

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ



**ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР
«ИНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГИИ И БИОХИМИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»**

БЕЛОРУССКИЕ ЛЕКАРСТВА

Материалы
международной научно-практической конференции

Минск, 2-3 ноября 2010 г.

Минск
2010

Полученные экспериментальные данные о взаимосвязи экспрессии генов *PPAR in vivo* и действием корректоров энергетического метаболизма милдроната и карнитина хлорида могут быть использованы для разработки фармакогеномных подходов в диагностике и лечении патологических состояний ишемической природы.

Литература:

1. Dambrova, M. Mildronate: Cardioprotective action through carnitine-lowering effect / M. Dambrova, E. Liepinch, I. Kalvinch // Trends Cardiovasc. Med. – 2002. –Vol. 12, № 6. – P. 275–279.
2. Bremer, J. Carnitine – metabolism and functions / J. Bremer // Physiol. Rev. – 1983. –Vol. 63, № 4. – P. 1420–1480.
3. Desvergne, B. Peroxisome proliferators-activated receptors: nuclear control of metabolism / B. Desvergne, W. Wahli // Endocr.Rev. – 1999. –Vol. 20, № 5. – P. 649–688.

EFFECT OF MILDRONATE AND CARNITINE CHLORIDE ON *PPAR* GENES EXPRESSION IN RATS

Morozova E.V., Nikolaevich L.N.

State Institution “Science-Production Center “Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus”, academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus

The effect of correctors of energetic metabolism mildronate and carnitine chloride on *PPAR* genes expression in rat liver, skeletal musculature and white visceral adipose tissue has been studied. Significant increase of genes *PPARA*, *PPARB* and *PPARG* expression in rat liver after mildronate and carnitine chloride administration has been revealed.

Obtained experimental data about correlation of *PPAR* genes expression *in vivo* and mildronate and carnitine chloride effect can be used for working out of pharmacogenomic approaches in diagnostics and treatment of pathological conditions of ischemic nature.

ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *PPAR* У КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ СТАТИНОВ

Морозова Е.В., Николаевич Л.Н.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: nikolarisa@tut.by

Статины являются одним из самых эффективных классов гиполипидемических лекарственных препаратов. Механизм действия статинов обусловлен ингибированием 3-гидрокси-3-метилглутарил коэнзим А (ГМК-КоА) редуктазы, ключевого фермента биосинтеза холестерина. Поскольку мевалонат, продукт реакции, катализируемой ГМК-КоА редуктазой, является предшественником не только холестерина, но и многих других изопреноидных соединений нестероидной природы, участвующих в контроле клеточного роста и дифференцировки, статины оказывают на организм многообразное действие [1]. Многие эффекты ингибиторов ГМК-КоА редуктазы опосредуются через ядерные рецепторы *PPAR*, несмотря на то что статины не являются их прямыми лигандами [2].

Цель данного исследования – изучение влияния аторвастатина и симвастатина на экспрессию генов *PPARA*, *PPARB*, *PPARG* в печени, белой висцеральной жировой и скелетной мышечной ткани крыс в норме и в условиях острой экспериментальной гиперлипидемии.

Работа выполнена на самцах крыс линии Wistar массой 220–250 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к корму и воде, а также при 12-часовом световом режиме (экспериментально-биологическая клиника ИФБ НАН Беларуси). В эксперименте (10 групп, по 5 крыс в каждой группе) 1-ю группу составили контрольные животные; 2-ю – животные с твиновой гиперлипидемией; 3–10-я группы – животные, получавшие в течение 7-и дней статины в двух дозах: 3-я и 4-я – аторвастатин в дозе 10 мг/кг/сут; 5-я и 6-я – аторвастатин в дозе 80 мг/кг/сут; 7-я и 8-я – симвастатин в дозе 10 мг/кг/сут; 9-я и 10-я – симвастатин в дозе 80 мг/кг/сут. У животных из групп 4, 6, 8, 10 в конце 7-го дня эксперимента индуцировали острую гиперлипидемию.

Таблетки аторвастатина («Липимакс», ЗАО «Максфарма Балтия», Литва) и симвастатина («Симвастерол», «Польфарма», Польша) животным вводили в растворе 0,1%-ного крахмала внутрижелудочно. Животным 1-й и 2-й групп в течение 7-и дней вводили внутрижелудочно 0,1%-ный раствор крахмала. Острую гиперлипидемию вызывали путем однократного внутривентрального введения детергента Твина-80 в дозе 70 мг/100 г веса животного. Через 10 ч проводили эвтаназию животных путем декапитации.

