

УДК ВМ 08-379

©Коллектив авторов

**ВСЕ ПРИЗНАКИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА  
У ГИПЕРТЕНЗИВНОЙ ЛИНИИ КРЫС НИСАГ АССОЦИИРУЮТСЯ  
С ПОВЫШЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ  
PPAR, LXR, PXR И CAR В ПЕЧЕНИ**

***Е.Н. Пивоварова<sup>1\*</sup>, М.И. Душкин<sup>2</sup>, М.Л. Перепечаева<sup>3</sup>, В.Ф. Кобзев<sup>1</sup>,  
В.А. Труфакин<sup>4</sup>, А.Л. Маркель<sup>5</sup>***

<sup>1</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090 Новосибирск,  
пр. Ак. Лаврентьева, 10; факс: (383)333-1278; эл. почта: enpivovarov@rambler.ru

<sup>2</sup>Институт терапии СО РАМН, 630089 Новосибирск,  
ул. Богаткова, 175/1; факс: (383)334-8373

<sup>3</sup>Институт молекулярной биологии и биофизики СО РАМН, 630117 Новосибирск,  
ул. Ак. Тимакова, 2; факс: (383)332-3147

<sup>4</sup>Институт физиологии СО РАМН, 630117 Новосибирск,  
ул. Ак. Тимакова, 4; факс: (383)332-3147

<sup>5</sup>Новосибирский государственный университет, 630090 Новосибирск,  
ул. Пирогова, 2; факс: (383)330-2237

Известно, что метаболический синдром (МС), характеризующийся гипертензией, дислипидемией, толерантностью к глюкозе и ожирением приводит к серьезным заболеваниям сердечно-сосудистой системы. Распространённость МС катастрофически растёт. Молекулярные механизмы, ответственные за причину комплексных нарушений при МС остаются практически неизученными. Важную роль в развитии МС играет хронический стресс, поэтому в данной работе была использована модель гипертензивной линии крыс с наследственной индуцированной стрессом гипертензией (НИСАГ). Было показано, что для крыс линии НИСАГ по сравнению с контрольной линией WAG характерно повышенное содержание триглицеридов (ТГ), повышенное содержание холестерина (ХС) липопротеинов очень низкой плотности и низкой плотности (ЛПОНП и ЛПНП), сниженное содержание ХС липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), пониженный уровень аполипопротеина А-I и повышенный уровень аполипопротеина В-100. Средняя масса тела крыс линии НИСАГ превышала аналогичный показатель крыс линии WAG, содержание глюкозы в крови также превышало содержание глюкозы у крыс линии WAG. Таким образом, у крыс НИСАГ гипертензия сопровождается дислипидемией, повышенным содержанием глюкозы в крови и повышенной массой тела, что демонстрирует весь симптомокомплекс, характерный для МС. ДНК-связывающая активность PPAR, LXR, PXR, CAR оказалась выше у крыс линии НИСАГ, чем у крыс линии WAG (транскрипционных факторов, участвующих в регуляции генов липидного и углеводного обменов). Комплексное исследование регуляторных механизмов, сигнальных путей и транскрипционных мишеней PPAR, LXR, PXR, CAR может существенно облегчить понимание патогенеза МС и даст ценную информацию для разработки соответствующих комплексных лекарственных препаратов для терапии МС.

**Ключевые слова.** метаболический синдром, гипертензивная линия крыс НИСАГ, PPAR, LXR, PXR, CAR.

**Принятые сокращения:** линия крыс НИСАГ (наследственная индуцированная стрессом артериальная гипертензия), PPAR - рецептор, активирующий пролиферацию пероксисом (peroxisome proliferators-activated receptor), LXR - X рецептор печени (liver X receptor), PXR - прегнановый X рецептор (pregnane X receptor), CAR - конститутивный андростановый рецептор (constitutive androstane receptor), HNF-4 - ядерный фактор печени 4 (hepatic nuclear factor 4).

\* - адресат для переписки

**ВВЕДЕНИЕ.** Метаболический синдром (МС) – это комплекс патологий, повышающих риск развития сердечно-сосудистых заболеваний.

Серьёзным фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний является ожирение, которое часто сочетается с гипертензией, что, в свою очередь, повышает риск развития таких метаболических нарушений как резистентность к инсулину, высокий уровень триглицеридов (ТГ), низкий уровень холестерина (ХС) липопротеинов высокой плотности (ЛПВП). В 1980-х Reaven [1] предложил такие метаболические нарушения объединить под общим названием X синдром, известного как метаболический синдром.

Несмотря на то, что термин “метаболический синдром” использовался в течении ряда лет, только относительно недавно была предпринята попытка дать конкретное определение данного понятия. Согласно NCEP-АТР III (National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III) критериями метаболического синдрома являются три или более из следующих нарушений: висцеральное ожирение, повышение ТГ, снижение ХС ЛПВП в крови, гипертензия, повышение глюкозы в крови [2].

Развитие сложного симптомокомплекса МС свидетельствует о системных нарушениях в липидном и углеводном метаболизме и, по-видимому, должно иметь общую основу, а именно на уровне регуляции экспрессии соответствующих генов.

В регуляции экспрессии генов, вовлеченных в липидный и углеводный обмен, принимают участие транскрипционные факторы, относящиеся к суперсемейству ядерных гормональных рецепторов: рецепторы, активирующие пролиферацию пероксисом (PPAR) [3, 4], X рецепторы печени (LXR) [5], прегнанные X рецепторы (PXR), конститутивные андростановые рецепторы (CAR) [6], а также ядерный фактор печени 4 (HNF-4) [7].

