

На правах рукописи

Гончарова Наталья Валерьевна

**Влияние стимуляции макрофагов на
экспериментальную дислипидемию у мышей**

1.5.4 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины» г. Новосибирск

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Короленко Татьяна Александровна

Официальные оппоненты: Шевела Екатерина Яковлевна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии, федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии“

Сорокина Ирина Васильевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории фармакологических исследований, федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова”

Ведущая организация

Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Защита состоится «__» _____ 2022 г. в __ часов на заседании диссертационного совета 24.1.242.02 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерально-го государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» <https://frcftm.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Русских Галина Сергеевна

Введение

Актуальность проблемы:

Изучение механизмов развития атеросклероза – процесса хронического сосудистого воспаления, важно для профилактики, ранней диагностики и лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы. (FERENCE et al., 2020; Getz et al., 2016; Libby, Aikawa 2002). Ведущим фактором развития атеросклероза является гиперлипидемия – повышенное содержание в крови холестерина, триглицеридов и липопротеинов низкой плотности (Jinnouchi et al., 2020; Ragino и др., 2010, 2020).

Изучение характера нарушений липидного обмена проводится на различных экспериментальных моделях: химических, диетических, генетических (Jawień, 2011). Значительный интерес представляет экспериментальная фармакологическая модель гиперлипидемии у мышей, вызванная ингибитором липопротеинлипаз – детергентом-полоксамером 407 (P-407) (Johnston et al, 2003, 2017). После введения P-407 у мышей нарушается катаболизм липопротеинов и их захват клетками печени, что сопровождается повышением уровня липидов сыворотки: холестерина (ХС), триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) (Johnston, 2017). Преимуществами данной модели являются простота воспроизведения, низкая токсичность P-407, дозозависимость изменений липидного спектра. Эта модель позволяет изучать гиперлипидемию (особенно гипертриглицеридемию) и формирование атеросклероза у мышей и открывает перспективу изучения влияния различных соединений на этот процесс и может использоваться для тестирования ряда гиполипидемических препаратов. Учитывая осложнения, возникающие при использовании статинов в качестве гиполипидемической терапии, были проведены исследования эффектов полисахаридов (ПС): карбоксиметилированного-β-1,3-D-гликана (КМГ) и маннанов А и В, стимулирующих макрофаги и обладающих гиполипидемическим эффектом при экспериментальной гиперлипидемии (Viola, et al., 2019).

Известно, что процесс атеросклероза начинается с усиленной инфильтрации макрофагов в сосудистую стенку с последующей дифференцировкой в липидную пенистую клетку. Роль макрофагов в патогенезе атеросклероза требует дальнейшего изучения (Kozicky and Sly, 2019). Хитотриозидаса, относящаяся к классу хитиназ, яв-

ляется одним из белков, секретируемых активными макрофагами и рассматривается как маркер стимулированных макрофагов (Kzhyshkowska and Larionova, 2020). Стимуляция полисахаридами макрофагов, воздействующих на рецепторное звено, сопровождается повышением активности лизосомных ферментов - хитотриозидазы (ХТ) и гиполипидемическим эффектом (Kzhyshkowska et al., 2007; Kzhyshkowska and Larionova, 2020).

Атеросклероз рассматривается как процесс хронического воспаления, связанный с внутриклеточным (внутрилизосомным) накоплением липидов; изучение веществ, стимулирующих макрофаги, открывает новые перспективы в лечении не только гиперлипидемии и атеросклероза, но и других болезней, связанных с накоплением патологических соединений, в том числе ишемической болезни сердца, острого ишемического инсульта, цереброваскулярной деменции, неалкогольной жировой болезни печени, остеолитических процессов, бронхиальной астмы (Di Rosa and Malaguagnera, 2016; Khawar et al., 2019). До настоящего времени роль стимуляции и депрессии макрофагов в развитии дислипидемии и атеросклероза изучена недостаточно.

Цель работы:

Исследовать влияние полисахаридов (маннанов А и В, карбоксиметилированного- β -1,3-D-гликана), стимулирующих активность макрофагов, на динамику изменений липидов в крови и тканях при экспериментальной гиперлипидемии у мышей, вызванной полксамером-407.

Задачи:

– Изучить изменения липидного спектра у мышей при острой гиперлипидемии, вызванной ингибитором липопротеинлипаз, полксамером-407;

– Выявить клеточные, биохимические изменения, связанные с формированием раннего атеросклероза при повторном введении полксамера-407;

– Оценить влияние полисахаридов, стимулирующих макрофаги, маннана *Candida albicans* серотипа А и В и карбоксиметилированного β -1,3-D-гликана, на индуцированную гиперлипидемию у мышей;

– Сравнить гиполипидемический эффект маннана с эффектом аторвастатина при экспериментальной дислипидемии.

– Исследовать влияние полисахаридов, стимулирующих макрофаги, маннана серотипа А и В и карбоксиметилированного- β -1,3-D-гликана, на активность и экспрессию хитиназ и оценить их роль при экспериментальных воздействиях на гиперлипидемию.

Научная новизна:

На моделях однократного и повторного введения полноксамера 407 показано развитие гипертриглицеридемии в сыворотке крови как одного из ведущих факторов развития атеросклероза.

При экспериментальной дислипидемии у мышей впервые выявлено, что гипополипидемический эффект полисахаридов – карбоксиметилированного- β -1,3-D гликана, маннана А и В, сравним с гипополипидемическим эффектом аторвастатина, что может использоваться в качестве нового перспективного подхода к терапии снижения липидов.

В результате исследования активности лизосомного фермента хитотриозидазы и экспрессии генов хитиназ *Chit1* и *Chia1* при экспериментальной гиперлипидемии у мышей и влиянии на нее стимуляторов макрофагов маннанов и карбоксиметилированного- β -1,3-D-гликана, впервые продемонстрировано увеличение обоих показателей, что позволяет оценить роль ХТ как маркера стимулированных макрофагов и использовать этот показатель в качестве диагностического при многих заболеваниях, связанных с накоплением патологических соединений и тканевым воспалением.

