

ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ В МИОКАРДЕ САМЦОВ КРЫС С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ И ВЛИЯНИЕ НА НЕЕ ЛЕЧЕНИЯ МЕТФОРМИНОМ И ИНТРАНАЗАЛЬНО ВВОДИМЫМ ИНСУЛИНОМ

Деркач К.В.¹, Игнатъева П.А.², Шпаков А.О.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова»
Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение
здравоохранения «Санкт-Петербургская клиническая больница
Российской академии наук», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Шпаков Александр Олегович,
«ИЭФБ РАН», пр. Тореза, д. 44,
Санкт-Петербург, Россия, 194223.
Тел.: +7(812)552-31-17.
E-mail: alex_shpakov@list.ru

Статья поступила в редакцию 07.02.2016
и принята к печати 05.03.2016.

Резюме

Метаболический синдром (МС) тесно ассоциирован с развитием заболеваний сердечно-сосудистой системы, одной из причин которых являются изменения в гормональных системах, в том числе в аденилатциклазной сигнальной системе (АЦСС), чувствительной к агонистам адренергических рецепторов (АР) и другим гормонам и играющей ключевую роль в регуляции функций миокарда. Однако функциональное состояние АЦСС миокарда при МС в настоящее время мало изучено. Цель исследования состояла в изучении гормональной чувствительности АЦСС в миокарде крыс с МС и влияния на нее лечения метформинном (МФ) и интраназально вводимым инсулином (ИИ). МС у крыс вызывали потреблением ими в течение двух месяцев 30-процентного раствора сахарозы и диеты, обогащенной насыщенными жирами. Лечение МС-крыс МФ (200 мг/кг/день) и ИИ (0,5 МЕ/крыса/день) проводили в течение 5 недель. У леченных МФ и ИИ МС-крыс восстанавливались толерантность к глюкозе, инсулиновая чувствительность и липидный метаболизм. В миокарде МС-крыс снижались стимулирующие аденилатциклазу (АЦ) эффекты β_1/β_2 -АР-агонистов, релаксина и глюкагонподобного пептида-1, соотношение между β_1/β_2 -АР и β_3 -АР смещалось в сторону β_3 -АР, ослаблялся ингибирующий эффект 2-хлор- N^6 -циклопентиладенозина, агониста A_1 -аденозиновых рецепторов. Лечение МФ и, в меньшей степени, ИИ восстанавливало гормональную регуляцию АЦ в миокарде. Таким образом, в миокарде МС-крыс нарушалась гормональная чувствительность АЦСС, а лечение МФ и ИИ приводило к ее полному или частичному восстановлению, что является одним из механизмов кардиопротекторного действия этих препаратов.

Ключевые слова: метаболический синдром, миокард, аденилатциклаза, адренергический рецептор, метформин.

Для цитирования: Деркач К.В., Игнатъева П.А., Шпаков А.О. Гормональная регуляция аденилатциклазы в миокарде самцов крыс с метаболическим синдромом и влияние на нее лечения метформинном и интраназально вводимым инсулином. Трансляционная медицина. 2016; 3 (1): 73–81.

////////////////////////////////////
**HORMONAL REGULATION OF ADENYLYL
 CYCLASE IN THE MYOCARDIUM OF MALE
 RATS WITH METABOLIC SYNDROME
 AND THE INFLUENCE OF TREATMENT
 WITH METFORMIN AND INTRANASALLY
 ADMINISTERED INSULIN**

Derkach K.V.¹, Ignatieva P.A.², Shpakov A.O.¹

¹ Sechenov Institute
 of Evolutionary Physiology and Biochemistry
 of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia
² Saint Petersburg Clinical Hospital of the Russian Academy of Sciences,
 Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:
 Aleksandr O. Shpakov,
 Sechenov Institute
 of Evolutionary Physiology and Biochemistry
 of the Russian Academy of Sciences, Saint
 Petersburg, Russia
 Phone: +7(812)552-31-17.
 E-mail: alex_shpakov@list.ru

Received 07 February 2016; accepted 05
 March 2016.

////////////////////////////////////
Abstract

Background. Metabolic syndrome (MS) is closely associated with the development of diseases of the cardiovascular system, one of the causes of which are changes in the hormonal system, including adenylyl cyclase signaling system (ACSS), which is sensitive to agonists of adrenergic receptors (AR) and the other hormones and plays a key role in the regulation of myocardial function. However, the functional state of the myocardial ACSS in MS is currently poorly understood. **Objective.** The aim of the work was to study the hormone sensitivity of ACSS in the myocardium of rats with MS and the influence of metformin (MF) and intranasally administered insulin (I-I) treatment on it. **Design and methods.** The MS in rats was caused by two-month consumption of 30% sucrose solution and diet enriched by saturated fat. The treatment of the MS-rats with MF (200 mg/kg/day) and I-I (0.5 IU/rat/day) was performed for 5 weeks. **Results.** The MF and I-I treatment of MS-rats led to restoration of glucose tolerance, insulin sensitivity and lipid metabolism. In the myocardium of MS-rats the adenylyl cyclase (AC) stimulating effects of β_1/β_2 -AR agonists, relaxin and glucagon-like peptide-1 were decreased, the relationship between β_1/β_2 - and β_3 -AR was shifted to β_3 -AR, and the inhibitory effect of 2-chloro-N⁶-cyclopentyl adenosine, an agonist of A₁-adenosine receptors, was reduced. The treatment with MF and, to a lesser extent, with I-I restored the hormonal regulation of AC in the myocardium. **Conclusion.** Thus, in the myocardium of MS-rats the hormonal sensitivity of ACSS was impaired, and the MF and I-I treatment led to its complete or partial restoration, which is one of the mechanisms of cardioprotective effect of these drugs.

