

**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 нейрохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук

**Научный руководитель:**

**Шпаков Александр Олегович**, доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной эндокринологии и нейрохимии 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](mailto: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 (МК<sub>3</sub>Р) и 4-го типов (МК<sub>4</sub>Р), а также серотониновых рецепторов 1-го типа (С<sub>1</sub>Р), 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 МК<sub>3</sub>Р и МК<sub>4</sub>Р 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 МК<sub>3</sub>Р и МК<sub>4</sub>Р 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 МК<sub>3</sub>Р и МК<sub>4</sub>Р.

Одной из наиболее перспективных моделей таких расстройств может являться аутоиммунное подавление функций МК<sub>3</sub>Р и МК<sub>4</sub>Р, тем более что в крови некоторой части пациентов с ожирением и другими метаболическими расстройствами выявлены специфичные антитела к МК<sub>4</sub>Р 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; МК<sub>3</sub>Р, МК<sub>4</sub>Р – 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<sub>1А</sub>Р, С<sub>1В</sub>Р – серотониновый рецептор 1А или 1В подтипов; тТ<sub>3</sub> – общий трийодтиронин; тТ<sub>4</sub>, фТ<sub>4</sub> – общий и свободный тироксин; ТГ – триглицерид; ТТГ – тиреотропный гормон; ЩЖ – щитовидная железа; РАСАР-38 – гипофизарный АЦ-активирующий полипептид-38; PBS – фосфатный буфер.

механизмы, связывающие длительное аутоиммунное ингибирование МК<sub>3</sub>Р и МК<sub>4</sub>Р 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 МК<sub>3</sub>Р и МК<sub>4</sub>Р 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 С<sub>1</sub>Р 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 С<sub>1</sub>Р могут также регулировать функции эндокринной системы и участвовать в контроле некоторых метаболических процессов, представляется необходимым изучить, как аутоиммунное выключение С<sub>1</sub>Р влияет на эти процессы. Актуальность такого подхода обусловлена тем, что агонисты и антагонисты С<sub>1</sub>Р 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 С<sub>1</sub>Р-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 МК<sub>3</sub>Р и МК<sub>4</sub>Р, а также серотонина, действующего через С<sub>1</sub>Р, является аденилатциклазная сигнальная система (АЦСС), которая, наряду с гормональным рецептором, включает гетеротримерные G-белки стимулирующего (G<sub>s</sub>) или ингибирующего (G<sub>i</sub>) 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 МК<sub>4</sub>Р 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(Asm)IC(Asm)YТАНА]-280 МК<sub>3</sub>Р крысы.
3. Изучить метаболические показатели, состояние тиреоидной системы, функциональную активность АЦСС в мозге крыс, иммунизированных БСА-конъюгатом пептида, производного фрагмента второй внеклеточной петли 189-[QAKAEVVSEEC(Asm)VVNTDHA]-205 СР 1В-подтипа (С<sub>1В</sub>Р) крысы.
4. В условиях *in vitro* изучить влияние антител, выделенных из крови крыс, иммунизированных пептидами, соответствующими участкам 11–25 МК<sub>4</sub>Р, 269–280 МК<sub>3</sub>Р и 189–205 С<sub>1В</sub>Р, на активность АЦ в мембранах, выделенных из гипоталамуса интактных крыс.

### Научная новизна

Впервые с помощью многократной иммунизации крыс БСА-конъюгатами пептидов, соответствующих внеклеточным участкам МК<sub>3</sub>Р, МК<sub>4</sub>Р и С<sub>1В</sub>Р, 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 МК<sub>4</sub>Р- и МК<sub>3</sub>Р-пептидами ведет к метаболическим и гормональным нарушениям (дислипидемии, нарушенной толерантности к глюкозе, ИР, снижению уровня тиреоидных гормонов), причем иммунизация МК<sub>4</sub>Р-пептидом приводила к повышению массы тела, в то время как иммунизация МК<sub>3</sub>Р-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 МК<sub>3</sub>Р- и МК<sub>4</sub>Р-меланокортиновых путей. В миокарде менялось соотношение стимулирующих АЦ сигнальных путей, реализуемых через  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - и  $\beta_3$ -адренергические рецепторы ( $\beta$ -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 МК<sub>4</sub>Р- и МК<sub>3</sub>Р-пептидами.

