. При этом используются как кролики, так и крысы [Хныченко Л.К. et al, 2016; Окуневич И.В. и др., 2019]. Острая модель: однократное внутрибрюшинное введение детергента тритона WR-1339; длительное введение этанола или кормление животных специальной гиперхолестеринемической диетой в течение нескольких недель [Хныченко Л.К. et al, 2016; Окуневич И.В. и др., 2019; Клюева Н.Н. и др., 2020]. Одним из определяющих моментов в развитии тритоновой ДЛП является быстрое и значительное увеличение концентрации липидов, в частности, проатерогенных фракций и субфракций в ЛП в крови опытных животных. Алиментарная или хроническая модель ДЛП, вызванная рационом с избытком пищевого ХС и смеси жиров заключается в кормлении животных специальной гиперхолестеринемической диетой (ГХС диетой) в течение нескольких недель. Использование данной ГХС диеты при разной длительности опыта (от 2-х до 4-х недель) позволяет создать отличающийся по степени выраженности дисбаланс липидного спектра крови - гиперхолестеринемию и гипертриглицеринемию.

Одним из определяющих моментов в развитии хронической алиментарной ДЛП является повышение уровня общего ХС и триглицеридов (ТГ) в крови опытных животных. Однако степень развития ДЛП в алиментарной модели бывает более низкой по сравнению с моделью острой гиперлипидемии, индуцированной детергентом тритоном WR-1339 (из-за видовой толерантности крыс) [Окуневич И. В., и др., 2014; Хныченко Л.К. и др., 2016; Окуневич И.В. и др., 2019; Ключева Н.Н. и др., 2020]. Тритон WR-1339 также является универсальным ингибитором экспрессии генов. Было показано, что введение тритона WR-1339 понижает практически до нуля экспрессию гена *АПОА1*, а также экспрессию генов транспортеров витамина Е в печень, за счет чего снижается концентрация в печени этого витамина [Chisato Abe et. al, 2007]. Это также приводит к исчезновению фракции белка АПОА1 из ЛПВП частиц. Инъекция тритона WR-1339 ингибирует ЛПЛ и снижение уровня токоферолов в печени. Было показано, что это связано не только с ингибированием АПОА1 и АпоЕ непосредственно, но также и с ингибированием рецептора SR-B1, который по функциям связан с АПОА1 [Chisato Abe et. al, 2007].

#### 1.4 Антиатеросклеротические лекарственные средства.

Для профилактики и лечения АС необходима ранняя, интенсивная фармакотерапия с помощью эффективных гиполипидемических и антиатеросклеротических средств. Для профилактики атеросклероза и лечения дислипидемии с целью улучшения качества жизни кардиологических больных необходимо раннее применение эффективных гиполипидемических и антиатеросклеротических средств.

Несмотря на широкий арсенал лекарственных средств, используемых для терапии атеросклероза и его проявлений, проблема терапии далека от окончательного решения [Hegele R.A., et. al., 1999; Hofmann M.A., 1999; Shih, P.T. et. al., 1998; Gu, L. et. al., 1998; Сергиенко И.В. и др., 2011]. Не до конца изученными остаются молекулярные механизмы, затрагивающие метаболические и клеточные процессы, вызывающие развитие атеросклероза. Данные по разным

механизмам атеросклероза остаются неполными и часто противоречивыми [Coan P. et. al., 2017; Fledderus J. et. al., 2021; Насонов Е.Л. и др., 2018]. Актуальным вопросом является поиск молекулярных мишеней действия биологически активных веществ [Baigent, C. et. al., 2010, Mihaylova, B. et. al., 2012, Goldbourt, U. et. al., 1988; Risch, N.J. et. al., 2000, Ouweneel A.B. et.al., 2021].

Ограничивающим фактором поиска гиполипидемических средств выступает сложность моделирования гиперлипидемии и атеросклероза. На сегодняшний день нет адекватной модели *in vivo* и (или) *in vitro*, которая могла бы воспроизвести все стадии атеросклероза [Wang, Y. M et. al., 2010, Veseli B. E. et.al., 2017]. Создание модели атеросклероза, близкой к организму человека, позволит точнее исследовать патогенетические факторы развития заболевания [Veseli B. E. et.al., 2017], а также механизмы его лечения и профилактики [Wang, Y. M et. al., 2010; Buzello M. et. al., 2003].

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (2016), гиполипидемические препараты классифицируются следующим образом [[http://zo.mednet.ru/bd\\_zo\\_rf/zo\\_rf.php?type=1](http://zo.mednet.ru/bd_zo_rf/zo_rf.php?type=1), 2016]:

1) статины (ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы) [Bruckert E. et al., 2005; Jukema J.W. et al., 2012; Tsujita K. et al., 2015; Беленков Ю. Н. и др., 2010; Squizzato A et al., 2010; Cannon C.P. et al., 2015];

2) фибраты [Keech A. et al., 2005; Хорольская В.Г.и др., 2019];

3) секвестранты желчных кислот [Schwartz G.G. et al., 2014; Sabatine, M.S. et al., 2016; Sabatine M.S. et al., 2016];

4) никотиновая кислота и ее производные [Seed, M. et. al., 1993];

5). ингибиторы белка-транспортера эфиров холестерина (СЕТР);

6) препараты с прочими механизмами действия [Kotwal S., 2014; Sabatine, M.S. et al., 2016; Robinson, J.G. et al., 2015; Schwartz G.G., 2014; Окуневич И.В. и др.,2007];

7). Моноклональные антитела к PCSK9 (эволокумаб и др.)

7) комбинированные лекарственные средства, содержащие в качестве обязательного компонента ингибитор ГМГ-КоА-редуктазы.

Ряд препаратов, используемых для терапии дислипидемий и атеросклероза, обладают невысокой активностью или вызывают побочные эффекты [Беленков Ю. Н. и др., 2010; Окуневич И.В. и др., 2011].

В настоящее время наиболее широко применяемыми, изученными и эффективными средствами, используемыми в терапии атеросклероза и дислипидемий, являются статины [Squizzato A et al., 2010; Adams S.P. et al., 2014; NCT01492361, 2016; NCT02104817, 2016; Окуневич И.В. и др., 2004] – конкурентные ингибиторы фермента ГМГ-КоА-редуктазы, являющегося ключевым ферментом синтеза ХС [Трошков В. В. et. al. ,2008]. Статины прикрепляются к ферменту ГМГ-КоА-редуктазе и блокируют синтез мевалоната – промежуточного продукта синтеза ХС, за счет чего снижается уровень ХС. Кроме прямого гиполипидемического эффекта, статины обладают несколькими другими полезными биологическими свойствами [Беленков Ю. Н. et. al., 2010]. Например, статины регулируют ангиогенез [Bellosa S. et. al., 1998], проявляют антиоксидантное, антитромботическое и другие действия [Wiesbauer, F. et. al., 1998; Corsini A. et. al., 1998; Undas A. et. al., 2005; NCT01492361, 2016]. По мнению некоторых ученых, подобные эффекты ингибиторов ГМГ-КоА-редуктазы не опосредованы их гиполипидемическим действием, а являются самостоятельными механизмами [Wiesbauer, F. et. al., 1998]. Несмотря на достаточно высокую эффективность статинов, длительное их применение способно вызывать побочные эффекты. К рискам использования статинов и возможным побочным эффектам их применения относят поражение мышц (рабдомиолиз и миопатия), гепатотоксические эффекты [Baays, H. et. al., 2006; Keech, A. et. al., 2005].

Фибраты являются производными фиброевой кислоты и по своим гиполипидемическим свойствам преимущественно влияют на обмен липопротеинов, богатых ТГ. Фибраты снижают содержание ХС в ЛПНП, за счет повышения количества ЛПНП рецепторов на мембранах гепатоцитов, что и приводит к усилению захвата гепатоцитами ЛПНП и, как следствие, к снижению уровня ХС-ЛПНП. Так, фенофибрат является агонистом ядерных  $\alpha$ -рецепторов, активирующих пролиферацию пероксисом (PPAR- $\alpha$ ) [Хорольская В.Г. и др., 2019].

В результате активации PPAR- $\alpha$  происходит увеличение экспрессии гена фермента липопротеинлипазы (ЛПЛ) и снижение экспрессии гена *ApoC3* – ингибитора фермента ЛПЛ, за счёт чего увеличивается липолиз ЛП. При применении фибратов, таких, как фенофибрат наблюдаются изменения в экспрессии генов, связанных с липидным обменом. Так, повышается экспрессия гена *Acaadm*. Это ген, кодирующий фермент митохондриального  $\beta$ -окисления – среднецепочечную ацил-КоА-дегидрогеназу. Также повышается экспрессия гена, кодирующего субъединицу фермента карнитин-пальмитоилтрансферазы 1, определяющего перемещение жирных кислот на внутреннюю мембрану митохондрий. Фенофибрат приводит к повышению экспрессии гена *Ppargc1a*, кодирующего белок PGC-1 $\alpha$ , и гена *Ppara*, кодирующего белок PPAR $\alpha$ , что связано с процессом  $\beta$ -окисления. Повышение экспрессии гена *Ppara* наблюдается в метаболически активных тканях. При этом повышение экспрессии гена *Ppargc1a* также может быть связано с повышением метаболизма. В нейронах и клетках глии фенофибрат приводит к повышению экспрессии генов, кодирующих ферменты, относящиеся к антиоксидантной системе клеток мозга. Повышается экспрессия гена *Sod2*, кодирующего митохондриальный фермент супероксиддисмутазу 2, который катализирует разложение супероксида с образованием кислорода и пероксида водорода, а также гена *Prdr5*, кодирующего белок, семейства пероксиредоксинов, активный как в митохондриях, так и в цитоплазме и пероксисомах [Хорольская В.Г. и др., 2019].

Вместе с тем, фибраты не лишены побочных эффектов, таких как гепатотоксические свойства, нарушения со стороны ЖКТ (тошнота, запоры, диарея и др.), болевые ощущения [Moutzouri, E et. al., 2010 Moutzouri, E; Keech, A. et. al., 2005, Хорольская В.Г. и др., 2019].

Препарат эзетимиб является избирательным ингибитором поглощения ХС и растительных стеролов. При этом ингибирование всасывания ХС происходит в кишечнике. Синтез ХС в печени не ингибируется. Применение эзетимиба не приводит к понижению общей смертности среди пациентов, но снижает риск развития острого коронарного синдрома. Побочными эффектами являются

развитие диареи и головных болей у пациентов, принимающих препарат [Phan B. P. et. al, 2012].

Так, препарат эвацетрапиб (evacetrapib) и другие препараты этой группы – анацетрапиб, дальцетрапиб, торцетрапиб, являются ингибиторами белка-транспортера эфиров холестерина (СЕТР). Эти препараты явились результатом исследований действия СЕТР на риск развития сердечно-сосудистых заболеваний. При этом необходимо отметить, что данные по эффективности этого препарата в клинических исследованиях противоречивы. Было показано, что данный препарат влияет на уровень ХС, но не влияют на симптомы атеросклеротического поражения. Кроме того, клинические исследования торцетрапиба были прекращены из-за увеличения смертности. [Nicholls S.J. et al., 2015].

Препарат моноклональных антител к PCSK9 (эволокумаб) селективно и с высокой степенью аффинности связывается с PCSK9 и ингибирует связывание циркулирующей PCSK9 с LDLR на поверхности клеток печени, таким образом, предотвращая PCSK9-опосредованный распад LDLR. Как результат, повышение экспрессии LDLR в печени приводит к снижению сывороточной концентрации ЛПНП. У пациентов с первичной гиперлипидемией и смешанной дислипидемией эволокумаб снижает концентрации несвязанной PCSK9, ХС ЛПНП, общего ХС, АпоВ, ХС ЛПОНП; повышает концентрации ХС ЛПВП и АПОА1, улучшая соотношение общего ХС/ХС ЛПВП и АПОВ/АПОА1. При том, что общих негативных побочных эффектов для эволокумаба и препаратов его группы в целом не наблюдается, его применение не рекомендуется при гиперлипидемиях II типа для возраста до 18 лет. Также с осторожностью эволокумаб следует применять при нестабильной стенокардии [Nicholls S.J. et al., 2016].

Учитывая все выявленные побочные эффекты, при применении в клинической практике статинов и фибратов [Shepherd J. et. al., 1995; Sacks F.M. et. al., 1996; Nissen S.E. et. al., 2006; Nicholls S.J. et. al., 2011] имеются ограничения их использования: часть из них дороги в производстве, для многих из этих препаратов наблюдаемые побочные эффекты оказываются весьма существенными [Barter P.J. et. al., 2010; Ginsberg H.N. et. al., 2010; Окуневич И.В. и др., 2011]. В

связи с этим актуальным остается поиск новых и безопасных лекарственных средств, способных осуществлять коррекцию атерогенной дислипидемии [Nicholls, S.J. et. al.; 2015; Tuin, S.J. et. al.; 2015; Окуневич и др., 2014; Окуневич и др., 2019]. В частности, есть основания для дальнейших поисков лекарственных средств, среди производных ароматических гетероциклических соединений [Gsaller F. et.al., 2016; Хныченко Л.К. и др., 2016; Пиотровский и др., 2018].

### 1.5 Азолы и их производные, антиатеросклеротические свойства, применение

Полагают, что механизмы гиполлипидемического действия азолов связаны с изменением активности генов белков, которые участвуют в транспорте стеролов [Gupta A.K. et. al., 1990]. Азолы изначально применялись, как антифунгицидные препараты. Механизм действия азолов как антифунгицидов связан с блокировкой синтеза стеролов, причем не напрямую, а через регуляторы экспрессии генов, связанных с липидным обменом, такие, как SREBP-1. Именно активация SREBP-1 приводит к угнетению SR-B1 и нарушению липидного обмена в клетках грибов, что и дает антифунгицидный эффект [Gsaller F. et.al., 2016]. При этом в случае введения азоловых препаратов животным, наблюдался антиатерогенный эффект [Ахмеджанов Н.М. et. al., 2015]. Например, антиатерогенные эффекты некоторых производных имидазола характеризуются снижением числа липидных полосок и пятен в аорте у кроликов в модели экспериментального холестеринowego атеросклероза [Даутова Г.С. и др., 1994; Nievelstein P.F. et.al., 1991; Nievelstein-Post P. et. al., 1994]. Это может быть связано именно с угнетением белков, участвующих в липидном обмене, а может быть и следствием активации белков, осуществляющих транспорт и метаболизм липидов в организме позвоночных. Поскольку с гомологом SREBP связываются препараты из группы азолов в клетках грибов, антиатерогенность азоловых препаратов может быть связана с супрессией *SR-B1* через SREBP-1. Поскольку SR-B1 является важным белком-рецептором липопротеинов, прежде всего ЛПВП [Rhains D. et al, 2004; Traugher C. A. et al, 2020], влияние на его экспрессию должно неизбежно приводить к

изменению липидного обмена в организме позвоночного. В той же степени это касается основной группы транспортеров липидов – малых аполипопротеинов [Seed M. et.al, 1993; Viney N.J. et. al., 2016]. Здесь нужно отметить, что малые аполипопротеины, появляются только у позвоночных. С этим, скорее всего, и связаны такие полярные эффекты азолов – поражающее действие на клетки грибов и оздоравливающее действие на организм позвоночных животных, в частности, ранозаживляющее действие производных имидазола. [Хныченко и др., 2020]. Но, хотя было показано влияние препаратов группы азолов на уровень липопротеидов в крови и в ткани печени, не проводилось исследований по связи действия азолов и экспрессии генов, связанных с липидным обменом.

Молекулярные механизмы влияния производных имидазола на работу генов, участвующих в липидном обмене изучены недостаточно. Одним из возможных механизмов гипополипдемического и антиатерогенного действия азолов может быть их влияние на регуляторы экспрессии генов аполипопротеинов [Gibson C.M. et. al, 2016; Seed M. et.al, 1993; Viney N.J. et. al., 2016]. Было предположено, что через регуляцию экспрессии генов липопротеинов, азолы влияют на обратный транспорт липопротеинов в печень, а через экспрессию рецепторов к липопротеинам – на захват липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) [Kronenberg F. et. al., 1999; Wittrup H. H. et. al, 2006].

Подводя итоги, есть основания для изучения гипополипдемических и антиатеросклеротических свойств препарата крамизола, как одного из представителей ароматических гетероциклических соединений. При этом необходимо определить молекулярные механизмы, связанные с дислипидемическими синдромами, на которые исследуемый препарат крамизол оказывает действие. Спектр молекулярных механизмов на данный момент достаточно хорошо изучен, что позволяет избирательно тестировать препарат крамизол на связь его действия с конкретными механизмами, генами и их белковыми продуктами. Это составляет теоретическую основу экспериментальной части данного исследования.

## Методы

### 2.1 Модели, исследования и экспериментальные животные.

Эксперименты проведены на крысах-самцах, культуре клеток макрофагов человека (THP-1) и культуре изолированных перитонеальных макрофагов крысы. Для моделирования патологии обмена липидов и атеросклероза использовали две экспериментальные модели на животных и одну модель на культуре клеток. Эксперименты *in vivo* выполнены в осенне-зимний период на 180 крысах самцах линии Wistar (масса 280-320г), полученных из питомника лабораторных животных “Рапполово” (Ленинградская область). Эксперименты проведены с соблюдением принципов гуманности (Директивы Европейского Сообщества №86/609 ЕС) и одобрены Этическим комитетом ИЭМ. Животных содержали в условиях вивария на естественном световом режиме, при свободном доступе к пище и воде (температура воздуха в виварии  $(20 \pm 2)$  °С, влажность – не более 70 %). Рацион питания животных включал специализированный для лабораторных крыс и мышей гранулированный корм.

После карантина для проведения эксперимента методом случайной выборки формировались группы по 6–9 крыс из особей, имеющих близкую массу тела, контролируемую ежедневным взвешиванием для коррекции количества вводимых препаратов. Все манипуляции выполняли с 9.00 до 12.00 ч с целью исключения суточных влияний на метаболизм. На первом этапе скрининговых исследований для доказательства гиполипидемического эффекта, согласно Руководству по доклиническому исследованию лекарственных средств, использовали экспериментальные модели гиперлипидемии, вызванной тритоном WR1339 и хронической модели гиперлипидемии и атеросклероза, индуцированной у крыс диетой, содержащей холестерол и жиры (Таблица 3).

На втором этапе исследований для выяснения механизмов гиполипидемического действия препарата изучали степень его влияния на активность генов белков, участвующих в липидном обмене.

### 2.1.1 Острая модель дислипидемии

Для оценки гипополипидемического действия исследуемых веществ нами была использована модель гиперлипидемии, воспроизводимая у экспериментальных животных при введении тритона WR 1339, являющегося неионным детергентом [Holt P.R. et al., 1980]. Данная модель характеризуется простотой воспроизведения, при этом низкая токсичность тритона и зависимость эффекта от концентрации детергента позволяет воспроизводить гиперлипидемию разной степени выраженности [Holt P.R. et al., 1980; Хныченко Л.К. и др., 2016]. Крысы-самцы были разделены на 4 группы: 1-ая группа – контрольная (интактные крысы); 2-ая группа – модель острой гиперлипидемии, вызванной введением детергента тритона WR-1339; 3-я группа получала тестируемый препарат крамизол; 4-ой группе крыс вводили тестируемый препарат крамизол +тритон WR-1339. В соответствии с ранее полученными данными животные получали крамизол в дозе 100 мг/кг веса животного (при ЛД<sub>50</sub>=20000 мг), разведенные в 1%-м растворе крахмала, перорально в течение 7-ми дней [Окуневич И.В. и др., 2016]. Контрольная группа получали эквивалентное количество 1% раствора крахмала. Для воспроизведения этой модели на 8-е сут через час после введения исследуемого препарата (крамизол), препарата сравнения (фенофибрат) и крахмальной слизи животным всех групп, кроме 1-й группы, внутривентриально вводили детергент тритон WR-1339 в дозе 200 мг/кг массы тела, растворенный в 0,9% стерильном растворе натрия хлорида. Группе отрицательного контроля вводили внутривентриально эквивалентный объем стерильного апиrogenного раствора натрия хлорида. Через сутки после введения детергента тритона WR 1339 производился забой крыс быстрой декапитацией с забором крови и взятием образцов ткани печени.

