



УДК 577.125:577.127.2

## ВЛИЯНИЕ АНАЛОГОВ 15-КЕТОСТЕРИНА, СОДЕРЖАЩИХ 5,6-ДИМЕТИЛГЕПТ-3-ЕН-2-ИЛЬНУЮ ЦЕПЬ ПРИ C17, НА МЕТАБОЛИЗМ ХОЛЕСТЕРИНА В КЛЕТКАХ ГЕПАТОМЫ Нер G2

© 2004 г. Е. А. Пийр\*, Н. В. Медведева\*, Н. М. Каширина\*\*, А. Я. Шевелев\*\*, А. Ю. Мишарин\*\*

\*Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119992, Москва, Погодинская ул., 10;

\*\*Институт экспериментальной кардиологии РКНПК МЗ РФ, Москва

Поступила в редакцию 03.06.2003 г. Принята к печати 03.07.2003 г.

Изучено влияние новых аналогов 3 $\beta$ -гидрокси-5 $\alpha$ -холест-8(14)-ен-15-она (15-кетостерина) (I): 3 $\beta$ -гидрокси-(24S)-метил-5 $\alpha$ -холеста-8(14),22-диен-15-она (II), 3 $\alpha$ -гидрокси-(24S)-метил-5 $\alpha$ -холеста-8(14),22-диен-15-она (III) и (24S)-метил-5 $\alpha$ -холеста-8(14),22-диен-3,15-диола (IV) на метаболизм холестерина в клетках гепатомы Нер G2. Соединения (I) и (II) одинаково эффективно подавляли биосинтез холестерина при 3-часовой инкубации, однако соединение (II) проявляло более сильный ингибиторный эффект при 24-часовой инкубации, или при инкубации клеток, предварительно обработанных ингибитором, в среде без кетостерина. Способность кетостероинов подавлять биосинтез холестерина убывала в ряду (II) > (IV) > (III). Кетостерин (II) подавлял, а кетостерин (III) стимулировал биосинтез холестероловых эфиров; кетостерин (IV) стимулировал биосинтез холестероловых эфиров в концентрации 1–10 мкМ и не оказывал заметного эффекта в концентрации 30 мкМ. Полученные результаты продемонстрировали, что  $\Delta$ 8(14)-15-кетостерины, содержащие модифицированную боковую цепь, представляют интерес в качестве регуляторов метаболизма холестерина в клетках печени.

*Ключевые слова:* оксистерины, ингибиторы биосинтеза холестерина, метаболизм холестерина, клетки гепатомы Нер G2.

### ВВЕДЕНИЕ

Синтетические  $\Delta$ 8(14)-15-кетостерины – важные регуляторы липидного метаболизма, подавляющие биосинтез холестерина и обладающие гипохолестеринемическим эффектом *in vivo* [1]. В работах Шрепфера и соавт. [2–4] было установлено, что способность  $\Delta$ 8(14)-15-кетостероидов ингибировать биосинтез холестерина в клетках печени в 20–40 раз слабее, чем в других типах клеток. Ранее, на примере взаимодействия 3 $\beta$ -(2-гидроксиэтокси)-5 $\alpha$ -холест-8(14)-ен-15-она с клетками Нер G2, мы показали [5], что сравнительно слабое ингибирование биосинтеза холестерина этим соединением обусловлено быстрой деградацией его боковой цепи и образованием 3 $\beta$ -(2-гидроксиэтокси)-15-кето-5 $\alpha$ -хол-8(14)-ен-24-овой кислоты, секретлируемой в культуральную среду, и что подавление биосинтеза холестерина 15-оксигенированными стеринами в клетках Нер G2 коррелирует с внутриклеточной концентрацией ингибитора.

