

УДК 577.125:577.127.2

© Коллектив авторов

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АЦИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
3 β -ГИДРОКСИ-5 α -ХОЛЕСТ-8(14)-ЕН-15-ОНА И 3 α -ГИДРОКСИ-
5 α -ХОЛЕСТ-8(14)-ЕН-15-ОНА С КЛЕТКАМИ ГЕПАТОМЫ Нер G2.**

Е.А. Пийр¹, Н.В. Медведева¹, Н.М. Каширина², А.Я. Шевелев², А.Ю. Мишарин¹.

¹Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН,
119992, Москва, Погодинская ул., 10.

²Институт экспериментальной кардиологии, РКНПК,
121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15А.

Исследовано влияние 3 β -гидрокси-5 α -холест-8(14)-ен-15-она (I), 3 α -гидрокси-5 α -холест-8(14)-ен-15-она (II), 3 β -гексадеканоилокси-5 α -холест-8(14)-ен-15-она (III), 3 α -гексадеканоилокси-5 α -холест-8(14)-ен-15-она (IV), 3 β -ацетокси-5 α -холест-8(14)-ен-15-она (V) и 3 α -ацетокси-5 α -холест-8(14)-ен-15-она (VI) на метаболизм холестерина в клетках гепатомы Нер G2. Соединение III медленно связывалось и метаболизировалось в клетках Нер G2 (при концентрации 30 мкМ общее связывание составляло $3,9 \pm 0,4$ нмоль на 1 мг клеточного белка за 24 ч инкубации). Соединение I подавляло, а соединение III стимулировало захват липопротеинов низкой плотности, содержащих радиоактивно меченый олеилхолестерилэфир (58% и 149% от контроля при концентрации 10 мкМ, соответственно). Соединения I и II ингибировали биосинтез холестерина из [¹⁴C]ацетата: значения IC₅₀ составляли $4,0 \pm 0,7$ мкМ и $8,0 \pm 1,5$ мкМ, соответственно. Эффект соединений V и VI был достоверно слабее; соединения III и IV были неактивны. Соединение II активировало биосинтез холестерилэфиров, оцениваемый по включению [¹⁴C]олеиновой кислоты во фракцию холестерилэфиров (170% от контроля при концентрации 30 мкМ). Способность исследуемых соединений регулировать метаболизм холестерина в клетках Нер G2 коррелирует с их полярностью.

Ключевые слова: оксистерин, ацильные производные оксистерина, метаболизм холестерина, ингибиторы биосинтеза холестерина, гипохолестеринемическая активность, Нер G2.

ВВЕДЕНИЕ. Среди биологически активных оксистерина синтетические 15-оксигенированные производные холестерина и ланостерина привлекают особое внимание вследствие их сильного гипохолестеринемического и антиатерогенного эффекта *in vivo*. Известный ингибитор биосинтеза холестерина 3 β -гидрокси-5 α -холест-8(14)-ен-15-он (15-кетостерин, I) снижает активность ацетоацетил-СоА-тиолазы, HMG-СоА-синтазы и HMG-СоА-редуктазы в культуре клеток, ингибирует активность АХАТ в микросомах печени и кишечника, подавляет всасывание холестерина в кишечнике, эффективно снижает уровень холестерина и уровень ЛНП при добавлении к корму грызунов и приматов. Детальное обсуждение биологической активности и метаболизма 15-кетостерина и родственных соединений представлено в обзоре [1].

Принятые сокращения: HMG СоА - 3-гидрокси-3-метилглутарил коэнзим А; АХАТ- ацил СоА: холестерин ацилтрансфераза; ЛНП - липопротеины низкой плотности; [¹⁴C-СЕ]ЛНП - ЛНП, содержащие 3 β -(9,10-*цис*-октадеценоилокси)-[4-¹⁴C]холест-5-ен; ЛОНП- липопротеины очень низкой плотности; ЛПДС - липопротеин-дефицитная сыворотка; PBS - фосфатсодержащий физиологический раствор.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ОКСИСТЕРИНОВ С КЛЕТКАМИ

Основной транспортной формой 15-кетостерина в организме млекопитающих являются соответствующие ацильные производные - кетостеридовые эфиры жирных кислот. Ацильные производные образуются из I в клетках кишечника (при диетарном введении) и в плазме крови (при внутривенном введении) [2-5]. Ацильные производные 15-кетостерина в составе кишечных хиломикронов и ЛНП плазмы крови поступают в клетки печени, где после гидролиза эфира, кетостерин быстро метаболизирует в полярные продукты [6, 7]. В настоящее время мало известно о биологической активности ацильных производных 15-кетостерина, а также об их вкладе в гипохолестеринемическую активность 15-кетостерина, проявляемую *in vivo*.