Key words: metabolic syndrome, myocardium, adenylyl cyclase, adrenergic receptor, metformin

For citation: Derkach KV, Ignatieva PA, Shpakov AO. Hormonal regulation of adenylyl cyclase in the myocardium of male rats with metabolic syndrome and the influence of treatment with metformin and intranasally administered insulin. Translyatsionnaya medicina = Translational Medicine. 2016; 3 (1): 73–81.

Метаболический синдром (МС) представляет собой одно из широко распространенных заболеваний, которое включает ожирение, гипергликемию, гипертензию, дислипидемию. Поскольку важнейшим фактором, который ассоциирован с развитием МС, является инсулиновая резистентность, то отмечается тесная взаимосвязь между МС и сахарным диабетом (СД) 2-го типа [1]. В мире МС страдают от 20

до 30 % взрослого населения, и это число постоянно возрастает. Наибольшую опасность для пациентов с МС представляют осложнения со стороны сердечно-сосудистой системы (ССС), являющиеся основной причиной их смерти. Уже на ранних этапах МС отмечаются нарушения липидного обмена. Дислипидемия и усиление воспалительных процессов в сосудистой стенке приводят к прогрессирующим

атеросклеротическим изменениям и гипертензии, что в конечном итоге становится причиной тяжелых форм кардиомиопатии и инфаркта миокарда [2].

В основе развития болезней ССС лежат патологические изменения в гормональных сигнальных системах, ответственных за регуляцию функций сердечной мышцы. Ключевую роль здесь играет аденилатциклазная сигнальная система (АЦСС), чувствительная к лигандам адренергических рецепторов (АР) и ряду других гормонов [3]. Ранее нами и другими авторами было показано, что при СД 2-го типа, который функционально связан с МС, меняется чувствительность АЦСС к агонистам β -АР и релаксину, и эти изменения положительно коррелируют с тяжестью и продолжительностью заболевания [4–7]. Однако функциональное состояние АЦСС и ее чувствительность к гормонам в миокарде при экспериментальных моделях МС остаются мало изученными [8]. В миокарде не исследовано влияние лечения животных с МС метформином (МФ) и интраназально вводимым инсулином (ИИ) на активность АЦСС. МФ в настоящее время является основным антидиабетическим препаратом, который, активируя АМФ-зависимую протеинкиназу, восстанавливает липидный обмен и глюкозный гомеостаз, повышает чувствительность тканей к инсулину [9]. Нами показано, что МФ улучшает метаболические и гормональные показатели у крыс с ожирением [10]. ИИ восстанавливает активность инсулиновой системы мозга и улучшает центральную регуляцию энергетического гомеостаза и периферическую инсулиновую чувствительность [4, 11]. Исходя из вышесказанного, идентификация гормональных нарушений в миокарде в условиях МС и влияние на них лечения МФ и ИИ является одной из актуальных задач медицины, поскольку позволяет разработать новые подходы для лечения заболеваний ССС при МС и вносит важный вклад в понимание их этиологии и патогенеза.

Цель исследования состояла в изучении функционального состояния АЦСС и ее регуляции гормонами в миокарде крыс с МС, а также влияния на активность АЦСС лечения МФ и ИИ. МС у крыс вызывали потреблением ими в течение двух месяцев 30-процентного раствора сахарозы и диеты, обогащенной животными жирами. Изучали регуляцию АЦСС активаторами аденилатциклазы (АЦ) — агонистами β -АР, включая селективные β_3 -АР-агонисты, релаксином, глюкагоном, глюкагонподобным пептидом-1 (ГПП-1), которые действуют через сопряженные с G_s -белками рецепторы. Наряду с этим изучали влияние на АЦСС миокарда лейцин-энкефалина и 2-хлор- N^6 -циклопентила-

денозина, агониста A_1 -аденозиновых рецепторов (A_1 -АденР), действие которых реализуется через рецепторы, сопряженные с АЦ через G_i -белки.