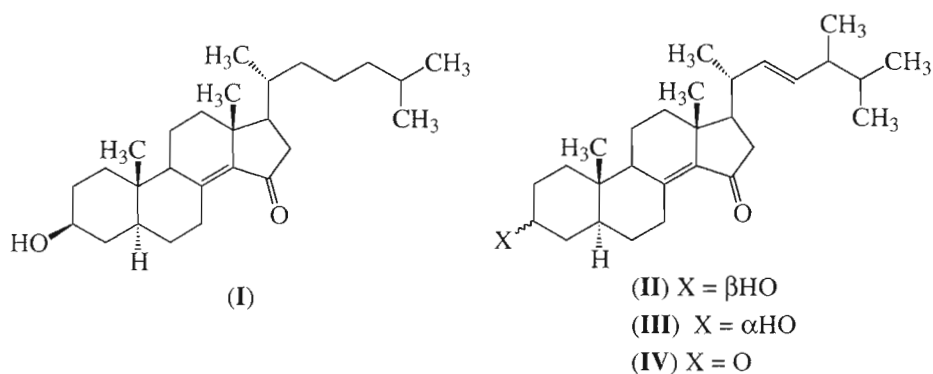
Разумно считать, что  $\Delta$ 8(14)-15-кетостерины с модифицированной боковой цепью, устойчивой к метаболической деградации в клетках печени, должны представлять интерес как регуляторы метаболизма холестерина. На основании работ [6–9] мы предположили, что такими свойствами могут обладать аналоги 15-кетостерина с цепью при C17, содержащей алкильный заместитель при C24 и двойную связь при C22, и осуществили синтез новых аналогов 15-кетостерина: 3 $\beta$ -гидрокси-(24S)-метил-5 $\alpha$ -холеста-8(14),22-диен-15-она (II), 3 $\alpha$ -гидрокси-(24S)-метил-5 $\alpha$ -холеста-8(14),22-диен-15-она (III) и (24S)-метил-5 $\alpha$ -холеста-8(14),22-диен-3,15-диола (IV) [10]. Цель данной работы – исследование новых соединений (II)–(IV) в качестве регуляторов биосинтеза холестерина и холестероловых эфиров в клетках гепатомы человека линии Нер G2 – стандартной клеточной модели для изучения регуляции метаболизма липидов в печени человека.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кетостерин (I) и его аналог (II), содержащий 5,6-диметилгепт-3-ен-2-ильную цепь при C17, эффективно подавляли биосинтез холестерина в клетках Нер G2, однако ингибирующий эффект

Сокращения: LPDS – липопротендефицитная сыворотка (плазмы крови человека); FCS – эмбриональная сыворотка теленка; PBS – фосфатсодержащий физиологический раствор; АСАТ – ацил-СоА:холестерин-ацилтрансфераза.

# Автор для переписки (тел.: (095) 246-33-75; эл. почта: misharin@ibmh.msk.su).

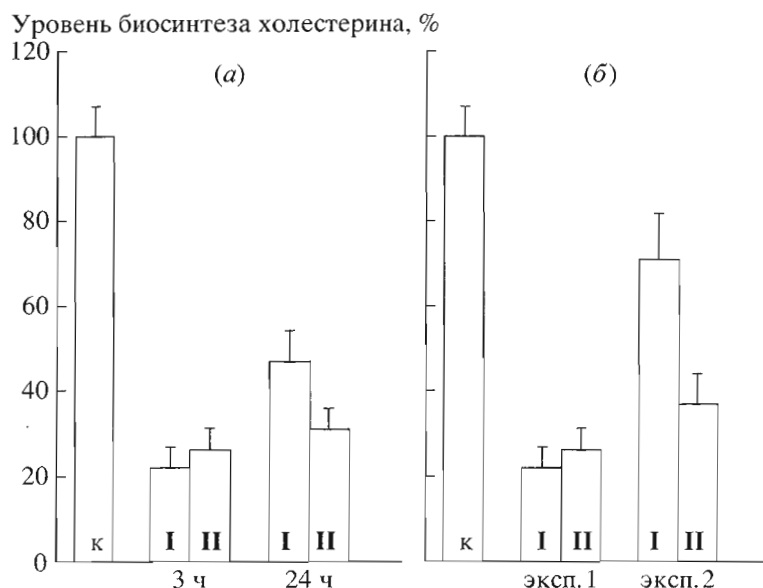


соединений сильно различался в зависимости от условий (рис. 1). На рис. 1а показан уровень биосинтеза холестерина в клетках Нер G2, инкубированных 3 и 24 ч с соединениями (I) и (II) при концентрации 20 мкМ в среде, содержащей 10% LPDS. На рис. 1б приведены результаты двух экспериментов, демонстрирующие различное влияние соединений (I) и (II) на биосинтез холестерина в клетках Нер G2 в зависимости от условий инкубации. В первом эксперименте измерялся уровень биосинтеза холестерина в присутствии 20 мкМ растворов соединений (I) и (II) в среде, содержащей 10% LPDS. Во втором эксперименте – предынкубированные с соединениями (I) и (II) клетки дополнительно выдерживали 3 ч в среде, содержащей 10% LPDS в отсутствие кетостероидов.