Таблица 1 – Схема эксперимента по острой дислипидемии

Группы	Вводимый препарат	Введение Тритона WR 1339
--------	-------------------	--------------------------

Интактный контроль	1% раствор крахмала без препарата	Введение физ. раствора
Тритон WR 1339	1% раствор крахмала без препарата	Введение Тритона WR 1339
Тритон WR 1339 + фенофибрат	Фенофибрат в 1% растворе крахмала	Введение Тритона WR 1339
Тритон WR 1339 + крамизол	Крамизол в 1% растворе крахмала	Введение Тритона WR 1339

### 2.1.2. Хроническая модель дислипидемии

Одним из широко применяемых способов моделирования гиперлипидемии в эксперименте является длительное (2–3 нед) применение диеты, содержащей холестерол (2,5%), холиевой кислоты (0,5%) и 30% растительного масла [Хныченко Л.К. и др., 2016; Окуневич И.В. и др., 2019; Ключева Н.Н. и др., 2020]. Данная модель гиперлипидемии варьирует как по соотношению ингредиентов в диете, так и по длительности ее применения.

Животные в течение 4 недель получали диету с высоким содержанием холестерина и окисленных жиров (45% энергии за счет животного жира), содержащую 2,5% холестерина (Sigma), 0,5% холевой кислоты (Sigma) (для улучшения всасывания ХС в ЖКТ). Одновременно с получением диеты экспериментальным группам животных, продолжавшим получать эту же диету, в течение 4 нед. в соответствии с ранее полученными данными вводили крамизол в дозе 100 мг/кг, разведенные в 1%-м растворе крахмала, перорально [Окуневич И.В. и др., 2016] и препарат сравнения фенофибрат в 1% крахмальном растворе (100 мг/кг, торговое название «Трайкор»). Контрольная группа получали эквивалентное количество 1% раствора крахмала.

Состав диеты (в расчете на 1 кг корма): брикеты гранулированного корма (ГОСТ Р 50258-92) - 750г, жир свиной - 450г, подсолнечное масло - 100г, сухое молоко - 500г, холестерин пищевой - 87г, вода - 100г [Хныченко Л.К. и др., 2016;

Окуневич И.В. и др., 2019; Ключева Н.Н. и др., 2020]. Всего за четыре недели опытная крыса потребляла около 2000г корма с повышенным содержанием холестерина. Крысы-самцы были разделены на 4 группы: 1-ая группа – контрольная (интактные крысы); 2-я группа – ГХС диета; 3-я группа – ГХС диета + препарат сравнения фенофибрат, перорально (100 мг/кг веса животного); 4-я группа – ГХС диета + крамизол, перорально (100 мг/кг веса животного при ЛД<sub>50</sub>=20000 мг) [Окуневич И.В. и др., 2016]. Количество животных в группе составляло от 6 до 9 особей. На 30-й день производился забой крыс быстрой декапитацией с забором крови и взятием образцов ткани печени.

### 2.2.1. Определение уровня общего ХС, триглицеридов и ЛПВП в выделенной сыворотке подопытных животных.

Уровень общего ХС, ТГ и ХС ЛПВП в сыворотке крови определяли с помощью ферментативных наборов фирмы «Vital Diagnostics», Россия. Измерение проводилось на 96 – луночном планшете. В соответствие с методикой в каждую лунку планшета вводилась смесь из 10 мкл пробы сыворотки от одного подопытного животного и 190 мкл ферментативного раствора. Для общего ХС, триглицеридов и ХС ЛПВП вносились отдельные смеси с соответствующими ферментативными растворами и каждого образца сыворотки крови подопытных животных. Для калибровки в отдельные лунки вносились растворы со стандарт-титрами в раститровке: 0,5 мкл, 1 мкл, 5 мкл, 10 мкл, 20 мкл. В качестве отрицательного контроля в отдельные лунки вносился ферментативный раствор с деионизованной водой. Планшет инкубировался 10 минут при комнатной температуре, после чего производилось измерение оптической плотности на спектрофотометре. Уровень общего ХС, триглицеридов и ХС ЛПВП рассчитывался по формуле с коэффициентами, рассчитанными по построенной для стандарт-титров калибровочной кривой. Для общего ХС, триглицеридов и ХС ЛПВП строилась отдельная калибровочная кривая и рассчитывались собственные коэффициенты. Для оценки атерогенности крови и степени развития ДЛП

рассчитывали холестеринный коэффициент атерогенности (КА):  $[(\text{общий ХС} - \text{ХС ЛПВП})/\text{ХС ЛПВП}]$ .

Таблица 2 –Схема эксперимента по хронической дислипидемии

Группы	Вводимый препарат	Диета
Интактный контроль	1% раствор крахмала без препарата	Кормление стандартным кормом
Холестериновая диета	1% раствор крахмала без препарата	Кормление холестеринной диетой
Холестериновая диета + фенофибрат	Фенофибрат в 1% растворе крахмала	Кормление холестеринной диетой
Холестериновая диета + крамизол	Крамизол в 1% растворе крахмала	Кормление холестеринной диетой

Таблица 3 – Состав холестеринной диеты (на 1 кг корма)

Брикеты гранулированного корма (ГОСТ Р 50258-92)	750г
жир свиной	450г
подсолнечное масло	100г
сухое молоко	500г
холестерин пищевой	87г
вода	100г
Натрия холат	100 мкг

### 2.2.2. Выделение РНК и ОТ-ПЦР

Для оценки экспрессии интересующих нас генов из печени крыс (при острой и хронической моделях ДПП) выделяли тотальную РНК. Образец ткани печени крысы помещали в коммерческий лизирующий реагент «Тризол», из расчета объема лизирующего реагента 100мкл/1мг образца. Помещенные в лизирующий реагент образцы инкубировали при 60°C 1 мин, после чего к образцу добавляли ½ часть объема хлороформа. Полученную смесь перемешивали 3 мин, после чего центрифугировали 10 мин при 13,4гpm. Затем из пробирки отбирали верхнюю фазу и переносили в новую пробирку. К полученному объему жидкости добавляли 1/10 часть объема 3М ацетата натрия и 2,5 полученного объема изопропилового спирта. Полученную смесь инкубировали сутки при температуре -20°C. После инкубации полученную смесь центрифугировали 10 мин при 13,4гpm. Жидкость удалялась, к осадку добавляли по 100мкл 70% этанола, после чего полученную жидкость снова центрифугировали 2 мин при 13,4гpm. После центрифугирования жидкость удаляли, осадок сушили 30 мин при температуре 65°C в термостате. Высушенный осадок растворяли в 50 мкл стандартного стерильного буфера TE. Концентрацию измеряли спектрофотометрически. Чистоту выделяемой РНК контролировали по отношению оптических плотностей при 260 и 280 нм ( $D_{260}/D_{280} > 1,8$ ). Целостность выделенной РНК проверяли электрофорезом в агарозном 1% геле по соотношению полосок (бендов), соответствующих рибосомным 28S и 18S РНК. После выделения РНК проводили реакцию обратной транскрипции, в качестве 3'-праймеров использовали коммерческие *oligo-dT* с последующей ПЦР в реальном времени с праймерами к мРНК генов интереса. Реакция обратной транскрипции проводилась в объеме 50 мкл, объем добавляемой РНК брался из расчета 3мкмоль РНК на реакцию. 3'-праймеры добавлялись в смесь с образцом РНК в расчете 1 мкл на реакцию. Для реакции обратной транскрипции использовали 5 кратный буфер для обратной транскриптазы, фермент обратная транскриптаза. Отжиг 3'-праймеров с образцом РНК осуществлялся в течение 15 мин при температуре 70°C. Для конденсации

испарившейся жидкости образец помещали на 1 мин на  $-20^{\circ}\text{C}$ . После к смеси РНК и праймеров добавляли смесь нуклеотидов, буфера для обратной транскриптазы и обратной транскриптазы. Полученную смесь инкубировали 60 мин при температуре  $42^{\circ}\text{C}$  для проведения реакции синтеза кДНК. После этого образец прогревали до  $70^{\circ}\text{C}$  для инактивации обратной транскриптазы.

Полученные в результате обратной транскрипции образцы кДНК использовали для проведения реакций ПЦР в реальном времени (циклер CFX384 Touch, Biorad-Laboratories, США). Реакция проводилась в объеме 20мкл, с использованием 10 кратного буфера для ДНК-полимеразы с добавленным флуоресцентным красителем SYBR-Green. В качестве фермента ДНК-полимеразы использовали Taq-полимеразу производства биохим (Россия). Также использовали стандартную смесь дезоксирибонуклеотидов в концентрации 2,5 мМоль, и стандартный раствор соли хлорида магния. Буфер и смесь нуклеотидов добавляли из расчета 2 мкл на реакцию. Хлорид магния добавляли из расчета 1,5 мкл на реакцию, Taq-полимераза – из расчета 2 пмоль на реакцию. В качестве референсных генов были использованы гены домашнего хозяйства: ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*Gapdh*), ген бета-актина (*beta-actin*). С помощью ПЦР в реальном времени анализировалась динамика экспрессии генов:

- 1). Гена Аполипопротеина А1 (*APOA1*)
- 2). Гена рецептора липопротеинов SR-B1 (*Scarb1*)
- 3). Гена Аполипопротеина С2 (*APOC2*)
- 4). Гена транспортера PDIA2 (*Pdia2*)

Праймеры к последовательностям генов интереса подбирали с помощью программы Primer3. Синтез праймеров осуществлялся по заказу компанией «Бигль». Праймеры поставлялись в форме высушенного осадка, объем растворения каждого из праймеров указывался поставщиком в документах к праймерам и рассчитывался из количества олигонуклеотидов и финальной концентрации после растворения 100пмоль/мкл. При добавлении праймеров в реакционную смесь для ПЦР составляли рабочую смесь из пары праймеров для каждого гена интереса и каждого референсного гена. При этом концентрация

каждого праймера в рабочем растворе составляла 10 пмоль/мкл. Рабочий раствор праймеров добавляли к реакционной смеси из расчета 2мкл на реакцию. Инкубация реакционной смеси по программе смены температур проводилась в циклере для ПЦР в реальном времени. Программа цикла приведена в Таблице 5. Уровень мРНК исследуемых генов 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].

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  $p < 0,05$ .

Таблица 4 – Последовательность праймеров

Ген	Праймеры		Длина продукта/ п.н.
	Прямой (5'-3')	Обратный (3'-5')	
<i>Gapdh</i>	AGACAGCCGCATCTT CTTGT	CTTGCCGTGGGTAGAGT CAT	207
<i>Actb</i>	TGTCACCAACTGGGA CGATA	AACACAGCCTGGATGGC TAC	195
<i>apoA1</i>	CCTGGATGAATTCCA GGAGA	TCGCTGTAGAGCCCAAA CTT	192
<i>АПОС2</i>	ATTGCACTCAGGTCCC AGAC	TCCCTCAGTTTCTCGTCC AC	232
<i>Scarb1</i>	GGTGCCCATCATTTAC CAAC	CCCTACAGCTTGGCTTC TTG	162
<i>Pdia2</i>	GCCCTGATGGTGGAGTTT TA	GTTTGTGCGGTTTCCATCT	210

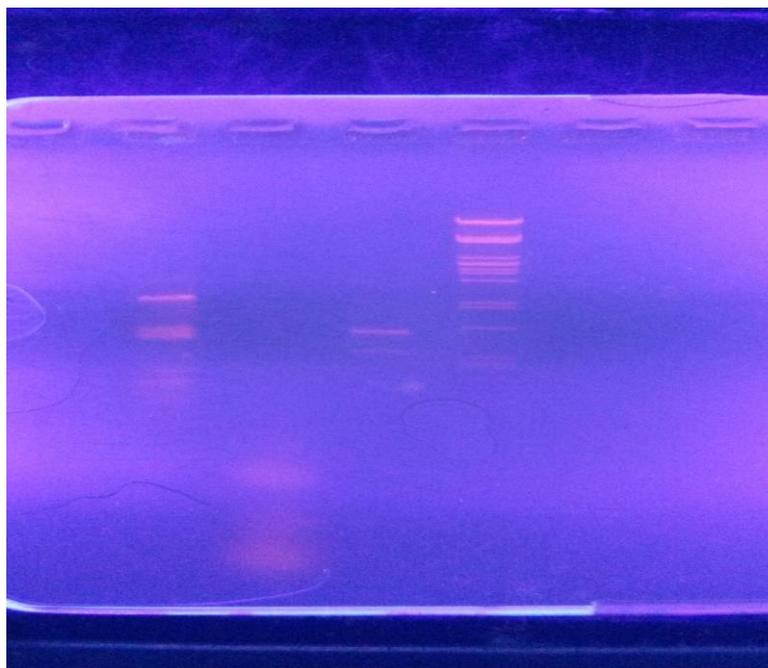


Рисунок 1 – Продукт ПЦР кДНК печени крысы с праймерами к гену *АПОА1* крысы. Маркер Ladder 1000-100 п.н.

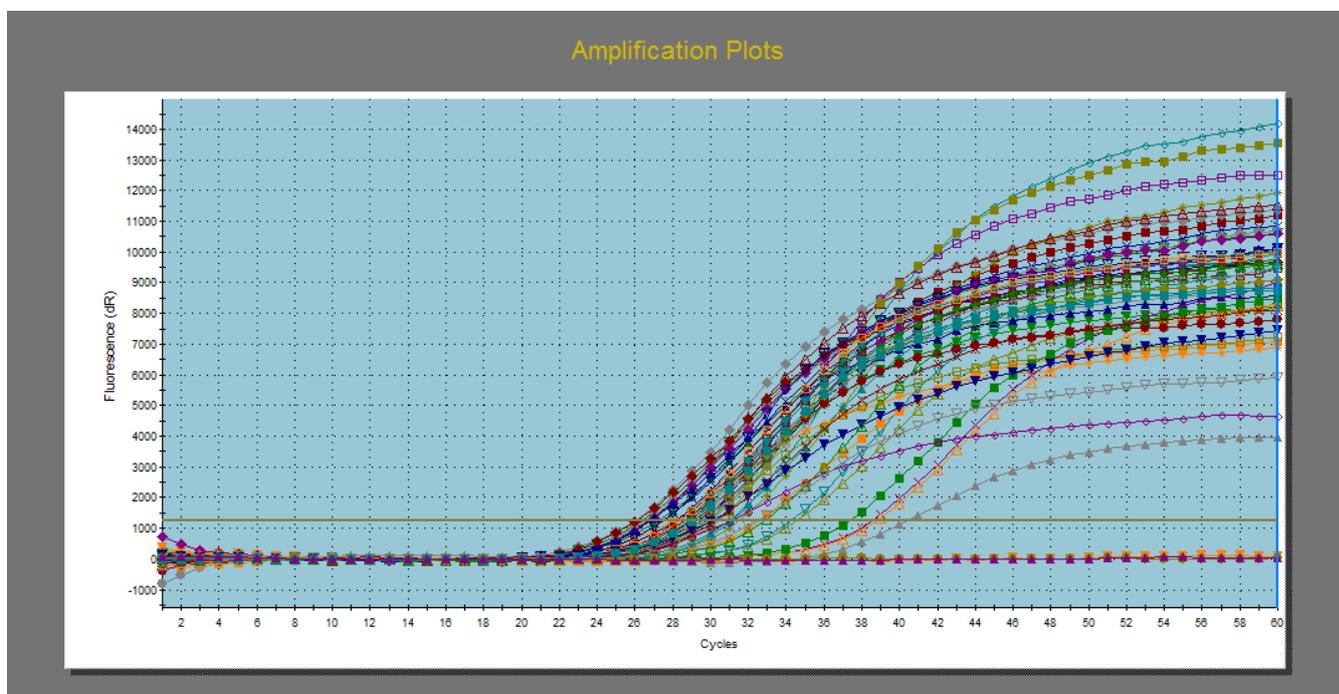


Рисунок 2 – ПЦР в реальном времени, график амплификации гена *АПОА1* в пробах печени подопытных животных, кДНК печени крысы

Таблица 5 –Пропись реакции обратной транскрипции в объеме 50 мкл

Mix1 24 мкл	Mix2 26 мкл
Oligo dT 2мкл	Буфер ОТx5 10 мкл
РНК+ddH <sub>2</sub> O суммарное разведение 10мкл	dNTPs10мМоль 2,5мкл
ddH <sub>2</sub> O 12мкл	Обратная транскриптаза 0,25 мкл
	ddH <sub>2</sub> O 10,75 мкл

Таблица – 6 Пропись реакции ПЦР для одной реакции в объеме 20 мкл

Компоненты	Количество
Буфер SYBRx10	2 мкл
dNTPs	2мкл
MgCl <sub>2</sub>	1,5мкл
Рабочая смесь праймеров	1 мкл
Taq-полимераза	0,25 мкл
ddH <sub>2</sub> O	13,25 мкл

### 2.3. Эксперименты на культуре клеток макрофагов человека 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 окисленных LDL 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 позволяет моделировать атерогенные процессы, такие, как изменение интенсивности захвата окисленных липопротеинов, на материале клеток иммунной системы человека [Yujiao S. et al, 2020]. При этом появляется возможность провести сравнение механизмов, задействованных в развитии атеросклероза, в организме человека и организме крысы. Также данная модель демонстрирует влияние тестируемого препарата на

механизмы развития атеросклероза в организме человека. Это позволяет провести сравнение механизмов действия тестируемого препарата, выявленных на моделях индуцированной ДЛП у крыс, с механизмами действия крамизола на развитие ДЛП у человека. Определение уровня белковых продуктов генов интереса определялось методом проточной цитометрии.

Основной принцип проточной цитометрии заключается в движении постоянного тока изотонического раствора через проточную ячейку под давлением. Внутри проточной ячейки находится зонд, из которого подается образец, содержащий клетки. За счет разницы давления в зонде и жидкости происходит гидродинамическое фокусирование струи в струе, и клетки за счет этого выстраиваются друг за другом. В определенном месте клетки пересекают луч света, и здесь происходит считывание информации [Хайдуков С.В. и др., 2012].

### 2.3.1. Инкубация клеток с препаратом крамизола.

В работе использовали линию клеток THP-1, полученную из банка клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Культивирование клеток линии THP-1 макрофагов человека осуществлялось на 24 луночных планшетах для культивирования в среде RPMI-1640 10% фетальной телячьей сывороткой (FCS), полимиксином и антибиотиками. Клетки были дифференцированы в макрофаги добавлением 50нг/мл форбол12-миристан13-ацетата (PMA, Sigma-Aldrich) согласно стандартной процедуре PMA [Schwende H. et al., 2000, Yujiao S. et al., 2020]. Инкубация проводилась в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37°C. Окисленные ЛПНП (оксЛПНП, oxLDL) получали последовательным двухкратным центрифугированием плазмы крови в градиенте хлористого цезия на ультрацентрифуге при 40000rpm и температуре 18°C.

В опыте было выделено 4 экспериментальные группы: негативный контроль (добавляли бычий сывороточный альбумин – БСА, BSA, в концентрации 100мкг/мл), позитивный контроль (добавляли окисленные ЛПНП), опыт 10 (добавляли окисленные ЛПНП и 10 нМ крамизола), опыт 100 (добавляли

окисленные ЛПНП и 100 нМ крамизола), опыт 1000 (добавляли окисленные ЛПНП и 1 мМ крамизола) и опыт 10000 (добавляли окисленные ЛПНП и 10 мМ крамизола). Окисленные ЛПНП во всех группах, кроме группы негативного контроля, добавляли по 100мкг/мл.

На первый день культуру клеток обрабатывали реагентом РМА (форбол -12-миристан-13-ацетат). На второй день культуру клеток отмывали от РМА. На третий день клетки оставляли расти, клеткам не добавляли ничего. На четвертый день добавляли раствор крамизола и оксЛПНП в концентрациях, соответствующих опытным группам. На пятый день клетки снимались с планшета, помещались в пробирки емкостью 1,5 мл (каждая точка – в отдельную пробирку) в 200мкл PBS. Сам эксперимент по воздействию препарата на культуру клеток проводился по следующей схеме, представленной в таблице 7.

