

УДК 577.125

ИЗУЧЕНИЕ ПРЯМОГО ДЕЙСТВИЯ РИМОНАБАНТА, АНТАГОНИСТА РЕЦЕПТОРА СВ1, НА ПРОЦЕССЫ ОКИСЛЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ И ГЛИКОГЕНОЛИЗ В КЛЕТКАХ ПЕЧЕНИ И МЫШЦ *in vitro**

© 2019 G.A. Müller^{1,2**}, S. Wied³, A.W. Herling³

¹ Helmholtz Diabetes Center (HDC) at the Helmholtz Center for Health and Environment Munich, Institute for Diabetes and Obesity (IDO), 85764 Oberschleissheim, Germany;
E-mail: guenter.mueller@helmholtz-muenchen.de

² Ludwig-Maximilians-University Munich, Department Biology I, Genetics, 82152 Planegg-Martinsried, Germany

³ Sanofi Pharma Germany GmbH, Diabetes Research, 65926 Frankfurt am Main, Germany

Поступила в редакцию 04.02.2019

После доработки 24.06.2019

Принята к публикации 25.06.2019

Результаты последних исследований фармакологического действия аноректика римонабанта, являющегося антагонистом каннабиноидного рецептора типа 1 (CB1R), позволили говорить об отсутствии убедительных доказательств того факта, что все без исключения аспекты его воздействия на метаболизм и энергетический баланс у откормленных крыс линии Wistar опосредуются влиянием центральной нервной системы на снижение потребляемых животными лишних калорий. Вместо этого, римонабант мог критически влиять на метаболизм путем индукции гликогенолиза в печени, и это влияние сопровождалось кратковременным повышением окисления глюкозы и устойчивым повышением окисления жирных кислот. Возможно, римонабант оказывал прямое стимулирующее воздействие на эти процессы в соответствующих первичных и культивируемых клетках крыс в краткосрочной и долгосрочной перспективе. Было установлено, что при длительном инкубировании римонабант несколько увеличивал интенсивность β -окисления длинноцепочечных жирных кислот в культивируемых миоцитах крысы, экспрессирующих избыточное количество 4-й изоформы глюкозного транспортера (Glut4), а также стимулировал фосфорилирование АМР-зависимой протеинкиназы (АМРК) в первичных гепатоцитах крысы. Однако при кратковременном воздействии римонабант практически не оказывал стимулирующего воздействия на β -окисление жирных кислот в миоцитах, миотубах и гепатоцитах, а также сколь-нибудь значительного влияния на фосфорилирование АМРК, гликогенолиз и уровни сАМР в гепатоцитах. Критическое влияние римонабанта на состояние гликогена в печени (распад) и общий расход энергии (повышение) у нормально питающихся крыс не могло объясняться его прямым стимулирующим воздействием на гликогенолиз и окисление жирных кислот в мышцах и печени. Скорее всего, эти стимулирующие эффекты были опосредованы центральной нервной системой.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АМР- и сАМР-зависимая сигнализация, каннабиноидный рецептор 1, метаболизм глюкозы и липидов, ожирение.

DOI: 10.1134/S032097251910004X

Как уже было установлено, эндогенные каннабиноиды и их рецепторы осуществляют контроль потребления пищи [1–4]. Другими подобными регуляторными соединениями являются нейропептид Y (NPY), грелин, холецистокинин

(ССК), орексины, агути-родственный пептид (AGRP), меланин-концентрирующий гормон (MCH), лептин, инсулин, проопиомеланокортин (POMC) и CART (транскрипт, регулируемый кокаином и амфетамином) [5–7]. Все экс-

Принятые сокращения: АСС – ацетил-СоА карбоксилаза; АМРК – АМР-зависимая протеинкиназа; СВ1R – каннабиноидный рецептор типа 1; (F)FA – свободные жирные кислоты; IBMX – изобутилметилксантин; РКА – протеинкиназа А; АICAR – 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», ВМ19-029, 15.07.2019. Статья на английском языке опубликована в вып. 8 2019 г. журнала «Biochemistry» (Moscow).

** Адресат для корреспонденции.

периментальные данные, полученные до настоящего времени, указывают на то, что заполнение G-белок-связанного каннабиноидного рецептора типа 1 (CB1R) в латеральной гипоталамической области эндогенными лигандами, эндоканнабиноидами, может приводить к гиперактивации нисходящей эндоканнабиноидной системы. Это в сочетании с другими орексигенными сигналами [8] стимулирует прием пищи, возможно, способствуя перееданию и ожирению. Подтверждением наличия такого механизма регуляции аппетита у грызунов и людей служат эксперименты с использованием синтетического селективного антагониста CB1R, римоабанта, который уменьшает индуцированный эндоканнабиноидами гиперфагический эффект потребления пищи и увеличения массы тела при введении мышам с ожирением, вызванным диетой [9], и пациентам с ожирением [10]. Влияние на функционирование CB1R-опосредуемой сигнальной системы эндогенных каннабиноидов и римоабанта подтверждается и наблюдениями на CB1R-нокаутированных мышах. Было установлено, что эти мыши были склонны к худобе, не были подвержены ожирению, вызванному особенностью диеты [11], не реагировали на римоабант и значительно снижали потребление пищи, когда находились на диете с повышенным содержанием жира [2, 12, 13].

В отличие от, по-видимому, централизованного и CB1R-опосредованного регулирования снижения потребления пищи, показавшего большую эффективность у животных во время возобновления кормления после временного лишения пищи, чем у животных, имеющих свободный доступ к пище [2, 12, 13], механизм(ы), участвующие в снижении массы тела в ответ на прием римоабанта, кажутся менее ясными. Недавние наблюдения вызывают сомнения в том, что кратковременное снижение потребления пищи, вызванное антагонистом гипоталамических CB1R, римоабантом, является единственным механизмом, ответственным за устойчивое снижение массы тела. Действительно, чип-анализ генов, регулируемых на транскрипционном уровне римоабантом в жировых тканях мышей, находящихся на особой диете и являющихся мышью моделью ожирения человека [14], а также фармакологическая характеристика нормально питающихся крыс линии Wistar после введения римоабанта (неопубликованные данные) позволяют предположить, что существуют и альтернативные механизмы, вносящие вклад в долгосрочный эффект римоабанта, направленный против ожирения. Эти предполагаемые механизмы могут осуществлять исправления параметров метаболизма путем

снижения потребления пищи, как показано на примере уменьшения триглицеридов и HDL-холестерина в сыворотке крови у пациентов с ожирением, получавших римоабант, что не может быть объяснено только степенью снижения веса [10]. Кроме того, поскольку животные, получавшие римоабант, теряли массу тела в большей степени, чем животные, не получавшие римоабант [15], механизмы, причинно не связанные с приемом пищи, также работают. Эти механизмы могли основываться на расходовании энергии в мышечной ткани и печени путем β -окисления жирных кислот, высвободившихся из жировой ткани, и/или при окислении глюкозы, вышедшей из печени. Подобная гипотеза основана на следующих недавних наблюдениях: (i) происходящие многочисленные изменения в экспрессии генов, которые индуцируются в белом и буром жире у тучных мышей и реверсируют при применении римоабанта, включая гены, ответственные за β -окисление жирных кислот, за цикл трикарбоновых кислот и др. [14]; (ii) однократное воздействие римоабанта на откормленных крыс линии Wistar приводило к резкому повышению уровня свободных жирных кислот (FFA) в сыворотке крови, снижению запасов эндогенного гликогена и липидов в печени, а также к увеличению общего расходования энергии, связанному с кратковременной стимуляцией окисления глюкозы и устойчивой стимуляцией окисления жирных кислот (неопубликованные данные).