Высокий процент заболеваемости МС обуславливает повышенный интерес исследователей к моделированию МС, поиску причин его возникновения и разработке новых методов лечения. Несмотря на существование целого ряда инбредных, конгенных и трансгенных линий крыс, моделирующих развитие МС человека, ни одна из полученных на сегодняшний день экспериментальных моделей не дает описания всех механизмов, отражающих этиологию данного комплекса заболеваний у человека. Известно, что важную роль в развитии МС у людей играет хронический стресс, вызывающий системные нарушения липидного обмена и тонуса сосудов [8]. В Институте цитологии и генетики Сибирского отделения РАН из популяции крыс Wistar в результате селекции по уровню артериального давления (АД) на фоне эмоционального стресса была получена линия крыс с наследственной, индуцированной стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ или ISIAH – inherited stress-induced arterial hypertension – в англоязычной литературе) [9]. Ранее было показано, что эта линия характеризуется также повышенной массой тела [10] и изменением толерантности к глюкозе [11].

Поскольку помимо артериальной гипертензии, предрасположенности к диабету и ожирения, еще одной составляющей МС, является атерогенное изменение липидного спектра, в данной работе было проведено сравнительное исследование липидного спектра у гипертензивной линии НИСАГ и нормотензивной линии Wistar Albino Glaxo (WAG). Были измерены уровень глюкозы в крови и масса тела животных. Поскольку основным органом, контролирующим энергетический гомеостаз организма является печень, в печени была оценена функциональная активность транскрипционных факторов, контролирующих экспрессию генов, вовлеченных в липидный и углеводный метаболизм, а именно PPAR, LXR, PXR, CAR и HNF4, у гипертензивной линии крыс НИСАГ и нормотензивной линии крыс WAG.

## МЕТОДИКА.

**Материалы.** В работе использованы: [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-дезоксид АТФ (удельная активность 6000 Кюри/нмоль) “Amersham” (Англия); Tris, Hepes, спермин, спермидин, дитиотриглицерин (ДТТ) – “Sigma”, США; фрагмент Клёнова ДНК-полимеразы I *E. coli* “Сибэнзим” (Россия); DEAE-81 бумага – “Whatman” (Великобритания); акриламид, бисакриламид “Reanal” (Венгрия); ЭДТА, ЭГТА, сахароза, глицерин “Serva” (Германия). Остальные реактивы отечественного производства квалификации “х.ч.” и “о.с.ч.”.

**Олигонуклеотиды.** В работе использовали двуцепочечные олигонуклеотиды, соответствующие известным сайтам связывания транскрипционных факторов (вторая цепь не приведена):

PPAR: 5'-gatcCAAAACTAGGTCAAAGGTCA-3' [12];

LXR: 5'-gatcCAGTGACCGCCAGTAACCCAGC-3' [13];

PXR: 5'-gatcTATGAAC TCAAAGGAGGTCACT-3' [14];

CAR: 5'-gatcGAAGTTCATGAGAGTTCA-3' [15];

HNF-4: 5'- gatcCGCTGCTGCTCTTTGATCTGTAGGCG-3' [16].

Строчными буквами обозначены добавленные выступающие концы, по которым после отжига метили олигонуклеотиды с помощью фрагмента Клёнова ДНК-полимеразы I в присутствии [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP. Олигонуклеотиды были синтезированы на автоматическом синтезаторе АСМ-102И (“Биоссет”, Новосибирск) Н-фосфонатным методом.

**Животные.** Работа выполнена на 4-5-месячных самцах крыс стресс-чувствительной гипертензивной линии НИСАГ и нормотензивной линии WAG разведения вивария ИЦиГ СО РАН. Всего было использовано по 16 животных каждой линии. Животных содержали в клетках по 2-3 особи при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище (брикетированный корм 120-1 “Лабораторснаб”, Москва). Массу тела животных определяли простым взвешиванием. Все экспериментальные процедуры с животными проводили в соответствии с международными правилами работы с животными [European Communities Council Directive (86/609/ЕЕС)].

**Получение сыворотки крови.** Животных забивали быстрой декапитацией, кровь собирали в 15мл пластиковые пробирки, содержащие 100 мкл раствора 10 мМ фосфатно-солевого буфера, pH 7,4 (НПЦ “ЭКО СЕРВИС”, Россия) и 50 мМ ЭДТА. Плазму, полученную после центрифугирования крови (3000 g, 30 мин), замораживали при -20°C и хранили не более 2 недель.

**Изолирование липопротеиновых фракций крови.** Липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП), липопротеины низкой плотности (ЛПНП), липопротеины высокой плотности<sub>2</sub> (ЛПВП<sub>2</sub>) и ЛПВП<sub>3</sub> выделяли из объединённой по группам плазмы крови крыс методом изоплотностного ультрацентрифугирования в растворе KBr в роторе Ti-75 ультрацентрифуги L8M (“Beckman”), 105000 g 24 ч для каждой фракции. Полученные фракции липопротеинов диализовали при +4°C в течение 24 ч против 0,15 М раствора NaCl, содержащего 0,3 мМ ЭДТА, pH 7,4.

**Определение содержания липидов в плазме крови и липопротеинах.** Концентрацию холестерина и триглицеридов в плазме крови и липопротеиновых фракциях определяли с помощью колориметрического метода, используя стандартные наборы (“Sigma-Aldrich”, США). Содержание белка в липопротеинах определяли методом Лоури. Достоверность различий сравниваемых средних значений оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

**Определение содержания апопротеинов B-100 (apo B-100) и A-I (apo A-I) в сыворотке крови.** Содержание apo B-100 и apo A-I в сыворотке крови определяли методом иммуноблота при обработке фракций липопротеинов (ЛПОНП и ЛПВП<sub>3</sub> соответственно). Липопротеины делипидизировали смесью диэтиловый эфир : этанол (3:1; об/об), электрофорез апопротеинов проводили

в 10% ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия по модифицированному методу Laemmli, затем осуществляли перенос на нитроцеллюлозную бумагу. Содержание апопротеинов определяли используя кроличьи поликлональные антитела к апо В-100 и апо А-I (“Calbiochem”, США). В качестве вторичных антител использовали анти-кроличьи антитела, меченные щелочной фосфатазой (“Santa Cruz Biotechnology”). Фотоденситометрический анализ полос на рентгеновской плёнке осуществляли с помощью программы Kodak 1D Image Analysis Software.

