

УДК 615.322.012:547.913.5-314:575.117.2:577.125

DOI 10.20538/1682-0363-2016-4-84-90

Для цитирования: Раткин А.В., Пфаргер Ю.А., Кайдаш О.А., Иванов В.В., Цыганов М.М., Чучалин В.С., Адекенов С.М., Новицкий В.В. Влияние ахиллина на экспрессию генов метаболизма липидов в культуре клеток. *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (4): 84–90.

Влияние ахиллина на экспрессию генов метаболизма липидов в культуре клеток

Раткин А.В.¹, Пфаргер Ю.А.¹, Кайдаш О.А.¹, Иванов В.В.¹, Цыганов М.М.^{1,2}, Чучалин В.С.¹, Адекенов С.М.³, Новицкий В.В.¹

¹ Сибирский государственный медицинский университет
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

² Научно-исследовательский институт онкологии (НИИ онкологии)
Россия, 634028, г. Томск, ул. Савиных, 12/1

³ АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия»
Республика Казахстан, г. Караганда, ул. М. Газалиева, 4

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Оценка *in vitro* механизмов гиполипидемического эффекта сесквитерпенового γ -лактона ахиллина на культуре клеток гепатомы крыс.

Материал и методы. Изучено влияние сесквитерпенового γ -лактона ахиллина и гемфиброзила (препарат сравнения) на жизнеспособность, содержание липидов и экспрессию ключевых генов обмена липидов в клеточной культуре гепатомы крыс (НТС). Содержание липидов оценивали флуоресцентным методом с витальным красителем NileRed, жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста.

Результаты. Культивирование клеток гепатомы в течение 48 ч сахиллином в концентрации 0,25–1,0 мМ и гемфиброзидом 0,25–0,5 мМ не приводило к изменению жизнеспособности клеток по сравнению с контролем. В этих же концентрациях исследуемые вещества уменьшали содержание липидов в клетках, оцененных флуоресцентным методом с витальным красителем NileRed.

Для исследования механизма гиполипидемического действия ахиллина определяли экспрессию ключевых генов метаболизма липидов в клеточной культуре линии НТС. Возможный механизм гиполипидемического действия ахиллина может быть обусловлен увеличением транспорта и окисления длинноцепочечных жирных кислот в митохондриях, о чем свидетельствует повышение экспрессии гена карнитин-пальмитоилтрансферазы2 *Cpt2*. Снижение уровня холестерина может быть связано с повышенным синтезом желчных кислот из холестерина вследствие повышенной экспрессии гена 7-альфа-гидроксилазы *Cyp7a1*.

Заключение. В культуре клеток НТС сесквитерпеновый γ -лактон ахиллин снижает накопление липидов в клетках, о чем свидетельствует уменьшение флуоресценции NileRed, повышение экспрессии генов *Cpt2* и *Cyp7a1*.

Ключевые слова: сесквитерпеновый γ -лактон ахиллин, гемфиброзил, гепатома крыс (НТС), *Cyp7a1*, *Cpt2*, гиполипидемическое действие.

ВВЕДЕНИЕ

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смертности населения и глобальной социально-значимой проблемой во всем мире. Для снижения развития риска ССЗ необходима лекарственная терапия, направленная на снижение уровня липидов в крови.

В АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия» (г. Караганда, Республика Казахстан) из *Achillea lanulosa* Nutt., *Achillea crantha* Willd., *Achillea millefolium* L., *Artemisia leucodes* Shrenk, *Hyoscyameris setosus* и *Stevia alpina* Griseb выделен сесквитерпеновый γ -лактон ахиллин, который относится к группе вторичных метаболитов растений – терпеноидов, предшественников синтеза холестерина [1].