Данная работа была предпринята, чтобы оценить участие ацильных производных 15-кетостерина в регуляции метаболизма и баланса холестерина в клетках печени. Объектом исследования были клетки гепатомы человека Hep G2, представляющие стандартную клеточную модель для изучения метаболизма липидов в печени человека. Мы исследовали взаимодействие ацильных производных 15-кетостерина и соответствующего 3 α -эпимера II с клетками Hep G2, а также влияние этих соединений на основные параметры, характеризующие метаболизм и баланс холестерина в клетках печени: захват холестеридовых эфиров в составе ЛНП, биосинтез холестерина из ацетата, АХАТ-зависимое ацилирование холестерина. Для выяснения связи биологической активности со структурой молекулы производного кетостерина в данной работе сопоставляли эффекты 3 β -гидрокси-5 α -холест-8(14)-ен-15-она (I), 3 α -гидрокси-5 α -холест-8(14)-ен-15-она (II), соответствующих пальмитатов - III и IV и ацетатов V и VI.

МЕТОДИКА. Холестерин, холестеридолеат, триолеин, олеиновая кислота, EDTA, NaBr, трис-(гидроксиметиламином)-метан (трис), додецилсульфат Na и PBS получены от фирмы "Sigma" (США). 3 β -Гидрокси-5 α -холест-8(14)-ен-15-он (I) синтезирован по методу [8], 3 α -гидрокси-5 α -холест-8(14)-ен-15-он (II), 3 β -гексадеканоксид-5 α -холест-8(14)-ен-15-он (III), 3 β -гексадеканоксид-[1- 14 C]-оксид-5 α -холест-8(14)-ен-15-он (IIIa), 3 α -гексадеканоксид-5 α -холест-8(14)-ен-15-он (IV), 3 β -ацетоксид-5 α -холест-8(14)-ен-15-он (V) и 3 α -ацетоксид-5 α -холест-8(14)-ен-15-он (VI) - по методам [9-11]. Радиоактивные изотопы: [1- 14 C]ацетат Na, [1- 14 C]олеиновая кислота, [1- 14 C]пальмитиновая кислота, и 3 β -(9,10-цис-октадеценилоксид)-[4- 14 C]олест-5-ен получены от фирмы "Amersham" (Англия). Растворители (квалификации для ВЭЖХ): хлороформ, гексан, метанол, этанол, изопропанол, этилацетат, диэтиловый эфир, уксусная кислота получены от фирмы "Merck" (Германия).

Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Yanaco UO 2000. Концентрацию белка определяли модифицированным методом Лоури [12]. ТСХ исследуемых соединений и липидных экстрактов проводили на пластинках HPTLC Kieselgel UV₂₅₄ фирмы "Merck". Измерение радиоактивности проводили в толуольном сцинтилляторе на счетчике фирмы "LKB" (Швеция).

Клетки гепатомы человека линии Hep G2, полученные из Европейской коллекции клеточных культур (ECACC, Salisbury), культивировали при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂ в среде OptiMEM:F12 (1:1) с 10% эмбриональной сывороткой теленка и выращивали в 24-луночных планшетах.

Соединения I и II добавляли к культуральной среде в этанольном растворе, соединения III - VI - в изопропанольном растворе. Содержание этанола или изопропанола во всех опытах, включая соответствующие контроли, составляло 0,4%.

Связывание соединения III клетками Hep G2. Изопропанольные растворы соединений III и IIIa смешивали в рассчитанных соотношениях и вводили в нагретую до 37° культуральную среду при интенсивном перемешивании. Среда добавляла к клеткам Hep G2, прединкубированным 24 ч в безсывороточной среде. После соответствующей инкубации клетки промывали холодным PBS, липиды экстрагировали смесью гексан:изопропанол (3:2, по объему), клеточный остаток использовали для измерения количества клеточного белка. Для определения

общего связывания **III** определяли радиоактивность в аликвоте экстракта (1/3 от объема). Остаток экстракта упаривали в токе азота и разделяли ТСХ в системе гексан:диэтиловый эфир:уксусная кислота (70:30:1) в присутствии внутренних стандартов: холестерилпальмитата, трипальмитина, соединения **III**, пальмитиновой кислоты. После проведения хроматографии соответствующие зоны соскабливали и переносили во флаконы для счета радиоактивности.

Радиоактивно меченные ЛНП. ЛНП ($1,006 < d < 1,063$ г/мл) и ЛПДС ($d > 1,210$ г/мл) получали из плазмы крови здорового донора препаративным ультрацентрифугированием [13]. Для инактивации ЛХАТ препарат ЛПДС выдерживали 10 мин при 60°C. Для получения [^{14}C -СЕ]ЛНП раствор 3 β -(9,10-цис-октадеценилокси)-[4- ^{14}C]холест-5-ена (0,1 мКи/мл) в изопропанол при интенсивном перемешивании впрыскивали в ЛПДС (конечное содержание изопропанола в смеси не превышало 2%). К смеси добавляли равный объем ЛНП и инкубировали 24 ч при 37°C [14]. Затем плотность раствора доводили до 1,071 г/мл добавлением сухого NaBr. [^{14}C -СЕ]ЛНП выделяли ультрацентрифугированием в течение 16 ч при 40 000 об./мин на ультрацентрифуге Beckman L8, ротор Ty 65. Перед экспериментом [^{14}C -СЕ]ЛНП диализовали против PBS. Удельная радиоактивность [^{14}C -СЕ]ЛНП составляла 2,5 мКи/мг белка.

