

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ НА ЛИПИДНЫЙ ПРОФИЛЬ, УРОВЕНЬ ГЛЮКОЗЫ КРОВИ И МАССУ ТЕЛА КРЫС ПРИ РАЗВИТИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА

Оберган Т.Ю.¹, Шубина Т.А.¹, Григорьева М.Е.¹, Ляпина Л.А.¹, Мясоедов Н.Ф.², Андреева Л.А.²

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, e-mail: shubina.74@mail.ru;

²Институт молекулярной генетики РАН, Москва, e-mail: nfm@img.ras.ru

В настоящем исследовании было установлено, что интраназальное многократное (7 раз) введение в малых дозах (50 мкг/кг) исследуемых пептидов Pro-Leu-Pro, Pro-Leu-Pro-Ala, Pro-Gly-Pro-Ala и Phe-Pro-Leu-Pro-Ala животным с метаболическим синдромом приводило к нормализации жирового и углеводного обменов. Эти различные по структуре регуляторные пептиды при данной патологии замедляли рост массы тела, максимальный эффект был отмечен при введении пептида Phe-Pro-Leu-Pro-Ala. Они снижали уровень глюкозы крови, уровень общего холестерина, холестерина липопротеидов низкой плотности и триглицеридов. Следует отметить, что пептиды Pro-Leu-Pro-Ala и Phe-Pro-Leu-Pro-Ala оказывали достоверные эффекты не только через 20 ч после последнего введения животным, но и спустя 7 сут. после отмены их применения животным, которые продолжали находиться на высококалорийной диете.

Ключевые слова: метаболический синдром, липиды, глюкоза, регуляторные пептиды.

STUDY OF THE EFFECT OF REGULATORY PEPTIDES ON LIPID PROFILE, BLOOD GLUCOSE LEVEL AND BODY WEIGHT OF RATS DURING THE DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL METABOLIC SYNDROME

Obergan T.Yu.¹, Shubina T.A.¹, Grigoreva M.E.¹, Lyapina L.A.¹, Myasoedov N.F.², Andreeva L.A.²

¹Moscow State University, Moscow, e-mail: shubina.74@mail.ru;

²Institute of Molecular Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, e-mail: nfm@img.ras.ru

In the present study it was found that intranasal repeated (7 times) introduction to low doses (50 µg/kg) of the test peptides Pro-Leu-Pro, Pro-Leu-Pro-Ala, Pro-Gly-Pro-Ala and Phe-Pro-Leu-Pro-Ala in animals with metabolic syndrome led to normalization of lipid and carbohydrate metabolism. These various regulatory peptides in this disease slowed the growth of body weight, the maximum effect was observed with the introduction of the peptide Phe-Pro-Leu-Pro-Ala. They reduced blood glucose, total cholesterol, low-density lipoproteins, triglycerides. It should be noted that the peptides Pro-Leu-Pro-Ala and Phe-Pro-Leu-Pro-Ala exerted significant effects not only 20 h after the last administration, the animals, but after 7 days of cancellation of their application to animals that continued to be on a high calorie diet.

Keywords: metabolic syndrome, lipids, glucose, regulatory peptides.

Метаболический синдром (МС) представляет собой совокупность гормональных и метаболических нарушений, клинически проявляющихся в развитии ожирения, сахарного диабета и сердечно-сосудистых заболеваний. МС характеризуется инсулинорезистентностью, гиперинсулинемией, артериальной гипертензией и увеличением массы висцерального жира, что вызывает нарушения углеводного, липидного и пуринового обменов [7]. Эффективность фармакотерапии МС оценивается с позиции предотвращения развития заболеваний, связанных с атеросклерозом, атеротромбозом и их осложнений [3]. На сегодняшний день существует ряд лекарственных препаратов, воздействующих практически на все стадии метаболизма липидов, однако в современной литературе развернулась

дискуссия о возможных нежелательных последствиях вмешательства в липидный метаболизм [5]. Для лечения МС необходим многофакторный подход, поэтому поиск гиполипидемических средств, восстанавливающих как нормальную работу поджелудочной железы, так функцию гемостатической системы организма, крайне актуален.

В организме человека при протеолизе и синтезе коллагена постоянно образуются короткие регуляторные пептиды глипролинового ряда, включающие в себя последовательности Pro-Gly, Pro-Gly-Pro, Gly-Pro, содержащие такие аминокислоты как глицин и пролин [1,6], которые обеспечивают сохранение нормального жирового обмена [2]. Ранее нами было показано, что регуляторные пептиды глипролинового ряда способствуют сохранению нормальной функции противосвертывающей системы и работы поджелудочной железы при стойкой гипергликемии и развитии экспериментального сахарного диабета 1-го типа у крыс [5, 8].