Ранее нами было показано, что курсовое введение крысам ахиллина на фоне острой гиперлипидемии, вызванной этанолом, приводит к снижению в плазме крови экспериментальных животных уровней триацилглицеридов, свободных жирных кислот и холестерина в атерогенных липопротеинах низкой плотности (ЛПНП) [2]. Для понимания механизмов гиполипидемического действия ахиллина важно изучить молекулярные механизмы, в том числе влияние ахиллина на экспрессию ключевых генов обмена липидов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект исследования. В исследовании использовали ахиллин – сесквитерпеновый лактон гваянового типа (рис. 1), выделенный в АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия» [1]. Субстанция зарегистрирована на территории Республики Казахстан, исследуемый образец соответствует требованиям ФС РК 42-1909-08, количественное содержание – 99,7 %.

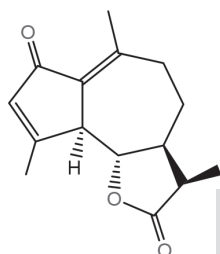


Рис. 1. Химическое строение ахиллина

Культивирование клеточной линии НТС. Перевиваемую клеточную культуру гепатомы крыс линии НТС, полученную из банка клеточных культур Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург), культивировали в куль-

туральных флаконах (SPL lifescience, ЕС) до 70–80% конфлюэнтного монослоя (субконфлюэнтный монослой) в среде, содержащей 90% DMEM с L-глутамином («Биолот», Россия), 10% ЭТС (РАА Laboratories, Германия), 50 мкг/мл гентамицина («ПанЭко», Россия) (полная среда DMEM) в стандартных условиях (37 °С, 5% CO₂, влажность 95%).

Оценка жизнеспособности клеток и содержания липидов в них. Ахиллин и препарат сравнения гемфиброзил (Sigma-Aldrich, США) добавляли в культуральную среду в конечных концентрациях 0,25–1,0 мМ. Через 48 ч оценивали жизнеспособность клеток МТТ-тестом [3]. Содержание липидов в клеточной культуре НТС определяли флуоресцентным методом с витальным липофильным красителем Nile Red, который окрашивает капли липидов в цитозоле [3]. Интенсивность флуоресценции Nile Red детектировали на микропланшетном ридере Infinite 200 PRO (Tecan, Швейцария) и на проточном цитофлуориметре Facs Canto II (Becton Dickinson, Великобритания) при длине волны возбуждения 580 нм и эмиссии 630 нм. При цитометрическом анализе накопление производили до 10 000 событий.

Оценка экспрессии мРНК генов метаболизма липидов. РНК из клеточной культуры выделяли с помощью набора Illustra RNA spin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare, США) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию и чистоту выделенной РНК определяли на спектрофотометре Nano Drop-2000 (Thermo Scientific, Германия). Концентрация РНК составляла 100–500 нг/мкл; $A_{260}/A_{280} = 1,85–1,95$; $A_{260}/A_{230} = 1,90–2,10$. Целостность РНК оценивали при помощи капиллярного электрофореза на приборе Tape Station (Agilent Technologies, США) и набора R6K Screen Tape (Agilent Technologies, США).

Уровень экспрессии мРНК генов оценивали при помощи количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени по технологии Taq Man на амплификаторе Rotor Gene-6000 (Corbett Research, Австралия), кДНК получали с помощью набора Revert Aid First Strandc DNA Synthesis Kit (Fermentas, Канада). ПЦР ставили в трех репликах в объеме 15 мкл, содержащем 250 мкл МДНТФ (Sibenzyme, Россия), 300 нМ прямого и обратного праймеров, 200 нМ зонда, 2,5 мМ MgCl₂ (Sibenzyme, Россия), 1xSE буфера (67 мМ Tris-HCl pH 8,8 при 25 °С, 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween-20) (Sibenzyme), 2,5 ед. Tag ДНК-полимеразу 5 Ea/мкл (Sibenzyme) и 50 нгк

ДНК. Программа амплификации включала один цикл – 94 °С, 2 мин (предварительная денатурация); 40 циклов: первый шаг – 94 °С, 6 с и второй шаг – 60,5 °С, 10 с. Праймеры и зонды

(FAM-BHQ1) были подобраны с использованием программы VectorNTIAdvance 11.5 и базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucscore>) (таблица).

