

## ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ СЕСКВИТЕРПЕНОВОГО $\gamma$ -ЛАКТОНА АХИЛЛИНА НА КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ КРЫСИНОЙ ГЕПАТОМЫ

Иванов В.В.<sup>1</sup>, Ратькин А.В.<sup>1</sup>, Пфаргер Ю.А.<sup>1</sup>, Кайдаш О.А.<sup>1</sup>, Рязанцева Н.В.<sup>1</sup>,  
Адекенов С.М.<sup>2</sup>, Чучалин В.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет, Томск

<sup>2</sup> АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия», г. Караганда, Республика Казахстан

### РЕЗЮМЕ

Цель исследования – оценить *in vitro* фармакологические эффекты сесквитерпенового  $\gamma$ -лактона ахиллина в качестве потенциального гиполипидемического средства.

**Материал и методы.** Изучено влияние сесквитерпенового  $\gamma$ -лактона ахиллина и гемфиброзила (препарат сравнения) на содержание липидов в клеточной культуре крысиной гепатомы (НТС) флуоресцентным методом с витальным красителем Nile Red и окрашиванием клеток красителем Oil Red O при их инкубации с жировой эмульсией – липофундином. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста и окрашиванием с трипановым синим.

**Результаты.** Культивирование клеточной культуры НТС с ахиллином и гемфиброзилом в концентрациях от 0,5 до 1,5 и от 0,25 до 0,5 ммоль соответственно приводило к дозозависимому уменьшению интенсивности флуоресценции Nile Red, что связано со снижением содержания липидов в клетках. В этих концентрациях препараты не оказывали цитотоксического действия, и жизнеспособность клеток НТС не изменялась по сравнению с соответствующим показателем контрольной культуры.

Экспериментальную гиперлипидемию в культуре гепатомы индуцировали добавлением в инкубационную среду жировой эмульсии липофундина в конечной концентрации 0,05%. Интенсивность флуоресценции Nile Red в клетках возрастала в 4 раза ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует о существенном накоплении липидов в цитозоле клеток и подтверждается данными микроскопии после окрашивания нейтральных липидов в клетках красителем Oil Red O. В этих условиях ахиллин и гемфиброзил в концентрациях 0,5 и 0,25 ммоль соответственно снижали содержание липидов в клетках.

**Заключение.** На модели гиперлипидемии, индуцированной липофундином, добавление сесквитерпенового  $\gamma$ -лактона ахиллина в инкубационную среду препятствует накоплению липидов в клетках НТС, о чем свидетельствует уменьшение флуоресценции Nile Red и снижение содержания окрашенных Oil Red O липидных капель в цитозоле. Для установления молекулярных мишеней действия ахиллина на метаболизм липидов в культуре НТС в дальнейшем необходимо исследование экспрессии генов ключевых ферментов липидного обмена.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** сесквитерпеновый  $\gamma$ -лактон ахиллин, гемфиброзил, крысиная гепатома (НТС), гиполипидемическое действие.

### Введение

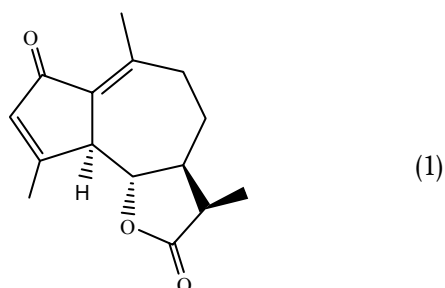
Коронарные заболевания сердца, обусловленные атеросклеротическим поражением коронарных артерий, лидируют по смертности как в России, так и в большинстве стран мира [1, 2]. В основе их развития и

прогрессирования лежит не только локальное сужение просвета артерий атеросклеротическими бляшками, но и атерогенная дислипидемия [2–4]. Наиболее частым проявлением атерогенной дислипидемии является сочетание гипертриацилглицеридемии, низкого уровня холестерина в липопротеинах высокой плотности (ЛПВП) и повышенного содержания атерогенных липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) [2].

✉ Ратькин Александр Валентинович, тел.: 8-903-915-3991,  
8 (3822) 42-09-50; e-mail: midodiclo@gmail.com

Несмотря на большое разнообразие синтетических гиполипидемических препаратов на фармацевтическом рынке, проблема терапии атеросклероза и его проявлений еще полностью не решена [4]. Перспективным источником лекарственных средств этой группы являются вещества растительного происхождения, характеризующиеся достаточно высоким фармакотерапевтическим потенциалом, низким уровнем побочных эффектов и хорошей переносимостью [5]. Среди веществ, продуцируемых растениями, активно изучаются сесквитерпеновые лактоны, для которых показаны противоопухолевая, антиинвазивная, противовоспалительная, антималярийная, противовирусная, противобактериальная, противогрибковая активности [6–8]. Сесквитерпеновые  $\gamma$ -лактоны представляют собой класс химических соединений терпеноидной структуры [8, 9] и подобно гиполипидемическим препаратам группы статинов содержат лактонное кольцо в своей структуре [9]. В частности, гиполипидемическое действие показано для сесквитерпенового  $\gamma$ -лактона гваянового ряда леукомизина, выделенного из тысячелистника мелкоцветкового *Achillea micrantha* Willd и полыни беловойтой *Artemisia leucodes* Schrenk [1, 9, 10].

