

©Коллектив авторов

## ВЛИЯНИЕ КРАМИЗОЛА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА АПОЛИПОПРОТЕИНА А1 (АпоА1) В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ИНДУЦИРОВАННОЙ ГИПЕРЛИПИДЕМИИ

А.В. Лизунов<sup>1,3\*</sup>, И.В. Окуневич<sup>1</sup>, С.В. Орлов<sup>1,3</sup>, А.А. Лебедев<sup>1</sup>,  
Е.Р. Бычков<sup>1,2</sup>, Л.Б. Пиотровский<sup>1</sup>, П.Д. Шабанов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт экспериментальной медицины,

197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12; \*эл. почта: izya12005@yandex.ru

<sup>2</sup>Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, 194044, Санкт-Петербург, ул. Акад. Лебедева, 6

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

Производное имидазола крамизол обладает цитопротекторным, гиполипидемическим и антиатерогенным действием. На модели острой гиперлипидемии, индуцированной детергентом тритоном WR-1339, этот препарат снижает содержание холестерина и триглицеридов в крови, а также значительно уменьшает холестериновый индекс атерогенности. По выраженности гиполипидемического действия крамизол соответствует эталонному гиполипидемическому препарату фенофибрату. Крамизол также восстанавливает до нормальных значений экспрессию гена *Apoa1* в печени у крыс с экспериментально индуцированной острой гиперлипидемией, что, возможно, является основой его гиполипидемического и антиатерогенного действия.

**Ключевые слова:** крамизол; экспериментальная гиперлипидемия; тритон WR-1339; холестерин; триглицериды; аполипопротеин А1

**DOI:** 10.18097/PBMC20196505403

### ВВЕДЕНИЕ

Ведущей причиной развития атеросклероза (АС) является метаболическое нарушение – дислипидемия (ДЛП) атерогенного характера. Это длительное повышение в крови липопротеинов (ЛП) и липидов: триглицеридов (ТГ), общего холестерина (ХС), атерогенных липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), а также снижение концентрации антиатерогенных липопротеинов высокой плотности (ЛПВП). Для профилактики и лечения АС необходима ранняя интенсивная фармакотерапия с помощью эффективных гиполипидемических и антиатеросклеротических средств. С целью коррекции атерогенной ДЛП актуальным является поиск новых и безопасных лекарственных препаратов среди ароматических гетероциклических соединений.

Среди веществ, синтезированных на основе азолов, производное имидазола – бензолсульфонат 1-метил-3-этил, 4,5(бис-N-метилкарбамоил) имидазолия (крамизол) – проявляет в опытах *in vivo* гиполипидемические и антиатерогенные свойства [1].

Предполагают, что механизмы гиполипидемического действия азолов связаны с блокадой синтеза стеролов [2], снижением степени этерификации липидов в атерогенных ЛПНП [3]. Антиатерогенные эффекты некоторых производных имидазола характеризуются снижением числа липидных полосок и пятен в аорте кроликов с экспериментальным холестериновым АС [4].

Однако молекулярные механизмы влияния производных имидазола на работу генов липопротеинов остаются до конца не изученными.

Рассматривая вопрос об увеличении уровня антиатерогенных ЛПВП и генов, на экспрессию которых могут влиять препараты производных имидазола, необходимо выделить основной белок ЛПВП – аполипопротеин А1 (АпоА1). АпоА1 – переносчик липидов в русле крови и является основным липопротеином, формирующим ЛПВП. АпоА1 связывается с рецепторами на гепатоцитах и увеличивает обратный транспорт ХС в печень [5]. Повышение экспрессии гена *Apoa1* связано со снижением риска развития АС, обусловленного выведением ХС из различных клеток и тканей [6]. Соответственно, повышение и понижение уровня ЛПВП в крови может быть обусловлено изменением уровня экспрессии гена *Apoa1*.

Для оценки гиполипидемической активности фармакологических препаратов широко применяют острые и хронические модели индуцированной ДЛП: однократное внутрибрюшинное введение детергента тритона WR-1339; длительное введение этанола или кормление животных специальной гиперхолестеринемической диетой в течение нескольких недель [7]. Одним из определяющих моментов в развитии тритоновой ДЛП является быстрое и значительное увеличение концентрации липидов, в частности, проатерогенных фракций и субфракций в ЛП в крови опытных животных [7, 8].