В сыворотке крови крыс определяли содержание триглицеридов, общего холестерина и холестерина ЛПВП с помощью наборов реагентов «Триглицериды ФС "ДДС"», «Холестерин ФС "ДДС"», «Холестерин ЛПВП ФС» (ЗАО «ДИАКОН-ДС», Россия) на спектрофотометре Agilent 8453 (Agilent Technologies, USA). Суммарную РНК из тканей крыс выделяли с использованием набора реагентов NucleoSpin^R RNA II (MACHEREY-NAGEL, Germany), обратную транскрипцию РНК проводили с использованием набора реагентов RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Lithuania). Экспрессию генов *PPAR* оценивали методом относительного количественного ПЦР-анализа в режиме реального времени с использованием Tornado *Taq*TM полимеразы и интеркалирующего красителя Зубр I (ОДО «Праймтех», Минск, Беларусь) на приборе Chromo4 (Bio-Rad, USA). Нормализацию относительных количеств кДНК осуществляли по отношению к гену глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH*).

Статистическая обработка результатов производилась с помощью программы Statistica 7.0. Достоверности различий групповых средних оценивались на основе однофакторного дисперсионного анализа. Различия между группами считали статистически значимыми при $P < 0,05$.

При твиновой гиперлипидемии содержание триглицеридов в сыворотке крови крыс повысилось на 59% по сравнению с контрольными животными ($P < 0,05$), а содержание ЛПВП достоверно снизилось ($P < 0,001$). Внутрижелудочное введение статинов в течение 1 недели приводило к существенному снижению концентрации сывороточных триглицеридов: при введении аторвастатина содержание триглицеридов в сыворотке крови крыс уменьшилось почти в 2 раза ($P < 0,001$), симвастатина – почти в 3 раза ($P < 0,001$) (существенных различий между дозами статинов 10 и 80 мг/кг/сут не выявлено). Средние значения концентрации триглицеридов в крови крыс, получавших внутрижелудочно симвастатин и аторвастатин, достоверно отличаются ($P < 0,05$), в частности, симвастатин снижает сывороточную концентрацию триглицеридов эффективнее по сравнению с аторвастатином. Введение аторвастатина и симвастатина до индукции твиновой гиперлипидемии приводило к снижению сывороточной концентрации триглицеридов до контрольного уровня, за исключением животных, получавших симвастатин в дозе 80 мг/кг/сут, где концентрация триглицеридов в сыворотке крови оказалась на 74% ниже по сравнению с контрольным уровнем ($P < 0,01$). Предварительное введение аторвастатина и симвастатина животным, у

которых не индуцировали острую гиперлипидемию, не наблюдалось изменений концентрации ЛПВП. У крыс, получавших внутрижелудочно статины в течение 7-и дней до индукции гиперлипидемии, показано статистически достоверное снижение уровня ЛПВП в сыворотке крови ($P<0,001$).

В печени крыс при индукции твиновой гиперлипидемии показано статистически достоверное снижение экспрессии гена *PPARA* ($P<0,05$), в то время как предварительное введение статинов не приводило к его активации. Экспрессия *PPARA* в печени крыс, получавших внутрижелудочно ингибиторы ГМГ-КоА редуктазы в течение 1 недели, не изменилась по сравнению с контролем. Установлено отсутствие влияния острой твиновой гиперлипидемии на экспрессию *PPARB* в печени крыс. У крыс, получавших статины в дозе 80 мг/кг/сут, активность *PPARB* статистически достоверно снижается по сравнению с контролем ($P<0,05$). Активность *PPARG* в печени крыс, у которых вызывали острую гиперлипидемию, снижается в 2 раза по сравнению с контрольными животными ($P<0,05$). Применение статинов не вызывало значительного изменения экспрессии *PPARG* в печени крыс. Предварительное введение статинов в дозе 10 мг/кг/сут в течение 1 недели до индукции гиперлипидемии существенно не повлияло на экспрессию *PPARG* в печени крыс по сравнению с гиперлипидемическими животными. Лишь при повышении дозы препаратов до 80 мг/кг/сут экспрессия *PPARG* в печени животных с гиперлипидемией статистически значимо не отличалась от контрольного уровня.

В белой висцеральной жировой ткани крыс с твиновой гиперлипидемией также наблюдается статистически значимое снижение активности генов *PPARA* и *PPARG* по сравнению с контрольными животными ($P<0,05$). Аторвастатин вызывает повышение экспрессии генов *PPARA* и *PPARG* в белой висцеральной жировой ткани крыс при пероральном введении в течение 1 недели по отношению к контрольному уровню ($P<0,05$). Аторвастатин в дозе 80 мг/кг/сут также существенно активизирует *PPARB* в белой жировой ткани крыс ($P<0,05$). Других значимых изменений экспрессии гена *PPARB* в белой жировой ткани крыс при индукции твиновой гиперлипидемии и введении статинов не выявлено. Симвастатин в норме не влияет на экспрессию генов *PPARA* и *PPARG* в жировой ткани крыс. Однако при введении симвастатина до индукции гиперлипидемии экспрессия *PPARA* и *PPARG* существенно не отличается от контрольного уровня. При предварительном введении аторвастатина в дозе 80 мг/кг/сут средние значения относительной экспрессии *PPARG* в жировой ткани статистически достоверно выше контрольного уровня ($P<0,05$).