Влияние соединений I - VI на связывание ЛНП клетками Нер G2. Клетки Нер G2 выдерживали 24 ч в среде, содержащей 10% ЛПДС и соединения I - VI в концентрации 10 мКи, затем среду заменяли на свежую, к которой были добавлены [^{14}C -СЕ]ЛНП (концентрация белка ЛНП - 25 мКи/мл среды, активность - 100 000 имп/мин на 1 мл среды) и исследуемые вещества, инкубацию продолжали 1, 2 и 4 ч. Клетки промывали холодным PBS, липиды экстрагировали смесью гексан:изопропанол (3:2) и определяли радиоактивность экстрактов. Захват радиоактивных ЛНП (A) для каждого образца рассчитывали по формуле $A = (A_{\text{изм}} - A_0) / [p]$, где $A_{\text{изм}}$ - фактически измеренное значение радиоактивности, A_0 - неспецифическое связывание радиоактивных ЛНП с пластиком в отсутствие клеток, измеренное в тех же условиях, $[p]$ - количество белка в лунке, определенное в клеточном остатке, после экстракции липидов [15].

Во всех экспериментах зависимость связывания [^{14}C -СЕ]-ЛНП с клетками A от времени инкубации была близка к линейной. Для каждого эксперимента графически определяли значение A' (имп./мин на 1 мг клеточного белка в единицу времени), соответствующее захвату радиоактивных ЛНП 1 мг клеточного белка за 1 ч. Соответствующее значение A' в контрольном эксперименте принимали за 100%.

Уровень биосинтеза холестерина. Согласно [16], перед экспериментом клетки инкубировали в безсывороточной среде, содержащей исследуемые соединения в различных концентрациях в течение 3 ч, затем среду заменяли на свежую, содержащую 0,1 мМ [$1\text{-}^{14}\text{C}$]CH₃COONa (1 мКи на 1 мл среды) и исследуемые соединения, и продолжали инкубацию еще 3 ч. После этого клетки трижды промывали холодным PBS, липиды экстрагировали как указано выше и разделяли ТСХ в системе гексан : диэтиловый эфир:уксусная кислота (70:30:1). Уровень биосинтеза холестерина рассчитывали по включению радиоактивной метки в холестерин. Включение метки в отсутствие исследуемых соединений принимали за 100%.

Уровень ацилирования холестерина. Клетки инкубировали со средой, содержащей 10% эмбриональной сыворотки и исследуемые соединения в течение 4 ч, промывали PBS (37°C), заменяли культуральную среду на свежую, содержащую [$1\text{-}^{14}\text{C}$]олеиновую кислоту (52 мКи/ммоль, 0,5 мКи на 1 мл среды) и 10% ЛПДС, и продолжали инкубацию 3 ч [16]. Затем клетки трижды промывали холодным PBS, экстрагировали и проводили ТСХ-анализ, как описано выше. Уровень ацилирования холестерина рассчитывали по включению радиоактивной метки во фракцию холестерилэфиров. Включение - радиоактивной метки в отсутствие исследуемых соединений принимали за 100%.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ОКСИСТЕРИНОВ С КЛЕТКАМИ

Каждое определение проводили в трех повторах в трех независимых экспериментах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Включение пальмитоильного производного 15-кетостерина (III) в клетки Нер G2. Характер взаимодействия стерина или его производного с клетками в культуре в основном определяется структурой молекулы стерина. Хорошо известно, что холестерин, введенный в культуральную среду, равномерно распределяется между средой и клеточной мембраной [17]. Полярные оксистерины (25-гидроксихолестерин, 7-кетохолестерин, 15-кетостерин и его аналоги), не имея заметного сродства к клеточной мембране, быстро и равномерно распределяются между компартментами клетки и культуральной средой [18-20]. Холестериловые эфиры, вследствие очень низкой растворимости в воде, захватываются клеткой по механизму эндоцитоза только в составе липопротеинов или липидной мицеллы [21].

Связывание и интернализацию (захват) пальмитоильного производного 15-кетостерина III при концентрации 30 мкМ клетками Нер G2 изучали в безсывороточной среде. Клетки инкубировали в среде, содержащей соединение III в присутствии следовых количеств соответствующего радиоактивно меченного соединения IIIa в течение определенных промежутков времени, после чего проводили анализ радиоактивных продуктов, содержащихся в клетках (рис. 1). Очевидно, что общее количество радиоактивности характеризует захват (неспецифическое связывание с поверхностью клеток и интернализацию внутрь) III. Доказательством интернализации кетостерилового эфира III служит наличие радиоактивных метаболитов. Исходя из удельной радиоактивности общий захват клетками соединения III составил $3,9 \pm 0,4$ нмоль на 1 мг клеточного белка за 24 ч инкубации.

