

ЖАРОВА
Ольга Алексеевна

**МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ И ГОРМОНАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ У КРЫС,
ИММУНИЗИРОВАННЫХ ФРАГМЕНТАМИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ
ПЕТЕЛЬ МЕЛАНКОРТИНОВЫХ И СЕРОТОНИНОВЫХ
РЕЦЕПТОРОВ**

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2018

Работа выполнена в лаборатории молекулярной эндокринологии и нейрехимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук

Научный руководитель:

Шпак Александр Олегович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной эндокринологии и нейрехимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук

Официальные оппоненты:

Кокряков Владимир Николаевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией общей патологии Отдела общей патологии и патофизиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины».

Маслюков Петр Михайлович, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой нормальной физиологии с биофизикой Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), Новосибирск

Защита состоится «29» мая 2018 г. в 11 часов на заседании Диссертационного совета Д 002.127.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44), тел. (812)-552-79-01, электронная почта office@iephb.ru, сайт <http://www.iephb.ru>.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ИЭФБ РАН по адресу: 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44, с авторефератом на сайте ВАК РФ, с авторефератом и диссертацией на сайте <http://www.iephb.ru>

Автореферат разослан « ___ » _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета:

доктор биологических наук



Р.Г.Парнова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Ожирение в последние годы охватило более 40 % взрослого населения, и его распространение носит эпидемиологический характер. Одним из серьезных последствий ожирения является развитие метаболического синдрома (МС) и сахарного диабета 2-го типа (СД2), для которых характерны инсулиновая резистентность (ИР), дислипидемия, сердечно-сосудистая патология, нарушения функций эндокринной системы. Ожирение развивается постепенно, под влиянием генетических факторов, неправильного питания, дисфункций в ЦНС и на периферии (Feng et al., 2010; Ghosh, Bouchard, 2017). Ключевую роль в развитии ожирения, МС и СД2 играют нарушения в сигнальных системах мозга, регулирующих пищевое поведение, энергетический обмен и чувствительность тканей к инсулину (Donato, 2012; Shpakov et al., 2015). Среди таких систем центральное место занимают меланокортиновая и серотониновая системы. Их активность в значительной степени определяется функциональным состоянием рецепторных компонентов этих систем – меланокортиновых рецепторов 3-го (МК₃Р) и 4-го типов (МК₄Р), а также серотониновых рецепторов 1-го типа (С₁Р), которые в значительных количествах присутствуют в различных отделах мозга, в том числе в гипоталамических нейронах (Bouwknicht et al., 2001; Xu et al., 2008; Begriche et al., 2013; Kievit et al., 2013).

В отношении МК₃Р и МК₄Р в ЦНС имеются свидетельства того, что их фармакологическое ингибирование, а также выключение кодирующих эти рецепторы генов или инактивирующие мутации в них приводят к развитию метаболических, гормональных и функциональных нарушений (Farooqi et al., 2003; Шпаков, Деркач, 2015; You et al., 2016). Однако генетические модели уже на ранних стадиях онтогенеза вызывают значительные перестройки всей интегративной сети гормональных сигнальных систем мозга, в то время как ингибирующие эффекты антагонистов МК₃Р и МК₄Р являются краткосрочными. Поскольку у пациентов с ожирением, МС и СД2 нарушения меланокортинового сигналинга, как правило, носят длительный характер, то для изучения молекулярных механизмов, лежащих в основе этиологии и патогенеза ожирения меланокортинового типа и ассоциированных с ним функциональных и метаболических расстройств, необходимы экспериментальные модели, в основе которых лежит длительное подавление активности МК₃Р и МК₄Р.

Одной из наиболее перспективных моделей таких расстройств может являться аутоиммунное подавление функций МК₃Р и МК₄Р, тем более что в крови некоторой части пациентов с ожирением и другими метаболическими расстройствами выявлены специфичные антитела к МК₄Р и меланокортиновым пептидам, агонистам этих рецепторов (Fetissof et al., 2008; Peter et al., 2009). При этом сведения о взаимосвязи между наличием антител к МКР и развитием ожирения и МС крайне противоречивы, а

Сокращения: АЦ – аденилатциклаза; АЦСС – аденилатциклазная сигнальная система; ГИДФ – гуанилилимидодифосфат; ГТТ – глюкозотолерантный тест; ИГТТ – инсулин-глюкозотолерантный тест; ИП – иммунопозитивность, ИР – инсулиновая резистентность; ЛПНП, ЛПОНП, ЛПВП – липопротеиды низкой, очень низкой и высокой плотности; МК₃Р, МК₄Р – меланокортиновый рецептор 3-го или 4-го типов; МС – метаболический синдром; МСГ – меланоцитстимулирующий гормон; 5-НОТ – 5-нонилоситриптамин; ОХ – общий холестерин; СД2 – сахарный диабет 2-го типа; С_{1А}Р, С_{1В}Р – серотониновый рецептор 1А или 1В подтипов; тТ₃ – общий трийодтиронин; тТ₄, фТ₄ – общий и свободный тироксин; ТГ – триглицерид; ТТГ – тиреотропный гормон; ЩЖ – щитовидная железа; PАСАР-38 – гипофизарный АЦ-активирующий полипептид-38; PBS – фосфатный буфер.

механизмы, связывающие длительное аутоиммунное ингибирование МК₃Р и МК₄Р с метаболическими, гормональными и функциональными нарушениями в ЦНС и на периферии не исследованы. В связи с этим, одной из актуальных проблем современной биохимии и молекулярной медицины является изучение влияния длительного аутоиммунного подавления функций МК₃Р и МК₄Р на метаболические и гормональные показатели, а также на активность гормональных сигнальных систем в мозге и на периферии, участвующих в регуляции энергетического гомеостаза, в функционировании ЦНС, сердечно-сосудистой, эндокринной и других систем организма.

В отношении влияния длительного аутоиммунного подавления функциональной активности С₁Р на гормональные и метаболические показатели информация отсутствует несмотря на то, что имеются клинические данные об обнаружении антител к различным типам СР у пациентов с психическими и сердечно-сосудистыми заболеваниями (Tanaka et al., 2003; Breidert et al., 2012). Поскольку имеются основания полагать, что С₁Р могут также регулировать функции эндокринной системы и участвовать в контроле некоторых метаболических процессов, представляется необходимым изучить, как аутоиммунное выключение С₁Р влияет на эти процессы. Актуальность такого подхода обусловлена тем, что агонисты и антагонисты С₁Р широко применяются в медицине (Celada et al., 2013), и это требует понимания молекулярных механизмов и мишеней их действия, как в ЦНС, так и на периферии. Наряду с этим, важно выяснить возможную роль нарушений в С₁Р-серотониновой системе в этиологии и патогенезе ряда заболеваний, которые связывают с дисфункциями серотониновой сигнализации в ЦНС и на периферии.

Основной мишенью меланокортиновых пептидов, действующих через МК₃Р и МК₄Р, а также серотонина, действующего через С₁Р, является аденилатциклазная сигнальная система (АЦСС), которая, наряду с гормональным рецептором, включает гетеротримерные G-белки стимулирующего (G_s) или ингибирующего (G_i) типов, и фермент аденилатциклазу (АЦ), катализирующий синтез циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), универсального вторичного посредника (Kamenetsky et al., 2006; Omori, Kotera, 2007). Изменение уровня цАМФ в клетке приводит к изменению активности множества цАМФ-зависимых эффекторных белков и транскрипционных факторов, вовлеченных в контроль фундаментальных клеточных процессов. АЦСС ответственна за гормональную регуляцию нервной, сердечно-сосудистой, эндокринной и других систем, а также за протекание липолитических процессов в жировой ткани. В условиях ожирения и других метаболических расстройств функциональная активность АЦСС в мозге и в периферических органах и тканях претерпевает значительные изменения, что является одной из ключевых причин развития нейродегенеративных, сердечно-сосудистых и эндокринных заболеваний (Berthouze et al., 2011; Shpakov, Derkach, 2013; Шпаков, Деркач, 2015). Однако данные о функциональном состоянии и гормональной чувствительности АЦСС в условиях аутоиммунного подавления активности рецепторов, функционально сопряженных с АЦ, в том числе МКР и СР, отсутствуют, в результате чего механизмы, которые лежат в основе развития метаболических, функциональных и гормональных дисфункций под влиянием длительного аутоиммунного ингибирования рецепторных компонентов АЦСС, остаются не выясненными.

Цель работы состояла в изучении метаболических и гормональных показателей, а также функциональной активности АЦСС в различных тканях у крыс, длительное время иммунизированных пептидами, производными внеклеточных участков меланокортиновых рецепторов 3-го и 4-го типа и серотонинового рецептора 1В-подтипа.

Для достижения цели были поставлены следующие **основные задачи**:

1. Изучить метаболические показатели, тиреоидный статус и активность АЦСС в мозге и периферических тканях крыс, иммунизированных БСА-конъюгированным пептидом, производным фрагмента N-концевого участка 11-[KTSLHLWNRSSHGLHGA]-25 МК₄P крысы.
2. Изучить метаболические показатели, тиреоидный статус и активность АЦСС в мозге и периферических тканях крыс, иммунизированных БСА-конъюгатом пептида, производного фрагмента третьей внеклеточной петли 269-[ARTNPYC(Acm)IC(Acm)YТАНА]-280 МК₃P крысы.
3. Изучить метаболические показатели, состояние тиреоидной системы, функциональную активность АЦСС в мозге крыс, иммунизированных БСА-конъюгатом пептида, производного фрагмента второй внеклеточной петли 189-[QAКАЕЕЕVSEC(Acm)VVNTDHA]-205 СР 1В-подтипа (С_{1В}P) крысы.
4. В условиях *in vitro* изучить влияние антител, выделенных из крови крыс, иммунизированных пептидами, соответствующими участкам 11–25 МК₄P, 269–280 МК₃P и 189–205 С_{1В}P, на активность АЦ в мембранах, выделенных из гипоталамуса интактных крыс.

Научная новизна

Впервые с помощью многократной иммунизации крыс БСА-конъюгатами пептидов, соответствующих внеклеточным участкам МК₃P, МК₄P и С_{1В}P, созданы длительные модели аутоиммунного ингибирования функциональной активности этих рецепторов и изучено влияние такой иммунизации на широкий спектр метаболических и гормональных показателей. Впервые показано, что длительная иммунизация крыс МК₄P- и МК₃P-пептидами ведет к метаболическим и гормональным нарушениям (дислипидемии, нарушенной толерантности к глюкозе, ИР, снижению уровня тиреоидных гормонов), причем иммунизация МК₄P-пептидом приводила к повышению массы тела, в то время как иммунизация МК₃P-пептидом вызывала ее снижение, хотя в обоих случаях отмечали повышение массы и удельного содержания жировой ткани.

Впервые выявлены изменения функциональной активности гормоночувствительной АЦСС в мозге и на периферии – в миокарде, эпидидимальном жире, семенниках, щитовидной железе (ЩЖ). В мозге это выражалось в изменении регуляторных эффектов агонистов дофаминовых и серотониновых рецепторов и соотношения активности МК₃P- и МК₄P-меланокортиновых путей. В миокарде менялось соотношение стимулирующих АЦ сигнальных путей, реализуемых через β_1 -, β_2 - и β_3 -адренергические рецепторы (β -АР), в то время как в эпидидимальном жире эти пути ослаблялись. В семенниках и ЩЖ отмечали снижение чувствительности АЦСС к хорионическому гонадотропину человека (ХГЧ) и тиреотропному гормону (ТТГ). Все эти изменения в АЦСС, как мы полагаем, являются одними из ключевых причин выявленных метаболических и гормональных нарушений у крыс, иммунизированных МК₄P- и МК₃P-пептидами.