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

Впервые были выделены и функционально охарактеризованы по способности влиять на активность АЦСС антитела, выработанные вследствие длительной иммунизации крыс пептидами 11–25 МК<sub>4</sub>Р, 269–280 МК<sub>3</sub>Р и 189–205 С<sub>1В</sub>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 МК<sub>4</sub>Р и МК<sub>3</sub>Р 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 МК<sub>4</sub>Р и МК<sub>3</sub>Р, тем более что у части из них выявлены антитела к МК<sub>4</sub>Р и их агонистам. Все это позволяет выяснить первопричины метаболических нарушений и разработать оптимальные пути их коррекции. Снижение уровня тиреоидных гормонов при ослаблении МК<sub>4</sub>Р- и МК<sub>3</sub>Р-сигнализации, а также при аутоиммунном подавлении С<sub>1В</sub>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 МК<sub>4</sub>Р, МК<sub>3</sub>Р и С<sub>1В</sub>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 МК<sub>4</sub>Р 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 МК<sub>3</sub>Р 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<sub>1В</sub>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 МК<sub>4</sub>Р, МК<sub>3</sub>Р и С<sub>1В</sub>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,  $\alpha$ - и  $\gamma$ -меланоцитстимулирующие гормоны (МСГ), МК<sub>4</sub>P-агонист ТН1Q, С<sub>6</sub>P-агонист EMD-386088, С<sub>1В</sub>P-агонист 5-нонилокситриптамин (5-НОТ),  $\beta_3$ -агонисты BRL-37344 и CL-316243, PACAP-38, агонисты А<sub>1</sub>- и А<sub>2</sub>-аденозиновых рецепторов – N<sup>6</sup>-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). [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]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-[TSLHLWNRSSHGLHG<sup>11-25</sup>]-А, производного внеклеточного N-концевого участка МК<sub>4</sub>P (М4P, n=9), А-[PTNPYC(Acm)IC(Acm)TTAN<sup>269-280</sup>]-А (Аcm – ацетамидометил), производного третьей внеклеточной петли МК<sub>3</sub>P (М3P, n=6) и [QAKAEVVSEC(Acm)VVNTDH<sup>189-205</sup>]-А, производного второй внеклеточной петли С<sub>1В</sub>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 МК<sub>4</sub>P и 269–280 МК<sub>3</sub>P 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<sub>1В</sub>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-Т $T_4$ -1» и «ИФА-Т $T_3$ -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 MgCl<sub>2</sub>, 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 рН 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°С. 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) солибилизирующий 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 MgCl<sub>2</sub>, 0.1 мМ цАМФ, 1 мМ АТФ, 37 КБк [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]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 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-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<sup>-5</sup> 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 МК<sub>4</sub>P-модель метаболического синдрома.

Введение БСА-конъюгата пептида K-[KTSLHLWNRSSHGLHGA<sup>11-25</sup>]-A, соответствующего N-концевому внеклеточному участку МК<sub>4</sub>P, вызывало выраженный иммунный ответ у крыс (**табл. 1**). У иммунизированных МК<sub>4</sub>P-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 МК<sub>4</sub>P-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 МК<sub>4</sub>P. 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.

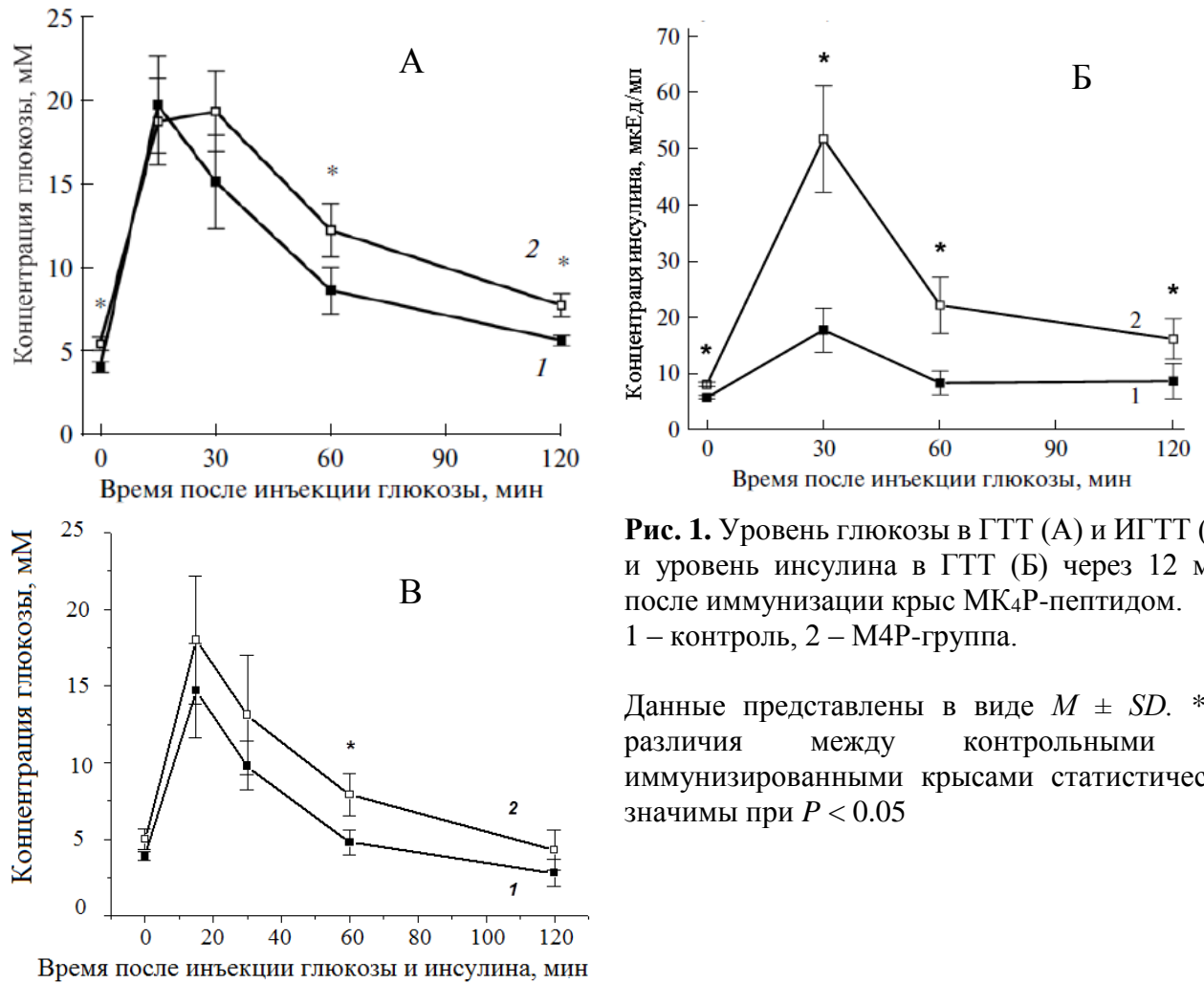
День эксперимента		30 (1) <sup>a</sup>	55 (2)	140 (4)	400 (8)
Номер животного	1	0.1	н/т	39.0	24.7
	2	0.2	н/т	8.3	7.7
	3	0.8	н/т	49.0	24.2
	4	0.5	3.5	12.5	10.0
	5	н/т	3.7	10.9	2.9
	6	0.2	1.4	11.0	5.4
	7	н/т	1.1	35.3	10.1
	8	н/т	н/т	86.1	24.7
	9	н/т	2.2	38.3	23.0