Таблица – 7 Схема эксперимента на культуре клеток ТНР1. Добавление окисленных ЛПНП и крамизола

	Изотип	Контроль(-) (x4x2)	Контроль(+) (x4x2)	Опыт1 0 (x4x2)	Опыт10 0 (x4x2)	Опыт1000 (x4x2)	Опыт 10000 (x4x2)
окс ЛПНП	-	-	100мкг/мл	100мкг /мл	100мкг/ мл	100мкг/мл	100мкг/мл
Крами зол	-	-	-	10 нМ	100 нМ	1 мМ	10 мМ
БСА	-	100мкг/мл	-	-	-	-	-

После инкубации с препаратами клетки снимали с планшета раствором аккутазы (0,25 %). Далее клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 330 g. Для приготовления рабочего раствора PBS брали 125 мкл стандартные таблетки фосфатного буфера 1xPBS (pH 7.4).

### 2.3.2. Проточная цитометрия белков, участвующих в липидном обмене.

После инкубации с препаратом крамизола снятые с планшетов клетки инкубировали с антителами к белковым продуктам исследуемых генов. Суспензию клеток центрифугировали при 4000rpm в течение 5 минут. После надосадочную жидкость удаляли, клетки оставляли в 50мкл жидкости. После этого к суспензии клеток добавлялся раствор первичных антител (для каждой пробы антитело к одному из изучаемых белков) до итоговой концентрации антител 1/100 относительно исходной. Полученную смесь перемешивали и инкубировали на шейкере при комнатной температуре 30 минут. После инкубации к суспензии клеток добавляли по 1 мл стерильного PBS, после чего суспензию клеток центрифугировали при 4000rpm в течение 5 минут [Хайдуков С.В. и др., 2012]. Надосадочная жидкость удалялась, клетки оставались в 50мкл жидкости, к полученной суспензии добавляли раствор вторичных антител, меченых флуоресцентной меткой (Alexa 647), до итоговой концентрации 1/1000 относительно исходной. Полученную смесь перемешивали и инкубировали на шейкере при комнатной температуре в темноте в течение 60 минут. После инкубации к пробам добавляли по 4мл стерильного PBS и суспензию клеток центрифугировали при 15000rpm в течение 5 минут. Затем жидкость удаляли, к пробам добавляли по 250 мкл стерильного PBS и проводили проточную цитометрию [Хайдуков С.В. и др., 2012]. Длины волн каналов при цитометрии составляли 647 нм и 488нм.

Схема инкубации проб с антителами для проточной цитометрии.

1. автофлуоресценция
2. изотип Alexa 647
3. изотип clone CD36, Abcam clone ab133625
5. изотип SR-B1, Abcam clone ab272003
6. изотип LOX 1, R&D clone 331212
7. изотип АПОА1, Bio-Rad № 0650-0050
8. oxLDL

9. oxLDL крамизол 10 нМ (для Alexa 488)
10. oxLDL крамизол 1 мкМ (для Alexa 488)
11. oxLDL крамизол 10 нМ (для Alexa 488)
12. oxLDL крамизол 10 нМ (для АПОА1, Bio-Rad № 0650-0050)
13. oxLDL крамизол 1 мкМ (для АПОА1, Bio-Rad № 0650-0050)
14. oxLDL крамизол 10 мкМ (для АПОА1, Bio-Rad № 0650-0050)
15. oxLDL крамизол 10 нМ (для CD36, Abcam clone ab133625)
16. oxLDL крамизол 1000 мкМ (для CD36, Abcam clone ab133625)
17. oxLDL крамизол 10000 мкМ (для CD36, Abcam clone ab133625)
18. oxLDL крамизол 10 нМ (для SR-B1, Abcam clone ab272003)
19. oxLDL крамизол 1 мкМ (для SR-B1, Abcam clone ab272003)
20. oxLDL крамизол 10 нМ (для SR-B1, Abcam clone ab272003)
21. oxLDL крамизол 10 нМ (для LOX1, R&D clone331212)
22. oxLDL крамизол 1 мкМ (для LOX1, R&D clone331212)
23. oxLDL крамизол 10 мкМ (для LOX1, R&D clone331212)
24. BSA

Метки к окисленным ЛПНП – Alexa 488, к вторичным антителам к АПОА1, SR-B1 и CD 36 – Alexa 674. оксЛПНП – окисленные ЛПНП. Первичные антитела: abcam, США.

### 2.3.3. Выделение РНК из культуры клеток THP1, ОТ-ПЦР

Для оценки экспрессии интересующих нас генов из культуры клеток THP-1 выделяли тотальную РНК по стандартному протоколу с помощью коммерческого реагента «Тризол». РНК из каждой лунки на планшете с культурой выделяли отдельно. Концентрацию измеряли спектрофотометрически. Чистоту выделяемой РНК контролировали по отношению оптических плотностей при 260 и 280 нм ( $D_{260}/D_{280} > 1,8$ ). Целостность выделенной РНК проверяли электрофорезом в агарозном 1% геле по соотношению бендов, соответствующих рибосомным 28S и 18S РНК. После выделения РНК проводили реакцию обратной транскрипции, в качестве 3'-праймеров использовали коммерческие *oligo-dT* с последующей ПЦР

(циклер CFX384 Touch, Biorad-Laboratories, США) в реальном времени с праймерами к мРНК генов интереса. В качестве референсных генов был использованы гены домашнего хозяйства: ген циклофилина А (*Cyclophilin A*) и ген 60S кислого рибосомального белка Р0 (*RPLP0*). Праймеры к последовательностям генов интереса подбирались с помощью программы Primer3. Уровень мРНК генов интереса рассчитывали, как  $2^{Ct(\text{интактные})-Ct(\text{образец})}$ . Для статистической обработки выравнивание производили по среднему геометрическому двух референсных генов (*Cyclophilin A* и *GAPDH*) [Vandesompele J. et. al., 2002]. С помощью ПЦР в реальном времени анализировалась динамика экспрессии генов:

- 1). Гена Аполипопротеина А1 (*APOA1*)
- 2). Гена рецептора липопротеинов SR-B1 (*SR-B1*)
- 3). Гена скэвенджер рецептора LOX1 (*LOX1*)
- 4). Гена скэвенджер рецептора CD36 (*CD36*)

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  $p < 0,05$ .

Таблица – 8 Последовательность праймеров

Ген	Праймеры		Длина продукта/ п.н.
	Прямой (5'-3')	Обратный (3'-5')	
<i>RPLP0</i>	TTCCAATTGCTGAAAA GGT	GTCCGACTCCTCCG ACTCTT	207
<i>Cyclophilin A</i>	TCGAGTTGTCCACAGT CAGC	TTCATCTGCACTGC CAAGAC	222
<i>ApoA1</i>	GCCTACAGGAACAGC TAGG	CGTTCCAATTCTCCT GGAAT	192
<i>LOX1</i>	GGTCSTTTGCCTGGGA	CTGGTGAGTTAGGT	127

	TTAGTAG	TTGCTTGC	
<i>SR-B1</i>	ATGAAATCTGTGCGCA GGCATTG	TGCATCACCTTGGG CATCA	162
<i>CD 36</i>	TCAGCAAATGCAAAG AAGGGAGAC	GGTTGACCTGCAGC CGTTTTG	211

## 2.4 Эксперименты на перитонеальных макрофагах крысы.

### 2.4.1. 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 введенная жидкость отбирали в стерильную пробирку. После этого полученную жидкость центрифугировали 7 мин при 1200 g. Клетки высевали на 24-луночный планшет для культивирования [Smith J.D. et al, 1995].

### 2.4.2. Инкубация клеток с препаратом крамизола

Инкубация проводилась в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 35°C. Для проведения эксперимента были выделены 2 опытные группы. Негативный контроль (в культуру клеток не добавляли ничего), опытная группа (в культуру клеток добавляли 100 нМ крамизола). На каждую опытную группу выделялось по 6 лунок на планшете.

Для опыта по изучению влияния препарата на изменение захвата окисленных ЛПНП макрофагами крысы на первые сутки в клетки культуры перитонеальных макрофагов крысы добавляли раствор окисленных ЛПНП с флуоресцентной меткой (Alexa 647), а также раствор препарата крамизола в концентрациях соответственно 10 нМ, 100 нМ, 1000 нМ, 10000 нМ. На вторые

сутки культивирования клетки снимались с планшета. Полученные клетки обрабатывали для проточной цитометрии без обработки первичными и вторичными антителами (по 4 лунки от каждой группы).

Таблица – 9. Схема инкубации клеток перитонеальных макрофагов крысы с крамизолом

	Контроль (-) (x4x2)	Контроль (+) (x4x2)	Опыт1 0 (x4x2)	Опыт100 (x4x2)	Опыт100 0 (x4x2)	Опыт 100000 (x4x2)
Меченые окисленные ЛПНП	-	100мкг/м л	100мкг /мл	100мкг/м л	100мкг/м л	100мкг/мл
Крамизол	-	-	10 нмоль	100 нмоль	1000 нмоль	10000 нмоль

Примечание: Контроль – отрицательный контроль, крамизол – крамизол (+)

Таблица – 10 Схема инкубации клеток перитонеальных макрофагов крысы с крамизолом

	Опыт100 нмоль	Опыт100 нмоль	Опыт100 нмоль	Опыт100 нмоль	Опыт100 нмоль	Опыт100 нмоль
Контроль	–	–	–	–	–	–
Крамизол	100	100	100	100	100	100

Примечание: Контроль – отрицательный контроль, крамизол – крамизол (+)

#### 2.4.3. Проточная цитометрия белков, участвующих в липидном обмене.

Проточная цитометрия: снятые с планшетов клетки инкубировали с антителами к белковым продуктам генов интереса по стандартной схеме. После инкубации проводили проточную цитометрию.

Схема инкубации проб с антителами для проточной цитометрии.

1. автофлуоресценция
2. изотип Alexa 647
3. Lox1
4. крамизол 100 нМ Lox1
5. SR-B1
6. крамизол 100 нМ SR-B1
7. CD36
8. крамизол 100 нМ CD36

### 3. Результаты и их обсуждение

#### 3.1. Острая модель дислипидемии.

В предыдущих опытах на модели алиментарного холестерина АС у кроликов было обнаружено выраженное гиполипидемическое действие крамизола [Даутова Г.С. и др., 1994]. Предполагается, что в механизме антиатерогенного действия данного оригинального соединения имеет значение его цитопротективная способность мощно стимулировать тканевый энергетический обмен. Это позволило в свое время рекомендовать препарат крамизол для применения в клинической практике при поражениях миокарда [Недошивин и др., 2002]. Известно, что с целью первичного выявления гиполипидемической активности новых соединений и оценки потенциальных свойств используется модель острой тритоновой гиперлипидемии, которая характеризуется значительным увеличением в крови концентрации проатерогенных фракций и субфракций ЛП [Holt P.R. et al., 1980; Окуневич И.В. и др., 2014].

##### 3.1.1. Влияние крамизола на липиды в сыворотке крови крыс в острой модели ДЛП.

В ходе исследования было показано, что внутрибрюшинное введение тритона WR-1339 крысам вызывало достоверное повышение уровней общего ХС, ТГ и наблюдалось увеличение расчётного показателя - коэффициента атерогенности (КА), отражающего степень развития ДЛП (таблица 11). 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 антиатерогенных ХС ЛПВП. Курсовое введение фенофибрата и крамизола в течение 7-ми дней, а также 2-х кратное совместное применение каждого из них с детергентом тритоном WR-1339 приводило к снижению повышенного уровня общего ХС, ТГ и КА. Введение фенофибрата приводило к снижению общего ХС вдвое по сравнению с контрольной группой, которой вводили детергент тритон WR-1339, и

снижению триглицеридов в 2,5 раза по сравнению с контрольной группой, которой вводили детергент тритон WR-1339. Введение крамизола также приводило к снижению общего холестерина на 50% по сравнению с контрольной группой, которой вводили детергент тритон WR-1339 и снижению общего холестерина в 2 раза по сравнению с контрольной группой, которой вводили детергент тритон WR-1339. Следует отметить, что эталонный и тестируемый препараты – фенофибрат и крамизол имели сходный профиль гиполипидемического действия (таблица 11).

Таблица 11 – 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 – холестерин

коэффициент атерогенности. Данные представлены как среднее арифметическое  $\pm$  стандартная ошибка среднего арифметического.  $n$  – число животных в группе.

### 3.1.2. Влияние крамизола на активность генов крысы, связанных с липидным обменом, в острой модели дислипидемии.

В опытах при молекулярно-генетическом исследовании у крыс на модели острой тритоновой ДЛП отмечалось резкое снижение экспрессии гена АПОА1 в печени на 80% по сравнению с интактной группой животных. Введение фенофибрата практически не повлияло на сниженный уровень экспрессии гена АПОА1 после введения детергента. В тоже время введение крамизола нормализовало сниженный уровень экспрессии гена АПОА1 в печени при экспериментально индуцированной ДЛП – по сравнению с группой, которой вводили детергент тритон WR-1339, экспрессия *apoA1* возросла на 70%.

При молекулярно-генетическом исследовании у крыс на модели острой 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. Введение фенофибрата практически не повлияло на сниженный уровень экспрессии гена *ApoC2* после введения детергента. Введение крамизола также не повлияло на сниженный уровень экспрессии гена *ApoC2* в печени при экспериментально индуцированной ДЛП. Уровень экспрессии *scarb1* при введении фенофибрата многократно повышался по сравнению с группой, которой вводили детергент тритон WR-1339. При введении крамизола уровень экспрессии *scarb1* также многократно повышался по сравнению с группой, которой вводили детергент тритон WR-1339. Данные по экспрессии исследуемых генов представлены в таблице 12 и рис. 3-4.

Таблица – 12 Влияние крамизола на экспрессию генов липидного обмена в печени крыс при экспериментальной острой гиперлипидемии, вызванной тритоном WR-1339

	Контроль Интактные крысы (n=8)	Тритон WR-1339 (n=8)	Фенофибрат + тритон WR-1339 (n=9)	Крамизол + тритон WR-1339 (n=8)
apoA1, мРНК	1,000±0,216	0,213±0,026 *	0,149±0,020 #	1,113±0,246 #@
Scarb1, мРНК	1,000±0,632	0,014±0,010	0,309±0,167	0,215±0,142
ApoC2, мРНК	1,000±0,480	–	–	–
Pdia2, мРНК	1,000±0,506	–	–	–

Примечание: \* –  $p < 0,01$  по отношению к группе интактных животных; # –  $p < 0,01$  по отношению к группе крыс, получавших тритон WR-1339. 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 гена *APOA1* в группах. Выравнивание производилось по среднему геометрическому двух референсных генов (*Actb* и *Gapdh*). Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка. n – число животных в группе.

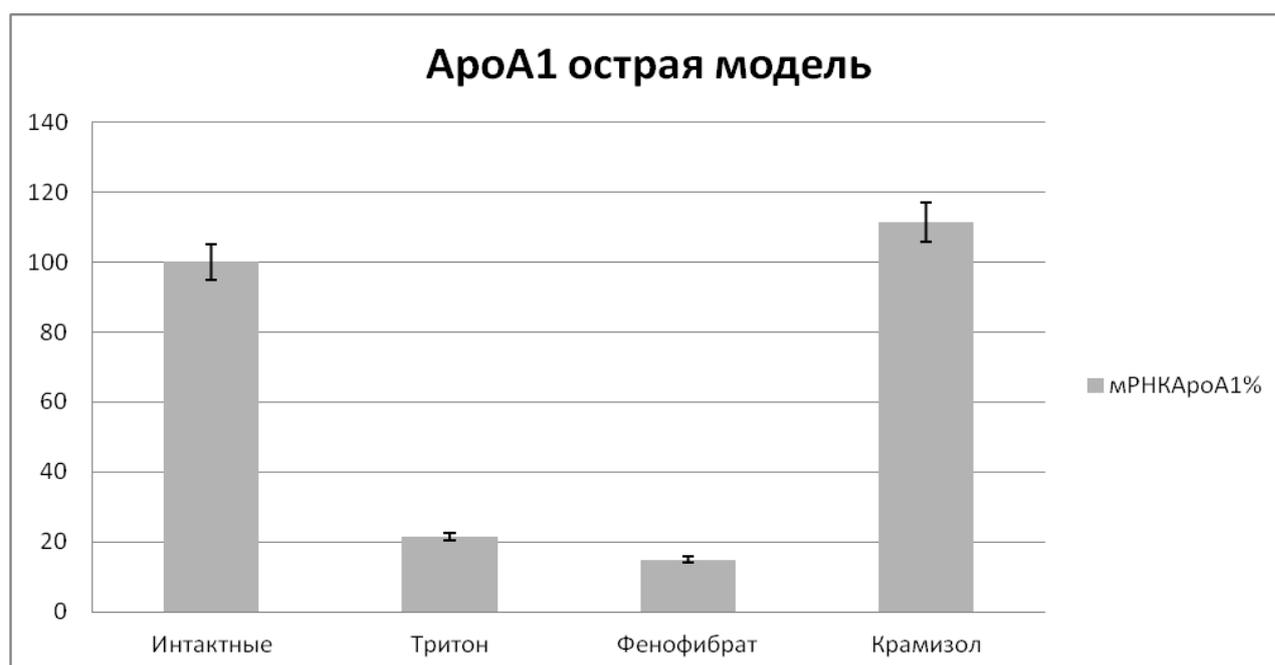


Рисунок – 3 Влияние крамизола на экспрессию гена *apoA1* (м РНК) в печени крыс при экспериментальной острой гиперлипидемии, вызванной тритоном WR-1339. Данные представлены в процентном соотношении (значение интактной группы принято за 100%)  $\pm$  стандартная ошибка среднего арифметического, графическое выражение

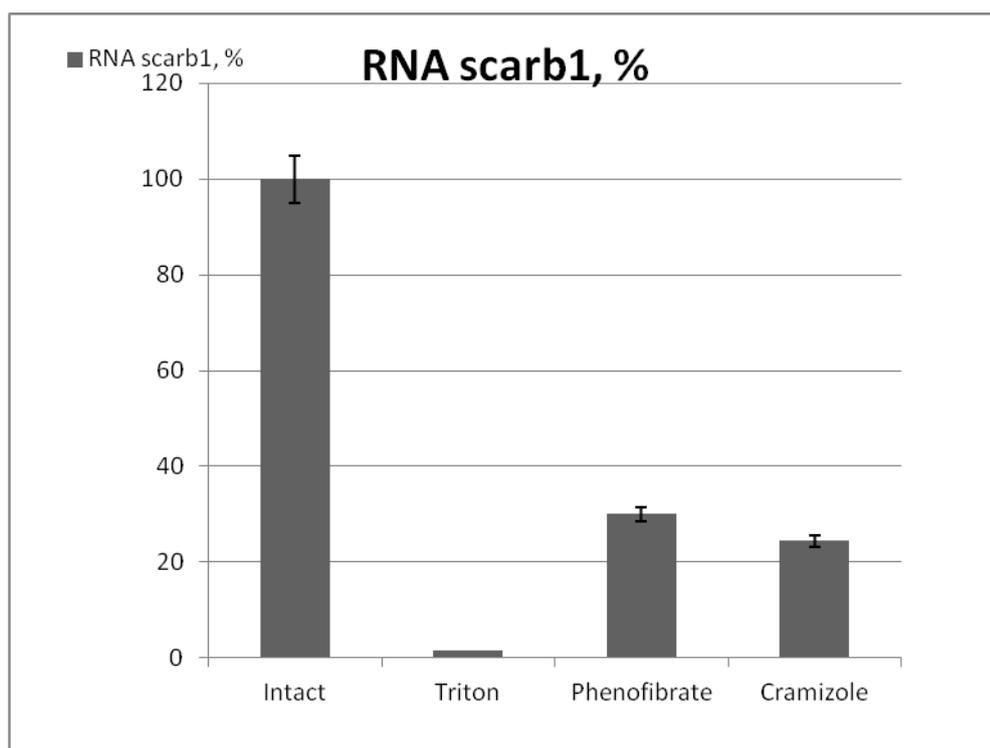


Рисунок – 4 Влияние крамизола на экспрессию гена *Scarb1* (м РНК) в печени крыс при экспериментальной острой гиперлипидемии, вызванной тритоном WR-1339. Данные представлены в процентном соотношении (значение интактной группы принято за 100%)  $\pm$  стандартная ошибка среднего арифметического, графическое выражение.

