

## ОБЗОРЫ

© Ю.А.ПАНКОВ

УДК 577.112.5.+577.113.5.+577.17.01:591.05

### ВСЕ ОРГАНЫ И ТКАНИ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА ЯВЛЯЮТСЯ ЭНДОКРИННЫМИ И СЕКРЕТИРУЮТ В КРОВЬ ГОРМОНЫ ПЕПТИДНОЙ ПРИРОДЫ?

Ю.А.ПАНКОВ

Эндокринологический научный центр РАМН, Москва

Эндокринология зародилась и развивалась как наука о железах внутренней секреции и заболеваниях человека и животных, вызываемых нарушением их функции. Сформировавшаяся номенклатура эндокринных желез включила в себя гипофиз, щитовидную и паращитовидную железы, надпочечники, поджелудочную железу и гонады. Впоследствии было показано, что некоторые отделы головного мозга и, в частности, гипоталамус также являются эндокринными органами и секретируют в кровь большое количество разнообразных пептидных гормонов. Сердце секретирует в кровь пептидное соединение натрий-уретический гормон, регулирующий обмен натрия. Новейшие исследования показывают, что адипоциты — клетки жировой ткани секретируют в кровь пептидный гормон — лептин, стимулирующий использование липидов жировых депо в энергетическом обмене. Лептин является продуктом экспрессии гена ожирения (гена *ob*), который экспрессируется главным образом в белой жировой ткани. Первым природным соединением, которому было присвоено название “гормон”, было пептидное вещество “секретин”, которое выделяется в кровь не традиционными эндокринными железами, а клетками двенадцатиперстной кишки и регулирует экзокреторную функцию поджелудочной железы. Сформировавшаяся тенденция позволяет утверждать, что по аналогии с адипоцитами, сердцем, гипоталамусом и др. все остальные органы и ткани животных и человека также могут быть эндокринными и способны секретировать в кровь гормоны пептидной природы, которые еще предстоит открыть и которые как информационные биополимеры лучше других химических соединений приспособлены к переносу информации и, следовательно, могут эффективно выполнять регуляторные функции.

Ключевые слова: пептидные гормоны, эндокринные железы, лептин, жировой обмен, ген ожирения, библиотека КДНК.

Утверждение, вынесенное в заголовок настоящей статьи, строго говоря, не является экспериментально доказанным, но оно становится чрезвычайно правдоподобным и может в полной мере соответствовать реальной действительности в свете последних достижений молекулярной биологии, молекулярной генетики и смежных дисциплин. Исследование гормонов длительное время было связано с эндокринологией, которая зародилась и развивалась как наука о железах внутренней секреции и заболеваниях человека и животных, вызванных нарушением их функции. Сразу же после зарождения в эндокринологии довольно быстро сформировалась номенклатура эндокринных желез, которая включала в себя гипофиз, щитовидную и паращитовидную железы, надпочечники, поджелудочную железу и гонады. В отличие от обычных желез, выделяющих секрет через специальные выводящие протоки в полость желудочно-кишечного тракта и другие полости организма, эндокринные железы не имеют выводящих протоков и секретируют вырабатываемые ими продукты непосредственно в кровяное русло, с которым они распространяются по всему организму и оказывают регулирующее действие на различные органы и ткани. Эти узко специализированные органы (небольшие железы) иногда даже называли “маленькими органами большого значения”.

Серьезные сомнения в сложившиеся представления зародили исследования, которые впоследствии позволили делать заявления о том, что головной мозг также является эндокринным органом. Этот вопрос остается дискуссионным, но, по крайней мере, один из отделов головного мозга, а именно гипоталамус, который вырабатывает и секретирует в кровь большое количество разнообразных пептидных гормонов, несомненно является эндокринным органом. Однако эти новейшие достижения довольно органично вписывались в старые представления и, в соответствии с новой концепцией (в рамках старых представлений), гипоталамус и гипофиз стали даже называть эндокринным мозгом.

