

especially as well as developing cardiovascular disease and diabetes in the future, and it allows us to suspect the genetic form of hyperlipidemia. These patients, in accordance with recommendations (EOC/EO 2016), should receive lipid-lowering therapy from the moment of discovery.

References

1. Payab M. et al. Effect of the herbal medicines in obesity and metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis of clinical trials / Payab M et al. // *Phyther. Res.* Wiley Online Library, 2020. Vol. 34. № 3. P. 526–545.
2. Liorens S. Pathogenic Microenvironment from Diabetic–Obese Visceral and Subcutaneous Adipocytes Activating Differentiation of Human Healthy Preadipocytes Increases Intracellular Fat, Effect of the Apocarotenoid Crocetin // *Nutrients.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute. 2021. Vol. 13. № 3. P. 1032.
3. Romantsova T.I. The Obesity Epidemic: Obvious and Probable Causes. // *Obesity and metabolism.* 2011. Т. 8. № 1. P. 5–19 (In Russian).
4. Weltman A., Despres J.P., Clasey J.L. et al. Impact of abdominal visceral fat, growth hormone, fitness, and insulin on lipids and lipoproteins in older adults // *Metabolism.* 2003. V. 52. P. 73–80.
5. Otto T.C., Lane M.D. Adipose development: from stem cell to adipocyte // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* Taylor & Francis. 2005. Vol. 40. № 4. P. 229–242.
6. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: Report of WHO Consultation. 1999. Part 1. WHO/NCD/NCS. P. 32–52.

УДК 577.17

Бахтюков А.А., Деркач К.В., Лебедев И.А., Шпаков А.О.
*ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И.М. Сеченова» Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия
bahtyukov@gmail.com*

АНОРЕКСИГЕННЫЙ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТЫ ИНТРАНАЗАЛЬНО ВВОДИМОГО ФРАГМЕНТА ЛЕПТИНА ПРИ КУРСОВОМ ЛЕЧЕНИИ КРЫС С ДИЕТА- ИНДУЦИРОВАННЫМ ОЖИРЕНИЕМ

*Модифицированный миристамом с N-конца фрагмент лептина
116–122 при интраназальном его введении крысам с диета-
индуцированным ожирением в суточной дозе 100 мкг/крысу ослабляет*

гиперфагию, снижает массу тела и жировой ткани, частично восстанавливает повышенные при ожирении уровни глюкозы, инсулина, лептина, улучшает чувствительность к инсулину.

Ключевые слова: лептин, пептидный фрагмент, интраназальное введение, ожирение, гиперлептинемия, гипергликемия.

Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Lebedev I.A., Shpakov A.O.
*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,
Russian Academy of Sciences,
St. Petersburg, Russia*

ANOREXIGENIC AND METABOLIC EFFECTS OF INTRANASALLY INTRODUCED LEPTIN FRAGMENT DURING COURSE TREATMENT OF RATS WITH DIET-INDUCED OBESITY

Anorexigenic and metabolic effects of intranasally administered leptin fragment in treatment of rats with diet-induced obesity.

The leptin fragment 116–122 modified with myristate from the N-terminus, when intranasally administered to rats with diet-induced obesity at a daily dose of 100 µg/rat, weakens hyperphagia, reduces the body and fat weight, partially restores the glucose, insulin and leptin levels, which are increased in obesity, and improves the insulin sensitivity.

Keywords: *leptin, peptide fragment, intranasal administration, obesity, hyperleptinemia, hyperglycemia.*

Введение. Адипокин лептин, продуцируемый адипоцитами белой жировой ткани, является важнейшим регулятором пищевого поведения, массы тела, метаболических и гормональных показателей [1]. Большинство своих эффектов он осуществляет через активацию лептиновых рецепторов в гипоталамических нейронах. В условиях ожирения и ассоциированных с ним метаболических заболеваний уровень лептина в крови повышается, что характеризуется как гиперлептинемия, и это приводит к лептиновой резистентности [1]. Однако такая ситуация характерна в основном для периферических тканей, поскольку в ЦНС и, в первую очередь, в гипоталамусе отмечается недостаточность лептина. Этот парадоксальный факт объясняется нарушением транспорта лептина через гематоэнцефалический барьер. Транспорт лептина в мозг осуществляется с помощью рецептор-опосредуемого механизма, который в условиях лептиновой резистентности ослабевает [2]. В результате уровень лептина в мозге при метаболических расстройствах снижается, как показано ранее нами [3], вследствие чего