*Примечание:* <sup>a</sup> – 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 <sup>11-25</sup> МК4Р, <sup>269-280</sup> МК3Р и <sup>189-205</sup> 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 <sub>4</sub> ), пМ	26.3±4.8	21.2±2.4	20.8±2.7	18.4±3.0*
Общий тироксин (tT <sub>4</sub> ), нМ	78.6±4.3	72.2±5.2	69.3±6.1	67.6±5.9*
Общий трийодтиронин (tT <sub>3</sub> ), 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 МК<sub>4</sub>Р-пептидом. 1 – контроль, 2 – М4Р-группа.

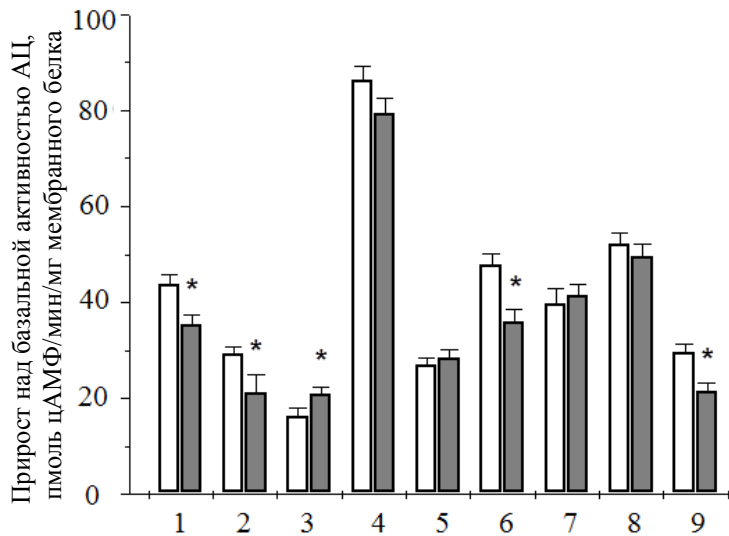
Данные представлены в виде  $M \pm SD$ . \* – различия между контрольными и иммунизированными крысами статистически значимы при  $P < 0.05$

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.

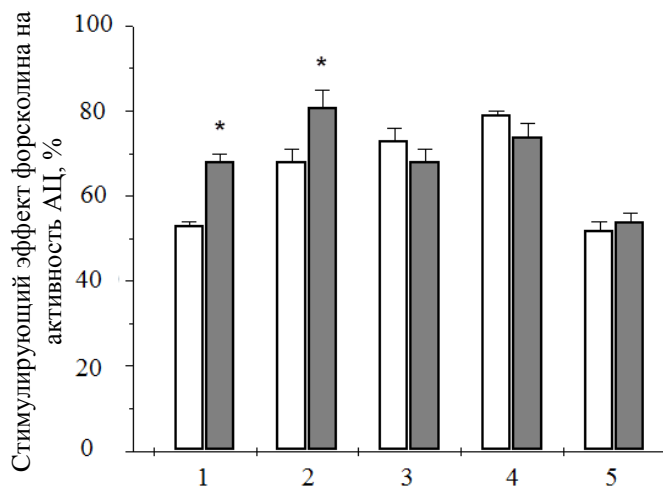
В синаптосомальных мембранах мозга крыс М4Р-группы как базальная, так и стимулированная форсколином, активатором каталитического сайта АЦ, или ГИДФ, активатором  $G_s$ -белков, активность АЦ не менялась, что свидетельствует о сохранении каталитической активности АЦ и ее полноценном сопряжении с  $G_s$ -белками. Стимулирующие АЦ эффекты  $\alpha$ -МСГ (неселективного МКР-агониста), ТНІQ (селективного МК<sub>4</sub>Р-агониста), дофамина и РАСАР-38 в группе М4Р достоверно снижались в сравнении с контролем (**рис. 2**). Стимулирующий АЦ эффект  $\gamma$ -МСГ (селективный МК<sub>3</sub>Р-агонист) повышался, что является компенсаторной реакцией на ослабление МК<sub>4</sub>Р. В группах К и М4Р АЦ эффекты  $\alpha$ -МСГ и ТНІQ были дозо-зависимыми во всем диапазоне исследованных концентраций, а их аффинность к МК<sub>4</sub>Р 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 МК<sub>4</sub>Р-пептидом меняет чувствительность АЦ в мозге к ряду гормональных агентов. В наибольшей степени меняется активность

стимулирующих АЦ каскадов, реализуемых через МК<sub>3</sub>Р/МК<sub>4</sub>Р, Д<sub>1</sub>-дофаминовые и РАСАРергические рецепторы, и ингибирующих АЦ путей, реализуемых через С<sub>1</sub>Р.