Цель исследования – оценка *in vitro* фармакологические эффекты сесквитерпенового  $\gamma$ -лактона ахиллина (1) в качестве потенциального гиполипидемического средства.



В настоящее время для скрининговых исследований широко используются культуры клеток, поскольку они самовоспроизводятся, требуют меньших материальных затрат и работа с ними не обременена этическими ограничениями [11]. В связи с этим в качестве биологической модели для изучения гиполипидемического действия сесквитерпенового  $\gamma$ -лактона ахиллина использовали клеточную культуру НТС.

## Материал и методы

Ахиллин (1) – сесквитерпеновый лактон гваянового типа, выделенный в АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия» из *Achillea micrantha* Willd и *Artemisia leucodes* Schrenk [10]. Субстанция зарегистрирована на территории Республики Казахстан, исследуемый образец соответствует

требованиям ФС РК 42-1909-08, количественное содержание – 99,7%. В качестве препарата сравнения использовали гемфиброзил (Sigma-Aldrich, США). Ахиллин и гемфиброзил растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) (ПанЭко, Россия) и использовали в конечных концентрациях от 0,25 до 5,0 ммоль.

В эксперименте использовали перевиваемую клеточную культуру крысиной гепатомы (НТС), полученную из Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург). Клеточную культуру НТС культивировали в 6-луночных планшетах (SPL life science, Корея) до 70–80% конфлюэнтного монослоя ( $0,5 \cdot 10^6$  клеток в 1 мл среды в течение двух суток) в среде DMEM с L-глутамином («Биолот», Россия) и добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки («РАА Laboratories», Австрия), 50 мкг/мл гентамицина («ПанЭко», Россия) (полная среда DMEM) при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе MCO-5AC («SANYO», Япония) в атмосфере 95% воздуха и 5% CO<sub>2</sub>. Через 48 ч в инкубационную среду добавляли ахиллин и гемфиброзил в различных концентрациях (в контрольную пробу добавляли соответствующее количество ДМСО) и клетки культивировали 48 ч.

После достижения клетками 70–80% конфлюэнтного монослоя (через 48 ч) для моделирования гиперлипидемии клетки инкубировали в присутствии жировой эмульсии – липофундина МСТ/ЛСТ в конечной концентрации 0,05% (Б. Браун Медикал, Россия) – как описали Е. Пап и соавт. [12]. Липофундин добавляли перед внесением препаратов, в контрольную пробу вносили соответствующее количество ДМСО.

Жизнеспособность клеточной линии НТС оценивали через 48 ч после внесения препаратов в культуральную среду двумя методами: с использованием МТТ-теста (стандартный колориметрический метод) с применением в качестве реагента соли тетразолия – 3-[4,5-диметилтиазолил-2-ел]-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ-реагент) (ПанЭко, Россия) и с 0,1% трипановым синим (ДИАЭМ, Германия). После инкубации с препаратами клетки снимали с планшета раствором трипсина (0,25%) и ЭДТА (0,02%) (ПанЭко, Россия) и отмывали один раз в 1xPBS (pH 7,4) (Am-bion, США). Количество восстановленного продукта – формазана – измеряли на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ-Спектр, Россия) при длине волны 570 нм. Жизнеспособность в контрольной культуре клеток принимали за 100%. Количество клеток, окрашенных трипановым синим, подсчитывали в камере Горяева под световым микроскопом МИКМЕД-1 (Россия) с увеличением (ок. 7 х об. 9). Определяли процент неокрашенных (живых) клеток среди 100% посчитанных. Каждый опыт повторяли 6–7 раз [1, 13, 14].

Содержание липидов в клеточной культуре НТС определяли флуоресцентным методом с витальным липофильным красителем Nile Red, который окрашивает капли липидов в цитозоле согласно протоколу [14]. Для этого клетки снимали с пластика раствором трипсин-ЭДТА через 48 ч после внесения препаратов в культуральную среду и отмывали один раз в 1xPBS (pH 7,4). Надосадочную жидкость аккуратно аспирировали и клетки инкубировали 30 мин с Nile Red (Sigma-Aldrich, США) в конечной концентрации 3 мкмоль. Затем клетки отмывали в 1xPBS (pH 7,4) и детектировали флуоресценцию Nile Red на микропланшетном ридере Infinite 200 PRO (Tecan, Швейцария) при длине волны возбуждения 580 нм и эмиссии 630 нм. Каждый опыт повторяли 6 раз [1, 12, 14].