У крыс, иммунизированных БСА-конъюгатом пептида 189–205 С_{1В}P, выявлены дисфункции тиреоидной системы, что является первым доказательством функциональной взаимосвязи между тиреоидной системой и С_{1В}P-серотониновой системой. Впервые выявлены изменения активности АЦСС в мозге крыс, иммунизированных С_{1В}P-пептидом, в том числе компенсаторное усиление ингибирующего АЦ эффекта агониста С_{1А}P в условиях подавления негативной регуляции АЦ серотонином через С_{1В}P.

Впервые были выделены и функционально охарактеризованы по способности влиять на активность АЦСС антитела, выработанные вследствие длительной иммунизации крыс пептидами 11–25 МК₄Р, 269–280 МК₃Р и 189–205 С_{1В}Р, и установлена специфичность их действия в отношении рецепторов, гомологичных этим пептидам.

Научно-практическая ценность работы

Полученные новые данные о том, что длительное аутоиммунное ингибирование МК₄Р и МК₃Р приводит к увеличению массы жировой ткани, дислипидемии и ИР, а также к нарушениям гормональной регуляции АЦСС в мозге и периферических тканях подтверждают ключевую роль ослабления меланокортиновой сигнализации в развитии ожирения, МС и СД2, а также свидетельствуют о возможных молекулярных механизмах, лежащих в основе развития и патогенеза этих заболеваний. На основании вышесказанного может быть обоснована необходимость скрининга пациентов с ожирением и другими метаболическими расстройствами, в том числе с неясным генезом, на наличие антител к МК₄Р и МК₃Р, тем более что у части из них выявлены антитела к МК₄Р и их агонистам. Все это позволяет выяснить первопричины метаболических нарушений и разработать оптимальные пути их коррекции. Снижение уровня тиреоидных гормонов при ослаблении МК₄Р- и МК₃Р-сигнализации, а также при аутоиммунном подавлении С_{1В}Р указывает на исключительно важную роль меланокортиновой и серотониновой систем в функционировании тиреоидной оси, и открывает новые возможности для разработки фармакологических подходов для предупреждения гипотиреоидных состояний. Соответственно, скрининг на антитела к рецепторам МК₄Р, МК₃Р и С_{1В}Р может быть необходим и при различных формах патологии тиреоидной системы, в том числе при гипотиреозе, ассоциированном с ожирением и МС, а также при дефиците ТТГ. Полученные результаты и сделанные на их основе теоретические и практические выводы могут быть использованы при подготовке курсов лекций по биохимии, молекулярной эндокринологии, иммунологии и фармакологии для студентов биологических и медицинских вузов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Длительная иммунизация крыс БСА-конъюгированным пептидным фрагментом N-концевого участка МК₄Р приводит к развитию ожирения, нарушению толерантности к глюкозе, ИР, дефициту тиреоидных гормонов, дисфункциям в гормоночувствительной АЦСС в мозге, миокарде, семенниках, ЩЖ и эпидидимальном жире иммунизированных крыс.
2. Длительная иммунизация крыс БСА-конъюгированным пептидным фрагментом третьей внеклеточной петли МК₃Р приводит к повышению массы жировой ткани и нарушению липидного обмена, изменению глюкозного гомеостаза, снижению уровня тиреоидных гормонов, изменению чувствительности АЦ в мозге и периферических тканях к гормональной регуляции.
3. Длительная иммунизация крыс БСА-конъюгированным пептидным фрагментом второй внеклеточной петли С_{1В}Р, хотя и оказывает слабое влияние на метаболические показатели, но при этом подавляет функции тиреоидной оси и вызывает специфические изменения активности АЦСС в мозге.
4. Выделенные из крови иммунизированных крыс антитела к внеклеточным участкам МК₄Р, МК₃Р и С_{1В}Р селективно блокируют передачу гормональных сигналов через эти рецепторы, действуя как их функциональные антагонисты.

Апробация работы

Результаты исследований представлены на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Трансляционные исследования в инновационном развитии здравоохранения» (Санкт-Петербург, 2014), Всероссийской конференции с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга» (Санкт-Петербург–Колтуши, 2014), Международном научном форуме «Иммунитет и аллергия: взгляд в будущее» (Москва, 2015), IX Всероссийской конференции «Нейроэндокринология–2015» (Санкт-Петербург, 2015), II Всероссийской научной конференции с международным участием «Современные проблемы нейробиологии: Структура и функции нервной системы в норме и патологии» (Ярославль, 2016), Всероссийской конференции с международным участием «Командный подход в современной эндокринологии» (Санкт-Петербург, 2016), 12-ом Международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2016), XV Международном совещании и VIII Школе по эволюционной физиологии (Санкт-Петербург, 2016), XLVI «Неделе науки СПбПУ» (Санкт-Петербург, 2017), Всероссийском симпозиуме с международным участием «Стресс: физиологические эффекты, патологические последствия и способы их предотвращения» (Санкт-Петербург, 2017).

Публикации

По материалам диссертации опубликованы 22 печатных работы, в том числе 7 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ для защиты кандидатских диссертаций.

Личный вклад автора

Все экспериментальные результаты, приведенные в диссертационной работе, получены лично автором или при его непосредственном участии. Автор проводил статистическую обработку полученных данных, осуществлял их анализ и обобщение, принимал участие в подготовке публикаций по материалам работы.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 142 страницах и состоит из списка сокращений, Введения, Обзора литературы (глава 1), описания методических подходов (глава 2), описания результатов исследования (глава 3) и их обсуждения (глава 4), а также выводов и списка литературы, который включает 209 источников. Работа иллюстрирована 27 рисунками и 14 таблицами.

Благодарности.

Работа выполнялась при финансовой поддержке РФФИ (№ 12-04-00434) и РНФ (№ 14-15-00413).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы представлены сведения о функционировании регулируемых меланокортиновыми пептидами и серотонином сигнальных систем, в том числе АЦСС, а также об участии этих систем в контроле энергетического обмена, гормонального статуса, функциональной активности ЦНС и периферических органов и тканей.

Всесторонне проанализированы данные о роли нарушений в меланокортиновой и серотониновой сигнальных системах в этиологии и патогенезе ожирения и метаболического синдрома. Обобщены и систематизированы данные об аутоиммунных заболеваниях, вызванных антителами к гормональным рецепторам, а также о возможных путях для их лечения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реагенты и материалы. Норадреналин, дофамин, бромокриптин, серотонин, α - и γ -меланоцитстимулирующие гормоны (МСГ), МК₄P-агонист ТНIQ, С₆P-агонист EMD-386088, С_{1В}P-агонист 5-нонилокситриптамин (5-НОТ), β_3 -агонисты BRL-37344 и CL-316243, PACAP-38, агонисты А₁- и А₂-аденозиновых рецепторов – N⁶-циклопентиладенозин и CGS-21680, гуанилилимидодифосфат (ГИДФ), форсколин получены из фирм «Sigma» (США) и «Tocris Cookson Ltd.» (Великобритания). Пептиды и их БСА-конъюгаты синтезированы в ИВС РАН (Санкт-Петербург). [α -³²P]АТФ произведен ОАО «Изотоп» (Россия). Для ИФА и вестерн блоттинга использовали вторичные антитела Goat-anti-Rat IgG HRP («Millipore», Германия). Остальные реактивы из фирм «Sigma» (США) и «Fluka» (Швейцария).

Иммунизация животных. Для экспериментов использовали полуторамесячных самцов крыс Wistar, которых разделили на 4 группы – контроль (группа К, n=6) и крыс, иммунизированных с помощью БСА-конъюгатов К-[TSLHLWNRSSHGLHG¹¹⁻²⁵]-А, производного внеклеточного N-концевого участка МК₄P (М₄P, n=9), А-[PTNPYC(Асм)IC(Асм)ТТАН²⁶⁹⁻²⁸⁰]-А (Асм – ацетамидометил), производного третьей внеклеточной петли МК₃P (М₃P, n=6) и [QAKAEVSEC(Асм)VVNTDH¹⁸⁹⁻²⁰⁵]-А, производного второй внеклеточной петли С_{1В}P (С₁P, n=6). Для всех групп схема иммунизации включала 8 инъекций БСА-конъюгата пептида, которые проводили п/к в межлопаточную область в 1, 30, 60, 90, 190, 300, 320 и 360-й дни эксперимента. Для 1-й иммунизации использовали раствор БСА-конъюгата в полном адьюванте Фрейнда, для 2-й и 3-й иммунизаций – БСА-конъюгат в неполном адьюванте, последующие иммунизации проводили с помощью БСА-конъюгата пептида без адьюванта. Дозы БСА-конъюгированных пептидов составили при 1-м и 2-м введениях – 20 мкг, при 3-м – 40 мкг, при дальнейших введениях – 50 мкг на крысу. Контрольных крыс обрабатывали сходным образом, но без БСА-конъюгата.

Полуколичественная оценка титров антител методом иммуноферментного анализа (ИФА). Для оценки иммунного ответа разработали оригинальную методику непрямого ИФА с использованием плат с иммобилизованными на них пептидами. Сорбцию пептидов проводили на иммунобиологическом пластике Nunc MaxiSorp (Thermo Fisher Scientific, Inc., Дания). Посадку пептидов 11–25 МК₄P и 269–280 МК₃P на плату проводили в 0.1 М PBS (pH 7.3) с учетом значений их изоэлектрической точки (pI), которые составили 10.61 и 6.43. Посадку более кислого пептида 189–205 С_{1В}P (pI 4.13) проводили в 0.1 М глициновом буфере (pH 3.0). Значения pI определяли с помощью алгоритма Kozlowski (<http://isoelectric.ovh.org>). Для анализа иммунопозитивности (ИП) сывороток в лунки планшета с сорбированным на пластик пептидом вносили 100 мкл образца, разбавленного PBS (pH 7.4, 1:100), инкубировали (1 ч, 37 °С), удаляли не связавшиеся белки трехкратной промывкой PBS, содержащим 0.05% Tween-20, вносили 100 мкл раствора вторичных антител Goat-anti-Rat IgG HRP, в PBS (1:50000–1:75000), инкубировали в тех же условиях и промывали PBS-Tween-20. Далее в лунки планшета вносили по 100 мкл раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина, и после развития окраски (10–15 мин) реакцию останавливали 0.1 М HCl. Измерение оптической плотности (ОП) проводили на фотометре «Anthos 2020» (Anthos Labtec Instruments GmbH, Австрия) при длине волны 450 нм. Рассчитывали индекс ИП, как отношение средней оптической плотности к критической оптической плотности ($M+3SD$ в лунках с индивидуальными сыворотками контрольных крыс). Иммунную реакцию считали отрицательной, если индекс ИП < 0.9, и положительной, если индекс ИП \geq 1.