### 3.2. Хроническая модель дислипидемии

В опытах на модели алиментарного холестерина АС у кроликов было обнаружено выраженное антиатеросклеротическое действие крамизола [Даутова, Г.С. и др., 1994]. Мы предположили, что в механизме действия крамизола имеет значение его способность влиять на экспрессию генов липидного обмена. Для

выяснения вероятного механизма действия крамизола мы использовали модель хронической алиментарной ДЛП, которая характеризуется плавным увеличением в крови концентрации проатерогенных фракций и субфракций ЛП – ЛПОНП, общего ХС и ТГ [Хныченко Л.К. и др., 2016].

### 3.2.1. Влияние крамизола на липидный профиль крысы в хронической модели дислипидемии.

В данном исследовании было показано, что ГХС диета, вызывала у крыс повышение уровней общего ХС на 60%, ТГ на 100% и величину холестерина КА, отражающего степень развития ДЛП, на 360%, а также снижение уровня ЛПВП на 65% (таблица 12). Гиперлипидемия зависит от количества ХС и других жиров в диете, которую получали подопытные животные в течение месяца. Следует подчеркнуть, что наряду с повышением общего ХС при ГХС диете отмечалось снижение уровня ХС антиатерогенных ЛПВП. Таким образом, ГХС диета не только повышает уровень атерогенных форм липопротеидов в сыворотке крови, но и отрицательно влияет на общий обмен липидов, снижая факторы, антиатерогенные липопротеиды. Курсовое введение препарата сравнения фенофибрата и исследуемого вещества крамизола в течение 30-и дней при ГХС диете приводило к снижению повышенного уровня общего ХС. Введение фенофибрата снижало уровень общего ХС на 35%. В то же время введение крамизола снижало уровень общего ХС на 45% (таблица 12). Важно подчеркнуть, что введение крамизола при ГХС диете приводило к снижению повышенного в условиях моделирования уровня ТГ на 70% (таблица 12). При этом введение фенофибрата при ГХС диете не привело к достоверным изменениям уровня ТГ. Введение фенофибрата и крамизола при ГХС диете также привело к повышению уровня ХС ЛПВП. Введение фенофибрата повышало уровень ХС ЛПВП на 200%. Введение крамизола повышало уровень ХС ЛПВП на 300% (таблица 13).

Таблица – 13 Влияние крамизола на уровень липидов сыворотки крови крыс и расчётный коэффициент атерогенности в условиях экспериментальной ДЛП, вызванной холестериновой диетой

ГРУППЫ ЖИВОТНЫХ	Группа 1 Контроль интактные крысы <i>n</i> =9	Группа 2 Гипер холестериновая диета <i>n</i> =6	Группа 3 Фенофибрат + Гипер холестериновая диета <i>n</i> =8	Группа 4 Крамизол + Гипер холестериновая диета <i>n</i> =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; # -  $p < 0,05$ , ## -  $p < 0,01$  различия достоверны в сравнении с группой крыс, получавших гиперхолестериновую диету, КА – холестериновый коэффициент атерогенности. *n* – число особей в группе. Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего арифметического.

### 3.2.2. 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. Введение фенофибрата не изменило уровень экспрессии гена *apoA1* по сравнению с группой ГХС диеты. В тоже время введение крамизола повышало уровень экспрессии гена *apoA1* в печени на 300% по сравнению с группой ГХС диеты в условиях экспериментально индуцированной хронической ДЛП (4,113 по сравнению с интактной группой животных, значение которой было принято за 1,000).

В опытах при молекулярно-генетическом исследовании у крыс на модели хронической холестериновой ДЛП наблюдалась тенденция к снижению экспрессии гена *Scarb1* на 20% в группе ГХС диеты по сравнению с группой интактного контроля.

Что касается экспрессии гена *Scarb1*, то в опытах при молекулярно-генетическом исследовании у крыс на модели хронической ДЛП для экспрессии гена *Scarb1* была показана тенденция к снижению на 30% (0,741 по сравнению с интактной группой, значение которой было принято за 1,000). Экспрессия гена *Scarb1* по сравнению с группой ГХС диеты снизилась на 40% в группе фенофибрата. В то же время экспрессия гена *Scarb1* в группе крамизола снизилась на 60% по сравнению с группой ГХС диеты.

У группы с ГХС диетой отмечено повышение экспрессии гена *ApoC2* в печени на 100%. Введение фенофибрата снизило уровень экспрессии гена *ApoC2* на 100% по сравнению с группой ГХС диеты. В то же время введение крамизола увеличило уровень экспрессии гена *ApoC2* в печени на 250% по сравнению с группой ГХС диеты при экспериментально индуцированной хронической ДЛП.

У группы с ГХС диетой отмечено понижение экспрессии гена *Pdia2* в печени на 60% (0,407 по сравнению с интактной группой животных, значение которой было принято за 1,000). Введение фенофибрата достоверно не изменило уровень экспрессии гена *Pdia2* по сравнению с группой ГХС диеты. В то же время введение крамизола увеличило уровень экспрессии гена *Pdia2* в печени на 40% по сравнению с группой ГХС диеты.

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*. Увеличение количества мРНК *apoA1* позволяет сохранять необходимый уровень ЛПВП в плазме крови. 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 хиломикронов [Rhainds D. et al, 2004]. Повышение экспрессии гена *ApoC2* может влиять на разные пути липидного обмена. Белок АпоС2 является аполипопротеином ЛПНП. Увеличение его экспрессии повышает поглощение липидов этими липопротеиновыми частицами. С другой стороны, АпоС2 повышает активность липопротеинлипазы (ЛПЛ), что способствует увеличению её активности и усилению метаболизма липидов, в том числе липидов плазмы крови [Wolska A. et al, 2017]. Из полученных данных следует, что это является механизмом понижения уровня триглицеридов в плазме крови при введении крамизола подопытным животным. Данные по экспрессии генов интереса представлены в таблице 14 и рис. 5-8.

Таблица – 14 Влияние крамизола на экспрессию гена *АПОА1*, *Scarb1*, *АПОС2* и *Pdia2* в печени крыс при экспериментальной хронической гиперлипидемии

Группы животных	Группа 1 Контроль	Группа 2 Гиперхолес	Группа 3 Фенофибрат +	Группа 4 Крамизол +
-----------------	----------------------	------------------------	--------------------------	------------------------

	интактные крысы <i>n</i> =9	териновая диета <i>n</i> =6	гиперхолестер иновая диета <i>n</i> =8	гиперхолестеринова я диета <i>n</i> =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.

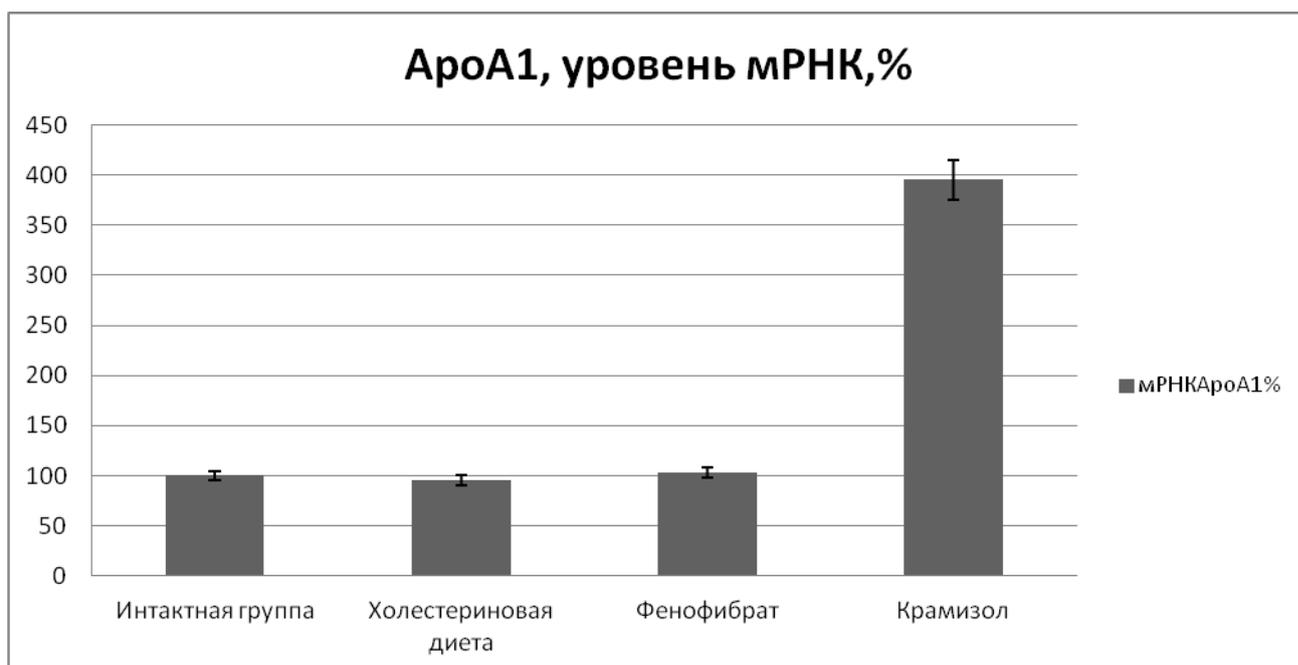


Рисунок – 5 Влияние крамизола на экспрессию гена *apoA1* (м РНК) в печени крыс при экспериментальной хронической гиперлипидемии, вызванной холестериновой диетой. Данные представлены в процентном соотношении (значение интактной группы принято за 100%)  $\pm$  стандартная ошибка среднего арифметического графическое выражение

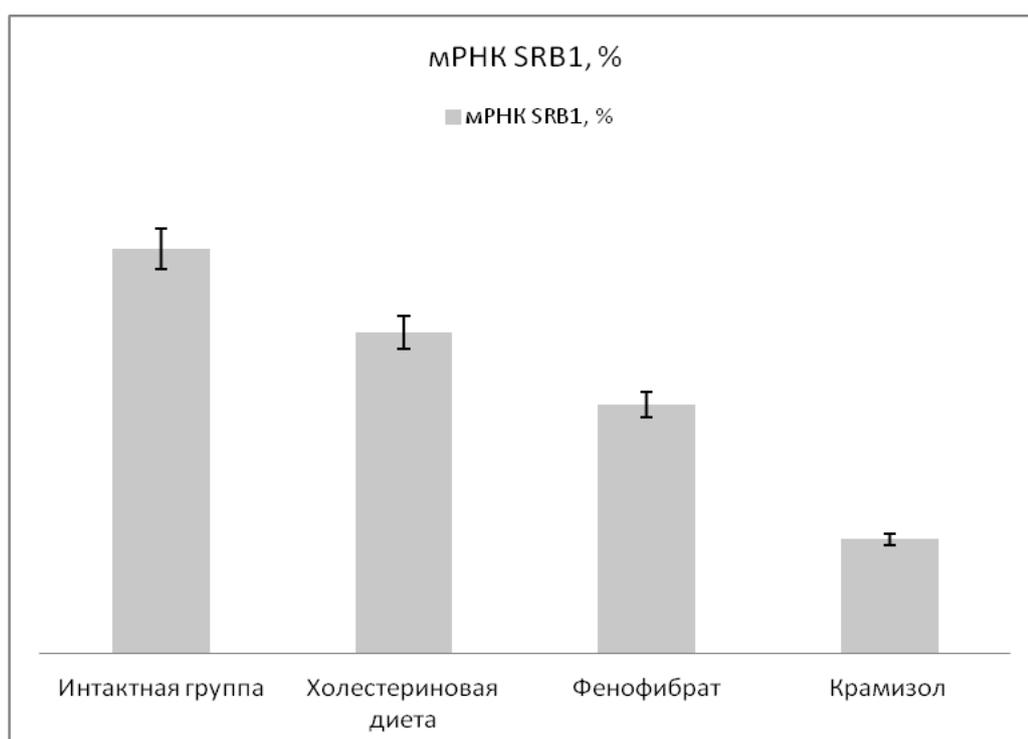


Рисунок – 6 Влияние крамизола на экспрессию гена *Scarb1* (м РНК) в печени крыс при экспериментальной хронической гиперлипидемии, вызванной холестериновой диетой. Данные представлены в процентном соотношении (значение интактной группы принято за 100%)  $\pm$  стандартная ошибка среднего арифметического графическое выражение

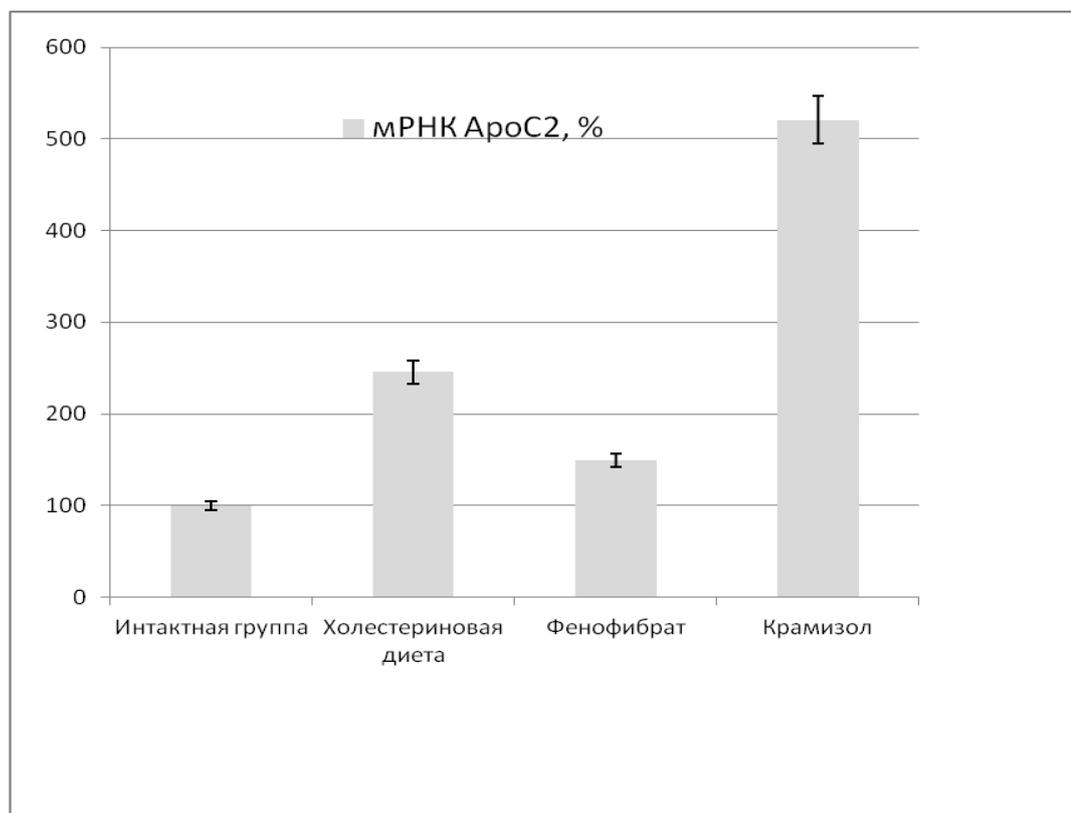


Рисунок – 7 Влияние крамизола на экспрессию гена *ApoC2* (м РНК) в печени крыс при экспериментальной хронической гиперлипидемии, вызванной холестериновой диетой. Данные представлены в процентном соотношении (значение интактной группы принято за 100%)  $\pm$  стандартная ошибка среднего арифметического графическое выражение

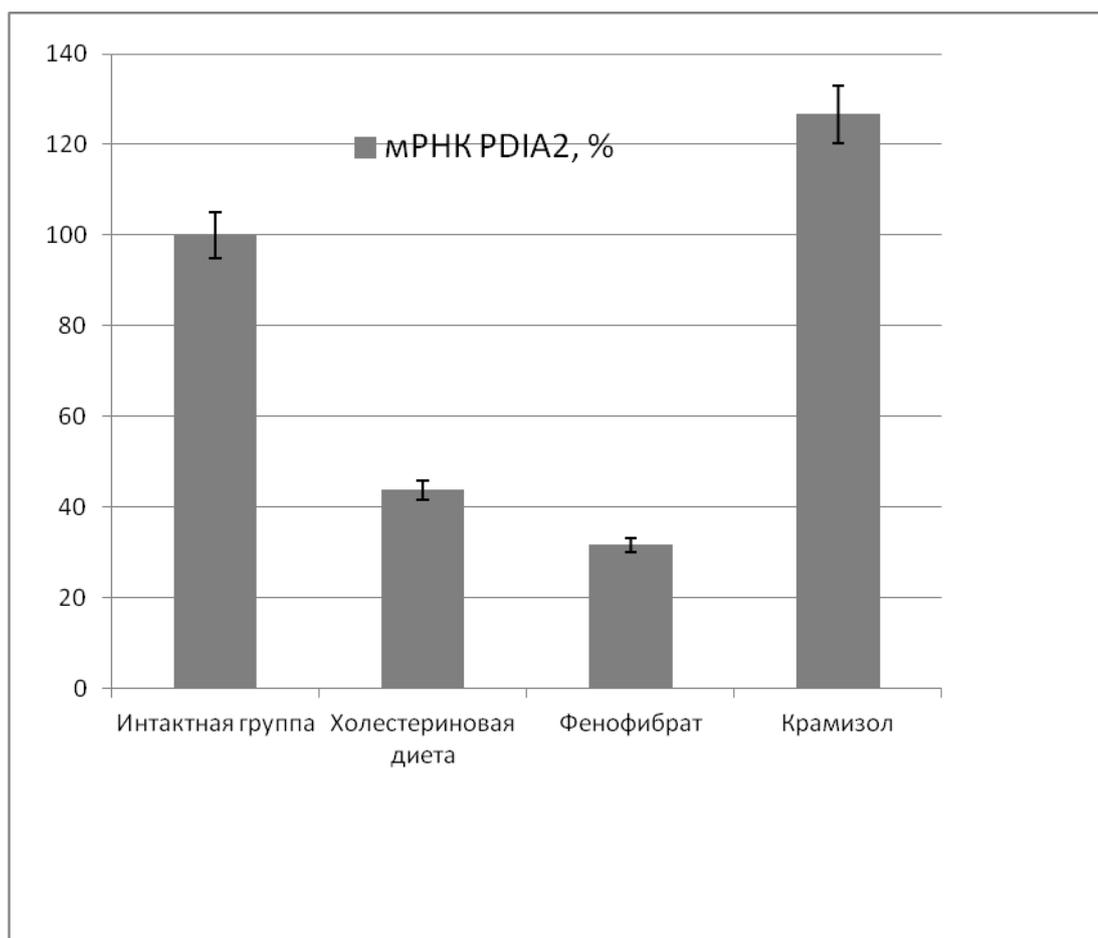


Рисунок – 8 Влияние крамизола на экспрессию гена *Pdia2* (м РНК) в печени крыс при экспериментальной хронической гиперлипидемии, вызванной холестериновой диетой. Данные представлены в процентном соотношении (значение интактной группы принято за 100%)  $\pm$  стандартная ошибка среднего арифметического графическое выражение

### 3.3.Изменение экспрессии белков, участвующих в липидном обмене, и их генов, в макрофагах человеческой культуры (THP1)

В ходе исследований была проведена проточная цитометрия с антителами к белкам АПОА1, SR-B1, LOX1, CD36. Клетки культуры THP1 были обработаны, в разных пробах, бычим сывороточным альбумином (БСА, контроль), окисленными ЛПНП человека, окисленными ЛПНП человека и препаратом крамизола в концентрациях, соответственно 10 нМ, 1  $\mu$ М и 10  $\mu$ М. 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 15 и на рис. 9.

Таблица – 15 Влияние крамизола на захват окисленных ЛПНП в культуре клеток макрофагов ТНР 1

	Группа 1 Контроль	Группа 2 окLDL	Группа 3 Крамизол 10 нМ + окLDL	Группа 5 Крамизол 1 мМ + окLDL	Группа 6 Крамизол 10 мМ + окLDL
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; # –  $p < 0,05$ ; ## –  $p < 0,01$  различия достоверны в сравнении с группой, обработанной окисленными ЛПНП (оксЛПНП). Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего арифметического.