Окрашивание нейтральных липидов с красителем Oil Red O [15] также проводили через 48 ч после внесения препаратов в культуральную среду. Клетки фиксировали в 10%-м забуференном растворе формалина (Biovitrum, Россия) на 10 мин. Затем клетки отмывали в 1xPBS (pH 7,4) в течение 1 мин и 60%-м растворе изопропилового спирта в течение 15 с. Клетки окрашивали Oil Red O (Sigma-Aldrich, США) при 37 °С в течение 1 мин в темноте. Не связавшийся с клетками краситель отмывали в 60%-м изопропиловом спирте в течение 15 с, 3 раза по 3 мин в 1xPBS (pH 7,4) и фотографировали на микроскопе (Биомед, Россия) (об. 25 х ок. 10), оснащенный цифровой камерой DCM 510 [15].

Результаты исследования обрабатывали с использованием программы Microsoft Excel (2007), стандартного пакета программ SPSS 17.0 for Windows. Результаты представлены в виде выборочного среднего  $M$  и ошибки среднего  $m$ . Равенство выборочных средних проверяли с применением  $t$ -критерия Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Известно, что сесквитерпеновые лактоны в зависимости от их структуры обладают цитотоксическим действием и изучаются как противоопухолевые препараты [8]. Поэтому для исследования *in vitro* фармакологической активности предварительно проводили оценку жизнеспособности клеток при инкубации их в среде с различными концентрациями ахиллина и препарата сравнения. В результате наших экспериментов установлено, что жизнеспособность клеток НТС при культивировании с ахиллином в концентрации от 0,5 до 1,5 ммоль и гемфиброзилом в концентрации от 0,25 до 0,5 ммоль не изменялась по сравнению с контрольной культурой ( $p > 0,05$ ), и составляла при использо-

вании метода окраски с трипановым синим не менее  $(97,1 \pm 1,5)\%$ , а МТТ-теста – не менее  $(81,8 \pm 2,2)\%$  (рис. 1, 2). При повышении концентрации ахиллина в культуральной среде до 5,0 ммоль жизнеспособность клеток снижалась по сравнению с контролем и составляла  $(17,3 \pm 2,6)\%$  ( $p < 0,05$ ) (рис. 1). Препарат сравнения гемфиброзил в концентрации 1,0 ммоль цитотоксически действовал на клетки, при этом концентрация живых клеток составляла  $(16,0 \pm 2,5)\%$  ( $p < 0,05$ ) (рис. 2).

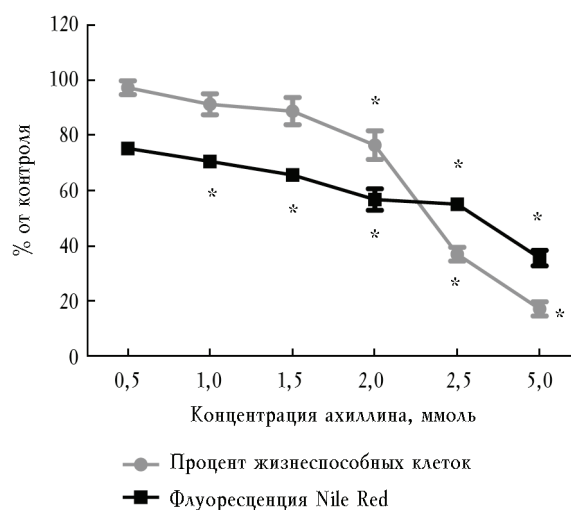


Рис. 1. Влияние ахиллина на жизнеспособность клеток с применением МТТ-теста и на флуоресценцию Nile Red в клеточной культуре крысиной гепатомы (НТС),  $M \pm m$ ,  $n = 6$ . Жизнеспособность клеток и флуоресценцию Nile Red в контроле принимали за 100%. \* – статистически значимые различия по сравнению с контролем при  $p < 0,05$

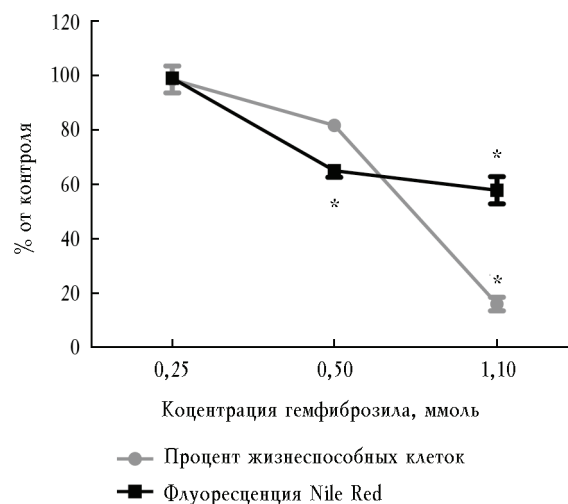


Рис. 2. Влияние гемфиброзила на жизнеспособность клеток с применением МТТ-теста и на флуоресценцию Nile Red в клеточной культуре крысиной гепатомы (НТС),  $M \pm m$ ,  $n = 6$ . Жизнеспособность клеток и флуоресценцию Nile Red в контроле принимали за 100%. \* – статистически значимые различия по сравнению с контролем при  $p < 0,05$

Добавление ахиллина к культуре НТС приводило к дозозависимому снижению интенсивности флуоресценции Nile Red с  $(75,3 \pm 1,3)$  до  $(35,6 \pm 2,8)$ % при концентрации от 0,5 до 5,0 ммоль (рис. 1), гемфиброзила – с  $(99,2 \pm 1,9)$  до  $(57,9 \pm 4,9)$ % при концентрации от 0,25 до 1,0 ммоль ( $p < 0,05$ ) (рис. 2). Статистически значимое уменьшение интенсивности флуоресценции Nile Red в клетках НТС регистрировалось при концентрации ахиллина 1,0 ммоль и гемфиброзила – 0,5 ммоль, что отражает снижение содержания липидов в клеточной культуре.