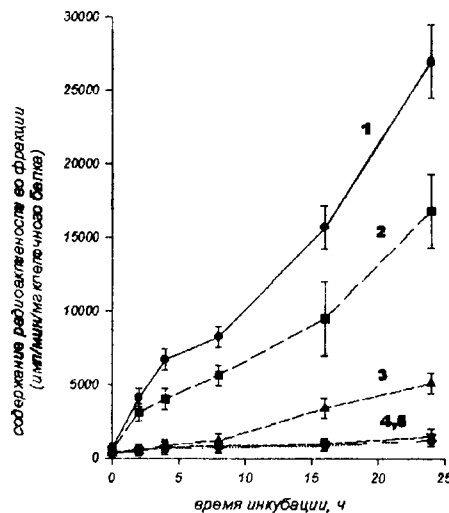


Рисунок 1.

Связывание соединения III клетками Нер G2. Клетки инкубировали с 30 мкМ раствором соединения III в присутствии следовых количеств радиоактивного аналога IIIa (удельная активность препарата $4,2 \times 10^6$ имп./мин/мкмоль). Обозначения: 1 - общее содержание радиоактивных продуктов в клетке; 2 - содержание радиоактивного пальмитата IIIa; 3 - содержание радиоактивности во фракции триглицеридов; 4 - содержание радиоактивности во фракции жирных кислот; 5 - содержание радиоактивности в полярной фракции.

Внутриклеточный гидролиз соединения III приводил к образованию радиоактивной пальмитиновой кислоты, которая преимущественно включалась во фракцию триглицеридов. Включение радиоактивности в полярную фракцию было незначительным, во фракцию холестеринных эфиров - не отличалось от фона. Из рисунка 1 видно, что скорость внутриклеточного расщепления соединения III низка: за 24 ч включение [14 C] во фракцию жирных кислот и триглицеридов в сумме не превышало 30% от общей радиоактивности. Необходимо отметить, что

превращение 15-кетостерина в полярные метаболиты в клетках Нер G2, образовавшегося в результате гидролиза пальмитата III, происходит, по крайней мере, на порядок быстрее [20].

Влияние соединений I - VI на взаимодействие клеток Нер G2 с ЛНП. Поступление холестерилэфиров ЛНП в клетки печени является важнейшим этапом транспорта холестерина в организме млекопитающих [22]. Для того, чтобы оценить влияние соединений I-VI на захват холестерилэфиров в составе ЛНП, клетки Нер G2 сначала инкубировали 4 ч в безсывороточной среде, содержащей исследуемые соединения, а затем инкубировали в присутствии ЛНП, содержащих радиоактивно меченый олеилхолестерил (простой) эфир (^{14}C -СЕ)ЛНП. О захвате холестерилэфиров ЛНП судили по радиоактивности липидных экстрактов клеток. Влияние соединений I-VI в концентрации 10 мкМ на захват ^{14}C -СЕ)ЛНП в клетках Нер G2 представлено на рис. 2. Среди исследованных соединений только два имели эффект, достоверно отличающийся от контроля: кетостерин I подавлял захват ^{14}C -СЕ)ЛНП, что согласуется с ранее опубликованными данными [23], а пальмитат III стимулировал захват ^{14}C -СЕ)ЛНП.

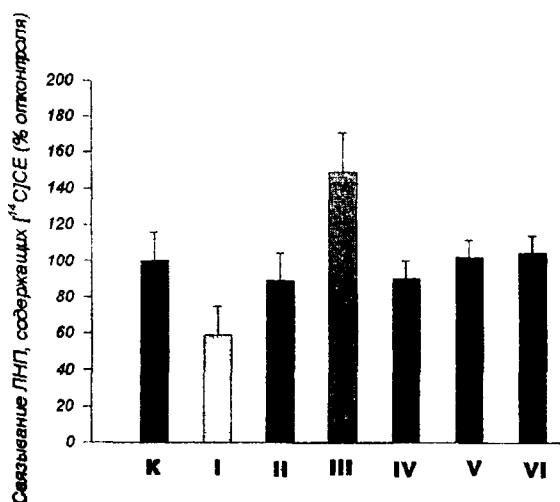


Рисунок 2.

Влияние соединений I - VI на связывание ^{14}C -СЕ)ЛНП клетками Нер G2. Концентрация исследуемых веществ в инкубационной среде 10 мкМ. Контрольное значение составляло 1200 имп./мин на 1 мг клеточного белка за 1ч (принято за 100%).