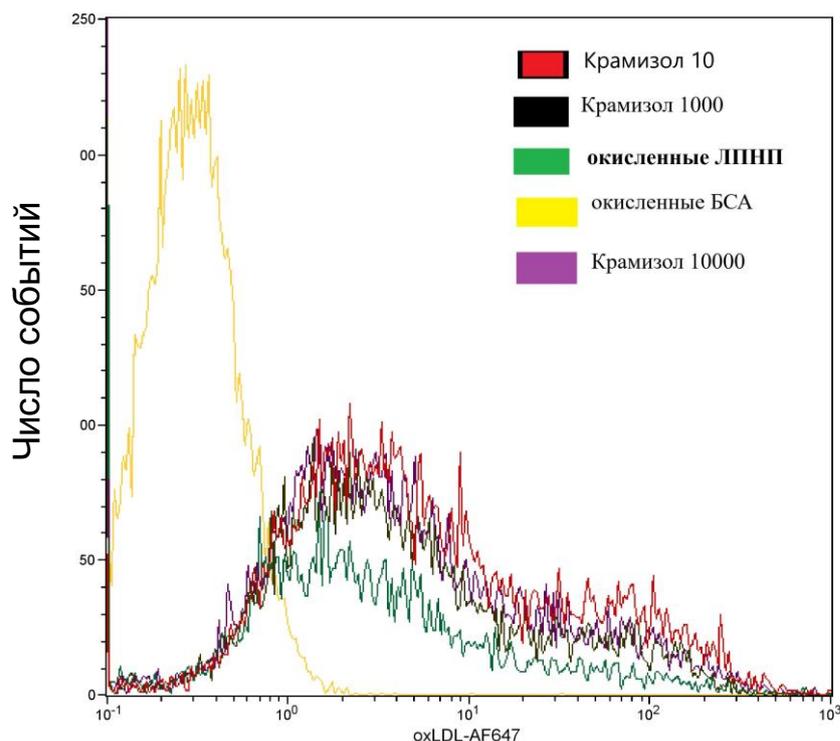


Рисунок – 9 Влияние крамизола на захват окисленных ЛПНП в культуре клеток макрофагов человека THP1 по данным проточной цитометрии. Обработка оксЛПНП (зеленый), обработка БСА (желтый), обработка оксЛПНП +Крамизол 10 нМ (красный), обработка оксЛПНП + крамизол 1  $\mu$ М (черный) обработка оксЛПНП + крамизол 10  $\mu$ М (фиолетовый)

Повышенный захват макрофагами окисленных ЛПНП в присутствии крамизола, по-видимому, обусловлен его влиянием на экспрессию генов, кодирующих скавенджер рецепторы, ответственных за интернализацию окисленных ЛПНП. Для проверки этого предположения были проведены соответствующие эксперименты.

В таблице 16 представлены данные по влиянию различных концентраций крамизола на уровень мРНК гена *SR-B1* (результаты Real-time RT-PCR). Экспрессия гена *SR-B1* в культуре клеток THP1 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*,

достигавшее 4,4 раз относительно клеток, инкубированных с окисленными ЛПНП, при максимальных концентрациях крамизола.

Уровень влияния крамизола на уровень поверхностных SR-B1 оценивали методом проточной цитометрии. Установлено, что при обработке культуры макрофагов THP1 окисленными ЛПНП уровень поверхностных SR-B1 падает на треть по сравнению с клетками, обработанными окисленным БСА. При этом обработка крамизолом во всех концентрациях приводила к повышению уровня поверхностных SR-B1 по сравнению с клетками, обработанными только ЛПНП. Но дозозависимости данного эффекта не регистрировалось. Данные представлены в таблице 18 и на рис. 11.

Таблица – 16 Влияние крамизола на экспрессию гена *SR-B1* в культуре клеток макрофагов THP 1 при обработке окисленными ЛПНП (oxLDL)

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>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: \* –  $p < 0,05$  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.

Таблица – 17 Влияние крамизола на содержание 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 1μМ + оксЛПНП	Группа 6 Крамизол 10μМ + оксЛПНП
SR-B1	0,24±0,013	0,46±0,052*	1,5±0,041 #	1,05±0,027 #	1,15±0,086 #

Примечание: \* –  $p < 0,05$  различия достоверны по отношению к группе контроля; # –  $p < 0,05$ ; ## обработка оксЛПНП +  $p < 0,01$  различия достоверны в сравнении с группой, обработанной окисленными ЛПНП (оксЛПНП). Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего арифметического.

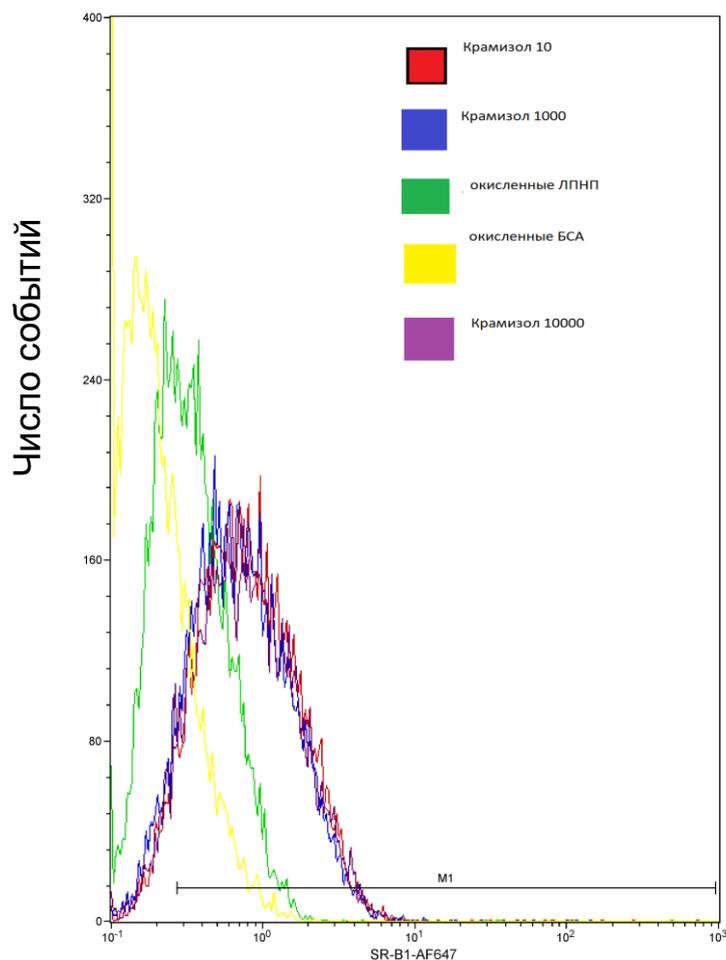


Рисунок – 10 Влияние крамизола на содержание поверхностного рецептора *SR-B1* в культуре клеток макрофагов человека THP1 при обработке окисленными ЛПНП. Проточная цитометрия, график. Обработка оксЛПНП (зеленый), обработка БСА (желтый), обработка оксЛПНП +Крамизол 10 нм (красный), обработка оксЛПНП + крамизол 1  $\mu$ М (синий) обработка оксЛПНП + крамизол 10  $\mu$ М (фиолетовый)

При обработке культуры макрофагов THP-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  $\mu$ М и 10  $\mu$ М значимое повышение экспрессии наблюдалось только при максимальной концентрации 10  $\mu$ М – 2,5 раза по сравнению с клетками, обработанными только окисленными ЛПНП. При

остальных концентрациях изменения были недостоверны. Данные представлены в таблице 20.

Установлено, что при обработке культуры макрофагов ТНР1 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 мМ приводила к дозозависимому повышению уровня поверхностных LOX1 по сравнению с клетками, обработанными только окисленными ЛПНП. Инкубация клеток с крамизолом в концентрации 10 мМ приводила к резкому падению уровня поверхностных рецепторов LOX1 до уровня контрольных клеток, обработанных БСА. Данные представлены в таблице 21 и на рис. 12.

Таблица – 20 Влияние крамизола на экспрессию гена *LOX1* в культуре клеток макрофагов ТНР 1 при обработке окисленными ЛПНП

Гены	Группа 1 Изотип	Группа 2 оксЛПНП	Группа 3 Крамизол 10нМ + оксЛПНП	Группа 4 Крамизол 100нМ + оксЛПНП	Группа 5 Крамизол 1мМ + оксЛПНП	Группа 6 Крамизол 10мМ + 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.

Таблица – 21 Влияние крамизола на содержание 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 1μМ + оксЛПНП	Группа 6 Крамизол 10μМ + оксЛПНП
LOX1	0,24±0,013	0,86±0,106 *	1,19±0,071 #	1,32±0,035 #	0,58±0,042 #

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.

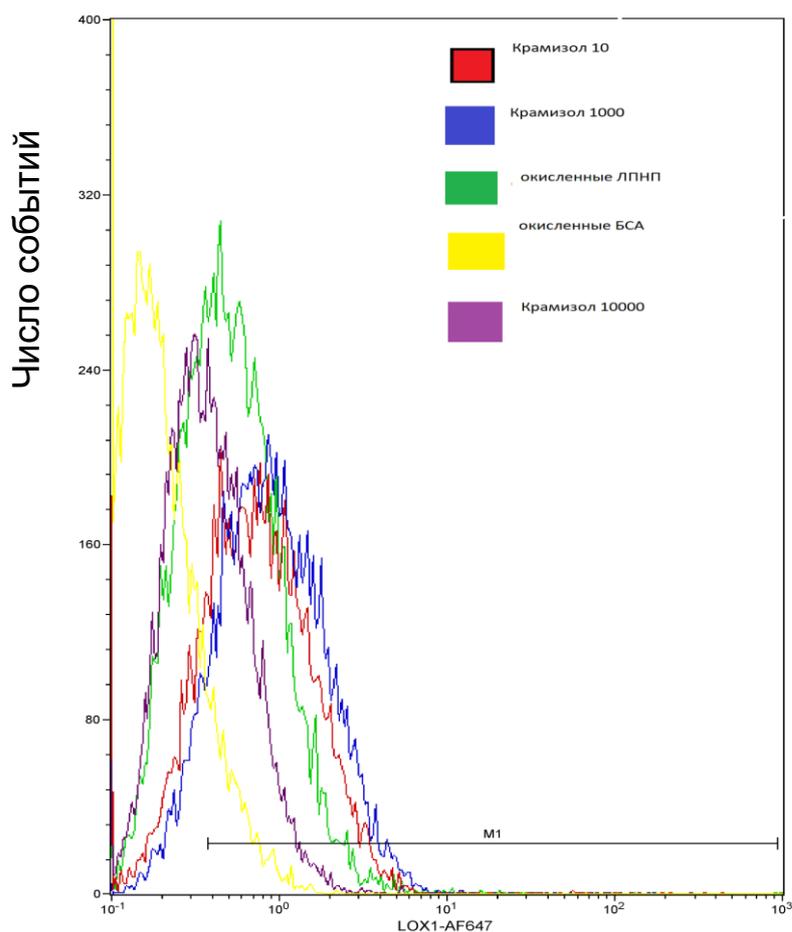


Рисунок – 11 Влияние крамизола на количество поверхностного рецептора LOX1 в культуре клеток макрофагов человека THP1 при обработке окисленными ЛПНП (оксЛПНП). Проточная цитометрия, график. Обработка оксЛПНП (зеленый), обработка БСА (желтый), обработка оксЛПНП +Крамизол 10 нм (красный), обработка оксЛПНП + крамизол 1  $\mu$ М (синий) обработка оксЛПНП + крамизол 10  $\mu$ М (фиолетовый)

При добавлении к культуре макрофагов THP-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  $\mu$ М и 10  $\mu$ М и окисленных ЛПНП наблюдалось повышение уровня мРНК гена *CD36*. Максимумом это повышение достигало при максимальной концентрации крамизола 10  $\mu$ М – в 3,5 раза по

сравнению с клетками, обработанными только окисленными ЛПНП. Но дозозависимого эффекта не наблюдалось. Данные представлены в таблице 22.

Установлено, что при обработке культуры макрофагов ТНР1 окисленными ЛПНП уровень поверхностных рецепторов CD36 возрастает по сравнению с клетками, обработанными БСА. При этом обработка крамизолом только в концентрации 1 мкМ приводила к повышению уровня поверхностных CD36 по сравнению с клетками, обработанными только окисленными ЛПНП. Данные представлены в таблице 23 и на рис. 12.

Таблица – 22 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 10нМ + оксЛПНП	Группа 4 Крамизол 100нМ + оксЛПНП	Группа 5 Крамизол 1μМ + оксЛПНП	Группа 6 Крамизол 1μМ + 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: \* –  $p < 0,05$  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.

Таблица – 23 Влияние крамизола на содержание белка CD36 в культуре клеток макрофагов THP 1 при обработке окисленными ЛПНП (oxLDL)

Белки	Группа 1 контроль	Группа 2 оксЛПНП	Группа 3 Крамизол 10нМ + оксЛПНП	Группа 5 Крамизол 1μМ + оксЛПНП	Группа 6 Крамизол 10μМ + оксЛПНП
CD36	1,58±0,027	11,44±0,265 *	10,17±0,302 #	12,91±0,366 #	11,38±0,375

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 представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего арифметического.

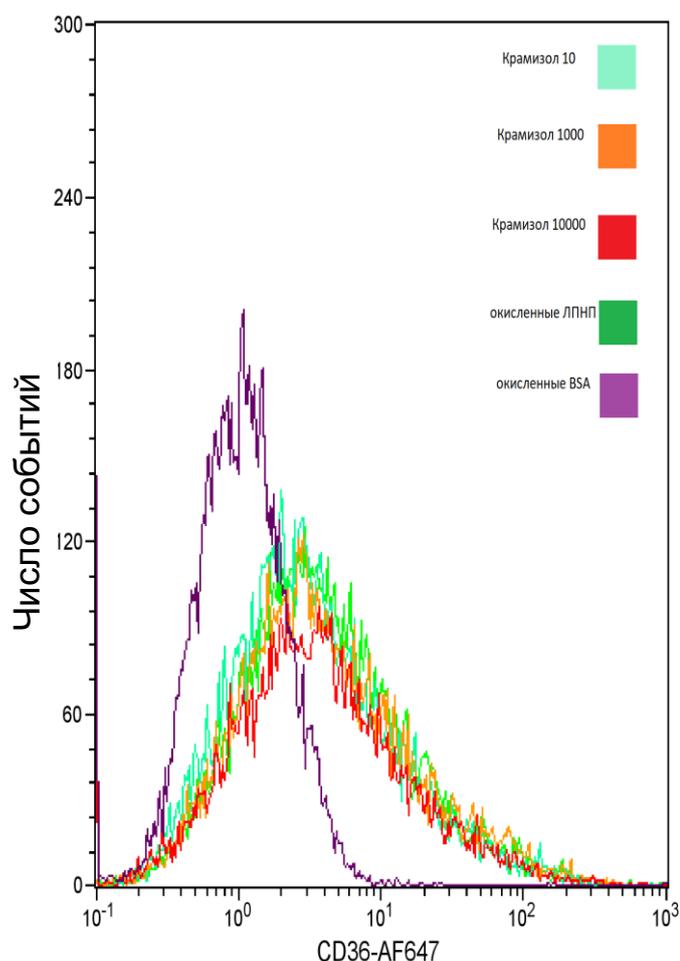


Рисунок – 12 Влияние крамизола на содержание поверхностных рецепторов *CD36* в культуре клеток макрофагов человека THP1 при обработке окисленными ЛПНП (оксЛПНП). Проточная цитометрия, график. Обработка оксЛПНП (зеленый), обработка БСА (фиолетовый), обработка оксЛПНП +Крамизол 10 нМ (бирюзовый), обработка оксЛПНП + крамизол 1  $\mu$ М (оранжевый) обработка оксЛПНП + крамизол 10  $\mu$ М (красный)

Экспрессия гена *АПОА1* в культуре клеток THP1 при обработке клеток окисленными ЛПНП проявляла тенденцию к повышению по сравнению с контрольной группой. При обработке культуры клеток THP1 крамизолом в концентрациях 10 нМ, 100 нМ, 1  $\mu$ М и 10  $\mu$ М 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.

В ходе опыта по проточной цитометрии было показано, что окисленные ЛПНП человека повышают уровень белка АПОА1 по сравнению с клетками, обработанными BSA. При обработке культуры клеток ТНР1 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 16 и на рис. 10.

Таблица – 16 Влияние крамизола на уровень экспрессии гена *АПОА1*, 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>АpoA1</i> , мРНК	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.

Таблица 17 – Влияние крамизола на уровень экспрессии 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 1μМ + оксЛПНП	Группа 6 Крамизол 10μМ + оксЛПНП
АроА1	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;# –  $p < 0,05$  различия достоверны в сравнении с группой, обработанной окисленными ЛПНП (оксЛПНП). Данные представлены как среднее арифметическое  $\pm$  стандартная ошибка среднего арифметического.

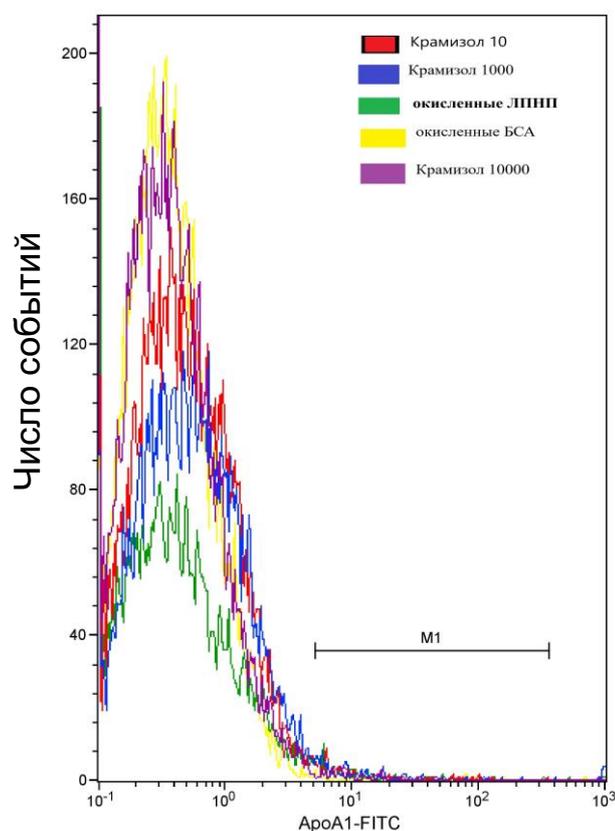


Рисунок – 13 Влияние крамизола на уровень экспрессии белков АПОА1 в культуре клеток макрофагов человека THP1 при обработке окисленными ЛПНП (оксЛПНП). Проточная цитометрия, график. Обработка оксЛПНП (зеленый), обработка БСА (желтый), обработка оксЛПНП +Крамизол 10 нМ (красный), обработка оксЛПНП + крамизол 1μМ (синий) обработка оксЛПНП + крамизол 10 μМ (фиолетовый)

Таким образом, можно сделать вывод, что крамизол в разной концентрации активирует в макрофагах разные скэвенджер рецепторы. Активация экспрессии генов скэвенджер 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 скэвенджер 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. Стоит отметить, что повышение уровня мРНК генов скэвенджер рецепторов и повышение содержания самих скэвенджер рецепторов на поверхности клеток связаны нелинейно, что, возможно, свидетельствует о различных механизмах регуляции крамизолом активности скэвенджер рецепторов на посттранскрипционном и посттрансляционном уровнях.

#### 3.4.Изменение экспрессии белков в культуре перитонеальных макрофагов крысы.

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

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

Экспрессия Lox1 в культуре перитонеальных макрофагов, обработанных крамизолом в концентрации 100 нМ повышается по сравнению с необработанными клетками. Экспрессия рецептора Cd36 в культуре перитонеальных макрофагов крысы при обработке клеток крамизолом в концентрации 100 нМ также повышается по сравнению с необработанными клетками.

Таблица – 24 Влияние крамизола на содержание поверхностных скэвенджер рецепторов Scarb1, Lox1, и Cd36 в культуре клеток перитонеальных макрофагов крысы

	Группа 1 Необработанные клетки	Группа 2 Обработанные клетки
Scarb1	5,5±0,055	2,75±0,025*
Lox1	4,93±0,044	6,41±0,027*
Cd36	5,75±0,054	7,75±0,056*

Примечание: \* –  $p < 0,05$  различия достоверны по отношению к группе необработанных клеток. Данные выражены в условных единицах и представлены как среднее арифметическое ± ошибка среднего.