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

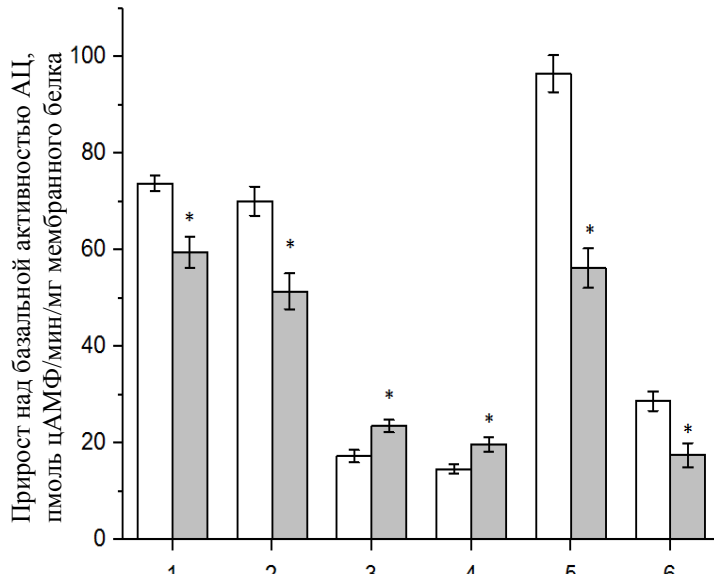


**Рис. 3.** Ингибирующие эффекты гормонов на стимулированную форсколином активность АЦ в синаптосомальных мембранах мозга крыс, иммунизированных МК<sub>4</sub>Р-пептидом. 1 – серотонин, 2 – 5-НОТ, 3 – бромокриптин, 4 – норадреналин (все – 10<sup>-5</sup> М), 5 – соматостатин (10<sup>-6</sup> М). Стимулирующий АЦ эффект форсколина (10<sup>-5</sup> 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.

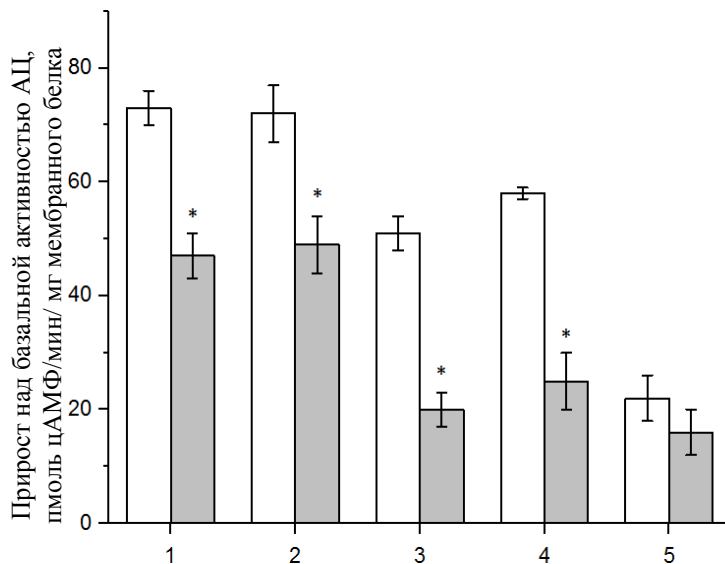
В миокарде крыс группы М4Р базальная и стимулированная форсколином (10<sup>-5</sup> М) и ГИДФ (10<sup>-5</sup> М) активность АЦ существенно не отличались от таковых в контроле. В то же время снижался стимулирующий АЦ эффект изопротеренола и норадреналина, агонистов β<sub>1</sub>/β<sub>2</sub>-адренорецепторов (β<sub>1</sub>/β<sub>2</sub>-АР) и усиливался АЦ эффект селективных агонистов β<sub>3</sub>-АР (BRL-37344 и CL-316243) (**рис. 4**), и, как следствие, соотношение β<sub>1</sub>/β<sub>2</sub>/β<sub>3</sub>-АР изменялось в пользу β<sub>3</sub>-АР, что является фактором повышенного риска кардиомиопатии.

В семенниках крыс группы М4Р снижалась как базальная, так и стимулированная форсколином и ГИДФ (10<sup>-5</sup> М) активность АЦ. Снижение эффекта ГИДФ было выражено в значительной степени (-43 %), что указывает на ослабление взаимодействия между АЦ и G<sub>s</sub>-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 β<sub>1</sub>/β<sub>2</sub>-АР (адреналину и изопротеренолу), так и к β<sub>3</sub>-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 МК<sub>4</sub>Р - 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 МК<sub>4</sub>Р-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 МК<sub>4</sub>Р-каскадов аутоантителами к N-концевому домену МК<sub>4</sub>Р 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 МК<sub>3</sub>Р модель метаболического синдрома

Введение БСА-конъюгата пептида А-[PTNPYCSICTTAN<sup>269-280</sup>]-А, соответствующего третьей петле МК<sub>3</sub>Р (группа М3Р) приводило к выработке специфичных антител, хотя интенсивность иммунного ответа была менее выражена, чем в МК<sub>4</sub>Р-модели (табл. 3).