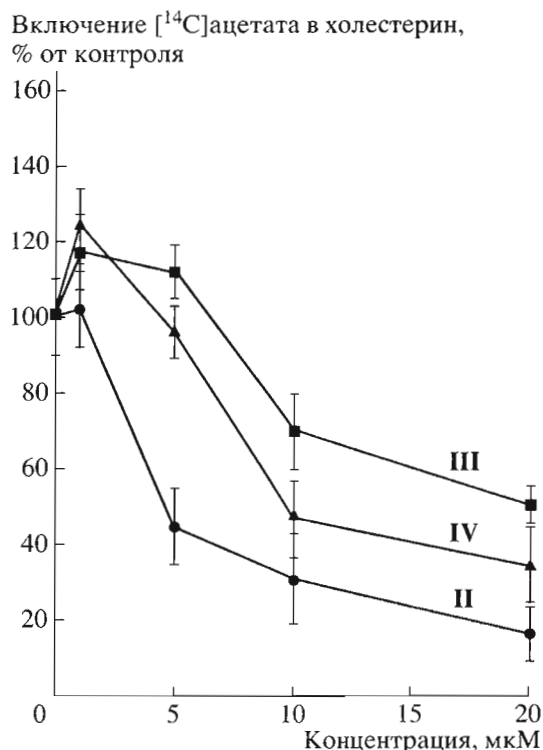
Ранее мы показали, что кетостерин (I) и его 3-замещенные аналоги в клетках Нер G2 сильнее подавляют биосинтез холестерина при инкубации

в течение 3 ч, чем в течение 24 ч [11]. Было установлено также, что выдерживание клеток, предынкубированных с кетостеринами в среде с 10% LPDS, приводит к резкому снижению внутриклеточной концентрации ингибитора и восстановлению уровня биосинтеза холестерина в клетках [5]. Из рис. 1 следует, что ингибирующий эффект кетостерина (II) меньше зависит от инкубации в среде без кетостерина, чем эффект кетостерина (I). Это свидетельствует в пользу предположения о том, что модификация боковой цепи 15-кетостерина может влиять на его биологическую активность и скорость катаболизма в клетках печени.

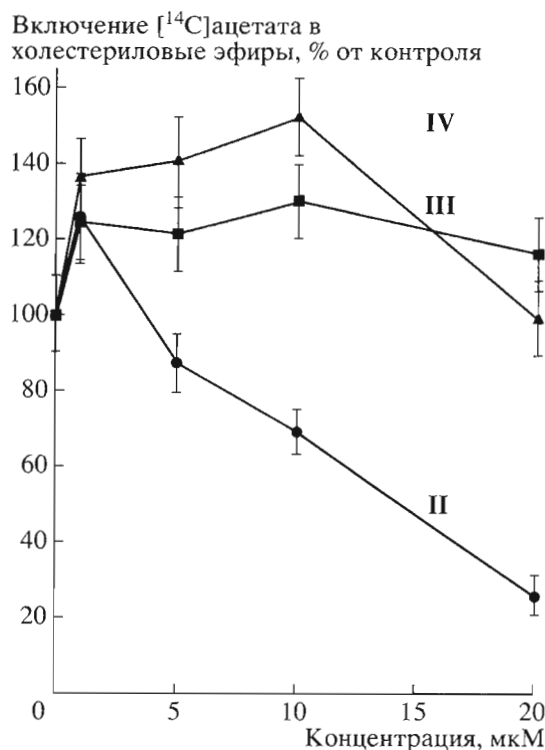
При краткосрочной инкубации в бессывороточной среде соединения (II)–(IV) подавляли биосинтез холестерина из [<sup>14</sup>C]ацетата [12] (рис. 2), не влияя на включение радиоактивности во фракции свободных жирных кислот и триглицеридов. Ингибирующий эффект соединений убывал в ряду