Практическая значимость работы:

Поиск новых гипополипидемических соединений важен для клинической медицины, особенно в случаях, когда возможно преодолеть ограничения применения существующих лекарственных средств. Среди разрабатываемых лекарственных соединений в этой области ведущее значение имеют вещества, влияющие на снижение атерогенных липидов ХС, ТГ, ЛПНП (Barter, Rye 2016). Терапия статинами, наиболее широко используемая для лечения атеросклероза и дислипидемии, имеет побочные эффекты, такие как миопатии, липидоз печени, что ограничивает их применение (Simic, Reiner 2015).

Полисахариды маннан А и В, карбоксиметилированный- β -1,3-D-гликан, обладающие стимулирующим действием на функциональную активность макрофагов, взаимодействуя с их рецепторами, вы-

зывают гиполипидемический эффект, при экспериментальной гиперлипидемии у мышей, сравнимый с гиполипидемическим эффектом аторвастатина, что открывает новый подход к терапии снижения липидов.

Повышение активности хитотриозидазы и одновременное увеличение экспрессии генов хитиназ *Chit1* и *Chia1*, в условиях воздействия на экспериментальную гиперлипидемию стимуляторов макрофагов, открывает перспективу использования этого фермента для диагностики атеросклероза и лизосомных болезней накопления.

Положения, выносимые на защиту:

– Однократное введение мышам ингибитора липопротеинлипаз P-407 индуцирует острую гиперлипидемию и может использоваться для исследования гиполипидемического эффекта различных веществ, в том числе полисахаридов маннана А и В, карбоксиметилированного- β -1,3-D-гликана.

– При повторном введении ингибитора липопротеинлипаз P-407 у мышей развивается гиперлипидемия, длительное воздействие которой способствует развитию атеросклероза.

– Стимуляторы макрофагов полисахариды маннан А и В, карбоксиметилированный- β -1,3-D-гликан оказывают защитный гиполипидемический эффект, сравнимый с гиполипидемическим эффектом статинов (аторвастатина), при гиперлипидемии, вызванной полксамером 407.

– Активность хитотриозидазы ХТ и кислой хитиназы АМК, а также экспрессия генов этих ферментов *Chit1* и *Chia1* повышаются при стимуляции макрофагов полисахаридами (маннаном А, В и карбоксиметилированным- β -1,3-D-гликаном), в условиях экспериментальной дислипидемии, и являются маркерами лизосомной активности макрофагов.

Апробация результатов:

Материалы диссертации были доложены:

– на VII Всероссийской научно-практической конференции «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» Новосибирск, 2015.

– 20th European Study Group on Lysosomal Diseases (ESGLD) Workshop and Graduated Course. 30th September–4th, October 2015, Pozzuoli (Naples), Italy. 2015.

- 20th World Congress on Heart Disease, Vancouver, Canada, 2015.
- 21st World Congress on Heart Disease» Boston, USA, 2016.
- 21st ESGLD Workshop and Graduate Course, Sept. 14-16, 2017 Lyon, France. 2017
- 22nd World Congress on Heart Disease, Vancouver, Canada, 2017
- 3rd Conference on Neurovascular and Neurodegenerative Disease (virtual), Paris-France, Nov. 08-09, 2021

Публикации:

По теме диссертации опубликовано 12 работ в отечественных и зарубежных журналах, входящих в перечень ВАК и 10 абстрактов, входящих в материалы Российских и зарубежных научно-практических конференций.

Объем и структура диссертации:

Диссертация изложена на 139 страницах, содержит 37 рисунков и 11 таблиц, включает главы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, заключение, обсуждение результатов, выводы, список литературы, который состоит из 310 источников.

Личный вклад автора:

Автор принимала участие в проведении экспериментов, выполняла исследования уровня биохимических показателей в сыворотке крови мышей: ХС, ТГ, ЛПНП, общего белка, глюкозы, активности ферментов: аланинаминотрансферазы АЛТ, хитотриозидазы ХТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена в лаборатории клеточной биохимии и физиологии ФБГУ «НИИ ФФМ» (НИИНМ).

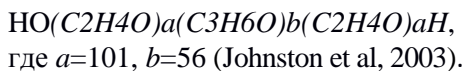
Лабораторные животные: Объектом исследования были самцы мышей СВА и С57В1/6 массой 22–25 г, возраста 2,5–3 месяца.

Эксперименты проводили с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского Сообщества (86/609/ЕС); содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных», опубликованным в 2011 году Национальной академией наук США, и прото-

колу лечения (протокол животных № 9). Эксперименты *in vivo* проводили в соответствии с Рекомендациями Комитета по этике НИИ-ИНМ, относящимся к исследованиям с участием лабораторных животных.

Исследование пролиферации перитонеальных макрофагов и образования оксида азота *in vitro*: Перитонеальные макрофаги выделяли у самцов мышей CBA/Lac в возрасте от 10 до 12 недель для количественной оценки пролиферации макрофагов в отсутствие и присутствии (0, 10, 50, 250 и 500 мкг/мл) маннанов А и В. Абсорбцию определяли спектрофотометрически при 570 нм на микропланшетном ридере StatFax 2100 (Палм Сити, Флорида, США). Продукцию оксида азота (NO) определяли количественно с использованием реакции Грисса после сбора культурального супернатанта перитонеальных макрофагов и инкубации либо с маннаном А, либо с маннаном В (0, 10, 50, 250 и 500 мкг / мл), или LPS (1 и 10 мг / мл) (положительный контроль) в течение 24 часов. Содержание NO рассчитывали с использованием линейного регрессионного анализа методом наименьших квадратов. *Выполнено совместно со ст.н.с. НИИ туберкулеза, к.м.н. Лыковым А.П.*

Модель гиперлипидемии и гиполипидемическая терапия у мышей: Гиперлипидемию у мышей воспроизводили с помощью полоксамера-407 (Pluronic F-127 Sigma, USA). P-407 – полимер неионного происхождения, блок-сополимеров – полиоксиэтилен-полиоксипропилен (молекулярная масса: 9840-14600) с общей формулой:



Острую гиперлипидемию воспроизводили с помощью однократного введения P-407 в дозах: 125, 250, 300 мг/кг внутрибрюшинно, животных умерщвляли через 24 ч (максимальное развитие гиперлипидемии), 48 ч (восстановление показателей).