Первое достаточно внушительное открытие, которые несколько пошатнуло твердый фундамент сложившихся представлений, было открытие натрий-уретического гормона, вырабатываемого и секретируемого в кровь сердцем. Этот гормон вместе со своим антагонистом альдостероном (гормон надпочечников) достаточно эффективно регулирует обмен ионов натрия в организме и недвусмысленно показывает, что сердце также является эндокринным органом. Однако, после открытия натрий-уретического гормона старые представления в эндокринологии еще каким-то образом удержались и сохранились. Они вряд ли останутся неизменными после открытия пептидного гормона адипоцитов — лептина, который вырабатывается и секретируется в кровь жировой тканью и оказывает регулирующее воздействие на энергетический обмен и сгорание жиров в организме. Интересно, что одним из основных органов — мишеней лептина, по всей вероятности может быть центральная нервная система, через воздействие на которую лептин осуществляет регуляцию липидного обмена.

Уместно напомнить, что термину "гормон" скоро исполнится 100 лет [1, 2]. Он происходит от греческого *hormoio* — приводить в движение, побуждать. Он впервые был введен в научную литературу английскими физиологами W.H.Bayliss и E.Starling в 1902 году для биологически активного соединения секретина. Секретин, как известно, синтезируется клетками слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки, секретируется в кровь и регулирует экзокреторную функцию желудочно-кишечного тракта. Интересно, что термин "гормон" появился на 7 лет раньше, чем в научную литературу вошло название специальности "эндокринология" [1], и относился к пептидному гормону, секретируемому в кровь не классическими железами внутренней секреции, которые впоследствии стали предметом интенсивного изучения эндокринологии как науки, а клетками пищеварительного тракта. Впоследствии, помимо секретина, были открыты десятки других пептидных гормонов желудочно-кишечного тракта. Открытие лептина — пептидного гормона адипоцитов и некоторые другие накопленные результаты могут заставить коренным образом пересмотреть сложившиеся и утвердившиеся в эндокринологии представления и концепции.

Исследования, которые в наше время привели к открытию лептина, начались в 50-е годы выделением особых генетических линий мышей *ob/ob*, и некоторых других, характеризующихся избыточным весом, высоким уровнем потребления пищи, низкой физической активностью, сниженным энергетическим обменом, повышенным отложением липидов в жировой ткани и развитием диабета II типа, что было вызвано рецессивной мутацией (*obese mutation*) [3,4].

Опыты по парабризу с перекрестным кровообращением обычных мышей и мышей линии *ob/ob* показали, что, когда в организм мышей *ob/ob* постоянно поступает кровь нормальных животных, у них снижается потребление пищи, увеличивается энергетический обмен и уменьшаются жировые запасы [5,6]. Эти данные позволили постулировать, что в крови здоровых животных циркулирует гуморальный фактор, который стимулирует энергетический обмен и который отсутствует в крови мышей линии *ob/ob*. Длительное время этот фактор идентифицировать не удавалось и только в последнее время, благодаря новейшим достижениям молекулярной биологии и разработке новых эффективных методических подходов, удалось найти ответы на многие поставленные вопросы и решить ряд связанных с ними фундаментальных проблем.

Первые исследования показали, что ген *ob* (*obese gene*) располагается в проксимальной части 6 хромосомы мышей [7]. Исследования гена *ob* основывались на использовании позиционного клонирования и на поиске генов, активно экспрессирующихся в жировой ткани [8]. Для позиционного клонирования использовали искусственные хромосомы дрожжей (YAC-yeast artificial chromosome). В YAC клонировали различные участки 6 хромосомы вблизи локуса *ob* и исследовали концы различных YAC, что позволило первоначально определить размер локуса *ob* порядка 2,2 м.п.н. Более точно локализация гена *ob* была определена после того как было показано, что он располагается между дистальными концами двух хромосом YAC 903E1016 и YAC 902A0653, и включает в себя 900 т.п.о. В дальнейшем эта область была сужена до 650 т.п.о. и было проведено исследование двадцати четырех P1 клонов, перекрывающих большую часть локуса *ob*. Гены из интервала 650 т.п.о. 6 хромосомы затем исследовали с использованием так называемого метода захвата экзонов (*exon trapping*) [9]. Для этого индивидуальные или объединенные клоны субклонировали в экзон захватывающем векторе pSPL3 по сайтам BamHI/Bgl II, затем их секвенировали и сравнивали со

всеми нуклеиновыми последовательностями в Генбанке (Gene Bank). С помощью нозернблоттинга и ПЦР на основе обратной транскрипции (reverse transcription PCR) проводили скрининг мРНК, комплементарных предполагаемых экзонам, в различных тканях. Таким образом было отобрано и идентифицировано шесть генов, из которых четыре картированы внутри 650 т.п.о. области об.