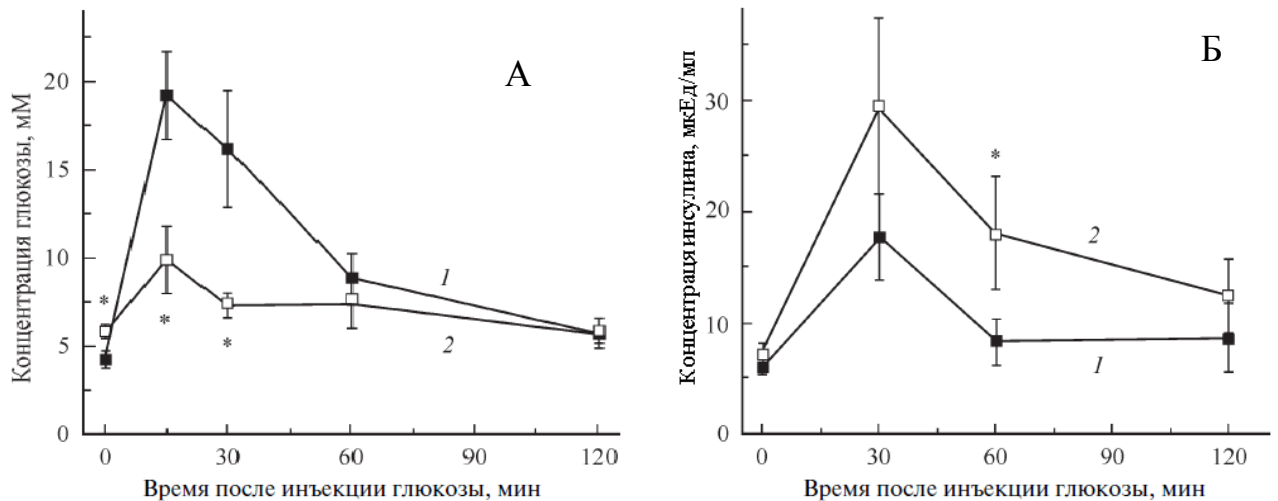
**Таблица 3.** Индексы ИП у крыс группы МЗР

День эксперимента		30 (1) <sup>a</sup>	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: <sup>a</sup> – 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 МК<sub>4</sub>Р-модели. При этом массовая доля жировой ткани была выше, чем в контроле (табл. 2), что свидетельствует о жировом перерождении тканей при ингибировании МК<sub>3</sub>Р. 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 МК<sub>4</sub>Р-модели.



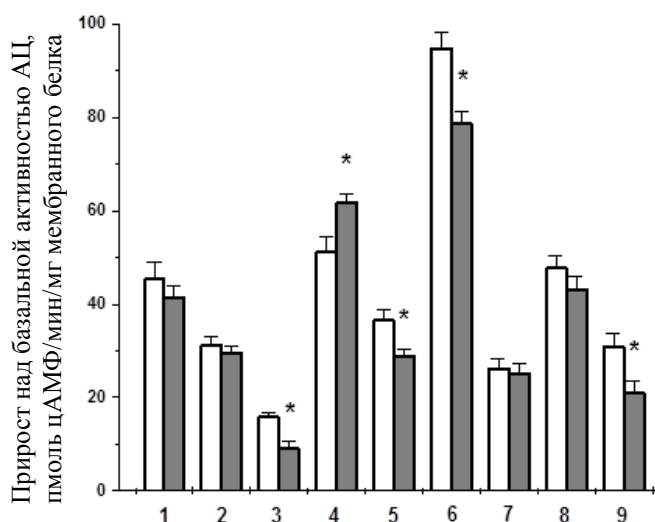
**Рис. 6.** Концентрация глюкозы (А) и инсулина (Б) в крови контрольных (1) и иммунизированных МК<sub>3</sub>Р-пептидом (2) крыс через 12 мес после 1-й иммунизации. Данные представлены в виде  $M \pm SD$ . \* -  $P < 0.05$ , в сравнении с контролем.

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 МК<sub>4</sub>Р-модели, стимулирующий АЦ эффект ТТГ ( $10^{-8}$  М), регулятора секреции и синтеза тиреоидных гормонов, в группе МЗР был достоверно ниже, чем в контроле ( $26.2 \pm 3.4$  против  $37.4 \pm 4.1$  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 МК<sub>3</sub>Р-агонисту  $\gamma$ -МСГ, в то время как эффекты МК<sub>4</sub>Р-агонистов сохранялись (рис. 7). В группе МЗР снижался стимулирующий АЦ эффект серотонина, в то время как ингибирующие эффекты серотонина и С<sub>1В</sub>Р-агониста 5-НОТ усиливались (рис. 8). Таким образом, иммунизация крыс МК<sub>3</sub>Р-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  $\beta$ 1/ $\beta$ 2-АР, при сохранении эффектов  $\beta$ 3-АР-агонистов (BRL-37344 и CL-316243), что лежит в основе развития сердечно-сосудистой патологии.

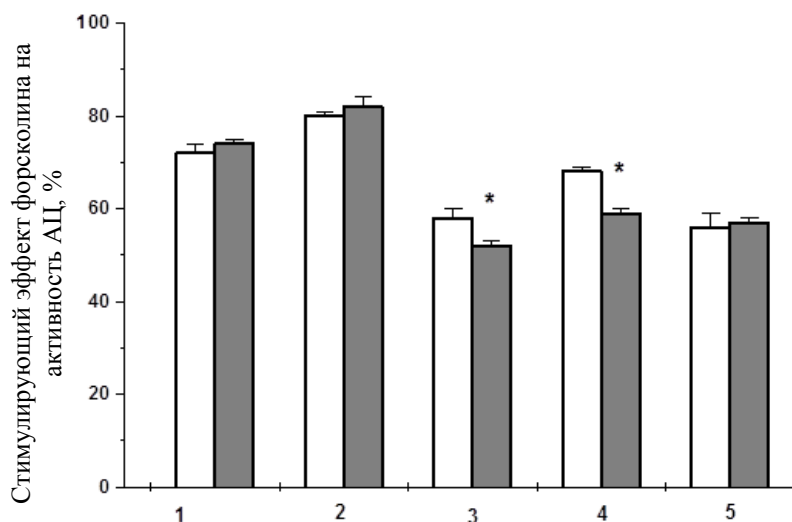
В эпидидимальном жире было показано значительное снижение стимулирующих АЦ эффектов адреналина, изопротеренола и агонистов  $\beta$ 3-АР, причем в наибольшей степени ослаблялись эффекты  $\beta$ 3-агонистов BRL-37344 и CL-316243 (снижение на 41 и 44%), что указывает на ослабление в жировой ткани крыс группы МЗР  $\beta$ 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 МК<sub>3</sub>Р-пептидом.