Дислипидемию, как модель раннего атеросклероза, воспроизводили с помощью повторных введений P-407 дважды в неделю, в дозе 300 мг/кг в течение 30 суток. Животных умерщвляли через 24 ч, после последней инъекции препарата (выраженная гиперлипидемия), 4 и 10 сут (нормализация показателей). Перед умерщвлением животные голодали в течение 14 ч, потребление воды не ограничи-

вали. **Контрольной** группе мышей вводили соответствующий объем физиологического раствора (0,25 мл).

Для стимуляции макрофагов использовали:

1) Карбоксиметилированный- β -1,3-D-гликан (КМГ, Институт химии Словацкой АН, Братислава, Словакия) вводили двукратно внутрибрюшинно в дозе 25 мг/кг массы тела животных за 72 и 24 часа до введения Р-407.

2) Маннан вводили животным предварительно до Р-407 (за 24 ч) внутрибрюшинно; в дозах – первой группе 50 мг/кг пятикратно с интервалом 1 день и второй группе - в дозе 100 мг /кг дважды с интервалом 1 день. Использовали штаммы дрожжей *Candida albicans* серотипа А (ССУ 29-3-100) и *C. albicans* серотипа В (ССУ 29-3-103) из Культурной коллекции дрожжей (ССУ; Институт химии Словацкой академии наук, Братислава, Словакия).

3) Для сравнения гиполипидемического эффекта отдельной группе мышей вводили аторвастатин в растворе крахмала (75 мг/кг) (Atoris; KRKA, Новоместо, Словения) через желудочный зонд за 24 и 48 ч перед инъекцией Р-407. *Автор благодарит профессора Шандулу Й. (Институт химии Словацкой АН), за предоставление маннанов и гликана, использованных в исследовании.*

Исследования липидного спектра, уровня общего белка, глюкозы, активности АЛТ в сыворотке крови мышей

После декапитации кровь собирали в пробирки, центрифугировали при 3000 g 15 мин. в центрифуге Eppendorf 5415 R, Германия.

Концентрацию ХС и ТГ, общего белка, глюкозы, активности АЛТ в сыворотке крови мышей определяли на автоматическом биохимическом анализаторе Architect С 8000 (Abbot, США), с использованием соответствующих наборов и системного калибратора (Abbot). Концентрацию ЛПНП – с помощью наборов Biosystems (Коста Брава, Испания) на биохимическом анализаторе Labio 200 (КНР), в ммоль/л. Для контроля правильности перед постановкой анализов использовали контрольную сыворотку «Lipocheck» 1 и 2 уровня (Bio Rad).

Для оценки состояния **повреждаемости мембран лизосом** определяли свободную активность лизосомного фермента β -галактозидазы. Для разрушения клеток применяли тритон X-100, конечная концентрация в пробе 0,1 %.

Для экстракции **триглицеридов печени** образцы гомогенизировали в 1 мл 5 % Nonidet P-40, пробы инкубировали в течение 5 минут при 90 °С, охлаждали, повторяя нагрев/охлаждение. Гомогенат центрифугировали для получения супернатанта. На 96-луночный планшет наносили в дублях по 10 мкл бидистиллированной воды (бланк), 5 % Nonidet P-40 (негативный контроль), калибратор (2,29 ммоль/л = 200 мг/100 мл), подготовленные образцы. Добавляли по 150 мкл рабочего реагента (Ольвекс Диагностикум, Триглицериды), инкубировали при помешивании в планшетном шейкере 15 минут при комнатной температуре, измеряли оптическую плотность при длине волны 530 нм, с использованием мультимодального планшетного ридера TriStar, Berthold Inc., Germany. Концентрацию ТГ рассчитали по калибратору на 1 грамм ткани. *Выполнено совместно со ст.н.с. ФИЦ ФТМ, к.б.н. Храповой М.В.*

Морфологические исследования печени мышей

Для электронномикроскопического исследования образцы ткани печени фиксировали в смеси 2 % параформальдегида и 2,5 % глутаральдегида на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4), дофиксировали в 1 % растворе четырехокси осмия и заключали в эпон-аралдит (Serva, Гейдельберг, Германия). Ультроструктурные изменения в клетках печени изучали с помощью электронного микроскопа JEM-1400 (Япония) при увеличении $\times 20000$. Измерения клеток проводили с помощью программы Motic Images 2000. *Выполнено совместно с проф. НИИ лимфологи, д.б.н. Бгатовой Н.П.*

Световая микроскопия ткани печени и сердца. Образцы фиксировали 10 % нейтральным буферным формалином и готовили с помощью ротационного микротома MICROM HM 340E (Carl Zeiss, Германия). Помещали в гистопласт, и поперечные срезы тканей размером 4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Срезы исследовали при помощи световой микроскопии на микроскопе Axioscop 40 (Carl Zeiss, Германия). Оценивали запасы липидов печени: образцы обезвоживали, заливали полиэтиленгликолем-1500, срезы окрашивали Суданом III и гематоксилином.

Систолическое и диастолическое **артериальное давление** у мышей определяли совместно со ст.н.с. НИИ ФФМ, д.м.н. Спиридоновым В.К. с помощью многоканальной компьютеризированной неинвазивной системы артериального давления для мышей и крыс

(CODA, Kent Scientific Corporation, Торрингтон, Коннектикут США).

Активность цистеиновой протеазы-**катепсина В** в ткани сердца и печени определяли спектрофотометрическим методом (Wiederanders, Oelke 1984).

Активность хитотриозидазы определяли по методу Guo et al. (1995), с использованием флуоресцентного субстрата 4-МУФ-β-D-N-N²-триацетилхитотриозид (Sigma, USA), где МУФ – метилумбеллиферил, при pH 5,2. Уровень флуоресценции оценивали с помощью флуоресцентного спектрофотометра Shimadzu RF-5301 (PC)S (Япония) при длине волны возбуждения 360 нм и эмиссии 445 нм. В качестве стандарта использовали 4-метилумбеллиферон (Sigma, USA). Для контроля специфичности реакции использовали ингибитор хитиназ аллозамидин (GlycoFineChem, MIR Biotech, Czech Republic). Активность ХТ в сыворотке крови выражена в нмоль МУФ/(мл/час).