Полученные результаты подтверждаются данными микроскопии клеток после окрашивания нейтральных липидов в клетках НТС красителем Oil Red O. Под действием 1,0 ммоль ахиллина и 0,5 ммоль гемфиброзила в клетках снижалось содержание липидных капель, окрашенных Oil Red O, по сравнению с контролем (рис. 3, а, б, з).

С учетом полученных результатов для исследования гиполлипидемического действия на модели гиперлипидемии *in vitro* ахиллин и гемфиброзил использованы в концентрациях от 0,5 до 1,5 ммоль и от 0,25 до 0,5 ммоль соответственно. При этих концентрациях жизнеспособность клеток значимо не изменялась по сравнению с контролем, и отмечалось снижение уровня липидов в клетках.

Исследованиями Е. Пап и соавт. показано, что культивирование первичных крысиных гепатоцитов с липофундином в течение 48 ч приводит к накоплению триацилглицеролов (ТАГ) и жирных кислот в клетках [12]. Поэтому для моделирования экспериментальной гиперлипидемии мы добавляли в культуральную среду жировую эмульсию – липофундин в конечной концентрации 0,05%. При инкубации клеточной культуры НТС в присутствии липофундина в течение 48 ч интенсивность флуоресценции Nile Red в клетках повышалась в 4 раза и составила  $(48\,534,7 \pm 1\,924)$  ед. флуоресценции (в контроле –  $(10\,928,4 \pm 967,3)$  ед. флуоресценции) ( $p < 0,05$ ). Накопление липидов в культуре НТС также подтвердилось данными микроскопии клеток после окрашивания нейтральных липидов красителем Oil Red O (рис. 3). На рис. 3, б (инкубация клеток с липофундином 0,05%) отмечалось больше гранул липидов, окрашенных Oil Red O, чем в контрольной культуре (рис. 3, а).

На экспериментальной модели гиперлипидемии ахиллин проявлял гиполлипидемическое действие и уже в концентрации 0,5 ммоль значительно снижал интенсивность флуоресценции Nile Red ( $(72,5 \pm 1,2)$ %) по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ) (рис. 4). Гемфиброзил уменьшал содержание липидов в клетках НТС на экспериментальной модели гиперлипидемии до  $(36,5 \pm 3,7)$ % при концентрации 0,25 ммоль ( $p < 0,05$ ) (рис. 5).