Нами были изучены возможности прямого воздействия римоабанта на потенциальные периферические клетки-мишени, которые важны для регуляции расходования энергии, а также на гликогенолиз и окисление жирных кислот в культивируемых мышечных и первичных печеночных клетках.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культуры мышечных клеток крысы L6. Миоциты L6 и миоциты L6(Glut4), устойчиво экспрессирующие тус-меченый GLUT4 (клетки L6-GLUT4тус), были предоставлены Dr. Amira Klip (Programme in Cell Biology, The Hospital for Sick Children, 555 University Ave., Toronto, ON, Canada M5G 1X8). Миоциты культивировали в 24-луночных микропланшетах в среде α -MEM, содержащей 2%-ную (v/v) фетальную сыворотку крупного рогатого скота, 1% (v/v) смесь антибиотиков (100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 250 нг/мл амфотерицина В) при 37 °C в атмосфере 5% CO₂, а затем дифференцировались в L6 миотубы в течение 7 дней в

той же среде. Культура миотуб содержала <20% моноядерных клеток.

Культуры первичных гепатоцитов крыс. Первичные гепатоциты были изолированы из печени взрослых самцов крыс линии Sprague–Dawley («Møllegaard Breeding Centre Ltd.», Дания), кормили в свое удовольствие по стандартной методике с двухступенчатой перфузией, в среде, свободной от Ca^{2+} , с добавлением коллагеназы, как описано в работе Seglen [16]. Нежизнеспособные клетки удаляли центрифугированием в градиенте плотности Перколла [17]. Качество конечного препарата клеток оценивали с использованием трипанового синего. Жизнеспособность гепатоцитов составляли $\geq 95\%$.

Окисление жирных кислот. Скорость реакции β -окисления жирных кислот клетками определяли с использованием в качестве субстрата [9,10(n)- ^3H]пальмитиновую кислоту и тестировали по выходу продукта реакции $^3\text{H}_2\text{O}$ [18]. *Первичная культура гепатоцитов крысы:* клетки высевали в 24-луночные планшеты (2×10^5 клеток в лунку). После прикрепления клеток их инкубировали в течение ночи в 5 мМ глюкозе с 10 нМ дексаметазона. Клетки промывали один раз буфером PBS и затем инкубировали в среде DMEM, содержащей 5 мкМ (0,4 мКи) [^3H]пальмитиновой кислоты, 0,02% (w/v) БСА, 500 мкМ L-карнитин, 0,1% (v/v) ДМСО в присутствии или в отсутствии глюкозы (25 мМ), римонабанта и сорафена. *Культивируемые миоциты:* клетки лишали сыворотки на 5 ч, промывали сбалансированным солевым раствором Эрла (EBSS; 130 мМ NaCl, 26 мМ NaHCO_3 , 5 мМ KCl, 1,8 мМ CaCl_2 , 1 мМ NaH_2PO_4 , 0,8 мМ MgSO_4 , pH 7,4) и инкубировали 30 мин при 37 °C в среде EBSS, содержащей 5 мМ глюкозу и 2% (w/v) БСА, либо в среде EBSS, содержащей 0,1 мМ пальмитат (готовили 10 мМ раствор пальмитата в этаноле и разбавляли средой EBSS, содержащей 2% БСА) и римонабант. β -Окисление инициировали добавлением 0,5 мКи [^3H]пальмитата в среду инкубации. Через 4 ч инкубации при 37 °C аликвоты из бесклеточного супернатанта наносили на картриджи SerPak («Waters», Германия). Величину несвязавшейся радиоактивности определяли с использованием жидкостного сцинтилляционного счетчика.

Культуры первичных гепатоцитов крыс. Перед началом исследования мы оценили параметры реакции окисления [9,10(n)- ^3H]пальмитата в контроле (в отсутствие римонабанта) с целью достижения максимально возможной активности. Степень окисления оказалась зависимой от четырех главных параметров: концентрации

субстрата, плотности клеточного монослоя (количество белка), концентрации БСА, времени инкубации. Хотя концентрация субстрата, используемого обычно (5 и 100 мкМ соответственно), и не была насыщающей, <0,2% [^3H]пальмитата превращались в $^3\text{H}_2\text{O}$ контрольными клетками, и эта концентрация оставалась постоянной в течение всего периода инкубации. Продукция $^3\text{H}_2\text{O}$ происходила линейно вплоть до 80 мкг клеточного белка на лунку, после этого уровень активности переставал нарастать линейно. Все проведенные нами эксперименты были выполнены при 20–60 мкг белка в лунке. Первоначально окисление [^3H]пальмитата определяли в различных средах, включая (D)MEM и HBSS, дополненных сывороткой и/или БСА в различных концентрациях. Оптимум активности наблюдался в среде HBSS, содержащей 0,02 и 2% соответственно, свободного от жирных кислот БСА. Поскольку возрастание активности происходило линейно от 1 до 4 ч инкубации, измерения выполняли за период инкубации 2 ч.

Высвобождение глюкозы и содержание гликогена. Для определения высвобождения глюкозы и содержания гликогена в гепатоцитах первичную культуру клеток высевали в 96-луночные микропланшеты (3×10^4 клеток в лунку). После прикрепления клетки инкубировали в течение ночи в среде Вильяма (William's E-Medium), а затем добавляли 25 мМ глюкозы и 100 нМ инсулина для аккумуляции клетками глюкозы и накопления гликогена. Клетки 3× промывали прогретой насыщенной кислородом средой КНН (20 мМ Hepes; 115 мМ NaCl; 4,5 мМ KCl; 4,5 мМ CaCl_2 ; 1,1 мМ KH_2PO_4 ; 1,1 мМ MgSO_4 ; pH 7,4), а потом инкубировали 30 мин при 37 °C в 100 мкл среды КНН с 1% ДМСО и римонабантом или WIN55.212-2, как указано ниже. Гликогенолиз инициировали добавлением 10 мкл глюкогона (конечная концентрация 100 нМ). Концентрацию высвободившейся в среду глюкозы определяли с использованием набора Amplex Red Glucose Assay Kit («Molecular Probe», США) в соответствии с инструкцией производителя. Для оценки количества накопленного гликогена первичную культуру гепатоцитов рассеивали в 6-луночные планшеты ($1,5 \times 10^6$ клеток в лунку). Клетки инкубировали в течение ночи в среде Вильяма, а затем добавляли 25 мМ глюкозы и 100 нМ инсулина в присутствии или в отсутствие римонабанта. Клетки 2× промывали и лизировали в 200 мкл 100 мМ NaOH. Гликоген изолировали и анализировали, как описано ранее [19].

