

Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2010

М. М. Расулов¹, М. К. Нурбеков¹, С. Н. Бобкова¹, В. В. Буланова¹,
Е. С. Антонова¹, М. И. Сусова¹, М. Г. Воронков²

ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ТРЕКРЕЗАНА И ЕГО ВОЗМОЖНЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ

¹ ГОУ ВПО "Московский городской педагогический университет", Москва, Россия;

² Иркутский институт химии СО РАН, Иркутск, Россия

В экспериментах выявлено, что препарат трекрезан при профилактическом введении кроликам сдерживает развитие атеросклероза, что выражается в уменьшении пораженности аорты атеросклеротическими бляшками, а также снижением уровня холестерина, триацилглицеринов и бета-липопротеинов в сыворотке крови, ткани печени и аорты. Под влиянием трекрезана ускоряется синтез триптофанил-тРНК синтетазы, что является ключевым звеном в сложном механизме действия препарата.

Ключевые слова: триптофанил-тРНК синтетаза, гиполипидемия, трекрезан, атеросклероз.

В последние годы изучаются механизмы контроля атерогенеза, связанных с цитокинной активностью ряда белковых факторов. Выявлена роль ферментов класса аминоксил-тРНК-синтетаз — ключевых для обмена веществ. В частности — тирозил-тРНК-синтетаза (ТирРСаза), будучи расщепленной, обладает цитокинной активностью и стимулирует ангиогенез, способствуя, тем самым, атерогенезу [1, 2]. Гомолог ТирРСазы — триптофанил-тРНК синтетаза (ТРСаза) в клетках существует в 2 формах: 1) основная полноразмерная форма; 2) частично усеченная форма (миниТРСаза), которая лишается N-концевого фрагмента в процессе альтернативного сплайсинга при созревании пре-мРНК [3]. Образование обеих форм фермента может быть резко ускорено у всех млекопитающих при воздействии ряда белковых факторов, в частности, γ -интерферона. При этом ТРСаза, особенно в виде миниТРСазы, в отличие от ТирРСазы, обладает выраженным антиангиогенным и антиатерогенным действием [1, 2]. Наряду с этим известно, что развитие атеросклероза связано с патологическими процессами в эндотелии сосудов. Поэтому эффективность антиатеросклеротических препаратов определяется их способностью защищать сосудистую стенку [4, 5]. В этой связи представляют интерес триэтанолламмониевые соли ароксиксусных кислот, имеющих протатрановую структуру [6], которые уменьшают пораженность эластических волокон и стабилизируют клеточные мембраны [7]. Из них особый интерес привлекает новый отечественный препарат трекрезан, который, как было показано нами ранее, обладает широким спектром терапевтического действия [8]. Целью настоящего исследования явилось изучение влияния трекрезана в

разных дозах и путях введения на развитие экспериментального атеросклероза и активность ТРСазы.

Экспериментальная часть

Атеросклероз моделировали по Н. Н. Аничкову и С. С. Халатову на кроликах массой 2,5 – 3 кг. Животным ежедневно скармливали с пищей холестерина в дозе 0,25 г/кг. Через 1 мес после начала кормления в крови животных определялся уровень общих липидов, холестерина, триацилглицеринов и β -липопротеинов. В последующем все животные продолжали получать холестерин.

В первой серии опытов кроликам вводили трекрезан в дозе 5 мг/кг внутримышечно однократно ежедневно в течение 2 мес, а во второй серии опытов — в дозе 25 мг/кг также однократно ежедневно в течение 2 мес.

В третьей серии экспериментов трекрезан добавляли в пищевой рацион животных из расчета 50 мг/кг в 1 сут в течение 2 мес. В четвертой серии опытов, выполненных по той же схеме, животные получали с пищей трекрезан в дозе 150 мг/кг в 1 сут. В этих сериях экспериментов учитывалась только суточная доза трекрезана.

В пятой серии опытов кроликам вводили раствор трекрезана в дозе 5 мг/кг внутримышечно однократно с первого дня эксперимента, т.е. в течение 3 мес, одновременно со скармливанием холестерина. Эта серия служила моделью для изучения профилактического действия трекрезана, в отличие от 1 – 4 серии экспериментов, в которых изучали терапевтические эффекты трекрезана.