1 –  $\alpha$ -МСГ, 2 – ТНИQ, 3 –  $\gamma$ -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

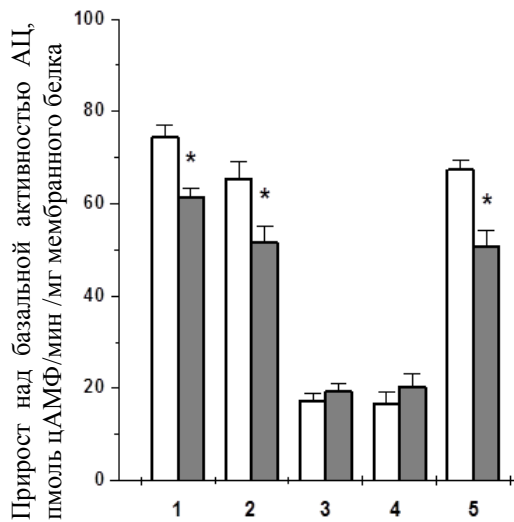
$M \pm SD$ . \* -  $P < 0.05$ , в сравнении с контролем. □ – группа К, ■ – группа МЗР.



**Рис. 8.** Ингибирующие эффекты гормонов на стимулированную форсколином активность АЦ в мозге крыс, иммунизированных МК<sub>3</sub>Р-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 МК<sub>3</sub>Р-пептидом.

1 – изопротеренол, 2 – норадреналин, 3 – BRL-37344, 4 – CL-316243 (все  $10^{-5}$  М), 5 – релаксин ( $10^{-8}$  М). Данные представлены в виде  $M \pm SD$ . \* -  $P < 0.05$ , в сравнении с контролем. □ – группа К, ■ - группа М3Р.

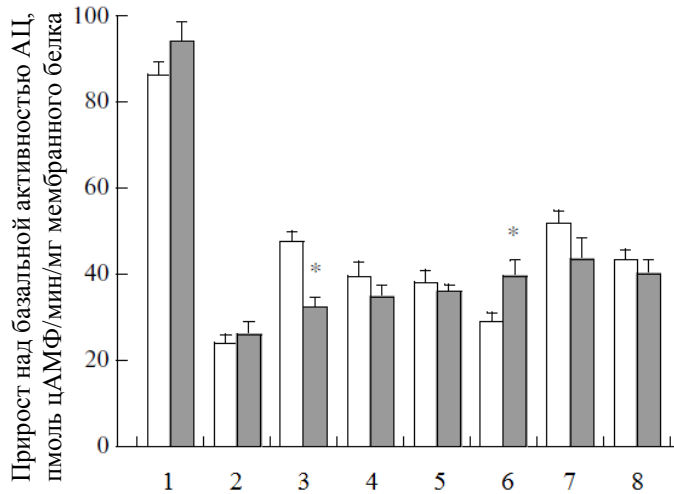
Таким образом, длительное ослабление МК<sub>3</sub>Р-сигнальных путей приводило к нарушению глюкозного гомеостаза, липидного обмена на фоне снижения массы тела крыс, что в целом согласуется с результатами генетических моделей с нокаутом гена для МК<sub>3</sub>Р. Выявлены изменения функциональной активности АЦСС в мозге, миокарде, эпидидимальном жире и ЩЖ крыс группы М3Р к регуляторному действию гормонов, ключевых регуляторов функций ЦНС, сердечно-сосудистой и эндокринной систем, а также липидного обмена.

### 3. Аутоиммунная С<sub>1В</sub>Р модель

При иммунизации животных пептидом [QAQAEVSECVVNTDH<sup>189-205</sup>]-А, соответствующим второй внеклеточной петле С<sub>1В</sub>Р на протяжении всего эксперимента отмечали специфичные антитела в сыворотке крови, хотя индексы иммунопозитивности были ниже, чем в группах М3Р 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 С1Р возникают на уровне продуцирующих тиролиберин гипоталамических нейронов или тиреотрофов гипофиза.