Определение метаболических и гормональных показателей. Кровь для анализа на гормоны и липиды получали из хвостовой вены. Концентрацию инсулина измеряли с помощью набора «Rat Insulin ELISA» (MercoDIA AB, Швеция), уровни свободного (fT_4) и общего (tT_4) тироксина и общего трийодтиронина (tT_3) определяли с помощью наборов «ИФА-Св T_4 -1», «ИФА- T_4 -1» и «ИФА- T_3 -1» (ЗАО «НВО ИммуноТех», Россия), уровни тиреотропного гормона (ТТГ) с помощью набора «Rat-TSH» (Cusabio Biotech Co. Ltd., Китай). Уровни триглицеридов (ТГ), общего холестерина (ОХ), комплекса холестерина с липопротеинами высокой (ЛПВП), низкой (ЛПНП) и очень низкой (ЛПОНП) плотности оценивали колориметрическими методами с помощью наборов «Ольвекс Диагностикум» (Россия). Уровень глюкозы определяли в цельной крови с помощью тест-полосок и глюкометра «One Touch Ultra» (США). В глюкозотолерантном тесте (ГТТ), в/б вводили глюкозу (2 г/кг) и измеряли ее уровень в крови через 15, 30, 60 и 120 мин. В инсулинглюкозотолерантном тесте (ИГТТ) одновременно вводили глюкозу (2 г/кг, в/б) и инсулин «Хумалог» (0.8 МЕ/кг, п/к) и измеряли уровень глюкозы через 15, 30, 60 и 120 мин.

Выделение фракций плазматических мембран из тканей крыс. Фракции плазматических мембран выделяли из тканей мозга, в том числе отдельно гипоталамуса, семенников, миокарда и ЩЖ в конце эксперимента (через 13 месяцев после 1-й иммунизации). С помощью Политрона ткани измельчали и гомогенизировали в охлажденном до +4 °С 50 мМ Tris-HCl буфере (pH 7.4), содержащем 5 мМ MgCl₂, 320 мМ сахарозы и ингибиторы протеаз (буфер А). Для получения синаптосомальных мембран гомогенат тканей мозга или гипоталамуса центрифугировали (1000 g, 10 мин), осадок отбрасывали, супернатант повторно центрифугировали (9000 g, 20 мин), осадок ресуспендировали в буфере А без сахарозы, центрифугировали при 35000 g в течение 10 мин. Для получения мембран из миокарда гомогенат центрифугировали (480 g, 10 мин), осадок отбрасывали, супернатант центрифугировали (27 500 g, 20 мин), полученный осадок ресуспендировали в буфере А без сахарозы и повторно центрифугировали в том же режиме. Для выделения фракций тестикулярных мембран гомогенат центрифугировали (1500 g, 10 мин), осадок отбрасывали, супернатант центрифугировали (20000 g, 30 мин), полученный осадок ресуспендировали в буфере А без сахарозы и повторно центрифугировали (20000 g, 30 мин). Выделение фракций мембран из ЩЖ проводили по методу (Неума, Harrison, 1984). Полученные фракции мембран ресуспендировали в буфере А и использовали для определения активности АЦ.

Выделение и очистка антител. Фракции антител из сывороток выделяли последовательной их обработкой каприловой кислотой и сульфатом аммония (Temroni et al., 1989). Для этого пул сывороток разбавляли 0.36% (w/v) уксусной кислотой, вносили по каплям каприловую кислоту, доводили pH до 4.5, перемешивали и центрифугировали (14 900g, 20 мин). Супернатант подвергали диализу (24 ч) против 50-кратного объема PBS (размер ячейки – 12 кДа), вносили сульфат аммония (0.277 г/мл), раствор центрифугировали и снова подвергали диализу. Полученную фракцию смешивали с глицерином (1:1, v/v) и хранили при -20°C. Концентрацию антител определяли спектрофотометрическим методом, чистоту препарата контролировали с помощью гель-электрофореза в ПААГ, активность антител – с помощью ИФА.

Иммуноблоттинг. Ткани гипоталамуса гомогенизировали (1:20, w/v) в лизирующем буфере – 20 мМ Tris-HCl (pH 6.8), содержащем 25 мМ ЭДТА, 0.1% Triton X-100, ингибиторы протеаз и фосфатаз. Полученный гомогенат центрифугировали (1000 g, 10 мин), к супернатанту добавляли (3:1, v/v) солюбилизирующий буфер – 200 мМ Tris-HCl (pH 6.8), содержащий 400 мМ β-меркаптоэтанола, 4% SDS, 40% глицерина, 0.01%

бромфенолового синего. Пробы нагревали (+95 °С, 3 мин). ПААГ-электрофорез проводили в камере «Mini-Protean Tetra Cell» («Bio-Rad», США), используя 10 % разделяющий и 4% концентрирующий гель, при силе тока 25 А на 1 гель. После разделения в ПААГ пробы переносили на нитроцеллюлозную мембрану (0.45 мкм, «Bio-Rad», США). Мембраны обрабатывали блокирующим раствором (5% раствор сухого обезжиренного молока в 20 мМ Tris-HCl-буфере (pH 7.6), содержащем 150 мМ NaCl и 0.1% Tween-20, в течение 1 ч, затем в течение ночи (+4° С) инкубировали с первичными антителами, выделенными из сывороток иммунизированных животных (1:200–1:400). В качестве вторичных антител использовали Goat-anti-Rat IgG HRP (1:5000) («Millipore», Германия). Для детекции использовали набор для иммунохемилюминесценции (Novex ECL Reagents, «Invitrogen», США).

Определение активности аденилатциклазы. Активность АЦ (ЕС 4.6.1.1) определяли радиоизотопным методом. 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 50–100 мкг мембранного белка. Активность АЦ выражали в пмоль цАМФ/мин/мг мембранного белка. Для измерения [α -³²P]-цАМФ использовали сцинтилляционный счетчик 1209/1215 RackBeta («ЛКВ», Швеция). Базальную активность АЦ измеряли в отсутствие гормонов и негормональных агентов, а ингибирующий эффект гормонов на АЦ изучали по их влиянию на стимуляцию АЦ форсколином (10⁻⁵ М), эффект которого в отсутствие гормонов принимали за 100 %. Для изучения влияния антител на активность АЦ фракции гипоталамических мембран предварительно инкубировали в течение 5 мин при 4 °С с 30-60 мкг антител.

Статистическую обработку данных проводили с применением компьютерных программ Microsoft Office Excel 2007 и Statistica 6.0. Данные представлены как M±SD (среднее арифметическое значение ± стандартное отклонение выборки). Проверку на нормальность проводили по критерию Шапиро-Уилка. Для сравнения нормально распределенных данных применяли критерий Стьюдента, при сравнении трех и более групп, применяя поправку Бонферрони. Если нормальность распределения полученных данных не подтверждалась, применяли критерий Манн-Уитни. Различия между значениями признаков для разных групп животных оценивали как достоверные при P<0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Аутоиммунная МК₄P-модель метаболического синдрома.

Введение БСА-конъюгата пептида K-[KTSLHLWNRSSHGLHGA¹¹⁻²⁵]-A, соответствующего N-концевому внеклеточному участку МК₄P, вызывало выраженный иммунный ответ у крыс (**табл. 1**). У иммунизированных МК₄P-пептидом крыс масса тела, абдоминального и эпидидимального жира была выше, чем в контроле (**табл. 2**). Уровни глюкозы и инсулина и индекс ИР в группе М4Р были повышены (**табл. 2**). В ГТТ отмечали ослабление утилизации глюкозы, несмотря на увеличение выброса инсулина в ответ на нагрузку глюкозой (**рис. 1**). В ИГТТ было выявлено снижение утилизации глюкозы под действием экзогенного инсулина (**рис. 1**). Эти данные свидетельствуют о снижении чувствительности тканей к инсулину и нарушении глюкозного гомеостаза у крыс, иммунизированных МК₄P-пептидом. Исследование липидного статуса выявило повышение уровня ОХ и атерогенных форм холестерина (ЛПНП и ЛПОНП), а также соотношения ЛПНП/ЛПВП и индекса атерогенности (**табл. 2**), что указывает на развитие дислипидемии у крыс при длительном аутоиммунном выключении МК₄P. При изучении

тиреоидного статуса показано снижение уровня tT_3 , несмотря на тенденцию к повышению уровня ТТГ (табл. 2). Причиной этого было снижение активации АЦ в тироидальных мембранах крыс группы МЗР при обработке ТТГ (10^{-8} М). В группе М4Р стимулирующий эффект ТТГ был на 41% ниже в сравнении с контролем ($P < 0.05$). Необходимо отметить, что снижение уровня tT_3 , эффекторного гормона тиреоидной системы, может играть важную роль в развитии метаболических нарушений у крыс со сниженной активностью МК4Р.

Таблица 1. Индексы ИП сывороток у крыс группы М4Р.

День эксперимента		30 (1) ^a	55 (2)	140 (4)	400 (8)
Номер животного	1	0.1	н/т	39.0	24.7
	2	0.2	н/т	8.3	7.7
	3	0.8	н/т	49.0	24.2
	4	0.5	3.5	12.5	10.0
	5	н/т	3.7	10.9	2.9
	6	0.2	1.4	11.0	5.4
	7	н/т	1.1	35.3	10.1
	8	н/т	н/т	86.1	24.7
	9	н/т	2.2	38.3	23.0

Примечание: ^a – в скобках число предшествующих иммунизаций, н/т – не тестировался.

Таблица 2. Масса тела и жировой ткани, основные метаболические и гормональные показатели у крыс, иммунизированных БСА-конъюгатами пептидов ¹¹⁻²⁵ МК4Р, ²⁶⁹⁻²⁸⁰ МК3Р и ¹⁸⁹⁻²⁰⁵ С1ВР.

Показатель	К (n=6)	М4Р (n=6)	МЗР (n=6)	С1ВР (n=6)
Масса тела, г	452±15	493±21*	401±17*	431±22
Масса абдоминального жира, г	3.7±1.0	7.9 ± 1.3*	6.2±1.4*	4.0±1.2
Масса эпидидимального жира, г	1.9±0.2	3.0 ± 0.4*	2.2±0.2	1.9±0.4
Доля жировой ткани, %	1.2	2.2	2.1	1.3
Глюкоза, мМ	4.1±0.2	5.5±0.4*	5.8±0.3*	3.8±0.2
Инсулин, мкЕд/мл	5.7±0.3	8.0±0.4*	7.2±0.4*	6.2±0.7
Индекс ИР	1.04	1.96*	1.86*	1.05
Триглицериды, мМ	0.85±0.28	1.23±0.29	1.48±0.29*	0.77±0.31
Общий холестерин, мМ	4.49±0.36	5.93±0.43*	4.78±0.41	4.68±0.33
ЛПНП, мМ	1.42±0.23	2.44±0.39*	1.79±0.22	1.62±0.19
ЛПВП, мМ	2.89±0.31	2.72±0.18	2.34±0.28	2.42±0.34
ЛПОНП, мМ	0.18±0.06	0.77±0.13*	0.65±0.16*	0.27±0.16
Соотношение ЛПНП/ЛПВП	0.491	0.897*	0.765*	0.670*
Индекс атерогенности	0.554	1.180*	1.043*	0.934*
ТТГ, мкЕд/мл	0.42±0.18	0.78±0.28	0.67±0.22	0.22±0.13*
Свободный тироксин (fT ₄), пМ	26.3±4.8	21.2±2.4	20.8±2.7	18.4±3.0*
Общий тироксин (tT ₄), нМ	78.6±4.3	72.2±5.2	69.3±6.1	67.6±5.9*
Общий трийодтиронин (tT ₃), нМ	2.7±0.2	2.0±0.1*	2.2±0.2*	2.34±0.37

Примечание: Данные представлены в виде $M \pm SD$. * - различия с контрольной группой статистически значимы при $P < 0.05$.