**Рис. 1.** Влияние соединений (I) и (II) (20 мкМ) на уровень биосинтеза холестерина в клетках Нер G2 из [<sup>14</sup>C]ацетата в различных условиях. (а) – уровень биосинтеза холестерина после 3 и 24 ч инкубации в среде с 10% LPDS; к – контрольный эксперимент в отсутствие стероидов; (б) – уровень биосинтеза холестерина в клетках предынкубированных со стероидом, а затем выдержанных в среде без стероидов; к – контрольный эксперимент без стероидов; эксп. 1 – после 3-часовой инкубации с соединениями (I) и (II) в среде с 10% LPDS; эксп. 2 – после аналогичной 3-часовой инкубации с соединениями (I) и (II) и последующей 3-часовой инкубации в среде с 10% LPDS без стероидов.



**Рис. 2.** Зависимость уровня биосинтеза холестерина из  $[^{14}\text{C}]$ ацетата в клетках Hep G2 в бессывороточной среде от концентрации соединений (II)–(IV). Обозначения кривых соответствуют номеру соединения. Контрольное значение (принятое за 100%) составляло  $20400 \pm 1600$  (имп./мин на 1 мг клеточного белка).



**Рис. 3.** Зависимость уровня биосинтеза холестерилвых эфиров из  $[^{14}\text{C}]$ ацетата в клетках Hep G2 в бессывороточной среде от концентрации соединений (II)–(IV). Обозначения кривых соответствуют номеру соединения. Контрольное значение (принятое за 100%) составляло  $1400 \pm 200$  (имп./мин на 1 мг клеточного белка).

(II) > (IV) > (III). В условиях эксперимента ингибирующая активность соединения (II) была несколько выше, чем активность кетостерина (I) (зависимость для соединения (I) была ранее приведена в работе [11] и на рис. 2а не показана), но различия не были достоверными.

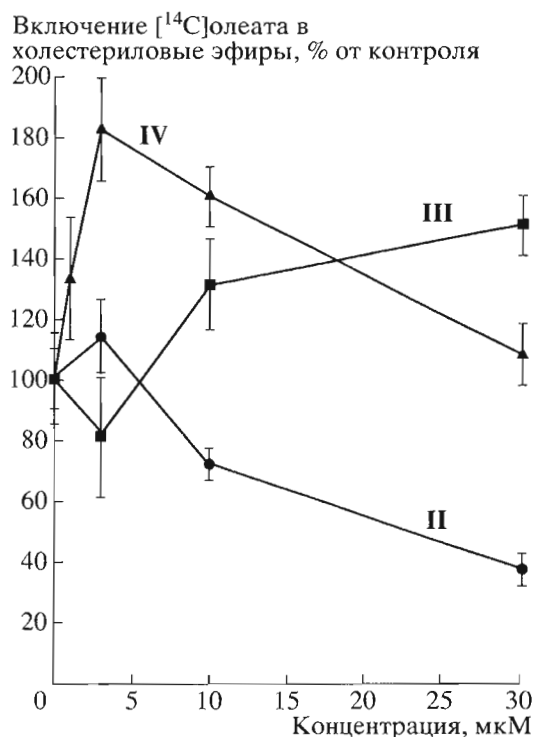
Соединения (II)–(IV) влияли на включение  $[^{14}\text{C}]$ ацетата во фракцию холестерилвых эфиров (рис. 3). В отличие от соединения (II), ингибирующего включение радиоактивности во фракцию холестерилвых эфиров пропорционально концентрации в среде, для соединений (III) и (IV) зависимости показывали сложный характер. Очевидно, включение  $[^{14}\text{C}]$ ацетата во фракцию холестерилвых эфиров должно зависеть от скорости биосинтеза холестерина и жирной кислоты, а также от скорости АСАТ-зависимого ацилирования холестерина.

Для того чтобы оценить влияние новых аналогов 15-кетостерина (II)–(IV) на АСАТ-зависимое ацилирование холестерина, мы проводили инкубацию клеток Hep G2 с  $[1-^{14}\text{C}]$ олеиновой кислотой в присутствии 10% FCS [12–14] и измеряли включение радиоактивности во фракцию холестерилвых эфиров (рис. 4). Кетостерин (I), ингибирующий активность АСАТ в микросомах печени и кишечника крысы [15, 16], тем не менее не влиял на биосинтез холестерина из  $[1-^{14}\text{C}]$ олеата в клетках Hep G2 [11].