Т а б л и ц а

Последовательности праймеров и зондов, используемых в исследовании экспрессии мРНК генов метаболизма липидов		
<i>Actb</i> NM_031144.3 Ампликон 71 bp	F 5'-GAAAAGATGACCCAGATCATGT-3' R 5'-AACACAGCCTGGATGGCTA-3' Probe 5'-AGACCTTCAACACCCAGCCAT-3'	Оригинальный дизайн
<i>Acaca</i> NM_022193.1 Ампликон 94 bp	F 5'-CGCAGGCATCAGAAGATCA-3' R 5'-TGGCAAGTTTTACAGCACACT-3' Probe 5'-ACCCAGCAGTATTTGAACACATG-3'	
<i>Cpt1a</i> NM_031559.2 Ампликон 98 bp	F 5'-CATTGACCTCCGCCTGA-3' R 5'-TGATGCCATTCTGAACCG-3' Probe 5'-CCACGAAGCCCTCAAACAGAT-3'	
<i>Cpt2</i> NM_012930.1 Ампликон 104 bp	F 5'-GCTGTTACAGATGACTGGATAG-3' R 5'-TCGAAAATGTCTTCCAAGCA-3' Probe 5'-ACGCAATGCCCGAGAGTTTC-3'	
<i>Cyp7a1</i> NM_012942.2 Ампликон 103 bp	F 5'-CTGATGCTCTCCTGCTTTGA-3' R 5'-CATGTAGTGGTGGCAAAATTC-3' Probe 5'-TGTGGAGAGCCAAGTCAAGTGTC-3'	
<i>Hmgcr</i> NM_013134.2 Ампликон 106 bp	F 5'-GCTTGAGATCATGTGCTGCTT-3' R 5'-CCGAGAAAAGCTCTAGGACCA-3' Probe 5'-CTGTATGTCCGTGCTTGCCAACT-3'	
<i>Ldlr</i> NM_175762.2 Ампликон 95 bp	F 5'-GCCATCTATGAGGACAAAAGTGT-3' R 5'-GCCACCAAATTCACATCTGA-3' Probe 5'-AGGCGGTTGGCACTGAAAATG-3'	
<i>Soat1</i> NM_031118.1 Ампликон 79 bp	F 5'-GTGCTCGTGTCTGCTGCTCC-3' R 5'-AAGGCAAAGAACGAAAAGGAA-3' Probe 5'-AGCACACCTGGCAAGATGGAGTT-3'	

П р и м е ч а н и е. Все пробы – FAM → BHQ1; NM – номер последовательности РНК в NCBI Nucleotide Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucscore>); bp – пара оснований (basepair); F – прямой праймер; R – обратный праймер; Probe – зонд.

Исследовали экспрессию генов: *Ldlr* – рецептор к ЛПНП; *Hmgcr* – 3-гидрокси-3-метилглутарил КоАредуктаза; *Soat1* – ацилКоАхолестеролацил-трансфераза; *Cyp7a1* – 7-альфа-гидроксилаза; *Cpt1a* – карнитин-пальмитоилтрансфераза 1; *Cpt2* – карнитин-пальмитоилтрансфераза 2; *Acaca* – ацетил-КоА карбоксилаза.

Проверку чистоты ПЦР-продуктов проводили с использованием электрофореза в 2,5%-м агарозном геле с 0,2%-м бромистым этидием. Уровень экспрессии каждого целевого гена выражали в условных единицах по отношению к контролю (клетки инкубировали с DMSO) и гену-референту фермента *Actb* (*Rattus norvegicus* actin, beta). Относительная экспрессия генов метаболизма липидов была оценена с помощью метода Pfaffl [4].