Один из захваченных экзонов, обозначенный 2G7, с помощью нозернблоттинга гибридизовался с -4,5 kb РНК только в белой жировой ткани и не гибридизовался с РНК других тканей мышцы. Идентичные результаты были получены с использованием ПЦР на основе обратной транскрипции. Высокий уровень экспрессии экзона в жировой ткани заставлял предполагать, что он мог возникнуть из гена об, что подтверждалось отсутствием экспрессии 2G7 экзона в жировой ткани одной из линий мышей об/об (SM/Ск<sub>h</sub> + Das об 2j/об 2j), характеризующейся блокадой экспрессии гена об.

Экзон 2G7 был использован в качестве зонда для выделения 22 комплементарных ему клонов ДНК из библиотеки кДНК, полученной на основе жировой ткани нормальной мышцы. Секвенирование выделенных кДНК клонов обнаружило в них стартовый кодон Met, открытую рамку считывания нуклеотидной последовательности, кодирующей белок из 167 аминокислотных остатков, и очень длинную 3'-нетранслируемую область.

Ген об и белок об не имели заметной гомологии ни с одной последовательностью в Gene Bank, поэтому можно думать, что лептин, продукт экспрессии гена об, открывает новый класс или семейство белков, которые станут предметом интенсивного исследования в будущем. Ген об и белок об относятся к тем 90% нуклеотидных и аминокислотных последовательностей животных и человека, которые до последнего времени находились вне поля зрения и активной исследовательской деятельности научного сообщества. Наряду с другими генами и белками, которые сейчас активно изучаются, он обозначает прорыв науки в новую, пока неизведанную область знания.

Из библиотеки кДНК, полученной на основе мРНК из жировой ткани человека, путем гибридизации с кДНК об мышей были отобраны и секвенированы кДНК об человека. Нуклеотидные последовательности кодирующих областей кДНК об человека и мыши обнаруживали высокую гомологию (85% идентичной аминокислотной последовательности) и только 30% гомологии в 5'- и 3'-нетранслируемых областях [8].

Белок об проявлял высокую консервативность и методом гибридизации с кДНК об мыши была показана экспрессия генов об в жировой ткани 11 различных видов животных. Группой Фридмана [10] белку об присвоено название "лептин" от греческого слова "leptos" (тонкий) и сформулирован постулат: продукт экспрессии гена об — лептин, является гормоном, который секретируется адипоцитами в кровь в изменяющихся количествах и контролирует массу жировой ткани путем стимуляции обмена липидов в организме.

Затем были созданы генно-инженерные конструкции для биотехнологического синтеза активного пептида в дрожжах [1] и в *E.coli* [11], что позволило наработать лептин в достаточном количестве и изучить его биологические свойства, а также получить поликлональную антисыворотку к пептиду. Методом иммуноблоттинга было показано, что лептин полностью отсутствует в циркулирующей крови об/об мышей, обнаруживается в крови нормальных животных и в очень большом количестве присутствует в крови другой генетической линии мышей с ожирением db/db [10]. Полученные результаты позволили высказать предположение о блокировании биологического действия лептина у этих животных в результате либо мутаций гена рецептора белка об, либо нарушения других стадий его пострецепторного действия [10], что приводило к гиперпродукции белка об у мышей db/db.

Лептин обнаружен в различных количествах в крови здоровых людей, у которых он циркулирует в виде мономера с молекулярной массой 16 kD и имеет замкнутую внутримолекулярную дисульфидную связь [10]. Эти данные заставляют постулировать отсутствие какой-либо модификации синтезируемого пептида при его секреции в кровь. У мышей лептин циркулирует в крови как в виде мономера, так и в виде полимера, появляющегося в результате образования межмолекулярных дисульфидных связей. В значительном количестве он присутствует не только в крови, но и в жировой ткани db/db мышей, но отсутствует в жировой ткани мышей линии об/об.