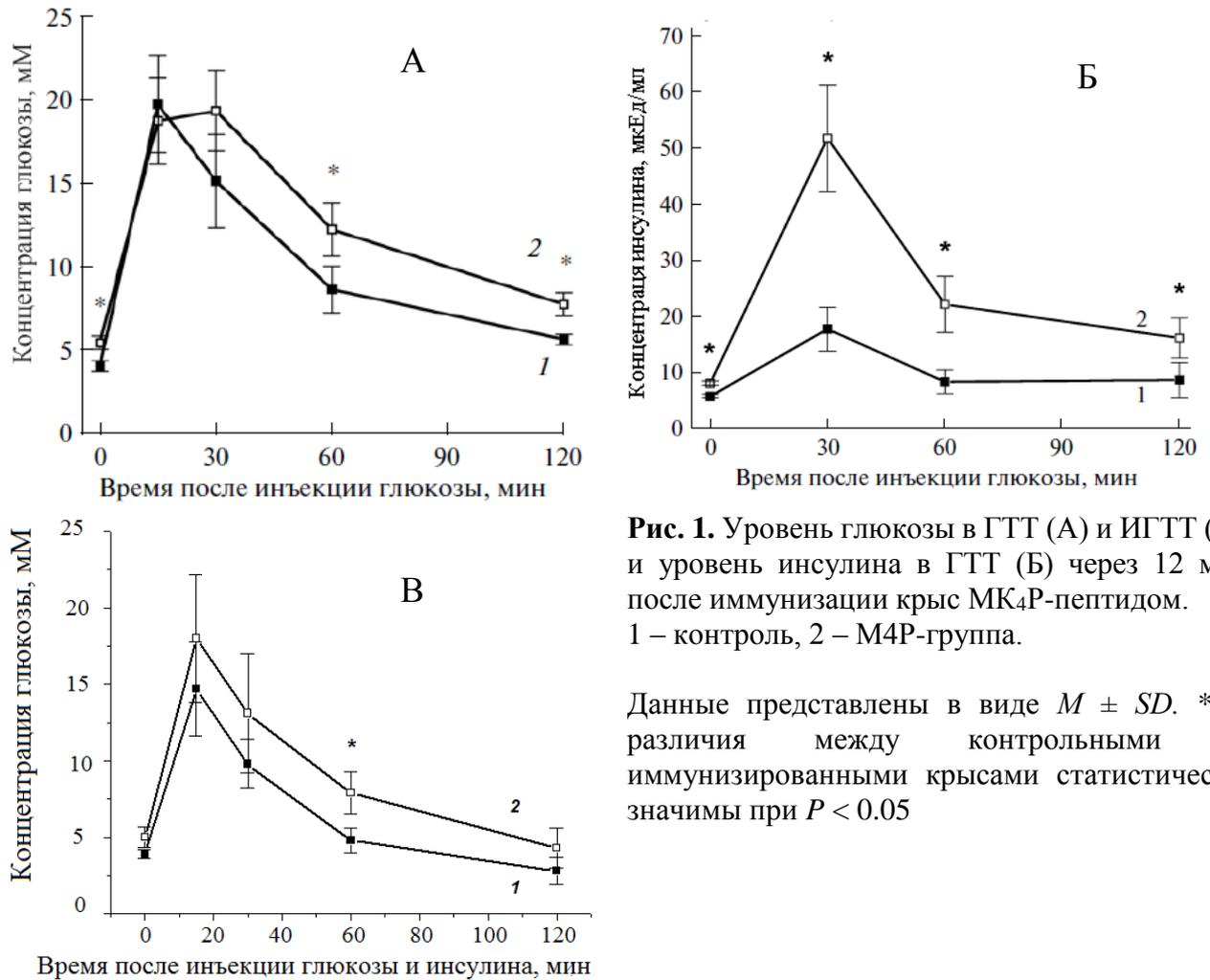


Рис. 1. Уровень глюкозы в ГТТ (А) и ИГТТ (В) и уровень инсулина в ГТТ (Б) через 12 мес после иммунизации крыс МК₄Р-пептидом. 1 – контроль, 2 – М4Р-группа.

Данные представлены в виде $M \pm SD$. * – различия между контрольными и иммунизированными крысами статистически значимы при $P < 0.05$

Выявленные метаболические и гормональные изменения могут быть как причиной, так и следствием функциональных изменений гормональных сигнальных систем в ЦНС и на периферии, в первую очередь в миокарде, жировой ткани, тканях эндокринной системы. Поэтому на следующем этапе мы изучили функциональную активность АЦСС в мозге, миокарде, эпидидимальном жире, семенниках и ЩЖ.

В синаптосомальных мембранах мозга крыс М4Р-группы как базальная, так и стимулированная форсколином, активатором каталитического сайта АЦ, или ГИДФ, активатором G_s -белков, активность АЦ не менялась, что свидетельствует о сохранении каталитической активности АЦ и ее полноценном сопряжении с G_s -белками. Стимулирующие АЦ эффекты α -МСГ (неселективного МКР-агониста), ТНІQ (селективного МК₄Р-агониста), дофамина и РАСАР-38 в группе М4Р достоверно снижались в сравнении с контролем (**рис. 2**). Стимулирующий АЦ эффект γ -МСГ (селективный МК₃Р-агонист) повышался, что является компенсаторной реакцией на ослабление МК₄Р. В группах К и М4Р АЦ эффекты α -МСГ и ТНІQ были дозо-зависимыми во всем диапазоне исследованных концентраций, а их аффинность к МК₄Р не менялась, на что указывает сходство значений EC_{50} . Ингибирующие АЦ эффекты серотонина и 5-НОТ (селективный агонист G_i -сопряженного $C_{1B}P$) в мозге крыс группы М4Р были ослаблены, в то время как соответствующие эффекты агонистов других рецепторов не менялись (**рис. 3**).

Таким образом, иммунизация крыс МК₄Р-пептидом меняет чувствительность АЦ в мозге к ряду гормональных агентов. В наибольшей степени меняется активность

стимулирующих АЦ каскадов, реализуемых через МК₃Р/МК₄Р, Д₁-дофаминовые и РАСАРергические рецепторы, и ингибирующих АЦ путей, реализуемых через С₁Р.

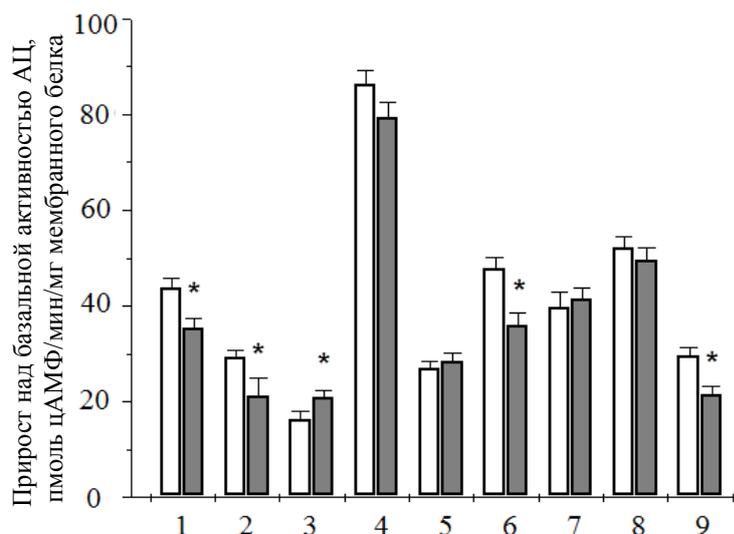


Рис. 2. Стимулирующие АЦ эффекты гормонов в синаптосомальных мембранах мозга крыс, иммунизированных МК₄Р-пептидом. 1 – α-МСГ, 2 – TNIQ, 3 – γ-МСГ (все – 10⁻⁷ М), 4 – серотонин, 5 – EMD-386088, 6 – дофамин, 7 – норадреналин (все – 10⁻⁵ М), 8 – релаксин-2 (10⁻⁸ М), 9 – РАСАР-38 (10⁻⁶ М). Данные представлены в виде $M \pm SD$. * - $P < 0.05$, в сравнении с контролем. □ – группа К, ■ - группа М4Р.

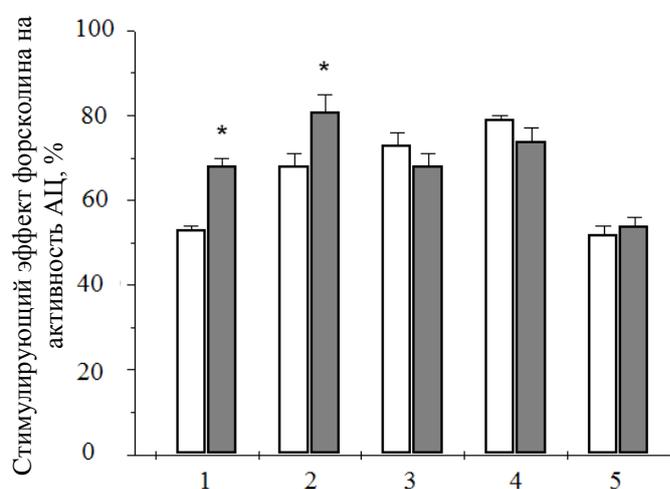


Рис. 3. Ингибирующие эффекты гормонов на стимулированную форсколином активность АЦ в синаптосомальных мембранах мозга крыс, иммунизированных МК₄Р-пептидом. 1 – серотонин, 2 – 5-НОТ, 3 – бромокриптин, 4 – норадреналин (все – 10⁻⁵ М), 5 – соматостатин (10⁻⁶ М). Стимулирующий АЦ эффект форсколина (10⁻⁵ М) в отсутствие гормонов принят за 100 %. Данные представлены в виде $M \pm SD$ * - $P < 0.05$, в сравнении с контролем. □ – группа К, ■ - группа М4Р.

В миокарде крыс группы М4Р базальная и стимулированная форсколином (10⁻⁵ М) и ГИДФ (10⁻⁵ М) активность АЦ существенно не отличались от таковых в контроле. В то же время снижался стимулирующий АЦ эффект изопротеренола и норадреналина, агонистов β₁/β₂-адренорецепторов (β₁/β₂-АР) и усиливался АЦ эффект селективных агонистов β₃-АР (BRL-37344 и CL-316243) (**рис. 4**), и, как следствие, соотношение β₁/β₂/β₃-АР изменялось в пользу β₃-АР, что является фактором повышенного риска кардиомиопатии.

В семенниках крыс группы М4Р снижалась как базальная, так и стимулированная форсколином и ГИДФ (10⁻⁵ М) активность АЦ. Снижение эффекта ГИДФ было выражено в значительной степени (-43 %), что указывает на ослабление взаимодействия между АЦ и G_s-белком. Стимулирующие АЦ эффекты ХГЧ и РАСАР-38 снижались и составили 58 и 61 % от таковых в контроле (**рис. 4**).