Статистический анализ. Результаты исследования обрабатывали с использованием программ Microsoft Excel (2007), GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, США) и SPSS Statistics 17.0 (IBM, США). Результаты представлены в виде выборочного среднего *M* и ошибки среднего *m*. Для

проверки значимости различий между исследуемыми группами использовали t-критерий Стьюдента для одной выборки и непараметрический U-критерий Манна – Уитни для малых групп. Статистически значимые считали различия при уровне значимости $p < 0,05$, среднее рассчитывали из шести измерений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культивирование клеток гепатомы в течение 48 ч с ахиллином в концентрации 0,25–1,0 мМ и гемфибризом 0,25–0,5 мМ не приводило к изменению жизнеспособности клеток по сравнению с контролем ($p > 0,05$) и составляла не менее (91,4 ± 3,8)% и (81,8 ± 2,2)% соответственно. В этих же концентрациях исследуемые вещества уменьшали содержание липидов в клетках, оцененных флуоресцентным методом с витальным красителем Nile Red на микропланшетном ридере, с (93,1 ± 2,8)% до (71,4 ± 3,9)% (ахиллин в концентрации 0,25–1,0 мМ) и с (99,2 ± 1,9)% до (65,1 ± 2,3)% (гемфибризол в концентрации 0,25–0,5 мМ).

Статистически значимое уменьшение интенсивности флуоресценции Nile Red в клетках НТС регистрировалось при концентрации ахиллина 1,0 мМ (на 28,6%) и гемфиброзила – 0,5 мМ (на 34,9%) по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Снижение уровня липидов в клетках гепатомы под действием ахиллина подтверждается данными цитометрического анализа с красителем Nile Red методом проточной цитофлуориметрии. При этом ахиллин оказывал более выраженное гиполипидемическое действие и при концентрации 0,25 мМ снижал интенсивность флуоресценции Nile Red на 15% ($17,75 \pm 0,7$ ед. флуоресценции по сравнению с контролем ($20,87 \pm 0,8$ ед. флуоресценции ($p < 0,05$).

Для исследования механизма гиполипидемического действия ахиллина определяли экспрессию ключевых генов метаболизма липидов в клеточной культуре линии НТС. Известно, что уровень внутриклеточного холестерина регулируется путем рецептор-опосредованного пиноцитоза, осуществляемого с участием рецепторов к ЛПНП (*Ldlr*), расположенных на плазматической мембране гепатоцитов [5], и ферментом 3-гидрокси-3-метилглутарил КоАредуктазой (ГМГ-КоАредуктаза), которая локализована на эндоплазматическом ретикулуме и пероксисомах и лимитирует скорость биосинтеза холестерина [6]. В результате экспериментов было установлено, что инкубация клеток гепатомы с препаратом сравнения гемфиброзил (0,25 мМ) приводила к увеличению экспрессии мРНК гена *Ldlr* в 2,2 раза ($(2,21 \pm 0,16)$ усл. ед., $p < 0,05$) (рис. 2, а). Ахиллин (0,5 мМ) не оказывал влияния на экспрессию гена *Ldlr*, и величина экспрессии составляла $(1,31 \pm 0,13)$ усл. ед., $p > 0,05$ (рис. 2, б). Экспрессия гена *Hmgcr* увеличилась в 1,4 раза ($(1,39 \pm 0,12)$ усл. ед., $p < 0,05$) при инкубации клеток гепатомы с ахиллином (см. рис. 2, б), гемфиброзил ($(1,2 \pm 0,11)$ усл. ед., $p > 0,05$) не оказывал существенного влияния на экспрессию гена *Hmgcr* по сравнению с контролем (см. рис. 2, а). Известно, что конеч-

ный продукт метаболического пути холестерол регулирует скорость транскрипции гена ГМГ-КоА-редуктазы по принципу отрицательной обратной связи. Однако регуляция активности фермента ГМГ-КоАредуктазы – это сложный процесс, который контролируется как на транскрипционном уровне (через транскрипционные факторы SREBPs), так и на посттранскрипционном (через процессы фосфорилирования и (или) дефосфорилирования) [5]. Поэтому можно предполагать, что увеличение экспрессии гена ГМГ-КоА-редуктазы, обнаруженное в наших экспериментах, обусловлено снижением содержания холестерина под действием ахиллина.

АцилКоАхолестеролацилтрансфераза (*Soat1*) – фермент, катализирующий образование эфиров холестерина [7]. Установлено, что культивирование клеточной культуры НТС с гемфиброзил (0,25 мМ) приводило к снижению экспрессии гена *Soat1* на 40% ($(0,61 \pm 0,07)$ усл. ед., $p < 0,05$) (см. рис. 2, а). Ахиллин ($(0,89 \pm 0,09)$ усл. ед., $p > 0,05$) не оказывал существенного влияния на экспрессию гена *Soat1* по сравнению с контролем (см. рис. 2, б).