Цель настоящей работы заключалась в выявлении корригирующего действия регуляторных пептидов Pro-Leu-Pro, Pro-Leu-Pro-Ala, Pro-Gly-Pro-Ala и Phe-Pro-Leu-Pro-Ala на уровень общего холестерина, липидный профиль, нормализацию индекса массы тела и уровень глюкозы крови в условиях *in vivo* на модели крыс с экспериментальным метаболическим синдромом.

Материал и методы исследования

В работе применялись пептиды Pro-Leu-Pro, Pro-Leu-Pro-Ala, Pro-Gly-Pro-Ala и Phe-Pro-Leu-Pro-Ala, синтезированные в Институте молекулярной генетики РАН (Москва). Эксперимент был проведен на 60 беспородных белых крысах-самцах в возрасте к началу опыта (к началу кормления высококалорийным рационом) 2 мес с массой тела 200 ± 10 г. Работа с животными была проведена в соответствии с этическими принципами, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.).

Индукция метаболических нарушений вызывали высококалорийным рационом (ВКР), с избыточным содержанием углеводов и насыщенных жиров, выбранным на основании предыдущих исследований [4]. Энергетическая ценность ВКР составляла 130 % от стандартного рациона. Содержание крыс в течение 6 недель на ВКР приводило к развитию нарушений липидного обмена, ожирению и увеличению глюкозы в крови, что соответствовало показателям в группе животных, в дальнейшем обозначаемой как Контроль.

Через 6 недель от начала содержания крыс на высококалорийной диете животные были разделены на 5 групп. Первой группе интраназально вводили пептид Pro-Leu-Pro (Опыт 1), 2-ой – Pro-Leu-Pro-Ala (Опыт 2), 3-ей – Pro-Gly-Pro-Ala (Опыт 3), 4-ой – Phe-Pro-

Leu-Pro-Ala (Опыт 4) в дозе 50 мкг/кг 1 раз в сутки в течение 7 суток. Контрольные животные получали в те же сроки и подобным образом вместо пептида 0,85 %-ый NaCl (группа Контроль). В эксперименте использовали нормальных здоровых (интактных) крыс, которые содержались на обычном лабораторном рационе, имея свободный доступ к воде и не получая никаких препаратов (группа Норма).

Через 20 ч после последнего 7-го введения пептидов опытным животным или физиологического раствора контрольным крысам у них отбирали кровь для исследований, после чего отменяли введение препаратов. Повторное взятие крови осуществляли через 7 дней после отмены введения исследуемых пептидов или NaCl при продолжающемся содержании животных на высококалорийном рационе с глюкозой.

Взятие крови у крыс осуществляли натошак из яремной вены (*v. jugularis*) с использованием в качестве консерванта 3.8 %-ного раствора цитрата натрия в соотношении кровь: консервант как 9 : 1. Образцы крови центрифугировали при 3000 g в течение 10 мин для получения бедной тромбоцитами плазмы.

Показатели жирового обмена в плазме крови исследовали энзиматическим колориметрическим методом с использованием набора реагентов фирмы Ольвекс-Диагностикум (Россия). При этом определяли концентрацию общего холестерина (ОХ), концентрацию холестерина липопротеидов низкой плотности (Хс-ЛПНП), концентрацию триглицеридов (ТГ).

Концентрацию глюкозы в крови определяли на биохимическом анализаторе One Touch HORIZON (США), используя специальные тест-полоски для данного прибора.

Все данные были обработаны статистически по непараметрическому критерию Вилкоксона (программа STATISTICA 6.0).

Результаты исследования и их обсуждение

Взвешивание животных проводили до начала эксперимента, т.е. до начала содержания крыс на жировом рационе, затем через 6 недель после нахождения на жировой диете (перед 1-ым введением пептида или физиологического раствора), через 20 ч после последнего (7-го) введения пептида и спустя 7 суток после отмены его применения.

Можно видеть, что интраназальное введение четырех исследуемых пептидов на фоне высококалорийной жировой диеты приводило к замедлению роста массы тела во всех опытных группах. После 7-кратного применения пептидов все опытные крысы поправились в среднем на 10.0 (2 и 4 группы) – 14.2 (3 группа) г, тогда как контрольные животные за этот же период времени поправились на 21.7 г (табл.1).