В целом, эксперименты продолжались в течение 3 мес. После этого животные забивались путём воз-

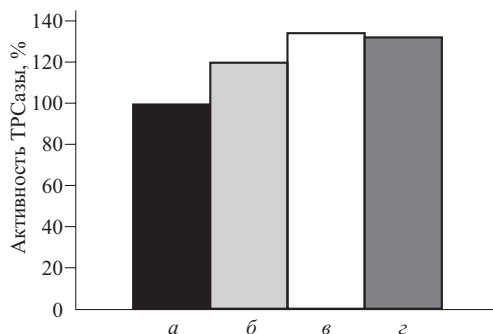


Рис. 1. Влияние трекрезана на активность ТРСазы в частично очищенных препаратах аорты при экспериментальном атеросклерозе у кроликов: *а* — контроль; *б* — трекрезан в дозе 150 мг/кг перорально; *в* — трекрезан в дозе 25 мг/кг внутримышечно; *г* — трекрезан в дозе 5 мг/кг вместе с холестерином.

душной эмболии. В конце экспериментов в сыворотке венозной крови животных определяли стандартными методами уровень общих липидов, холестерина, триацилглицеринов и β -липопротеинов; кроме этого определяли уровень холестерина и триацилглицеринов в печени. В грудном отделе аорты также определяли содержание липидов и холестерина; наряду с этим измеряли активность ТРСазы. Планиметрическим методом оценивали индекс пораженности аорты атеросклеротическими бляшками (ИПА) [9].

Активность ТРСазы в частично очищенных экстрактах измеряли модифицированным методом [10]. Образцы аорты массой от 5 до 8 г измельчали при $t = 5^\circ\text{C}$ и растирали под жидким азотом до порошкового состояния. Смесь экстрагировали в буфере, содержащем 20 мМ трис-НСl pH 7,5, 1 мМ β -меркаптоэтанол, 5 мМ ЭДТА, 1 мМ фенолметилсульфанилфторид (PMSF), 0,1 М КСl. После перемешивания при $t = 5^\circ\text{C}$ в течение 30 мин, клеточный дебрис осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 20 000 об/мин. К супернатанту добавляли, перемешивая, мелко измельченный сульфат аммония до 40 % насыщения. После формирования в течение 1–2 ч при $t = 5^\circ\text{C}$ осадка, его удаляли центрифугированием при 20 000 об/мин в течение 20 мин. Осадок отбрасывали. К супернатанту добавляли таким же способом сульфат аммония до 60 % насыщения. Осадок оставляли на ночь при $t = 5^\circ\text{C}$. Перед опытом осадок центрифугировали при 20 000 об/мин в течение 20 мин. Осадок для удаления соли диализовали против указанного выше буфера без КСl. Реакционная смесь объемом 60 мкл содержала 20 мМ трис-НСl pH 7,5, 5 мМ MgCl_2 , 0,05 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 0,1 мМ C_{14} , L-триптофан (54 мCi/моль, Amersham), 50 мМ КСl, 1,0 мМ ЭДТА, 2,5 мМ АТФ, 7 мг/мл суммарной дрожжевой тРНК [10]. При использовании частично очищенных препаратов транспортной РНК, специфичных к триптофану (тРНК^{Трп}), их концентрация в смеси составляла 0,2 мкМ. Добавляли 20 мкг частично очищенного препарата, нормализованного по белку. Смесь инкубировали при 25°C . По 9 мкл аликвот отбирали, помещали на Whatman GFC диски и промывали 5 % трихлоруксусной кислотой. Связан-