Целью данного исследования было изучение влияния нового производного имидазола – препарата крамизола (Кр) – на липидный обмен и экспрессию гена *Apoa1* в печени крыс на модели острой экспериментальной ДЛП, вызванной тритоном WR-1339.

## МЕТОДИКА

В работе было использовано 40 крыс-самцов (7 особей выбыли из эксперимента из-за выявленных у них заболеваний) линии Wistar (масса 280-320 г), полученных из питомника лабораторных животных “Рапполово” (Ленинградская область). Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище.

Для моделирования ДЛП у животных была использована общепринятая скрининговая тритоновая модель, при которой в короткий срок создаётся ДЛП, обусловленная блокадой фермента липопроотеинлипазы (ЛПЛ) [9]. Крысы-самцы были разделены на 4 группы: 1-ая группа – контрольная (интактные крысы); 2-ая группа – модель острой гиперлипидемии, вызванной введением детергента тритона WR-1339; 3-я группа получала гиполипидемический препарат сравнения фенофибрат + тритон WR-1339; 4-ой группе крыс вводили тестируемый препарат Кр + тритон WR-1339. Животные получали фенофибрат (ФФ, 100 мг/кг) и Кр (100 мг/кг), разведенные в 1% растворе крахмала, перорально в течение 7-ми дней. Контрольные группы получали эквивалентное количество 1%-ого раствора крахмала. На 8-е сутки эксперимента крыс лишали пищи в течение 18 ч, а затем после введения препаратов животным 2-ой, 3-ей и 4-ой групп вводили раствор тритона WR-1339 в дозе 225 мг/кг (однократно внутривентрально). Через сутки после введения детергента производился забой голодающих крыс быстрой декапитацией с забором крови и взятием образцов ткани печени. Уровень общего ХС, ТГ и ХС ЛПВП в сыворотке крови определяли энзиматическим колориметрическим методом с помощью ферментативных наборов фирмы “Vital Diagnostics” (Россия) по стандартной методике в соответствии с инструкцией. Для оценки атерогенности крови и степени развития ДЛП рассчитывали холестеринный индекс атерогенности (ИА): [(общий ХС – ХС ЛПВП)/ХС ЛПВП].

Для оценки экспрессии гена *ApoA1* из печени крыс выделяли мРНК методом фенол-хлороформной экстракции. После выделения мРНК проводили реакцию обратной транскрипции с последующей ПЦР в реальном времени с праймерами к мРНК *ApoA1*; в качестве референсных генов были использованы гены домашнего хозяйства бета-актина (*Actb*) и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*Gapdh*). Последовательность праймеров представлена в таблице 1. Количество мРНК рассчитывали как  $2^{(C_{\text{т(интактные)}} - C_{\text{т(образец)})}}$ . Для статистической обработки производили выравнивание по среднему геометрическому двух референсных генов (*Actb* и *Gapdh*) и вычисляли среднее значение и стандартную ошибку [10, 11].

Таблица 1. Последовательность праймеров

Ген	Праймеры		Длина продукта, п.н.
	Прямой (5'-3')	Обратный (3'-5')	
<i>Gapdh</i>	AGACAGCCGCATCTTCTTGT	CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT	207
<i>Actb</i>	TGTCACCAACTGGGACGATA	AACACAGCCTGGATGGCTAC	195
<i>ApoA1</i>	CCTGGATGAATCCAGGAGA	TCGCTGTAGAGCCCAAACTT	192

Полученные данные подвергали компьютерной обработке с использованием стандартного пакета программ GraphPad PRISM 6.0, сравнивая данные с помощью метода дисперсионного анализа при уровне статистической значимости различий  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В наших предварительных опытах на модели алиментарного холестеринного АС у кроликов было обнаружено выраженное антиатеросклеротическое действие Кр. Мы предположили, что в механизме антиатерогенного действия данного оригинального соединения имеет значение его цитопротективная способность мощно стимулировать тканевый энергетический обмен. Это позволило в своё время рекомендовать Кр для применения в клинической практике при поражениях миокарда [12]. Известно, что с целью первичного выявления гиполипидемической активности новых соединений и оценки потенциальных свойств необходимо использовать модель острой тритоновой гиперлипидемии, которая характеризуется значительным увеличением в крови концентрации проатерогенных фракций и субфракций ЛП [7].