Парентеральное и внутривенное введение лептина в течение различных промежутков времени в количестве нескольких мкг на животное в день вызывало повышение

энергетического обмена, увеличение двигательной активности, снижение потребления пищи, уменьшение жировых запасов и снижение веса животных [10-12].

Линия мышей ob/ob, у которых, помимо отмеченных характеристик, наблюдается также значительное повышение содержания инсулина и глюкозы в крови, может служить экспериментальной моделью определенной формы неинсулинзависимого сахарного диабета человека (диабет типа II). Введение лептина мышам линии ob/ob в дозе 0,1 и 1,0 мкг/кг веса приводит к быстрому и резкому снижению содержания инсулина и глюкозы в циркулирующей крови, а в дозе 10 мкг/кг веса тела он снижает содержание инсулина в крови в 6 раз и глюкозы в 4 раза, доводя таким образом их концентрацию практически до нормального уровня [12]. Ни одно из известных соединений не обладает подобной активностью.

Белок ob оказывает свое действие не только на мышей ob/ob, но проявляет также некоторое влияние и на животных без признаков ожирения [12]. У животных с ожирением, вызванным избыточным потреблением жиров, введение лептина также приводит к повышению энергетического обмена, снижению потребления пищи и уменьшению жировых запасов, несмотря на то, что экспрессия и функционирование гена ob у этих животных не нарушены. Эти результаты пока позволяют положительно оценивать перспективы использования лептина в качестве лечебного средства при лечении больных с некоторыми формами ожирения, хотя этот вопрос потребует специального и длительного исследования. Он усложняется тем, что в отличие от мышей ожирение человека является более гетерогенным заболеванием и может иметь разную этиологию.

Интересно, что лептин оказывает свое действие не только при парентеральном и внутривенном введении, но и при введении в латеральный желудочек головного мозга, причем в первом случае его эффективная доза составляет 6 мкг, во втором 3 мкг, а при внутрижелудочковом введении только 1 мкг белка на животное в день [11]. Эти данные позволяют высказать предположение, что одним из органов — мишеней лептина может быть центральная нервная система, через которую гормон осуществляет свое биологическое действие и именно через влияние на ЦНС он вызывает снижение аппетита и уменьшает потребление пищи, повышает энергетический обмен и увеличивает использование жиров в энергетическом обмене. Связь между вентромедиальными ядрами гипоталамуса и потреблением пищи обнаружена уже давно, поскольку повреждение вентромедиальных ядер приводило к увеличению веса тела животных, сопровождавшегося как повышением потребления пищи, так и снижением расхода энергии [13]. Возможно, лептин является важным звеном во взаимодействии жировой ткани, важнейшего депо энергии, с одной стороны, и мозга, с другой, в регуляции энергетического обмена в организме.

Пока остается открытым вопрос о том, каким образом лептин может преодолевать гематоэнцефалический барьер. Некоторые особые свойства лептина позволяют допустить такую возможность, хотя она потребует специальной и тщательной экспериментальной проверки. Гидрофобными свойствами в белке ob обладает только N-концевой сигнальный пептид, который отщеплялся от белка с образованием гидрофильного секреторируемого пептида. Секреторируемый пептид состоит из 145 аминокислотных остатков и имеет внутримолекулярную дисульфидную связь между C-концевым остатком цистеина и цистеином в 117 положении. Ярко выраженные гидрофильные свойства лептина позволяют допустить его способность проникать через гематоэнцефалический барьер так же, как это делает гидрофильная глюкоза, с участием специальных белковых переносчиков (транспортёров глюкозы).