Кетостерин (II) с  $3\beta$ -гидроксильной группой ингибировал биосинтез холестерилвых эфиров, а соответствующий  $3\alpha$ -эпимер (III) оказывал стимулирующий эффект. Необычный эффект вызывал  $3,15$ -дикетон (IV): он сильно стимулировал включение радиоактивности в холестерилвые эфиры в низких концентрациях и не оказывал заметного эффекта в концентрации 30 мкМ. В тех же условиях соединения (II)–(IV) не влияли на включение  $[1-^{14}\text{C}]$ олеата во фракцию триглицеридов.

Соединения (II)–(IV) в концентрациях до 100 мкМ не вызывали токсического эффекта в клетках Hep G2 при инкубации в среде, содержащей 10% LPDS в течение 24 и 48 ч. Ацетаты кетостерина (II) и (III):  $3\beta$ -ацетокси-(24S)-метил- $5\alpha$ -холеста-8(14),22-диен-15-он и  $3\alpha$ -ацетокси-(24S)-метил- $5\alpha$ -холеста-8(14),22-диен-15-он [10] дозозависимо ингибировали биосинтез холестерина в клетках Hep G2 при краткосрочной инкубации в бессывороточной среде, но их ингибирующая активность была слабее, чем активность стерина (II) и (III).

Сравнивая данные, полученные в настоящей работе с результатами аналогичных исследований кетостерина (I) и его производных, содержащих 2-изооктильную цепь при C17 [1, 11], можно заключить, что существенными различиями являются ингибирование соединением (II) биосинтеза холестерило-



**Рис. 4.** Зависимость уровня биосинтеза холестерилэфиров из  $[^{14}\text{C}]$ олеата в клетках Hep G2 в среде, содержащей 10% FCS, от концентрации соединений (I)–(IV). Обозначения кривых соответствуют номеру соединения. Контрольное значение (принятое за 100%) составляло  $1950 \pm 200$  (имп./мин на 1 мг клеточного белка).

вых эфиров и более сильное подавление биосинтеза холестерина соединением (II) по сравнению с соединением (I), что наблюдалось при длительной инкубации или при инкубации в отсутствие кетостерина. Все вышесказанное позволяет считать, что 15-кетостерины, содержащие модифицированную боковую цепь, могут оказаться интересными и перспективными регуляторами липидного обмена в культуре клеток и в экспериментах *in vivo*.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Химические реактивы и органические растворители получены от фирм "Sigma" (США) и "МедХимЛаб" (Россия),  $[1-^{14}\text{C}]$ ацетат Na и  $[1-^{14}\text{C}]$ олеиновая кислота от фирмы "Amersham" (США), культуральный пластик и среды от фирмы "Costar". Эмбриональную сыворотку телят (FCS) получали от фирмы "Gibco BRL" (США), липопротеиндефицитную сыворотку (LPDS) выделяли из плазмы крови здоровых доноров по методу [17]. Соединения (I)–(IV) синтезированы по методам [10, 18].

Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Yano Co 2000; концентрацию белка определяли модифицированным методом Лоури [19]; ТСХ исследуемых соединений и липидных экстрактов проводили на пластинках HPTLC Kieselgel UV<sub>254</sub> фирмы "Merck"; для изме-

рения радиоактивности на счетчике фирмы "ЛКВ" использовали толуольный сцинтиллятор.

**Клетки Hep G2.** Клетки гепатомы человека линии Hep G2, полученные из Европейской коллекции клеточных культур (ECACC, Salisbury), культивировали при 37°C в атмосфере, содержащей 5%  $\text{CO}_2$  в среде OptiMEM : F12 (1 : 1) с 10% FCS. Клетки выращивали в 24-луночных планшетах (содержание клеточного белка 0.2 мг/ячейку). Перед экспериментом клетки выдерживали 24 ч в бессывороточной среде, или в среде, содержащей 10% LPDS, или в среде, содержащей 10% FCS. Соединения (I)–(IV) добавляли к культуральной среде в этанольном растворе, содержание этанола во всех опытах, включая соответствующие контроли, составляло 0.4%.

**Уровень биосинтеза холестерина и холестерилэфиров из  $[1-^{14}\text{C}]$ ацетата в клетках Hep G2** оценивали по методу [12].