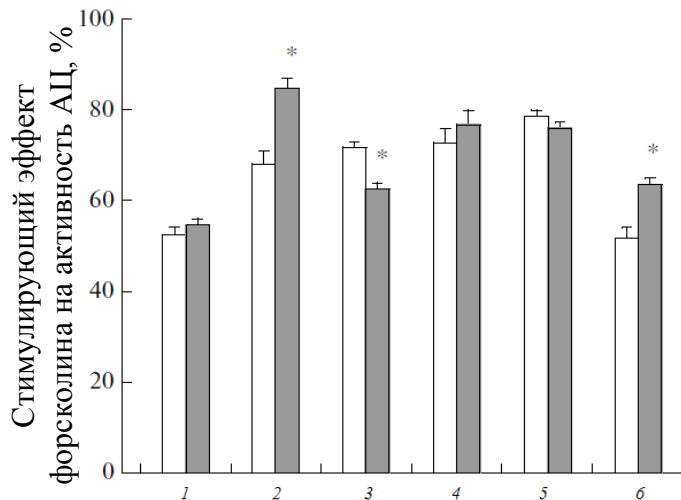
В мозге крыс группы С1Р отмечали снижение стимулирующего АЦ эффекта дофамина и усиление эффекта PACAP-38 (рис. 10). Наряду с этим был ослаблен ингибирующий АЦ эффект С<sub>1В</sub>Р-агониста 5-НОТ, в то время как ингибирующий эффект С<sub>1А</sub>Р-агониста 8-ОН-ДРАТ усиливался. Это можно рассматривать как компенсаторный механизм, обеспечивающий сохранение негативной серотониновой регуляции АЦ в условиях дефицита С<sub>1В</sub>Р (рис. 11). В пользу этого указывает то, что ингибирующий АЦ эффект серотонина, действующего через различные подтипы G<sub>i</sub>-сопряженных С<sub>1Р</sub>, сохранялся.

Таким образом, длительная иммунизация С<sub>1В</sub>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<sub>i</sub>-сопряженных С<sub>1Р</sub>.



**Рис. 10.** Стимулирующие АЦ эффекты гормонов в синапсомембранных мембранах мозга крыс, иммунизированных С<sub>1ВР</sub>-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<sub>1ВР</sub>-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-МК<sub>4</sub>Р и анти-МК<sub>3</sub>Р антителами проверяли на платах с С<sub>1ВР</sub>-пептидом, а пробы с анти-С<sub>1ВР</sub> антителами проверяли на платах с МК<sub>4</sub>Р-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.

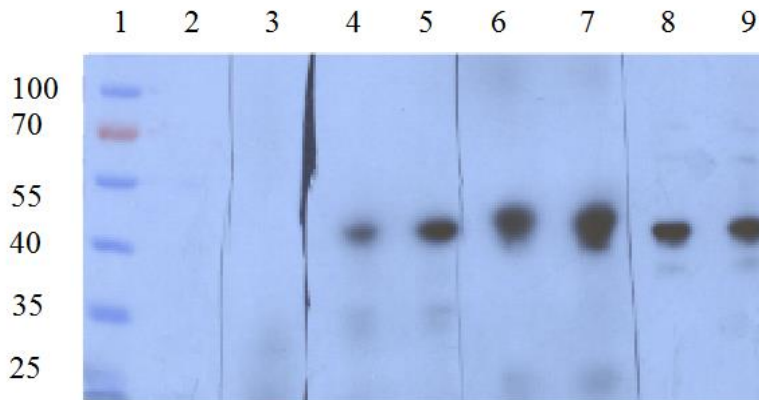
Сыворотка	Иммуносорбент		
	11–25 МК <sub>4</sub> Р	269–280 МК <sub>3</sub> Р	189–205 С <sub>1ВР</sub> Р
Контрольная сыворотка	0.4	0.3	0.9
Анти-МК <sub>4</sub> Р	18.2	н/т	0.5
Анти-МК <sub>3</sub> Р	н/т	23.8	0.3
Анти-С <sub>1ВР</sub> Р	0.7	н/т	47.9

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.



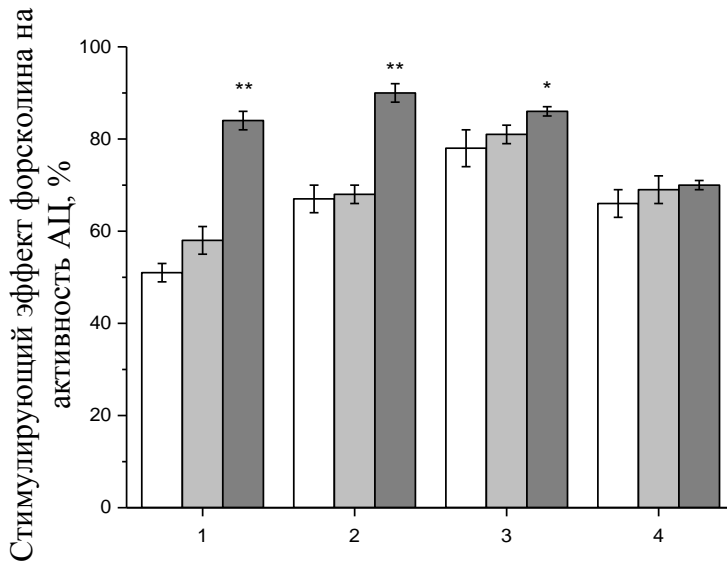
**Рис. 12.** Иммуноблоттинг антител с мембранной фракцией гипоталамуса интактных крыс. 1 – маркер молекулярного веса, 2 – контроль вторичных антител, 3 – антитела контрольных животных, 4 и 5 – анти-МК<sub>3</sub>Р антитела, 6 и 7 – анти-5-С<sub>1В</sub>Р антитела, 8 и 9 – анти-МК<sub>4</sub>Р антитела. Цифры справа – молекулярный вес.