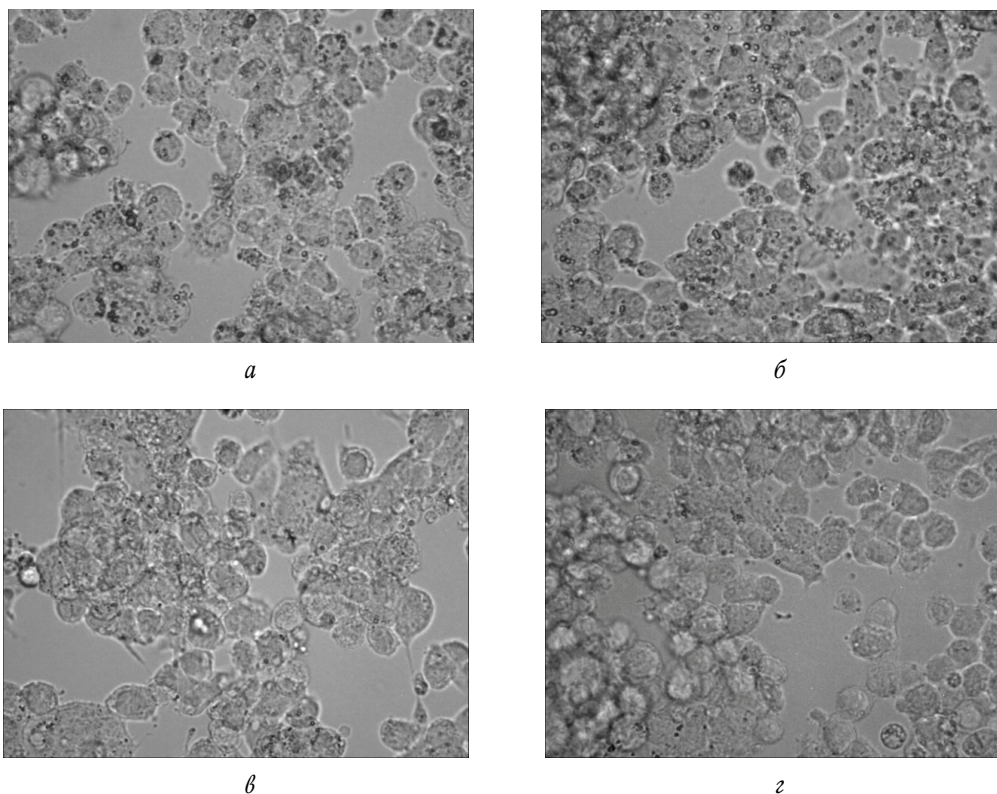


Рис. 3. Микрофотографии клеточной культуры НТС (об. 25 х ок. 10). Гранулы липидов, окрашенные красителем Oil Red O, красного цвета: а – контроль, б – 0,05% липофундин, в – 1,0 ммоль ахиллина, з – 0,5 ммоль гемфиброзила

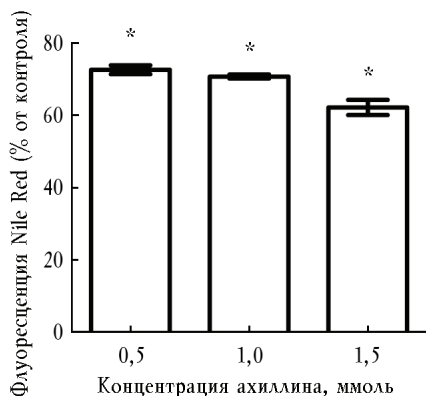


Рис. 4. Влияние ахиллина на флуоресценцию Nile Red в клеточной культуре крысиной гепатомы (НТС) при культивировании клеток с липофундином в концентрации 0,05%,  $M \pm m$ ,  $n = 6$ . Флуоресценцию Nile Red в контроле принимали за 100%. \* – статистически значимые различия по сравнению с флуоресценцией контроля при  $p < 0,05$

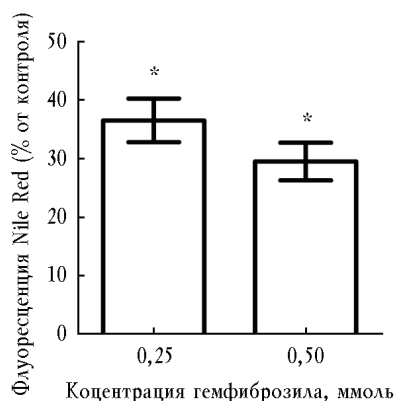


Рис. 5. Влияние гемфиброзила на флуоресценцию Nile Red в клеточной культуре крысиной гепатомы (НТС) при культивировании с 0,05% липофундином,  $M \pm m$ ,  $n = 6$ . Флуоресценцию Nile Red в контроле принимали за 100%. \* – статистически значимые различия по сравнению с флуоресценцией контроля при  $p < 0,05$

Способность липофундина индуцировать гиперлипидемию показана не только на культуре первичных гепатоцитов *in vitro* [13], но и на экспериментах *in vivo* [16]. Липофундин при введении экспериментальным животным вызывал повышение в крови уровня ТАГ, общего холестерина и холестерина в ЛПНП. Это обусловлено тем, что высокий уровень экзогенных ТАГ индуцирует синтез АпоВ-100 и холестерина в печени, что, в свою очередь, способствует образованию и секреции липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) [16].

Механизм, с помощью которого ахиллин снижает накопление липидов в клетках крысиной гепатомы, не изучен. В то же время известно, что основными механизмами гиполипидемического действия фибратов, в том числе гемфиброзила, являются снижение синтеза

ТАГ и увеличение их гидролиза [17, 18]. Гемфиброзил, будучи агонистом рецептора, активируемого пероксисомным пролифератором (PPAR), действует на ядерные рецепторы, увеличивая экспрессию генов, которые регулируют синтез ключевых ферментов липидного обмена и белков метаболизма липопротеинов [17]. Снижение синтеза ТАГ происходит за счет ингибирующего влияния гемфиброзила на активность микросомальной диацилглицеролацилтрансферазы. К тому же гемфиброзил активирует деградацию аполипопротеина В (АпоВ), что приводит к снижению секреции ЛПОНП [19]. Флавоноид нарингенин, полученный из цитрусовых, снижает секрецию ЛПОНП также за счет увеличения внутриклеточной деградации АпоВ [20]. Полученные нами данные об уменьшении флуоресценции Nile Red и снижении содержания окрашенных Oil Red О липидных капель в цитозоле клеток под влиянием ахиллина могут быть обусловлены ингибированием липогенеза или гидролизом ТАГ. Для установления молекулярных мишеней действия ахиллина на метаболизм липидов в культуре НТС необходимо в дальнейшем исследовать экспрессию генов ключевых ферментов липидного обмена.