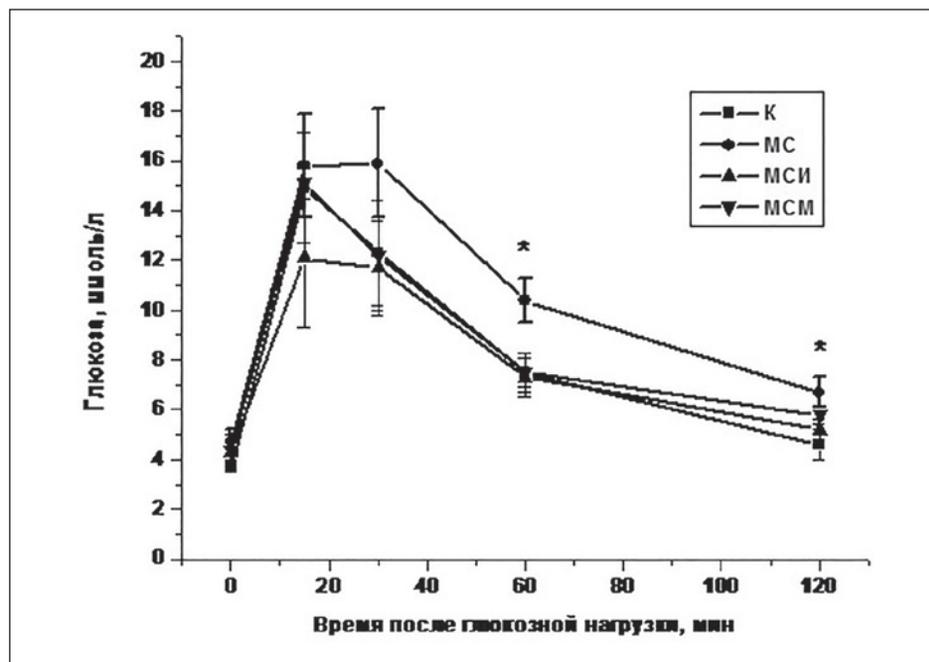
Материал и методика

Для индукции МС были взяты 30 самцов крыс Wistar, которые с возраста 25 дней начали получать высокоуглеводную диету (30-процентный раствор сахарозы вместо питьевой воды) в сочетании с высокожировой диетой, включающей потребление 5 г маргарина/крыса/сутки. Через 2 месяца животных обследовали с помощью глюкозотолерантного теста (ГТТ), и тех из них, у кого через 120 мин после нагрузки глюкозой ее уровень превышал 6,5 ммоль/л, рассматривали, как крыс с признаками МС и использовали в дальнейших экспериментах. МС-крыс разделили на 3 группы — без лечения (МС, $n=6$), с лечением МФ (МСМ, $n=6$) и ИИ (МСИ, $n=6$). МФ давали перорально в суточной дозе 200 мг/кг, ИИ — в суточной дозе 0,5 МЕ/крысу. Контрольные животные (К, $n=6$) и группа МС вместо препаратов получали их плацебо. Группы МС, МСМ и МСИ во время лечения находились на той же диете, что и до лечения. Лечение продолжали в течение 5 недель, после чего крыс декапитировали и извлекали миокард, который промывали, немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C . За неделю перед забоем всех крыс обследовали с помощью ГТТ, а перед забоем забирали кровь для оценки показателей липидного обмена.

Для оценки толерантности к глюкозе крысам в/б вводили раствор глюкозы (2 г/кг), после чего в течение 120 мин измеряли концентрацию глюкозы и инсулина в крови животных. Измерение уровня глюкозы проводили в цельной крови, полученной из хвостовой вены, с помощью глюкометра Life Scan Johnson&Johnson (Дания) и тест-полосок One Touch Ultra (США). Концентрацию инсулина в сыворотке крови измеряли с помощью набора Rat Insulin ELISA (Mercodia AB, Швеция). Концентрацию триглицеридов, общего холестерина и комплексов холестерина с липопротеидами низкой (Хол-ЛПНП) и высокой (Хол-ЛПВП) плотности измеряли с помощью наборов фирмы Ольвекс Диагностикам (Россия).

В биохимических экспериментах использовали норадреналин, изопротеренол, селективные β_3 -АР-агонисты — [4-[[2-(3-хлорофенил)-2-гидроксиэтил]амино]пропил] уксусной кислоты натриевую соль (BRL-37344) и [(2R)-2-[[2(2R)-2-(3-хлорофенил)-2-гидроксиэтил]амино]пропил]-1,3-бензодиазоксол-2,2-дикарбоновой кислоты динариевую соль (CL-316243), релаксин, глюкагон, ГПП-1, лейцин-энкефалин, 2-хлор- N^6 -циклопенти-

Рис. 1. Влияние лечения МС-крыс интраназально вводимым инсулином и метформином на динамику изменения уровня глюкозы в глюкозотолерантном тесте.



* - различия между группами К и МС достоверны при $P < 0,05$. Данные представлены в виде $M \pm SD$.

Таблица 1. Масса тела, уровни глюкозы и инсулина натощак у самцов крыс с МС и влияние на них лечения метформином и интраназально вводимым инсулином

| Группа крыс | Масса, г | Глюкоза, мМ | Инсулин, нг/мл |
|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| К ($n=6$) | 287 ± 18 | $3,5 \pm 0,3$ | $0,46 \pm 0,20$ |
| МС ($n=6$) | $363 \pm 23^*$ | $4,8 \pm 0,3^*$ | $0,64 \pm 0,07$ |
| МСИ ($n = 6$) | 343 ± 19 | $4,2 \pm 0,6$ | $0,44 \pm 0,13$ |
| МСМ ($n = 6$) | $314 \pm 17\#$ | $4,2 \pm 0,2\#$ | $0,47 \pm 0,18$ |

Данные представлены как $M \pm SD$. * — различия между группами К и МС, # — различия между МС-крысами с лечением и без лечения статистически значимы при $P < 0.05$.

