

©Коллектив авторов

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ О ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ХОЛЕСТЕРИНОКСИДАЗЫ

Н.Н. Ключева*, И.В. Окуневич, Н.С. Парфенова, Е.В. Белова, Е.В. Агеева

Институт экспериментальной медицины (ИЭМ),
197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12; *эл. почта: nnklyueva@gmail.com

Для внедрения ферментного препарата холестериноксидазы (ХО) в медицинскую практику в качестве липидснижающего средства были проведены доклинические исследования. В хронических опытах *in vivo* (крысы, кролики, собаки) была установлена низкая токсичность, хорошая переносимость и антиатеросклеротическая активность препарата ХО. Для оценки действия ХО в условиях умеренной алиментарной дислипидотеинемии (ДЛП) поставлены эксперименты на трёх видах животных (крысы, морские свинки, кролики). Установлено, что при пероральном введении ферментный препарат ХО в условиях моделированной ДЛП оказывает выраженное гиполипидемическое действие. В результате применения ХО значительно улучшается липидный спектр липидов крови и печени, а также липопротеинов (ЛП) сыворотки крови, нарушенный при моделировании ДЛП. Показано снижение содержания холестерина атерогенных ЛП низкой и промежуточной плотности и увеличение концентрации холестерина антиатерогенных ЛП высокой плотности.

Ключевые слова: холестерин; липопротеины; атеросклероз; дислипидотеинемия; холестериноксидаза

DOI: 10.18097/PBMC20196503227

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что атерогенная дислипидотеинемия (ДЛП) относится к одному из главных, но модифицируемых факторов риска развития атеросклероза (АС) [1, 2]. Для лечения АС и ДЛП применяется ряд гиполипидемических препаратов, имеющих серьезные побочные эффекты. В связи с этим актуальным является направленный поиск биологически активных веществ различного происхождения, корректирующих нарушение липидного обмена. С этой целью применяются как природные ферменты, так и препараты, полученные биотехнологическим путём. Наше внимание привлёк оригинальный отечественный препарат природного происхождения фермента холестериноксидазы (ХО; КФ 1.1.3.6). Технология получения ХО из *Streptomyces lavendulae* штамм ВКМА-5921 почвенного происхождения была разработана в Институте антибиотиков и ферментов медицинского назначения (Санкт-Петербург). Источником фермента ХО являются бактерии *Streptomyces lavendulae*. ХО относится к классу оксидоредуктаз, имеет молекулярную массу 55 кДа и катализирует окислительно-восстановительные реакции, в частности, окисление гидроксильного радикала ХС в положении С3 с образованием кетона (холест-4-ен-3-он) и пероксида водорода. ХО применяют в лабораторной диагностике для определения в сыворотке крови уровня общего холестерина (ХС) и ХС-липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП) энзиматическим методом в наборах фирмы “Vital Diagnostics” (Россия) [3]. Современное биотехнологическое использование ХО, получаемой из различных источников, её новые физико-химические и физиологические свойства активно изучаются во многих зарубежных лабораториях [4, 5].

Цель данного исследования – выявить гиполипидемическое действие природного ферментного препарата ХО бактериального происхождения (*Streptomyces lavendulae* штамм ВКМА-5921) в опытах *in vivo* на моделях алиментарной атерогенной ДЛП.

МЕТОДИКА

Опыты проведены на беспородных взрослых животных-самцах: 30 крысах (200-300 г), 30 морских свинках (350-380 г) и 17 кроликах (2,7-3,5 кг), полученных из питомника “Рапполово” (Ленинградская область). Экспериментальную алиментарную ДЛП (гиперлипидемию) у крыс, морских свинок и кроликов создавали в соответствии с главой руководства “Методические рекомендации по изучению гиполипидемического и антиатеросклеротического действия лекарственных средств”, где описаны способы моделирования ДЛП с помощью многокомпонентной гиперхолестеринемической диеты (ГХС диета), с учётом чувствительности и особенностей липидного профиля крови подопытных животных [6]. Умеренную ДЛП (гиперлипидемию) у крыс вызывали применением специальной ГХС диеты, скармливая атерогенный рацион, обогащённый пищевым ХС в виде 5% прогретой смеси с подсолнечным маслом и тиреоидсупрессорным агентом – метилтиоурацилом (МТУ 0,12%) в течение 20 дней. Гиперлипидемию у морских свинок создавали кормлением с помощью зонда ГХС диетой, содержащей избыточное количество пищевого ХС (0,5 г/кг) и смесью жиров (подсолнечное масло/свиной жир 3:1) в течение 20 дней. Использование свиного жира в диете способствовало более быстрому созданию выраженной гиперлипидемии у данных животных. Умеренную гиперлипидемию у кроликов моделировали, используя пищевой ХС (0,5 г/кг), перемешанный вместе с небольшим количеством капусты, в течение 12-24 дней.

ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ХОЛЕСТЕРИНОКСИДАЗЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

ХО вводили перорально ежедневно один раз утром в дозах, рассчитанных в единицах активности – 20 ед/кг массы тела. Препарат разводили в 2 мл дистиллированной воды. За 18 ч до завершения опытов всех подопытных животных отсаживали на голод в течение 18 ч; крыс и морских свинок забивали быстрой декапитацией, кроликов – мгновенной воздушной эмболией. В полученной крови и печени определяли содержание общего ХС, триглицеридов (ТГ) и ХС-ЛПВП с помощью наборов реактивов “Ranbaxy” (Великобритания). Навеску печени 200 мг измельчали и экстрагировали изопропанолом, с последующим использованием специфических цветных реакций для определения общего ХС и ТГ [7]. Индекс атерогенности (ИА) крови рассчитывали по общепринятой формуле А.Н. Климова:

$$ИА = (ОХС - ХС-ЛПВП) / ХС-ЛПВП.$$

Для анализа распределения спектра липопротеинов в сыворотке крови крыс, морских свинок и кроликов использовали широко известный метод ультрацентрифугирования в градиенте плотности КВг, как указано в работе [7]. Статистическую обработку данных производили, используя однофакторный анализ ANOVA; различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В предварительных опытах у кроликов и собак была выявлена отчётливая гипополипидемическая активность, протективное антиатеросклеротическое действие и хорошая переносимость тестируемого препарата – ферментного препарата ХО.

В настоящем исследовании была поставлена задача выяснить, в какой степени препарат ХО может влиять на развитие умеренно-высокой алиментарной ДЛП у крыс, морских свинок и кроликов. Использование в опытах 3-х видов экспериментальных животных-грызунов продиктовано особенностями их липидного спектра крови. У кроликов основное количество ХС распределено равномерно по фракциям атерогенных липопротеинов (ЛПОНП, ЛПЛП, ЛПНП) и антиатерогенных ЛП высокой плотности (ЛПВП). У крыс основной пул ХС находится в антиатерогенных ЛПВП, а у морских свинок – в атерогенных фракциях ЛПОНП и ЛПНП, поэтому морские свинки более чувствительны к созданию моделируемой ДЛП, чем кролики из-за особенностей обмена ЛП [6, 7]. Крысы толерантны к воздействию атерогенного рациона, в связи с чем им необходимо вводить ГХС диету не только с ХС, но и длительно использовать в высоких дозах такие повреждающие агенты как МТУ, холат натрия, холевая кислота, витамин Д₂, нарушающие функцию щитовидной железы и метаболизм липидов.

Полученные результаты опытов по изучению влияния ХО на развитие умеренной алиментарной ДЛП представлены в таблицах 1-3. Как видно из таблицы 1, введение препарата ХО морским свинкам способствовало снижению уровня липидов в сыворотке крови и в печени данных животных. Так, уровень ХС в крови снизился на 49%, в печени – на 26%, содержание ТГ в сыворотке крови уменьшилось на 21%, в печени – на 25%, что свидетельствовало о выраженном гипополипидемическом действии изучаемого препарата. В следующем эксперименте на модели ДЛП у крыс, индуцированной ГХС диетой, было также показано

Таблица 1. Влияние препарата холестериноксидазы (ХО – 20 ед/кг массы тела) на показатели липидного обмена в сыворотке крови и печени морских свинок при пероральном введении в течение 20 дней

Группы животных	n	ХС сыворотки	ТГ сыворотки	ХС печени	ТГ печени
1. Интактные морские свинки	10	1,19±0,13	0,61±0,14	2,5±0,07	5,8±0,4
2. ГХС диета	10	6,49±0,72*	18,0±0,36*	13,8±0,09*	26,5±3,2*
3. ГХС диета + ХО	10	4,14±0,54 [#]	14,3±0,27 [#]	10,5±0,08 [#]	20,0±1,7 [#]

Примечание. Здесь и в таблицах 2 и 3: n – число животных в группе, * – различия достоверны в сравнении 1 и 2 группы при $p < 0,05$; [#] – различия достоверны в сравнении 2 и 3 группы при $p < 0,05$.