В данном исследовании было показано, что внутривентральное введение тритона WR-1339 крысам вызывало достоверное повышение уровней общего ХС, ТГ и наблюдалось увеличение расчётного показателя – холестеринного ИА, отражающего степень развития ДЛП (табл. 2). Гиперлипидемия обусловлена способностью детергента тритона ингибировать активность фермента ЛПЛ и, таким образом, препятствовать утилизации ЛП, богатых ТГ и ХС. Наряду с повышением общего ХС через 24 ч после введения тритона WR-1339 отмечалась тенденция к увеличению уровня ХС антиатерогенных ЛПВП. Курсовое введение ФФ и Кр в течение 7 дней, а также 2-х кратное совместное применение каждого из них с детергентом тритон WR-1339 приводило к снижению повышенного уровня общего ХС, ТГ и расчётного холестеринного ИА. Следует отметить, что эталонный и тестируемый препараты – ФФ и Кр – имели сходный профиль гиполипидемического действия (табл. 2).

В наших опытах при молекулярно-генетическом исследовании у крыс на модели острой тритоновой ДЛП отмечалось резкое снижение экспрессии гена *ApoA1* в печени на 70% по сравнению с интактной группой животных. Курсовое введение ФФ практически не повлияло на сниженный уровень экспрессии гена *ApoA1* после введения детергента (табл. 3). В то же время курсовое введение Кр нормализовало сниженный уровень экспрессии гена *ApoA1* в печени при экспериментально индуцированной ДЛП (табл. 3).

Таблица 2. Влияние Кр на уровень липидов сыворотки крови крыс и расчётный индекс атерогенности в условиях экспериментальной ДЛП, вызванной тритоном WR-1339

ГРУППЫ ЖИВОТНЫХ Показатели	Группа 1 Контроль (интактные крысы) (n=8)	Группа 2 Тритон WR-1339 (n=8)	Группа 3 Фенофибрат + тритон WR-1339 (n=9)	Группа 4 Крамизол + тритон WR-1339 (n=8)
Общий ХС, ммоль/л	1,08±0,09	2,81±0,42**	1,72±0,28 <sup>#</sup>	1,64±0,13 <sup>#</sup>
ТГ, ммоль/л	0,63±0,06	4,92±0,51**	1,86±0,34* <sup>##</sup>	1,91±0,41* <sup>##</sup>
ХС ЛПВП, ммоль/л	0,72±0,08	0,86±0,09	0,67±0,06	0,69±0,05
ИА, отн. ед.	0,36	2,26	1,56	1,37

Примечание. \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,001$ , различия достоверны в сравнении с группой интактных животных; # –  $p < 0,01$ , ## –  $p < 0,001$ , различия достоверны в сравнении с группой крыс, получавших тритон WR-1339, ИА – холестеринный индекс атерогенности. Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего арифметического. n – число животных в группе.

Таблица 3. Влияние Кр на уровень экспрессии гена *Apoa1* в печени крыс при экспериментальной острой гиперлипидемии, вызванной тритоном WR-1339

	Контроль Интактные крысы (n=8)	Тритон WR-1339 (n=8)	Фенофибрат + тритон WR-1339 (n=9)	Крамизол + тритон WR-1339 (n=8)
<i>Apoa1</i> , мРНК	1,367±0,296	0,292±0,035*	0,204±0,028 <sup>#</sup>	1,522±0,336 <sup>#</sup>

Примечание. \* –  $p < 0,01$  по отношению к группе интактных животных; # –  $p < 0,01$  по отношению к группе крыс, получавших тритон WR-1339. Данные выражены в условных единицах и нормированы к уровню экспрессии генов бета-актина (*Actb*) и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*Gapdh*) и рассчитаны в относительных единицах по отношению к средней величине экспрессии гена *Apoa1* в группах. Выравнивание производили по среднему геометрическому двух референсных генов (*Actb* и *Gapdh*). Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка. n – число животных в группе.