В эпидидимальном жире базальная активность АЦ снижалась на 22 %, а стимулирующие АЦ эффекты форсколина и ГИДФ в группе М4Р были на 36 и 50 % ниже, чем в контроле. Снижалась чувствительность АЦ как к агонистам β₁/β₂-АР (адреналину и изопротеренолу), так и к β₃-агонистам (BRL-37344 и CL-316243) (**рис. 5**), что подавляет липолиз и может являться одной из причин ожирения и дислипидемии.

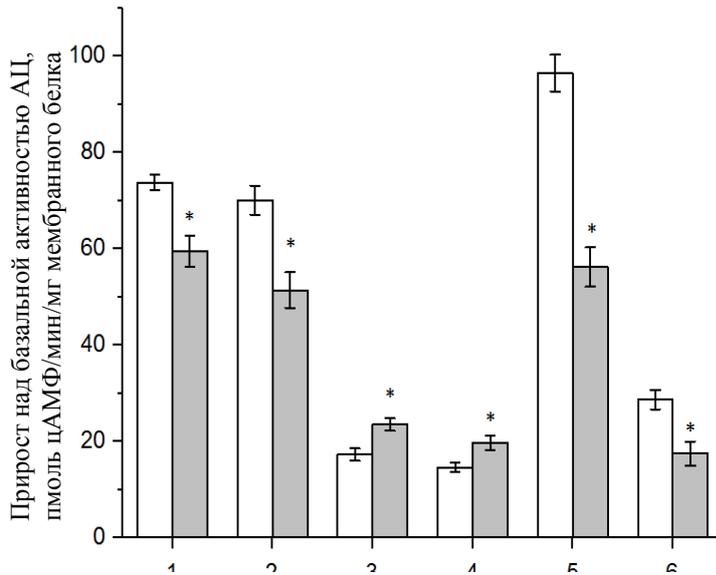


Рис. 4. Стимулирующие АЦ эффекты гормонов в мембранах, выделенных из миокарда и семенников контрольных и иммунизированных МК₄Р - пептидом крыс. 1–4 – миокард, 5–6 – семенники. 1 – изопротеренол (10^{-5} М), 2 – норадреналин (10^{-5} М), 3 – BRL-37344 (10^{-5} М), 4 – CL-316243 (10^{-5} М), 5 – ХГЧ (10^{-8} М), 6 – PACAP-38 (10^{-6} М). Данные представлены в виде $M \pm SD$. * - $P < 0.05$, в сравнении с контролем. □ – группа К, ■ – группа М4Р.

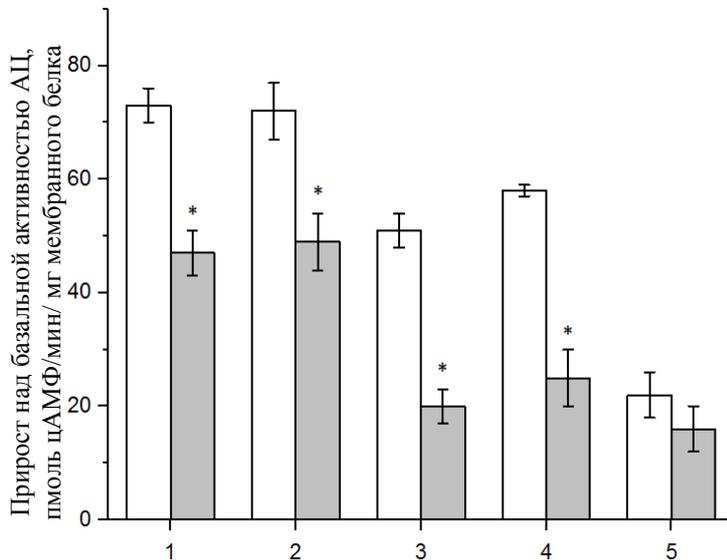


Рис. 5. Стимулирующие эффекты гормонов на активность АЦ в мембранах, выделенных из эпидидимального жира контрольных и иммунизированных МК₄Р-пептидом крыс. 1 – адреналин (10^{-5} М), 2 – изопротеренол (10^{-5} М), 3 – BRL-37344 (10^{-5} М), 4 – CL-316243 (10^{-5} М), 5 – CGS-21680 (10^{-5} М). Данные представлены в виде $M \pm SD$. * - $P < 0.05$, в сравнении с контролем. □ – группа К, ■ – группа М4Р.

Таким образом, нами впервые установлено, что подавление МК₄Р-каскадов аутоантителами к N-концевому домену МК₄Р приводит к развитию у крыс нарушенной толерантности к глюкозе, ИР, дислипидемии, нарушению тиреоидного статуса. Эти изменения сопровождаются изменением чувствительности АЦСС в мозге иммунизированных крыс к меланокортиновым пептидам, серотонину и другим гормональным агентам и затрагивают как стимулирующие, так и ингибирующие АЦ пути. Меняется и функциональная активность АЦСС в периферических тканях, что является одной из причин нарушений в сердечно-сосудистой и эндокринной системах и дальнейшего ухудшения метаболических и гормональных показателей.

2. Аутоиммунная МК₃Р модель метаболического синдрома

Введение БСА-конъюгата пептида А-[PTNPYSICSTTAN²⁶⁹⁻²⁸⁰]-А, соответствующего третьей петле МК₃Р (группа М3Р) приводило к выработке специфичных антител, хотя интенсивность иммунного ответа была менее выражена, чем в МК₄Р-модели (табл. 3).

Таблица 3. Индексы ИП у крыс группы МЗР

День эксперимента		30 (1) ^a	55 (2)	140 (4)	400 (8)
Номер животного	1	-0.2	1.1	1.1	5.7
	2	0.6	2.7	3.4	3.8
	3	1.7	1.2	3.1	2.5
	4	1.1	2.4	3.7	6.8
	5	0.8	2.6	2.7	4.9
	6	н/т	н/т	0.8	3.8
	7	н/т	н/т	0.4	3.9
	8	н/т	н/т	1.1	2.3
	9	н/т	н/т	1.2	1.5

Примечание: ^a – в скобках число предшествующих иммунизаций, н/т – не тестировался.

Масса тела крыс группы МЗР существенно не отличалась от таковой в контроле, а в конце эксперимента она была ниже, чем в контроле, что отличается от МК₄Р-модели. При этом массовая доля жировой ткани была выше, чем в контроле (табл. 2), что свидетельствует о жировом перерождении тканей при ингибировании МК₃Р. Повышение адипозности было ассоциировано с повышением уровней ТГ, атерогенного ЛПОНП и индекса атерогенности (табл. 2), что указывает на развитие дислипидемии.

В группе МЗР были выявлены изменения глюкозного гомеостаза, что выражалось в повышении уровня глюкозы натощак (табл. 2) и в парадоксальном исчезновении начального пика глюкозы в ГТТ (рис. 6, А). При этом отмечалась гиперсекреция инсулина в ходе глюкозной нагрузки (рис. 6, Б). Повышение индекса ИР указывает на снижение чувствительности тканей к инсулину, хотя и не в такой степени, как в случае МК₄Р-модели.

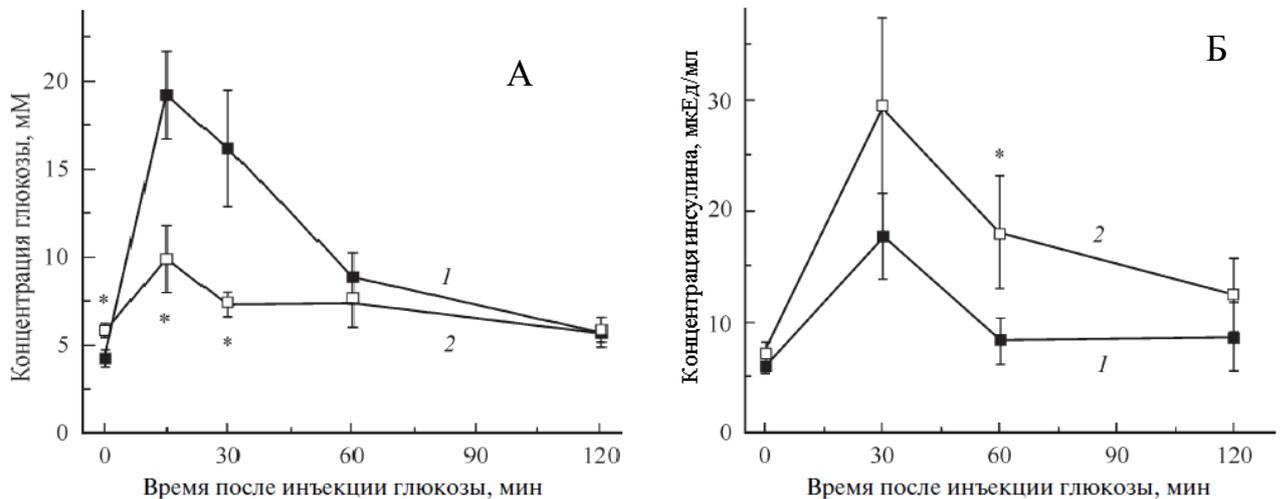


Рис. 6. Концентрация глюкозы (А) и инсулина (Б) в крови контрольных (1) и иммунизированных МК₃Р-пептидом (2) крыс через 12 мес после 1-й иммунизации. Данные представлены в виде $M \pm SD$. * - $P < 0.05$, в сравнении с контролем.

У крыс группы МЗР ослаблялись функции ЩЖ, поскольку на фоне повышения уровня ТТГ снижались уровни tT_3 и fT_4 (табл. 2). Изучение функционального состояния АЦСС в тканях ЩЖ показало, что, как и в случае МК₄Р-модели, стимулирующий АЦ эффект ТТГ (10^{-8} М), регулятора секреции и синтеза тиреоидных гормонов, в группе МЗР был достоверно ниже, чем в контроле (26.2 ± 3.4 против 37.4 ± 4.1 пмоль цАМФ/мин/мг мембранного белка, $P < 0.05$). Полученные данные свидетельствуют о снижении чувствительности ЩЖ к ТТГ.

В мозге крыс группы МЗР изменений базальной и стимулированной форсколином и ГИДФ активности АЦ выявлено не было. При этом снижалась чувствительность АЦСС к МК₃Р-агонисту γ -МСГ, в то время как эффекты МК₄Р-агонистов сохранялись (рис. 7). В группе МЗР снижался стимулирующий АЦ эффект серотонина, в то время как ингибирующие эффекты серотонина и С_{1В}Р-агониста 5-НОТ усиливались (рис. 8). Таким образом, иммунизация крыс МК₃Р-пептидом приводит к перераспределению серотониновых путей в пользу ингибирующей активности АЦ.

Значительные изменения активности АЦСС были выявлены в миокарде крыс группы МЗР (рис. 9). Они выражались в снижении чувствительности АЦ к релаксину, регулятору тонуса сосудов, и изопротеренолу и норадреналину, агонистам β 1/ β 2-АР, при сохранении эффектов β 3-АР-агонистов (BRL-37344 и CL-316243), что лежит в основе развития сердечно-сосудистой патологии.