*Измерение глюкозы в крови.* Образцы крови получали из хвостовой вены крыс натошак, лишая животных корма накануне вечером. Измерение глюкозы в крови проводили электрохимическим методом, используя глюкометр “One Touch Ultra” (“Life Scan, Inc”, США) и тест-полоски для количественного измерения уровня глюкозы в цельной крови “One Touch Ultra” (“Life Scan Inc.”).

*Выделение белковых экстрактов ядер клеток печени.* Экстракты ядер клеток печени готовили по методу Горски в модификации Шапиро [17, 18]. Животных декапитировали, печень перфузировали охлажденным до +4°C буфером, содержащим 140 mM KCl, 1 mM ЭДТА, 10 mM Hepes, pH 7,6, измельчали и гомогенизировали не менее чем в 6 объемах сахарозного буфера (10 mM Hepes, pH 7,6, 25 mM KCl, 1 mM ЭДТА, 0,15 mM спермин, 0,5 mM спермидин, 2,05 M сахароза, 10% глицерин) и получали экстракты ядер. Для этого 25 мл гомогената наносили на подушку из 10 мл того же буфера в пробирки для ротора SW28 для ультрацентрифуги Beckman L8M/E и центрифугировали при 24000 об/мин в течение 40 мин. Осадок ядер ресуспендировали в 4 мл буфера, содержащего 10 mM Hepes, pH 7,6, 100 mM KCl, 0,1 mM ЭДТА, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ДТТ, 10% глицерин. Ядра лизировали добавлением 400 мкл насыщенного при +4°C раствора (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Хроматин осаждали центрифугированием в роторе SW50 при 34000 об/мин в течение 90 мин. К супернатанту добавляли порциями (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,252 г на 1 мл раствора) при постоянном перемешивании на льду. Осадок собирали центрифугированием в роторе SW50 при 32000 об/мин в течение 20 мин и растворяли в 0,3 мл буфера, содержащего 25 mM Hepes, pH 7,6, 80 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 0,2 mM EGTA 1 mM ДТТ, 10% глицерин. Образцы диализовали три раза по 45 мин против 100 объёмов того же буфера. После диализа экстракты делили на аликвоты и хранили при -70°C. Определение белка в экстрактах ядер проводили методом Брэдфорд.

*Торможение комплексов ядерных белков со специфическими ДНК-зондами в геле.* ДНК-связывающую активность белков оценивали методом торможения в геле. Белки ядерных экстрактов (4 мкг на пробу) инкубировали в течение 10 мин во льду с озвученной ДНК из спермы лосося (из расчета 1 мкг ДНК на 6 мкг суммарного белка в пробе) в буфере, содержащем 25 mM Hepes, pH 7,6, 80 mM KCl, 0,1 mM ЭДТА, 1 mM ДТТ, 10% глицерин. Добавляли меченный олигонуклеотид (600-1000 имп/мин на пробу) и инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Электрофорез проводили при напряжении 10 В/см и температуре +4°C в течение 40 мин в 4,5% нативном ПААГ. По окончании электрофореза гель фиксировали, высушивали и радиоавтографировали.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

*Липидный спектр сыворотки крови, уровень глюкозы в крови и массы тела крыс линии НИСАГ и WAG.* При сравнении липидного спектра сыворотки крови крыс нормотензивной линии WAG и гипертензивной линии НИСАГ было показано, что при отсутствии статистически значимых различий в уровне общего холестерина (ХС), крысы линии НИСАГ отличаются достоверно пониженным содержанием ХС липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), а также повышенным содержанием триглицеридов (ТГ) на 16,2% и 34,7% соответственно (рис. 1). Такое изменение липидного спектра характерно для МС, а также служит показателем атерогенеза [19].

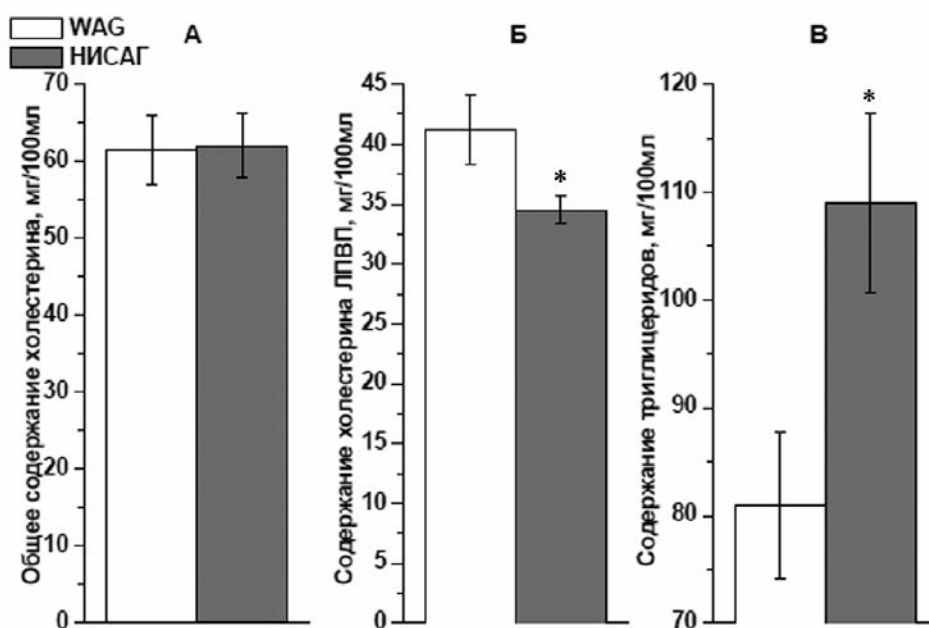


Рисунок 1.