Таблица 1

Изменение массы тела у крыс в разные сроки эксперимента до и после интраназального введения пептидов Pro-Leu-Pro, Pro-Leu-Pro-Ala, Pro-Gly-Pro-Ala, Phe-Pro-Leu-Pro-Ala на фоне жировой диеты ($M \pm m$, $n=10$ в каждой группе)

Группы животных	Масса тела (начало диеты), г	Начало введения препаратов		Через 20 ч после 7-ми кратного введения препаратов		Через 1 нед после отмены препаратов		
		Привес за 6 нед.	Масса тела, г	Привес	Масса тела, г	Привес за 1 нед	Масса тела, г	Σ привес, г
Конт-роль	208.0 ± 4.1	+131.0 ± 14.9 (127%)	345.0 ± 9.4	+21.7 \pm 2.5 (100%)	367.0 ± 8.9	+12.5 \pm 0.9 (100%)	379.0 ± 11.2	+34.1 \pm 2.1 (100%)
Опыт 1	200.0 ± 5.1	+137.0 ± 6.7 (133%)	338.0 ± 8.3	+12.2 \pm 2.7* (56%)	351.0 ± 14.5	+10.2 \pm 3.1 (82%)	362.0 ± 15.1	+23.1 \pm 2.8** (68%)
Опыт 2	210.0 ± 4.1	+129.0 ± 7.6 (125%)	339.0 ± 9.7	+10.5 \pm 2.7* (48%)	350.0 ± 8.4	+5.4 \pm 1.4** (43%)	357.0 ± 9.7	+17.1 \pm 2.1** (50%)
Опыт 3	205.0 ± 6.4	+135.0 ± 5.7 (131%)	340.0 ± 11.3	+14.2 \pm 1.6* (65%)	353.0 ± 11.2	+8.3 \pm 2.5* (67%)	361.0 ± 12.2	+22.5 \pm 3.2* (65%)
Опыт 4	209.0 ± 7.1	+133.0 ± 6.5 (129%)	341.0 ± 6.5	+10.0 \pm 1.6** (46%)	350.0 ± 9.9	+4.1 \pm 2.4** (33%)	355.0 ± 7.8	+14.2 \pm 2.4** (41%)
Норма	202.0 ± 7.2	+103.0 ± 5.4 (100%)	305.0 ± 10.2	+17.5 \pm 2.2* (80%)	322.0 ± 9.5	+10.5 \pm 1.8* (84%)	333.0 ± 5.9	+25.5 \pm 2.1* (75%)

Примечание: статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля, принятого за 100 %, ** – $p < 0.01$, * – $p < 0.05$ (для табл. 1, 2).

Через 1 неделю после отмены применения пептидов у крыс опытных групп замедление роста массы тела продолжалось – все животные поправились всего на 4.1 (4 группа) – 10.2 (1 группа) г по сравнению с исходным весом. Итак, за все время проведения эксперимента животные опытных групп поправились на 14.2 (4 группа), 17.1 (2 группа), 22.5 (3 группа), 23.1 (1 группа) г, а крысы контрольной группы поправились на 34.1 г.

Суммарный привес (изменение массы тела за весь период проведения эксперимента) у животных опытных групп был на 32–59 % меньше, чем у контрольной группы, принятой за 100 %. Следовательно, пептиды Pro-Leu-Pro, Pro-Leu-Pro-Ala, Pro-Gly-Pro-Ala и Phe-Pro-Leu-Pro-Ala, применяемые интраназально в ежедневной дозе 50 мкг/кг массы тела на фоне развития метаболического синдрома при одновременном поступлении в организм жирной

пищи и глюкозы, замедляли рост массы тела крыс, причем максимальным действием обладал пептид Phe-Pro-Leu-Pro-Ala.

Исследование крови, взятой через 20 ч после последнего 7-го введения пептидов опытным животным, показало, что в контрольной и опытных 1 и 2 группах крыс с метаболическими нарушениями регистрируется повышенный уровень глюкозы по сравнению с нормой. В группе 3 уровень глюкозы был достоверно ниже контроля и соответствовал нормальным значениям (табл. 2).