В первом эксперименте (рис. 1а) клетки инкубировали с 20 мкМ раствором соединений (I) и (II) в среде, содержащей 10% LPDS, в течение 3 или 24 ч, после чего вносили  $[1-^{14}\text{C}]$ ацетат (1 мкКи/мл среды) и продолжали инкубацию в присутствии кетостерина еще 3 ч.

Во втором эксперименте (рис. 1б) клетки инкубировали с 20 мкМ раствором соединений (I) и (II) в среде, содержащей 10% LPDS, в течение 3 ч, затем среду удаляли, к клеткам добавляли культуральную среду с 10% LPDS без кетостерина и инкубировали 3 ч, после чего вносили  $[1-^{14}\text{C}]$ ацетат (1 мкКи/мл среды) и продолжали инкубацию в отсутствие кетостерина еще 3 ч.

В третьем эксперименте (рис. 2) клетки инкубировали с соединениями (I)–(IV) в различных концентрациях в бессывороточной среде в течение 3 ч, после чего вносили  $[1-^{14}\text{C}]$ ацетат (1 мкКи/мл среды) и продолжали инкубацию в присутствии кетостерина еще 3 ч.

Клетки промывали PBS при 4°C, липиды экстрагировали смесью гексан–изопропанол (3 : 2), клеточный остаток использовали для определения содержания белка. Экстракты концентрировали в токе азота, липиды анализировали ТСХ в системе гексан– $\text{Et}_2\text{O}$ – $\text{CH}_3\text{COOH}$  (70 : 29 : 1). После окрашивания парами йода зоны, соответствующие холестерину, холестерилэфиром, триглицеридам и свободным жирным кислотам, соскабливали с пластинки и переносили во флаконы для счета радиоактивности.

Уровень биосинтеза холестерина, холестерилэфиров, триглицеридов и жирных кислот выражали как количество  $^{14}\text{C}$  (имп./мин), включенное в соответствующую фракцию за 3 ч инкубации с  $[1-^{14}\text{C}]$ ацетатом, нормированное на 1 мг клеточного белка (имп./мин на 1 мг клеточного белка). Контрольные значения уровней биосинтеза холестерина и холестерилэфиров, составлявшие соответственно  $20400 \pm 1600$  и  $1400 \pm 200$  (имп./мин

на 1 мг клеточного белка), принимали за 100%. Все эксперименты проведены в четырех повторах.