Таблица 2. Влияние препарата холестериноксидазы (ХО – 20 ед/кг массы тела) на показатели липидного обмена в сыворотке крови и печени крыс при пероральном введении в течение 20 дней

Группы животных	n	ХС сыворотки	ТГ сыворотки	ХС печени	ТГ печени
1. Интактные крысы	10	1,32±0,08	0,73±0,06	4,45±0,38	7,53±0,91
2. ГХС диета	10	3,17±0,13*	0,42±0,05*	21,15±0,96*	23,4±1,03*
3. ГХС диета + ХО	10	1,71±0,05* [#]	0,32±0,07*	14,48±1,03* [#]	12,0±1,13* [#]

Таблица 3. Влияние препарата холестериноксидазы (ХО – 20 ед/кг массы тела), вводимой перорально в течение (12 и 24 дня) на изменение уровня липидов сыворотки крови у кроликов с ДЛП

Условия опыта	n	ХС сыворотки крови ммоль/л			ХС-ЛПВП	ТГ сыворотки ммоль/л			ИА ед.
		В начале опыта	Через 12 дней	Через 24 дня		В начале опыта	Через 12 дней	Через 24 дня	
1. Норма	4	1,1±0,21	2,0±0,44	1,4±0,10	0,7±0,04	0,94±0,10	0,90±0,28	1,04±0,08	1
2. ГХС диета	5	1,2±0,16	29,7±3,80*	45,0±2,82*	0,3±0,02* [#]	0,62±0,11*	1,67±0,32*	2,45±0,24*	149
3. ГХС диета+ХО	8	1,2±0,05	24,5±2,70* [#]	11,7±2,64* [#]	1,0±0,09* [#]	0,91±0,15* [#]	0,42±0,11* [#]	0,97±0,21* [#]	12

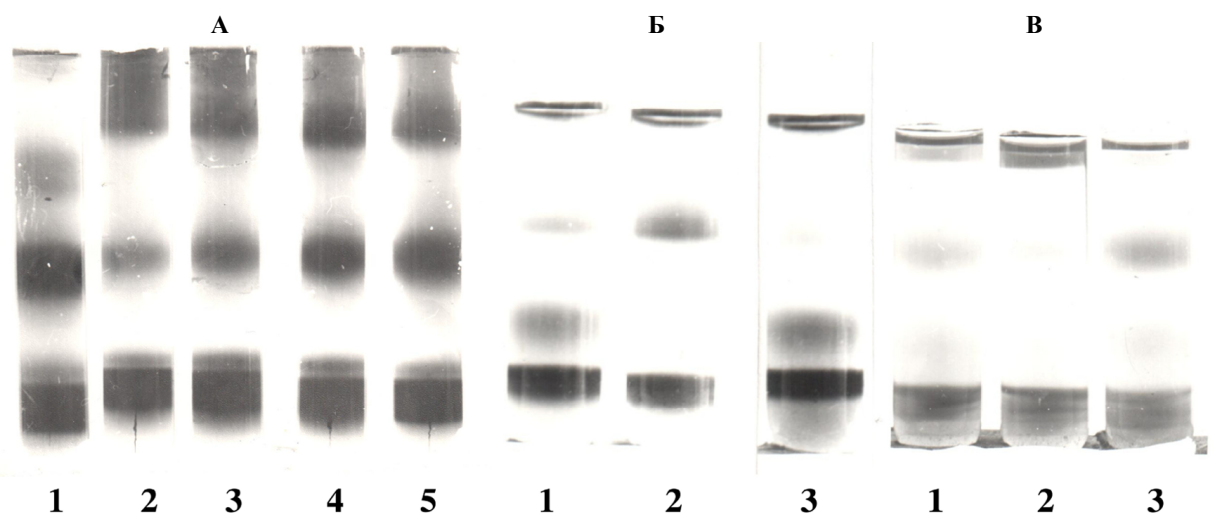


Рисунок. Разделение липопротеинов сыворотки крови кроликов, крыс, морских свинок при ультрацентрифугировании в градиенте плотности КВг. **А.** Кролики: 1 – intactные животные; 2 – ГХС диета; 3 – ГХС диета +ХО 10 ед.; 4 – ГХС диета +ХО 20 ед.; 5 – ГХС диета +ХО 30 ед. **Б.** Крысы: 1 – intactные животные; 2 – получавшие ГХС диету; 3 – ГХС диета +ХО 30 ед. **В.** Морские свинки: 1 – intactные животные; 2 – ГХС диета; 3 – ГХС диета +ХО 30 ед.