Анализируя полученные результаты, следует отметить, что препарат сравнения ФФ является агонистом ядерных  $\alpha$ -рецепторов, активирующих пролиферацию пероксисом (PPAR- $\alpha$ ) и оказывает влияние преимущественно на обмен ЛП частиц, богатых ТГ. В результате активации PPAR- $\alpha$  происходит увеличение экспрессии гена фермента ЛПЛ и снижение экспрессии гена *ApoC3* – ингибитора фермента ЛПЛ, за счёт чего увеличивается липолиз ТГ-богатых ЛП [13]. У ФФ имеется также свойство увеличивать синтез АпоА1 и АпоА2 в антиатерогенных ЛПВП человека, которое приводит к ускорению обратного транспорта ХС из тканей в печень [14]. Также нужно отметить, что у грызунов PPAR- $\alpha$  не увеличивает синтез АпоА1 из-за мутации в гепатоцитарном энхансере гена *Apoa1*, с которым взаимодействует PPAR- $\alpha$  [14]. Таким образом, можно рассчитывать, что у человека эффект ФФ на экспрессию гена аполипопротеина АпоА1 будет выше, чем у крыс за счёт регуляции PPAR- $\alpha$  [14]. Эти эффекты ФФ (препарат группы фибратов) являются важными для активного снижения риска развития ДЛП в клинической практике.

В настоящем исследовании показано, что производное имидазола – препарат Кр – действует как средство, понижающее концентрацию общего ХС и ТГ в крови при остром нарушении липидного обмена, и его эффективность близка к таковой у препарата сравнения ФФ. Возможно, что молекулярный механизм гипополипидемического действия исследуемого препарата Кр связан с повышением уровня экспрессии гена *Apoa1* на уровне мРНК, и это способствует ускорению процесса обратного транспорта ХС в печень. Можно предположить, что Кр действует как активатор

экспрессии гена аполипопротеина АпоА1, что приводит к улучшению нарушенного в условиях моделирования липидного профиля крови.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Производное имидазола Кр обладает гипополипидемическим и антиатерогенным действием. Препарат Кр на модели острой ДЛП, индуцированной тритоном WR-1339, снижает содержание общего ХС и ТГ в крови. По выраженности гипополипидемического действия Кр близок к эффектам известного гипополипидемического препарата ФФ. Кр восстанавливает до нормальных значений экспрессию гена *Apoa1* у крыс с экспериментально индуцированной острой ДЛП, что, возможно, также приносит свой вклад в его гипополипидемическое действие.