Влияние соединений I - VI на биосинтез холестерина в клетках Нер G2. Известно, что 15-кетостерин (I) подавляет активность HMG-CoA-синтазы, HMG-CoA-редуктазы и ингибирует биосинтез холестерина в культуре клеток в зависимости от его концентрации в культуральной среде [1]. Влияние ацильных производных 15-кетостерина на биосинтез холестерина в культуре клеток ранее не изучалось. На рисунке 3 представлены концентрационные зависимости влияния соединений I-VI на биосинтез холестерина в клетках Нер G2. Из рисунка видно, что кетостерин I эффективно подавлял биосинтез холестерина - значение IC_{50} составляло $4,0 \pm 0,7$ мкМ и соответствовало данным, полученным ранее [24]. Ингибирующий эффект кетостерина II с гидроксильной группой в 3 α -конфигурации был достоверно меньше - значение IC_{50} составляло $8,0 \pm 1,5$ мкМ. Из рисунка 3 видно, что ингибирующий эффект снижается при уменьшении полярности молекулы: ацетаты V и VI ингибировали биосинтез холестерина слабее, чем кетостерины I и II; пальмитаты III и IV были практически неактивны.

Влияние соединений I - VI на ацилирование холестерина в клетках Нер G2. АХАТ-зависимое ацилирование холестерина в клетках печени характеризует продукцию ЛОНП и секрецию холестерилэфиров в составе ЛОНП в кровотока [22]. Поэтому изучение влияния соединений I-VI на биосинтез

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ОКСИСТЕРИНОВ С КЛЕТКАМИ

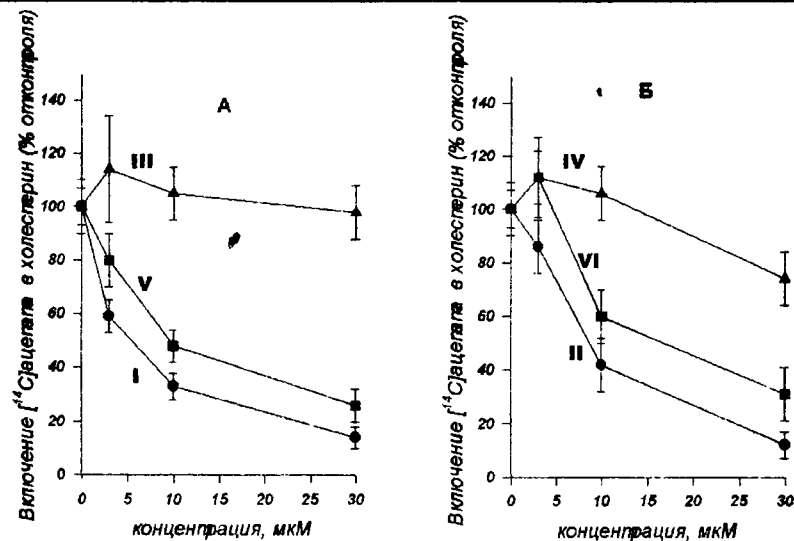


Рисунок 3.

Влияние соединений I - VI на биосинтез холестерина. А - 3β-гидрокси-5α-холест-8(14)-ен-15-он (I) и его ацильные производные (соединения III, V); Б - 3α-гидрокси-5α-холест-8(14)-ен-15-он (II) и его ацильные производные (соединения IV, VI). Контрольное значение составляло 18900 имп./мин на 1 мг клеточного белка за 3 ч (принято за 100%).

холестериловых эфиров в клетках Нер G2 представляет интерес для объяснения гипохолестеринемического эффекта *in vivo*. Влияние соединений I - VI на ацилирование холестерина в клетках Нер G2, оцениваемое по включению [¹⁴С]-олеиновой кислоты во фракцию холестериловых эфиров, представлено на рисунке 4. В работах [25, 26] было показано, что 15-кетостерин эффективно ингибирует активность АХАТ в бесклеточных системах (микросомах печени и кишечника крысы), являясь конкурентным субстратом АХАТ-зависимого ацилирования холестерина. Однако, в наших опытах 15-кетостерин I не оказывал заметного влияния на включение [¹⁴С]-олеиновой кислоты в холестериловые эфиры. В то же время для кетостерина II наблюдали концентрационно зависимое стимулирование биосинтеза холестериловых эфиров.

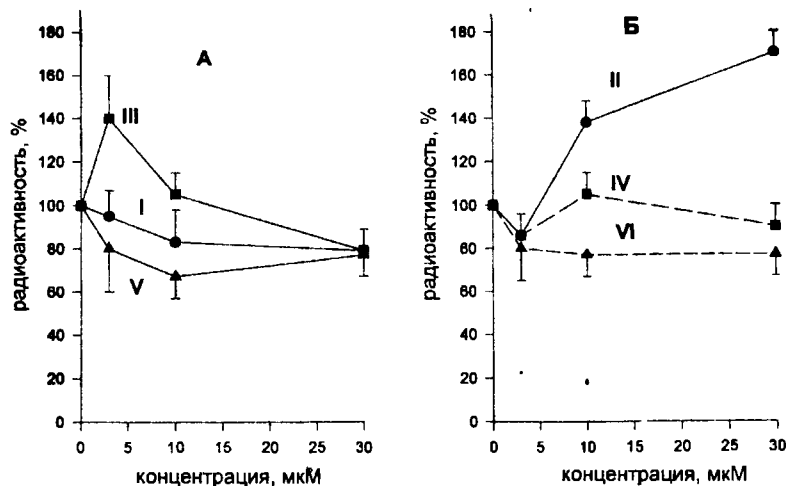


Рисунок 4.