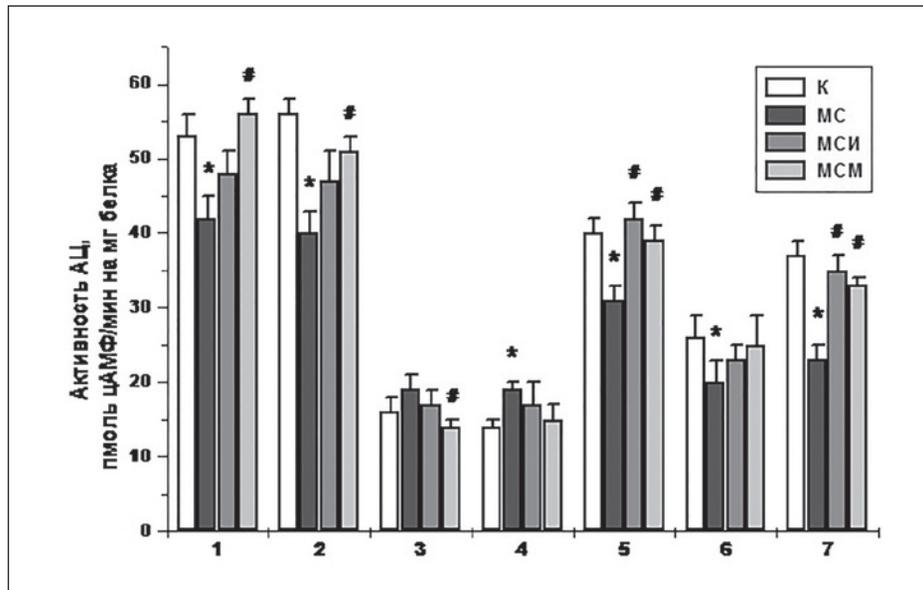
ладенозин, 5'-гуанилилимидодифосфат (ГИДФ), форсколин, цАМФ, АТФ, креатинфосфокиназу из мышц кролика, креатинфосфат (Sigma, США).

Плазматические мембраны из миокарда крыс выделяли, как описано ранее [4]. Для этого желудочки отделяли от предсердий, жира и сердечных клапанов, промывали охлажденным физиологическим раствором, измельчали и гомогенизировали с помощью Polytron в охлажденном 50 мМ Tris-HCl буфере (рН 7,4), который содержал 5 мМ MgCl₂, 320 мМ сахарозу и коктейль ингибиторов протеаз (буфер А). Соотношение ткани и буфера составило 1:20 (по объему). Полученный гомогенат центрифугировали (480 g, 10 мин), осадок отбрасывали, супернатант снова центрифугировали (27 500 g, 20

мин). Полученный осадок переосаждали в буфере А без сахарозы (27 500 g, 20 мин), ресуспендировали в том же буфере и использовали для определения активности АЦ.

Активность АЦ определяли, как описано ранее [12], для чего в течение 12 мин при 37°C инкубировали миокардиальные мембраны в смеси, содержащей 50 мМ Tris-HCl (рН 7.5), 5 мМ MgCl₂, 0.1 мМ цАМФ, 1 мМ АТФ, 37 КБк [α -³²P]-АТФ, 20 мМ креатинфосфата, 0,2 мг/мл креатинфосфокиназы и 50–75 мкг мембранного белка. В качестве радиоактивно меченого субстрата использовали [α -³²P] АТФ (150 ГБк/ммоль) («Изотоп», Россия). Активность АЦ выражали в пмоль цАМФ/мин на 1 мг мембранного белка.

Рисунок 2. Стимулирующие АЦ эффекты агонистов β -АР и пептидных гормонов в миокарде МС-крыс и влияние на них лечения интраназально вводимым инсулином и метформином.



1 – норадреналин, 2 – изопротеренол, 3 – BRL-37344, 4 – CL-316243 (все – 10^{-5} М), 5 – релаксин (10^{-8} М), 6 – глюкагон (10^{-7} М), 7 – ГПП-1 (10^{-7} М).

Различия между группами МС и К (*) и между группой МС и группами МСИ и МСМ (#) достоверны при $P < 0.05$. Данные представлены в виде $M \pm SD$.

Таблица 2. Уровень триглицеридов, общего холестерина, Хол-ЛПВП и Хол-ЛПНП, соотношение Хол-ЛПНП/Хол-ЛПВП у МС-крыс и влияние на них лечения ИИ и МФ.

| Группа крыс | Триглицериды, мМ | Общий Хол, мМ | Хол-ЛПВП, мМ | Хол-ЛПНП, мМ | Хол-ЛПНП/Хол-ЛПВП |
|-----------------|-------------------|-------------------|-----------------|-------------------|---------------------|
| К ($n=6$) | $0,82 \pm 0,19$ | $4,47 \pm 0,23$ | $2,67 \pm 0,20$ | $1,48 \pm 0,17$ | $0,554 \pm 0,019$ |
| МС ($n=6$) | $1,47 \pm 0,22^*$ | $6,14 \pm 0,33^*$ | $2,52 \pm 0,24$ | $2,85 \pm 0,18^*$ | $1,131 \pm 0,026^*$ |
| МСИ ($n = 6$) | $0,93 \pm 0,18\#$ | $5,37 \pm 0,34\#$ | $2,71 \pm 0,20$ | $2,07 \pm 0,12\#$ | $0,764 \pm 0,025\#$ |
| МСМ ($n = 6$) | $1,02 \pm 0,37\#$ | $5,32 \pm 0,28\#$ | $2,52 \pm 0,26$ | $2,41 \pm 0,19$ | $0,956 \pm 0,030\#$ |

Данные представлены как $M \pm SD$. * — различия между группами К и МС, # — различия между МС-крысами с лечением и без лечения статистически значимы при $P < 0.05$.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием компьютерной программы ANOVA. Данные представлены в виде $M \pm SD$ нескольких независимых экспериментов. Различия между значениями активности АЦ в различных группах животных оценивали как достоверные при $P < 0,05$.