Полученные в настоящем исследовании данные расширяют наше представление о сложном и множественном механизме действия препарата Кр и указывают на перспективу его дальнейшего изучения.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы статьи выражают особую благодарность за методическую помощь в работе Ключевой Н.Н., к.б.н., научному сотруднику отдела биохимии Института экспериментальной медицины (ИЭМ).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проведены с соблюдением принципов гуманности (Директивы Европейского Сообщества №86/609 ЕС) и одобрены Этическим комитетом ИЭМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Окуневиц И.В., Сапронов Н.С., Хныченко Л.К., Шабанов П.Д. (2016) Патент РФ №2598347, Бюл. изобрет. №26, 1-15. [Okunevich I.V., Sapronov N.S., Khnychenko L.K., Shabanov P.D. (2016) Patent RF #2598347, Byul. izobret. #26, 1-15.]
2. Gsaller F., Hortschansky P., Furukawa T., Carr P.D., Rash B., Capilla J., Muller C., Bracher F., Bowyer P., Haas H., Brakhage A.A., Bromley M.J. (2016) PLoS Pathogens, **12**(7), e1005775. DOI:10.1371/journal.ppat.1005775.
3. Gupta A.K., Sexton R.C., Rudney H. (1990) J. Lipid Res., **31**, 203-215
4. Даутова Г.С., Косых В.А., Репин В.С., Камбург Р.А. (1994) Экспер. клин. фармакол., **57**(5), 21-24. [Dautova G.S., Kosych V.A., Repin V.C., Kamburg R.A. (1994) Exper. Klin. Farmakol., **57**(5), 21-24.]
5. Barter P.J., Rye K.A. (1996) Curr. Opin. Lipidol., **7**(2), 82-87.
6. Mohamad N., Ananthramiah G.M., Reddy S.T., van Lenten B.J., Ansell B.J., Fonarow G.C., Vahabzadeh K., Hama S., Hough G., Kamranpour N., Berliner J.A., Lusis A.J., Fogelman A.M. (2004) J. Lipid Res., **45**, 993-1007.
7. Окуневиц И.В., Хныченко Л.К., Шабанов П.Д. (2014) Обзоры клин. фармакол. лек. тер., **12**(3), 26-29. [Okunevich I.V., Khnychenko L.K., Shabanov P.D. (2014) Obzory Klin. Farmakol. Lek. Ter., **12**(30), 26-29.]
8. Хныченко Л.К., Окуневиц И.В., Лосев Н.А., Сапронов Н.С. (2016) Патол. физиол. eksper. тер., **60**(1), 36-39. [Khnychenko L.K., Okunevich I.V., Losev N.A., Sapronov N.S. (2016) Patol. Fisiol. Eksper. Ter., **60**(1), 36-39.]
9. Abe C., Ikeda S., Uchida T., Yamashita K., Ichikawa T. (2007) J. Nutrition Nutrient Physiology, Metabolism, and Nutrient - Nutrient Interactions, **137**, 345-350.
10. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., van Roy N., de Paeye A., Speleman F. (2002) Genome Biology, **3**(7), 0034.1-0034.11. DOI:10.1186/gb/2002.3.7.research0034
11. Shavva V.S., Bogomolova A.M., Nikitin A.A., Dizhe E.B., Tanyanskiy D.A., Efremov A.M., Oleinikova G.N., Perevozchikov A.P., Orlov S.V. (2017) J. Cell. Biochem., **118**, 382-396.
12. Недошивин А.О. (2002) Цитопротекторы в терапии сердечной недостаточности у больных ишемической болезнью сердца. Автореф. дисс. докт. наук, Научно-исследовательский институт кардиологии, Санкт-Петербург [Nedoshivin A.O. (2002) Cytoprotektory v terapii serdechnoy nedostatochnosti u bol'nyh ishemicheskoy bolezni'y serdtsa. Avtoref. Diss. Dokt. Nauk, Nauchno-issledovatel'skiy institute kardiologii, Sankt-Peterburg].
13. Tenenbaum A., Fisman E.Z. (2012) Cardiovascular Diabetology, **11**(125), 1-10.
14. Burri L., Thoresen G.H., Berge R.K. (2010) PPAR Research, **2010**, ID 542359, 1-11. DOI: 10.1155/2010/542359.

Поступила в редакцию: 29. 05. 2019.  
После доработки: 17. 07. 2019.  
Принята к печати: 19. 07. 2019.

EFFECTS OF CRAMIZOL ON EXPRESSION OF THE ApoA1 GENE  
IN RATS WITH EXPERIMENTAL HYPERLIPIDEMIA

A.V. Lizunov<sup>1,3\*</sup>, I.V. Okunevich<sup>1</sup>, S.V. Orlov<sup>1,3</sup>, A.A. Lebedev<sup>1</sup>, E.R. Bychkov<sup>1,2</sup>, L.B. Piotrovskiy<sup>1</sup>, P.D. Shabanov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Experimental Medicine,

12 Acad. Pavlov str., St. Petersburg, 197376 Russia; e-mail: izya12005@yandex.ru

<sup>2</sup>Kirov Military Medical Academy, 6 Acad. Lebedev str., St. Petersburg, 194100 Russia

<sup>3</sup>St Petersburg University, 7/9 Universitetskaya emb., St. Petersburg, 199044 Russia

An imidazole derivative cramizol, has lipid-lowering and anti-atherogenic effects. Cramizol reduces blood levels of cholesterol and triglycerides, and also reduces the atherogenic index in animals with acute hyperlipidemia induced by Triton WR-1339. Cramizol and the lipid-lowering drug fenofibrate exhibited similar effectiveness as hypolipidemic agents. Cramizol also restores the expression of the *Apoa1* gene in rats with experimentally induced hyperlipidemia to normal values. This may be a basis of its hypolipidemic and anti-atherogenic action.

**Key words:** cramizol; experimental hyperlipidemia; Triton WR-1339; cholesterol; triglycerides; apolipoprotein A1

Received: 29.05.2019, revised: 17.07.2019, accepted: 19.07.2019.