Печень устраняет избыток холестерина из организма путем непосредственной секреции в желчь или после преобразования его в желчные кислоты. Лимитирующим ферментом синтеза желчных кислот является холестерин 7 α -гидроксилаза (*Cyp7a1*) [8]. Культивирование клеток с гемфиброзил (0,25 мМ) приводило к снижению экспрессии мРНК гена *Cyp7a1* на 25%, и величина экспрессии составляла $(0,75 \pm 0,06)$ усл. ед., $p < 0,05$ (см. рис. 2, а). Действительно, ранее было показано, что фибраты, в том числе гемфиброзил, уменьшают экспрессию гена *Cyp7a1* у пациентов с гиперлипидемией [9] и в клеточной культуре гепатомы HepG2 [10]. Уменьшение экспрессии мРНК гена *Cyp7a1* способствует снижению синтеза и секреции желчных кислот, что приводит к повышению литогенности желчи, то есть к риску образования желчных камней [9].

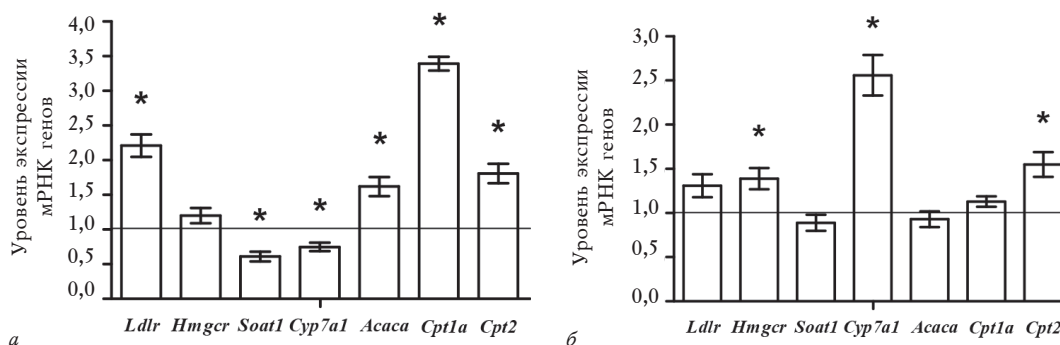


Рис. 2. Влияние гемфиброзила (0,25 мМ) (а) и ахиллина (0,5 мМ) (б) на экспрессию мРНК генов метаболизма липидов в клеточной культуре гепатомы линии НТС, * $p < 0,05$, $n = 6$

Поэтому гемфиброзил противопоказан больным с желчнокаменной болезнью. Ахиллин, напротив, повышал экспрессию мРНК гена *Cyp7a1* в 2,6 раза ($(2,56 \pm 0,23)$ усл. ед., $p < 0,05$) (см. рис. 2, б).

Жирные кислоты с длинной углеводородной цепью переносятся через внутреннюю мембрану митохондрий с помощью карнитина. Карнитин-пальмитоилтрансфераза 1 (*Cpt1a*) – фермент, расположенный на внешней мембране митохондрий и осуществляющий транспорт длинноцепочечных жирных кислот в митохондрии, катализирует реакцию с образованием ацилкарнитина. Фермент карнитин-пальмитоилтрансфераза 2 (*Cpt2*) катализирует перенос ацила на внутримитохондриальный КоА [11]. Поэтому была исследована экспрессия обоих генов ферментов, участвующих в катаболизме жирных кислот. При культивировании клеток НТС с гемфиброзилом экспрессия гена *Cpt1a* увеличивалась в 3,4 раза ($(3,39 \pm 0,1)$ усл. ед., $p < 0,05$) (см. рис. 2, а). Ахиллин в исследуемой концентрации не оказывал существенного влияния на экспрессию гена *Cpt1a* ($(1,13 \pm 0,06)$ усл. ед. соответственно, $p > 0,05$). Экспрессию гена *Cpt2* гемфиброзил увеличивал лишь в 1,8 раза ($(1,81 \pm 0,14)$ усл. ед., $p < 0,05$) (см. рис. 2, а), а ахиллин повышал величину экспрессии гена *Cpt2* в 1,5 раза ($(1,55 \pm 0,14)$ усл. ед., $p < 0,05$) (см. рис. 2, б).