Фосфорилирование аденозинмонофосфат-зависимой протеинкиназы (АМПК). Для изуче-

ния фосфорилирования АМПК первичную культуру гепатоцитов инкубировали в течение ночи в 5 мМ глюкозы и 10 нМ дексаметазона. Клетки промывали один раз буфером PBS, а затем инкубировали в присутствии или в отсутствии римонабанта или 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR). По прошествии 90 мин клетки лизировали в буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 0,1% (w/v) Triton X-100, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 50 мМ NaF, 10 мМ β -глицерофосфат Na, 1 мМ Na_3VO_4 , 5 мМ NaPP_i , 1 мМ дитиотреитол и таблетки ингибиторов протеаз («Roche», Германия). Обломки клеток удаляли центрифугированием. Аликваты, содержащие по 20 мкг белка разделяли методом DS-Na электрофореза в (4–12)% ПААГ и переносили на PVDF (поливинилидендифторид) мембраны. Мембраны инкубировали с антителами против фосфо-АМПК β 1 (Ser108; «Cell Signaling», США). После промывки мембраны обрабатывали в течение 1 ч вторичными антителами против кроличьих IgG, конъюгированных с пероксидазой. Детектирование специфических белковых полос на блотах выполняли методом хемилюминесценции с использованием набора Lumi-LIGHT («Roche», Германия).

Внутриклеточные уровни сАМР. Для определения уровней внутриклеточного сАМР первичную культуру гепатоциты рассеивали в 96-луночные микропланшеты (по 3×10^4 клеток в лунку) и инкубировали в течение ночи в среде Вильяма в присутствии 25 мМ глюкозы и 100 нМ инсулина. Затем клетки инкубировали в течение 30 мин в среде КНН, дополненной 1 мМ изобутилметилксантина (IBMX), в присутствии или в отсутствии глюкагона, римонабанта или CP55.940. Уровни сАМР определяли с использованием набора HitHunter EFC сАМР chemiluminescence assay kit («Applied Biosystems», США) в соответствии с инструкцией производителя.

Разное. Римонабант был синтезирован, как описано ранее [9]. Концентрацию белка определяли с использованием БСА в качестве стандарта с набором фирмы «Pierce», США, Ds-Na электрофорез в 4–12% ПААГ проводили с набором фирмы «Novex», США. Иммуноблоттинг с использованием поливинилидендифторидных мембран и с последующим хемилюминисцентным детектированием — с помощью набора для ECL («Amersham-Buchler», Германия); количественную оценку проводили с использованием Люми-имиджера («Roche», Германия), снабженного программой для обработки данных Graph-Pad Prism 4.03, как было описано ранее [20].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Римонабант не индуцирует кратковременную активацию β -окисления в культуре мышечных клеток и в культуре первичных гепатоцитов. Ранее было продемонстрировано, что под действием римонабанта быстро повышались уровни FFA в сыворотке откормленных крыс линии Wistar. При проведении непрямых калориметрических измерений было обнаружено продолжительное увеличение уровней окисления липидов и критическое снижение уровней содержания липидов в печени (неопубликованные данные). Для изучения предполагаемого прямого действия римонабанта на β -окисление липидов в двух главных оксидативных тканях, мышцах и печени, сжигающих FFA, высвобождаемые из жировой ткани под действием римонабанта, использовались культивированные миоциты и миотубы крыс, а также первичные гепатоциты крыс. Кратковременная обработка римонабантом культуры L6 миоцитов и дифференцированных *in vitro* L6 миотуб, демонстрировавших высокую скорость β -окисления (рис. 1), а также первичных гепатоцитов (рис. 2), не приводила к существенному изменению скорости β -окисления экзогенной [^3H]пальмитиновой кислоты. И в качестве контроля окисление пальмитата существенно стимулировалось в гепатоцитах в отсутствие в культуральной среде глюкозы и сорафена, ингибитора ацетил-CoA карбоксилазы (ACC).

Одним из ключевых регуляторов окисления жирных кислот и расходования энергии является АМПК [21]. При фосфорилировании и активации в ответ на снижение энергетического статуса клеток, АМПК инактивирует ACC и тем самым стимулирует окисление жирных кислот. При кратковременной инкубации римонабант не индуцировал фосфорилирование АМПК в первичных гепатоцитах, в то время как AICAR, фармакологический активатор АМПК, приводил к резкому повышению уровня фосфорилирования АМПК (рис. 3, а). Кроме того, было показано, что введение агониста СВ1R крысам не влияет на активность АМПК в скелетных мышцах [22]. Это согласуется с отсутствием в наших экспериментах кратковременной активации римонабантом окисления жирных кислот в периферических клетках (рис. 1). Все эти данные в совокупности позволяют заключить, что римонабант не оказывал прямого и резкого воздействия на метаболические и регуляторные ферменты, принимающие участие в β -окислении длинноцепочечных жирных кислот в клетках мышц и печени. Напротив, при длительной инкубации миоцитов L6, экспрессирующие повы-