В эпидидимальном жире было показано значительное снижение стимулирующих АЦ эффектов адреналина, изопротеренола и агонистов β 3-АР, причем в наибольшей степени ослаблялись эффекты β 3-агонистов BRL-37344 и CL-316243 (снижение на 41 и 44%), что указывает на ослабление в жировой ткани крыс группы МЗР β 3-АР-сигнальных путей, играющих ключевую роль в стимуляции липолиза. Это может быть одной из основных причин жирового перерождения тканей у иммунизированных крыс.

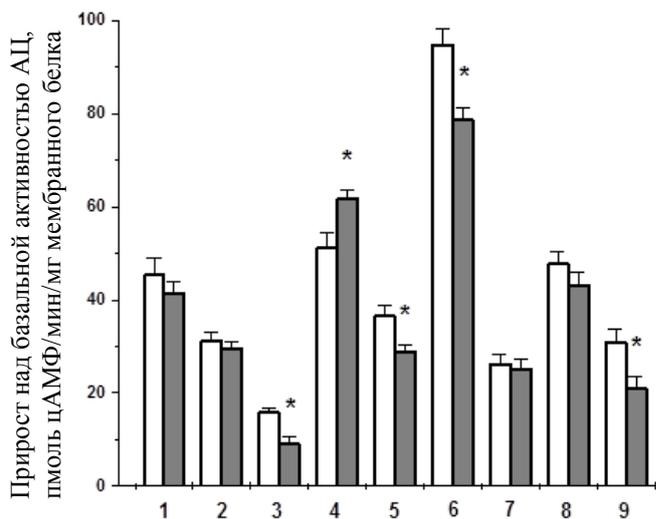


Рис. 7. Стимулирующие АЦ эффекты гормонов в мембранах мозга крыс, иммунизированных МК₃Р-пептидом.

1 – α -МСГ, 2 – ТНИQ, 3 – γ -МСГ (все 10^{-7} М), 4 – дофамин, 5 – норадреналин, 6 – серотонин, 7 – EMD-386088 (все 10^{-5} М), 8 – релаксин (10^{-8} М), 9 – РАСАР-38 (10^{-6} М). Данные представлены в виде

$M \pm SD$. * - $P < 0.05$, в сравнении с контролем. □ – группа К, ■ – группа МЗР.

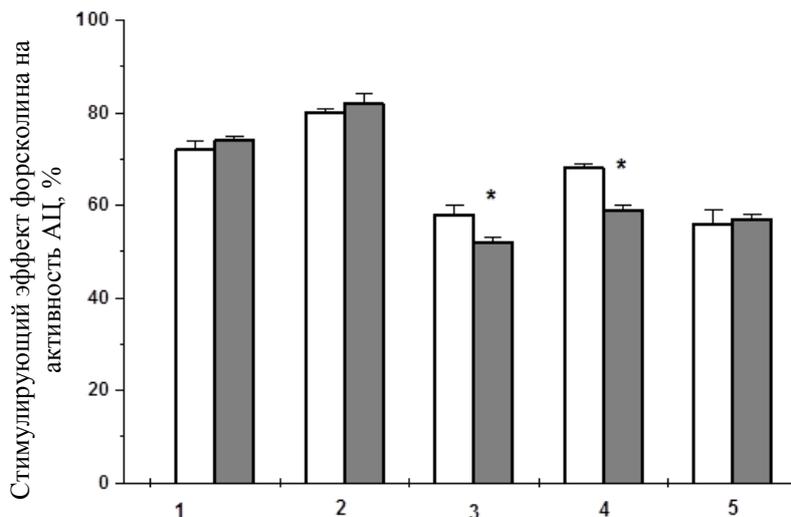


Рис. 8. Ингибирующие эффекты гормонов на стимулированную форсколином активность АЦ в мозге крыс, иммунизированных МК₃Р-пептидом.

1 – бромкриптин, 2 – норадреналин, 3 – серотонин, 4 – 5-НОТ (все 10^{-5} М) 5 – соматостатин (10^{-6} М). АЦ эффект форсколина (10^{-5} М) в отсутствие гормонов принят за 100 %. Данные представлены в виде $M \pm SD$. * - $P < 0.05$, в сравнении с контролем. □ – группа К, ■ – группа МЗР.

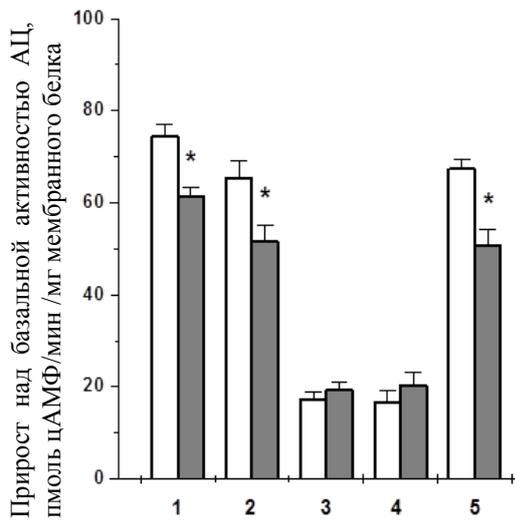


Рис. 9. Стимулирующие АЦ эффекты гормонов в миокардиальных мембранах крыс, иммунизированных МК₃Р-пептидом.

1 – изопротеренол, 2 – норадреналин, 3 – BRL-37344, 4 – CL-316243 (все 10^{-5} M), 5 – релаксин (10^{-8} M). Данные представлены в виде $M \pm SD$. * - $P < 0.05$, в сравнении с контролем. □ – группа К, ■ - группа МЗР.

Таким образом, длительное ослабление МК₃Р-сигнальных путей приводило к нарушению глюкозного гомеостаза, липидного обмена на фоне снижения массы тела крыс, что в целом согласуется с результатами генетических моделей с нокаутом гена для МК₃Р. Выявлены изменения функциональной активности АЦСС в мозге, миокарде, эпидидимальном жире и ЩЖ крыс группы МЗР к регуляторному действию гормонов, ключевых регуляторов функций ЦНС, сердечно-сосудистой и эндокринной систем, а также липидного обмена.

3. Аутоиммунная С_{1В}Р модель

При иммунизации животных пептидом [QAQAEVSECVVNTDH¹⁸⁹⁻²⁰⁵]-А, соответствующим второй внеклеточной петле С_{1В}Р на протяжении всего эксперимента отмечали специфичные антитела в сыворотке крови, хотя индексы иммунопозитивности были ниже, чем в группах МЗР и М4Р. Масса тела и жировой ткани иммунизированных крыс существенно не отличались от таковых в контроле. Не было выявлено значительных изменений глюкозного гомеостаза и липидного обмена (табл. 2), хотя имелась некоторая тенденция к увеличению доли атерогенных форм холестерина. При этом отмечали ослабление функций гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси, что иллюстрируется не только снижением fT_4 и tT_4 , но и двукратным снижением уровня ТТГ (табл. 2). При этом чувствительность АЦ тироцитов к ТТГ сохранялась. Как можно полагать, основные нарушения тиреоидной оси у крыс группы С_{1Р} возникают на уровне продуцирующих тиролиберин гипоталамических нейронов или тиреотрофов гипофиза.

В мозге крыс группы С_{1Р} отмечали снижение стимулирующего АЦ эффекта дофамина и усиление эффекта PACAP-38 (рис. 10). Наряду с этим был ослаблен ингибирующий АЦ эффект С_{1В}Р-агониста 5-НОТ, в то время как ингибирующий эффект С_{1А}Р-агониста 8-ОН-ДРАТ усиливался. Это можно рассматривать как компенсаторный механизм, обеспечивающий сохранение негативной серотониновой регуляции АЦ в условиях дефицита С_{1В}Р (рис. 11). В пользу этого указывает то, что ингибирующий АЦ эффект серотонина, действующего через различные подтипы G_i-сопряженных С_{1Р}, сохранялся.

Таким образом, длительная иммунизация С_{1В}Р-пептидом не вызвала нарушений углеводного и липидного обмена, но ослабляла тиреоидную ось, в основном вследствие снижения уровня ТТГ, а также меняла чувствительность АЦ мозга к агонистам G_i-сопряженных С_{1Р}.

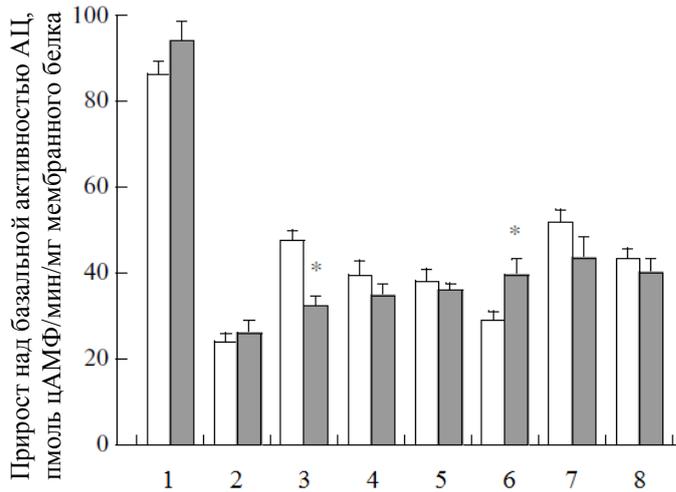


Рис. 10. Стимулирующие АЦ эффекты гормонов в синапсомембранных мембранах мозга крыс, иммунизированных С_{1ВР}-пептидом.

1 – серотонин, 2 – 5-НОТ, 3 – 8-ОН-ДАТ, 4 – бромкриптин, 5 – норадреналин (все – 10^{-5} М), 6 – соматостатин (10^{-6} М). Данные представлены в виде $M \pm SD$. * - $P < 0.05$, в сравнении с контролем. □ – группа К, ■ – группа С1Р.

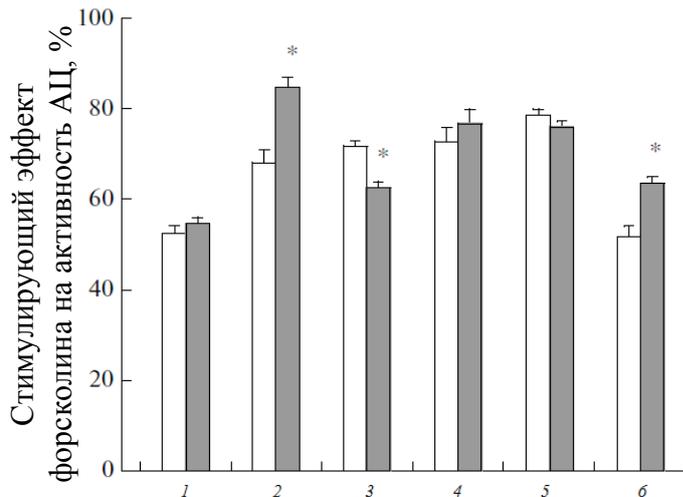


Рис. 11. Ингибирующие эффекты гормонов на стимулированную физостигмином активность АЦ в мозге крыс, иммунизированных С_{1ВР}-пептидом.

1 – серотонин, 2 – 5-НОТ, 3 – 8-ОН-ДАТ, 4 – бромкриптин, 5 – норадреналин (все – 10^{-5} М), 6 – соматостатин (10^{-6} М). Стимулирующий АЦ эффект физостигмина (10^{-5} М) в отсутствие гормонов принят за 100 %. Данные представлены в виде $M \pm SD$. * - $P < 0.05$, в сравнении с контролем. □ – группа К, ■ – группа С1Р.