Влияние соединений I - VI на уровень ацилирования холестерина в клетках Нер G2. А - 3β-гидрокси-5α-холест-8(14)-ен-15-он (I) и его ацильные производные (соединения III, V); Б - 3α-гидрокси-5α-холест-8(14)-ен-15-он (II) и его ацильные производные (соединения IV, VI). Контрольное значение составляло 3100 имп./мин на 1 мг клеточного белка за 3 ч (принято за 100%).

Исследование гипохолестеринемической активности 15-оксигенированных стеринов было начато Шрепфером около 30 лет назад и фокусировалось в основном на способности этих соединений подавлять активность HMG-CoA-редуктазы. Однако, в настоящее время стало очевидным, что ингибирование биосинтеза холестерина 15-оксигенированными стеринами не может объяснить сильный гипохолестеринемический эффект, наблюдаемый в экспериментах *in vivo*. 15-Кетостерин, добавленный к корму подопытных животных, быстро деградирует в печени и, следовательно, не может поступать в клетки периферических тканей (где синтезируется основная масса холестерина). Кроме того, для 15-кетостерина I показано, что в культуре гепатоцитов крысы он ингибировал активность HMG-CoA-редуктазы, а в экспериментах *in vivo* вызывал повышение активности HMG-CoA-редуктазы в печени крыс, получавших 15-кетостерин I с кормом [27].

Молекулярные механизмы, лежащие в основе гипохолестеринемической активности 15-кетостерина и родственных соединений, в настоящее время не установлены. Эти соединения ингибируют активность HMG-CoA-редуктазы и HMG-CoA-синтазы в культуре клеток, но не влияют на активность этих ферментов в бесклеточных системах [24]. 15-Кетостерин заметно подавляет захват холестерилвых эфиров ЛНП в клетках Hep G2, не влияя на неспецифический эндоцитоз липидных дисперсий [21, 23]. 15-Кетостерин является конкурентным субстратом АХАТ-зависимого ацилирования холестерина в микросомах печени и кишечника [25, 26], но, как показано в данной работе, не влияет на биосинтез холестерилвых эфиров в клетках Hep G2. 15-Кетостерин и родственные соединения не активировали ядерные рецепторы, регулируемые окистеринами (LXR α , LXR β , SF1, LXR, SHP) [Мишарин, Кладель, Бошер, Стаэльс, неопубликованные данные]. 15-Кетостерин и родственные соединения незначительно снижают уровень мРНК HMG-CoA-редуктазы и не влияют на уровень мРНК ЛНП рецептора в клетках Hep G2 [23], что свидетельствует о том, что эти соединения не участвуют в SREBP-зависимой регуляции [28]. Не исключено, что влияние на активность HMG-CoA-редуктазы обусловлено эффектами 15-кетостерина на скорости фосфорилирования и деградации фермента в клетке [29].

Поскольку в настоящее время объяснить биологическую активность 15-кетостеринов на молекулярном уровне не представляется возможным, некоторую полезную информацию можно получить из сопоставления структуры и проявляемого биологического эффекта. Во многих работах ранее постулировалось, что для проявления биологической активности окистеринов необходимым условием является наличие свободной гидроксильной группы в положении 3 β . Однако, данные настоящей работы показывают, что кетостерин II, содержащий 3 α -гидроксильную группу, а также 3-ацетилированные кетостерины V и VI способны влиять на биосинтез холестерина в клетках Hep G2. По-видимому, для проявления биологической активности 15-кетостеринов существенными факторами являются полярность молекулы и возможность метаболической деградации в полярные продукты.

Пальмитаты III и IV (наименее полярные из исследованных в данной работе соединений) не ингибировали биосинтез холестерина; пальмитат III активировал захват холестерилвых эфиров ЛНП. Ацетаты V и VI и исследованные ранее 3 β -(2-пропенилокси)5 α -холест-8(14)-ен-15-он и 3 β -(2-оксоэтокси)5 α -холест-8(14)-ен-15-он [23, 30] (с полярностью ниже, чем полярность 15-кетостерина I) слабо ингибировали биосинтез холестерина. Кетостерин II с гидроксильной группой в α -конфигурации заметно ингибировал биосинтез и значительно стимулировал ацилирование холестерина. Известно, что некоторые окистерины (в частности, 25-гидроксихолестерин) активируют биосинтез холестерилвых эфиров, являясь аллостерическими регуляторами АХАТ [31, 32]. Для 15-кетостеринов стимулирующий эффект мы показали впервые.