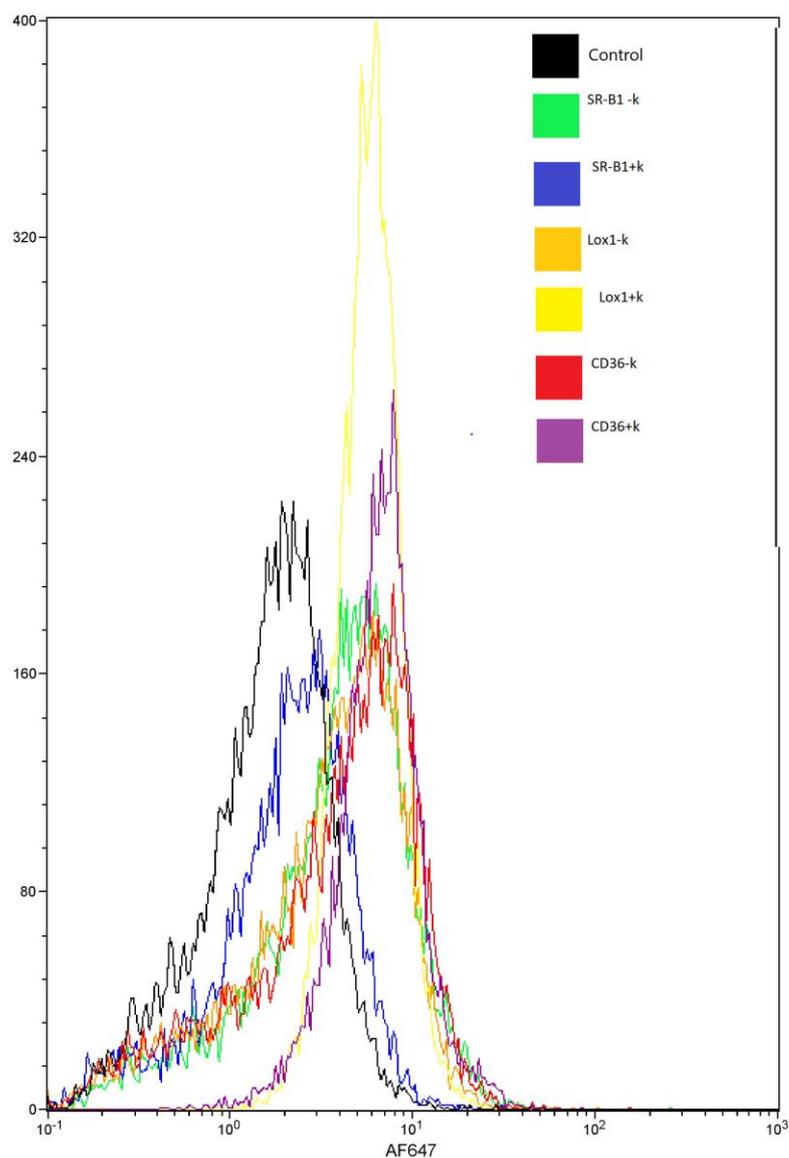


Рисунок – 14 Влияние крамизола на содержание поверхностных скэвенджер рецепторов в культуре клеток перитонеальных макрофагов крысы. Проточная цитометрия, график. Контроль – черный, экспрессия Scarb1 без обработки крамизолом – зеленый, экспрессия Scarb1 при обработке крамизолом – синий, экспрессия Lox1 без обработки крамизолом – оранжевый, экспрессия Lox1 при обработке крамизолом – желтый, экспрессия Cd36 без обработки крамизолом – красный, экспрессия Cd36 при обработке крамизолом – фиолетовый

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

генов скэвенджер 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 скэвенджер 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 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 приносит 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 [Rhainds 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  $\alpha$ -рецепторов, активирующих пролиферацию пероксисом (PPAR- $\alpha$ ). В результате активации PPAR- $\alpha$  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 *АроС3* [Tenenbaum A. et al, 2012], что может обуславливать повышение уровня ЛПВП без увеличения уровня экспрессии *АПОА1* в нашем эксперименте. Повышение экспрессии гена *АПОС2* 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.

Основным механизмом гиполипидемического действия фибратов, в том числе фенофибрата, является снижение синтеза триацилглицеролов (ТАГ) и увеличение их гидролиза. Фибраты, являясь агонистами рецептора, активируемого пероксисомным пролифератором (PPAR), действуют на ядерные рецепторы, увеличивая экспрессию генов, которые регулируют синтез ключевых ферментов липидного обмена и белков метаболизма липопротеинов [Debin L. et al, 2005]. 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].

Из полученных результатов 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 пенистых 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, ацелированных 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. Из вышеизложенного можно сделать вывод, что крамизол следует рассматривать как потенциальное гиполипидемическое средство терапевтического либо профилактического ряда.

## 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 скэвенджер рецепторов *Lox1* и *Cd36* и снижает экспрессию скэвенджер рецептора *Scarb1* на поверхности клеток.
4. В клеточной модели макрофагов человека ГНР-1 крамизол усиливает захват клетками окисленных ЛПНП, который коррелирует с повышением количества скэвенджер 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 использованных сокращений

- АПОА1 – аполипопротеин А1  
АПОА1 – аполипопротеин А1  
АпоЕ – аполипопротеин Е  
АПОЕ – аполипопротеин Е  
АпоС2 – аполипопротеин С2  
АПОС2 – аполипопротеин С2  
АпоС3 – аполипопротеин С3  
АроС3 – аполипопротеин С3  
SR-B1 – скэвенджер рецептор В1  
Scarb1 - скэвенджер рецептор В1 крыс  
LOX1 – скэвенджер рецептор Е1 (LOX1)  
Lox1 - скэвенджер рецептор LOX1 крысы  
CD36 - скэвенджер рецептор CD 36 человека  
Cd36 - скэвенджер рецептор CD 36 крысы  
PDIA2 – протеиндисульфидизомераза А2  
Pdia2 – протеиндисульфидизомераза А2 крысы  
АС – атеросклероз
- ДЛП – дислипопротеинемия
- ЛП – липопротеины
- ТГ – триглицериды
- ХС – общий холестерин
- ИВЗ – иммуновоспалительные заболевания
- РФ – ревматоидный фактор
- ИБС – ишемическая болезнь сердца
- АЦБ – антитела к цитруллинированным белкам

ЛПОНП, VLDL- липопротеины очень низкой плотности

ЛППП – липопротеины промежуточной плотности

ЛПНП, LDL – липопротеины низкой плотности

ЛПВП, HDL – липопротеины высокой плотности

*APOA1* – ген аполипопротеина A1 человека

*SR-B1* – ген скэвенджер рецептора B1 человека

*Scarb1* – ген скэвенджер рецептор B1 крыс

*CD36* - скэвенджер рецептора CD 36 человека

*LOX1* - скэвенджер рецептора LOX1 человека

*APOA1* – ген аполипопротеина A1 крысы

*APOC2* – ген аполипопротеина C2 крысы

*Scarb1* – ген скэвенджер рецептора B1 крысы

*Cd36* – ген скэвенджер рецептора CD 36 крысы

*Lox1* – ген скэвенджер рецептора LOX1 крысы

#### Список литературы

1. Аймагамбетова, А.О. Атерогенез и воспаление. Обзор литературы / А.О. Аймагамбетова // Наука и здравоохранение. – 2016. – Т.1. – С.24-39.
2. Ахмеджанов, Н.М. Анализ распространенности гиперхолестеринемии в условиях амбулаторной практики (по данным исследования арго): часть 1 / Н.М. Ахмеджанов, Д.В. Небиеридзе, А.С. Сафарян, В.А. Выгодин, А.Ю. Шураев, О.Н. Ткачева, А.С. Лишута // Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии. – 2015. – Т.11 (3). – С. 253-260.
3. Беленков, Ю. Н. Статины в современной кардиологической практике / Ю. Н. Беленков, И. В. Сергиенко, А. А. Лякишев, В. В. Кухарчук //М. – 2010. – 64 с.

4. Гусев, Е.Ю. Физиологическая и патогенетическая роль Рецепторов-мусорщиков у человека/ Е.Ю. Гусев, Н.В. Зотова, Ю.А. Журавлева, В.А. Черешнев // Медицинская иммунология. – 2020. – Т.22(№ 1). – С.7-48.
5. Даутова, Г.С. Влияние диметил - (имидазол-1-ил) метасульфоновой кислоты на экспериментальный атерогенез у кроликов / Г.С. Даутова, В.А. Косых, В.С. Репин, Р.А. Камбург // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1994. – Т.57(5). – С.21-24
6. Карагодин, В.П. Воспаление, иммунокомпетентные клетки, цитокины —роль в атерогенезе / В.П. Карагодин, Ю.В. Бобрышев, А.Н. Орехов // Патогенез – 2014. – Т.12(1). – С.21 – 35.
7. Ключева, Н.Н. Коррекция экспериментальной дислипидемии интраназальным введением оригинального ферментного препарата / Н.Н. Ключева, И.В. Окуневич, Н.С. Парфенова, П.Д. Шабанов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2020. – Т. 18(2). – С. 155-160.
8. Кухарчук, В.В. Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза. российские рекомендации, VII пересмотр / В.В. Кухарчук, М.В. Ежов, И.В. Сергиенко, Г.Г. Арабидзе, М.Г. Бубнова, Т.В. Балахонова, В.С. Гуревич, М.А. Качковский, Г.А. Коновалов, В.О. Константинов, П.П. Малышев, С.Д. Покровский, А.А. Соколов, А.Б. Сумароков, Н.Б. Горнякова, А.Г. Обрезан, И.И. Шапошник, М.Б. Анциферов, А.А. Аншелес, Д.М. Аронов // Атеросклероз и дислипидемии. – 2020. – Т.1 (38). – С. 7-40.
9. Могиленко, Д. А. Характеристика альтернативных промоторов гена аполипопротеина А-I человека / Д. А. Могиленко, В. С. Шавва, Э. Б. Диде, С. В. Орлов // Молекулярная биология клетки. – 2019. – Т.53(3). – С.485–496.
10. Насонов, Е.Л. Атеросклероз: перспективы противовоспалительной терапии/ Насонов Е.Л., Попкова Т.Е. // Терапевтический архив. – 2018. – Т.5. – С.4-12.
11. Недошивин, А.О. Цитопротекторы в терапии сердечной недостаточности у больных ишемической болезнью сердца / Автореф. дисс. докт.

наук, Научно-исследовательский институт кардиологии МЗ РФ, Санкт-Петербург – 2002.

12. Окуневич, И. В Анализ результатов комплексного применения препарата левопа: вклад гиполипидемического действия Л-ДОФА в метаболическую терапию больных ишемической болезнью сердца / И.В. Окуневич, Н.С. Сапронов // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии* – 2011. – Т.9(3). – С.65-70.

13. Окуневич, И. В Гиполипидемическая терапия дислипидемий статинами: их роль в комплексном лечении атеросклероза / И.В. Окуневич // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. – 2004. – Т.3(4) – С.2-14.

14. Окуневич, И. В Гиполипидемическое и антиатеросклеротическое действие отечественного оригинального ферментного препарата в эксперименте / И. В. Окуневич, Н. Н. Ключева, Н. С. Парфёнова, Белова Е. В. // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. – 2019. – Т.17(3). – С.79-84.

15. Окуневич, И. В Гиполипидемическое и антиатеросклеротическое действие симпатолитика резерпина: экспериментальные данные / И.В. Окуневич, Л.К. Хныченко, Н.С. Сапронов // *Артериальная гипертензия*. – 2007. – Т.13(7). – С.136-140.

16. Окуневич, И. В. Влияние гипоксена на изменение показателей липидного обмена в условиях экспериментальной дислипидемии / Окуневич И. В., Хныченко Л. К., Шабанов П. Д. // *Обзоры клинической фармакологии и лекарственной терапии*. –2014. –Т.12(3) – С.26–29.

17. Савченко, Н.В. Старые и новые имидазолы для терапии дерматомикозов / Н.В. Савченко, Г.Н. Бурцева, Ю.В. Сергеев // *Успехи медицинской микологии*. – 2016. – Т.15 – С. 169-173.

18. Сергиенко, И. В. Тактика выявления и лечения пациентов с высоким сердечно-сосудистым риском / И.В. Сергиенко, С.Ж. Уразалина, В.В. Кухарчук, Ю.А. Карпов // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. – 2011. – Т.10(7). – С.81-86.

19. Сергиенко, И.В. Патогенез, диагностика и лечение атеросклероза: практические аспекты / И.В. Сергиенко, А.А. Аншелес // Кардиологический вестник. – 2021. – Т. 16(1). – С. 64-72.
20. Сквиззато, А. Статины, фибраты и венозная тромбоэмболия: метаанализ / А. Сквиззато, М. Галли, Э. Ромуалди и др. // Серцева недостатність. – 2011. – Т.2. – С. 107–116.
21. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России. – М., АстраФармСервис, 2011. – 1728 с.
22. Сусеков, А. В Возможности клинического применения препарата эзетимиба Отрио (АО «АКРИХИН», Россия) у пациентов высокого и очень высокого сердечно-сосудистого риска, не достигших целевых значений показателей липидного обмена. Заключение Совета экспертов / Сусеков А. В., Кобалава Ж.Д., Гуревич В.С., Галявич А.С., Каминный А.И., Кашталап В.В., Мареев В.Ю., Сусеков А.В., Шапошник И.И. // Кардиология. – 2019. – Т.59(5) – С.47-57.
23. Титова, Г.В. Взаимодействие холестерина с апопротеином Е – аргининбогатым белком липопротеинов очень низкой плотности / Г.В. Титова, Н.Н. Ключева, К.А. Кожевникова, А.Н. Климов // Биохимия. – 1980. – Т.45. – С.51-55.
24. 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.
25. 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.
26. Ушаков, Р.В. Комбинированная антимикробная химиотерапия (фторхинолоны и имидазолы) в комплексном лечении воспалительных

заболеваний пародонта / Р.В. Ушаков, Н.Н. Нуруев, Т.В. Ушакова, В.М. Карпова, А.А. Арутюнян, А.А. Лабазанов, В.Н. Царев // Клиническая стоматология. – 2021. – Т.1(97). – С. 60-65.

27. Хайдуков, С.В. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов» (проект) / Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян А. А. // Медицинская иммунология. – 2012. – Т.14(3). – С.255-268.

28. Хныченко, Л.К. Исследование гипополипидемического свойства н-холинолитика бензогексония в эксперименте / Л.К. Хныченко, И.В. Окуневич, Н.А. Лосев, Н.С. Сапронов // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2016. – Т.60(1). – С.36-39.

29. Хныченко, Л.К. Ранозаживляющее действие бензосульфоната 1-этил-3-метил-4,5-бис(п-метилкарбомойл) имидазолия / Л.К. Хныченко, Е.Н. Селина, О.М. Родионова, Пиотровский Левон Борисович, Шабанов Петр Дмитриевич // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2020. – Т.18(3). – С. 229-235.

30. Хорольская, В.Г. Влияние фенофибрата на генотоксичность в мозге и печени и на экспрессию генов, регулирующих метаболизм жирных кислот, у мышей / В.Г. Хорольская, А.П. Гуреев, Е.А. Шафоростова, Д.А. Лавер, В.Н. Попов // Биомедицинская химия. – 2019. – Т. 65(5). – С. 388-397.

31. Центральный НИИ организации и информатизации здравоохранения [Электронный ресурс] / Министерство здравоохранения Российской Федерации. – Электрон. дан. – Режим доступа: [http://zo.mednet.ru/bd\\_zo\\_rf/zo\\_rf.php?type=1](http://zo.mednet.ru/bd_zo_rf/zo_rf.php?type=1). – Загл. с экр.

32. Шилова, А. Н. Объем мирового фармрынка за 12 месяцев – к январю 2012 года. [Электронный ресурс] / А. Н. Шилова // Аптека онлайн Режим доступа: <http://www.apteka.ua>

33. A Study of AMR101 to Evaluate Its Ability to Reduce Cardiovascular Events in High Risk Patients With Hypertriglyceridemia and on Statin. The Primary

Objective is to Evaluate the Effect of 4g/DayAMR101 for Preventing the Occurrence of a First Major Cardio-vascular Event (REDUCE-IT). [Электронный ресурс]. – Identifier:NCT01492361.<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01492361?term=NCT01492361&rank=1>. Accessed 12 Dec 2016.

34. Abe, C. TritonWR1339, an Inhibitor of Lipoprotein Lipase, Decreases VitaminE Concentration in Some Tissues of Rats by Inhibiting Its Transport to Liver / C. Abe, Saiko Ikeda, Tomono Uchida, Kanae Yamashita, Tomio Ichikawa // The Journal of Nutrition Nutrient Physiology, Metabolism, and Nutrient – Nutrient Interactions. – 2007. – Vol.137. – P.345–350.

35. Adams, S.P. Lipid-lowering efficacy of rosuvastatin / S.P. Adams, S.S. Sekhon, J.M. Wright // Cochrane Database Syst Rev. – 2014. – Vol.11. – P.1-217.

36. Babin, P. J. Apolipophorin II/I, Apolipoprotein B, Vitellogenin, and Microsomal Triglyceride Transfer Protein Genes Are Derived from a Common Ancestor / P. J. Babin, J. Bogerd, F. P. Kooiman, W. J. A. Van Marrewijk, D. J. Van der Horst // Journal of Molecular Evolution. – 1999. – Vol.49. – P.150–160.

37. Baigent, C. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials / C. Baigent, L. Blackwell, J. Emberson // Lancet. – 2010. – Vol.376(9753). – P.1670–1681.

38. Barter, P.J. Effect of statins on HDL-C: a complex process unrelated to changes in LDL-C: analysis of the VOYAGER Database / P.J. Barter, G. Brandrup-Wognsen, M.K. Palmer, S.J. Nicholls // J Lip Res. – 2010. – Vol.51(6). – P.1546–1553.

39. Barter, P.J. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events / P. J. Barter, M.D., M. Caulfield, M. Eriksson, S. M. Grundy, J.J.P. Kastelein, M. Komajda, J. Lopez-Sendon, L. Mosca, J.-C. Tardif, D. D. Waters, C. L. Shear, J. H. Revkin, K. A. Buhr, M. R. Fisher, A. R. Tall, B. Brewer // N. Engl. J. Med. – 2007. – Vol.357(21). – P.2109–2122.

40. Barter, P.J. Molecular mechanisms of reverse cholesterol transport / P.J. Barter, K.A. Rye // Curr. Opin. Lipidol. – 1996. – Vol.7(2). – P.82–87.

41. Bays, H. Statin safety: an overview and assessment of the data 2005 / H. Bays // *Am. J. Cardiol.* – 2006. – Vol. 97. – P. 6–27.
42. Bodor, E.T. Nicotinic acid: an old drug with a promising future/ E.T. Bodor, S. Offermanns // *Br J Pharmacol.* – 2008. – Vol. 153, № 1. – P. 68–75.
43. Bolanos-Garcia, V. M. Review: On the structure and function of apolipoproteins: more than a family of lipid-binding proteins / V. M. Bolanos-Garcia, R. N. Miguel // *Progress in Biophysics & Molecular Biology.* – 2003. – Vol.83. – P.47–68.
44. Bruckert, E. Mild to moderate muscular symptoms with high-dosage statin therapy in hyperlipidemic patients the PRIMO study / E. Bruckert, G. Hayem, S. Dejager, C. Yau, B. Begaud // *Cardiovasc Drugs Ther.* – 2005. – Vol.19(6). – P.403–414.
45. Burger, D. High-density lipoprotein-associated apolipoprotein A-I: The missing link between infection and chronic inflammation / D. Burger, J.-M. Dayer // *Autoimmunity reviews.* – 2002. – Vol.1. – P.111-117.
46. Burri, L. The Role of PPAR Activation in Liver and Muscle / L. Burri, G.H. Thoresen, R.K. Berge // *PPAR Research.* – 2010. – Vol.542359. – P.1-11.
47. Buzello, M. The apolipoprotein e knockout mouse: a model documenting accelerated atherogenesis in uremia / M. Buzello, J. Törnig, J. Faulhaber, H. Ehmke, E. Ritz, K. Amann // *J Am Soc Nephrol.* – 2003. – Vol.14(2) – P. 311–316.
48. Cannon, C.P. Ezetimibe added to Statin therapy after acute coronary syndromes/ C. P. Cannon, M. A. Blazing, R. P. Giugliano, A. McCagg, J. A. White, P. Theroux, H. Darius, B. S. Lewis, T. O. Ophuis, J. W. Jukema, G. M. De Ferrari, W. Ruzyllo, P. De Lucca, K. Im, E. A. Bohula, C. Reist, S. D. Wiviott, A. M. Tershakovec, T. A. Musliner, E. Braunwald, R. M. Califf // *N. Engl. J. Med.* – 2015. – Vol.372(25). – P.2387–2397.
49. Cannon, C.P. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes / C. P. Cannon, E. Braunwald, C. H. McCabe, D. J. Rader, J. L. Rouleau, R. Belder, S. V. Joyal, K. A. Hill, M. A. Pfeffer, A. M. Skene // *N. Engl. J. Med.* – 2004. – Vol.350(15). – P.1495–504.