Содержание общего ХС (А), ХС ЛПВП (Б), ТГ (В) в сыворотке крови крыс нормотензивной линии WAG и гипертензивной линии НИСАГ.

\* -  $p < 0,05$  по сравнению с WAG, число животных в каждой группе - 16.

Анализ распределения ХС по фракциям липопротеинов (рис. 2А) также выявил тенденцию к атерогенезу у крыс линии НИСАГ. Для них характерно повышенное содержание ХС в атерогенных фракциях липопротеинов: ЛПОНП и ЛПНП на 46% и 31% соответственно, а также пониженное содержание ХС в антиатерогенных фракциях липопротеинов: ЛПВП<sub>2</sub> и ЛПВП<sub>3</sub> на 33% и 18% соответственно.

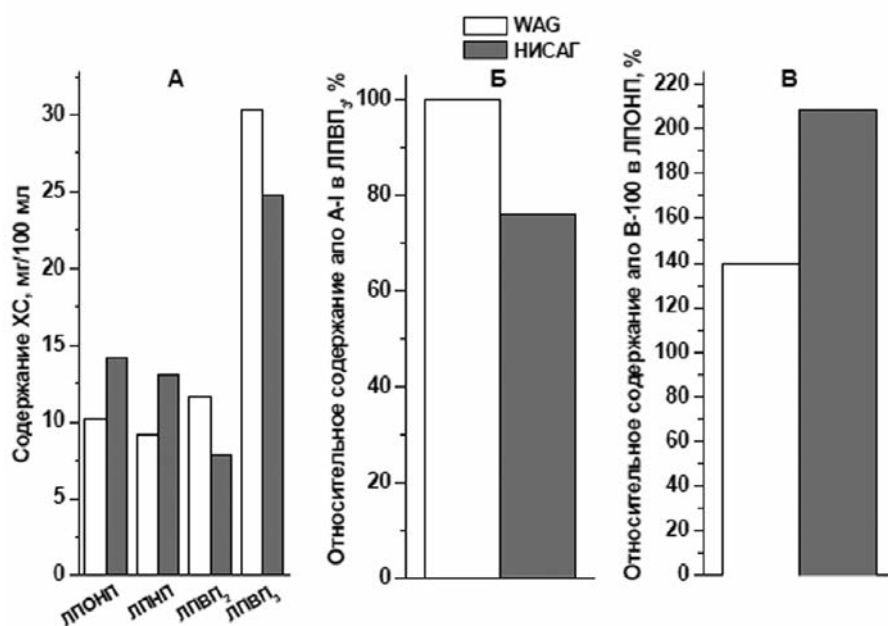


Рисунок 2.

Содержание ХС в отдельных фракциях липопротеинов (А) и относительное содержание апо А-I и апо В-100 (Б) в сыворотке крови нормотензивной линии WAG и гипертензивной линии НИСАГ.

Образцы сыворотки крови были смешены по группам, число животных в каждой группе - 16.



## УЧАСТИЕ PPAR, LXR, PXR, CAR В РАЗВИТИИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА

Уровень апоА-I, основного белка ЛПВП, в крови крыс линии НИСАГ был на 24% ниже данного показателя у крыс линии WAG (рис. 2Б). Уровень апоВ-100, основного белка ЛПНП, в крови крыс линии НИСАГ был на 49,5% выше данного показателя у крыс линии WAG (рис. 2В). Сниженный уровень апоА-I и повышенный уровень апоВ-100 также являются факторами риска развития сердечно-сосудистых заболеваний [19].

Средняя масса тела крыс линии НИСАГ достоверно на 8,5% превышала аналогичный показатель крыс линии WAG (рис. 3А). Базальный уровень глюкозы у крыс НИСАГ статистически значимо (на 15%) превышал уровень глюкозы у крыс линии WAG (рис. 3Б). Повышенная масса тела и повышенный уровень глюкозы в крови являются характерными признаками развития МС (NCEP-ATP, 2001).

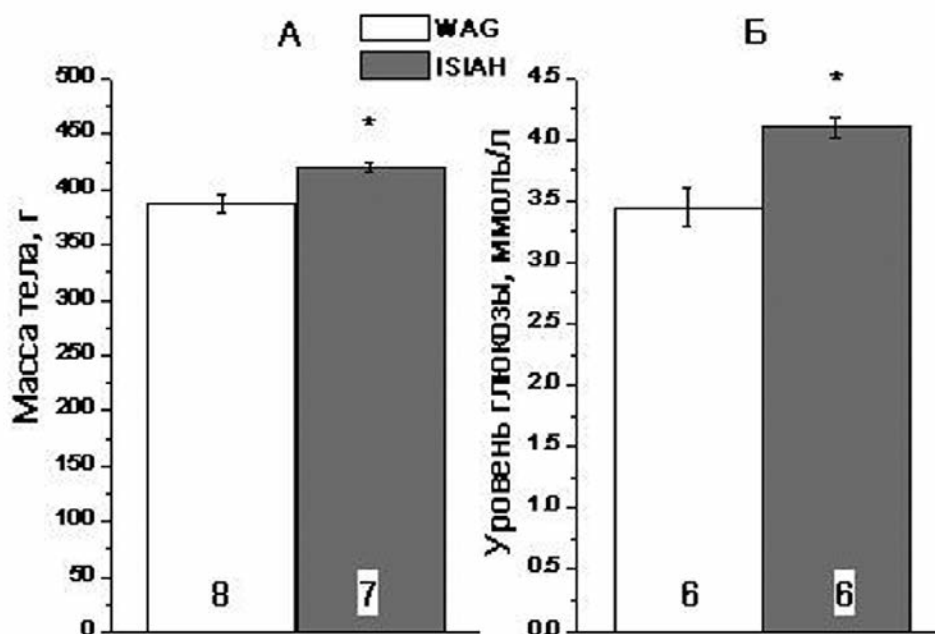
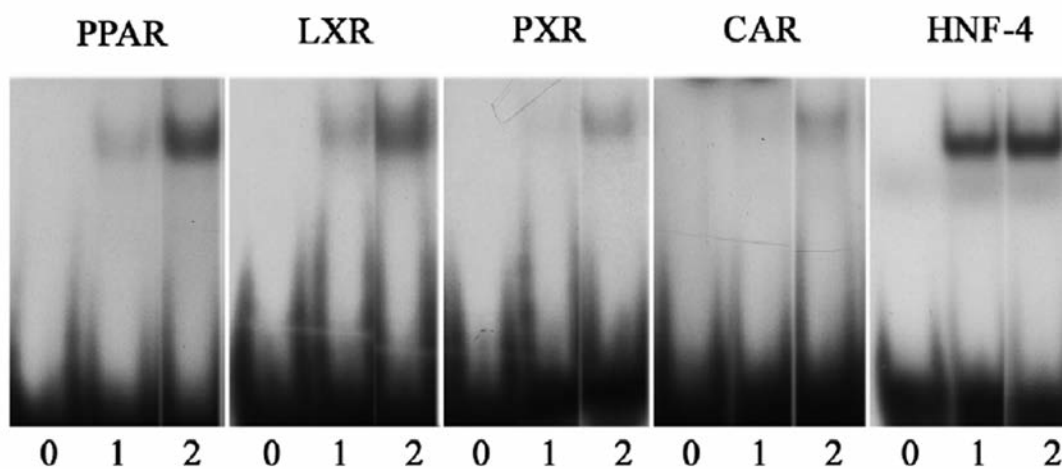