Изучение экспрессии генов хитиназ методом ОТ-ПЦР в реальном времени. РНК выделяли из печени мышей (для сравнения относительной экспрессии исследуемых генов, РНК выделяли из желудка, языка, легких, кишечника и коры головного мозга мышей) с использованием набора RNeasy Plus (Qiagen, Hilden, Germany), включающего обработку ДНКазой, для удаления геномной ДНК. Концентрацию и чистоту выделенной РНК измеряли с использованием NanoPhotometer P-Class (Имплен, Мюнхен, Германия). Из 1 мкг общей РНК синтезировали кДНК с использованием набора ABI High Capacity RNA to cDNA в соответствии с протоколом произво-

Ген	Прямой	Обратный	Размер, б.п
<i>Chia1</i>	5'-TCCTGGTGAAGGAAATGCG-3'	5'-AAATCCCACCAGCTACAGCA-3'	96
<i>Chit1</i>	5'-TCAGACAATGGAGTTGGG-3'	5'-TTCCAGGAGCAGGCCTCATA-3'	101
<i>Gapdh</i>	5'-GCTCCTCCCTGTTCAGAGAC-3'	5'-CCAATACGGCCAAATCCGTCA-3'	103
<i>β-Actin</i>	5'-TTCTACAATGAGCTGCGTGTG-3'	5'-GGGGTGTGTAAGGTCTCAA-3'	121

ПЦР проводили в реальном времени в объеме 25 мкл на приборе CFX96 (Bio-Rad, Hercules, Калифорния, США) с использованием

набора реактивов HS-qPCR Mix SYBR Green (Биосан, Новосибирск, Россия). Относительная экспрессия генов-мишеней рассчитали по формуле $2^{-\Delta\Delta Ct}$ согласно (Livak и Schmittgen, 2001). *Выполнено совместно со ст.н.с. ФИЦ ФТМ, к.б.н. Шинтяпиной А.В.*

Статистическая обработка данных. Полученные данные обрабатывали непараметрическими методами: ранговой ANOVA Крускала-Уоллиса, критерием Вилкоксона–Манна–Уитни для межгрупповых сравнений и корреляционным анализом Спирмена. Вычисления проводились в среде программы Statistica 6.0. За достоверные принимали различия сравниваемых средних при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние полисахаридов на изолированные перитонеальные мышинные макрофаги *in vitro*.

In vitro липополисахариды и маннан серотипа А и В, индуцировали увеличение пролиферации макрофагов и продукции NO ($p < 0,01$) (рис. 1) относительно базального уровня. Показано увеличение продукции NO при оценке КМГ ($p < 0,001$) (рис. 1) в культуре клеток макрофагов.

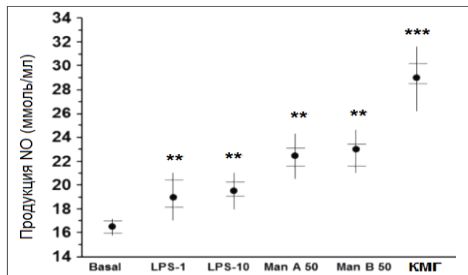


Рис. 1. Влияние маннана серотипа А и В и КМГ на пролиферацию макрофагов мыши и продукцию NO *in vitro*. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Характеристика модели острой дислипидемии

Однократное введение Р-407 в дозе 250 мг/кг (спустя 24 ч) характеризуется значительным ($p < 0,001$) увеличением концентрации липидов: ХС, ТГ и ЛПНП; и снижением ЛПВП в сыворотке крови мышей (рис. 2).

Введение Р-407 в дозе 125 мг/кг вызывало аналогичные, менее выраженные изменения (дозозависимый эффект) (рис. 2).

P-407 ингибирует липопротеинлипазу, что приводит к нарушению деградации липидов и их накоплению в макрофагах, с развитием дислипидемии.

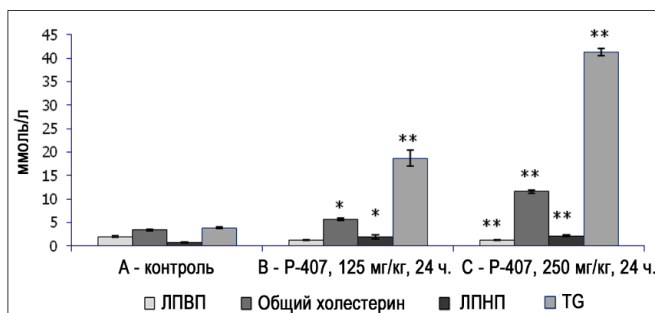


Рис. 2. Липидный профиль сыворотки крови мышей с острой гиперлипидемией, вызванной различными дозами P-407, ммоль/л (сред. \pm SD). * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$ в сравнении с контролем.

Характеристика модели дислипидемии при повторном введении полксамера-407

Повторное введение мышам P-407 (300 мг/кг в течение 1 месяца дважды в неделю) вызывало увеличение концентрации общего ХС ($p < 0.001$), ЛПНП ($p < 0.001$) и, особенно, ТГ ($p < 0.001$) спустя 24 ч после прекращения введения P-407 (рис. 3). В последующем, спустя 4 сут происходила нормализация этих показателей, за исключением повышенной концентрации ТГ ($p < 0.05$), которая нормализовалась через 10 сут (рис. 3).

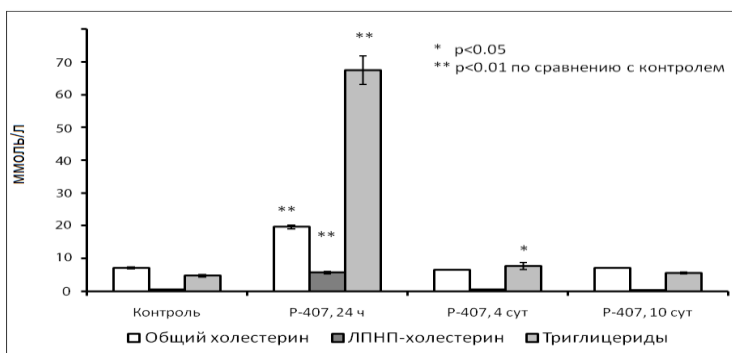


Рис. 3. Липиды сыворотки крови мышей при повторном ведении P-407

Введение животным Р-407 повторно проводили для изучения формирования раннего атеросклероза у мышей. Оценивали повышение атерогенных липидов, активность функциональных проб печени (АЛТ), артериальное давление, активность катепсина В в ткани сердца, морфологические изменения в кардиомиоцитах и гепатоцитах.