необходимы подходы, направленные на повышение уровня лептина в мозге. Наиболее подходящим для этого является интраназальный способ введения лептина [4, 5], но его недостатками являются высокая стоимость и низкая стабильность препаратов лептина, а также быстрое развитие центральной лептиновой резистентности при накоплении лептина в ЦНС. Альтернативой может стать применение укороченных пептидных аналогов лептина, которые включают его функционально активные последовательности, взаимодействующие с лептиновым рецептором и запускающие целевые сигнальные каскады. Среди них фрагмент лептина 116–122 [6, 7]. Поскольку значительный пул лептиновых рецепторов локализован внутри клеток, то для придания пептиду способности проникать через мембрану N-конец пептида модифицируется миристатином. Цель работы состояла в изучении влияния интраназально вводимого миристоилированного пептида 116–122 крысам с диета-индуцированным ожирением (ДИО) на их пищевое поведение, массу тела и жировой ткани, показатели липидограммы, уровни глюкозы, инсулина и лептина, толерантность к глюкозе.

Материал и методы. Пептид 116–122 синтезировали с помощью ВОС/Vzl-стратегии и *Na-трет*-бутилоксикарбонильных производных аминокислот. Для миристоилирования N-концевого остатка серина пептид обрабатывали активированным эфиром миристиновой кислоты. Структуру подтверждали с помощью масс-спектрометрии, которая показала значение массы для целевого соединения 943.5412 (масса ионов $M+Na^+=966.5273$ и $M+K^+=982.5024$).

Для биологических экспериментов использовали крыс Wistar. Их содержали в стандартных условиях вивария, все процедуры по уходу за животными и по их использованию для моделирования ожирения и оценки эффектов фрагмента лептина осуществляли в соответствии с требованиями Этического комитета ИЭФБ РАН, European Communities Council Directive 1986 (86/609/EEC) и «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals».

ДИО индуцировали, переводя крыс в двухмесячном возрасте на высокожировую диету, состав которой приведен нами ранее [8]. Контрольные животные потребляли стандартный сухой корм. Через 16 недель содержания на высокожировой диете отбирали крыс с повышенной массой тела (на 10% выше контроля), гипергликемией (через 2 ч после приема пищи на 30% выше контроля) и нарушенной глюкозотолерантностью, которую оценивали в интраперитонеальном глюкозотолерантном тесте (ИГТТ). Для этого крысам вводили раствор глюкозы (2 г/кг) и измеряли ее уровень в крови до и через 15, 30, 60 и 120 мин после инъекции. Кровь забирали из хвостовой вены под местной

анестезией (лидокаин, 3 мг/кг). Уровень глюкозы измеряли с помощью тест-полосок «One Touch Ultra» (США) и глюкометра «Life Scan Johnson & Johnson» (Дания). Формировали 3 группы (по 6 животных) — контроль (К), ожирение (ОЖ) и ожирение с обработкой в течение 9 дней фрагментом лептина (интраназально, в суточной дозе 100 мкг/крысу) (ОЖ+П). Группы К и ОЖ вместо пептида получали физиологический раствор. В течение эксперимента крыс переводили на стандартный корм. В конце эксперимента проводили ИГГТ и оценивали концентрацию глюкозы, лептина и инсулина в крови до и через 120 мин после глюкозной нагрузки. Концентрацию гормонов измеряли с помощью наборов «Rat Insulin ELISA» («Mercodia AB», Швеция) и «ELISA for Leptin, Rat» («Cloud-Clone Corp.», США). Затем животных наркотизировали (хлоральгидрат, 400 мг/кг, в/б), декапитировали, измеряли массу жира, оценивали уровни триглицеридов и общего холестерина с помощью тест-полосок «Triglycerides multiCare-in» и «Cholesterol multiCare-in» («Biochemical Systems Int.», Италия).

Статистический анализ осуществляли, используя программу «Microsoft Office Excel 2007» (США). Результаты представляли, как $M \pm SEM$. Нормальность распределения оценивали, используя критерий Шапиро-Уилка. Значимыми считали различия при $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение. Крысы с ожирением имели повышенные массу тела и жировой ткани и долю жировой ткани, гипергликемию, нарушенную толерантность к глюкозе, оцениваемую по более высокому ходу глюкозной кривой в ИГГТ, повышенные уровни триглицеридов, общего холестерина, инсулина и лептина (как натощак, так и через 120 мин после глюкозной нагрузки), а также повышенный индекс инсулинорезистентности (ИР) (см. табл. 1, рис. 1). В группе ОЖ отмечали повышенное потребление пищи, оцениваемое по калорийности (см. табл. 1). Эти данные указывают на типичные признаки метаболического синдрома с характерными для него гипергликемией, нарушенной толерантностью к глюкозе, гиперинсулинемией, гиперлептинемией и дислипидемией.