Рисунок 3.

Масса тела (А) и уровень глюкозы в крови (Б) крыс нормотензивной линии WAG и гипертензивной линии НИСАГ. \* -  $p < 0,01$ , на столбцах указано количество животных.

*ДНК-связывающая активность PPAR, LXR, PXR, CAR и HNF-4 в печени крыс линии НИСАГ и WAG.* При МС происходят нарушения в липидном и углеводном обмене. Согласно литературным данным, в регуляции экспрессии генов, вовлечённых в липидный и углеводный обмен, принимают участие транскрипционные факторы PPAR, LXR, PXR, CAR и HNF-4 [3-7]. Основным органом контролирующим энергетический гомеостаз организма является печень.

В данной работе была оценена функциональная активность PPAR, LXR, PXR, CAR и HNF-4 в печени по их способности связываться с олигонуклеотидами, имитирующими сайты связывания (response elements) в регуляторных участках генов-мишеней. ДНК-связывающая активность PPAR, LXR, PXR и CAR оказалась повышенной в экстрактах ядер печени крыс линии НИСАГ по сравнению с линией WAG (рис. 4). Согласно результатам количественной денситометрии радиоавтографов, активность PPAR была выше в 9,4 раза, LXR – в 3,9 раза, PXR – в 4,8 и CAR – в 7,1 (рис. 5). ДНК-связывающая активность HNF-4 у крыс линий WAG и НИСАГ была одинаковой.



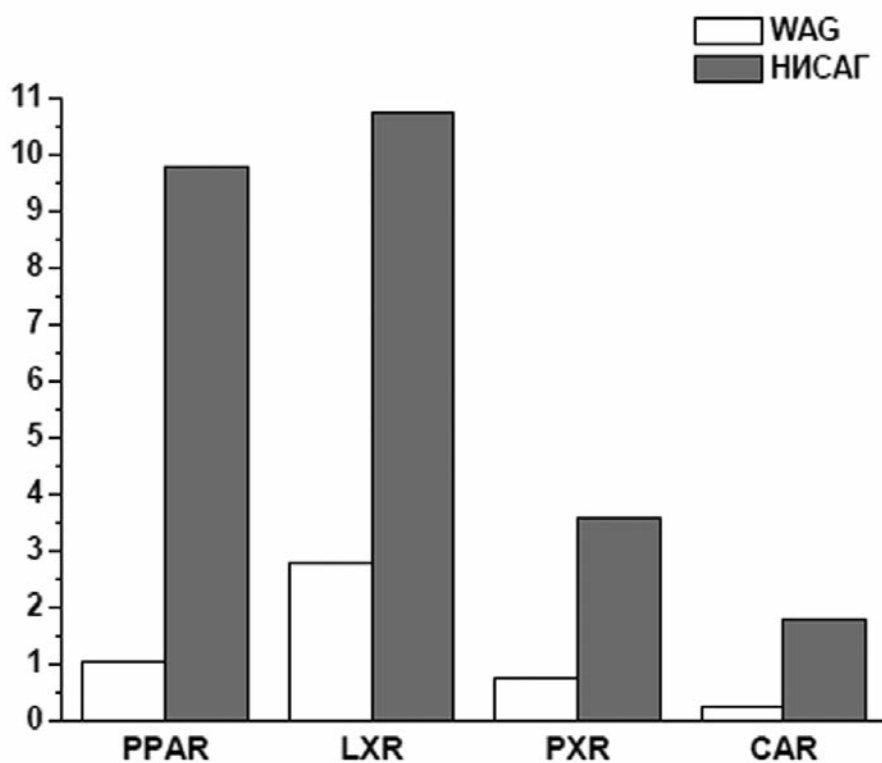
**Рисунок 4.**

ДНК-связывающая активность транскрипционных факторов PPAR, LXR, PXR, CAR и HNF-4 в экстрактах ядер клеток печени крыс нормотензивной линии WAG и гипертензивной линии НИСАГ.

0 - зонд; 1 - зонд после инкубации с экстрактом ядер клеток печени крыс линии WAG;

2- зонд после инкубации с экстрактом ядер клеток печени крыс линии НИСАГ.

Число животных в каждой группе - 4.



**Рисунок 5.**

Изменение ДНК-связывающей активности транскрипционных факторов PPAR, LXR, PXR, CAR и HNF-4 в экстрактах ядер клеток печени крыс нормотензивной линии WAG и гипертензивной линии НИСАГ в относительных единицах по результатам количественной денситометрии радиоавтографов (рис. 4).