Таблица 2

Изменение уровня глюкозы в крови и показателей липидного профиля плазмы в разные сроки эксперимента до и после интраназального введения пептидов Pro-Leu-Pro, Pro-Leu-Pro-Ala, Pro-Gly-Pro-Ala, Phe-Pro-Leu-Pro-Ala модели метаболического синдрома у крыс

($M \pm m, n=10$ в каждой группе)

Группы животных	уровень глюкозы крови, ммоль/л	ОХ, ммоль/л	Хс-ЛПНП, ммоль/л	ТГ, ммоль.л
Через 20 ч после 7-го введения пептидов или NaCl				
Контроль NaCl	4.6±0.3 [#]	1.996 ± 0.091 (100%)	0.853 ± 0.075 (100%)	2.029 ± 0.178 (100%)
Опыт 1 Pro-Leu-Pro	6.1±0.5 [#]	1.794±0.032 (90%)	0.708±0.042 (83%)	1.298±0.079** (64%)
Опыт 2 Pro-Leu-Pro-Ala	4.9±0.2 [#]	1.536±0.091* (77%)	0.597±0.058** (70%)	1.157±0.046** (57%)
Опыт 3 Pro-Gly-Pro-Ala	3.7±0.3*	1.570±0.110* (78%)	0.580±0.041** (70%)	1.371±0.151** (68%)
Опыт 4 Phe-Pro-Leu-Pro-Ala	4.3±0.5	1.600±0.068* (80%)	0.530±0.046** (63%)	1.075±0.102** (53%)
Норма	3.3±0.2	1.507±0.043** (73%)	0.425±0.042** (47%)	0.659±0.023** (35%)
Через 7 суток после отмены введения пептидов или NaCl				
Контроль NaCl	6.0±0.5 [#]	1.712±0.032 (100%)	0.912±0.065 (100%)	2.777±0.122 (100%)
Опыт 1 Pro-Leu-Pro	5.6±0.7	1.301±0.045* (76%)	0.612±0.011** (67%)	1.860±0.052** (67%)
Опыт 2 Pro-Leu-Pro-Ala	5.0±0.7*	1.489±0.064* (87%)	0.722±0.064* (79%)	2.138±0.078** (77%)
Опыт 3 Pro-Glg-Pro-Ala	7.2±1.1 [#]	1.455±0.011* (85%)	0.784±0.062* (86%)	2.062±0.234* (74%)
Опыт 4 Phe-Pro-Leu-Pro-Ala	5.0±0.1*	1.369±0.061* (80%)	0.556±0.077** (61%)	1.112±0.121** (40%)
Норма	4.1±0.3	1.284±0.022** (75%)	0.356±0.036** (39%)	0.861±0.637** (31%)

Примечание: [#] – p<0,05 по сравнению с нормой.

Через 7 суток после отмены введения пептидов в крови опытных животных 1, 2 и 4 групп наблюдалось достоверное снижение уровня глюкозы на 0.4-1.0 ммоль/л по сравнению с контролем, где содержание крыс на жировой диете и сладкой воде спровоцировало дальнейшие нарушения обменных процессов и рост уровня глюкозы крови. В этот же период времени в опытной группе 3 после отмены применения пептида Pro-Gly-Pro-Ala при содержании крыс на высококалорийном рационе наблюдалось увеличение уровня сахара крови по сравнению с контрольными значениями (табл. 2). На основании полученных данных видно, что гипогликемический эффект после отмены введения пептидов, включающих лейцин и аланин, Pro-Leu-Pro-Ala и Phe-Pro-Leu-Pro-Ala сохранялся в течение недели, а при применении лейцинсодержащего пептида Pro-Leu-Pro этот эффект проявляется впервые лишь спустя неделю после отмены его введения.

На основании проведенного исследования установлено, что пептиды Pro-Leu-Pro-Ala, и Phe-Pro-Leu-Pro-Ala при 7-кратном применении 1 раз в сут в дозе 50 мкг/кг на фоне развития метаболического синдрома оказывали защитное гипогликемическое действие, способствуя поддержанию удовлетворительного уровня глюкозы в крови опытных животных. Спустя неделю после отмены применения препаратов пептиды, включающие лейцин и аланин, сохраняли сниженный уровень глюкозы крови. Это, возможно, обусловлено эффектами, как самих пептидов, так и их составных частей, а именно пептида пролин-лейцин-пролина и аминокислот – лейцина, аланина, которые согласно данным литературы снижают уровень сахара крови до нормальных величин.

После 7-кратного интраназального введения пептидов в опытных группах крыс 2, 3 и 4 происходило достоверное снижение концентрации ОХ с 1.996 ммоль/л (контроль) до 1.536 – 1.600 ммоль/л (на 20–23 %). При этом во всех опытных группах крыс отмечено значительное уменьшение концентрации Хс-ЛПНП с 0.853 ммоль/л (контроль) до 0.530 ммоль/л (на 27–37 % по сравнению с контролем), а также снижение концентрации ТГ – с 2.029 ммоль/л до 1.075 ммоль/л (на 32–47 % по сравнению с контролем).