## Заключение

На модели гиперлипидемии, индуцированной липофундином, добавление сесквитерпенового  $\gamma$ -лактона ахиллина в инкубационную среду препятствует накоплению липидов в клетках НТС, о чем свидетельствует уменьшение флуоресценции Nile Red и снижение содержания окрашенных Oil Red О липидных капель в цитозоле.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации, № НШ-4184.2014.7*

## Литература

1. Ратькин А.В., Арыстан А.И., Яковлева Ю.А., Иванов В.В., Рязанцева Н.В., Чучалин В.С., Адекенев С.М. Влияние сесквитерпенового  $\gamma$ -лактона леукомизина на уровень триацилглицеролов в клетках крысиной гепатомы при экспериментальной модели гиперлипидемии // Сиб. мед. обозрение. 2014. Т. 1. С. 44–48.
2. Бувеева Е.А., Дряпкина О.М., Ивашкин В.Т. Атерогенная дислипидемия и печень // Рос. мед. вести. 2008. Т. 13, № 1. С. 17–23.
3. Амосова Е.Н. Гиполипидемическая терапия при ишемической болезни сердца // Укр. кардиол. журн. 2002. Т. 6. С. 13–18.
4. Ramsey S., Gold E.S., Aderem A. A systems biology approach to understanding atherosclerosis // EMBO Mol. Med. 2010. V. 2. P. 79–89.
5. Kumar D., Parcha V., Maitani A., Dbulia I. Effect and evaluation of antihyperlipidemic activity guided isolated fraction from total methanol extract of *Salvadoraoleoides*

- (Decne.) in Triton WR-1339 Induced hyperlipidemic rats // Pharmacogn. Mag. 2012. V. 8, № 32. P. 314–318.
6. Wyrebska A., Gach K., Szymraj J., Szewczyk K., Hrabec E., Koszuc J., Janecki T., Janecka A. Comparison of anti-invasive activity of parthenolide and 3-isopropyl-2-methyl-4-methyleneisoxazolidin-5-one (MZ-6) – a new compound with  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -lactone motif – on two breast cancer cell lines // Chem. Biol. Drug Des. 2013. V. 79. P. 112–120.
  7. Wyrebska A., Szymanski J., Gach K., Piekietna J., Koszuc J., Janecki T., Janecka A. Apoptosis-mediated cytotoxic effects of parthenolide and the new synthetic analog MZ-6 on two breast cancer cell lines // Mol. Biol. Rep. 2013. V. 40. P. 1655–1663.
  8. Chaturvedi D. Sesquiterpene lactones: structural diversity and their biological activities // Research signpost. 2011. P. 313–334.
  9. Роднова Е.А., Иванов В.В., Ледюкова С.И., Чучалин В.С., Ратькин А.В., Рахимова Б.Б., Хабаров И.А., Адекенов С.М. Гиполипидемическое действие леукомизина на модели острой гиперлипидемии, индуцированной этанолом // Бюл. сиб. медицины. 2013. Т. 12, № 1. С. 43–48.
  10. Адекенов С.М., Гафуров Н.М., Турмухамбетов А.Ж., Ивлев В.И. Терпеноиды *Achillea micrantha* // Химия природ. соединений. 1987. № 2. 305 с.
  11. Морозов С.Ю. Применение симвастатина для лечения и профилактики ишемической болезни сердца // Рус. мед. журн., кардиология. 2009. № 8. С. 606–609.
  12. Pan E., Tirosh O., Madar Z. Triacylglycerol-mediated oxidative stress inhibits nitric oxide production in rat isolated hepatocytes // J. Nutr. 2005. V. 135, № 9. P. 2090–2095.
  13. Giri S., Nieber K. et al. Telomerase activity and hepatic functions of rat embryonic liver progenitor cell in nanoscaffold-coated model bioreactor // Mol. Cell. Biochem. 2010. V. 336. P. 137–149.
  14. Shen Cb., Meng Q., Schmelzer E., Bader A. Gel entrapment culture of rat hepatocytes for investigation of tetracycline-induced toxicity // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2009. V. 238. P. 178–187.
  15. Xu S., Huang Y., Xie Y. et al. Evaluation of foam cell formation in cultured macrophages: an improved method with Oil Red O staining and Dil-oxLDL uptake // Cytotechnology. 2010. V. 62. P. 473–481.
  16. Roche L.D., Medina E.A., Perez A.F. et al. Lipofundin-induced hyperlipidemia promotes oxidative stress and atherosclerotic lesions in New Zealand white rabbits // Int. J. Vasc. Med. 2012. V. 2012. P. 1–7.
  17. Ozansoy G., Akin F.B. Effects of gemfibrozil treatment on vascular reactivity of streptozotocin-diabetic rat aorta // J. Pharm. Pharmacol. 2004. V. 56. P. 241–246.
  18. Umeda Y., Kako Yu., Mizutani K. et al. Inhibitory action of gemfibrozil on cholesterol absorption in rat intestine // The journal of lipid research. 2001. V. 42. P. 1214–1219.
  19. Zhu D., Ganji S.H., Kamanna V.S., Kasbyap M.L. Effect of gemfibrozil of apolipoprotein B secretion and diacylglycerolacyltransferase activity in human hepatoblastoma (HepG2) cells // Atherosclerosis. 2002. V. 164, № 2. P. 221–228.
  20. Borradaile N.M., Dreu L.E. et al. Inhibition of hepatocyte apoB secretion by naringenin: enhanced rapid intracellular degradation independent of reduced microsomal cholesteryl esters // J. Lipid Res. 2002. V. 43, № 9. P. 1544–1554.