Ацетил-КоА-карбоксилаза (*Acsa*) – ключевой фермент синтеза жирных кислот, катализирующий карбоксилирование ацетил-КоА с образованием малонил-КоА. Увеличение экспрессии мРНК гена *Acsa* под действием гемфиброзила может быть обусловлено снижением субстрата ацетил-КоА, необходимого для синтеза малонил-КоА, поскольку увеличение экспрессии генов *Cpt1a* и *Cpt2* (см. рис. 2, а) усиливает β -окисление жирных кислот [12]. Установлено, что гемфиброзил увеличивал экспрессию гена фермента ацетил-КоА-карбоксилазы в клетках гепатомы НТС в 1,6 раза ($(1,62 \pm 0,14)$ усл. ед., $p < 0,05$) (рис. 2, а). Ахиллин не оказывал влияния на экспрессию исследуемого гена ($(0,93 \pm 0,09)$ усл. ед., $p > 0,05$) (см. рис. 2, б).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возможный механизм гиполипидемического действия ахиллина может быть обусловлен увеличением транспорта и окисления длинноцепочечных жирных кислот в митохондриях, о чем свидетельствует повышение экспрессии гена карнитин-пальмитоилтрансферазы 2 (*Cpt2*). Снижение уровня холестерина может быть связано с повышенным синтезом желчных кислот из холестерина вследствие повышенной экспрессии гена

7-альфа-гидроксилазы (*Cyp7a1*) в культуре клеток гепатомы крыс.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адекенов С.М., Гафуров Н.М., Турмухамбетов А.Ж., Ивлев В.И. Терпеноиды *Achillea micrantha* // *Химия природных соединений*. 1987; 2: 305–306.
2. Ратькин А.В., Кайдаш О.А., Пфаргер Ю.А. и др. Гиполипидемическое действие сесквитерпеновых лактонов арглабина и ахиллина на модели острой гиперлипидемии // *Сиб. мед. обоз.* 2014; 5 (89): 40–43.
3. Shen Ch., Meng Q., Schmelzer E., Bader A. Gel entrapment culture of rat hepatocytes for investigation of tetracycline-induced toxicity // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009; 238: 178–187.
4. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // *Nucleic. Acids. Res.* 2001; 29 (9): e45.
5. Goldstein J.L., Bose-Boyd R.A., Brown M.S. Protein sensors for membrane sterols // *Cell*. 2006; 124: 35–46.
6. Wang Y.M., Zhang B., Xue Y. et al. The mechanism of dietary cholesterol effects on lipids metabolism in rats // *Lipids Health. Dis.* 2010; 9 (4): 1–6.
7. Lee M.K., Moon S.S. et al. Naringenin 7-O-cetyl ether as inhibitor of HMG-CoA reductase and modulator of plasma and hepatic lipids in highcholesterol-fed rats // *Bioorg. Med. Chem.* 2003; 11 (3): 393–398.
8. Chen Z.Y., Jiao R., Ma K.Y. Cholesterol-lowering nutraceuticals and functional foods // *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56 (19): 8761–8773.
9. Roglans N., Peris C., Verd J.C. et al. Increase in hepatic expression of SREBP 2 by gemfibrozil administration to rats // *Biochem. Pharmacol.* 2001; 62 (6): 803–809.
10. Gbaguidi G.F., Agellon L.B. The inhibition of the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene (*CYP7A1*) promoter by fibrates in cultured cells is mediated via the liver x receptor alpha and peroxisome proliferator-activated receptor alpha heterodimer // *Nucleic. Acids Res.* 2004; 32 (3): 1113–1121.
11. Bonnefont J.P. et al. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects // *Mol. Aspects Med.* 2004; 24 (5–6): 495–520.
12. Munday M.R., Hemingway C.J. The regulation of acetyl-CoA carboxylase—a potential target for the action of hypolipidemic agents // *Adv. Enzyme. Regul.* 1999; 39: 205–234.