Влияние повторного введения поллоксамера-407 на уровень белка, глюкозы, активность АЛТ в сыворотке крови мышей

Уровень общего белка сыворотки ($p < 0,01$), активность АЛТ ($p < 0,05$) повышены по сравнению с контролем через 24 часа после прекращения повторного воздействия Р-407 (1 мес). Нормализация показателей через 4 дня. Концентрация глюкозы в сыворотке ($p < 0,05$) снижена через 4 дня после последнего введения Р-407.

Повышение активности АЛТ отражает повреждение печени, связанное с накоплением липидов.

Влияние повторного введения поллоксамера-407 на артериальное давление у мышей

Наблюдалась тенденция к повышению как систолического, так и диастолического артериального давления у мышей по сравнению с контрольной группой, получавшей изотонический раствор (рис. 4). Это является признаком функциональных изменений сердечно-сосудистой системы у мышей после повторного введения Р-407.

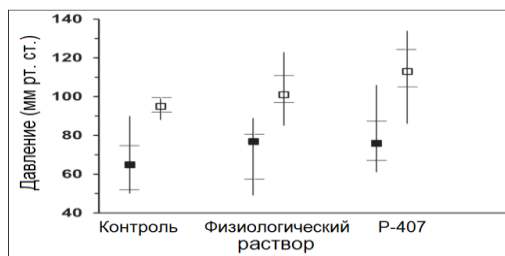


Рис. 4. Артериальное давление мышей при повторном введении Р-407. Незаштрихованный квадрат – систолическое; заштрихованный – диастолическое артериальное давление.

Степень стабильности лизосомальной мембраны

Лизосомы печени, исследованные через 24 часа после последней инъекции Р-407, показали значительное ($p < 0,05$) увеличение сво-

бодной активности β -галактозидазы (рис. 5 А), а также ($p < 0,01$) увеличение их повреждаемости к гипоосмотическому воздействию *in vitro* при использовании 0,125 М сахарозы (рис. 5 В). Это отражает увеличение повреждаемости лизосом клеток печени.

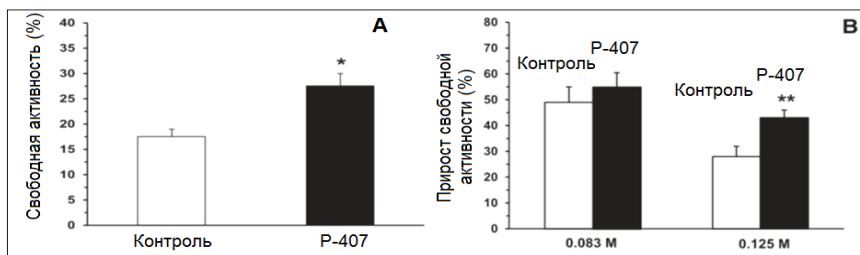


Рис. 5. Активность β -галактозидазы при повторной гиперлипидемии, вызванной P-407. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ в сравнении с контролем

Активность катепсина В в ткани сердца

Активность катепсина В в сердечной ткани повышена ($p < 0,01$) по сравнению с контролем через 24 ч после окончания повторного введения P-407; нормализация показателя отмечена к 4 дню (контроль 1.4 ± 0.05 ; опыт 2.0 ± 0.06 мкмоль МСА/мин/г белка). Это отражает повышение протеолитической активности в органе.

Световая микроскопия клеток печени и сердца

В клетках печени мышей, полученных через 24 ч после прекращения введения P-407 (1 мес.), выявлено, что гепатоциты увеличены в размерах и их цитоплазма выглядит «пенистой» (рис. 6-1 А и В).

Многочисленные макрофаги содержали «пенистое» вещество, что наблюдали в увеличенных синусоидах и в перипортальных зонах (рис. 6-1 В). Повреждение печени у мышей, получавших P-407, характеризовалось накоплением липидов в клетках печени (особенно в макрофагах), дисккомплексированием клеток печени и повышенным холестазом (рис. 6-1 А, В).

Изменения ткани сердца, наблюдаемые у мышей, получавших P-407, состояли в основном из повреждения кардиомиоцитов сократительного типа, что типично для липидоза (рис. 6-2 А). Отметили набухание мышечного слоя внутри мембранных сосудов, прилипание фибрина и эритроцитов к просветной стенке сосудов (рис. 6-2 В).

Поражения сердца и печени при повторном введении Р-407 характеризовались светооптическими изменениями клеток, а также повышением активности катепсина В (в сердце) и увеличением активности β -галактозидазы (в печени). Данные изменения характеризовали нарушения, связанные с атерогенным каскадом, сформировавшимся при длительной экспериментальной гиперлипидемии.

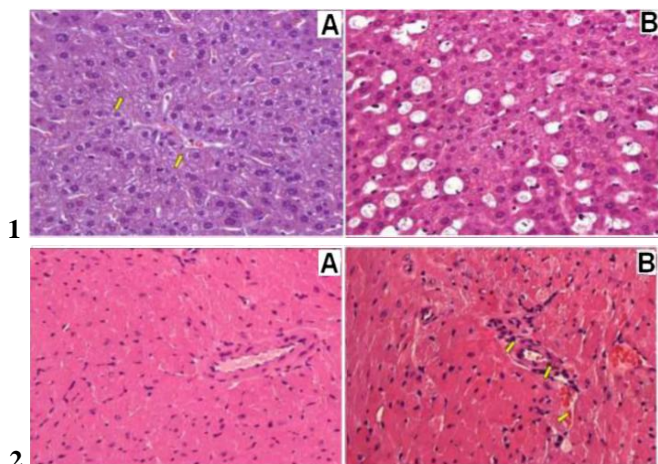


Рис. 6. Характеристика поражений печени (1) и сердца (2) мышей при развитии раннего атеросклероза (Р-407).

(А) — контроль; (В) — Р-407 (модель повторного введения)

Гиполипидемическое действие β -гликана. Изменения хитотриозидазы в сыворотке крови мышей при экспериментальной гиперлипидемии и воздействии на нее карбоксиметилированного- β -гликана.