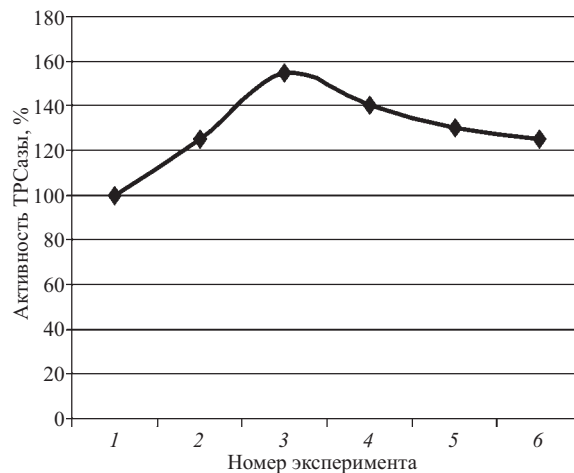


Рис. 2. Кинетика активности ТРСазы в частично очищенных препаратах аорты кроликов при развитии атеросклероза и применении трекрезана в дозе 25 мг/кг: *1* — контроль (сразу после введения трекрезана); *2* — 2 недели введения трекрезана; *3* — 1 мес введения трекрезана; *4* — 1,5 мес введения трекрезана; *5* — 2 мес введения трекрезана; *6* — 2,5 мес введения трекрезана.

ную радиоактивность определяли с помощью толуольного сцинтиллятора. В контроле использовали соответствующие количества суммарного белка плазмы. Для измерения специфического эффекта трекрезана использовали время инкубации на линейном участке зависимости радиоактивности от времени инкубации и от концентрации экстракта.

Вместе с тем в специальной серии наблюдений исследовали кинетику активности ТРСазы в аорте кроликов в условиях развивающегося атеросклероза и терапевтическом применении препарата только в дозе, вызвавшей максимальный эффект. При этом эпоха анализа составляла 2 недели, начиная с первого дня введения трекрезана и до 10 недели экспериментов.

Результаты обрабатывали статистически.

Результаты и их обсуждение

Установлено, что введение трекрезана в дозе 5 мг/кг внутримышечно ежедневно однократно в течение 2 мес опытов приводит к достоверному снижению уровня триацилглицеринов, β -липопротеинов и общих липидов в сыворотке крови и печени. При этом не отмечено существенных изменений уровня холестерина в крови и печени, содержания общих липидов и холестерина, активности ТРСазы в ткани аорты, а также степени ее пораженности атеросклеротическими бляшками — ИПА (табл. 1).

При увеличении дозы трекрезана до 25 мг/кг (вторая серия) показатели липидного обмена в крови и печени снижаются еще больше (табл. 1). Одновременно в ткани аорты снижается уровень холестерина и общих липидов, уменьшается индекс ИПА, а также заметно повышается уровень ТРСазы (рис. 1). Корреляционный анализ выявил сильную связь между этими показателями (табл. 2).

При введении трекрезана в рацион животных (третья и четвертая серии), его эффективность значитель-

Таблица 1
Влияние трекрезана на показатели липидного обмена при экспериментальном атеросклерозе у кроликов