Поступила в редакцию 12.06.2016

Утверждена к печати 25.07.2016

Ратькин Александр Валентинович, канд. фарм. наук, доцент базовой кафедры фармацевтической технологии и биотехнологии СибГМУ (г. Томск).

Пфаргер Юлия Андреевна, старший преподаватель кафедры гигиены СибГМУ (г. Томск).

Кайдаш Ольга Александровна, ассистент кафедры фармакологии СибГМУ (г. Томск).

Иванов Владимир Владимирович, канд. биол. наук, доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии СибГМУ (г. Томск).

Цыганов Матвей Михайлович, м.н.с. лаборатории онковирусологии НИИ онкологии, м.н.с. лаборатории трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины СибГМУ (г. Томск).

Чучалин Владимир Сергеевич, д-р фарм. наук, профессор, декан фармацевтического факультета, зав. кафедрой фармацевтической технологии СибГМУ (г. Томск).

Адекенов Сергазы Мынжасарович, д-р хим. наук, академик НАН РК, председатель правления АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия» (г. Караганда, Республика Казахстан).

Новицкий Вячеслав Викторович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, зав. кафедрой патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

✉ Ратькин Александр Валентинович, e-mail: midodiclo@gmail.com

УДК 615.322.012:547.913.5-314:575.117.2:577.125

DOI 10.20538/1682-0363-2016-4-84-90

For citation: Ratkin A.V., Pfarger Iu.A., Kaidash O.A., Ivanov V.V., Tsyganov M.M., Chuchalin V.S., Adekenov S.M., Novitsky V.V. Effects of achilline on lipid metabolism gene expression in cell culture. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2016; 15 (4): 84–90.

Effects of achilline on lipid metabolism gene expression in cell culture

Ratkin A.V.¹, Pfarger Iu.A.¹, Kaidash O.A.¹, Ivanov V.V.¹, Tsyganov M.M.^{1,2},
Chuchalin V.S.¹, Adekenov S.M.³, Novitsky V.V.¹

¹ *Siberian State Medical University*

2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

² *Tomsk Cancer Research Institute*

12/1, Savinub St., Tomsk, 634028, Russian Federation

³ *JSC "International Scientific- industrial holding "Phytochemistry"*

4, Gazaliev St., Karaganda, Kazakhstan

ABSTRACT

Objective. Evaluation in vitro of the mechanisms of the hypolipidemic effect of sesquiterpene γ -lactone achilline in the hepatoma tissue culture (HTC).

Materials and methods. The influence of sesquiterpene γ -lactone achilline and gemfibrozil (comparison drug) on the viability, lipid content and expression of key genes of lipid metabolism in the hepatoma tissue culture. The lipid content was assessed by fluorescent method with the vital dye Nile Red, the cell viability was assessed using MTT assay.

Results. Cultivation of cell cultures of rat's hepatoma cell line HTC for 48 h with achilline in a concentration of from 0.25 to 1.0 μ M and gemfibrozil from 0.25 to 0.5 μ M did not change cell viability compared to control. In these same concentrations of the test substance reduced the lipid content in the cells, assessed by fluorescent method with the vital dye Nile Red.

To study the mechanism of hypolipidemic action of achilline determined the expression of key genes of lipid metabolism in cell culture lines HTC. The possible mechanism of hypolipidemic action of achilline can be

attributed to the increased transport and oxidation of long-chain fatty acids in mitochondria, as evidenced by the increase in the gene expression of carnitine-palmitoyltransferase 2 (*Cpt2*). The decrease in cholesterol level may be due to increased synthesis of bile acids from cholesterol, due to increased gene expression of 7-alpha-hydroxylase (*Cyp7a1*).