**ОБСУЖДЕНИЕ.** Линия НИСАГ была получена из популяции крыс Wistar в результате селекции по уровню диастолического артериального давления на фоне эмоционального стресса. Базальный уровень артериального давления у крыс линии НИСАГ составляет 150-160 мм рт. ст., а у нормотензивных крыс WAG - в среднем 120 мм рт.ст. Мягкий эмоциональный стресс – получасовая рестрикция в тесной клетке - приводит к повышению артериального давления у крыс НИСАГ до 200 мм рт. ст., незначительно изменяя уровень артериального давления у крыс WAG [20].

У крыс линии НИСАГ наблюдаются следующие признаки, характерные для МС: сниженное содержание ХС ЛПВП, повышенный уровень ТГ; во фракциях липопротеинов – повышенное содержание ХС ЛПОНП и ЛПНП, сниженное содержание ХС ЛПВП<sub>2</sub> и ЛПВП<sub>3</sub>; повышенный уровень ароВ-100, сниженный уровень апоА-I; повышенная масса тела; повышенный уровень глюкозы в крови. Таким образом, для крыс линии НИСАГ характерны все признаки МС.

Согласно литературным данным, известная гипертензивная линия крыс SHR (Spontaneously Hypertensive Rats) характеризуется достоверно повышенным содержанием ХС ЛПНП по сравнению с нормотензивной линией WKY (Wistar-Kyoto) [21]. Другая гипертензивная линия крыс - лионская гипертензивная линия (Lyon hypertensive rats) - отличается от нормотензивного контроля (Lyon normotensive rats) повышенным весом тела и повышенным уровнем ТГ в крови [22]. Резистентность к инсулину была показана у нескольких гипертензивных моделей животных, включая линию спонтанно гипертензивных крыс (SHR) [23].

Таким образом, у крыс, полученных при селекции на повышение артериального давления, наблюдаются некоторые признаки, характерные для развития МС. Используемая в данной работе линия крыс НИСАГ, отличается от всех других линий тем, что при создании данной линии, отбор проводился по приросту артериального давления в ответ на действие эмоционального стресса. Более выраженные признаки МС у крыс линии НИСАГ, по-видимому, говорят о существенной роли эмоционального стресса в развитии МС.

Признаки МС у крыс линии НИСАГ свидетельствуют о нарушениях в липидном и углеводном обменах. В регуляции экспрессии генов, вовлечённых в липидный и углеводный обмен, принимают участие транскрипционные факторы PPAR, LXR, PXR, CAR и HNF-4 [3-7]. Нами было показано что, ДНК-связывающая активность PPAR, LXR, PXR и CAR повышена в экстрактах ядер печени крыс линии НИСАГ по сравнению с линией WAG.

Экспрессия транскрипционных факторов и их изоформ является ткане- и орган-специфической. PPAR имеет три изоформы: PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta$ ( $\delta$ ) и PPAR- $\gamma$ . В печени преобладающей изоформой является PPAR- $\alpha$ . В печени также экспрессируется PPAR- $\beta$  и в небольшом количестве PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 2 экспрессируется только в жировой ткани [3]. PPAR- $\alpha$  контролирует экспрессию генов, вовлечённых во внутриклеточный и внеклеточный липидный метаболизм, а именно: карнитинпальмитилтрансферазы 1, контролирующей поступление жирных кислот (ЖК) в митохондрии; сквенджер рецептора класса В CD36, вовлечённого в высокоаффинный захват периферических ЖК; транспортного белка жирных кислот; ацил-СоА синтетазы, превращающей ЖК в их ацил-СоА производные; липопротеинлипазы, расщепляющей ТГ хиломикронов и ЛПОНП; апоА-I и апоА-II, основных белков ЛПВП, влияя, таким образом, на уровень ХС ЛПВП [4]. PPAR- $\alpha$  также контролируют экспрессию генов ферментов, участвующих в превращении глицерола в глюкозу в печени: глицерол-3-фосфатдегидрогеназы и глицеролкиназы, а также генов транспортеров глицерола, аквапоринов 3 и 9 [24]. PPAR- $\beta$  участвует в регуляции генов, вовлечённых в катаболизм ЖК. PPAR- $\gamma$  участвует в регуляции генов, вовлечённых в накопление липидов, а также в метаболизм глюкозы [3].

Гиперэкспрессия PPAR- $\alpha$  в сердце приводит к резистентности к инсулину в сердце и печени, гиперэкспрессия в мышцах - к толерантности к глюкозе.



Гиперэкспрессия PPAR- $\gamma$  в гепатоцитах приводит к жировой инфильтрации печени (стеатозу) за счет накопления ТГ [3]. При этом стеатоз печени часто ассоциируется с МС [25]. Экспрессия PPAR- $\alpha$  и - $\gamma$  повышена в сосудах гипертензивной линии крыс SHR по сравнению с контрольной линией WKY [26, 27].

LXR имеет две изоформы, LXR- $\alpha$  и LXR- $\beta$ . Эти две изоформы LXR, представленные в печени, участвуют в регуляции холестерина обмена. В печени избыток ХС превращается в желчные кислоты и выводится из клетки, в то же время синтез ХС и захват ХС липопротеинов снижается. Функциональные сайты связывания LXR- $\alpha$  и - $\beta$  были обнаружены в промоторах ряда генов, кодирующих ключевые ферменты, транспортеры и регуляторы этих процессов. LXR регулирует экспрессию SREBP-1с, белка, контролирующего экспрессию синтазы ЖК и других ключевых генов, вовлечённых в биосинтез ЖК [5]. Кроме того, LXR может регулировать экспрессию синтазы ЖК напрямую [28]. LXR также регулирует экспрессию гена ABCA-1, белка принимающего участие в опосредованном апо А-I транспорте холестерина из гепатоцитов [29]. LXR участвуют в регуляции метаболизма глюкозы, модулируя экспрессию ключевых генов глюконеогенеза: фосфоенолпируваткарбоксикиназы (PEPCK) и глюкозо-6-фосфатазы (G6Pase), контролирующих уровень глюкозы в плазме крови [30].