гиполипидемическое действие ХО. Из полученных данных, представленных в таблице 2, видно, что у крыс, получавших тестируемый препарат ХО, содержание ХС в сыворотке крови снижалось на 47%, в печени – на 34%. Важно подчеркнуть, что после использования в атерогенном рационе тиреоидсупрессорного агента – МТУ – уровень ТГ сыворотки крови не увеличивался. Липидснижающий эффект ХО – снижение ТГ под влиянием препарата – наблюдался только в печени (табл. 2, группы 3 и 2). В таблице 3 приведены результаты, полученные после перорального введения ХО кроликам с ДЛП, индуцированной атерогенным рационом. Из данных таблицы 3 видно, что через 12 дней и 24 дня кормления животных ГХС диетой наблюдалось увеличение содержания общего ХС и снижение концентрации ХС антиатерогенной фракции ЛПВП в сыворотке крови. Поэтому при расчёте по формуле А.Н. Климова возросла величина ИА (более чем в 12 раз) по сравнению с показателем ИА у нормальных животных (группы 3 и 2). Применение ферментного препарата ХО улучшило липидные показатели сыворотки крови, что свидетельствовало о наличии гиполипидемического действия у ферментного препарата ХО (табл. 3). Результаты опытов с ультрацентрифугированием сыворотки крови подопытных животных в градиенте плотности КВг представлены на рисунке.

Из рисунка видно, что создание ДЛП у всех 3-х видов животных (кролики, морские свинки, крысы) способствовало значительному нарушению липидного профиля крови, при котором увеличивалась полоса, соответствующая ЛП атерогенных фракций – ЛПОНП, ЛППП и ЛПНП и снижалась полоса антиатерогенной фракции – ЛПВП. Пероральное введение изучаемого ферментного препарата ХО в разных дозах от 10 ед. до 30 ед. вызывало корректирующее действие ферментного препарата ХО, при котором произошло улучшение соотношения фракций ЛП и липидного спектра крови в целом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в экспериментальном исследовании на 3-х видах экспериментальных животных-грызунов в условиях умеренной ДЛП установлено гиполипидемическое действие ферментного препарата холестериноксидазы (ХО). Полученные результаты будут полезными в дальнейшей разработке и внедрении этого природного микробного препарата, что позволит расширить перечень отечественных эффективных и безопасных лекарственных средств, корректирующих нарушение липидного обмена.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проведены в соответствии с правилами работы на лабораторных животных, с соблюдением принципов гуманности (Директивы Европейского сообщества №86/609 ЕС), одобренных Этическим комитетом ИЭМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахмедов В.А., Шевченко А.С., Исаева А.С. (2019) РМЖ, 1(II), 57-62. [Akhmedov V.A., Shevchenko A.S., Isayeva A.S. (2019) RMZH, 1(II), 57-62.]
2. Методические рекомендации (2012) Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза. (2012) 5-й пересмотр. [Metodicheskiye rekomendatsii (2012) Diagnostika i korrektsiya narusheniy lipidnogo obmena s tsel'yu profilaktiki i lecheniya ateroskleroza. (2012) 5-yu peresmotr.]
3. Безбородов А.М., Загустина Н.А. (2006) Прикл. биохим. микробиол., 52(3), 3-7. [Bezborodov A.M., Zagustina N.A. (2006) Prikl. biokhim. mikrobiol., 52(3), 3-7.]
4. Gadberry J.E., Sampson N.S. (2018) Biochemistry, 57, 5370-5378.
5. Kreit J., Sampson N.S. (2009) FEBS J., 276, 6844-6856.

6. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. (2012) Москва, "Гриф ИК", 445-452. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. (2012), Moscow, "Grif IK", 445-452.]
7. Okunevich I.V., Knychenko L.K., Sapronov N.S. (2013) Pharm. Chem. J., **47**(7), 374-377.

Поступила в редакцию: 17. 01. 2019.
После доработки: 10. 06. 2019.
Принята к печати: 13. 06. 2019.

**EFFECT OF LIPID-LOWERING ACTIVITY OF THE NATURAL ORIGINAL
ENZYME PREPARATION IN THE EXPERIMENT**

N.N. Klyueva*, I.V. Okunevich, N.S. Parfenova, E.V. Belova, E.V. Ageeva

Institute of Experimental Medicine,
12 Acad. Pavlov str., St. Petersburg, 197376 Russia; *e-mail: nnklyueva@gmail.com

The experimental study *in vivo* was aimed at evaluation of hypolipidemic action of the original natural microbial enzyme preparation of cholesterol oxidase (CHO). In preliminary chronic experiments in rats, rabbits, dogs, low toxicity, good tolerability, and anti-atherosclerotic activity of the CHO preparation were established. To assess the effect of CHO under conditions of moderate, nutritional, atherogenic dyslipoproteinemia, experiments were carried out in rats, guinea pigs, and rabbits. It was shown that administration of CHO had the pronounced lipid-lowering effect in models of atherogenic dyslipoproteinemia induced in these animals.

Key words: cholesterol; atherosclerosis; lipoproteins; dyslipoproteinemia; cholesterol oxidase

Received: 17.01.2019, revised: 10.06.2019, accepted: 13.06.2019.