Conclusion. In cell cultures of rat's hepatoma cell line HTC sesquiterpene γ -lactone achilline reduces the accumulation of lipids in cells, as evidenced by the decrease in the fluorescence of Nile Red, increased gene expression of the carnitine-palmitoyltransferase 2 (*Cpt2*) gene and 7-alpha-hydroxylase (*Cyp7a1*).

Key words: sesquiterpene γ -lactone, achilline, gemfibrozil, rat hepatoma tissue culture (HTC), *Cyp7a1*, *Cpt2*, hypolipidemic action.

REFERENCES

1. Adekenov S.M., Gafurov N.M., Turmukhambetov A.Zh., Ivlev V.I. [Terpenoidy Achillea micrantha] // *Khimiya prirodnykh soedineniy – Chemistry of Natural Compounds*. 1987; 2: 305–306 (in Russian).
2. Ratkin A.V., Kaydash O.A., Pfarger Yu.A. et al. [Gipolipidemicheskoe deystviya seskviterpenovykh laktonov arglabina i akhillina na modeli ostroy giperlipidemii] // *Sibirskoe medicinskoe obozrenie – Siberian medical review*. 2014; 5 (89): 40–43 (in Russian).
3. Shen Ch., Meng Q., Schmelzer E., Bader A. Gel entrapment culture of rat hepatocytes for investigation of tetracycline-induced toxicity // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009; 238: 178–187.
4. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // *Nucleic. Acids. Res.* 2001; 29 (9): e45.
5. Goldstein J.L., Bose-Boyd R.A., Brown M.S. Protein sensors for membrane sterols // *Cell*. 2006; 124: 35–46.
6. Wang Y.M., Zhang B., Xue Y. et al. The mechanism of dietary cholesterol effects on lipids metabolism in rats // *Lipids Health. Dis.* 2010; 9 (4): 1–6.
7. Lee M.K., Moon S.S. et al. Naringenin 7-O-cetyl ether as inhibitor of HMG-CoA reductase and modulator of plasma and hepatic lipids in highcholesterol-fed rats // *Bioorg. Med. Chem.* 2003; 11 (3): 393–398.
8. Chen Z.Y., Jiao R., Ma K.Y. Cholesterol-lowering nutraceuticals and functional foods // *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56 (19): 8761–8773.
9. Roglans N., Peris C., Verd J.C. et al. Increase in hepatic expression of SREBP 2 by gemfibrozil administration to rats // *Biochem. Pharmacol.* 2001; 62 (6): 803–809.
10. Gbaguidi G.F., Agellon L.B. The inhibition of the human cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) promoter by fibrates in cultured cells is mediated via the liver x receptor alpha and peroxisome proliferator-activated receptor alpha heterodimer // *Nucleic. Acids Res.* 2004; 32 (3): 1113–1121.
11. Bonnefont J.P. et al. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects // *Mol. Aspects Med.* 2004; 24 (5–6): 495–520.
12. Munday M.R., Hemingway C.J. The regulation of acetyl-CoA carboxylase—a potential target for the action of hypolipidemic agents // *Adv. Enzyme. Regul.* 1999; 39: 205–234.

Received June 12, 2016

Accepted July 25, 2016

Ratkin Alexander V., PhD, Associate Professor, Department of Pharmaceutical Technology and Biotechnology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Pfarger Iuliia A., Senior Lecturer of the Department of Hygiene, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Kaidash Olga A., Assistant Professor of Pharmacology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Ivanov Vladimir V., PhD, Associate Professor, Head of the Laboratory of Biological Models, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Chuchalin Vladimir S., DPhSc, Dean of the Faculty of Pharmacy, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Tsyganov Matvey M., Researcher of the Laboratory of Oncovirology, Tomsk, Cancer Research Institute, Researcher of the Laboratory of Translational Cell and Molecular Biomedicine, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Adekenov Sergazy M., DChSc, Academician of NAS RK, Chairman of the Board of JSC “International Scientific-industrial holding” Phytochemistry”, Karaganda, Kazakhstan.

Novitsky Vyacheslav V., MD, Professor, Academician of RAMS, Head of Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

✉ **Ratkin Alexander V.**, e-mail: midodiclo@gmail.com