Другие исследованные нами сенсоры ксенобиотиков CAR и PXR также принимают участие в регуляции липидного и углеводного метаболизма. CAR и PXR модулируют  $\beta$ -окисление ЖК, а PXR контролируют экспрессию транскрипционных факторов и ферментов, участвующих в липогенезе [6] и оказывают влияние на транскрипцию гена скэвенджер-рецептора CD36 [31]. В то же время CAR и PXR влияют на транскрипционные факторы и кофакторы, участвующие в регуляции генов ферментов глюконеогенеза в печени [6].

Таким образом, существует перекрест сигнальных путей трансдукции между PPAR, LXR, PXR и CAR [32], что говорит об их интегральной роли в регуляции генов липидного и углеводного обмена.

Ядерные гормональные рецепторы, к суперсемейству которых принадлежат PPAR, LXR, PXR и CAR, активируются после взаимодействия с лигандом. PPAR, LXR, и CAR локализируются в цитоплазме, и после взаимодействия с лигандом транспортируются в ядро. PXR локализован в ядре, где и активируется лигандом. В ядре, после образования гетеродимеров с белком RXR (ретиноидным X рецептором), ядерные рецепторы специфически связываются с регуляторными участками генов-мишеней, изменяя уровень их экспрессии [33]. Эндогенными лигандами для PPAR являются насыщенные жирные кислоты, нативные и окисленные ненасыщенные жирные кислоты, нативные и окисленные эйкозаноиды, простагландины и простациклины. Эндогенными лигандами для LXR являются окисленные производные ХС (оксистеролы), лигандами для PXR – стероиды и желчные кислоты.

Таким образом, наблюдаемые признаки МС у крыс линии НИСАГ, ассоциированные с повышенной ДНК-связывающей активностью PPAR, LXR, PXR и CAR, свидетельствуют об участии данных транскрипционных факторов в развитии МС.

Поскольку PPAR, LXR, PXR и CAR являются лиганд-активируемыми, они представляют собой перспективные мишени для фармакологического воздействия. В последнее время интенсивно ведется поиск природных и синтетических лигандов для PPAR [3]. Вовлечённость в развитие МС не только PPAR, но и LXR, PXR и CAR говорит о необходимости учитывать их метаболические пути при создании фармакологических препаратов. Комплексное исследование регуляторных механизмов, сигнальных путей и транскрипционных мишеней PPAR, LXR, PXR и CAR может существенно облегчить понимание патогенеза МС и даст ценную информацию для разработки соответствующих комплексных лекарственных препаратов для терапии МС.

Авторы искренне благодарны сотрудникам лаборатории теоретической генетики ИЦиГ СО РАН, с.н.с., к.б.н. Е.В. Игнатъевой и н.с., к.б.н. В.Г. Левитскому за неоценимые консультации в области регуляции экспрессии генов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 08-04-00832.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Reaven G.M.* (1988) *Diabetes*, **37**, 1595-1607.
2. *NCEP-ATP III* (2001) *J.A.M.A.*, **285**, 2486-2497.
3. *Michalik L., Auwerx J., Berger J.P., Chatterjee V.K., Glass C.K., Gonzalez F.J., Grimaldi P.A., Kadowaki T., Lazar M.A., O'Rahilly S., Palmer C.N., Plutzky J., Reddy J.K., Spiegelman B.M., Staels B., Wahli W.* (2006) *Pharmacol. Rev.*, **58**, 726-741.
4. *Lefebvre P., Chinetti G., Fruchart J.-C., Staels B.* (2006) *J. Clin. Invest.*, **116**, 571-580.
5. *Herzog B., Hallberg M., Seth A., Woods A., White R., Parker M.G.* (2007) *Mol. Endocrinol.*, **21**, 2687-2697.
6. *Moreau A., Vilarem M.J., Maurel P., Pascussi J.M.* (2008) *Mol. Pharm.*, **5**, 35-41.
7. *Van der Leij F.R., Bloks V.W., Grefhorst A., Hoekstra J., Gerding A., Kooi K., Gerbens F., te Meerman G., Kuipers F.* (2007) *Genomics*, **90**, 680-689.
8. *Chandola T., Brunner E., Marmot M.* (2006) *B.M.J.*, **332**, 521-525.
9. *Маркель А.Л.* (1985) *Изв. АН СССР, Сер. Биологическая*, **3**, 466-469.
10. *Redina O.E., Machanova N.A., Efimov V.M., Markel A.L.* (2006) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **33**, 456-464.
11. *Шорин Ю.П., Маркель А.Л., Селяницкая В.Г., Пальчикова Н.А., Гринберг П.М., Амстиславский С.Я.* (1990) *Бюлл. эксперим. биол. мед.*, **109**, 575-576.
12. *Juge-Aubry C., Pernin A., Favez T., Burger A.G., Wahli W., Meier C.A., Desvergne B.* (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 25252-25259.
13. *Yoshikawa T., Shimano H., Amemiya-Kudo M., Yahagi N., Hasty A.H., Matsuzaka T., Okazaki H., Tamura Y., Iizuka Y., Ohashi K., Osuga J., Harada K., Gotoda T., Kimura S., Ishibashi S., Yamada N.* (2001) *Mol. Cell Biol.*, **21**, 2991-3000.
14. *Xie W., Barwick J.L., Simon C.M., Pierce A.M., Safe S., Blumberg B., Guzelian P.S., Evans R.M.* (2000) *Genes. Dev.*, **23**, 3014-3023.
15. *Frank C., Gonzalez M.M., Oinonen C., Dunlop T.W., Carlberg C.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 43299-43310.
16. *Nitch D., Boshart M., Schutz G.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5479-5483.
17. *Gorski K., Carneiro M., Schibler U.* (1986) *Cell*, **47**, 767-776.
18. *Shapiro D.J., Sharp P.A., Wahli W.W., Keller M.J.* (1988) *DNA*, **7**, 47-55.
19. *Mathieu P., Pibarot P., Despres J.-P.* (2006) *Vasc. Health Risk Manag.*, **2**, 285-302.
20. *Amstislavsky S., Welker P., Frühauf J.H., Maslova L., Ivanova L., Jensen B., Markel A.L., Bachmann S.* (2006) *Histochem. Cell Biol.*, **125**, 651-659.
21. *Yu S.-M., Kang Ya-F., Chen C.-C., Teng C.-M.* (1993) *Br. J. Pharmacol.*, **108**, 1055-1061.
22. *Sassolas A., Vincent M., Benzoni D., Sassard J.* (1981) *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **5**, 1008-1014.
23. *Shimamoto K., Ura N.* (2006) *Clin. Exp. Hypertens.*, **28**, 543-552.
24. *Patsouris D., Mandard S., Voshol P.J., Escher P., Tan N.S., Havekes L.M., Koenig W., März W., Tafuri S., Wahli W., Müller M., Kersten S.* (2004) *J. Clin. Invest.*, **114**, 94-103.
25. *Reddy J.K., Rao M.S.* (2006) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **290**, G852-G858.
26. *Diep Q.N., Schiffrin E.L.* (2001) *Hypertension*, **38**, 249-254.