Известно, что 15-кетостерин быстро метаболизирует в печени с образованием полярных продуктов, приводя к резкому снижению концентрации биологически

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ОКСИСТЕРИНОВ С КЛЕТКАМИ

активного стерина в клетках Нер G2. При этом образовавшиеся полярные продукты выходят в культуральную среду [20]. 15-Кетостерин, обладающий высоким сродством к оксистерин-связывающему белку (OSBP) [33] и эффективно вытесняющий 25-гидроксихолестерин из комплекса с OSBP в бесклеточной системе [10], тем не менее, слабо ингибировал образование комплекса 25-гидроксихолестерин-OSBP в клетках Нер G2 [18] из-за быстрой деградации 15-кетостерина в клетке. Можно отметить, что устойчивый к метаболической деградации в клетках печени 3β -гидрокси-25,26,26,26,27,27,27-гептафтор-5 α -холест-8(14)-ен-15-он [7, 34, 35] подавлял биосинтез холестерина в клетках Нер G2 слабее, чем кетостерин I. Относительно слабую ингибиторную активность фторированного кетостерина также можно объяснить высокой полярностью его молекулы и сдвигом равновесия в распределении стерина между клетками и средой.

Результаты, представленные нами в настоящей работе, показывают, что пальмитоильные производные 15-кетостеринов III и IV практически не влияют на основные параметры, характеризующие метаболизм холестерина в клетках Нер G2. Соединение III медленно захватывалось клетками Нер G2. Скорости поступления и последующего его расщепления в клетках Нер G2 значительно ниже, чем скорость превращения 15-кетостерина (I) и его аналогов в полярные метаболиты в тех же условиях [20]. Очевидно, что внутриклеточное накопление биологически активного кетостерина (I) в этих условиях невозможно.

Полученные в данной работе результаты позволяют сделать заключение, что *in vivo* ацильные производные 15-кетостерина не способны оказывать значительного эффекта на основные пути поступления и выведения холестерина печенью. Следовательно, наши данные можно рассматривать как подтверждающие гипотезу, высказанной в обзоре [1], согласно которой гипохолестеринемический эффект 15-кетостерина *in vivo* в основном определяется блокированием абсорбции диетарного холестерина в кишечнике.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проекты 00-04-48643 и 01-04-48504).

ЛИТЕРАТУРА

1. Schroepfer G.J. (2000) *Physiol. Rev.*, **80**, 361-554.
2. Schroepfer G.J., Chrisophe A., Needleman D.H., Kisic A., Sherrill B.C. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **146**, 1003-1008.
3. Pajewsky T.N., Pinkerton F.D., Miller L.R., Schroepfer G.J. (1988) *Chem. Phys. Lipids*, **48**, 153-168.
4. Brabson J. S., Schroepfer G. J. (1988) *Chem. Phys. Lipids*, **47**, 1-20.
5. Schroepfer G.J., Chu A.J., Needleman D.H., Izumi A., Nguen P.T., Wang K.-S., Little J.M., Sherrill B.C., Kisic A. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 4110-4123.
6. St. Pyrek J., Vermilio, J.L., Stephens T.W., Wilson W.K., Schroepfer G.J. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 4536-4543.
7. Herz J.E., Swaminathan S., Pinkerton F.D., Wilson W.K., Schroepfer G.J. (1992) *J. Lipid Res.*, **33**, 579-598.
8. Wilson W. K., Wang K.S., Kisic A., Schroepfer G.J. (1988) *Chem. Phys. Lipids*, **48**, 7-17.
9. Мишарин А.Ю., Чернов Б.К. (1997) *Биоорган. химия*, **23**, 675-679.
10. Мишарин А.Ю., Крылов А.С., Алки К., Лафонт Ю., Штейншнейдер А.Я., Косых В.А., Морозкин А.Д. (1997) *Биоорган. химия*, **23**, 297-303.
11. Игнатов Д.В., Прокофьев Ю.И., Тимофеев В.П., Мишарин А.Ю. (2003) *Биоорган. химия*, **29**, 00-00.
12. Markwell M.A.K., Haas S.M., Bieber L.L., Folbert N.E. (1978) *Analyt. Biochem.*, **87**, 206-211.
13. Lindgren F.T. (1975) In: *Analysis of Lipids and Lipoproteins*. (E.G. Perkins ed.) Amer. Oil Chemists' Soc., Amsterdam, pp.202-224.
14. Roberts D.C.K., Miller N.E., Price S.G.L., Crook D., Cortese C., La Ville A., Masana L., Lewis B. (1985) *Biochem. J.*, **226**, 319-322.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ОКСИСТЕРИНОВ С КЛЕТКАМИ