50. CER-001 Atherosclerosis Regression ACS/ C. Keyserling, S. Nicholls [Электронный ресурс] Trial (CARAT). Identifier:NCT02484378.<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02484378?term=CARAT&rank=1>. Accessed 12 Dec 2016.

51. Classification of different cholesterol and triglyceride reducing medicines [Электронный ресурс] / WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. – Электрон. дан. – Identifier: [http://www.whocc.no/atc\\_ddd\\_index/?code=C&showdescription=yes](http://www.whocc.no/atc_ddd_index/?code=C&showdescription=yes).

52. Coan, P. Genetic, physiological and comparative genomic studies of hypertension and insulin resistance in the spontaneously hypertensive rat / P. Coan, O. Hummel, A. G. Diaz, M. Barrier, N. Alfazema, P. J. Norsworthy, M. Pravenec, E. Petretto, N. Hübner, T. J. Aitman // *Dis. Model Mech.* – 2017. – Vol.10(3). – P.297-306.

53. Cohen, J.C. Variation at the hepatic lipase and apolipoprotein AI/CIII/AIV loci is a major cause of genetically determined variation in plasma HDL cholesterol levels / J.C. Cohen, Z. Wang, S.M. Grundy, M.R. Stoesz, R. Guerra // *J. Clin. Invest.* – 1994. – Vol.94. – P.2377–2384.

54. Collins, R.G. P-selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM-1) deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice / R.G. Collins, R. Velji, N. V. Guevara, M. J. Hicks, L. Chan, A. L. Beaudet // *J. Exp. Med.* – 2000. – Vol.191. – P.189–194.

55. Corsini, A. Direct effects of statins on the vascular wall / A. Corsini, F. Pazzucconi, L. Arnaboldi, P. Pfister, R. Fumagalli, R. Paoletti, C. R. Sirtori // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 1998. – Vol. 31. – P. 773–778.

56. Crossey, E. A cholesterol-lowering VLP vaccine that targets PCSK9 / E. Crossey, M.J. Amar, M. Sampson, J. Peabody, J. T. Schiller, B. Chackerian, A. T. Remaley // *Vaccine.* – 2015. – Vol.33(43). – P.5747–5755.

57. Davignon, J. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis / J. Davignon, R.E. Gregg, C.F. Sing // *Arteriosclerosis.* – 1988. – Vol.8. – P.1-21.

58. Debin, L. Fenofibrate induces a novel degradation pathway for scavenger receptor B-I independent of PDZK1 / L. Debin, D.L. Silver // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol.280. – P.23390-23396
59. Desumont, C. Complete atherosclerosis regression after human APOE gene transfer in APOEdeficient/nude mice / C. Desurmont, J.-Mi. Caillaud, F. Emmanuel, P. Benoit, J. C. Fruchart, G. Castro, D. Branellec, J.-M. Heard, N. Duverge // *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* – 2000. – Vol.20. – P.435–442.
60. Diet-induce atherosclerosis/hypercholesterolemia in rodent models [Электронный ресурс] / ed. by M. A. Pellizzon. – Identifier URL: <http://www.researchdiets.com/product-literature>.
61. DiMarco, D. M. The Regulation of Reverse Cholesterol Transport and Cellular Cholesterol Homeostasis by MicroRNAs / D. M. DiMarco, M. L. Fernandez // *Biology*. – 2015. – Vol.4. – P.494-511.
62. Evans, M. Ciprofibrate therapy improves endothelial function and reduces postprandial lipemia and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. / M. Evans, R. A. Anderson, J. Graham, G.R. Ellis, M.P. Frenneaux, A. Rees // *Circulation*. – 2000. – Vol. 101, № 15. – P. 1773–1779.
63. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of the National Cholesterol Education Programm (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. – 2001. – Vol. 285. – P. 2486–2497.
64. Phan, B. P. Ezetimibe therapy: mechanism of action and clinical update. / B. P. Phan, T. D. Dayspring P. P. Toth // *Vascular Health and Risk Management*. – 2012. – Vol.8. – P.415–427.
65. Febbraio, M. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerosis lesion development in mice. / M. Febbraio, E.A. Podrez, J.D. Smith, D.P. Hajjar, S.L. Hazen, H.F. Hoff, K. Sharma, R.L. Silverstein // *J. Clin. Invest.* – 2000. – Vol.105 – P.1049–1056.

66. Feingold, K. R Introduction to Lipids and Lipoproteins. / K. R Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, W. W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, A. Grossman, J. M. Hershman, Johannes Hoflan, S. Kalra, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, C. S. Kovacs, W. Kuohung, B. Laferrère, E. A. McGee, R. McLachlan, J. E. Morley, M. New, J. Purnell, R. Sahay, F. Singer, C. A. Stratakis, D. L. Trencé, D. P. Wilson // In: Endotext [Электронный ресурс]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc. – 2000 – 2021.
67. Fitz, N. F. Opposing effects of APOE/APOA1 double deletion on amyloid- $\beta$  pathology and cognitive performance in APP mice. / N. F. Fitz, V. Tapias, A. A. Cronican, E. L. Castranio, M. Saleem, A. Y. Carter, M. Lefterova, I. Lefterov, R. Koldamova // Brain. – 2015. – Vol. 138. – P.3699–3715.
68. Fledderus, J. The Endothelium as a Target for Anti-Atherogenic Therapy: A Focus on the Epigenetic Enzymes EZH2 and SIRT1. / J. Fledderus, B. Vanchin, M. G. Rots, G. Krenning // J. Pers. Med. – 2021. – Vol.11(2). – P.103.
69. Fredrickson, D.S. A System for Phenotyping Hyperlipoproteinemia. / D.S. Fredrickson, R. S. Lees // Circulation. – 1965. – Vol.31(3). – P.321-327.
70. Gabriel, D. A Novel APOC2 Mutation in a Colombian Patient with Recurrent Hypertriglyceridemic Pancreatitis. / G. D. Pinilla-Monsalve, J. Lores, H. Pachajoa, J. D. López-PoncedeLeón, A. López, L. X Rodríguez-Rojas, J. A. Nastasi-Catanese // The Application of Clinical Genetics. – 2020. – Vol.13. – P.63–69.
71. Garbacz, W.G. Hepatic Overexpression of CD36 Improves Glycogen Homeostasis and Attenuates High-FatDiet-Induced Hepatic Steatosis and Insulin Resistance. / W. G. Garbacz, L. Peipei, T. M. Miller, S. M. Poloyac, N. S. Eyre, G. Mayrhofer, X. Meishu, R. Songrong, X. Wen // Molecular and Cellular Biology. – 2016. – Vol.36(21). – P. 2715-2727.
72. Gbaguidi, G. F. The inhibition of the human cholesterol 7 $\alpha$ -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, № 3. – P. 1113–1121.

73. Georgila, K. mTORC1-dependent protein synthesis and autophagy uncouple into the regulation of Apolipoprotein A-I expression. / K. Georgila, M. Gounis, S. Havaki, V.G. Gorgoulis, A.G. Eliopoulos // *Metabolism Clinical and Experimental*. – 2020. – Vol.105(154186).
74. Getz, G. S. Animal models of atherosclerosis. / G. S. Getz, C. A. Reardon // *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2012. – Vol. 35, № 5. – P. 1104-1115.
75. Gibson, C.M. Safety and tolerability of CSL112, a reconstituted, infusible, plasma-derived apolipoprotein A-I, after acute myocardial infarction: the AEGIS-I trial (ApoA-I event reducing in ischemic syndromes I). / C.M. Gibson, S. Korjian, P. Tricoci, Y. Daaboul, M. Yee, P. Jain, J. H. Alexander, P. G. Steg, A. M. Lincoff, J. J. P. Kastelein, R. Mehran, D. M. D'Andrea, L. I. Deckelbaum, B. Merkely, M. Zarebinski, T. O. Ophuis, R. A. Harrington // *Circulation*. – 2016. – Vol.134. – P.1918-1930.
76. Ginsberg, H.N. Effects of combination lipid therapy in type 2 diabetes mellitus. / H.N. Ginsberg, M.B. Elam, L.C. Lovato, J. R. Crouse 3rd, L. A. Leiter, P. Linz, W. T. Friedewald, J. B. Buse, H. C. Gerstein, J. Probstfield, R. H. Grimm, F. Ismail-Beigi, J. T. Bigger, D. C. Goff Jr, W. C. Cushman, D. G. Simons-Morton, R. P. Byington // *N Engl J Med*. – 2010. – Vol.362(17). – P.1563–1574.
77. Goldbourt, U. Genetic aspects of arteriosclerosis. / U. Goldbourt, H.N. Neufeld // *Arteriosclerosis*. – 1988. – Vol.6. – P.357–377.
78. Goldstein, J.L. Binding sites on macrophages that mediate uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. / J.L. Goldstein, Y.K. Ho, S.K. Basu, M.S. Brown // *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*. – 1979. – Vol.76. – P.333–337.
79. Goldstein, J.L. History of Discovery: The LDL Receptor. / J.L. Goldstein, M.S. Brown // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2009. – Vol.29(4). – P.431–438.
80. Grainger D.J., Activation of transforming growth factor- $\beta$  is inhibited in transgenic apolipoprotein(a) mice. / D.J. Grainger, P.R. Kemp, A.C. Liu, R.M. Lawn, J.C. Metcalfe // *Nature*. – 1994. – Vol.370. – P.460–462.
81. Gsaller, F. Sterol Biosynthesis and Azole Tolerance Is Governed by the Opposing Actions of SrbA and the CCAAT Binding Complex. / F. Gsaller, P.

Hortschansky, T. Furukawa, P. D. Carr, B. Rash, J. Capilla, C. M. Èller, F. Bracher, P. Bowyer, H. Haas, A. A. Brakhage, M. J. Bromley // *PLoSPathog.* – 2016. – Vol.12(12). – P.1-22.

82. Gu, L. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low densitylipoprotein-deficient mice. / L. Gu, Y. Okada, S. K. Clinton, C. Gerard, G. K. Sukhova, P. Libby, B. J. Rollins // *Mol. Cell.* – 1998. – Vol.2. – P.275–281.

83. Gupta, A.K. Differential regulation of low density lipoprotein suppression of HMG-CoA reductase activity in cultured cells by inhibitors of cholesterol biosynthesis. / K. G. Arun, R. C. Sexton, H. Rudney // *Journal of Lipid Research.* – 1990. – Vol.31. – P.203-215.

84. Gupta, S. IFN- $\gamma$  potentiates atherosclerosis in APOE knock-out mice. / S. Gupta, A. M. Pablo, X. Jiang, N. Wang, Al. R. Tall, C. Schindler // *J. Clin. Invest.* – 1997. – Vol.99. – P.2752–2761.

85. Guyton, J. R. Benefit versus risk in statin treatment / J. R. Guyton // *Am. J. Cardiol.* – 2006. – Vol. 97. – P. 96–99.

86. Hegele, R.A. Paraoxonase–genes and disease. / R.A. Hegele // *Ann. Med.* – 1999. – Vol.31 – P.217–224.

87. Holt, P.R. Triton-induced hyperlipidemia: a model for studies of intestinal lipoprotein production. / P.R. Holt, A.A. Dominguez // *Am. J. Physiol.* – 1980. – Vol.238(5). – P.453-457.

88. Hopkins, P.N. Molecular biology of atherosclerosis. / P.N. Hopkins // *Physiol. Rev.* – 2013. – Vol.93. – P.1317–1542.

89. Jukema, J.W. Effects of lipid lowering by pravastatin on progression and regression of coronary artery disease in symptomatic men with normal to moderately elevated serum cholesterol levels. The Regression Growth Evaluation Statin Study (REGRESS). / J.W. Jukema, A.V. Bruschke, A.J. van Boven J. H.C. Reiber, E. T. Bal, A. H. Zwinderman, H. Jansen, G. J.M. Boerma, F. M. van Rappard, K. I. Lie // *Circulation.* – 1995. – Vol.91(10). – P.2528–40.

90. Jukema, J.W. The controversies of statin therapy: weighing the evidence. / J.W. Jukema, C.P. Cannon, A.J. de Craen, R.G. Westendorp, S. Trompet // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2012. – Vol.60(10). – P.875–81.
91. Kannisto, K. LXR driven induction of HDL-cholesterol is independent of intestinal cholesterol absorption and ABCA1 protein expression / K. Kannisto, M. Gåfvels, Z. Jiang, K. Slätis, X. Hu, C. Jorns, K. R. Steffensen, G. Eggertsen // *Lipids.* – 2014. – Vol.49(1). – P.71-83.
92. Kattoor, A. J. LOX-1: Regulation, Signaling and Its Role in Atherosclerosis / A. J. Kattoor, A. Goel, J. L. Mehta // *Antioxidants.* – 2019. – Vol. 8 (218). – P. 1-15.
93. Keech, A. Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. / A. Keech, J. Simes, P. Barter J. Best, R. Scott, M. R. Taskinen, P. Forder, A. Pillai, T. Davis, P. Glasziou, P. Drury, Y. A. Kesäniemi, D. Sullivan, D. Hunt, P. Colman, M. d'Emden, M. Whiting, C. Ehnholm, M. Laakso, FIELD management committee // *Lancet.* – 2005. – Vol.366(9500). – P.1849–1861.
94. Knowles, J.W. Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(–/–) APOE(–/–) mice are ameliorated by enalapril treatment. / J.W. Knowles, R. L. Reddick, J. C. Jennette, E. G. Shesely, O. Smithies, N. Maeda // *J. Clin. Invest.* – 2000. – Vol.105. – P.451–458.
95. Kotwal, S. Omega 3 Fattyacids and cardiovascular outcomes: systematic review and meta-analysis. / S. Kotwal, M. Jun, D. Sullivan, V. Perkovic, B. Neal // *Circ. Cardiovasc. Qual. Outcomes.* – 2012. – Vol.5(6). – P.808–818.
96. Kronenberg, F. Role of lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) phenotype in atherogenesis. / F. Kronenberg, M. F. Kronenberg, S. Kiechl, E. Trenkwalder, P. Santer, F. Oberhollenzer, G. Egger, G. Utermann, J. Willeit // *Circulation.* – 1999. – Vol.100. – P.1154–1160.
97. Leeuwena, E. M. A new perspective on lipid research in age-related macular degeneration. / E. M. van Leeuwena, E. Emric, B. M.J. Merle, J. M. Colijn, E. Kersten, A. Cougnard-Gregoire, S. Dammeier, M. Meester-Smoor, F. M. Pool, E. K. de

Jong, C. Delcourt, E. Rodriguez-Bocanegra, M. Biarnés, P. J. Luthert, M. Ueffing, C. C.W. Klaver, E. Nogoceke, A. I. den Hollander, I. Lengyel // *Progress in Retinal and Eye Research*. – 2018. – Vol.2018. – P.1-31.

98. Lopez-Miranda, J. Influence of mutation in human apolipoprotein A-1 gene promoter on plasma LDL cholesterol response to dietary fat / J. Lopez-Miranda, A. Espino, C. Marin, J. Salas, F. Lopez-Segura, J. Jimenez-Pereperez, F. Perez-Jimenez, J.M. Ordovas // *The Lancet*. –1994. – Vol.343(8908). – P.1246-1249.

99. Lusis, A. J. Atherosclerosis / A. J. Lusis // *Nature*. – 2000. – Vol.407(6801). – P.233–241.

100. Mahley, R. W. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. / R. W. Mahley, T. L. Innerarity, S. C. Rall, Jr., K. H. Weisgraber // *Journal of Lipid Research*. – 1984. – Vol.25. – P.1277-1294.

101. Maiolino, G. The Role of Oxidized Low-Density Lipoproteins in Atherosclerosis: The Myths and the Facts. / G. Maiolino, G. Rossitto, P. Caielli, V. Bisogni, G. P. Rossi, L. A. Calò // *Mediators of Inflammation*. – 2013. – Vol.2013. – P.1-13.

102. Mihaylova, B. The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. / B. Mihaylova, J. Emberson, L. Blackwell, A. Keech, J. Simes, E. H. Barnes, M. Voysey, A. Gray, R. Collins, C. Baigent // *Lancet*. – 2012. – Vol.380(9841). – P.581–90.

103. Mineo, C. Lipoprotein receptor signaling in atherosclerosis. / C. Mineo // *Cardiovascular Research*. – 2020. – Vol.116. – P.1254–1274.

104. Moutzouri, E. Management of dyslipidemias 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.

105. Nelson Treatment of atherosclerosis with angiotensin II receptor blocking imidazoles. United States Patent; date of patent: Sep. 2, 1997; patent number: 5,663,186.

106. Nicholas, F.F. Opposing effects of APO/APOA1 double deletion on amyloid- $\beta$  pathology and cognitive performance in APP mice. / F.F. Nicholas, V. Tapias, A. A. Cronican, E. L. Castranio, M. Saleem, A.Y. Carter, M. Lefterova, I. Lefterov, R. Koldamova // *Brain*. – 2015. – Vol. 138. – P.3699-3715.

107. Nicholls, S.J. Assessment of the clinical effects of cholesteryl ester transfer protein inhibition with evacetrapib in patients at high-risk for vascular outcomes: rationale and design of the ACCELERATE trial. / S.J. Nicholls, A.M. Lincoff, P.J. Barter, H. B. Brewer, K. A. A. Fox, C. M. Gibson, C. Grainger, V. Menon, G. Montalescot, D. Rader, A. R. Tall, E. McErlean, J. Riesmeyer, B. Vangerow, G. Ruotolo, G. J. Weerakkody, S. E. Nissen // *Am. Heart J.* – 2015. – Vol.170(6). – P.1061–1069.

108. Nicholls, S.J. Effect of Evolocumab on progression of coronary disease in statin-treated patients: the GLAGOV randomized clinical trial. / S.J. Nicholls, R. Puri, T. Anderson, L. Cho, J. J. P. Kastelein, W. Koenig, R. Somaratne, H. Kassahun, J. Yang, S. M. Wasserman, R. Scott, I. Ungi, J. Podolec, A. O. Ophuis, J. H. Cornel, M. Borgman, D. M. Brennan, S. E. Nissen // *JAMA*. – 2016. – Vol.316. – P.2373-2384.

109. Nicholls, S.J. Effect of two intensivistatin regimens on progression of coronary disease. / S.J. Nicholls, C.M. Ballantyne, P.J. Barter, M. J. Chapman, R. M. Erbel, P. Libby, J. S. Raichlen, K. Uno, M. Borgman, K. Wolski, S. E. Nissen // *N. Engl. J. Med.* – 2011. – Vol.365(22). – P.2078–2087.

110. Nicholls, S.J. Intravascular ultrasound-derived measures of coronary atherosclerotic plaque burden and clinical outcome. / S.J. Nicholls, A. Hsu, K. Wolski, B. Hu, O. Bayturan, A. Lavoie, K. Uno, E. M. Tuzcu, S. E. Nissen // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2010. – Vol.55(21). – P.2399–407.

111. Nievelstein, P.F. Lipid accumulation in rabbit aorta intima 2 hours after bolus infusion of low density lipoprotein. A deep-etch and immunolocalization study of ultrarapidly frozen tissue. / P.F. Nievelstein, A.M. Fogelman, G. Mottino, J.S. Frank // *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* – 1991. – Vol.11. – P.1795–1805.

112. Nievelstein-Post, P. An ultrastructural study of lipoprotein accumulation in cardiac valves of the rabbit. / P. Nievelstein-Post, G. Mottino, A. Fogelman, J. Frank // *Arterioscl. Thromb. Vasc.* – 1994. – Vol.14. – P.1151–1161.