Таким образом, через 20 ч после введения пептидов животным параметры жирового обмена (ОХ, Хс-ЛПНП, ТГ) у крыс опытных групп приближались к значениям, соответствующим показателям липидного профиля здоровых животных (табл. 2).

Через 7 суток после отмены введения пептидов в плазме крови всех опытных животных концентрация ОХ составила 76–87 % по сравнению с контролем (100 %), что было статистически значимо и близко к нормальным значениям. При этом в плазме крови опытных животных обнаружено достоверное уменьшение концентрации ХС ЛПНП на 14–39 % и концентрации ТГ на 23–60 % по сравнению с контролем, что в опытной группе 4 практически соответствовало показателям у здоровых животных (табл. 2).

Итак, представленные данные указывают на способность пептидов Pro-Leu-Pro, Pro-Leu-Pro-Ala, Pro-Gly-Pro-Ala и Phe-Pro-Leu-Pro-Ala нормализовать параметры жирового обмена в условиях метаболического синдрома, что в конечном итоге должно приводить к уменьшению в крови общего холестерина, атерогенных липопротеинов низкой и очень низкой плотности, а также триглицеридов. Максимальным гиполипидемическим действием обладал пентапептид Phe-Pro-Leu-Pro-Ala. Способность блокировать накопления новых жировых отложений в организме животного, проявляемая в той или иной степени каждым из исследуемых пептидов, была впервые обнаружена нами.

Заключение

На основании проведенного исследования впервые было установлено, что в организме крыс, постоянно употребляющих жирную пищу с избытком насыщенных жирных кислот и глюкозы, интраназальное многократное (7 раз) введение в малых дозах (50 мкг/кг) каждого из исследуемых пептидов восстанавливало нарушенный при развитии метаболического синдрома жировой обмен и приводило к нормализации концентрации глюкозы в крови. Все четыре исследованные пептида при развитии данной патологии замедляли рост массы тела, а максимальный эффект был отмечен при введении пептида Phe-Pro-Leu-Pro-Ala. Следует отметить, что регуляторные пептиды Pro-Leu-Pro-Ala и Phe-Pro-Leu-Pro-Ala оказывали более выраженные эффекты не только через 20 ч после последнего введения животным, но и спустя 7 дней после отмены их введения крысам, которые продолжали находиться на высококалорийной диете, способствующей ожирению и связанному с ним нарушению углеводного и жирового обмена.

Список литературы

1. Ашмарин И.П. Структурно-функциональная классификация регуляторных пептидов, что включать в нее для минимальной ориентации широкого круга нейрохимиков и нейрофизиологов, аспирантов и студентов старших курсов? / И.П. Ашмарин // Нейрохимия. – 2007. – Т. 24, № 2. – С.180-185.
2. Кроненберг Г.М. Ожирение и нарушения липидного обмена / Г.М. Кроненберг, К. Шоломо, К.С. Полонски, П.Р. Ларсен; пер. с англ. под ред. И.И. Дедова, Г.А. Мельниченко. – М.: ООО «Рид Элсивер», 2010. – 264 с.
3. Маколкин В.И. Метаболический синдром / В.И. Маколкин – М.: Мед. информ. агентство, 2010. – 144 с.

4. Оберган Т.Ю. Исследование параметров гемостаза, липидного и углеводного обмена у крыс с модифицированной моделью экспериментального метаболического синдрома / Т.Ю. Оберган, М.Е. Григорьева // Совр. техн. в мед. – 2016. – Т. 8, № 4. – С. 303-305.
5. Kong X. Losartan and pioglitazone ameliorate nephropathy in experimental metabolic syndrome rats /X. Kong, D.Y. Zhang, H.B. Wu, F.X. Li // Biol. Pharm. Bull. – 2011. – V. 34, № 5. – P. 693-699.
6. Kostapanos M.S. Overview of the extra-lipid effects of rosuvastatin / M.S. Kostapanos, H.J. Milionis, M.S. Elisaf // J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther. – 2008. – V.13. – P. 157-174.
7. Mamedov M.N. Metabolicsyndrome in Russia: prevalence, clinical peculiarities and treatment. – М.: MIG med. kniga, 2011. – P.140.
8. Obergan T. Yu. Participation of the peptide PRO-GLY-PRO-LEU in restoration of functions anticoagulant and insular organism systems at development by a proof hyperglycemia at rats / T. Yu. Obergan, T.A. Shubina, M.E. Grigoreva, L.A. Lyapina, N.F. Myasoedov, L.A. Andreeva // Vopr. Biol., Med. Farmatsevt. Khim. – 2013. – V.4. – P. 38-42.