Результаты

У МС-крыс масса тела и уровень глюкозы были выше, чем в группе К, нарушалась толерантность к глюкозе, на что указывают результаты ГТТ (Табл. 1, Рис. 1). У МС-крыс немного повышался

уровень инсулина, на 91 % возрастал индекс инсулиновой резистентности НОМА-IR, что указывает на снижение чувствительности тканей к инсулину. Лечение МС-крыс с помощью ИИ и МФ снижало массу тела, уровни глюкозы и инсулина, улучшало толерантность к глюкозе. На это указывает тот факт, что в ГТТ концентрационные кривые для глюкозы в группах МСМ и МСИ почти не отличались от контроля (Табл. 1, Рис. 1). У МС-крыс отмечали повышение уровня триглицеридов, общего холестерина, Хол-ЛПНП и соотношения Хол-ЛПНП/Хол-ЛПВП. Лечение с помощью ИИ и МФ частично восстанавливало показатели липидного метаболиз-

Таблица 3. Базальная и стимулированная негормональными агентами активность АЦ в миокардиальных мембранах МС-крыс и влияние на нее лечения ИИ и МФ

| | Активность АЦ, пмоль цАМФ/мин на 1 мг белка, $M \pm SD$. | | | |
|-----|---|------------------------|-------------------|---------------------|
| | Базальная | Форсколин, 10^{-5} М | ГИДФ, 10^{-5} М | NaF, 10 мМ |
| К | 27 ± 2 | 164 ± 6 (137, 100%) | 95 ± 3 (68, 100%) | 121 ± 5 (94, 100%) |
| МС | 29 ± 3 | 152 ± 9 (123, 90%) | 78 ± 3 (49, 72%)* | 101 ± 4* (72, 77%)* |
| МСИ | 25 ± 1 | 166 ± 7 (141, 103%) | 88 ± 6 (63, 93%) | 109 ± 6 (84, 89%) |
| МСМ | 28 ± 4 | 153 ± 5 (125, 91%) | 93 ± 3 (65, 96%)# | 126 ± 6 (98, 104%)# |

В скобках приведены прирост активности АЦ на ее базальном уровне (пмоль цАМФ/мин на 1 мг белка) и прирост активности (в процентах) от такового в группе К, принятого за 100 %. Данные представлены, как $M \pm SD$. * — различия между группами К и МС, # — между группой МС и группами МСИ и МСМ статистически значимы при $P < 0,05$.

ма, снижая уровень триглицеридов, общего холестерина и соотношение Хол-ЛПНП/Хол-ЛПВП (Табл. 2). Таким образом, у МС-крыс было выявлено нарушение толерантности к глюкозе, инсулиновая резистентность, дислипидемия, а их лечение МФ и ИИ улучшало энергетический обмен и повышало чувствительность тканей к инсулину.

В фракциях мембран, выделенных из миокарда контрольных и МС-крыс, как базальная, так и стимулированная форсколином (10^{-5} М) активность АЦ существенно не различались. В то же время, стимулирующие эффекты ГИДФ (10^{-5} М), негидролизуемого аналога ГТФ, и фторида натрия (10 мМ) в миокарде МС-крыс снижались в сравнении с группой К на 28 и 23 %, соответственно (Табл. 3). Таким образом, каталитическая активность АЦ в миокарде МС-крыс существенно не менялась, в то время как опосредуемая G_s -белками активация фермента заметно ослаблялась, о чем свидетельствуют сниженные АЦ эффекты ГИДФ и NaF, которые переводят G_s -белки в активированное состояние. Лечение МС-крыс МФ и ИИ существенно не влияло на базальную и стимулированную форсколином активность АЦ, но частично (ИИ) или полностью (МФ) восстанавливало стимуляцию АЦ активаторами G_s -белков (Табл. 3). Эти данные свидетельствуют о том, что лечение МФ и в меньшей степени ИИ способствует восстановлению функций G_s -белков и их взаимодействия с АЦ.

Далее изучали регуляцию АЦ гормонами, стимулирующими активность фермента. У МС-крыс стимулирующие АЦ эффекты норадреналина и изопротеренола, действие которых реализуется преимущественно через β_1 - и β_2 -АР, достоверно снижались, в то время как АЦ эффекты β_3 -агонистов

BRL-37344 и CL-316243, напротив, повышались (Рис. 2). Эти данные указывают на изменение соотношения между β_1/β_2 -АР- и β_3 -АР-путями в миокарде МС-крыс в пользу β_3 -АР-путей. Ослабление стимулирующего влияния на АЦ отмечали и для пептидных гормонов — ГПП-1, глюкагона и релаксина. В наибольшей степени снижался АЦ эффект ГПП-1, который в группе МС был на 38 % ниже такового в контроле. Лечение МФ в значительной степени восстанавливало АЦ эффекты агонистов β -АР и их соотношение, ИИ был менее эффективным. Так рассчитанное соотношение величин АЦ эффектов β_1/β_2 -агониста изопротеренола и β_3 -агониста BRL-37344 в группе МС составило 2,1, в группе МСМ повышалось до 3,6, что близко к его значениям в контроле (3,5). В группе МСИ это соотношение повысилось только до 2,8. Оба препарата также восстанавливали АЦ эффекты ГПП-1 и релаксина (Рис. 2). Таким образом, в миокарде МС-крыс, леченных МФ и ИИ, отмечалось восстановление чувствительности АЦ к гормональным агентам, активаторам АЦ, причем МФ в этом отношении был более эффективным, чем ИИ.