113. Nissen, S.E. Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the AS-TEROID trial. / S.E. Nissen, S.J. Nicholls, I. Sipahi, P. Libby, J. S. Raichlen, C. M. Ballantyne, J. Davignon, R. Erbel, J. C. Fruchart, J.-C. Tardif, P. Schoenhagen, T. Crowe, V. Cain, K. Wolski, M. Goormastic, E. M. Tuzcu, ASTEROID Investigators // *JAMA.* – 2006. – Vol.295(13). – P.1556–1565.

114. Outcomes Study to Assess Statin Residual Risk Reduction With EpaNova in HiGh CV Risk PatientS With Hypertriglyceridemia (STRENGTH). [Электронный ресурс] Identifier:NCT02104817. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02104817?term=NCT02104817&rank=1>. Accessed 12 Dec 2016.

115. Ouweneel, A. B. Impact of bone marrow ATP-binding cassette transporter A1 deficiency on atherogenesis is independent of the presence of the low-density lipoprotein receptor. / A. B. Ouweneel, Y. Zhao, L. Calpe-Berdiel, B. Lammers, M. Hoekstra, T. J. C. Van Berkel, M. Van Eckor // *Atherosclerosis.* – 2021. – Vol.319. – P.79–85.

116. Panini, S. R. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and cholesterol biosynthesis by oxysterols. / S. R. Panini, R. C. Sexton, A. K. Gupta, E. J. Parish, S. Chittrakorn, H. Rudney // *Journal of Lipid Research* – 1986. – Vol.27(11). – P.1190-1204.

117. Reiner, Z. ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias: The Task Force for the Management of Dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS). Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). / Z. Reiner, A.L. Catapano, I. Graham, G. de Backer, O. Wiklund, M. J. Chapman, H. Drexel, A. W. Hoes, C. S. Jennings, U. Landmesser, T. R. Pedersen, G. Riccardi, M.-R. Taskinen, L. Tokgozoglu, W. M. M. Verschuren, C. Vlachopoulos, D.A. Wood, J. Luis Zamorano // *Eur. Heart J.* – 2016. – Vol.37(39). – P.2999-3058.

118. REVEAL: Randomized Evaluation of the Effects of Anacetrapib Through Lipid-modification (REVEAL). Identifier:NCT01252953.<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01252953?term=anacetrapib&rank=9>. Accessed 19 Dec2016.

119. Rhains, D. The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. / D. Rhains, L. Brissette // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2004. – Vol.36. – P.39–77.

120. Risch, N.J. Searching for genetic determinants in the new millennium. / N.J. Risch // *Nature*. – 2000. – Vol.405. – P.847–856.

121. Robinson, J.G. Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. / J.G. Robinson, M. Farnier, M. Krempf, J. Bergeron, G. Luc, M. Averna, E. S. Stroes, G. Langslet, F. J. Raal, M. E. Shahawy, M. J. Koren, N. E. Lepor, C. Lorenzato, R. Pordy, U. Chaudhari, J. J. P. Kastelein, ODYSSEY LONG TERM Investigators // *N. Engl. J. Med.* – 2015. – Vol.372(16). – P.1489–1499.

122. Rodenburg, K. W. Review: Lipoprotein-mediated lipid transport in insects: Analogy to the mammalian lipid carrier system and novel concepts for the functioning of LDL receptor family members. / Rodenburg K. W., Van der Horst D. J. // *Biochimica et Biophysica*. – 2005. – Vol.1736. – P.10 – 29.

123. Sabatine, M.S. Efficacy and safety of evolocumabin reducing lipids and cardiovascular events. / M.S. Sabatine, R.P. Giugliano, S. D. Wiviott, F. J. Raal, D. J. Blom, J. Robinson, C. M. Ballantyne, R. Somaratne, J. Legg, S. M. Wasserman, R. Scott, M. J. Koren, E. A. Stein, Open-Label Study of Long-Term Evaluation against LDL Cholesterol (OSLER) Investigators // *N. Engl. J. Med.* – 2015. – Vol.372(16). – P.1500–1509.

124. Sabatine, M.S. Rationale and design of the Further cardiovascular outcomes Research with PCSK9 Inhibition in subjects with Elevated Risk trial. / M.S. Sabatine, R.P. Giugliano, A. Keech, N. Honarpour, H. Wang, T. Liu, S. M. Wasserman, R. Scott, P. S. Sever, T. R. Pedersen // *Am. Heart J.* – 2016. – Vol.173. – P.94–101.

125. Sacks, F.M. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *Cholesterol and Recurrent Events*

Trial investigators. / F.M. Sacks, M.A. Pfeffer, L.A. Moye, J. L. Rouleau, J. D. Rutherford, T. G. Cole, L. Brown, J. W. Warnica, J. M. Arnold, C. C. Wun, B. R. Davis, E. Braunwald // *N. Engl. J. Med.* – 1996. – Vol.335(14). – P.1001–1009.

126. Sakakura, K. Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression. / K. Sakakura, Nakano M., F. Otsuka, E. Ladich, F.D. Kolodgie, R. Virmani // *Heart Lung Circ.* – 2013. – Vol.22(6). – P.399–411.

127. Stephen, S. L. Scavenger Receptors and Their Potential as Therapeutic Targets in the Treatment of Cardiovascular Disease. / S. L. Stephen, K. Freestone, S. Dunn, M. W. Twigg, S. Homer-Vanniasinkam, J. H. Walker, S. B. Wheatcroft, S. Ponnambalam // *International Journal of Hypertension.* – 2010. – Vol. 2010. – P.1-21.

128. Schönbeck, U. Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. / U. Schönbeck, G.K. Sukhova, K. Shimizu, F. Mach, P. Libby // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2000. – Vol.97. – P.7458–7463.

129. Schwartz, G.G. Effect of alirocumab, a monoclonal antibody to PCSK9, on long-term cardiovascular outcomes following acute coronary syndromes: rationale and design of the ODYSSEY outcomes trial. / G.G. Schwartz, L. Bessac, L.G. Berdan, L. B. Deepak, V. Bittner, R. Diaz, S. G. Goodman, C. Hanotin, R. A. Harrington, J. W. Jukema, K. W. Mahaffey, A. Moryusef, R. Porady, M. T. Roe, T. Rorick, W. J. Sasiela, C. Shirodaria, M. Szarek, J.-F. Tamby, P. Tricoci, H. White, A. Zeiher, P. G. Steg // *Am. Heart J.* – 2014. – Vol.168(5). – P.682–689.

130. Schwartz, G.G. Effects of dalcetrapib inpatients with a recent acute coronary syndrome. / G.G. Schwartz, A.G. Olsson, M. Abt, C. M. Ballantyne, P. J. Barter, J. Brumm, B. R. Chaitman, I. M. Holme, D. Kallend, L. A. Leiter, E. Leitersdorf, J. J. V. McMurray, H. Mundl, S. J. Nicholls, P. K. Shah, J.-C. Tardif, R. S. Wright, dal-OUTCOMES Investigators // *N. Engl. J. Med.* – 2012. – Vol.367(22). – P.2089–2099.

131. Schwende, H. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. / H. Schwende, E. Fitzke, P. Ambs, P. Dieter // *Journal of Leukocyte biology* – 1996. – Vol. 59(4). – P. 555-561.

132. Seed, M. The effect of nicotinic acid and acipimox on lipoprotein(a) concentration and turnover. / M. Seed, B. O'Connor, N. Perombelon, M. O'Donnell, D. Reaveley, B.L. Knight // *Atherosclerosis*. – 1993. – Vol.101(1). – P.61–68.

133. Shavva, V. S. Insulin-Mediated Downregulation of Apolipoprotein A-I Gene in Human Hepatoma Cell Line HepG2: The Role of Interaction Between FOXO1 and LXR $\beta$  Transcription Factors. / V. S. Shavva, A. M. Bogomolova, A. A. Nikitina, E. B. Dizhe, D. A. Tanyanskiy, A. M. Efremov, G. N. Oleinikova, A. P. Perevozchikov, S.V. Orlov // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2017. – Vol.118. – P.382-396.

134. Shavva, V. S. Tumor necrosis factor  $\alpha$  stimulates endogenous apolipoprotein A-I expression and secretion by human monocytes and macrophages: role of MAP-kinases, NF- $\kappa$ B, and nuclear receptors PPAR $\alpha$  and LXRs. / V. S. Shavva, D. A. Mogilenko, E. V. Nekrasova, A. S. Trulioff, I. V. Kudriavtsev, E. E. Larionova, A. V. Babina, E. B. Dizhe, B. V. Missyul, S. V. Orlov // *Molecular and Cellular Biochemistry*. – 2018. – Vol. 448. – P.211–223.

135. Shepherd, J. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. Westof Scotland Coronary Prevention Study Group. / J. Shepherd, S.M. Cobbe, I. Ford, C. G. Isles, A. R. Lorimer, P. W. MacFarlane, J. H. McKillop, C. J. Packard // *N. Engl. J. Med.* – 1995. – Vol.333(20). – P.1301–1307.

136. Shih, D.M. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. / D.M. Shih, Y. Xia, X. Wang, E. Milleri, L. W. Castellani, G. Subbanagounder, H. Cheroutre, K. F. Faull, J. A. Berliner, J. L. Witztumi, A. J. Lusis // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol.276. – P.17527–17535.

137. Shih, P.T. Blocking very late antigen-4 integrin decreases leukocyte entry and fatty streak formation in mice fed an atherogenic diet. / P. T. Shih, M.-L. Brennan, D. K. Vora, M. C. Territo, D. Strahl, M. J. Elices, Al. J. Lusis, J. A. Berliner // *Circ. Res.* – 1998. – Vol.84. – P.345–351.

138. Smith, A. F. Exchangeable apolipoproteins of insects share a common structural motif. / A. F. Smith, L. M. Owen, L. M. Strobel, H.D. Chen, M. R. Kanost, E. Hanneman, M. A. Wells // *Journal of Lipid Research*. – 1994. – Vol. 35.

139. Soria, L.F. Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. / L.F. Soria, E.H. Ludwig, H.R. Clarke, G.L. Vega, S.M. Grundy, B.J. McCarthy // *Proc. Nat.l Acad. Sci. U S A.* – 1989. – Vol.86(2). – P.587-591.
140. Squizzato, A. Statins, fibrates, and venous thromboembolism: a meta-analysis. / A. Squizzato, M. Galli, E. Romualdi, F. Dentali, P. W. Kamphuisen, L. Guasti, A. Venco, W. Ageno // *European Heart Journal.* – 2010. – Vol.31. – P.1248–1256.
141. Srivastava, RA. High density lipoprotein, apolipoprotein A-I, and coronary artery disease. / R.A. Srivastava, N. Srivastava // *Mol. Cell Biochem.* – 2000. – Vol.209. – P.131–144.
142. Su, X. The exchangeable apolipoproteins in lipid metabolism and obesity. / X. Su, D. Peng // *Clinica Chimica Acta.* – 2020. – Vol.503. – P.128–135.
143. 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(125). – P.1-10.
144. Thompson, G.R. Management of dyslipidaemia. / G.R. Thompson // *Heart.* – 2004. – Vol.90. – P.949–955.
145. Tomas, M. The Antioxidant Function of High Density Lipoproteins: A New Paradigm in Atherosclerosis. / M. Tomas, G. Lattote, M. Senti, J. Marrugat // *Rev. Esp. Cardiol.* – 2004. – Vol. 57(6). – P.557-569.
146. Tontonoz, P. PPAR gamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. / Tontonoz P., L. Nagy, J.L. Alvarez, V.A. Thomazy, R.M. Evans // *Cell.* – 1998. – Vol.93. – P.241–252.
147. Traugher, C. A. SR-B1 uptake of HDL promotes prostate cancer proliferation and tumor progression. / C. A. Traugher, E. Opoku, G. Brubaker, J. Major, H. Lu, S. W. Lorkowski, C. Neumann, A. Hardaway, Y. Chung, K. Gulshan, N. Sharifi, J. M. Brown, J. D. Smith // *bioRxiv.* – 2020.
148. Trial to Evaluate the Effect of ALN-PCSSC Treatment on LowDensity Lipoprotein Cholesterol (LDL-C) (ORION). / K.K. Ray [Электронный ресурс]

Identifier:NCT02597127.<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02597127?term=NCT02597127&rank=1>. Accessed 12 Dec 2016.

149. Tsujita, K. Impact of dual lipid-lowering strategy with ezetimibe and atorvastatin on coronary plaque regression in patients with percutaneous coronary intervention: the multicenter randomized controlled PRECISE-IVUS trial. / K. Tsujita, S. Sugiyama, H. Sumida, H. Shimomura, T. Yamashita, K. Yamanaga, N. Komura, K. Sakamoto, H. Oka, K. Nakao, S. Nakamura, M. Ishihara, K. Matsui, N. Sakaino, N. Nakamura, N. Yamamoto, S. Koide, T. Matsumura, K. Fujimoto, R. Tsunoda, Y. Morikami, K. Matsuyama, S. Oshima, K. Kaikita, S. Hokimoto, H. Ogawa, PRECISE–IVUS Investigators // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2015. – Vol.66(5). – P.495–507.

150. Tuin, S.J. Anacetrapib reduces (V)LDL cholesterol by inhibition of CETP activity and reduction of plasma PCSK9. / S.J. van der Tuin, S. Kuhnast, J.F. Berbee, L. Verschuren, E. J. Pieterman, L. M. Havekes, J. W. A. van der Hoorn, P. C. N. Rensen, J. W. Jukema, H. M. G. Princen, K. W. van Dijk, Y. Wang // *J. Lip. Res.* – 2015. – Vol.56(11). – P.2085–2093.

151. Undas, A. Statins and blood coagulation. / A. Undas, K. E. Brummel-Ziedins, K. G. Mann // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2005. – Vol. 25. – P. 287–294.

152. Vandesompele, J. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. / J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman // *Genome Biology.* – 2002. – Vol.3(7). – P.0034.1-0034.11.

153. Veseli, B. E. Animal models of atherosclerosis. / B. E. Veseli, P. Perrotta, G. R. A. De Meyer, L. Roth, C. V. Donckt, W. Martinet, G. R. Y. De Meyer // *European Journal of Pharmacology.* – 2017. – Vol.816. – P.3–13

154. Viney, N.J. Antisense oligonucleotides targeting apolipoprotein(a) in people with raised lipoprotein(a): two randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trials. / N.J. Viney, J.C. van Capelleveen, R.S. Geary, S. Xia, J. A. Tami, R. Z. Yu, S. M. Marcovina, S. G. Hughes, M. J. Graham, R. M. Crooke, S. T. Crooke, J.

L. Witztum, E. S. Stroes, S. Tsimikas // *Lancet*. – 2016. – Vol.388(10057). – P.2239–2253.

155. Vonbank, A. Current cholesterol guidelines and clinical reality: a comparison of two cohorts of coronary artery disease patients. / A. Vonbank, C.H. Saely, P. Rein, D. Sturn, H. Drexel // *Swiss Med. Wkly*. – 2013. – Vol.143(13828). – P.1-8.

156. Wang, L. The Enzymatic and Non-enzymatic Roles of Protein-disulfideIsomerase in Apolipoprotein B Secretion. / L. Wang, D. Fast, A.D. Attie // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – Vol.272(44). – P.27644-27651.

157. Wang, Y. M. The mechanism of dietary cholesterol effects on lipids metabolism in rats. / Y. M. Wang, B. Zhang, Y. Xue, Z. J. Li, J. F. Wang, C. H. Xue, T. Yanagita // *Lipids Health. Dis*. – 2010. – Vol. 9, N. 4.

158. Webb, N. R. Overexpression of SR-BI by adenoviral vectorpromotes clearance of apoA-I, but not apoB, in human apoB transgenic mice. / N. R. Webb, M. C. De Beer, J. Yu, M. S. Kindy, A. Daugherty, D. R. Van der Westhuyzen, F. C. De Beer // *Journal of Lipid Research*. – 2002. – Vol. 43.

159. Wen- Jun, S. Scavenger receptor B type 1: Expression, Molecular Regulation, and Cholesterol Transport Function. / S. Wen- Jun, S. Asthana, F. B. Kraemer, S. Azhar // *Journal of Lipid Research*. – 2018. – Vol.59(7). – P.1114-1131.

160. Wen-Hsiung, L. The apolipoprotein multigene family: biosynthesis, structure, structure-function relationships, and evolution. / L. Wen-Hsiung, M. Tanimura, Chi-Cheng Luo, S. Datta, L. Chant // *Journal of Lipid Research*. – 1988. – Vol.29. – P.245-271.

161. Wiesbauer, F. HMG CoA reductase inhibitors affect the fibrinolytic system of human vascular cells in vitro: a comparative study using different statins. / F. Wiesbauer, C. Kaun, G. Zorn, G. Maurer, K. Huber, J. Wojta // *British Journal of Pharmacology*. – 2002. – Vol. 135. – P. 284–292.

162. Wittrup, H. H. Combined analysis of six lipoprotein lipase genetic variants on triglycerides, high-density lipoprotein, and ischemic heart disease: cross-sectional, prospective, and case-control studies from the Copenhagen City Heart Study. / H. H.

Wittrup, R. V. Andersen, A. Tybjerg-Hansen, G. B. Jensen, B. G. Nordestgaard // *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 2006. – Vol.91(4). – P.1438–1445.

163. Wolska, A. Apolipoprotein C-II: New findings related to genetics, biochemistry, and role in triglyceride metabolism. / A. Wolska, R. L. Dunbarb, L. A. Freeman, M. Uedab, M. J. Amara, D. O. Sviridova, A. T. Remaley // *Atherosclerosis*. – 2017. – Vol.267. – P.49–60.

164. Xia, Z. Regulation of human apolipoprotein A-I gene expression by equine estrogens. / Z. Xia, J. Jei-Jun, B. R. Bhavnani, T. Shui-Pang // *Journal of Lipid Research*. – 2001. – Vol.42. – P.1789-1800.

165. Yujiao, S. Effects of nanoparticle-mediated delivery of pitavastatin on atherosclerotic plaques in APOE-knockout mice and THP-1-derived macrophages. / S. Yujiao, C. Ling, Z. Shijie, S. Liye, L. Hua, T. Wen, Q.J. Guoxian // *Experimental and therapeutic medicine*. – 2020. – Vol.19. – P.3787-3797.

166. Zhang, X. Endothelial Transcytosis of Lipoproteins in Atherosclerosis. / X. Zhang, W.C. Sessa, C. Fernández-Hernando // *Front. Cardiovasc. Med*. – 2018. – Vol.5(130).

167. Zhu, D. Effect of gemfibrozil of apolipoprotein B secretion and diacylglycerol acyltransferase activity in human hepatoblastoma (HepG2) cells. / D. Zhu, S. H. Ganji, V. S. Kamanna, M. L. Kashyap // *Atherosclerosis*. – 2002. – Vol. 164(2). – P. 221–228.

168. Zysk, C. Genetic Variants in Host Protein Disulfide Isomerase 2 (PDIA2) are Associated with Susceptibility to Chlamydia Trachomatis Infection. / C. Zysk, S. Williams, I. Chavarria, H. Wilson, A. Balogun, E. Jacobs, R. Kaminski, B.T. Foma, J. Johnson, W. Lux, K. McCoy, S. Morales, G. Sanchez, P. Grubb, M. Littlejohn, R. Mize, J. Moreno, C. Pirtle, E.C. Hendrix, K.M. Bennett // *Journal of the Association of Genetic Technologists*. – 2020. – Vol.46(4). – P.244-249.

169. Ковалева, В.Н. Бензолсульфонаты 1,3-диалкил-4,5-бис(метилкарбамоил)имидазолия, проявляющие стимулирующее действие на тканевый энергетический обмен. / В.Н. Ковалева, Н.Ю. Марасанова, Е.И. Морева,

В.П. Новиков, Л.Б. Пиотровский, Н.С. Сапронов, Н.В. Хромов-Борисов // РИД(Изобретения). – 1983. – №1075668.

170. Окуневич, И. В. Средство, обладающее гиполипидемической и антиатеросклеротической активностью. / И. В. Окуневич, Л. К. Хныченко, Н. С. Сапронов, П. Д.Шабанов // Описание Изобретения к Патенту (Россия). – 2016. – № RU 2598347 C1.