Дальнейшие исследования несомненно покажут, какие органы наиболее активно экспрессируют ген ob и секретируют кодируемый им гормон лептин в кровь и какие органы действительно являются органами-мишенями этого гормона. Если они подтвердят, что наиболее активно лептин секретируется адипоцитами и, следовательно, жировая ткань является эндокринным органом и таким образом регулирует свое собственное состояние, это несомненно будет крупным, важным и интересным открытием в науке. После этого можно будет с уверенностью утверждать, что все другие органы и ткани животных и человека также являются эндокринными и способны секретировать в кровь различные гормоны, которые предстоит еще открыть и которые скорее всего будут пептидными гормонами, поскольку именно пептидные соединения как информационные биополимеры лучше других химических веществ приспособлены к переносу информации в организме, а следовательно и к выполнению регуляторных функций.

Методология исследования желез внутренней секреции во все периоды развития эндокринологии, как правило, включала в себя следующие стадии. Удаление или повреждение эндокринной железы и наблюдение за животными с целью идентификации нарушений обмена веществ и физиологических функций, вызванных отсутствием соответствующей железы, с последующей подсадкой удаленной железы в различные части тела с целью коррективки вызванных нарушений. Вторая стадия состояла из получения экстракта железы и введения его животным с целью приготовления наиболее эффективного препарата, который мог бы имитировать работу эндокринной железы и полностью восстанавливать биологическую функцию, нарушенную ее удалением. Третья стадия включала препаративное выделение действующего начала (гормона) в чистом виде, установление его химической структуры и получение гормона и его аналогов искусственным путем. Четвертая (самая современная) выражалась в изучении структуры генов и кДНК, кодирующих аминокислотные последовательности пептидных гормонов, изучении механизмов экспрессии этих генов, и исследовании механизмов биологического действия гормонов на молекулярном уровне. Совершенно естественно, что такую методологию в полной мере можно было применять только для изучения "маленьких органов". Ее невозможно было использовать для изучения эндокринной функции сердца, печени, легких и других жизненно важных органов, удаление которых было бы несовместимо с поддержанием нормальных процессов жизнедеятельности и приводило бы к быстрой смерти. Ее невозможно было применить также для изучения эндокринной функции мышц, соединительной ткани, жировых депо и других тканей, которые просто технически невозможно было удалить из организма, поэтому возможные их эндокринные функции никем не исследовались.

Результаты исследования гена ожирения показывают, какой должна быть методология исследования эндокринных функций разных органов на современном этапе развития науки. Наряду с использованием других методов, она обязательно должна включать идентификацию генов, которые экспрессируются только в данном органе или ткани и кодируют, а так же регулируют биосинтез специфических для каждого органа белковых гормонов.

Таким образом, в свете последних достижений эндокринология, как наука о специальных эндокринных железах и их патологии, претерпевает коренные изменения и практически исчезает в классическом понимании этого термина, трансформируясь в науку о гормонах — основных регуляторах процессов жизнедеятельности, регуляторах обмена веществ и физиологических функций. Эту интересную мысль постоянно высказывал и подчеркивал в своих выступлениях Н. А. Юдаев [2]. Он вообще рассматривал эндокринологию как науку об общих закономерностях регуляции обмена веществ и физиологических функций и очень надеялся на ее выдвижение в лидирующие специальности среди медико-биологических дисциплин. Однако этим надеждам не суждено было воплотиться в жизнь, и развиваемые им научные положения не получили широкого признания в нашей стране, а содержащееся в них рациональное зерно не нашло для своего развития благодатной почвы. Ему не удалось убедить научную общественность в том, что гормоны действительно являются основными регуляторами жизненных процессов, возможно, потому, что в 60-70-е годы еще не было достаточно веских объективных предпосылок, чтобы такие представления получили широкое признание, и в этом вопросе Ю. А. Юдаев как бы опережал свое время. Во всяком случае, эти представления не получили поддержки в Академии наук СССР и России, где эндокринологию традиционно рассматривали как чисто прикладную медицинскую дисциплину. Они не нашли поддержки и должной оценки в научном обществе эндокринологов России (преобразованном сейчас в Российскую ассоциацию эндокринологов), которое на 90% состоит из практических врачей. Они не получили признания даже в Академии медицинских наук и ее медико-биологическом отделении, в котором традиционно ведущими медико-биологическими специальностями считались и остаются патологическая анатомия, патологическая физиология и смежные с ними дисциплины (несомненно важные и нужные медико-биологические специальности). Уместно напомнить, что в состав медико-биологического отделения РАМН за весь период его существования не было избрано ни одного специалиста по молекулярной биологии на конкурсной основе, что объективно отражает уровень развития этой науки в стране.