На заключительном этапе исследовали ингибирующие АЦ эффекты лейцин-энкефалина, агониста G_i -сопряженных δ - и μ -опиоидных рецепторов, и селективного A_1 -АденР-агониста 2-хлор- N^6 -циклопентиладенозина. Для этого изучали влияние лейцин-энкефалина и 2-хлор- N^6 -циклопентиладенозина на стимулированную форсколином активность АЦ. Вызываемое лейцин-энкефалином снижение АЦ эффекта форсколина в миокарде контрольных и МС-крыс почти не различалось — $21,9 \pm 2,0$ и $19,4 \pm 1,6$ пмоль цАМФ/мин на 1 мг мембранного белка, а лечение МС-крыс МФ и ИИ слабо влияло на эти

значения ($23,0 \pm 2,5$ и $20,2 \pm 1,8$ пмоль цАМФ/мин на 1 мг мембранного белка). В то же время ингибирующий эффект A_1 -АденР-агониста 2-хлор- N^6 -циклопентиладенозина, который превосходил таковой у лейцин-энкефалина, в миокарде МС-крыс был ниже, чем в контроле, и восстанавливался в группе МСМ. Снижение АЦ эффекта форсколина в группах К, МС, МСМ и МСИ составило $34,8 \pm 2,2$, $25,1 \pm 1,7$, $32,6 \pm 1,5$ и $28,4 \pm 2,2$ пмоль цАМФ/мин на 1 мг мембранного белка. Эти данные указывают на способность МФ восстанавливать ингибирующий АЦ эффект агонистов A_1 -АденР в миокарде МС-крыс.

Обсуждение

Заболевания ССС играют важную роль в этиологии и патогенезе МС, вследствие чего поиск их молекулярных причин является одной из актуальных задач эндокринологии и кардиологии. Одной из них является нарушение гормональной регуляции миокарда в условиях метаболических расстройств, и ключевую роль здесь играет АЦСС, чувствительная к β -агонистам. Повышение уровня цАМФ в клетке в ответ на активацию АЦ β -агонистами вызывает открытие активируемых гиперполяризацией, цАМФ-зависимых ионных каналов, а также стимулирует активность протеинкиназы А, которая фосфорилирует множество эффекторных белков, участвующих в регуляции процессов возбуждения и сокращения кардиомиоцитов. В результате повышается внутриклеточная концентрация Ca^{2+} , что опосредует хорошо известные эффекты симпатической иннервации сердца — положительные хронотропный, дромотропный, лузитропный и ионотропный эффекты [13]. Свои эффекты на АЦ β -агонисты могут оказывать через различные типы β -АР. При этом β_1 -АР сопряжены только с G_s -белками, β_2 -АР — преимущественно с G_s -белками, но при длительной активации взаимодействуют и с G_i -белками, β_3 -АР с одинаковой эффективностью взаимодействуют с G_s - и G_i -белками [14]. Вследствие этого активация β_3 -АР приводит к снижению сердечного ритма [13].

Нами показано, что в миокарде МС-крыс стимулирующие АЦ эффекты норадреналина и β_1/β_2 -агониста изопротеренола снижаются, в то время как АЦ эффекты BRL-37344 и CL-316243, селективных β_3 -агонистов, напротив, усиливаются. По величине АЦ эффекты β_3 -агонистов существенно уступают таковым у норадреналина и изопротеренола, что определяется большим числом β_1 -АР в миокарде и способностью β_3 -агонистов разнонаправленно действовать на АЦ как стимулирующим, так и ингибирующим способом. Соотношение между β_1/β_2 -АР- и β_3 -АР-путями в миокарде МС-крыс ме-

нялось, и если у здоровых животных АЦ эффекты норадреналина и изопротеренола превосходили таковые β_3 -агонистов в 3,5 раза, то при МС — только в два раза. Лечение МФ и ИИ в различной степени нормализовало соотношение β -АР-путей в пользу β_1/β_2 -АР, причем наиболее эффективным был МФ, который полностью восстанавливал как АЦ эффекты β -агонистов, так и соотношение между β_1/β_2 -АР и β_3 -АР.

Сходную картину ранее наблюдали другие авторы при изучении β -АР-сигнальных путей в миокарде крыс с СД 1-го типа, где соотношение β_1 -, β_2 - и β_3 -АР составило 40:36:23 и существенно отличалось от такового в контроле — 62:30:8. Лечение инъекционным инсулином предотвращало снижение числа β_1 - и β_2 -АР, вследствие чего соотношение β_1 -, β_2 - и β_3 -АР восстанавливалось до 57:33:10 [15]. Нами при изучении АЦСС в миокарде крыс с СД 2-го типа также было выявлено ослабление АЦ эффекта изопротеренола и смещение соотношения β -АР-путей в пользу β_3 -АР, причем лечение крыс D_2 -агонистом бромкриптином улучшало регуляцию АЦ β -АР-агонистами [16]. Данные об изменении соотношения между β_1 -, β_2 - и β_3 -АР получены и при изучении пациентов с острой сердечной недостаточностью. В кардиомиоцитах, выделенных из левого желудочка этих пациентов, в два-три раза повышалось число β_3 -АР [17]. У пациентов с МС и СД 2-го типа выявлена мутация в гене для β_3 -АР, которая приводила к повышению активности этого рецептора [18]. Поскольку в условиях метаболических расстройств и ассоциированной с ними кардиомиопатии ослабляются β_1 -АР-пути и усиливаются β_3 -АР-пути, то нормализация соотношения между ними под действием лекарственных препаратов может быть важнейшим показателем их эффективности, и это заключение вполне применимо к изученным нами МФ и ИИ. Одной из причин этого является восстановление энергетического гомеостаза у МС-крыс, которых в течение 5 недель лечили МФ и ИИ. Оба препарата, хотя и в различной степени, улучшали толерантность к глюкозе, восстанавливали инсулиновую чувствительность и липидный метаболизм.