Десятидневная обработка животных с ожирением с помощью фрагмента лептина значимо снижала массу тела и жировой ткани, а также соотношение массы жира к общей массе тела, и это было ассоциировано с ослаблением аппетита (см. табл. 1). Уровень глюкозы натощак оставался выше, чем в контроле и не отличался от группы ОЖ, в то время как уровень глюкозы через 120 мин после глюкозной нагрузки был ниже, чем в группе ОЖ, что в совокупности с данными об улучшении толерантности к глюкозе (более низкий ход глюкозной кривой в ИГГТ) указывает на умеренно выраженное улучшение глюкозного гомеостаза (см. табл. 1, рис. 1).

В группе ОЖ+П в сравнении с группой ОЖ снижались базовые и стимулированные глюкозой уровни инсулина и лептина и индекс ИР, что свидетельствует об улучшении системной чувствительности тканей к инсулину и лептину (см. табл. 1). В меньшей степени пептидный фрагмент влиял на показатели липидного обмена — отмечалась тенденция к снижению уровней триглицеридов и общего холестерина в крови, но различия с группой ОЖ не были значимыми (см. табл. 1).

Таким образом, миристоилированный фрагмент лептина 116–122 ослабляет гиперфагию у крыс с ожирением, что приводит к снижению массы тела и жировой ткани и, как следствие, улучшает чувствительность к лептину и инсулину и частично восстанавливает глюкозный и липидный метаболизм. В этом отношении фрагмент лептина ведет себя подобно полноразмерному гормону, введение которого в ЦНС, интраназально или интрацеребрально, приводит к улучшению метаболических показателей у животных с ожирением [4, 5, 9, 10]. Полученные данные указывают на то, что функционально активные фрагменты лептина могут быть использованы для разработки фармакологических препаратов, направленных на улучшение метаболических и гормональных показателей при ожирении и ассоциированных с ним метаболических расстройств, которые характеризуются ослаблением центральной лептиновой сигнализации.

Работа поддержана Российским научным фондом (№ 22-75-00130).

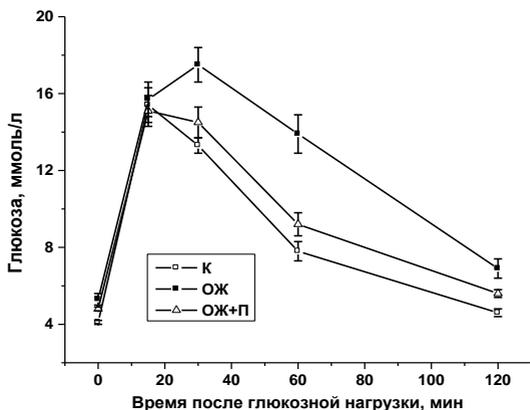


Рис. 1. Глюкозные концентрационные кривые в ИГТТ у крыс с ожирением и после их обработки фрагментом лептина 116–122

Таблица 1. Масса тела и жира, доля жировой ткани, уровни глюкозы, инсулина и индекс ИР до и через 120 мин после глюкозной нагрузки у ДИО-крыс и влияние на них обработки фрагментом лептина 116–122