4. Характеристика антител, выделенных из крови иммунизированных животных

Далее в экспериментах *in vitro* изучали специфическую активность антител, выделенных из сывороток крови иммунизированных крыс. Для оценки специфичности антител, оценивали их перекрестную реакцию, для чего пробы с анти-МК₄Р и анти-МК₃Р антителами проверяли на платах с С_{1ВР}-пептидом, а пробы с анти-С_{1ВР} антителами проверяли на платах с МК₄Р-пептидом. Перекрестная реактивность с негомологичными пептидами отсутствовала, что указывает на специфичность выделенных антител. Антитела, выделенные из сыворотки контрольных крыс, не взаимодействовали с пептидами на платах и были использованы, как контроль (табл. 4).

Таблица 4. Индексы ИП в пробах с антителами, выделенными из сывороток иммунизированных и контрольных крыс.

Сыворотка	Иммуносорбент		
	11–25 МК ₄ Р	269–280 МК ₃ Р	189–205 С _{1ВР}
Контрольная сыворотка	0.4	0.3	0.9
Анти-МК ₄ Р	18.2	н/т	0.5
Анти-МК ₃ Р	н/т	23.8	0.3
Анти-С _{1ВР}	0.7	н/т	47.9

Примечание: н/т – не тестировался.

Специфичность антител к гипоталамическим рецепторным белкам подтверждали методом иммуноблотинга. Антитела, выделенные из сыворотки иммунизированных животных, специфично взаимодействовали с белками, которые по молекулярному весу

соответствуют рецепторам-мишеням. Антитела, выделенные из пула контрольных животных и вторичные антитела, не взаимодействовали с этими белками (**рис. 12**).

Функциональную активность антител изучали по их влиянию на активность АЦСС. Для этого фракции мембран, выделенных из гипоталамуса интактных крыс, инкубировали в течение 10 мин с антителами, выделенными из сыворотки крови иммунизированных животных, а затем в них изучали активность АЦСС.

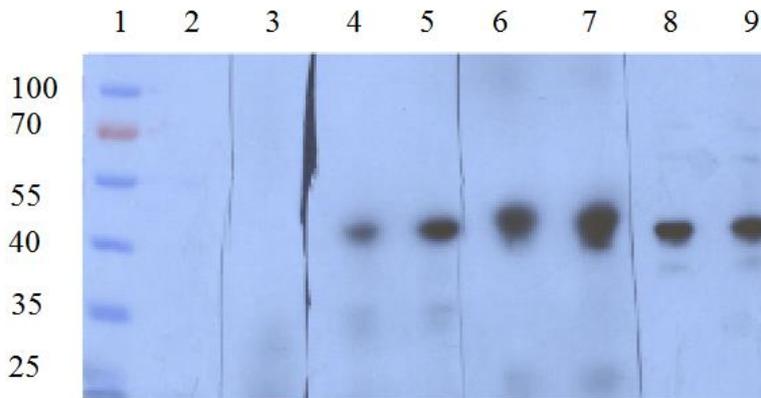


Рис. 12. Иммуноблоттинг антител с мембранной фракцией гипоталамуса интактных крыс. 1 – маркер молекулярного веса, 2 – контроль вторичных антител, 3 – антитела контрольных животных, 4 и 5 – анти-МК₃Р антитела, 6 и 7 – анти-5-С_{1В}Р антитела, 8 и 9 – анти-МК₄Р антитела. Цифры справа – молекулярный вес.

Базальная активность АЦ заметно не менялась при инкубации мембран с анти-МК₃Р- и анти-С_{1В}Р-антителами, и лишь незначительно снижалась в присутствии анти-МК₄Р-антител (**табл. 5**). Преинкубация с анти-МК₄Р-антителами приводила к снижению стимулирующих АЦ эффектов α -МСГ и МК₄Р-агониста ТНIQ (**табл. 5**). Анти-МК₄Р антитела снижали эффективность связывания МК₄Р-агонистов с рецептором, что выражалось в увеличении значений ЕС₅₀. Для α -МСГ значения ЕС₅₀ составляли 2.3 нМ в пробе с контрольными антителами и 7.5 нМ в присутствии анти-МК₄Р, для ТНIQ ЕС₅₀ – 1.9 и 9.1 нМ, соответственно. Полученные результаты свидетельствуют в пользу специфичности анти-МК₄Р-сыворотки по отношению к МК₄Р. Анти-МК₃Р антитела вызывали значительное снижение эффекта γ -МСГ, действующего преимущественно на МК₃Р, и небольшое снижение АЦ эффекта α -МСГ (**табл. 5**). Инкубация с анти-С_{1В}Р-антителами не влияла на стимулирующие АЦ эффекты серотонина, но ослабляли ингибирующие АЦ эффекты серотонина и С_{1В}Р-агониста 5-НОТ (**рис. 13**).

Таблица 5. Влияние антител против МК₄Р, МК₃Р и С_{1В}Р на стимулирующие АЦ эффекты в мембранах, выделенных из гипоталамуса интактных крыс.

Сыворотка	БА ^а	Агонист, концентрация				
		α -МСГ, 10 ⁻⁷ М	ТНIQ, 10 ⁻⁷ М	γ -МСГ, 10 ⁻⁷ М	Дофамин, 10 ⁻⁶ М	Серотонин, 10 ⁻⁶ М
		Прирост активности АЦ, пмоль цАМФ/мин/мг мембранного белка, $M \pm SD$				
Без сыворотки	24.9±1.0	43.8±2.1	29.3±1.4	16.3±1.7	47.8±2.3	86.4±2.9
Контрольная сыворотка	27.1±1.5	38.5±1.1	28.1±1.6	13.7±1.1	51.6±2.3	76.2±3.9
Анти-МК ₄ Р	22.6±1.7*	22.7±1.3*	13.9±1.7*	12.8±1.2	45.4±1.8	74.4±2.6
Анти-МК ₃ Р	23.7 ± 0.6	31.6±1.4*	24.6±1.7	7.0±1.5*	41.0±2.2*	75.3±2.7
Анти-С _{1В} Р	25.9±1.9	36.2±1.5	27.7±1.7	19.1±1.5	40.1±1.2*	71.6±1.8

Примечание: ^а – Базальная активность, пмоль цАМФ/мин/мг мембранного белка, $M \pm SD$ * – $P < 0.05$, в сравнении с контролем.

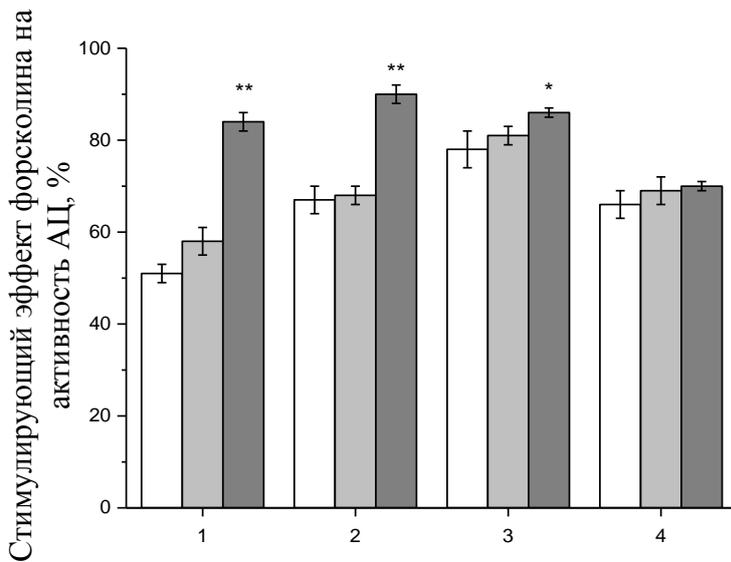


Рис. 13. Влияние анти-C_{1B}R антител на ингибирующие АЦ эффекты агонистов G_i-сопряженных рецепторов в мембранах, выделенных из гипоталамуса интактных крыс. 1 – серотонин, 2 – 5-HT, 3 – 8-OH-DPAT, 4 – бромокриптин (все 10⁻⁵ М). Стимулирующий АЦ эффект форсколина (10⁻⁵ М) в отсутствие гормонов принят за 100 %. Данные представлены в виде $M \pm SD$. * - $P < 0.05$, в сравнении с контролем, ** - $P < 0.01$. □ – без сыворотки, ▒ – с контрольной сывороткой, ■ – с анти-C_{1B}R-антителами.

Таким образом, длительная иммунизация крыс пептидами, соответствующими внеклеточным участкам МК₃R, МК₄R и C_{1B}R, приводила к образованию антител, которые были специфичны к соответствующим рецепторам. Анти-МК₄R, анти-МК₃R и анти-C_{1B}R-антитела, выделенные из сыворотки иммунизированных крыс, специфично подавляли АЦ эффекты селективных агонистов этих рецепторов в гипоталамусе интактных крыс. По своим регуляторным эффектам выделенные антитела являются ингибирующими антителами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами впервые установлено, что в условиях длительного аутоиммунного подавления МК₃R и МК₄R у крыс развивается широкий спектр метаболических и гормональных нарушений, которые характерны для МС, таких как изменение глюкозного гомеостаза, ИР, дислипидемия, снижение уровня тиреоидных гормонов и чувствительности тканей ЩЖ к ТТГ, изменения адренергической регуляции миокарда и жировой ткани, хотя эти нарушения были выражены в различной степени. Так при хроническом ингибировании МК₄R отмечали повышение массы тела, в то время как при ингибировании МК₃R масса тела, напротив, снижалась, несмотря на то, что масса и доля жировой ткани в обоих случаях повышались. Отмечали также специфические изменения гормональных сигнальных каскадов в мозге, в первую очередь МК₃R- и МК₄R-зависимых. Полученные данные указывают на возможные молекулярные механизмы, которые связывают ослабление меланокортинового сигналинга у пациентов с мутациями в компонентах МК₃R- и МК₄R-сигнальных путей с развитием ожирения, МС и его осложнений со стороны сердечно-сосудистой и эндокринной систем, а также свидетельствуют о необходимости детекции антител к МК₃R и МК₄R у пациентов с метаболическими расстройствами. Впервые показано, что длительное ингибирование C_{1B}R с помощью аутоантител вызывает значительные изменения в гормональной регуляции АЦСС в мозге, в первую очередь в регулируемой серотонином, что может вносить вклад в развитие заболеваний ЦНС, а также ослаблять функциональную активность тиреоидной оси, снижая продукцию ТТГ. Полученные результаты являются первым свидетельством в пользу функциональной взаимосвязи между C_{1B}R-серотониновой и тиреоидной системами.