Предварительное введение КМГ мышам с острой гиперлипидемией снижало концентрацию ХС ($p < 0.01$) и ТГ ($p < 0.01$) по сравнению с изолированным введением Р-407 (рис. 7а).

Показано увеличение активности ХТ в сыворотке крови мышей при воздействии КМГ и при введении Р-407 интактным мышам (рис. 7б). При сочетанном воздействии КМГ + Р-407 активность ХТ нормализуется (рис. 7б). Обнаружена однонаправленность повышения активности ХТ и уровня ХС, ТГ (рис. 7а, б).

Показано, что острая гиперлипидемия, вызываемая Р-407, характеризуется не только резким увеличением липидов крови, но и повышением активности ХТ за счет стимуляции макрофагов при перегрузке липидным материалом.

Впервые обнаружено, что предварительное парентеральное введение β -гликана мышам оказывает выраженный гиполипидемический эффект и одновременно нормализует повышенный при острой гиперлипидемии уровень ХТ сыворотки крови.

Повторное введение мышам Р-407 характеризовалось аналогичными однократному введению изменениями липидного профиля в сыворотке крови мышей и снижением активности ХТ при нормализации концентрации ХС и ТГ спустя 4 и 10 суток.

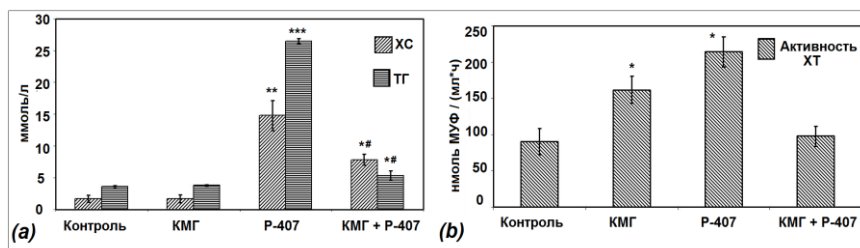


Рис. 7. (а) — Концентрация ХС и ТГ при воздействии КМГ на мышей и при острой гиперлипидемии, вызванной Р-407; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ в сравнении с контролем; # $p < 0.01$ в сравнении с Р-407.

(б) — активность ХТ в сыворотке крови при воздействии КМГ на мышей при острой гиперлипидемии, вызванной Р-407; * $p < 0.05$ в сравнении с контролем.

Сравнение гиполипидемических эффектов полисахарида маннана *Candida albicans* серотипа А и аторвастатина у мышей при экспериментальной гиперлипидемии

Введение интактным мышам аторвастатина и маннана А не приводило к изменениям ХС, ЛПНП; маннан вызывал снижение уровня ТГ ($p < 0,05$) в сыворотке по сравнению с контролем (рис. 8б).

Введение Р-407 вызывало значительное ($p < 0,001$) повышение ХС, ЛПНП и ТГ в сыворотке крови (рис. 8а, 8б, 8в).

Выявили, что предварительное введение маннана и аторвастатина мышам с индуцированной Р-407 гиперлипидемией привело к значительному ($p < 0,001$) снижению липидов сыворотки крови мышей

(рис. 8а, 8б, 8в). Гиполипидемический эффект предварительного введения маннана, сравним с гиполипидемическим эффектом аторвастатина (рис. 8а, 8б, 8в).

Влияние предварительного введения маннана 2-кратно в более высокой дозе (100 мг/кг) на индуцированную гиперлипидемию менее эффективно, чем 5-кратно в дозе 50 мг/кг (рис. 8а, 8б, 8в). Выявили, что наиболее выраженный эффект ПС оказывал на ЛПНП (в дозе 50 мг/кг) (рис. 8б). Наименее выраженный защитный эффект маннан и аторвастатин оказывали на ХС, наиболее выраженный - на ЛПНП и ТГ (рис. 8а, 8б, 8в).

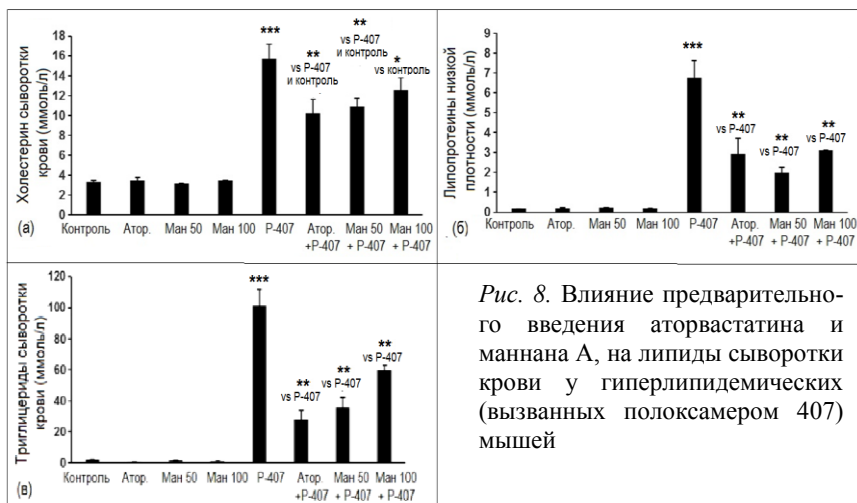


Рис. 8. Влияние предварительного введения аторвастатина и маннана А, на липиды сыворотки крови у гиперлипидемических (вызванных поллоксамером 407) мышей

* $p < 0.05$ по сравнению с P-407; ** $p < 0,01$ по сравнению с P-407 и контролем; *** $p < 0.001$ по сравнению с контролем.

Влияние маннана на уровень триглицеридов в печени

Отмечено снижение содержания ТГ печени по сравнению с контролем после введения аторвастатина и маннана (рис. 9). Показан защитный эффект предварительного введения маннана и аторвастатина на гиперлипидемию, вызванную P-407, по сравнению с мышами, получавшими только P-407 (рис. 9).