15. Swinkels D.W., Hendriks J.C.M., Demacker P.N.M., Stalenhoef A.F.H. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1047**, 212-222.
16. Goldstein J.L., Anderson R.G.W., Brown M.S. (1979) *Methods Enzymol.*, **98**, 241-261.
17. Johnson W.J., Mahlberg F.H., Rothblat G.H., Phillips M.C. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1085**, 273-298.
18. Kisseleva A.F., Goryunova L.E., Medvedeva N.V., Morozkin A.D., Alquier C., Misharin A.Yu. (1999) *FEBS Lett.*, **446**, 163-168.
19. Savouret J.-F., Antenos M., Quesne M., Xu J., Milgrom E., Casper R.F. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 3054-3059.
20. Сергеева Е.А., Игнатов Д.В., Медведева Н.В., Мишарин А.Ю. (2003) *Биоорг. химия*, **29**, 648-654.
21. Киселева А.Ф., Медведева Н.В., Горюнова Л.Е., Мишарин А.Ю. (2000). *Биол. мембр.*, **17**, 163-172.
22. Dietschy J.M., Turley S. D., Spady D.K. (1993) *J. Lipid Res.*, **34**, 1637-1659.
23. Киселева А.Ф., Горюнова Л.Е., Медведева Н.В., Алки К., Мишарин А.Ю. (1999) *Биохимия*, **64**, 456-463.
24. Schroepfer G. J., Parish E. J., Kandutsch A. A. (1979) *Chem. Phys. Lipids*, **25**, 265-285.
25. Needleman D.H., Strong K., Stemke K.A., Brabson J.S., Kisic A., Schroepfer G.J. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **148**, 920-925.
26. Miller L.R., Needleman D.H., Brabson J.S., Wang K.-S., Schroepfer G.J. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **148**, 934-940.
27. Miller L.R., Raulston D.I., Schroepfer G.J. (1988) *Chem. Phys. Lipids*, **47**, 177-186.
28. Brown M.S., Goldstein J.L. (1997) *Cell*, **89**, 331-340.
29. Edwards P.A., Ericsson J. (1999) *Annu. Rev. Biochem.*, **68**, 157-185.
30. Misharin A.Yu., Kisseleva A.F., Alquier C., Shatalov N.A. (1999) *Med. Chem. Res.*, **9**, 61-68.
31. Sturley S. (1997) *Curr. Opin. Lipidol.*, **8**, 167-173.
32. Morin R.J., Peng S.K. (1992) *Lipids*, **27**, 478-480.
33. Taylor F.R., Saucier S.E., Shown E.P., Parish E.J., Kandutsch A.A. (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 12382-12394.
34. Gerst N., Pinkerton F.D., Kisic A., Wilson W.K., Swaminathan S., Schroepfer G.J. (1994) *J. Lipid Res.*, **35**, 1040-1056.
35. Swaminathan S., Siddiqui A.U., Gerst N., Pinkerton F.D., Kisic A., Kim L.J., Wilson W.K., Schroepfer G.J. (1995) *J. Lipid Res.*, **36**, 767-786.

Поступила 17.06.2003.

INTERACTION OF ACYL DERIVATIVES OF 3 β -HYDROXY-5 α -CHOLEST-8(14)-EN-15-ONE AND 3 α -HYDROXY-5 α -CHOLEST-8(14)-EN-15-ONE WITH HEPATOMA Hep G2 CELLS.

E.A. Piir¹, N.V. Medvedeva¹, N.M. Kashirina², A.Ya. Shevelev², A.Yu. Misharin¹.

¹V.N. Orechovich Institute of Biomedical Chemistry, RAMS

²Institute of Experimental Cardiology, Cardiology Research Center.

Effects of 3 β -hydroxy-5 α -cholest-8(14)-en-15-one (I), 3 α -hydroxy-5 α -cholest-8(14)-en-15-one (II), 3 β -hexadecanoyloxy-5 α -cholest-8(14)-en-15-one (III), 3 α -heptadecanoyloxy-5 α -cholest-8(14)-en-15-one (IV), 3 β -acetoxy-5 α -cholest-8(14)-en-15-one (V), 3 α -acetoxy-5 α -cholest-8(14)-en-15-one (VI) on cholesterol metabolism in hepatoma Hep G2 cells were studied. Compound III slowly bind to Hep G2 cells followed by internalization and metabolic transformation (at a concentration of 30 μ M the total binding of compound III was (3.9 \pm 0.4) nmol per 1 mg of cell protein for 24 h incubation). Compound I depressed and compound III stimulated the uptake of low density lipoproteins radiolabeled with oleyl cholesteryl ether [¹⁴C-CE]LDL (58% and 149% from control). Compounds I and II inhibited cholesterol biosynthesis from [¹⁴C]acetate (with IC₅₀ values of 4.0 \pm 0.7 and 8.0 \pm 1.5 μ M). Effects of compounds V and VI were less potent; compounds III and IV were inactive. Compound II activated cholesterol acylation, estimated by incorporation of [¹⁴C]-oleic acid into cholesteryl esters (170% from control at a concentration of 30 μ M). The results indicate correlation between polarity of the compound and its ability to regulate cholesterol metabolism in Hep G2 cells.

Keywords: oxysterol, acyl derivatives of oxysterols, cholesterol metabolism, inhibition of cholesterol biosynthesis, hypocholesterinemic activity, Hep G2.