Наряду с β -агонистами функции регуляторов внутриклеточного уровня цАМФ и зависимых от него каскадов в кардиомиоцитах могут выполнять пептидные гормоны — релаксин, ГПП-1 и глюкагон, а также агонисты опиоидных и пуриnergических рецепторов. Релаксин, ГПП-1 и глюкагон через G_s -сопряженные рецепторы стимулируют АЦ [19, 20], в то время как лейцин-энкефалин и 2-хлор- N^6 -циклопентиладенозин, агонисты G_i -сопряженных δ/μ -опиоидных рецепторов и A_1 -АденР, напротив, снижают стимулированную другими

агентами активность АЦ [21, 22]. В проведенном исследовании нами показано, что у МС-крыс снижаются стимулирующие АЦ эффекты ГПП-1 и релаксина и ингибирующий эффект 2-хлор-*N*⁶-циклопентиладенозина, что указывает на ослабление их регуляторного влияния на сердечную мышцу.

Имеются многочисленные данные о том, что ГПП-1 играет важную роль в регуляции сердечного ритма, артериального давления, выполняет кардиопротекторные функции при повреждении миокарда в условиях ишемии/реперфузии [23]. Ряд авторов различают способность ГПП-1 контролировать функции ССС и его способность влиять на глюкозный гомеостаз [24]. Релаксин, пептидный гормон инсулиновой группы, также обладает выраженными кардиопротекторными свойствами, стимулирует расширение кровеносных сосудов, запускает процессы ангиогенеза и ремоделирования сосудов, предотвращая таким образом острую сердечную недостаточность, острый инфаркт миокарда, ишемическую болезнь сердца и развивающуюся в условиях МС и СД 2-го типа кардиомиопатию [25]. Агонисты А₁-АденР ингибируют высвобождение норадреналина и препятствуют гиперактивации АЦ, что позволяет сохранить β₁-АР в функционально активном состоянии [22]. Поскольку лечение МС-крыс с помощью МФ восстанавливало АЦ эффекты ГПП-1, релаксина и 2-хлор-*N*⁶-циклопентиладенозина, то можно предположить, что одним из механизмов кардиопротекторного действия МФ на ССС является восстановление и модуляция сигнальных каскадов, регулируемых этими гормонами. Как мы полагаем, это предположение справедливо и для ИИ.

Таким образом, нами впервые показано, что в миокарде крыс с МС, вызванным потреблением 30-процентного раствора сахарозы и диеты, обогащенной животными жирами, нарушена регуляция АЦ агонистами β-АР, пептидными гормонами (ГПП-1, релаксин) и агонистами А₁-АденР. Пятидневное лечение с помощью МФ и ИИ в различной степени восстанавливало эти эффекты. Следовательно, восстановление гормональной чувствительности АЦ миокарда при МС является одним из молекулярных механизмов, лежащих в основе кардиопротекторного действия МФ и ИИ. Полученные данные открывают новые возможности для коррекции заболеваний ССС в условиях МС с помощью регуляторов и модуляторов гормональной чувствительности АЦСС в миокарде.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Yudkin JS. Insulin resistance and the metabolic syndrome — or the pitfalls of epidemiology. *Diabetologia*. 2007; 50: 1576-1586.
2. Kwaśniewska M, Kozińska J, Dziańkowska-Zaborszczyk E et al. The impact of long-term changes in metabolic status on cardiovascular biomarkers and microvascular endothelial function in middle-aged men: a 25-year prospective study. *Diabetol. Metab. Syndr.* 2015; 7: 81.
3. Shpakov AO, Derkach KV. The functioning of hormone-sensitive adenylyl cyclase system in the peripheral tissues in diabetes mellitus. *Tsitologija*. 2014; 56(2): 91-104. In Russian. [Шпаков А.О, Деркач К.В. Функционирование гормоночувствительной аденилатциклазной сигнальной системы в периферических тканях при сахарном диабете. *Цитология*. 2014; 56(2): 91-104].
4. Shpakov A, Chistyakova OV, Derkach KV et al. Intranasal insulin affects adenylyl cyclase system in rat tissues in neonatal diabetes. *Central Eur. J. Biol.* 2012; 7: 33-47.
5. Derkach KV, Shpakov AO, Moiseyuk IV, Chistyakova OV. The functional activity of adenylyl cyclase signaling system in the brain, myocardium, and testes of rats with 8- and 18-month neonatal diabetes. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2013; 448: 43-45. In Russian. [Деркач К.В, Шпаков А.О, Мойсеюк И.В, Чистякова О.В. Функциональная активность аденилатциклазной сигнальной системы в мозге, миокарде и семенниках крыс с 8- и 18-ти-месячным неонатальным диабетом. *Докл. РАН*. 2013; 448(5): 598-601].
6. Derkach KV, Bogush IV, Berstein LM, Shpakov AO. The influence of intranasal insulin on hypothalamic-pituitary-thyroid axis in normal and diabetic rats. *Hormone and Metabolic Research*. 2015; 47(12): 916-924.
7. Derkach KV, Bondareva VM, Chistyakova OV et al. The effect of long-term intranasal serotonin treatment on metabolic parameters and hormonal signaling in rats with high-fat diet/low-dose streptozotocin-induced type 2 diabetes. *Int. J. Endocrinol.* 2015; 245459.
8. Adigun AA, Wrench N, Levin ED et al. Neonatal parathion exposure and interactions with a high-fat diet in adulthood: Adenylyl cyclase-mediated cell signaling in heart, liver and cerebellum. *Brain Res. Bull.* 2010; 81: 605-612.
9. Cignarelli A, Giorgino F, Vettor R. Pharmacologic agents for type 2 diabetes therapy and regulation of adipogenesis. *Arch. Physiol. Biochem.* 2013; 119: 139-150.
10. Derkach KV, Kuznetsova LA, Sharova TS, Ignat'eva PA, Bondareva VM, Shpakov AO. The effect of long-term metformin treatment on the activity of adenylyl cyclase system and NO-synthases in the brain and the myocardium of rats with obesity// *Tsitologiya*. 2015; 57(5): 360-369. In Russian. [Деркач К.В, Кузнецова Л.А, Шарова Т.С. и др. Влияние длительной обработки метформином на активность аденилатциклазной системы и NO-синтаз в мозге и миокарде крыс с ожирением. *Цитология*. 2015; 57(5): 360-369].
11. Shpakov AO, Derkach KV, Berstein LM. Brain signaling systems in the type 2 diabetes and metabolic syndrome: promising target to treat and prevent these diseases. *Future Science OA (FSO)*. 2015; 1: 29.
12. Shpakov AO, Shpakova EA, Tarasenko II, et al. The peptides mimicking the third intracellular loop