В противоположность этому, мировая эндокринология — довольно зрелая наука и, молекулярная эндокринология занимает в ней лидирующие и ключевые позиции, что

подтверждается лидирующим положением молекулярной эндокринологии и в современной мировой молекулярной биологии. Накопленные результаты в молекулярной эндокринологии вместе с достижениями других дисциплин убедительно показывают, что гормоны являются эффективными средствами коммуникации между органами и тканями, объединяют их в единое целое, и именно тонкое взаимодействие ансамблей гормонов создает и поддерживает гармонию в живом организме. Среди гормонов, несомненно, лидирующее положение занимают пептидные гормоны, которые, в соответствии с последними достижениями науки, могут вырабатываться и секретироваться в кровь многими и по всей вероятности всеми органами и тканями. Поэтому поиск и исследование этих гормонов превращается в важную фундаментальную проблему, которая вполне может стать интересным объектом исследования отечественной медико-биологической науки.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Старкова Н.Т. // БМЭ. 1986. Третье издание. Т. 28. С. 176-178.
- 2 Юдаев Н.А., Понов А.П., Федотов В.П. // БМЭ. 1977. Третье издание. Т. 6. С. 352-354.
- 3 Friedman J.M., Leibel P.L. // Cell. 1990. V. 69. P. 217-220.
- 4 Ingalls A.M., Dickie M.M., Snell G.D. // J. Hered. 1950. V. 41. P. 317-318.
- 5 Coleman D.L. // Diabetology. 1973. V. 9. P. 294-300.
- 6 Coleman D.L. // Diabetology. 1978. V. 14. P. 141-148.
- 7 Dickie M.M., Lane P.W. // Mouse News Lett. 1957. V. 17. P. 52.
- 8 Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J.M. // Nature. 1994. V. 352. P. 425-432.
- 9 Church D.M. // Nature Genet. 1994. V. 6. P. 98-105.
- 10 Halaas J.L., Gajiwala K.S., Maffei M., Cohen S.L., Chait B.T., Rabinowitz D., Lallone R.L., Burly S.K., Friedman J.M. // Science. 1995. V. 269. P. 543-546.
- 11 Campfield L.A., Smith F.J., Guesez Y., Devos R., Burn P. // Science. 1995. V. 269. P. 545-549.
- 12 Pellemounter M.A., Cullen M.J., Baker M.B., Hecht R., Winters D., Boone T., Collins F. // Science. 1995. V. 269. P. 540-543.
- 13 Brobeck J.R. // Physiol. Rev. 1946. V. 25. P. 541-559.

#### ALL HUMAN AND ANIMAL ORGANS AND TISSUES ARE ENDOCRINE, AND THEY SECRETE PEPTIDE HORMONES IN BLOOD?

Yu. A. Pankov

National Endocrine Research Center RAMS, Moscow

Endocrinology was born and developed as the science of endocrine glands and the human and animal diseases induced by the gland dysfunctions. The complex of endocrine glands included pituitary, thyroid and parathyroid glands, adrenals, pancreas and gonads. Further, it has been shown that certain brain structures, hypothalamus in particular, are also endocrine organs which secrete in blood a large number of various peptide hormones. Heart secretes in blood the peptide compound natriuretic hormone which regulates the sodium balance. Recent studies have been demonstrated that the adipose tissue cells adipocytes secrete in blood the peptide hormone leptine which stimulates utilization of lipids from the fat deposits in energy metabolism. Leptine is the product of obese (ob) gene which is mainly expressed in white adipose tissue. The first natural compound named "hormone" was the peptide "secretin". It is secreted by not a traditional endocrine gland, but by the duodenal cells, and it controls the exocrine function of the pancreas. The trend allows us to declare that, similarly to adipose tissue, heart and hypothalamus, all other human and animal tissues are probably also endocrine organs and able to secrete in blood the peptide hormones still to be identified, which being informative polymers are better adapted to transmit the information than other chemical compounds, and hence, they are most efficient for regulatory functions.