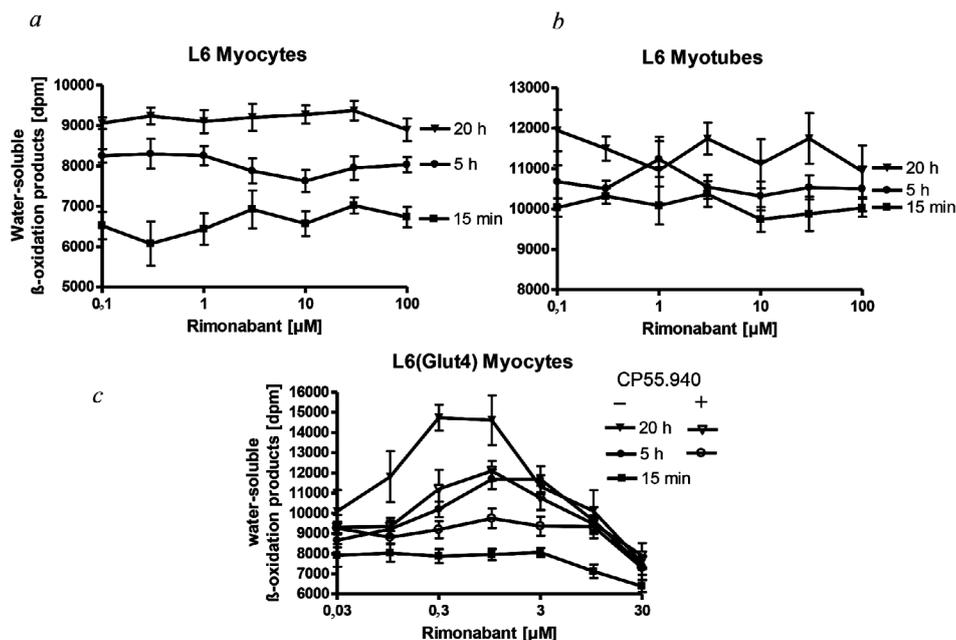


Рис. 1. Влияние римоабантанта на β -окисление FFA в миоцитах различных клеточных культур. Лишенные сыворотки культивируемые миоциты L6 (a), дифференцированные миотубы L6 (b) или миоциты L6, экспрессирующие Glut4 (c), инкубировали при 37 °C в среде EBSS, содержащей глюкозу и БСА, а затем в среде EBSS, содержащей пальмитат и БСА в отсутствии или присутствии повышающихся концентраций римоабантанта, различное время в отсутствии (L6 миоциты и миотубы) или в присутствии 10 мкМ CP55.940 (миоциты L6[Glut4]). Реакцию начинали добавлением ^3H пальмитата и инкубировали в течение 4 ч. Скорость β -окисления FFA определяли по количеству образовавшейся $^3\text{H}_2\text{O}$ (см. «Методы исследования»). Данные представлены как средние значения \pm S.D. ($n = 3$). 5000 dpm водорастворимых радиоактивных β -продуктов окисления соответствуют 1149 пмоль/мг/ч образовавшейся $^3\text{H}_2\text{O}$ из [9,10(n)- ^3H]пальмитата

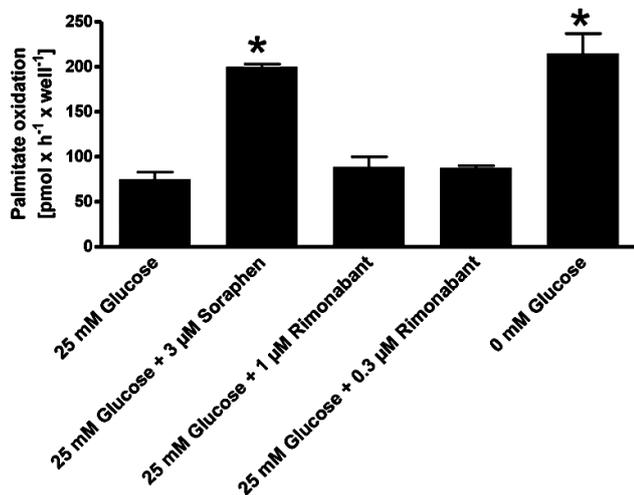


Рис. 2. Влияние римоабантанта на β -окисление FFA в первичных гепатоцитах крысы. Клетки инкубировали в течение 4 ч с ^3H пальмитиновой кислотой в присутствии или в отсутствии римоабантанта или ингибитора АСС, сорафена, при указанных концентрациях глюкозы. Данные представлены как средние значения \pm S. D. ($n = 3$). * $p < 0,05$. Окислению 127 пмоль пальмитата на лунку за 1 ч в условиях проведения реакции соответствуют 1000 dpm образовавшейся $^3\text{H}_2\text{O}$

шенное количество Glut4, окисление жирных кислот стимулировалось в средней степени (вплоть до 1,5 раз над базальным уровнем за 20 ч инкубации с 0,3–1 мкМ римоабантанта); эта активация полностью нивелировалась при избытке агониста СВ1R (рис. 1). К тому же, длительная инкубация (>90 мин) гепатоцитов с римоабантантом приводила к незначительному повышению в них уровня фосфорилирования AMPK (рис. 3, b). Напротив, стимулирующее влияние AICAR на β -окисление и на фосфорилирование AMPK детектировалось уже через 30 мин (рис. 3, b и данные не представлены).

Для доказательства достоверности использованного нами метода определения степени активации окисления жирных кислот была выполнена группа других экспериментов с использованием метода иммуноблоттинга в целях тестирования фосфорилированной формы ацетил-СоА карбоксилазы (по Thr172) — ключевого фермента, осуществляющего отрицательную регуляцию окисления жирных кислот, в то время как AMPK β 1 осуществлял положительную регуляцию. Сравнение двух методов выявило лишь незначительные различия между степенью