Поступила в редакцию 19.05.2014 г.

Утверждена к печати 09.10.2014 г.

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

Ратькин Александр Валентинович (✉) – канд. фарм. наук, доцент кафедры фармацевтической технологии СибГМУ (г. Томск).

Пфаргер Юлия Андреевна – аспирант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

Кайдаш Ольга Александровна – аспирант кафедры фармакологии СибГМУ (г. Томск).

Рязанцева Наталья Владимировна – д-р мед. наук, профессор, проректор по стратегическому развитию, инновационной политике и науке, зав. кафедрой молекулярной медицины и клинической лабораторной диагностики 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).

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

✉ Ратькин Александр Валентинович, тел.: 8-903-915-3991, 8 (3822) 42-09-50; e-mail: midodiclo@gmail.com

## INVESTIGATION OF HYPOLIPIDEMIC EFFECT OF SESQUITERPENE $\gamma$ -LACTONE AHILLIN IN HEPATOMA TISSUE CULTURE (HTC) CELLS

Ivanov V.V.<sup>1</sup>, Ratkin A.V.<sup>1</sup>, Pfarger Yu.A.<sup>1</sup>, Kaidash O.A.<sup>1</sup>, Ryazantseva N.V.<sup>1</sup>, Adekenov S.M.<sup>2</sup>, Chuchalin V.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation*

<sup>2</sup> *International scientific- industrial holding "Phytochemistry", Karaganda, Kazakhstan*

### ABSTRACT

**Objective.** Investigation of hypolipidemic effect of sesquiterpene  $\gamma$ -lactone achillin in hepatoma tissue culture (HTC) cells.

**Material and methods.** In this study we've evaluated the effect of  $\gamma$ -lactone sesquiterpene achillin and gemfibrozil (comparator drug) on the lipid content in the hepatoma tissue culture (HTC) cell which were incubated with a fat emulsion lipofundin by fluorescent method with vital dye Nile Red and staining the cells with the dye Oil Red O. The cell viability was investigated using the MTT-test and staining with Trypan blue.

**Results.** Cultivation cells HTC with achillin and gemfibrozil concentrations ranging from 0.5 to 1.5 mM and from 0.25 mM to 0.5 mM, respectively, resulted in dose-dependent decrease of the fluorescence's intensity Nile Red. It reflects a decrease in lipid content in the cells. At these concentrations the drugs didn't have cytotoxic effect and the cell viability didn't change compared to the control culture.

An experimental hyperlipidemia in the hepatoma culture cells was induced by adding to the incubation medium a fat emulsion lipofundin at a final concentration 0.05%. The intensity of fluorescence Nile Red in the cells was increased 4 fold ( $p < 0.05$ ). This result suggests the significant accumulation of lipids in the cell's cytosol and confirmed by microscopy after staining neutral lipids with the dye Oil Red O. Under these conditions achillin and gemfibrozil reduced lipid content in cells and had the effect at concentrations of 0.5 mM and 0.25 mM respectively.

**Conclusion.** In the lipofundin-mediated model of hyperlipidemia the sesquiterpene lactone achillin prevents the lipid accumulation in cells. It confirms by decrease of fluorescence Nile Red and reduction lipid drops which were stained with Oil Red O in cytosol. To establish the molecular targets of achillin's action on lipid metabolism in cell culture HTC we need to investigate a gene expression of key enzymes of lipid metabolism.

**KEY WORDS:** sesquiterpene  $\gamma$ -lactone achillin, gemfibrozil, hepatoma tissue culture (HTC) cells, hypolipidemic effect.