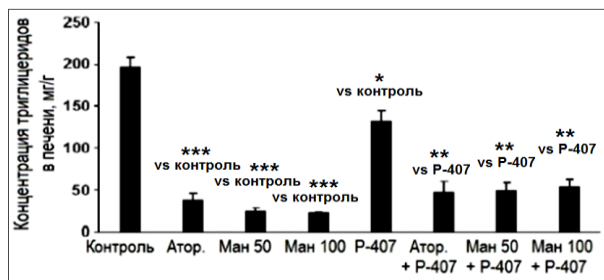


Рис. 9. Влияние предварительного введения аторвастатина и маннана А на уровень ТГ в печени у гиперлипидемических (индуцированных полоксамером 407) мышей. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ** $p < 0,001$ по сравнению с контролем; *** $p < 0,01$ по сравнению с P-407.

Влияние маннана на активность хитотриозидазы сыворотки крови мышей

Введение аторвастатина и высоких доз маннана интактным мышам не оказывало влияния на активность ХТ по сравнению с контрольной группой (рис. 10). Выявлено увеличение активности ХТ в сыворотке мышей после введения P-407 ($p < 0,05$) (рис. 10), сочетанного введения аторвастатина и P-407 ($p < 0,01$) (рис. 10) и сочетанного введения P-407 и маннана в низкой ($p < 0,001$) и в высокой дозе ($p < 0,05$) (рис. 10).

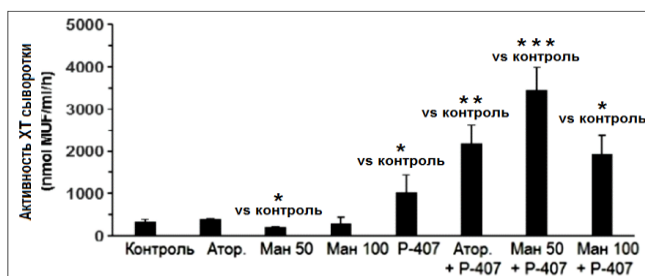


Рис. 10. Влияние предварительного введения аторвастатина и маннана А на активность ХТ у гиперлипидемических (индуцированных полоксамером 407) мышей. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ в сравнении с контролем.

Исследование экспрессии хитиназ мышей

В табл. 3 приведена относительная экспрессия *Chit1* и *Chia1* в различных органах мыши. Показано увеличение средних значений

кратного изменения печеночной экспрессии *Chit1* и *Chia1* после введения Р-407, маннана и сочетанного воздействия Р-407 и маннана по сравнению с контролем, табл. 4.

Таблица 3. Относительная количественная оценка уровней мРНК *Chit1* и *Chia1*, нормализованных с помощью *GAPDH* и *бета-актина*, в отдельных тканях мыши

Орган	<i>Chit1</i> (%)	<i>Chia1</i> (%)
Желудок	70±0.36 ^b	9.156±3.4
Язык	100±5.5	4.1±0.02
Легкие	2.0±0.03	100±1.6
Кишечник	0.6±0.11	0.1±0.01
Печень	2.4±0.12	0.8±0.02
Мозг	2.2±0.12	3.0±0.01

Таблица 4. Влияние маннана А на экспрессию генов *Chit1* и *Chia1* в печени мышей с гиперлипидемией, вызванной Р-407

Группа	<i>Chit1</i> /Кратность изменений	<i>Chia1</i> /Кратность изменений
Контроль	1.00±0.575 ^c	1.00±0.258
Р-407 (1 h) ^a	1.68±0.145	1.63±0.736
Р-407 (24 h)	0.87±0.665	2.01±1.255
Маннан (24 h)	3.87±1.910 ^d	3.97±0.424 ^d
Маннан + Р-407 (24 h)	6.08±2.561 ^{d,f}	2.66±1.234 ^e

Количество мышей в каждой группе 4–5.

Chia1 хитиназа кислая 1; *Chit1* хитиназа 1 (хитотриозидаза).

Электронно-микроскопическое исследование печени мышей

Выявлено значительное ($p < 0,001$) уменьшение объема и числа липидных капель в печени мышей с гиперлипидемией после предварительного введения маннана (рис. 11; рис. 12(1) А, В, С).

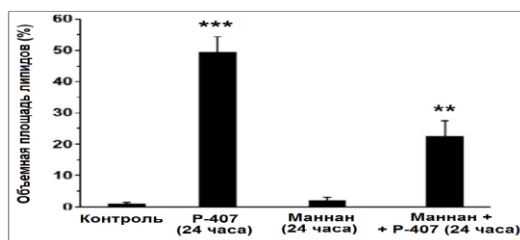


Рис. 11. Объем липидных капель в клетках печени мышей при экспериментальной гиперлипидемии и при предварительном введении маннана.

После введения Р-407 наблюдали появление липидных капель в гепатоцитах (рис. 12(1) В) и макрофагах (рис. 12(2) В). Клетки перегружены липидным материалом, выглядят пенистыми; при предварительном введении маннана значительно уменьшились липидные капли в макрофагах печени мышей с гиперлипидемией, вызванной Р-407 (рис. 12(2) А, В, С).

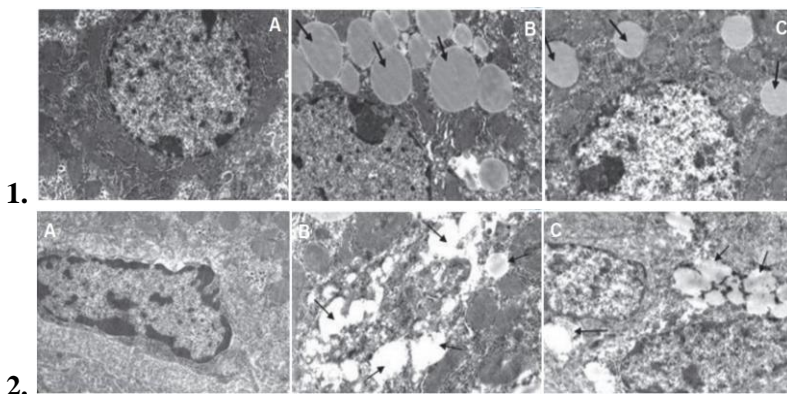


Рис. 12. Электронно-микроскопическое исследование клеток печени мышей с гиперлипидемией и при предварительном введении маннана.
(1) – гепатоциты; (2) - макрофаги. (А) Контроль; (В) Р-407; (С) Маннан + Р-407

ВЫВОДЫ

1. Однократное и повторное введение мышам ингибитора липопротеинлипаз полоксамера-407 воспроизводит модель гиперлипидемии смешанного типа с выраженной гипертриглицеридемией, и имеет важное значение в изучении формирования и терапии атеросклероза.