27. Di Z.L., Niu X.L., Wei J., Li Y.Q., Chen G.L., Wang N.P. (2006) *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.*, **37**, 204-207.
28. Tobin K.A., Steineger H.H., Alberti S., Spydevold O., Auwerx J., Gustafsson J.A., Nebb H.I. (2000) *Mol. Endocrinol.*, **14**, 741-752.
29. Chawla A., Boisvert W.A., Lee C.H., Laffitte B.A., Barak Y., Joseph S.B., Liao D., Nagy L., Edwards P.A., Curtiss L.K., Evans R.M., Tontonoz P. (2001) *Mol. Cell*, **7**, 161-171.
30. Cao G., Liang Y., Broderick C.L., Oldham B.A., Beyer T.P., Schmidt R.J., Zhang Y., Staybrook K.R., Suen C., Otto K.A., Miller A.R., Dai J., Foxworthy P., Gao H., Ryan T.P., Jiang X.C., Burris T.P., Eacho P.I., Etgen G.J. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 1131-1136.
31. Zhou J. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 15013-15020.
32. Woods C.G., Heuvel J.P., Rusyn I. (2007) *Toxicol. Pathol.*, **35**, 474-494.
33. Giguere V. (1999) *Endocr. Rev.*, **20**, 689-725.

Поступила: 25. 12. 2008.

**ALL SIGNS OF METABOLIC SYNDROME IN THE HYPERTENSIVE ISIAH RATS  
ARE ASSOCIATED WITH INCREASED ACTIVITY OF TRANSCRIPTION FACTORS  
PPAR, LXR, PXR, AND CAR IN THE LIVER**

*E.N. Pivovarova<sup>1</sup>, M.I. Dushkin<sup>2</sup>, M.L. Perepechaeva<sup>3</sup>, V.F. Kobzev<sup>1</sup>, V.A. Trufakin<sup>4</sup>, A.L. Markel<sup>5</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Cytology and Genetics SB RAS, pr. Acad. Lavrentieva, 10, Novosibirsk, 630090 Russia;  
fax: (383)333-1278, e-mail: enpivovarova@rambler.ru

<sup>2</sup>Institute of Internal Medicine SB RAMS, ul. Bogatkova, 175/1, Novosibirsk, 630089 Russia;  
fax: (383)334-8373

<sup>3</sup>Institute of Molecular Biology and Biophysics, Siberian Branch of Russian Academy of Medical  
Sciences, ul. Acad. Timakova, 2, Novosibirsk, 6301179 Russia; fax: (383)323-147

<sup>4</sup>Institute of Physiology SB RAMS, ul. Acad. Timakova, 4, Novosibirsk, 630117 Russia;  
fax: (383)332-3147

<sup>5</sup>Novosibirsk State University, ul. Pirogova, 2, Novosibirsk, Russia; fax: (383)330-2237

It is known that the metabolic syndrome (MS), which includes hypertension, dislipidemia, glucose intolerance, and obesity leads to cardiovascular diseases. The MS risk is growing catastrophically. Molecular mechanisms allowing to understand the reason of integrated dysfunctions, taking place at MS cases, have remained almost unstudied. The chronical stress plays a crucial role in MS development; therefore in the present work a hypertensive rat strain with Inherited Stress-Induced Arterial Hypertension (ISIAH) was used as a model. It was shown that ISIAH rat strain as compared with the control WAG rat strain is characterized by increased content of triglyceride, VLDL and LDL cholesterol, a decreased content of HDL cholesterol, a high level of apolipoprotein B-100, and decreased level of apolipoprotein A-I. The ISIAH rats body weight was higher as compared with WAG rats; ISIAH rats blood glucose content was higher too. Thus, strain hypertension for ISIAH rat is accompanied by dislipidemia, increased glucose content, and increased body weight, representing a whole set of MS signs. Since at MS cases the systemic abnormalities in lipid and carbohydrate metabolism take place, the functional activity of transcription factors (TFs) participating in integral regulation of lipid and carbohydrate metabolism genes in liver was measured. PPAR, LXR, PXR, CAR DNA-binding activity was increased in ISIAH rats, suggesting involvement of these TFs in MS development. Integrated investigation of PPAR, LXR, PXR, CAR regulatory mechanisms, signal transduction and transcriptional targets will provide insights into the pathogenesis of MS and offer valuable information for designing of drugs for MS treatment.

**Key words.** metabolic syndrome, hypertensive rat strain ISIAH, PPAR, LXR, PXR, CAR.