Показатель	К	ОЖ	ОЖ+П
Масса тела, г	363,0±6,4	413,3±6,9 ^a	381,7±7,1 ^b
Масса АЖ, г	4,8±0,1	11,5±0,8 ^a	7,9±0,8 ^{a,b}
Масса ЭЖ, г	3,6±0,2	6,6±0,5 ^a	5,1±0,4 ^{a,b}
Доля жира, %	2,3±0,1	4,4±0,2 ^a	3,4±0,3 ^{a,b}
Потребление корма, ккал/крысу/день	19,8±0,4	24,6±0,7 ^a	20,9±1,1 ^b
Глюкоза-0, мМ	4,1±0,1	5,3±0,3 ^a	4,8±0,2 ^a
Глюкоза-120, мМ	4,6±0,2 ^c	6,9±0,5 ^{a,c}	5,6±0,2 ^{a,b,c}
Инсулин-0, нг/мл	0,67±0,08	1,36±0,09 ^a	0,76±0,08 ^b
Инсулин-120, нг/мл	0,83±0,11	1,93±0,20 ^{a,c}	1,01±0,15 ^b
Индекс ИР-0, отн.ед.	2,70±0,30	7,23±0,80 ^a	3,61±0,41 ^b
Индекс ИР-120, отн.ед.	3,71±0,38	13,53±1,95 ^{a,c}	5,57±0,77 ^b
Лептин-0, нг/мл	1,05±0,17	3,16±0,23 ^a	2,06±0,20 ^{a,b}
Лептин-120, нг/мл	1,38±0,21	6,06±0,73 ^{a,c}	2,93±0,32 ^{a,b,c}
Триглицериды, мМ	2,03±0,10	3,25±0,20 ^a	2,68±0,25 ^a
ОХ, мМ	3,92±0,15	5,03±0,27 ^a	4,43±0,28

Примечание. АЖ — абдоминальный жир, ЭЖ — эпидидимальный жир, ОХ — общий холестерин. Значения представлены, как $M \pm SEM$. Различия с группой К (^a) и между группами ОЖ и ОЖ+П (^b) статистически значимы при $p < 0,05$. Различия между показателем до и через 120 мин после глюкозной нагрузки (^c) статистически значимы при $p < 0,05$.

Данные представлены как $M \pm SEM$, $n=6$ в каждой экспериментальной группе.

Список литературы

1. Misch M., Puthanveetil P. The Head-to-Toe Hormone: Leptin as an Extensive Modulator of Physiologic Systems // International Journal of Molecular Sciences. 2022. Vol. 23. № 10. P. 5439.

2. Banks W.A., DiPalma C.R., Farrell C.L. Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity☆ // *Peptides* (N.Y.). 1999. Vol. 20. № 11. P. 1341–1345.
3. Derkach K., Zakharova I., Zorina I., Bakhtyukov A., Romanova I., Bayunova L., Shpakov A. The evidence of metabolic-improving effect of metformin in Ay/a mice with genetically-induced melanocortin obesity and the contribution of hypothalamic mechanisms to this effect // *PLoS One*. 2019. Vol. 14. № 3. P. 213–779.
4. Schulz C., Paulus K., Jöhren O., Lehnert H. Intranasal Leptin Reduces Appetite and Induces Weight Loss in Rats with Diet-Induced Obesity (DIO) // *Endocrinology*. 2012. Vol. 153. № 1. P. 143–153.
5. Berger S., Pho H., Fleury-Curado T., Bevans-Fonti S., Younas H., Shin M.K., Jun J.C., Anokye-Danso F., Ahima R.S., Enquist L.W., Mendelowitz D., Schwartz A.R., Polotsky V.Y. Intranasal Leptin Relieves Sleep-disordered Breathing in Mice with Diet-induced Obesity // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2019. Vol. 199. № 6. P. 773–783.
6. Novakovic Z.M., Anderson B.M., Grasso P. Myristic acid conjugation of [D-Leu-4]-OB3, a biologically active leptin-related synthetic peptide amide, significantly improves its pharmacokinetic profile and efficacy // *Peptides* (N.Y.). 2014. Vol. 62. P. 176–182.
7. Wang A., Anderson B.M., Novakovic Z.M., Grasso P. [D-Leu-4]-OB3 and MA-[D-Leu-4]-OB3, small molecule synthetic peptide leptin mimetics, improve glycemic control in diet-induced obese (DIO) mice // *Peptides* (N.Y.). 2018. Vol. 101. P. 51–59.
8. Derkach K.V., Bondareva V.M., Chistyakova O.V., Berstein L.M., Shpakov A.O. 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 // *International Journal Endocrinology*. 2015. Vol. 2015. P. 1–17.
9. Bermúdez-Humarán L.G., Nouaille S., Zilberfarb V., Corthier G., Gruss A., Langella P., Issad T. Effects of Intranasal Administration of a Leptin-Secreting *Lactococcus lactis* Recombinant on Food Intake, Body Weight, and Immune Response of Mice // *Appl Environ Microbiology*. 2007. Vol. 73. № 16. P. 5300–5307.
10. Minciu Macrea M., Misra H., Zagrean L. The neuroprotective effect of intranasally applied leptin against hypoxic neuronal injury // *Medical Hypotheses*. 2010. Vol. 74. № 6. P. 1036–1037.