Количество липидов, ммоль/л	Сыворотка крови	Печень	Аорта
Контроль, ИПА (%) = 54 ± 5			
Липиды общие	72,5 ± 5,1	1,2 ± 0,1	1,8 ± 0,2
Холестерин	34,2 ± 2,2	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1
Триацилглицерины	16,3 ± 2,4	1,0 ± 0,1	0,45 ± 0,05
β-липопротеины	3,9 ± 0,4	0,2 ± 0,07	0,2 ± 0,05
Серия 1 (трекрезан в дозе 5 мг/кг в/м 2 мес) ИПА (%) = 47 ± 4			
Липиды общие	54,1 ± 4,1*	0,5 ± 0,1*	1,6 ± 0,2
Холестерин	31,1 ± 2,1	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1
Триацилглицерины	10,1 ± 1,1*	0,45 ± 0,04*	0,4 ± 0,06
β-липопротеины	2,1 ± 0,2*	0,1 ± 0,08*	0,15 ± 0,05
Серия 2 (трекрезан в дозе 25 мг/кг в/м 2 мес) ИПА (%) = 35 ± 4*			
Липиды общие	46,7 ± 4,0*	0,4 ± 0,1*	1,1 ± 0,1*
Холестерин	24,8 ± 1,9*	0,2 ± 0,05*	0,3 ± 0,1*
Триацилглицерины	8,2 ± 0,9*	0,25 ± 0,05*	0,2 ± 0,04*
β-липопротеины	1,7 ± 0,2*	—	—
Серия 3 (трекрезан в дозе 50 мг/кг per oris 2 мес) ИПА (%) = 51,5 ± 5			
Липиды общие	68 ± 4,9	1,1 ± 0,1	1,6 ± 0,2
Холестерин	32,1 ± 2,1	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1
Триацилглицерины	15,5 ± 2,2	0,9 ± 0,1	0,3 ± 0,1
β-липопротеины	3,5 ± 0,3	0,2 ± 0,08	0,2 ± 0,05
Серия 4 (трекрезан в дозе 150 мг/кг per oris 2 мес) ИПА (%) = 49 ± 4			
Липиды общие	57,5 ± 5,0*	0,6 ± 0,1*	1,5 ± 0,2
Холестерин	32,2 ± 2,1	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1
Триацилглицерины	10,3 ± 2,2*	0,5 ± 0,1*	0,3 ± 0,1
β-липопротеины	2,8 ± 0,3*	0,1 ± 0,07*	0,2 ± 0,03
Серия 5 (трекрезан в дозе 5 мг/кг в/м 3 мес) ИПА (%) = 41 ± 4*			
Липиды общие	46,9 ± 4,1*	0,6 ± 0,1*	1,2 ± 0,1*
Холестерин	25,5 ± 1,8*	0,2 ± 0,05*	0,4 ± 0,1*
Триацилглицерины	8,3 ± 0,95*	0,3 ± 0,05*	0,3 ± 0,05*
β-липопротеины	1,8 ± 0,2*	—	—

* $p < 0,05$ по отношению к контролю.

но снижается. Так, достоверное уменьшение количества общих липидов, β-липопротеинов и триацилглицеринов в сыворотке крови и в печени зарегистрировано только в группе животных, получавших трекрезан в дозе 150 мг/кг в сутки (табл. 1). Активность ТРСазы в ткани аорты кроликов этой группы имеет тенденцию к увеличению. Коэффициенты корреляции, приведенные в табл. 2, свидетельствуют о том, что связь между основными показателями слабая, а между ИПА и активностью ТРСазы — средней силы.

Наконец, при трехмесячном введении трекрезана в дозе 5 мг/кг с первого дня эксперимента (пятая серия опытов), т.е. профилактически, показатели липидного обмена в крови, в ткани аорты и в печени, достоверно снижаются (табл. 1), а уровень ТРСазы повышается (рис. 1). Пораженность аорты атеросклеротическими

Таблица 2
Коэффициенты корреляции (r) активности ТРСазы в ткани аорты с показателями липидного обмена при применении трекрезана в разных дозах и путях введения

Группа животных	Липиды общие, ммоль/л	Холестерин, ммоль/л	Триацилглицерины, ммоль/л	β-липопротеины, ммоль/л	ИПА, %
Серия 1	0,41	0,32	0,37	0,29	0,27
Серия 2	0,48	0,48	0,41	—	0,52
Серия 3	0,21	0,22	0,18	0,19	0,31
Серия 4	0,39	0,27	0,31	0,32	0,42
Серия 5	0,44	0,55	0,47	—	0,61

бляшками — ИПА — была существенно меньше, чем у контрольных животных. Коэффициенты корреляции приведены в табл. 2, из которой видно, что в большинстве случаев связь между активностью ТРСазы и показателями липидного обмена характеризуется как средней силы и сильная (табл. 2).

Учитывая сложность механизма действия трекрезана, необходимо было проследить динамику процесса активации ТРСазы. Для этого с использованием частично очищенных препаратов дрожжевой тРНК^{Гри} были изучены линейные участки зависимостей накопления продуктов специфического ацилирования ТРСазой. Выявленная кинетика с локальным максимумом (рис. 2) подтверждает стимулирующее действие трекрезана и отражает соотношение разных форм ТРСазы, возникающих при действии трекрезана, причем снижение относительного содержания активной формы с сохранением и возрастанием гипополидемического эффекта, может указывать на накопление усеченных форм фермента, обладающих гипополидемическим действием.

Итак, трекрезан при парентеральном введении в дозах 25 мг/кг в течение 2 мес и 5 мг/кг в течение 3 мес вызывает достоверное уменьшение пораженности аорты атеросклеротическими бляшками и гипополидемию, а также связанное с этими феноменами повышение синтетической активности ТРСаз. Это, по современным представлениям, является основным критерием оценки антисклеротического действия в экспериментах для любых факторов [11]. Применение трекрезана, обладающего антиоксидантным и противовоспалительным действием, сопряжено, по-видимому, со стимуляцией ряда цитокинов, включая γ-интерферон. При этом происходит каскадное усиление образования комплекса защитных факторов, включая ТРСазу. В свою очередь антиатерогенная активность ТРСазы связана, скорее всего, с образованием миниТРС, со снижением активности исходной формы фермента и снижением ацилирующей активности в суммарных препаратах. Связь гипополидемической активности трекрезана со стимуляцией синтеза различных форм ТРСазы согласуется с данными литературы [1, 2].

ЛИТЕРАТУРА

1. E. Tzima, J. S. Reader, M. Irani-Tehrani, et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **100**(25), 14903 – 14907 (2003).
2. K. Wakasugi, B. M. Slike, J. Hood, et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, № 1, 173 – 177 (2002).
3. J. Liu, E. Shue, K. L. Ewalt, and P. Schimmel, *Nucl. Acids Res.*, **32**(2), 719 – 727 (2004).
4. Ф. Е. Агеев, А. Г. Овчинников, В. Ю. Мареев и др., *Consilium Med.*, **3**(2), 61 – 65 (2001).
5. Б. А. Намаканов, М. М. Расулов, *Адаптивные процессы сердечно-сосудистой системы при артериальной гипертензии и возможности их фармакокоррекции*, “11 формат”, Москва (2009).
6. Г. Л. Старова, О. В. Франк-Каменецкая, В. С. Фундаментский и др., *Докл. АН СССР*, **260**(4), 888 – 892 (1981).
7. М. М. Расулов, М. Г. Воронков, *Журн. Мед. Альтера*, № 4(авг.), 32 – 36 (2001).
8. М. Г. Воронков, М. М. Расулов, *Хим.-фарм. журн.*, **41**(1), 3 – 9 (2007).
9. А. Н. Климов, В. Е. Рыженков, *Экспериментальное изучение гиполипидемических и антиатеросклерозных средств (методические рекомендации)*, МЗ СССР, Фармакологический комитет, Москва (1988).
10. P. Seshaiyah, D. J. Andrew, *Mol. Biol. Cell.*, **10**(5), 1595 – 1608 (1999).
11. D. I. Graham, A. K. Borch-Johnsen, G. Boysen, et al., *Eur. Heart J.*, **28**(19), 2375 – 2414 (2007).

Поступила 12.08.09

HYPOLIPIDEMIC EFFECT OF TRECREZAN AND ITS POSSIBLE MOLECULAR MECHANISM

M. M. Rasulov¹, M. K. Nurbekov¹, S. N. Bobkova¹, V. V. Bulanova¹, E. S. Antonova¹, M. I. Susova¹, and M. G. Voronkov²

¹ Moscow State Pedagogical University, Moscow, Russia;

² Favorsky Institute of Organic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033, Russia

Experiments showed that the preventive introduction of trecrezan to rabbits slows down the development of atherosclerosis, which is manifested by reduction of the aorta lesion with atherosclerotic plaque formation and by decrease in the level of cholesterol, triglycerides, and beta-lipoproteins in the blood serum, liver tissues, and aorta. Trecrezan accelerates the synthesis of tryptophanyl-tRNA synthetase, which is a key part in the complex mechanism of drug action.

Key words: tryptophanyl-tRNA synthetase, hypolipidemia, trecrezan, atherosclerosis