ВЫВОДЫ

1. Длительная иммунизация крыс Wistar БСА-конъюгатом фрагмента 11–25 внеклеточного N-концевого участка меланокортинового рецептора 4-го типа (МК₄P) приводит к развитию ожирения, нарушению толерантности к глюкозе, инсулиновой резистентности, дефициту тиреоидных гормонов, что свидетельствует о развитии у животных признаков метаболического синдрома (МС).
2. В мозге крыс, иммунизированных пептидом 11–25 МК₄P, меняется чувствительность аденилатциклазной сигнальной системы (АЦСС) к агонистам МК₄P, D₁-дофаминовых и 5-HT₁-серотониновых рецепторов (С₁P). В миокарде меняется соотношение стимулирующих аденилатциклазу (АЦ) эффектов агонистов β₁-, β₂- и β₃-адренергических рецепторов (АР), а в эпидидимальном жире эти эффекты снижаются. В щитовидной железе и семенниках ослабляются стимулирующие АЦ эффекты тиреотропного гормона (ТТГ) и хорионического гонадотропина. Все это указывает на изменение гормональной регуляции АЦСС в тканях иммунизированных крыс, как одной из причин развития МС и его осложнений.
3. Длительная иммунизация крыс БСА-конъюгированным пептидным фрагментом 269–280 третьей внеклеточной петли МК₃P вызывает изменение глюкозного гомеостаза, повышение массы жировой ткани, дислипидемию, дефицит тиреоидных гормонов. В мозге иммунизированных крыс снижаются стимулирующие АЦ эффекты МК₃P-агониста γ-меланоцитстимулирующего гормона, серотонина, норадrenalина и пептидного гормона PАСАР-38, и усиливаются ингибирующие АЦ эффекты агонистов С₁P, а в миокарде в эпидидимальном жире ослабляется стимуляция АЦ агонистами β-АР. Эти данные указывают на взаимосвязь между метаболическими нарушениями и изменениями в АЦСС при аутоиммунном ингибировании МК₃P.
4. Длительная иммунизация крыс БСА-конъюгатом фрагмента 189–205 второй внеклеточной петли серотонинового рецептора 1В подтипа (С_{1В}P) слабо влияет на глюкозный гомеостаз и липидный обмен, но изменяет регуляцию серотонином АЦСС в мозге и подавляет функции тиреоидной оси, снижая продукцию ТТГ, что является первым доказательством взаимосвязи между С_{1В}P-серотониновой и тиреоидной системами.
5. Преинкубация мембран, выделенных из гипоталамуса интактных крыс с антителами, полученными из крови крыс, иммунизированных фрагментами МК₄P, МК₃P и С_{1В}P, приводит к подавлению передачи сигнала через гомологичные рецепторы, что позволяет рассматривать эти антитела как их функциональные антагонисты.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Деркач К.В., Шпакова Е.А., **Жарова О.А.**, Бондарева В.М., Шпаков А.О. Влияние иммунизации крыс БСА-конъюгированным пептидом 269–280 меланокортинового рецептора 3-го типа на метаболические показатели и функции щитовидной железы // Цитология. 2014. Т. 56. № 11. С. 850–857.
2. Деркач К.В., Шпакова Е.А., **Жарова О.А.**, Шпаков А.О. Метаболические изменения у крыс, иммунизированных БСА-конъюгатом пептида, производного N-концевого участка меланокортинового рецептора 4-го типа // Доклады Академии наук. 2014. Т. 458. № 1. С. 102–105.
3. Шпаков А.О., Деркач К.В., **Жарова О.А.**, Шпакова Е.А., Бондарева В.М. Изменение чувствительности аденилатциклазы к гормонам в мозге, миокарде и семенниках крыс, иммунизированных БСА-конъюгированным пептидом 269–280 меланокортинового рецептора 3-го типа // Биол. мембраны. 2015. Т. 32. № 1. С. 20–32.
4. Шпаков А.О., Деркач К.В., **Жарова О.А.**, Шпакова Е.А. Функциональная активность аденилатциклазной системы в мозге крыс с метаболическим синдромом, вызванным иммунизацией пептидом 11–25 меланокортинового рецептора 4-го типа // Нейрохимия. 2015. Т. 32. № 1. С. 37–47.
5. Деркач К.В., Шпакова Е.А., Тарасенко И.И., **Жарова О.А.**, Шпаков А.О. Иммунизация пептидом 189–205, производным серотонинового рецептора 1В-подтипа, меняет чувствительность аденилатциклазы к гормонам в мозге крыс // Доклады Академии наук. 2015. Т. 463. № 3. С. 358–361.
6. **Жарова О.А.**, Шпаков А.О. Роль аутоантител к внеклеточным участкам ионотропных рецепторов в этиологии и патогенезе аутоиммунных заболеваний // Рос. Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2016. Т. 102. № 7. С. 773–791.
7. Шпаков А.О., **Жарова О.А.**, Деркач К.В. Аутоантитела к внеклеточным участкам сопряженных с G-белками рецепторов и рецепторов-тирозинкиназ, как одна из причин аутоиммунных заболеваний // Журн. эвол. биохим. физиол. 2017. Т. 53. № 2, с. 84–98.

Тезисы докладов:

1. Деркач К.В., Шпакова Е.А., **Жарова О.В.**, Бондарева В.М., Шпаков А.О. Аутоиммунная модель метаболического синдрома, вызванная иммунизацией крыс пептидом, производным N-концевого участка меланокортинового рецептора 4-го типа // Трансляционная медицина. 2014. Приложение 1. (Тез. Всер. научно-практ. конф. с межд. участием «Трансляционные исследования в инновационном развитии здравоохранения», 15–17 мая 2014 г., Санкт-Петербург). С. 14.
2. Деркач К.В., Шпакова Е.А., **Жарова О.А.**, Бондарева В.М., Шпаков А.О. Иммунизация пептидами, производными внеклеточных участков меланокортиновых рецепторов 3-го и 4-го типов, приводит к нарушению метаболического и гормонального статуса у крыс // Тез. Всер. Конф. с межд. участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга», 24–26 июня 2014 г., Санкт-Петербург–Колтуши. С. 50.
3. Деркач К.В., Шпакова Е.А., **Жарова О.А.**, Ложков А.А., Шпаков А.О. Модель метаболического синдрома на крысах, вызванная ингибированием функциональной активности меланокортинового рецептора 4-го типа // Сб. статей Межд. научн. конф. «Современная фармацевтика: теория, практика, эксперименты», 26–28 ноября 2014 г., Москва. Киров, 2014. С. 18–21.
4. Деркач К.В., Шпакова Е.А., **Жарова О.А.**, Шпаков А.О. Влияние длительной иммунизации пептидом 189–205 серотонинового рецептора 1В/1D-подтипа на функциональную активность аденилатциклазной системы в мозге крыс // Аллергология и иммунология. 2014. Т. 15. № 4. (Тез. Межд. научн. форума «Иммунитет и аллергия: взгляд в будущее», 26–28 января 2015 г., Москва). С. 301.
5. Шпаков А.О., **Жарова О.А.**, Деркач К.В., Шпакова Е.А. Модель метаболического синдрома, вызванная длительной иммунизацией крыс пептидом 11–25 меланокортинового рецептора 4-го

- типа // Аллергология и иммунология. 2014. Т. 15. № 4. (Тез. Межд. научн. форума «Иммунитет и аллергия: взгляд в будущее», 26–28 января 2015 г., Москва). С. 302–303.
6. Деркач К.В., **Жарова О.А.**, Шпакова Е.А., Ложков А.А., Шпаков А.О. Аутоиммунная модель метаболического синдрома, индуцированная ингибированием меланокортиновых рецепторов 4-го типа с помощью длительной иммунизации крыс пептидом 11–25, соответствующим N-концевому участку этого рецептора // Мат. IX Всер. конф. «Нейроэндокринология – 2015», 27–29 октября 2015 г., Санкт-Петербург. С. 59–60.
7. Деркач К.В., Шпакова Е.А., **Жарова О.А.**, Бондарева В.М., Ложков А.А., Шпаков А.О. Метаболические последствия от аутоиммунного ингибирования серотониновых и меланокортиновых рецепторов, вовлеченных в центральную регуляцию энергетического гомеостаза // Мат. II Всер. научн. конф. с межд. участием «Современные проблемы нейробиологии. Структура и функции нервной системы в норме и патологии». 12–14 мая 2016 г., Ярославль. С. 15–17.
8. **Жарова О.А.**, Деркач К.В., Шпаков А.О. Влияние антител к внеклеточным участкам МК4- и МК3-меланокортиновых рецепторов и 1В-серотонинового рецептора на активность аденилатциклазы // Мат. II Всер. научн. конф. с межд. участием «Современные проблемы нейробиологии. Структура и функции нервной системы в норме и патологии». 12–14 мая 2016 г., Ярославль. С. 18–19.
9. Деркач К.В., **Жарова О.А.**, Ложков А.А., Шпаков А.О. Модели метаболического синдрома, индуцированные длительным ингибированием меланокортиновой системы мозга с помощью специфичных антител // Трансляционная медицина. 2016. Приложение 2 (Тез. Всер. конф. с межд. участием «Командный подход в современной эндокринологии», 26–28 мая 2016 г., Санкт-Петербург). С. 29.
10. Деркач К.В., **Жарова О.А.**, Ложков А.А., Шпаков А.О. Аутоиммунная модель метаболического синдрома, вызванная исключением меланокортиновой системы мозга // Нейронаука для медицины и психологии: 12-й Межд. междисциплинарный конгресс. Судак, Крым, Россия; 1–11 июня 2016 г.: Труды Конгресса. С. 152–153.
11. **Жарова О.А.**, Деркач К.В., Ложков А.А., Шпаков А.О. Оценка специфичности антител, выработанных на внеклеточные участки МК4- и МК3-меланокортиновых и 1В-серотонинового рецепторов, в отношении гипоталамической аденилатциклазной сигнальной системы // Сб. XV Межд. совещания и VIII Школы по эвол. физиологии. 17–22 октября, 2016 г., Санкт-Петербург. С. 81–82.
12. Ложков А.А., Деркач К.В., **Жарова О.А.**, Шпаков А.О. Изучение специфичности влияния антител, выработанных на внеклеточные участки МК4- и МК3-меланокортиновых и 1В-серотонинового рецепторов, на активность аденилатциклазной сигнальной системы в гипоталамусе // Сб. Тез. V Мол. конф. по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН. 18–21 сентября, 2016 г., Санкт-Петербург. С. 37.
13. **Жарова О.А.**, Деркач К.В., Шпакова Е.А., Ложков А.А., Шпаков А.О. Гормональная регуляция аденилатциклазы в миокарде, эпидидимальном жире и семенниках крыс, длительное время иммунизированных БСА-конъюгатом пептида 11-25 меланокортинового рецептора 4-го типа // Неделя науки СПбПУ: мат. науч. конф с межд. участием. Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций. Санкт-Петербург, 2017 г. С. 453–455.
14. **Жарова О.А.**, Ложков А.А., Шпакова Е.А., Деркач К.В., Шпаков А.О. Оценка функциональной активности антител, выделенных из крови крыс, иммунизированных БСА-конъюгатами фрагментов внеклеточных петель меланокортиновых и серотониновых рецепторов // Неделя науки СПбПУ: мат. науч. конф с межд. участием. Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций. Санкт-Петербург, 2017 г. С. 456–458.
15. **Жарова О.А.**, Титов А.Л., Шпакова Е.А., Деркач К.В., Шпаков А.О. Влияние иммунизации крыс пептидом, производным второй внеклеточной петли 1В-серотонинового рецептора // Сб. тез. Всер. симп. с межд. участием «Стресс: физиологические эффекты, патологические последствия и способы их предотвращения», 10–13 октября 2017 г., Санкт-Петербург. С. 120–121.