*Bulletin of Siberian Medicine, 2014, vol. 13, no. 5, pp. 28–35*

### References

1. Ratkin A.V., Arystan LI, Yakovleva Y.A., Ivanov V.V., Ryazantseva N., Chuchalin V.S., Adekenov S.M. Influence of sesquiterpene  $\gamma$ -lactone leucomelaena on the level of triacylglycerols in the cells of rat hepatoma in experimental models hyperlipidemia. *Sibirskoye meditsinskoye obozrenie – Siberian Medical Review*, 2014, no 1, pp. 44–48.
2. Buyeverov E.L., Drapkina O.M., Ivashkin V.T. Atherogenic dyslipidemia and liver. *Rossiyskiye meditsinskiye vesti – Russian Medical News*, 2008, vol. 13, no. 1, pp. 17–23.
3. Amosova E.N. Lipid-lowering therapy in coronary heart disease. *Ukrainskiy kardiologicheskiy zurnal – The Ukrainian Cardiological Journal*, 2002, no. 6, pp. 13–18.
4. Ramsey S., Gold E.S., Aderem A. A systems biology approach to understanding atherosclerosis. *EMBO Mol. Med.*, 2010, vol. 2, pp. 79–89.
5. Kumar D., Parcha V., Maithani A., Dhulia I. Effect and evaluation of antihyperlipidemic activity guided isolated fraction from total methanol extract of *Salvadora oleoides* (Decne.) in Triton WR-1339 Induced hyperlipidemic rats. *Pharmacogn. Mag.*, 2012, vol. 8, no. 32, pp. 314–318.
6. Wyrebska A., Gach K., Szemraj J., Szewczyk K., Hrabec E., Koszuc J., Janecki T., Janecka A. Comparison of anti-invasive activity of parthenolide and 3-isopropyl-2-methyl-4-methyleneisoxazolidin-5-one (MZ-6) – a new compound with  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -lactone motif – on two breast cancer cell lines. *Chem. Biol. Drug Des.*, 2013, vol. 79, pp. 112–120.
7. Wyrebska A., Szymanski J., Gach K., Pieknielna J., Koszuc J., Janecki T., Janecka A. Apoptosis-mediated cytotoxic effects of parthenolide and the new synthetic analog MZ-6 on two breast cancer cell lines. *Mol. Biol. Rep.*, 2013, vol. 40, pp. 1655–1663.

8. Chaturvedi D. Sesquiterpene lactones: structural diversity and their biological activities. *Research Signpost.*, 2011, pp. 313–334.
9. Rodnova E.A., Ivanov V.V., Lizukova S.R., Chuchalin V.S., Ratkin A.V., Rakhimov B.B., Khabarov I.A., Adekenov S.M. Hypolipidemic effect leucomelaena on the model of acute hyperlipidemia induced by ethanol. *Bulleten sibirskoy meditsini – Bulletin of Siberian Medicine*, 2013, vol. 12, no. 1, pp. 43–48.
10. Adekenov S.M., Gafurov N.M., Turmagambetov A.Z., Ivlev V.I. Terpenoids *Achillea micrantha*. *Khimiya prirodnikh soedineniy – Chemistry of Natural Compounds*, 1987, no. 2, pp. 305.
11. Morozov H.E. Use of simvastatin for the treatment and prevention of coronary heart disease. *Russkiy meditsinskiy zhurnal, kardiologiya – Russian Journal of Medicine, Cardiology*, 2009, no 8. pp. 606–609.
12. Ilan E., Tirosh O., Madar Z. Triacylglycerol-mediated oxidative stress inhibits nitric oxide production in rat isolated hepatocytes. *J. Nutr.*, 2005, vol. 135, no. 9, pp. 2090–2095.
13. Giri Sh., Nieber K. et al. Telomerase activity and hepatic functions of rat embryonic liver progenitor cell in nanoscaffold-coated model bioreactor. *Mol. Cell. Biochem.*, 2010, vol. 336, pp. 137–149.
14. Shen Ch., Meng Q., Schmelzer E., Bader A. Gel entrapment culture of rat hepatocytes for investigation of tetracycline-induced toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2009, vol. 238, pp. 178–187.
15. Xu S., Huang Y., Xie Y. et al. Evaluation of foam cell formation in cultured macrophages: an improved method with Oil Red O staining and Dil-oxLDL uptake. *Cytotechnology*, 2010, vol. 62, pp. 473–481.
16. Roche L.D., Medina E.A., Perez A.F. et al. Lipofundin-induced hyperlipidemia promotes oxidative stress and atherosclerotic lesions in New Zealand white rabbits. *Int. J. Vasc. Med.*, 2012, vol. 2012, pp. 1–7.
17. Ozansoy G., Akin F.B. Effects of gemfibrozil treatment on vascular reactivity of streptozotocin-diabetic rat aorta. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2004, vol. 56, pp. 241–246.
18. Umeda Y., Kako Yu., Mizutani K. et al. Inhibitory action of gemfibrozil on cholesterol absorption in rat intestine. *The journal of lipid research*, 2001, vol. 42, pp. 1214–1219.
19. Zhu D., Ganji S.H., Kamanna V.S., Kashyap M.L. Effect of gemfibrozil of apolipoprotein B secretion and diacylglycerolacyltransferase activity in human hepatoblastoma (HepG2) cells. *Atherosclerosis*, 2002, vol. 164, no. 2, pp. 221–228.
20. Borradaile N.M., Dreu L.E. et al. Inhibition of hepatocyte apoB secretion by naringenin: enhanced rapid intracellular degradation independent of reduced microsomal cholesteryl esters. *J. Lipid Res.*, 2002, vol. 43, no. 9, pp. 1544–1554.

Ivanov Vladimir V., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Ratkin Aleksander V. (✉), Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Pfarger Yulia A., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Kaidash Olga A., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Ryazantseva Natalia V., State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Adekenov Sergazy M., International scientific- industrial holding “Phytochemistry”, Karaganda, Kazakhstan.

Chuchalin Vladimir S., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

✉ Ratkin Aleksander V., Ph.: +7-903-915-3991, +7 (3822) 42-09-50; e-mail: midodiclo@gmail.com