Базальная активность АЦ заметно не менялась при инкубации мембран с анти-МК<sub>3</sub>Р- и анти-С<sub>1В</sub>Р-антителами, и лишь незначительно снижалась в присутствии анти-МК<sub>4</sub>Р-антител (**табл. 5**). Преинкубация с анти-МК<sub>4</sub>Р-антителами приводила к снижению стимулирующих АЦ эффектов  $\alpha$ -МСГ и МК<sub>4</sub>Р-агониста ТНIQ (**табл. 5**). Анти-МК<sub>4</sub>Р антитела снижали эффективность связывания МК<sub>4</sub>Р-агонистов с рецептором, что выражалось в увеличении значений ЕС<sub>50</sub>. Для  $\alpha$ -МСГ значения ЕС<sub>50</sub> составляли 2.3 нМ в пробе с контрольными антителами и 7.5 нМ в присутствии анти-МК<sub>4</sub>Р, для ТНIQ ЕС<sub>50</sub> – 1.9 и 9.1 нМ, соответственно. Полученные результаты свидетельствуют в пользу специфичности анти-МК<sub>4</sub>Р-сыворотки по отношению к МК<sub>4</sub>Р. Анти-МК<sub>3</sub>Р антитела вызывали значительное снижение эффекта  $\gamma$ -МСГ, действующего преимущественно на МК<sub>3</sub>Р, и небольшое снижение АЦ эффекта  $\alpha$ -МСГ (**табл. 5**). Инкубация с анти-С<sub>1В</sub>Р-антителами не влияла на стимулирующие АЦ эффекты серотонина, но ослабляли ингибирующие АЦ эффекты серотонина и С<sub>1В</sub>Р-агониста 5-НОТ (**рис. 13**).

**Таблица 5.** Влияние антител против МК<sub>4</sub>Р, МК<sub>3</sub>Р и С<sub>1В</sub>Р на стимулирующие АЦ эффекты в мембранах, выделенных из гипоталамуса интактных крыс.

Сыворотка	БА <sup>а</sup>	Агонист, концентрация				
		$\alpha$ -МСГ, 10 <sup>-7</sup> М	ТНIQ, 10 <sup>-7</sup> М	$\gamma$ -МСГ, 10 <sup>-7</sup> М	Дофамин, 10 <sup>-6</sup> М	Серотонин, 10 <sup>-6</sup> 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 <sub>4</sub> 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 <sub>3</sub> 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 <sub>1В</sub> 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:* <sup>а</sup> – Базальная активность, пмоль цАМФ/мин/мг мембранного белка,  $M \pm SD$  \* –  $P < 0.05$ , в сравнении с контролем.



**Рис. 13.** Влияние анти-C<sub>1B</sub>R антител на ингибирующие АЦ эффекты агонистов G<sub>i</sub>-сопряженных рецепторов в мембранах, выделенных из гипоталамуса интактных крыс. 1 – серотонин, 2 – 5-HT, 3 – 8-OH-DPAT, 4 – бромокриптин (все 10<sup>-5</sup> М). Стимулирующий АЦ эффект форсколина (10<sup>-5</sup> 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<sub>1B</sub>R-антителами.

Таким образом, длительная иммунизация крыс пептидами, соответствующими внеклеточным участкам МК<sub>3</sub>R, МК<sub>4</sub>R и C<sub>1B</sub>R, приводила к образованию антител, которые были специфичны к соответствующим рецепторам. Анти-МК<sub>4</sub>R, анти-МК<sub>3</sub>R и анти-C<sub>1B</sub>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 МК<sub>3</sub>R и МК<sub>4</sub>R 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 МК<sub>4</sub>R отмечали повышение массы тела, в то время как при ингибировании МК<sub>3</sub>R 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 МК<sub>3</sub>R- и МК<sub>4</sub>R-зависимых. Полученные данные указывают на возможные молекулярные механизмы, которые связывают ослабление меланокортинового сигналинга у пациентов с мутациями в компонентах МК<sub>3</sub>R- и МК<sub>4</sub>R-сигнальных путей с развитием ожирения, МС и его осложнений со стороны сердечно-сосудистой и эндокринной систем, а также свидетельствуют о необходимости детекции антител к МК<sub>3</sub>R и МК<sub>4</sub>R у пациентов с метаболическими расстройствами. Впервые показано, что длительное ингибирование C<sub>1B</sub>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<sub>1B</sub>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 (МК<sub>4</sub>P) 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 МК<sub>4</sub>P, меняется чувствительность аденилатциклазной сигнальной системы (АЦСС) к агонистам МК<sub>4</sub>P, D<sub>1</sub>-дофаминовых и 5-HT<sub>1</sub>-серотониновых рецепторов (С<sub>1</sub>P). В миокарде меняется соотношение стимулирующих аденилатциклазу (АЦ) эффектов агонистов β<sub>1</sub>-, β<sub>2</sub>- и β<sub>3</sub>-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 МК<sub>3</sub>P вызывает изменение глюкозного гомеостаза, повышение массы жировой ткани, дислипидемию, дефицит тиреоидных гормонов. В мозге иммунизированных крыс снижаются стимулирующие АЦ эффекты МК<sub>3</sub>P-агониста γ-меланоцитстимулирующего гормона, серотонина, норадреналина и пептидного гормона PАСАР-38, и усиливаются ингибирующие АЦ эффекты агонистов С<sub>1</sub>P, 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 МК<sub>3</sub>P.
4. Длительная иммунизация крыс БСА-конъюгатом фрагмента 189–205 второй внеклеточной петли серотонинового рецептора 1В подтипа (С<sub>1В</sub>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<sub>1В</sub>P-серотониновой и тиреоидной системами.
5. Преинкубация мембран, выделенных из гипоталамуса интактных крыс с антителами, полученными из крови крыс, иммунизированных фрагментами МК<sub>4</sub>P, МК<sub>3</sub>P и С<sub>1В</sub>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.