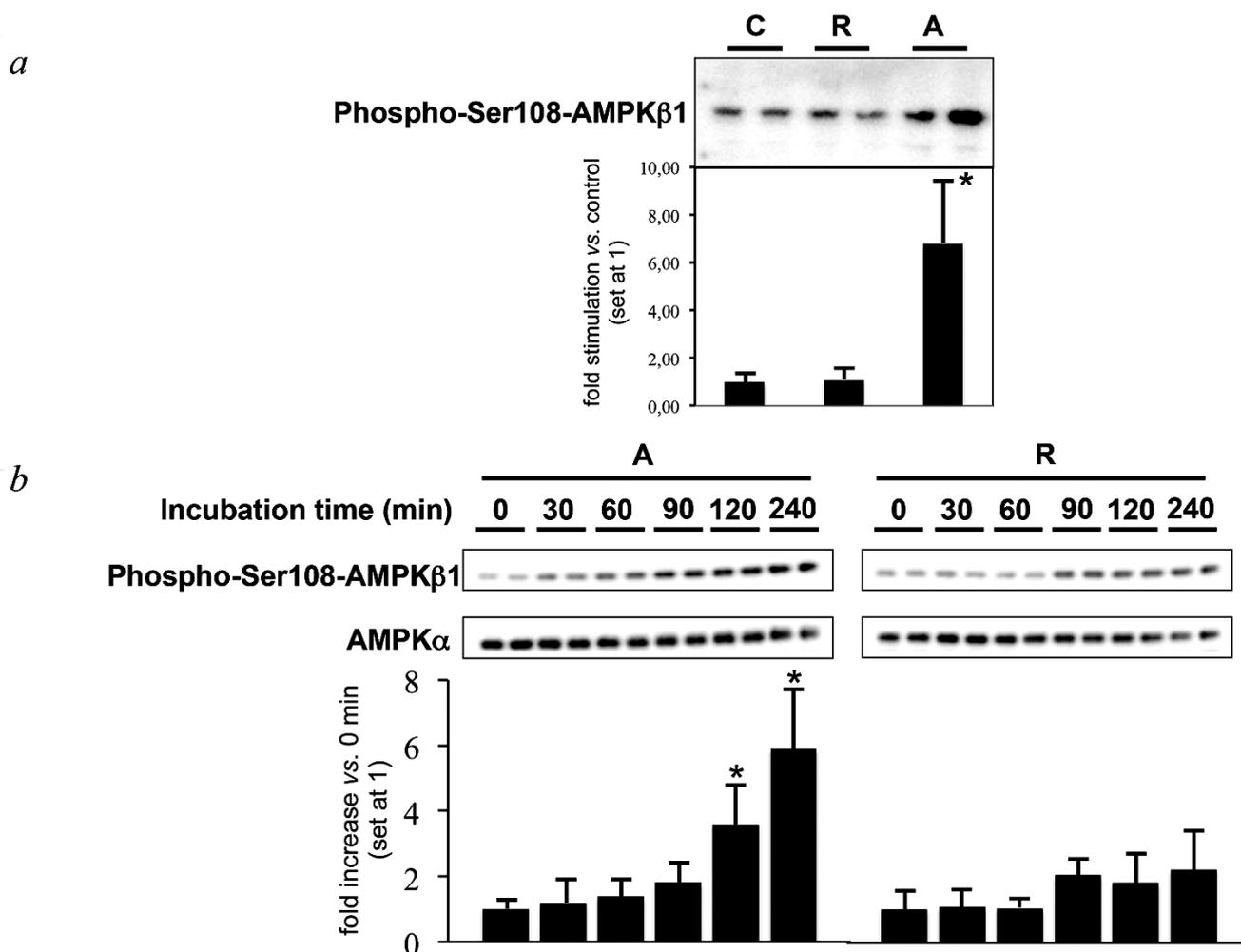


Рис. 3. Влияние римонабанта на фосфорилирование AMPK в первичных гепатоцитах крысы. *a* – Клетки инкубировали в течение 90 мин в отсутствии (столбец С) и в присутствии 1 мкМ римонабанта (столбец R) или 0,5 мМ AICAR (столбец А). Каждый эксперимент выполняли 4 раза. *b* – Клетки инкубировали различное время в присутствии 3 мкМ римонабанта (панель R) или 0,5 мМ AICAR (панель А). Аликвоты клеточных лизатов (по 20 мкг белка) разделяли методом Ds-Na-ПААГ электрофореза и анализировали методом иммуноблоттинга с использованием антител против фосфо-Ser108-AMPKβ1 или против AMPKα. Каждый эксперимент выполняли дважды. На панелях представлены репрезентативные иммуноблоты. Количественная оценка представлена в разях относительно контроля С (*a*) или в разях относительно нулевого момента времени инкубации (*b*). Столбцы на гистограммах представляют средние значения ± S.D. При $n = 4$ или $n = 2$ для (*a*) или (*b*) соответственно; * $p \leq 0,05$ относительно контроля С или нулевого момента времени инкубации для (*a*) или (*b*) соответственно

стимуляции фосфорилирования субъединицы AMPK β1 и фосфорилированием АСС римонабантом и AICAR, а также выявилась лишь незначительная задержка во времени между фосфорилированием АСС и AMPK (данные не представлены). Таким образом, уровень фосфорилирования AMPK β1 может быть использован как надежный показатель степени активации AMPK. Одновременное тестирование уровней фосфорилирования AMPK и АСС однозначно показывает, что римонабант не индуцирует активацию AMPK как молекулярный механизм, лежащий в основе предполагаемой регуляции окисления жирных кислот.

Отсутствие активации гликогенолиза римонабантом в первичных клетках печени. Известно, что под действием римонабанта наблюдалось критическое снижение содержания гликогена в печени крыс линии Wistar (неопубликованные данные). Для ответа на вопрос, связан ли этот эффект римонабанта с его прямым воздействием на метаболизм гликогена в печени, мы изучили влияние этого соединения на высвобождение глюкозы из запасов эндогенного гликогена с использованием в качестве объекта нагруженных гликогеном первичных гепатоцитов крысы (рис. 4). Глюкагон увеличивал высвобождение глюкозы из эндогенных запасов примерно в 2 раза.

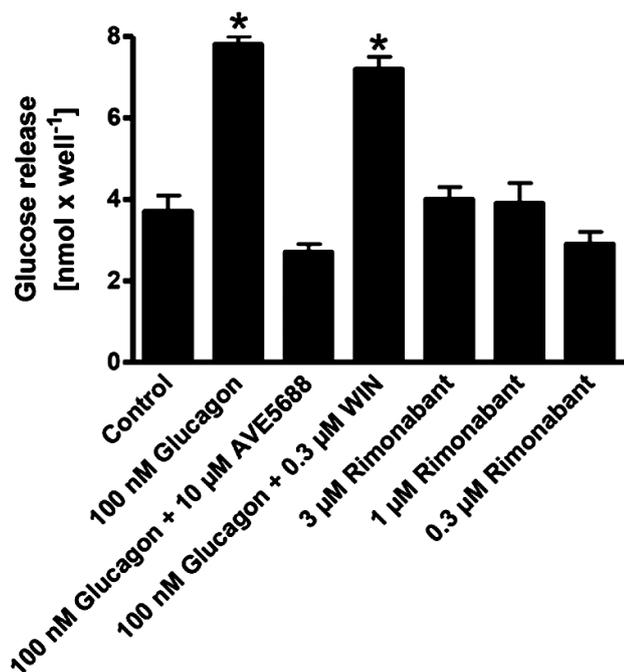


Рис. 4. Влияние римоабанта на высвобождение глюкозы из первичных гепатоцитов крысы. Высвобождение глюкозы определяли (см. «Методы исследования») после инкубации клеток в отсутствие (контроль) или в присутствии глюкагона, AVE5688 («Sanofi-Aventis»), WIN55.212-2 (Tocris) или римоабанта в различных концентрациях. * значительная стимуляция высвобождения глюкозы; $p \leq 0,05$

AVE5688, ингибитор гликогенфосфорилазы, блокировал эффект глюкагона, демонстрируя, что повышенное высвобождение глюкозы было обусловлено именно стимуляцией деградации гликогена. Агонист CB1R, WIN55.212-2, не оказывал влияния на глюкагон-стимулируемое высвобождение глюкозы. Римоабант в концентрации вплоть до 3 мкМ слабо повышал базальный уровень высвобождения глюкозы. Это наблюдение находилось в согласии с измеренным содержанием гликогена в культуре первичных гепатоцитов, обработанных римоабантом, которое тоже незначительно изменялось даже после инкубации римоабанта с клетками в течение 16 ч в присутствии глюкозы и инсулина (рис. 5).

Говоря в общем, эти данные свидетельствовали о том, что римоабант не оказывал прямого воздействия на метаболизм печеночного гликогена. Эта точка зрения нашла дальнейшее подтверждение при измерении уровней внутриклеточного cAMP, который опосредует стимулирующий эффект глюкагона на гликогенолиз. Как и ожидалось, глюкагон вызывал значительное увеличение уровней cAMP внутри первичных гепатоцитов прямо пропорционально своей концентрации; измерения были выполнены в присутствии ингибитора фосфодиэстера-

зы, IBMX (рис. 6, a). Агонист CB1R, CP55.940, не влиял на уровни AMP ни будучи один, ни в комбинации с глюкагоном. Римоабант в концентрации до 3 мкМ, отдельно или в комбинации с CP55.940, не оказывали существенного влияния на содержание клеточного cAMP в контрольном состоянии, т.е. в отсутствии глюкагона (рис. 6, b). Эти данные позволили заключить, что римоабант не оказывает прямого воздействия на первичные гепатоциты крысы при посредстве системы вторичного мессенджера cAMP.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В этой работе мы изучали механизмы, лежащие в основе острых и подострых эффектов римоабанта на гликогенолиз у откормленных крыс Wistar, которые выражались в снижении запасов гликогена в печени, активации окисления глюкозы и жирных кислот и в стимуляции общих энергозатрат (неопубликованные данные). В частности, мы попытались ответить на вопрос, может ли римоабант оказывать прямое (непосредственное) воздействие на культивируемые миоциты и первичные гепатоциты крысы. Демонстрация прямой стимуляции липолиза в изолированных адипоцитах крыс [23] и отсутствие стимуляции окисления базальных FA и фосфорилирования AMPK (рис. 3) в культивируемых

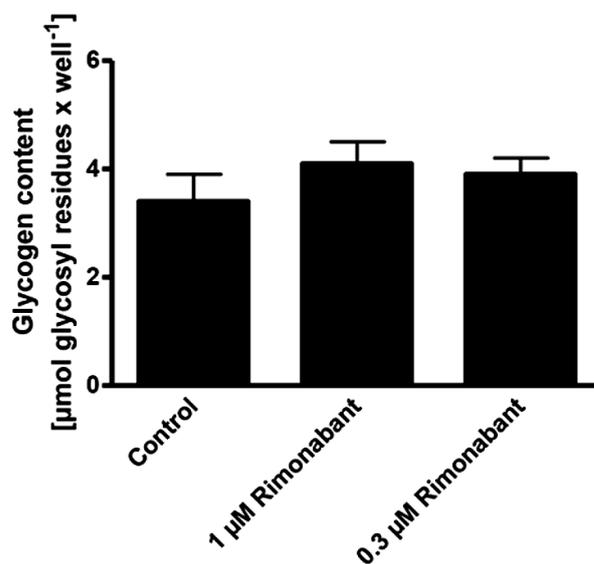


Рис. 5. Влияние римоабанта на содержание гликогена в первичных гепатоцитах крысы. Уровни содержания гликогена в клетках определяли (см. «Методы исследования») после инкубации в течение ночи в среде, содержащей 25 мМ глюкозы и 100 нМ инсулина в присутствии или в отсутствие римоабанта. Данные представлены как средние значения \pm S.D. ($n = 3$)

миоцитах и миотубах (рис. 1), а также в первичных гепатоцитах крыс (рис. 2) в ответ на кратковременное воздействие римонабанта позволяет предположить, что *in vivo* римонабант-индуцированное прямое высвобождение жирных кислот из жировой ткани в сыворотку приводит к окислению жирных кислот в мышцах и тканях печени без посторонней помощи. Эта комбинация прямых и косвенных периферических эффектов была бы совместима с острыми и подострыми эффектами римонабанта на липидный метаболизм у откормленных крыс линии Wistar (неопубликованные данные). Независимо от механизма косвенной и критической стимуляции окисления жирных кислот *in vivo*, римонабант, по-видимому, прямо приводит в действие СВ1R-зависимый способ положительного регулирования β -окисления жирных кислот (рис. 1), в основе которого может лежать активация АМПК (рис. 3). Примечательно, что выполненный ранее анализ экспрессии генов у выкормленных на высококалорийной диете ожиревших мышей, получавших римонабант в дозе 10 мг/кг/день в течение 40 дней, выявил индукцию ферментов окисления жирных кислот, а также 2× увеличение уровня Glut4 в белой и бурой жировой тканях в сравнении с контрольными животными, не получавшими римонабант [14]. Эти данные подтверждают тот факт, что модуляция экспрес-

сии генов является важным фактором для регуляции метаболизма жирных кислот римонабантом при посредстве СВ1R. Однако, поскольку стимуляция окисления ФА римонабантом не наблюдалась в миоцитах и миотубулах L6, не экспрессирующих повышенные количества Glut4 и требующих длительной (более 5 ч) инкубации с римонабантом, то прямое СВ1R-зависимое воздействие римонабанта на мышечную ткань при однократном получении этого препарата раскормленными крысами не может служить объяснением резкого повышения скорости окисления жирных кислот. Таким образом, первичная мишень для резкого стимулирующего действия римонабанта на окисление жирных кислот и расходование энергии *in vivo* не может быть локализована в периферических тканях.

Примечательно, что в первичных гепатоцитах не наблюдалось прямой стимуляции гликогенолиза римонабантом, что выражалось в высвобождении глюкозы в среду инкубации (рис. 4) и в содержании гликогена в клетках (рис. 5), а также в базальном уровне синтеза сАМР в гепатоцитах (рис. 6, *b*), несмотря на то что в гепатоцитах гликогенолиз регулируется сАМР, аналогично липолизу в адипоцитах. Неспособность обнаружить СВ1R-зависимую гликогенолитическую активность римонабанта может зависеть от более низкой экспрессии или менее эффективной связи СВ1R с

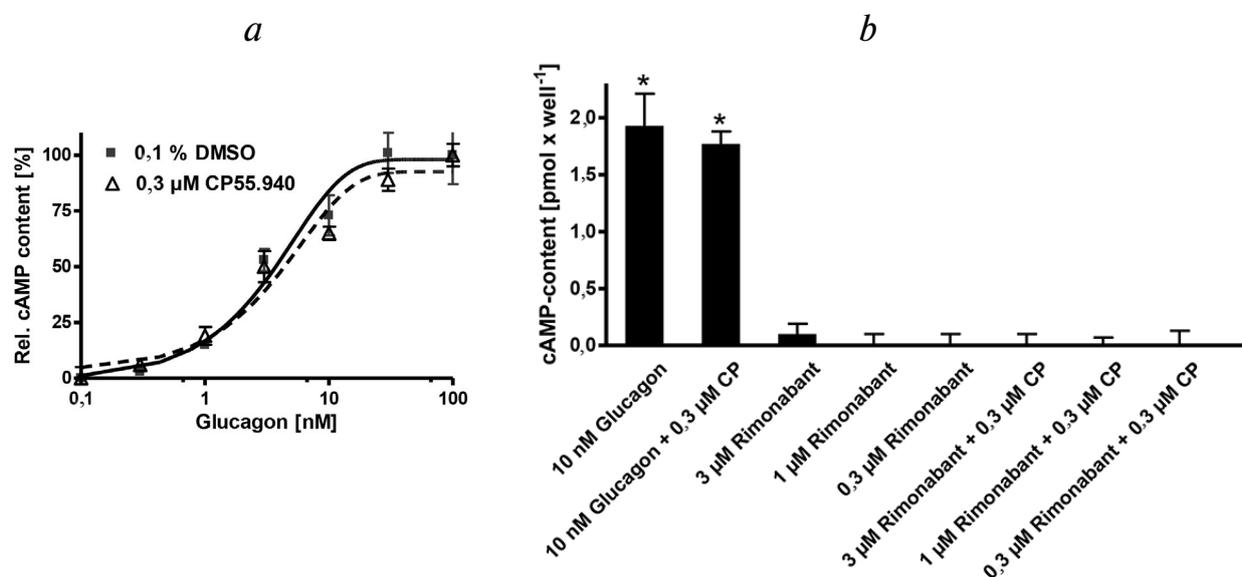


Рис. 6. Влияние римонабанта и CP55.940 на содержание сАМР в первичных гепатоцитах крысы. *a* – Уровни сАМР внутри клеток определяли через 30 мин инкубации в присутствии глюкагона в различных концентрациях и в отсутствии (черные квадраты, сплошная линия) или в присутствии (светлые треугольники, пунктирная линия) 0,3 мкМ CP55.940. *b* – Клетки инкубировали в течение 30 мин в присутствии или в отсутствии глюкагона, CP55.940 (CP) или римонабанта. Уровни сАМР определяли по стандартному калибровочному графику, как отмечено в разделе «Методы исследования». Данные представлены как средние значения \pm S.D. ($n = 3$).

* Значительное повышение уровней сАМР в клетках по сравнению с нестимулированными клетками; $p < 0,05$

нисходящими эффекторами в печени по сравнению с жировыми клетками. Экспрессия СВ1R, продемонстрированная в настоящее время в первичных гепатоцитах крысы [24] и адипоцитах крысы и мыши [25], по-видимому, сильно зависит от возраста животного-донора. Можно было ожидать, что при связывании СВ1R с эндогенными каннабиноидами, которые конкурируют с римонабантом, должны были бы стимулироваться гликогенолиз и липолиз, однако эта функция менее выражена или даже отсутствует в первичных гепатоцитах по сравнению с адипоцитами. Единственным прямым действием римонабанта на гепатоциты, о котором сообщалось до сих пор, является ингибирование синтеза базальных и СВ1R агонистов жирных кислот [24]. Подобные воздействия могут являться ответом на незначительные изменения в сигналах АМПК и/или протеинкиназы А (РКА) с большей чувствительностью по сравнению с окислением жирных кислот либо осуществляющихся через другие сигнальные системы, инициированные СВ1R печени, но опять-таки, независимо от распада жирных кислот. В любом случае описанные острые или подострые эффекты римонабанта на окисление глюкозы и жирных кислот у откормленных крыс линии Wistar, приводящие к резкому увеличению энергозатрат в организме (неопубликованные данные), являются, по-видимому, результатом не периферического, а центрального СВ1R-опосредованного действия римонабанта, либо они вторичны и возникают как ответ на приток субстратов, вызванный активацией липолиза и гликогенолиза.

Ситуация может поменяться, при длительном приеме римонабанта, как это предусмотрено при лечении ожирения. Что касается предполагаемого механизма реализации длительного воздействия римонабанта, он может заключаться в том, что в высокой концентрации (>10 мкМ) и при длительном воздействии он способен стимулировать липолиз способом, независимым от функционального СВ1R или других рецепторов, связанных с системой вторичного мессенджера сАМР–РКА [23]. Примечательно, что инкубация с римонабантом нативных липидных включений, полученных из изолированных адипоцитов крысы (но не эмульсии синтетических нейтральных липидов), приводила к повышению их сродства к гормон-чувствительной липазе и ускорению реакции липолиза. Механизм действия римонабанта на липолиз в бесклеточной системе или на липидные включения, полученные из обработанных римонабантом адипоцитов, вероятно, опосредуется РКА-зависимым фосфорилированием жировых включений, а не самой гормон-чувствительной липазой. Пред-

положение о том, что липидные включения могут являться первичной мишенью действия римонабанта, согласуется с существующими наблюдениями, свидетельствующими о ключевой роли липидных капельно-ассоциированных белков в регуляции липолиза [26, 27].

Приведенные данные являются аргументами в поддержку предположения о том, что взаимодействие римонабанта (в высокой концентрации) с поверхностью жировых включений, а также его воздействие на СВ1R в адипоцитах приводят к увеличению доступности этих включений для гормон-чувствительной липазы независимым и зависимым от фосфорилирования способами соответственно. Эти два механизма могут вести к прямой и резкой стимуляции липолиза и, следовательно, стимуляции окисления FA, осуществляемой римонабантом; они являются потенциальными мишенями для будущего лечения ожирения в обход гипоталамического СВ1R.

Заманчиво было предположить, что прямое воздействие римонабанта на липолиз не ограничивается его действием только на жировую ткань. Гормон-чувствительная липаза экспрессируется во многих тканях и регулирует мобилизацию запасов эндогенного жира в клетках различных типов, таких, как миоциты и гепатоциты [28]. Интересно, что индуцированное римонабантом увеличение уровней FFA в сыворотке раскормленных крыс было связано с повышением уровней внутримиецеллярных липидов через 6 ч после однократного введения римонабанта, которые впоследствии за 20 ч снижались до уровней более низких, чем у контрольных животных [29]. Это высвобождение FA из внутримиецеллярных/гепатоцеллюлярных липидов для их последующего окисления жирных кислот в мышечных/печеночных тканях может быть основано на стимуляции липолиза в миоцитах и гепатоцитах как прямо, СВ1R-зависимо, так и/или независимо, как это происходит в адипоцитах [23].

Таким образом, полученные результаты позволяют по-новому взглянуть на наши представления о рецептор-зависимом и независимом молекулярном действии СВ1 и физиологической регуляции процессов деградации липидов и гликогена эндогенными каннабиноидами и их антагонистами, в частности, аноректиком римонабантом, который может быть апробирован в будущем в качестве лекарственного лечебного препарата для терапии ожирения [30, 31].

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Данная статья не содержит исследований с участием животных или людей, выполненных кем-либо из авторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sack, N., Hutcheson, J.R., Watts, J.M., and Webb, R.E. (1990) Case report: the effect of tetrahydrocannabinol on food intake during chemotherapy, *J. Am. Coll. Nutr.*, **9**, 630–632.
- Di Marzo, V., Goparaju, S.K., Wang, L., Liu, J., Batkai, S., Jarai, Z., Fezza, F., Miura, G.I., and Palmiter, R.D. (2001) Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake, *Nature*, **410**, 822–825.
- Di Marzo, V., and Matias, I. (2005) Endocannabinoid control of food intake and energy balance, *Nature, Neurosci.*, **8**, 585–589.
- Cohen, K., Weizman, A., and Weinstein, A. (2019) Positive and negative effects of cannabis and cannabinoids on health, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **105**, 1139–1147, doi: 10.1002/cpt.1381.
- Benardis, L.L., and Bellinger, L.L. (1996) The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behaviour, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **20**, 189–287.
- Spiegelman, B.M., and Flier, J.S. (2001) Obesity and the regulation of energy balance, *Cell*, **104**, 531–543.
- Barsh, G.S., and Schwartz, M.W. (2002) Genetic approaches to studying energy balance, *Nat. Rev. Genet.*, **3**, 589–600.
- Hilaret, S., Bouaboula, M., Carriere, D., Le Fur, G., and Casellas, P. (2003) Hypersensitization of the orexin 1 receptor by the CB1 receptor: evidence for cross-talk blocked by the specific CB1 antagonist, SR141716, *J. Biol. Chem.*, **278**, 23731–23737.
- Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Heaulme, M., Alonso, R., Shire, D., Congy, C., Soubrie, P., Breliere, J.C., and Le Fur, G. (1995) Biochemical and pharmacological characterization of SR141716, the first potent and selective brain cannabinoid receptor antagonist, *Life Sci.*, **56**, 1941–1947.
- Van Gaal, L.F., Rissanen, A.M., Scheen, A.J., Ziegler, O., and Rossner, S. (2005) Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study, *Lancet*, **365**, 1389–1397.
- Ravinet, T.C., Delgorge, C., Menet, C., Arnone, M., and Soubrie, P. (2004) CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, **28**, 640–648.
- Gomez, R., Navarro, M., Ferrer, B., Trigo, J.M., Bilbao, A., Del, A., Cippitelli, A., Nava, F., Piomelli, D., and Rodriguez, D.F. (2002) A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding, *J. Neurosci.*, **22**, 9612–9617.
- Freedland, C.S., Poston, J.S., and Porrino, L.J. (2000) Effects of SR141716A, a central cannabinoid receptor antagonist, on food-maintained responding, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **67**, 265–270.
- Jbilo, O., Ravinet-Trillou, C., Arnone, M., Buisson, I., Bribes, E., Peleraux, A., Penarier, G., Soubrie, P., Le Fur, G., Galiegue, S., and Casellas, P. (2005) The CB1 receptor antagonist rimonabant reverses the diet-induced obesity phenotype through the regulation of lipolysis and energy balance, *FASEB J.*, **19**, 1567–1569.
- Ravinet, T.C., Arnone, M., Delgorge, C., Gonalons, N., Keane, P., Maffrand, J.P., and Soubrie, P. (2003) Anti-obesity effect of SR141716, a CB1 receptor antagonist, in diet-induced obese mice, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **284**, R345–R353.
- Seglen, P.O. (1976) Preparation of isolated rat liver cells, *Methods Cell Biol.*, **13**, 29–83.
- Kreamer, B.L., Steacker, J.L., Sawada, N., Sattler, G.L., Hsia, M.T., and Pitot, H.C. (1986) Use of a low-speed, iso-density percoll centrifugation method to increase the viability of isolated rat hepatocyte preparations, *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **22**, 201–211.
- Minnich, A., Tian, N., Byan, L., and Bilder, G. (2001) A potent PPARalpha agonist stimulates mitochondrial fatty acid beta-oxidation in liver and skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **280**, E270–E279.
- Schmoll, D., Fuhrmann, E., Gebhardt, R., and Hamprecht, B. (1995) Significant amounts of glycogen are synthesized from 3-carbon compounds in astroglial primary cultures from mice with participation of the mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase isoenzyme, *Eur. J. Biochem.*, **227**, 308–315.
- Muller, G., Jung, C., Wied, S., Welte, S., and Frick, W. (2001) Insulin-mimetic signaling by the sulfonylurea glimepiride and phosphoinositolglycans involves distinct mechanisms for redistribution of lipid raft components, *Biochemistry*, **40**, 14603–14620.
- Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D., and Hardie, D.G. (2005) AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism, *Cell Metabolism*, **1**, 15–25.
- Kola, B., Hubina, E., Tucci, S.A., Kirkham, T.C., Garcia, E.A., Mitchell, S.E., Williams, L.M., Hawley, S.A., Hardie, D.G., Grossman, A.B., and Korbonits, M. (2005) Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase, *J. Biol. Chem.*, **280**, 25196–25201.
- Muller, G.A., Herling, A.W., and Wied, S. (2019) Upregulation of phosphorylation of lipid droplet-associated proteins in primary rat adipocytes by the cannabinoid receptor 1 antagonist rimonabant, *Arch. Physiol.*, in press.
- Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Batkai S, Harvey-White J, Mackie, K., Offertaler, L., Wang, L., and Kunos, G. (2005) Endocannabinoid activation at hepatic CB₁ receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity, *J. Clin. Invest.*, **115**, 1298–1305.
- Bensaid, M., Gary-Bobo, M., Esclangon, A., Maffrand, J.P., Le Fur, G., Oury-Donat, F., and Soubrie, P. (2003) The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells, *Mol. Pharmacol.*, **63**, 908–914.
- Brown, D.A. (2001) Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat, *Curr. Biol.*, **11**, R446–R449.
- Blanchette-Mackie, E.J., Dwyer, N.K., Barber, T., Coxey, R.A., Takeda, T., Rondinone, C.M., Theodorakis, J.L., Greenberg, A.S. and Londos, C. (1995) Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes, *J. Lipid Res.*, **36**, 1211–1226.
- Yeaman, S.J. (2004) Hormone-sensitive lipase – new roles for an old enzyme, *Biochem. J.*, **379**, 11–22.
- Herling, A.W., Kilp, S., Juretschke, H.P., Neumann-Haefelin, C., Gerl, M., and Kramer, W. (2008) Reversal of visceral adiposity in candy-diet fed female Wistar rats by the CB1 receptor antagonist rimonabant, *Int. J. Obes.*, **32**, 1363–1372.
- Lu, Y., and Anderson, H.D. (2017) Cannabinoid signaling in health and disease, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **95**, 311–327.
- Simon, V., and Cota, D. (2017) Mechanisms in endocrinology: Endocannabinoids and metabolism: past, present and future, *Eur. J. Endocrinol.*, **176**, R309–R324.

**ANALYSIS OF DIRECT EFFECTS OF THE CB1 RECEPTOR
ANTAGONIST RIMONABANT ON FATTY ACID OXIDATION
AND GLYCOGENOLYSIS IN LIVER AND MUSCLE
CELLS *in vitro***

G. A. Müller^{1,2*}, S. Wied³, and A. W. Herling³

¹ *Helmholtz Diabetes Center (HDC) at the Helmholtz Center for Health and Environment Munich, Institute for Diabetes and Obesity (IDO), 85764 Oberschleissheim, Germany; E-mail: guenter.mueller@helmholtz-muenchen.de*

² *Ludwig-Maximilians-University Munich, Department Biology I, Genetics, 82152 Planegg-Martinsried, Germany*

³ *Sanofi Pharma Germany GmbH, Diabetes Research, 65926 Frankfurt am Main, Germany*

Received February 4, 2019

Revised June 24, 2019

Accepted June 25, 2019

Recent pharmacological findings regarding rimonabant, an anorectic and cannabinoid type 1 receptor (CB1R) antagonist, strongly suggest that some of its effects on the metabolic parameters and energy balance in rats are not related to the centrally mediated reduction in caloric intake. Instead, they may be associated with acute induction of glycogenolysis in the liver, in combination with transient increase in glucose oxidation and persistent increase in fat oxidation. It is possible that rimonabant produced direct short- or long-term stimulatory effect on these processes in primary and cultured rat cells. Rimonabant slightly stimulated β -oxidation of long-chain fatty acids in cultured rat myocytes overexpressing glucose transporter isoform 4, as well as activated phosphorylation of adenosine monophosphate-dependent protein kinase (AMPK) in primary rat hepatocytes upon long-term incubation. However, short-term action of rimonabant failed to stimulate β -oxidation in myocytes, myotubes, and hepatocytes, as well as to upregulate AMPK phosphorylation, glycogenolysis, and cAMP levels in hepatocytes. As a consequence, the acute effects of rimonabant on hepatic glycogen content (reduction) and total energy expenditure (increase) in rats fed with a standard diet cannot be explained by direct stimulation of glycogenolysis and fatty acid oxidation in muscles and liver. Rather, these effects seem to be centrally mediated.

Keywords: AMP- and cAMP-dependent signaling, cannabinoid receptor 1, glucose and lipid metabolism, obesity