of 5-hydroxytryptamine receptors of the types 1B and 6 selectively activate G proteins and receptor-specifically inhibit serotonin signaling via the adenylyl cyclase system. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 2010; 16: 95-105.

13. Ursino MG, Vasina V, Raschi E, et al. The β_3 -adrenoceptor as a therapeutic target: current perspectives. *Pharmacol. Res.* 2009; 59: 221–234.

14. Xiao RP, Avdonin P, Zhou YY et al. Coupling of β_2 -adrenoceptor to G_i proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. *Circ. Res.* 1999; 84: 43–52.

15. Matsuda N, Hattori Y, Gando S et al. Diabetes-induced down-regulation of β_1 -AR mRNA expression in rat heart. *Biochem. Pharmacol.* 1999; 58: 881–885.

16. Derkach KV, Bondareva VM, Moyseyuk IV, Shpakov AO. The influence of two-month treatment with bromocryptine on activity of the adenylyl cyclase signaling system in the myocardium and testes of rats with type 2 diabetes mellitus. *Tsitologija.* 2014; 56(2): 907-918. In Russian. [Деркач К.В., Бондарева В.М., Мойсеюк И.В., Шпаков А.О. Влияние двухмесячного лечения бромокриптином на активность аденилатциклазной сигнальной системы в миокарде и семенниках крыс с сахарным диабетом 2-го типа. *Цитология.* 2014; 56(12): 907-918].

17. Moniotte S, Kobzik L, Feron O. et al. Upregulation of β_3 -adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation.* 2001; 103: 1649-1655.

18. Xiu LL, Weng JP, Sui Y et al. Common variants in β_3 -adrenergic-receptor and uncoupling protein-2 genes are associated with type 2 diabetes and obesity. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2004; 84: 375–379.

19. Vila Petroff MG, Egan JM, Wang X, Sollott SJ. Glucagon-like peptide-1 increases cAMP but fails to augment contraction in adult rat cardiac myocytes. *Circ. Res.* 2001; 89: 445–452.

20. Shpakov A, Pertseva M, Kuznetsova L, Plesneva S. A novel, adenylate cyclase, signaling mechanism of relaxin H2 action. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005; 1041: 305–307.

21. Pepe S, Xiao RP, Hohl C, et al. 'Cross talk' between opioid peptide and adrenergic receptor signaling in isolated rat heart. *Circulation.* 1997; 95: 2122-2129.

22. Schütte F, Burgdorf C, Richardt G, Kurz T. Adenosine A1 receptor-mediated inhibition of myocardial norepinephrine release involves neither phospholipase C nor protein kinase C but does involve adenylyl cyclase. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2006; 84: 573-577.

23. Goodwill AG, Mather KJ, Conteh AM et al. Cardiovascular and hemodynamic effects of glucagon-like peptide-1. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2014; 15: 209-217.

24. Nikolaidis LA, Elahi D, Shen YT, Shannon RP. Active metabolite of GLP-1 mediates myocardial glucose uptake and improves left ventricular performance in conscious dogs with dilated cardiomyopathy. *Am. J. Physiol.* 2005; 289: 2401–2408.

25. Raleigh JM, Toldo S, Das A et al. Relaxin' the heart: A novel therapeutic modality. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 2015. pii: 1074248415617851.

Информация об авторах:

Деркач Кира Викторовна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник ФГБНУ «ИЭФБ» РАН;

Игнатъева Полина Анатольевна — врач-эндокринолог, Санкт-Петербургская клиническая больница РАН;

Шпаков Александр Олегович — доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной эндокринологии и нейрохимии ФГБНУ «ИЭФБ» РАН.

Author information:

Kira V. Derkach, PhD, Leading Researcher, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia;

Polina A. Ignatieva, Endocrinologist, Saint Petersburg Clinical hospital of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia;

Alexander O. Shpakov, Doctor of biological sciences, Head of the laboratory of molecular endocrinology and neurochemistry, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia.