

ВЛИЯНИЕ ИММУНИЗАЦИИ КРЫС БСА-КОНЬЮГИРОВАННЫМ ПЕПТИДОМ 269—280 МЕЛАНКОРТИНОВОГО РЕЦЕПТОРА 3-ГО ТИПА НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ФУНКЦИИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© К. В. Деркач,¹ Е. А. Шпакова,² О. А. Жарова,³ В. М. Бондарева,¹ А. О. Шпаков^{1, *}

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,

² Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург,

и ³ Фармацевтическая компания ООО «Тева», Ярославль;

* электронный адрес: alex_shpakov@list.ru

Одним из подходов для изучения роли гормональных систем мозга в регуляции биохимических и физиологических процессов является их выключение с помощью антител, выработанных против пептидов, соответствующих внеклеточным участкам рецепторов. Важную роль в центральной регуляции метаболизма и функций эндокринной системы играют меланокортиновые рецепторы 3-го типа (M₃P) мозга. Однако практически не изучено, как длительное выключение M₃P влияет на энергетический обмен, инсулиновую резистентность и функции щитовидной железы (ЩЖ). Цель работы состояла в изучении влияния длительной многократной иммунизации самцов крыс с помощью БСА-конъюгированного пептида Ala-[Pro-Thr-Asn-Pro-Tyr-Cys-Ile-Cys-Thr-Thr-Ala-His^{269–280}]-Ala (A[269—280]A), соответствующего третьей внеклеточной петле M₃P, на их метаболические показатели и функциональную активность ЩЖ. Через 9 мес после первой иммунизации масса крыс снижалась и через 12—13 мес была достоверно ниже, чем в контроле. Масса абдоминального и бурого жира, напротив, возрастала. В эти же сроки наблюдали повышение уровня тощачковой глюкозы и инсулина и возрастание индекса НОМА-IR (+75 %), что свидетельствует о развитии у иммунизированных крыс инсулиновой резистентности. При этом у них повышалась утилизация глюкозы вследствие усиления продукции инсулина β-клетками поджелудочной железы. Через 12 мес после начала иммунизации повышались уровень триглицеридов (+74 %) и соотношение холестерина-ЛПНП/холестерин-ЛПВП (+36 %). Уровень свободного и общего тироксина и общего трийодтиронина через 13 мес после начала иммунизации были снижены. В плазматических мембранах ЩЖ иммунизированных крыс ослаблялся стимулирующий эффект тиреотропного гормона на аденилатциклазу. Таким образом, длительное снижение активности M₃P в мозге вследствие многократной иммунизации крыс БСА-конъюгированным пептидом A[269—280]A вызывает нарушения периферического метаболизма и функций ЩЖ.

Ключевые слова: аденилатциклаза, дислипидемия, инсулиновая резистентность, меланокортиновый рецептор 3-го типа, пептид, тиреоидный гормон, толерантность к глюкозе, третья внеклеточная петля, щитовидная железа.

Принятые сокращения: АПП — агути-подобный пептид, АЦ — аденилатциклаза, БСА — бычий сывороточный альбумин, ГГТ-ось — гипоталамо-гипофизарно-тиреоидная ось, ЛПНП и ЛПВП — липопротеиды низкой и высокой плотности, МР — меланокортиновые рецепторы, M₃P и M₄P — меланокортиновые рецепторы 3-го и 4-го типов, α-МСГ и γ-МСГ — α- и γ-меланоцитстимулирующие гормоны, ТТГ — тиреотропный гормон, fT₄ — свободный тироксин, tT₄ — общий тироксин, tT₃ — общий трийодтиронин, НОМА-IR — гомеостатическая модель для оценки резистентности к инсулину (Homeostasis Model Assessment — Insulin Resistance), QUICKI — количественный индекс контроля чувствительности к инсулину (QUantitative Insulin sensitivity ChecK Index).

Меланокортиновая сигнальная система мозга, включающая в себя в качестве рецепторного компонента сопряженные с гетеротримерными G-белками меланокортиновые рецепторы (МР), вовлечена в регуляцию пищевого поведения, углеводного и жирового обменов, функциональной активности эндокринной системы. Определяющая роль здесь принадлежит МР 3-го (M₃P) и 4-го (M₄P) типов, которые активируются α-меланоцитстимулирующим гормоном (α-МСГ) и родственными ему нейропептидами (Xu et al., 2011; Renquist et al., 2012; Beg-

riche et al., 2013). Нарушения в сигнальных каскадах мозга, включающих в себя M₃P и M₄P, приводят к широкому спектру заболеваний, в том числе к ожирению, метаболическому синдрому, анорексии, нейроэндокринным дисфункциям, когнитивным расстройствам (Shpakov et al., 2011; Шпаков, Деркач, 2012; Begriche et al., 2013; Kievit et al., 2013). В большинстве случаев развитие этих заболеваний связывают с изменениями в M₄P-зависимых сигнальных каскадах, в то время как роль в них M₃P остается малоизученной. Необходимо отметить, что M₃P облада-

ет свойствами ауторецепторов, которые опосредуют снижение функциональной активности нейронов, секретирующих проопиомеланокортин, предшественник неселективного М₃Р/М₄Р-агониста α -МСГ и селективного М₃Р-агониста γ -МСГ, вследствие чего активация М₃Р приводит к ослаблению М₃Р- и М₄Р-зависимых сигнальных путей (Renquist et al., 2011). С другой стороны, М₃Р и М₄Р функционально сопряжены с G-белками стимулирующего типа и опосредуют активацию аденилатциклазы (АЦ) пептидами меланокортинового семейства, что указывает на возможность их синергичного стимулирующего влияния на цАМФ-зависимые сигнальные каскады в нейрональных клетках. Установлено, что М₃Р, как и родственные им М₄Р, относятся к достаточно редкой группе сопряженных с G-белками рецепторов, которые обладают конституционной активностью. Одним из путей контроля этой активности является их ингибирование с помощью агути-подобного пептида (АПП), эндогенного М₃Р/М₄Р-антагониста (Nijenhuis et al., 2001).

Одним из подходов для изучения функциональных нарушений, вызываемых длительным подавлением активности гормональных сигнальных систем, является иммунизация экспериментальных животных с использованием пептидов, соответствующих внеклеточным участкам рецепторов, сенсорных компонентов этих систем (Шпаков, 2011; Shpakov, 2011). Следует отметить, что в настоящее время описан ряд аутоиммунных заболеваний, которые вызваны патологической выработкой антител к внеклеточным участкам сопряженных с G-белками рецепторов. Среди них идиопатическая кардиомиопатия, синдром Шегрена, первичный билиарный цирроз печени и болезнь Чагаса (Reina et al., 2004; Buvall et al., 2005; Matsui, Fu, 2006). Антитела блокируют связывание эндогенных агонистов с рецепторами и выключают их из сигнальной трансдукции.

Цель работы состояла в изучении влияния длительной (в течение 1 года) многократной иммунизации самцов крыс пептидом Ala-[Pro-Thr-Asn-Pro-Tyr-Cys-Ile-Cys-Thr-Thr-Ala-His^{269—280}]-Ala (A[269—280]A), соответствующим третьей внеклеточной петле М₃Р, на массу тела и метаболические показатели (уровень глюкозы и инсулина, толерантность к глюкозе и липидный статус) у иммунизированных животных в сравнении с контрольными крысами того же возраста. Поскольку имеются данные о тесной взаимосвязи между меланокортиновой сигнальной системой мозга и гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной (ГГТ) осью (Lechan, Fekete, 2006), также оценивали функциональное состояние этой оси у иммунизированных самцов крыс по содержанию в их крови тиреоидных гормонов, важнейших регуляторов метаболических процессов в ЦНС и периферических тканях. Для повышения иммуногенности пептида использовали его конъюгат с бычьим сывороточным альбумином (БСА).

Материал и методика

Пептид Ala-[Pro-Thr-Asn-Pro-Tyr-Cys-Ile-Cys-Thr-Thr-Ala-His^{269—280}]-Ala-амид (A[269—280]A), соответствующий по первичной структуре третьей внеклеточной петле М₃Р крысы, синтезировали с помощью твердофазного синтеза на *para*-метилбензгидриламиновой смоле (емкость 1.16 ммоль/г) с использованием аминокислот, защищенных по свободным аминогруппам *N* _{α} -трет-бутилоксикарбонильными группами. Для образования пеп-

тидной связи использовали метод активированных эфиров, для чего с помощью *N,N*-диизопропилкарбодимида получали 1-оксibenзотриазолиловые эфиры аминокислот. Деблокирование и снятие пептида с полимера проводили с использованием трифторметансульфокислоты (1 мл) в трифторуксусной кислоте (10 мл) в присутствии тиоанизола (1 мл) и этандитиола (0.5 мл) (все количества на 1 г пептидил-полимера). Для очистки целевого пептида использовали обращенно-фазовую ВЭЖХ, структуру подтверждали с помощью ESI масс-спектрометрии высокого разрешения. По данным масс-спектрометрического анализа экспериментальная масса пептида составила 1522.6548 ([M+2H]²⁺ = 762.3278), что хорошо соответствует рассчитанной для него массе — 1522.6697 ([M+2H]²⁺ = 762.3427). Для повышения иммуногенности получали конъюгат пептида A[269—280]A с БСА, используя конденсацию с глутаровым альдегидом. Для этого использовали 30-кратный молярный избыток пептида, который добавляли к 0.15 мкмоль БСА, растворенного в 1 мл 0.1 М К⁺-фосфатного буфера (рН 8.0). К полученному раствору по каплям в течение 1 ч добавляли при перемешивании 300 мкл 21 мМ раствора глутарового альдегида (25 °С). Через 3 ч перемешивания при комнатной температуре получившийся конъюгат очищали с помощью геляпроникающей хроматографии на колонке с сорбентом Sephadex G-75 и затем лиофилизировали.

Для иммунизации были взяты 1.5-месячные самцы крыс породы Wistar (группа М₃Р, n = 6), которым вводили БСА-конъюгированный пептид A[269—280]A. Схема иммунизации включала в себя восемь инъекций БСА-конъюгированного пептида, которые проводили подкожно в межлопаточную область (в четыре точки). Инъекции проводили через 1, 30, 60, 90, 190, 300, 320 и 360 сут эксперимента. Первую иммунизацию осуществляли введением раствора БСА-конъюгата в полном адьюванте Фрейнда, вторую и третью — введением БСА-конъюгата в неполном адьюванте Фрейнда (в соотношении 1 : 1, объем 400 мкл), все последующие иммунизации проводили только конъюгатом (без адьюванта). Дозы БСА-конъюгированного пептида составили при первом и втором введении 20 мкг, при третьем — 40, в дальнейшем — по 50 мкг на крысу. Группу контрольных животных (группа К, n = 6) обрабатывали сходным образом, но без введения БСА-конъюгированного пептида. Для первых трех инъекций использовали физиологический раствор в смеси с полным (первая инъекция) или неполным (вторая и третья инъекции) адьювантом Фрейнда (в соотношении 1 : 1, объем 400 мкл). Для последующих пяти инъекций использовали только физиологический раствор. Для оценки иммунного ответа применяли метод непрямого иммуноферментного анализа на платах с иммобилизованным на них пептидом A[269—280]A. Сорбцию пептида проводили на иммунобиологическом пластике Nunc MaxiSorp (Thermo Fisher Scientific, Inc., Дания) в соответствии с рекомендациями фирмы Nalge Nunc International (Дания). Полуколичественная оценка титра антител к БСА-конъюгированному пептиду после последней иммунизации показала, что у всех животных группы М₃Р имелись антитела к пептиду. В группе К проба на антитела к пептиду была отрицательной.

Измерение уровня глюкозы в цельной крови, полученной из хвостовой вены крыс, проводили с помощью тест-полосок One Touch Ultra (США) и глюкометра фирмы Life Scan Johnson & Johnson (Дания). Концентрацию инсулина измеряли с помощью набора Rat Insulin ELISA

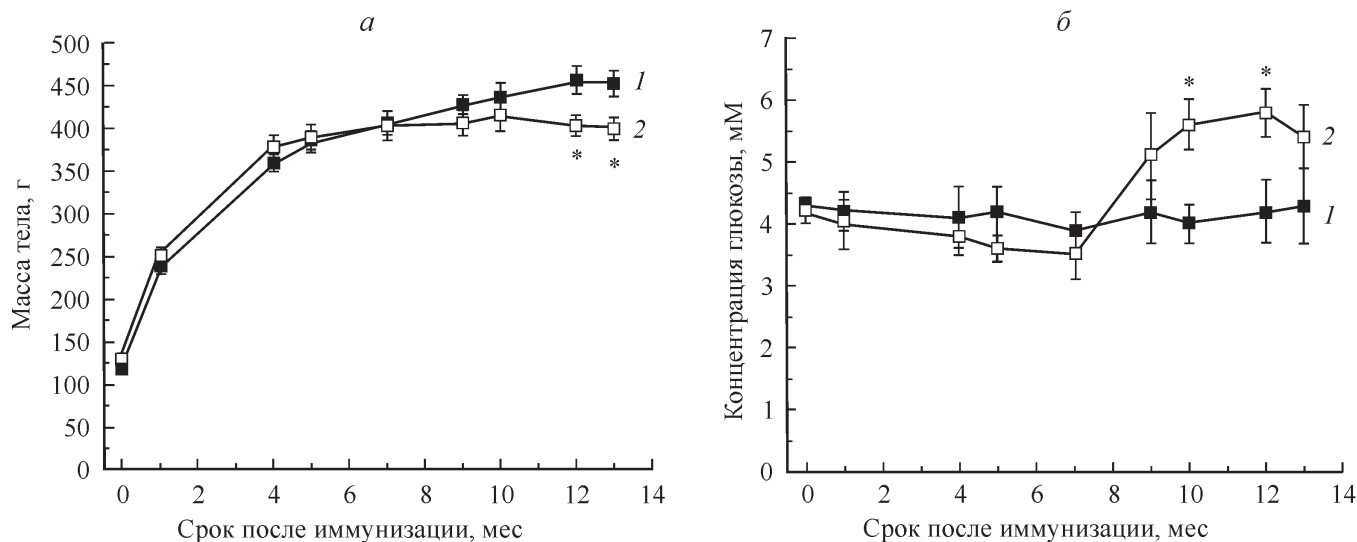


Рис. 1. Изменение массы тела (а) и концентрации тощачевой глюкозы (б) у крыс, иммунизированных БСА-конъюгированным пептидом А[269—280]А, на протяжении эксперимента.

1 — контроль (n = 6), 2 — иммунизированные крысы (n = 6). Звездочкой указаны достоверные отличия от контроля ($P < 0.05$).

(Merckodia AB, Швеция). Для оценки толерантности к глюкозе животным внутривенно вводили раствор глюкозы (2 г на 1 кг массы тела) с последующим измерением концентрации глюкозы и инсулина в крови на протяжении 2 ч. Концентрацию триглицеридов, общего холестерина и холестерина, связанного с липопротеидами низкой (ЛПНП) и высокой (ЛПВП) плотности, измеряли с помощью наборов фирмы Ольвекс Диагностикум (Россия). Для определения уровня свободного (fT₄) и общего (tT₄) тироксина и общего трийодтиронина (tT₃) использовали наборы ИФА-СвТ₄-1, ИФА-ТТ₄-1 и ИФА-ТТ₃-1 (ЗАО «НВО Иммунотех», Россия).

Выделение фракций частично очищенных плазматических мембран из щитовидной железы крыс проводили, как описано ранее (Шпаков и др., 2012). Животных наркотизировали и декапитировали через 13 мес после начала эксперимента. Активность аденилатциклазы (АЦ) определяли, как описано ранее (Shprakov et al., 2010). Ферментативную реакцию проводили в течение 12 мин при 37 °С в инкубационной смеси, которая содержала 50 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 5 мМ MgCl₂, 0.1 мМ цАМФ, 1 мМ АТФ, 37 КБк [α -³²P]-АТФ, 20 мМ креатинфосфата, 0.2 мг/мл креатинфосфокиназы и 50—75 мкг мембранного белка. Для определения активности АЦ использовали [α -³²P]АТФ (150 ГБк/ммоль) (Изотоп, Россия). Активность фермента выражали в пмоль цАМФ за 1 мин на 1 мг мембранного белка.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программы ANOVA. Данные представлены в виде $M \pm SD$ (среднее значение \pm стандартное отклонение) из трех независимых экспериментов. Различия между пробами оценивали как достоверные при $P < 0.05$. Для оценки чувствительности тканей к инсулину (инсулиновой резистентности) использовали индексы НОМА-IR (homeostasis model assessment — insulin resistance) и QUICKI (quantitative insulin sensitivity check index). Индекс НОМА-IR рассчитывали по формуле $(G \cdot I)/22.5$, где концентрация тощачевой глюкозы (G) выражена в ммоль/л инсулина (I) в мкЕД/мл (Matthews et al., 1985). Индекс QUICKI (quantitative insulin sensitivity check index) рассчитывали по формуле $1/[\log(I) + \log(G)]$,

где концентрации тощачевой глюкозы и инсулина выражены в мг/мл и мкЕД/мл соответственно (Katz et al., 2000).

Использованные реактивы: тиреотропный гормон (ТТГ) из гипофиза быка, цАМФ, АТФ, креатинфосфокиназа из мышц кролика, креатинфосфат, *N,N*-диизопропилкарбодимид, трифторметансульфоокислота, тиоанализол, этандитиол, защищенные *N*_α-трет-бутилосикарбонильными группами производные аминокислот (Sigma-Aldrich, США); хлористоводородная соль *para*-метилбензгидриламиновой смолы (Wachem, Германия), 1-гидроксибензотриазол (Fluka, Швейцария).

Результаты

У крыс, иммунизированных БСА-конъюгированным пептидом А[269—280]А, в течение первых 7 мес масса практически не отличалась от таковой в контроле. Через 9 мес после начала иммунизации она начинала снижаться и через 12—13 мес была достоверно ниже, чем в группе К (рис. 1, а). Через 13 мес после первой иммунизации масса абдоминального и бурого жира у иммунизированных животных (6.21 ± 1.44 и 0.98 ± 0.11 г) была выше в сравнении с контролем (3.69 ± 1.02 и 0.53 ± 0.09 г). Масса эпидидимального жира различалась незначительно (2.19 ± 0.23 г в группе М₃Р против 1.90 ± 0.14 в контроле). Уровень тощачевой глюкозы в первые 7 мес после начала иммунизации не отличался от такового в контроле. Через 9 мес он начал повышаться, причем наиболее выраженные различия между уровнем глюкозы в группах М₃Р и К отмечались через 10 и 12 мес (рис. 1, б). Уровень инсулина в группе М₃Р через 12 мес после иммунизации был повышен на 26 %. Индекс НОМА-IR, рассчитанный для группы М₃Р через 12 мес после иммунизации, составил 1.86, что на 75 % выше, чем в контроле (1.06). Индекс QUICKI, который также используется для оценки инсулиновой резистентности, в группе М₃Р составил 0.347, в то время как в группе К был выше (0.380). Повышение уровня глюкозы и инсулина, а также повышение индекса НОМА-IR и снижение индекса QUICKI свидетельствуют

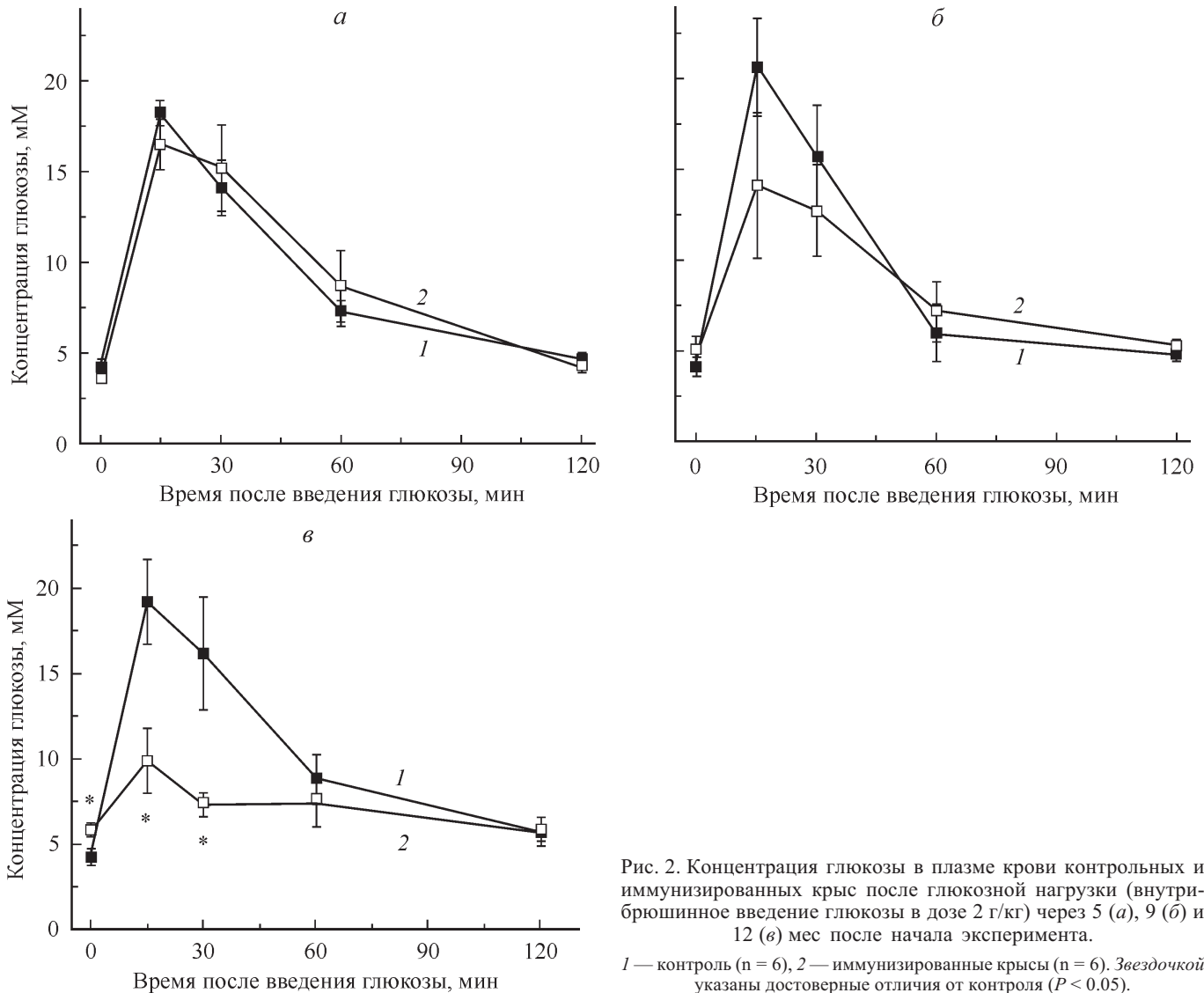


Рис. 2. Концентрация глюкозы в плазме крови контрольных и иммунизированных крыс после глюкозной нагрузки (внутрибрюшинное введение глюкозы в дозе 2 г/кг) через 5 (а), 9 (б) и 12 (в) мес после начала эксперимента.

1 — контроль (n = 6), 2 — иммунизированные крысы (n = 6). Звездочкой указаны достоверные отличия от контроля ($P < 0.05$).

о снижении чувствительности тканей к инсулину у крыс группы M_3P .

Для оценки толерантности к глюкозе использовали тест с глюкозной нагрузкой (внутрибрюшинные инъекции, доза 2 г/кг), который проводили через 5, 9 и 12 мес после первой иммунизации животных. Через 5 мес существенных различий в ходе кривых зависимости концентрации глюкозы от времени в группах M_3P и К отмечено не было (рис. 2, а). Через 9 мес в группе M_3P наблюдали снижение пика концентрации глюкозы через 15 и 30 мин после нагрузки, однако различия по отношению к контролю были статистически незначимыми (рис. 2, б). Через 12 мес подъем глюкозы (прирост над исходным уровнем), который наблюдали через 15 и 30 мин после инъекции, в группе M_3P был в 5 и 8 раз ниже, чем в контроле (рис. 2, в). Эти результаты указывают на то, что, несмотря на признаки развития инсулиновой резистентности, утилизация глюкозы у крыс группы M_3P через 9 и 12 мес после первой иммунизации в значительной степени усиливалась. Причиной этого является усиление секреции инсулина у иммунизированных животных после глюкозной нагрузки, как мы полагаем вследствие усиления продукции гормона β -клетками поджелудочной железы. Так, у

крыс группы M_3P через 12 мес после иммунизации прирост концентрации инсулина над его базовым уровнем спустя 30, 60 и 120 мин после глюкозной нагрузки был на 85, 315 и 79 % выше, чем в контроле (рис. 3). Индекс НОМА-IR* для постпрандиальных значений концентраций инсулина и глюкозы был существенно выше для группы M_3P , чем для группы К. Так, в группе M_3P через 60 и 120 мин после инъекции глюкозы индекс НОМА-IR* составил 6.00 и 3.14, в то время как в контроле — 3.24 и 2.14 соответственно.

Исследование липидного статуса у крыс группы M_3P через 12 мес после первой иммунизации выявило у них гипертриглицеридемию и другие нарушения обмена липидов. Уровень триглицеридов у иммунизированных крыс (1.48 ± 0.29 ммоль/л) был на 74 % выше в сравнении с контролем (0.85 ± 0.28 ммоль/л). Уровень общего холестерина в группе M_3P (4.78 ± 0.41 ммоль/л) практически не отличался от такового в контроле (4.49 ± 0.36 ммоль/л), но содержание холестерина, связанного с ЛПВП, при этом было сниженным, а содержание холестерина, связанного с атерогенными ЛПНП и липопротеидами особо низкой плотности (ЛПОНП), напротив, повышалось. В группе M_3P содержание ЛПВП,

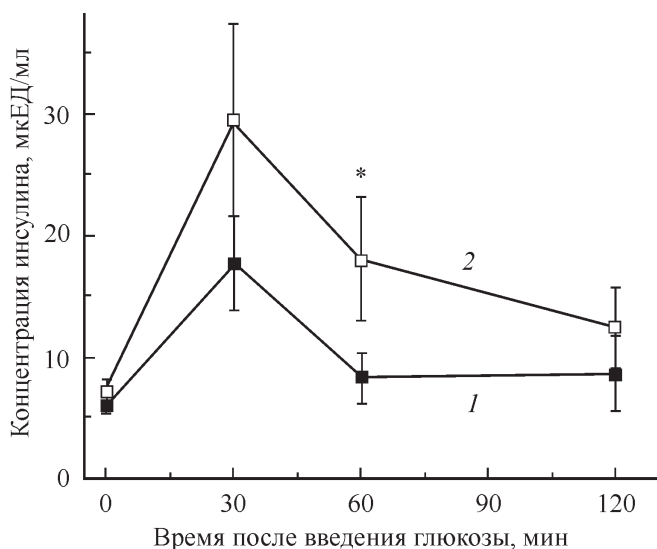


Рис. 3. Концентрация инсулина в плазме крови контрольных и иммунизированных крыс после глюкозной нагрузки (2 г/кг) через 12 мес после начала эксперимента.

1 — контроль (n = 6), 2 — иммунизированные крысы (n = 6). Звездочкой указаны достоверные отличия от контроля ($P < 0.05$).

ЛПНП и ЛПОНП составило 2.34 ± 0.28 , 1.79 ± 0.22 и 0.65 ± 0.16 ммоль/л, в то время как в контроле — 2.89 ± 0.31 , 1.42 ± 0.23 и 0.18 ± 0.06 ммоль/л соответственно. Соотношение холестерин-ЛПНП/холестерин-ЛПВП у иммунизированных животных составило 0.765, в то время как в группе К оно было на 36 % ниже (0.491).

Изучение тиреоидного статуса показало, что через 13 мес после иммунизации концентрация тиреоидных гормонов в крови крыс снижалась, в то время как через 7 мес различия в группах M_3P и К еще отсутствовали. Уровни fT_4 , tT_4 и tT_3 в крови контрольных крыс составили 26.3 ± 4.8 пмоль/л, 78.6 ± 4.3 и 2.7 ± 0.2 нмоль/л, в то время как у животных группы M_3P через 13 мес после иммунизации уровни этих гормонов составили 20.8 ± 2.7 пмоль/л, 69.3 ± 6.1 и 2.2 ± 0.2 нмоль/л соответственно. Базальная активность АЦ в плазматических мембранах щитовидной железы крыс группы M_3P составила 17.9 ± 2.0 пмоль цАМФ за 1 мин на 1 мг мембранного белка и практически не отличалась от таковой в контроле (16.2 ± 1.7 пмоль цАМФ за 1 мин на 1 мг мембранного белка). В то же время стимулирующий эффект ТТГ (10^{-8} М) на активность АЦ в щитовидной железе иммунизированных крыс был достоверно ниже, чем в группе К. Так, приросты активности АЦ, вызванные обработкой мембран ТТГ, в группах К и M_3P составили 37.4 ± 4.1 и 26.2 ± 3.4 пмоль цАМФ за 1 мин на 1 мг мембранного белка соответственно. Полученные данные указывают на то, что в условиях длительной иммунизации крыс БСА-конъюгированным пептидом A[269—280]A, снижается чувствительность щитовидной железы к регуляторному действию ТТГ, что приводит к снижению выработки тироксина и опосредованно к снижению синтеза трийодтиронина.

Обсуждение

Нами впервые показано, что у крыс, иммунизированных БСА-конъюгированным пептидом A[269—280]A, масса тела длительное время не отличается от таковой в

контроле, но через 9 мес начинает снижаться, а затем, через 12—13 мес, становится достоверно ниже таковой в контроле. При этом масса абдоминального и бурого жира у иммунизированных крыс была выше в сравнении с контрольными животными на 68 и 85 % соответственно. Полученные данные хорошо согласуются с рядом работ, в которых показано, что ингибирование M_3P в отличие от выключения M_4P не приводит к повышению массы тела. Однако удельная масса жировой ткани при этом заметно возрастает. Так масса тела у мышей, нокаутных по M_3P ($Mc3r^{-/-}$), в возрасте от 4 до 6 мес практически не отличается от такового у здоровых животных, в то время как удельная масса жировой ткани повышена, а удельная масса мышечной ткани, напротив, сильно снижена (Chen et al., 2000). Показано также, что нокаутным $Mc3r^{-/-}$ -мышам присуща более высокая в сравнении с контролем эффективность потребления пищи, определяемая как отношение потребляемой пищи к приросту веса тела.

Имеются данные о том, что дефицит функциональной активности M_3P сопряжен с изменениями липидного обмена. Недавно было установлено, что M_3P и зависимые от них сигнальные каскады вовлечены в регуляцию синтеза триглицеридов в печени и липолиза в белой жировой ткани, вследствие чего ингибирование этих рецепторов приводит к нарушению липидного обмена (Renquist et al., 2012). Снижение активности меланокортиновой сигнальной системы мозга, в том числе M_3P , приводит к повышению уровня циркулирующего в крови атерогенного холестерина, связанного с ЛПНП, вследствие снижения его поглощения печенью, причем этот процесс развивается независимо от приема пищи и массы тела животного (Perez-Tilve et al., 2010). Как известно, повышение уровня холестерин-ЛПНП на фоне снижения холестерин-ЛПВП является ключевой причиной развития атеросклероза и других сердечно-сосудистых патологий. В этом отношении необходимо отметить, что наиболее выраженная экспрессия M_3P отмечается в тех областях мозга, которые непосредственно связаны с регуляцией сердечно-сосудистой системы, и поражение этих областей мозга приводит к развитию сердечно-сосудистых заболеваний (Wachira et al., 2007). Нами у крыс, иммунизированных БСА-конъюгированным пептидом A[269—280]A, выявлены начальные стадии развития дислипидемии, что характерно для метаболического синдрома. На это указывает достоверное повышение уровня триглицеридов и соотношения холестерин-ЛПНП и холестерин-ЛПВП. Содержание триглицеридов, важнейшего маркера атерогенеза, было повышено в значительной степени — на 74 %, что с учетом повышения соотношения холестерин-ЛПНП/холестерин-ЛПВП может свидетельствовать о запуске атерогенных процессов, предвестников сердечно-сосудистых заболеваний. Эти данные подтверждают точку зрения о том, что M_3P непосредственно вовлечены в контроль липидного обмена и нарушения их функций могут быть одной из причин развития атеросклероза. Атеросклеротические изменения, как можно полагать, вносят значительный вклад в развитие гипертензивных состояний, которые развиваются при снижении функциональной активности M_3P или вследствие дефицита γ -МСГ (Humphreys, 2011). Другим фактором, который вовлечен в развитие гипертензивных состояний в условиях ослабления M_3P -зависимых сигнальных каскадов, является значительное повышение уровня норадреналина, который нормализуется при введении γ -МСГ (Ni et al., 2009).

В настоящее время имеются данные о том, что выключение или снижение активности M_4P приводит к развитию инсулиновой резистентности и умеренной гиперинсулинемии, в то время как активация этих рецепторов, напротив, повышает чувствительность тканей к инсулину, в том числе в условиях ожирения и метаболического синдрома (Kievit et al., 2013; Girardet, Butler, 2014). Влияние нарушений в M_3P -опосредуемых сигнальных путях на чувствительность тканей к инсулину изучено в меньшей степени (Begriche et al., 2013). Показано, что самцы $Mc3r^{-/-}$ -мышей, лишенные гена для M_3P , имеют умеренно повышенный уровень инсулина, нарушенную толерантность к глюкозе, характеризуются снижением функциональной активности инсулиновых сигнальных путей в адипоцитах и гепатоцитах (Chen et al., 2000; Sutton et al., 2006). У детей, гомозиготных по гену для M_3P с двумя инактивирующими мутациями Thr^6Lys и $Val^{81}Phe$, отмечены повышение концентрации инсулина в крови и повышение резистентности к гормону в сравнении с детьми, имеющими нормальный вариант гена (Feng et al., 2005). Следует отметить, что указанные мутации ведут к нарушению связывания M_3P с агонистами, ослаблению сопряженных с M_3P сигнальных каскадов и снижению экспрессии мутантного рецептора. Имеются и другие работы, авторы которых установили взаимосвязь между инактивирующими мутациями в гене для M_3P и развитием инсулиновой резистентности (Yiannakouris et al., 2004; Wong et al., 2008). Нами показано, что иммунизация крыс БСА-конъюгированным пептидом A[269—280]A приводит к снижению чувствительности тканей к инсулину, о чем свидетельствуют повышение индекса НОМА-IR и снижение индекса QUICKI. При этом отчетливые изменения в резистентности тканей к инсулину выявляются только при длительном дефиците M_3P — спустя 12 мес после первой иммунизации, что указывает на длительный характер развития инсулиновой резистентности в условиях выработки антител к M_3P . Снижение чувствительности тканей к инсулину является одним из молекулярных механизмов, который приводит к дислипидемии, нарушению энергетического баланса и жировому перерождению тканей. Наряду с развитием инсулиновой резистентности нами установлено, что утилизация глюкозы у иммунизированных крыс усиливается, как это показано в тесте с глюкозной нагрузкой. Причина этого состоит в значительном усилении продукции инсулина β -клетками поджелудочной железы. Это можно рассматривать как уникальную компенсаторную реакцию в ответ на развитие инсулиновой резистентности в условиях снижения активности M_3P . Молекулярные механизмы усиления инсулинпродуцирующей функции поджелудочной железы при выключении M_3P требуют дальнейшего изучения.

Нами установлено, что в крови иммунизированных крыс снижена концентрация тиреоидных гормонов — как тироксина, так и его функционально активного метаболита триодтиронина. Наряду с этим ослаблена чувствительность тканей щитовидной железы к регуляторному действию ТТГ, о чем свидетельствует снижение стимулирующего эффекта этого гормона на базальную активность АЦ в плазматических мембранах, выделенных из тканей щитовидной железы иммунизированных животных. Необходимо отметить, что данные о взаимосвязи между M_3P -зависимыми сигнальными путями в мозге и функциональным состоянием ГТТ оси в настоящее время мало изучены. В то же время имеются работы, в которых

продемонстрирована важная роль M_4P в регуляции функций щитовидной железы (Kim et al., 2000; Lechan, Fekete, 2006; Preston et al., 2011). Так, интрацеребральное введение крысам высокоселективного M_4P -антагониста HS014 в течение 1—2 сут приводило к снижению уровня свободного тироксина в крови крыс (Preston et al., 2011). Однократная инъекция АПП 83—132, низкоселективного M_4P -антагониста, в третий желудочек мозга или в паравентрикулярные ядра гипоталамуса приводила к снижению концентрации ТТГ и fT_4 на 38—44 и 29—37 % соответственно (Kim et al., 2000). Введение пептида 83—132 в течение 7 дней вызывало снижение секреции ТТГ гипофизом на 23—40 %, следствием чего было ослабление всей ГТТ-оси (Small et al., 2001). Введение же этого пептида мышам в течение 3 дней снижало на 15 % уровень тироксина и подавляло экспрессию мРНК прекурсорного белка рилизинг-фактора ТТГ тиролиберина в паравентрикулярных ядрах гипоталамуса (Fekete et al., 2004). Блокирование ингибирующего эффекта АПП на функциональную активность меланокортиновой системы с помощью низкомолекулярного препарата ТТР2515, напротив, приводило к повышению уровня тироксина у крыс (Dutia et al., 2013). Следует, однако, отметить, что дисфункции в ГТТ-оси у животных с экспериментальными моделями недостаточности меланокортиновой системы мозга заметно отличаются от таковых в условиях патологии меланокортиновой системы у человека. Так, у детей с врожденным синдромом дефицита проопиомеланокортина, предшественника различных форм МСГ, агонистов M_3P и M_4P , наблюдались повышение уровня ТТГ и ослабление продукции и секреции тиреоидных гормонов, что указывает на снижение чувствительности щитовидной железы к действию ТТГ (Krude et al., 2003). На основании этих данных, которые хорошо согласуются с полученными нами результатами, можно предположить, что гипотиреоидное состояние развивается при хроническом снижении функциональной активности меланокортиновой сигнальной системы мозга. Дефицит тиреоидных гормонов, возникающий вследствие нарушений в меланокортиновой сигнальной системе мозга, в том числе связанной с ослаблением функций M_3P , может быть непосредственно связан с наблюдаемыми нами и другими авторами изменениями углеводного и липидного обменов.

Таким образом, впервые показано, что длительная, многократная иммунизация крыс с помощью синтезированного нами БСА-конъюгированного пептида, соответствующего третьей внеклеточной петле M_3P , приводит к снижению чувствительности тканей к инсулину, нарушению липидного обмена и ослаблению функций щитовидной железы. Это свидетельствует в пользу того, что ослабление активности M_3P -зависимых сигнальных путей мозга вызывает нарушение периферического метаболизма и функций эндокринной системы, что может быть одной из первопричин развития целого ряда заболеваний. В тех случаях, когда метаболические нарушения у человека сходны с таковыми при аутоиммунном заболевании, вызванном у крыс вследствие их иммунизации пептидом A[269—280]A, целесообразно не только исследовать функциональную активность M_3P , но и осуществлять мониторинг возможного наличия антител к внеклеточным петлям этого рецептора в крови пациентов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 12-04-00434).

Список литературы

- Шпаков А. О. 2011. Пептиды, производные внеклеточных петель рецепторов: структура, механизмы действия, применение в физиологии и медицине. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 97 (5) : 441—458. (Shpakov A. O. 2011. Peptides derived from the extracellular loop of receptors: structure, mechanisms of action and application in physiology and medicine. Ross. Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova. 97 (5) : 441—458.)
- Шпаков А. О., Деркач К. В. 2012. Пептидергические сигнальные системы мозга при сахарном диабете. Цитология. 54 (10) : 733—741. (Shpakov A. O., Derkach K. V. 2012. The brain peptidergic signaling systems in diabetes mellitus. Tsitologiya. 54 (10) : 733—741.)
- Шпакова Е. А., Шпаков А. О., Чистякова О. В., Мойсейчук И. В., Деркач К. В. 2012. Биологическая активность *in vitro* и *in vivo* пептидов, соответствующих третьей цитоплазматической петле рецептора тиреотропина. Докл. РАН. 443 (1) : 123—126. (Shpakova E. A., Shpakov A. O., Chistyakova O. V., Moysyuk I. V., Derkach K. V. 2012. Biological activity *in vitro* and *in vivo* of peptides corresponding to the third intracellular loop of thyrotropin receptor. Dokl. Biochem. Biophys. 433 : 64—67.)
- Begriffe K., Girardet C., McDonald P., Butler A. A. 2013. Melanocortin-3 receptors and metabolic homeostasis. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. 114 : 109—146.
- Buvall L., Bollano E., Chen J., Shultze W., Fu M. 2005. Phenotype of early cardiomyopathic changes induced by active immunization of rats with a synthetic peptide corresponding to the second extracellular loop of the human β_1 -adrenergic receptor. Clin. Exp. Immunol. 143 : 209—215.
- Chen A. S., Marsh D. J., Trumbauer M. E., Frazier E. G., Guan X. M., Yu H., Rosenblum C. I., Vongs A., Feng Y., Cao L., Metzger J. M., Strack A. M., Camacho R. E., Mellin T. N., Nunes C. N., Min W., Fisher J., Gopal-Truter S., MacIntyre D. E., Chen H. Y., Van der Ploeg L. H. 2000. Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. Nat. Genet. 26 : 97—102.
- Dutia R., Kim A. J., Modes M., Rothlein R., Shen J. M., Tian Y. E., Ihbais J., Victory S. F., Valcarce C., Wardlaw S. L. 2013. Effects of AgRP inhibition on energy balance and metabolism in rodent models. PLoS ONE. 8 (6) : e65317. doi: 10.1371/journal.pone.0065317.
- Fekete C., Marks D. L., Sarkar S., Emerson C. H., Rand W. M., Cone R. D., Lechan R. M. 2004. Effect of Agouti-related protein in regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in the melanocortin 4 receptor knockout mouse. Endocrinology. 145 : 4816—4821.
- Feng N., Young S. F., Aguilera G., Puricelli E., Adler-Waitles D. C., Sebring N. G., Yanovski J. A. 2005. Co-occurrence of two partially inactivating polymorphisms of MC3R is associated with pediatric-onset obesity. Diabetes. 54 : 2663—2667.
- Girardet C., Butler A. A. 2014. Neural melanocortin receptors in obesity and related metabolic disorders. Biochim. biophys. acta. 1842 : 482—494.
- Humphreys M. H., Ni X. P., Pearce D. 2011. Cardiovascular effects of melanocortins. Eur. J. Pharmacol. 660 : 43—52.
- Katz A., Nambi S. S., Mather K., Baron A. D., Follmann D. A., Sullivan G., Quon M. J. 2000. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. J. Clin. Endocrinol. Metab. 85 : 2402—2410.
- Kievit P., Halem H., Marks D. L., Dong J. Z., Glavas M. M., Sinnayah P., Pranger L., Cowley M. A., Grove K. L., Culler M. D. 2013. Chronic treatment with a melanocortin-4 receptor agonist causes weight loss, reduces insulin resistance, and improves cardiovascular function in diet-induced obese rhesus macaques. Diabetes. 62 : 490—497.
- Kim M. S., Small C. J., Stanley S. A., Morgan D. G., Seal L. J., Kong W. M., Edwards C. M., Abusnana S., Sunter D., Ghatei M. A., Bloom S. R. 2000. The central melanocortin system affects the hypothalamo-pituitary thyroid axis and may mediate the effect of leptin. J. Clin. Invest. 105 : 1005—1011.
- Krude H., Biebermann H., Schnabel D., Tansek M. Z., Theunissen P., Mullis P. E., Gruters A. 2003. Obesity due to proopiomelanocortin deficiency: three new cases and treatment trials with thyroid hormone and ACTH4-10. J. Clin. Endocrinol. Metab. 88 : 4633—4640.
- Lechan R. M., Fekete C. 2006. Role of melanocortin signaling in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis. Peptides. 27 : 310—325.
- Matsui S., Fu M. L. 2006. Pathological importance of anti-G-protein coupled receptor autoantibodies. Int. J. Cardiol. 112 : 27—29.
- Matthews D. R., Hosker J. P., Rudenski A. S., Naylor B. A., Treacher D. F., Turner R. C. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia. 28 : 412—419.
- Ni X. P., van Dijk C., Pearce D., Humphreys M. H. 2009. Evidence for a noradrenergic mechanism causing hypertension and abnormal glucose metabolism in rats with relative deficiency of gamma-melanocyte-stimulating hormone. Exp. Physiol. 94 : 867—876.
- Nijenhuis W. A., Oosterom J., Adan R. A. 2001. AgRP(83-132) acts as an inverse agonist on the human-melanocortin-4 receptor. Mol. Endocrinol. 15 : 164—171.
- Perez-Tilve D., Hofmann S. M., Basford J., Nogueiras R., Pfluger P. T., Patterson J. T., Grant E., Wilson-Perez H. E., Granholm N. A., Arnold M., Trevaskis J. L., Butler A. A., Davidson W. S., Woods S. C., Benoit S. C., Sleeman M. W., DiMarchi R. D., Hui D. Y., Tschöp M. H. 2010. Melanocortin signaling in the CNS directly regulates circulating cholesterol. Nat. Neurosci. 13 : 877—882.
- Preston E., Cooney G. J., Wilks D., Baran K., Zhang L., Kraegen E. W., Sainsbury A. 2011. Central neuropeptide Y infusion and melanocortin 4 receptor antagonism inhibit thyrotropic function by divergent pathways. Neuropeptides. 45 : 407—415.
- Reina S., Sterin-Borda L., Orman B., Borda E. 2004. Autoantibodies against cerebral muscarinic cholinergic receptors in Sjogren syndrome: functional and pathological implications. J. Neuroimmunol. 150 : 107—115.
- Renquist B. J., Lippert R. N., Sebg J. A., Ellacott K. L., Cone R. D. 2011. Physiological roles of the melanocortin MC3 receptor. Eur. J. Pharmacol. 660 : 13—20.
- Renquist B. J., Murphy J. G., Larson E. A., Olsen D., Klein R. F., Ellacott K. L., Cone R. D. 2012. Melanocortin-3 receptor regulates the normal fasting response. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 109 : E1489—E1498.
- Shpakov A. O. 2011. Signal protein-derived peptides as functional probes and regulators of intracellular signaling. J. Amino Acids. 2011 : DOI:10.4061/2011/656051.
- Shpakov A., Chistyakova O., Derkach K., Bondareva V. 2011. Hormonal signaling systems of the brain in diabetes mellitus. In: Neurodegenerative diseases — processes, prevention, protection and monitoring (Ed. by R. C.-C. Chang). Rijeka, Croatia: Intech. Open Access Publ., 349—386.
- Shpakov A. O., Shpakova E. A., Tarasenko I. I., Derkach K. V., Vlasov G. P. 2010. The peptides mimicking the third intracellular loop of 5-hydroxytryptamine receptors of the types 1B and 6 selectively activate G proteins and receptor-specifically inhibit serotonin signaling via the adenylyl cyclase system. Int. J. Pept. Res. Ther. 16 : 95—105.
- Small C. J., Kim M. S., Stanley S. A., Mitchell J. R., Murphy K., Morgan D. G., Ghatei M. A., Bloom S. R. 2001. Effects of chronic central nervous system administration of agouti-related protein in pair-fed animals. Diabetes. 50 : 248—254.
- Sutton G. M., Trevaskis J. L., Hulver M. W., McMillan R. P., Markward N. J., Babin M. J., Meyer E. A., Butler A. A. 2006. Diet-genotype interactions in the development of the obese, insulin-resistant phenotype of C57BL/6J mice lacking melanocortin-3 or -4 receptors. Endocrinology. 147 : 2183—2196.
- Wachira S. J., Guruswamy B., Uradu L., Hughes-Darden C. A., Denaro F. J. 2007. Activation and endocytic internalization of melanocortin 3 receptor in neuronal cells. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1096 : 271—286.

Wong J., Nock N. L., Xu Z., Kyle C., Daniels A., White M., Yue D. K., Elston R. C., Mountjoy K. G. 2008. A polymorphism (D20S32e) close to the human melanocortin receptor 3 is associated with insulin resistance but not the metabolic syndrome. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 80 : 203—207.

Yiannakouris N., Melistas L., Kontogianni M., Heist K., Mantzoros C. S. 2004. The Val⁸¹ missense mutation of the melanocortin 3 receptor gene, but not the 1908c/T nucleotide polymorphism in

lamin A/C gene, is associated with hyperleptinemia and hyperinsulinemia in obese Greek caucasians. *J. Endocrinol. Invest.* 27 : 714—720.

Xu Y., Elmquist J. K., Fukuda M. 2011. Central nervous control of energy and glucose balance: focus on the central melanocortin system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1243 : 1—14.

Поступила 12 V 2014

THE INFLUENCE OF IMMUNIZATION OF RATS WITH BSA-CONJUGATED PEPTIDE 269—280
OF TYPE 3 MELANOCORTIN RECEPTOR ON THE METABOLIC PARAMETERS
AND THYROID FUNCTIONS

K. V. Derkach,¹ E. A. Shpakova,² O. A. Zharova,³ V. M. Bondareva,¹ A. O. Shpakov¹, *

¹ I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS,

² Institute of Macromolecular Compounds RAS, St. Petersburg,

and ³ Pharmaceutical Company OOO «Teva», Yaroslavl;

* e-mail: alex_shpakov@list.ru

One of the approaches to study the role of the brain hormonal signaling systems in the regulation of biochemical and physiological processes is their shutdown using the antibodies generated to peptides corresponding to extracellular regions of receptors. The brain type 3 melanocortin receptors (M₃R) play an important role in the central regulation of the metabolism and the endocrine system. However, the influence of prolonged inhibition of M₃R on energy metabolism, insulin resistance, and thyroid gland (TG) function is practically not studied. The aim of the study was to investigate the influence of prolonged repeated immunization of male rats with the BSA-conjugated peptide Ala-[Pro-Thr-Asn-Pro-Tyr-Cys-Ile-Cys-Thr-Thr-Ala-His^{269—280}]-Ala (A[269—280]A) corresponding to the third extracellular loop of M₃R on their metabolic parameters and functional activity of TG. 9 months after the first immunization, the weight of rats was reduced and after 12—13 months was significantly lower than in controls. The weight of abdominal and brown adipose tissues, on the contrary, increased. At the same timeline there was an increase in the fasting glucose and insulin levels, and increase of the HOMA-IR index (by 75 %) indicating that immunized animals develop insulin resistance. The rats have increased glucose utilization due to an increase of insulin production by pancreatic β -cells. 12 months after the first immunization, the increase of the triglycerides level (by 74 %) and the ratio of LDL- and HDL-cholesterol (by 36 %) were revealed. 13 months after the start of immunization, the levels of free and total thyroxine and total triiodothyronine significantly decreased. In the TG plasma membranes of immunized rats the weakening adenylyl cyclase stimulating effect of thyroid-stimulating hormone was detected. Thus, long-term decrease in the brain M₃R activity due to repeated immunization of rats with BSA-conjugated peptide A[269—280]A induces the disturbances of the peripheral metabolism and TG function.

Key words: adenylyl cyclase, dyslipidemia, insulin resistance, type 3 melanocortin receptor, peptide, thyroid hormone, glucose tolerance, the third extracellular loop, thyroid.