2. Повторное введение мышам полоксамера 407 вызывало увеличение концентрации атерогенных липидов сыворотки крови с последующим восстановлением показателей на 10 сутки. В результате воздействия гиперлипидемии (1 месяц), у мышей наблюдали изменения, связанные с развитием атеросклероза, в том числе липидоз печени и ранние признаки повреждения сердца.

3. Предварительное введение иммуномодуляторов полисахаридов: маннана А и В, карбоксиметилированного гликана оказывает выраженный гиполлипидемический эффект при острой экспериментальной гиперлипидемии, сравнимый с гиполлипидемическим эф-

фектом аторвастатина, что может рассматриваться как перспективный подход для коррекции этих нарушений.

4. Показано повышение активности макрофагального фермента лизосом хитотриозидазы в крови и одновременное увеличение экспрессии генов хитиназ *Chit1* и *Chia1* в печени при стимуляции макрофагов полисахаридами маннаном А и В и карбоксиметилированным гликаном на модели острой гиперлипидемии мышей, что подтверждает роль хитотриозидазы как маркера увеличения лизосомной активности стимулированных макрофагов.

ПЕРЕЧЕНЬ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Korolenko TA, Dubrovina NI, Ovsyukova MV, Bgatova NP, Tenditnik MV, Pupyshev AB, Akopyan AA, **Goncharova NV**, Lin CL, Zavjalov EL, Tikhonova MA, Amstislavskaya TG. Treatment with Autophagy Inducer Trehalose Alleviates Memory and Behavioral Impairments and Neuroinflammatory Brain Processes in db/db Mice. *Cells*. 2021 Sep 27;10(10):2557. doi: 10.3390/cells10102557.

2. Korolenko T.A., Johnston T.P., Shintyapina A.B., Pupyshev A.B., Korolenko E., **Goncharova N.V.** Biological functions and pathological roles of chitinases: a comparison between humans and mice. *In: Advances in Medicine and Biology*. 2019, Nova Publishers, USA. P. 179-206.

3. Korolenko T.A., Johnston T.P., Machova E., Bgatova N.P., Lykov A.P., **Goncharova N.V.**, Nescakova Z., Shintyapina A.B., Maiborodin I.V., Karmatskikh O.L. Hypolipidemic effect of mannans from *C. albicans* serotypes A and B in acute hyperlipidemia in mice. *Int J Biol Macromol*. 2018; 107 (Pt B): 2385-2394. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.111

4. Korolenko T.A., Johnston T.P., Cherkanova M.S., **Goncharova N.V.**, Vavilin V.A., Shintyapina A.V., Bgatova N.P., Kaledin V.I. Atorvastatin: Prevention and Treatment of Dislipidemia in clinical and experimental Medicine. Vol. 4. In *Advances in Health and Disease*. L.T. Duncan Editor. Nova Science Publishers, USA, 2018, pp. 106-129.

5. Korolenko T.A., Johnston T.P., Tuzikov F.V., Tuzikova N.A., Pupyshev A.B., Spiridonov V.K., **Goncharova N.V.**, Maiborodin I.V., Zhukova N.A. Early-stage atherosclerosis in poloxamer 407-induced hyperlipidemic mice: pathological features and changes in the lipid

composition of serum lipoprotein fractions and subfractions. *Lipids Health Dis.* 2016; 15: 16. doi: 10.1186/s12944-016-0186-7

6. Korolenko T., Johnston T.P., Lykov A.P., Shintyapina A.B., Khrapova M.V., **Goncharova N.V.**, Korolenko E., Bgatova N.P., Machova E., Nescakova Z., Sakhno L.V. A comparative study of the hypolipidaemic effects of a new polysaccharide, mannan *Candida albicans* serotype A, and atorvastatin in mice with poloxamer 407-induced hyperlipidaemia. *J. Pharm. Pharmacol.* 2016; 68 (12): 1516-1526. doi: 10.1111/jphp.12633

7. **Гончарова Н.В.**, Храпова М.В., Пупышев А.Б., Короленко Э.Ц., Несчакова З., Короленко Т.А. Гиполипидемический эффект маннана при острой липемии у мышей, вызываемой поллоксамером 407. *Бюл. exper. биол. и мед.* 2016; 162 (7): 24-28.

8. **Гончарова Н.В.**, Пупышев А.Б., Филюшина Е.Е., Локтев К.В., Короленко Э.Ц., Лушникова Е.Л., Молодых О.П., Короленко Т.А., Чурин Б.В. Депрессия макрофагов модифицирует липидный профиль сыворотки крови при гиперлипидемии. *Бюл. exper. биол. и мед.* 2015; 160 (11): 559-564.

9. **Гончарова Н.В.**, Шурлыгина А.В., Мельникова Е.В., Кармацких О.Л., Авроров П.А., Локтев К.В., Короленко Т.А. Клеточный состав селезенки и изменения лизосом селезенки в динамике дислипидемии, вызываемой повторным введением мышам поллоксамера 407. *Бюл. exper. биол. и мед.* 2015; 160 (7): 34-37.

10. Писарева Е.Е., Гончарова И.А., Тузиков Ф.В., **Гончарова Н.В.**, Махова Е., Короленко Т.А. Роль изменений хитотриозидазы в сыворотке крови мышей при липемии и гиполипидемическом действии карбоксиметилированного (1-3)-В-D-гликана. *Бюл. exper. биол. и мед.* 2014; 157 (5): 566-570.

Список сокращений:

ПС- полисахариды

КМГ- карбоксиметилированный- β -1,3-D-гликан

ХС - холестерин

ЛПНП - холестерин липопротеидов низкой плотности

ЛПВП - холестерин липопротеидов высокой плотности

ТГ - триглицериды

ХТ – хитотриозидаза (*chit1*),

chia1 - кислая хитиназа АМК

P-407 — поллоксамер-407

Благодарность:

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю доктору медицинских наук, профессору Короленко Татьяне Александровне за помощь на всех этапах исследования! Ведущему н.с. НИИНМ, к.б.н. Пупышеву А.Б. за помощь в исследовании ферментов и критические замечания.