**Уровень биосинтеза холестероловых эфиров из [1-<sup>14</sup>C]олеата [12].** Клетки Hep G2 инкубировали со средой, содержащей 10% FCS и исследуемые соединения, в течение 3 ч, культуральную среду заменяли на свежую, содержащую [1-<sup>14</sup>C]олеиновую кислоту (52 мКи/ммоль, 0.5 мКи на 1 мл среды) и 10% FCS, и продолжали инкубацию 3 ч. Клетки трижды промывали PBS, липиды экстрагировали смесью гексан-изопропанол (3 : 2, по объему) и анализировали ТСХ как описано выше. Уровень ацилирования холестерина рассчитывали по включению радиоактивной метки во фракцию холестероловых эфиров. Контрольное значение  $1950 \pm 200$  (имп./мин на 1 мг клеточного белка) принимали за 100%. Включение радиоактивной метки в отсутствие исследуемых соединений принимали за 100%. Каждое определение проводили в трех повторах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 03-04-48700 и 01-04-48504).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schroepfer G.J. // *Physiol. Rev.* 2000. V. 80. P. 361–554.
2. Schroepfer G.J., Parish E.J., Chen H.W., Kandutsch A.A. // *J. Biol. Chem.* 1977. V. 252. P. 8975–8980.
3. Miller L.R., Pinkerton F.D., Schroepfer G.J. // *Biochem. Internat.* 1980. V. 1. P. 223–228.
4. Schroepfer G.J., Parish E.J., Tsuda M., Kandutsch A.A. // *Chem. Phys. Lipids.* 1988. V. 47. P. 187–207.
5. Пийр Е.А., Игнатов Д.В., Медведева Н.В., Мишарин А.Ю. // *Биоорганическая химия.* 2003. Т. 29. С. 648–654.
6. Muri-Boberg K., Einarsson K., Bjorkhem I. // *J. Lipid Res.* 1990. V. 31. P. 1083–1088.
7. Muri-Boberg K., Lund E., Olund J., Bjorkhem I. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 7967–7985.
8. Bjorkhem I. // *J. Lipid Res.* 1992. V. 33. P. 455–471.
9. Fernandez C., Suarez Y., Ferruelo A.J., Gomez-Coronado N.M., Lasuncion M.A. // *Biochem. J.* 2002. V. 366. P. 109–119.
10. Мишарин А.Ю., Тимофеев В.П. // *Биоорганическая химия.* 2004. Т. 30. С. 84–88.
11. Киселева А.Ф., Горюнова Л.Е., Медведева Н.В., Алки К., Мишарин А.Ю. // *Биохимия.* 1999. Т. 64. С. 456–463.
12. Goldstein J.L., Anderson R.G.W., Brown M.S. // *Methods Enzymol.* 1979. V. 98. P. 241–261.
13. Cheng D., Chang C.C.Y., Qu X.-M., Chang T.-Y. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 685–695.
14. Harte R.A., Yeaman S.J., McElhinney J., Suckling C.J., Jackson B., Suckling K.E. // *Chem. Phys. Lipids.* 1996. V. 83. P. 45–59.
15. Needleman D.H., Strong K., Stemke K.A., Brabson J.S., Kiscic A., Schroepfer G.J. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987. V. 148. P. 920–925.
16. Miller L.R., Needleman D.H., Brabson J.S., Wang K.-S., Schroepfer G.J. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987. V. 148. P. 934–940.
17. Lindgren F.T. // *Analysis of Lipids and Lipoproteins* / Ed. E.G. Perkins. Amsterdam: Amer. Oil Chemists' Soc., 1975. P. 202–224.
18. Wilson W.K., Wang K.-S., Kiscic A., Schroepfer G.J. // *Chem. Phys. Lipids.* 1988. V. 48. P. 7–17.
19. Markwell M.A.K., Haas S.M., Bieber L.L., Folbert N.E. // *Analyt. Biochem.* 1978. V. 87. P. 206–211.

## The Effect of 15-Ketosterol Analogues with a 5,6-Dimethylhept-3-en-2-yl Chain at C17 on Cholesterol Metabolism in Hep G2 Hepatoma Cells

E. A. Piir\*, N. V. Medvedeva\*, N. M. Kashirina\*\*, A. Ya. Shevelev\*\*, and A. Yu. Misharin\*\*

\*Phone: +7 (095) 246-3375; e-mail: misharin@ibmh.msk.su

\*Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya ul. 10, Moscow, 119992 Russia

\*\*Institute of Experimental Cardiology, Cardiology Research Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

The effect on cholesterol metabolism in Hep G2 hepatoma cells was studied for new analogues of 15-ketosterol [3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -cholest-8(14)-en-15-one] (**I**): (24S)-3 $\beta$ -hydroxy-24-methyl-5 $\alpha$ -cholesta-8(14),22-diene-15-one (**II**), (24S)-3 $\alpha$ -hydroxy-24-methyl-5 $\alpha$ -cholesta-8(14),22-diene-15-one (**III**), and (24S)-24-methyl-5 $\alpha$ -cholesta-8(14),22-diene-3,15-dione (**IV**). Analogues (**I**) and (**II**) were found to be equally effective inhibitors of cholesterol biosynthesis after a 3-h incubation with Hep G2 cells; however, (**II**) produced a stronger inhibitory effect after a 24-h incubation or after an incubation of cells preliminarily treated with the inhibitor in a medium containing no ketosterol. The ability of ketosterols to inhibit cholesterol biosynthesis decreased in the order (**II**) > (**IV**) > (**III**). Ketosterol (**II**) inhibited, whereas ketosterol (**III**) stimulated the biosynthesis of cholesteryl esters. (**IV**) stimulated the biosynthesis of cholesteryl esters at a concentration of 1–10  $\mu$ M and exerted no marked effect at a concentration of 30  $\mu$ M. These results indicate that  $\Delta$ 8(14)-15-ketosterols containing a modified side chain are of interest as regulators of cholesterol metabolism in liver cells. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* cholesterol metabolism, Hep 2G hepatoma cells, inhibitors of cholesterol biosynthesis, oxysterols