Индукция твиновой гиперлипидемии и применение статинов не приводит к существенному изменению активности гена *PPARA* в скелетной мышечной ткани крыс. У крыс, получавших статины до индукции острой гиперлипидемии, наблюдается снижение активности *PPARB* в скелетной мышечной ткани крыс по сравнению с контролем ($P<0,05$). Значимых изменений экспрессии *PPARB* в скелетной мышечной ткани крыс при индукции острой гиперлипидемии и применении статинов у контрольных животных не выявлено. При острой гиперлипидемии у крыс в скелетной мускулатуре наблюдается повышение активности *PPARG* по сравнению с контролем ($P<0,05$). Статины в дозе 10 мг/кг/сут в течение 7-и дней существенно не влияют на активность *PPARG* в скелетной мышечной ткани, однако твиновая гиперлипидемия на фоне применения статинов не приводит к достоверному повышению экспрессии *PPARG* в скелетной мускулатуре крыс. Симвастатин в дозе 80 мг/кг/сут вызывает статистически достоверное снижение экспрессии *PPARG* в скелетной мышечной ткани крыс ($P<0,01$).

В результате исследования, выявлены различия в действии симвастатина и аторвастатина на экспрессию генов *PPAR in vivo*. В отличие от симвастатина, аторвастатин существенно активизирует гены *PPARA*, *PPARB* и *PPARG* в белой висцеральной жировой ткани крыс. Высокая доза симвастатина вызывает статистически достоверное снижение экспрессии *PPARG* в скелетной мышечной ткани крыс. Полученные данные позволяют

расширить представление о молекулярных механизмах плеiotропного действия статинов на организм.

Литература:

1. Stancu, C. Statins: mechanism of action and effects / C. Stancu, A. Sima // *J. Cell. Mol. Med.* – 2001. – Vol. 5, № 4. – P. 378–387.

2. Paumelle, R. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Mediate Pleiotropic Actions of Statins / R. Paumelle, B. Staels // *Circ. Res.* – 2007. – Vol. 100, № 10. – P. 1442–1451.

EVALUATION OF PPAR GENES EXPRESSION IN RATS UNDER STATINS ADMINISTRATION

Morozova E.V., Nikolaevich L.N.

State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus

The effects of atorvastatin and simvastatin on genes *PPARA*, *PPARB* and *PPARG* expression in liver, white visceral adipose tissue and skeletal musculature and also blood lipid composition of rats in norm and under tween hyperlipidemia have been studied. Difference of their effects on *PPAR* genes expression *in vivo* have been observed. Unlike simvastatin, atorvastatin essentially activates genes *PPARA*, *PPARB* and *PPARG* in rat white visceral adipose tissue. The high dose of simvastatin causes statistically significant decrease in *PPARG* expression in rat skeletal musculature. The obtained data can promote the insight into molecular mechanisms of pleiotropic effects of statins.

ХАРАКТЕРИСТИКА УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ PPAR, ПРОЛИФЕРАЦИИ, АПОПТОЗА И КЛЕТОК С МИКРОЯДРАМИ У КРЫС С ГИПЕРЛИПИДЕМИЕЙ ПРИ ВВЕДЕНИИ ЛИКОПИНА

Морозова Е.В., Николаевич Л.Н.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: nikolarisa@tut.by

Известно, что некоторые изопреноиды, содержащиеся в лекарственных и пищевых растениях, могут влиять на активность транскрипционных факторов PPAR, которые являются сенсорами пищевых липидов, контролирующими энергетический гомеостаз [1, 2]. Также для биоактивных изопреноидов показано подавление опухолевой пролиферации и апоптоз-индуцирующая активность [3]. Поэтому включение в ежедневный рацион таких соединений может быть использовано для терапии заболеваний, связанных с нарушением метаболизма липидов (сахарный диабет 2-го типа, гиперлипидемия, инсулинорезистентность, сердечно-сосудистые заболевания), а также при лечении рака.

Целью исследования явилось изучение влияния каротиноида ликопина, имеющего изопреноидную структуру, на экспрессию генов *PPARA*, *PPARB* и *PPARG* в печени, белой висцеральной жировой и скелетной мышечной ткани, а также на плоидность клеток крови (лейкоцитов) крыс в норме и острой экспериментальной гиперлипидемии.

Работа выполнена на самцах крыс линии Wistar массой 220–250 г, которых содержали при 12-часовом световом режиме на стандартном рационе вивария и свободном доступе к корму и воде (экспериментально-биологическая клиника ИФБ НАН Беларуси). В