

DOI: 10.7868/S0869813918060114

**КОЛИЧЕСТВО И ЛОКАЛИЗАЦИЯ СЕРТОНИНОВЫХ  
И ДОФАМИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА ГИПОТАЛАМИЧЕСКИХ  
ПРООПИОМЕЛАНКОРТИН-ИММУНОПОЗИТИВНЫХ НЕЙРОНАХ  
МЫШЕЙ И ИХ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ДИЕТА-ИНДУЦИРОВАННОМ  
И МЕЛАНКОРТИНОВОМ ОЖИРЕНИИ**

© *Е. В. Михайлова, И. В. Романова, К. В. Деркач,  
В. М. Бондарева, А. О. Шпаков*

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург, Россия  
E-mail: mikhailovaelena87@gmail.com

Важную роль в регуляции энергетического обмена играют моноаминергические системы мозга, нарушения в которых вносят вклад в развитие ожирения и других метаболических расстройств. Предполагают, что серотонин и дофамин вовлечены в регуляцию нейронов аркуатных ядер (АРК) гипоталамуса. Однако сведения о содержании серотониновых (5-HT<sub>1B</sub>R) и дофаминовых (DR) рецепторов в нейронах АРК немногочисленны, а данные о влиянии на них ожирения отсутствуют. Цель работы состояла в изучении количества и локализации рецепторов 5-HT<sub>1B</sub>R, 5-HT<sub>2C</sub>R, D<sub>1</sub>R и D<sub>2</sub>R в АРК-нейронах, продуцирующих проопиомеланокортин (ПОМК), у контрольных C57Bl/6J (*a/a*) мышей и мышей с диета-индуцированным (ДИО) и меланокортиновым ожирением (МО). ДИО вызывали высокожировой/высокоуглеводной диетой (9 недель). В качестве модели МО использовали C57Bl/6J (*A<sup>y/a</sup>*) мышей с гиперэкспрессией агути-сигнального пептида, антагониста меланокортиновых рецепторов. У ДИО- и МО-мышей отмечали нарушенную толерантность к глюкозе, гиперинсулинемию, инсулиновую резистентность, гиперлептинемию, дислипидемию. С помощью двойного иммуномечения на ПОМК-нейронах были выявлены рецепторы 5-HT<sub>1B</sub>R, 5-HT<sub>2C</sub>R, D<sub>1</sub>R и D<sub>2</sub>R, причем плотность 5-HT<sub>1B</sub>R была существенно ниже, чем 5-HT<sub>2C</sub>R. У ДИО-мышей снижалось число D<sub>2</sub>R, но содержание других рецепторов существенно не менялось. У МО-мышей снижалось количество D<sub>1</sub>R, а D<sub>2</sub>R, 5-HT<sub>1B</sub>R и 5-HT<sub>2C</sub>R повышалось. В АРК ДИО-мышей экспрессия гена *Drd2* снижалась, а экспрессия гена *Htr2c* повышалась. У МО-мышей отмечали значительное повышение экспрессии генов *Drd2* и *Htr1b*. Таким образом, изучены число и локализация различных типов 5-HT<sub>1B</sub>R и DR на ПОМК-иммунопозитивных нейронах у мышей и выявлены специфичные изменения их содержания в условиях различных типов ожирения.

*Ключевые слова:* дофаминовый рецептор, серотониновый рецептор, проопиомеланокортин, аркуатные ядра гипоталамуса, агути-мышцы.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 6. С. 683—691. 2018

*E. V. Mikhailova, I. V. Romanova, K. V. Derkach, V. M. Bondareva, A. O. Shpakov.* THE NUMBER AND LOCALIZATION OF THE 5-HYDROXYTRYPTAMINE AND DOPAMINE RECEPTORS ON THE HYPOTHALAMIC PROOPIOMELANOCORTIN-IMMUNOPOSITI-

The brain monoaminergic systems have an important role in the regulation of energy metabolism, and the abnormalities in these systems contribute to the development of obesity and other metabolic disorders. It is suggested that the serotonin and dopamine are involved in the regulation of neurons of the hypothalamic arcuate nuclei (ARC). However, information on the content of the 5-hydroxytryptamine (5-HT<sub>1B</sub>R) and dopamine (DR) receptors in ARC neurons is very scarce, and there is no evidence of the effect of obesity on it. The aim of the work was to study the number and localization of 5-HT<sub>1B</sub>R, 5-HT<sub>2C</sub>R, D<sub>1</sub>R and D<sub>2</sub>R in ARC-neurons produced pro-opiomelanocortin (POMC) in control C57Bl/6J (*a/a*) mice and in animals with the diet-induced (DIO) and melanocortin obesity (MO). The DIO was induced by a high-fat/high-carbohydrate diet during 9 weeks. To model MO, the C57Bl/6J (*A<sup>v</sup>/a*) mice with overexpression of agouti-signal peptide, a melanocortin receptor antagonist, were used. The DIO- and MO-mice had the impaired glucose tolerance, hyperinsulinemia, insulin resistance, hyperleptinemia, and dyslipidemia. Using double immunolabeling, the 5-HT<sub>1B</sub>R, 5-HT<sub>2C</sub>R, D<sub>1</sub>R and D<sub>2</sub>R were detected on the POMC neurons, and the density of 5-HT<sub>1B</sub>R was significantly lower than 5-HT<sub>2C</sub>R. In the DIO mice, the number of D<sub>2</sub>R was decreased, but the content of other receptors did not change significantly. In the MO-mice, the number of D<sub>1</sub>R was decreased and the number of 5-HT<sub>2C</sub>R, HT<sub>1B</sub>R and 5-HT<sub>2C</sub>R was increased. In the ARC of the DIO mice, the expression of the *Drd2* gene was reduced, and the expression of the *Htr2c* gene was increased. In the MO-mice, a significant increase in the expression of the *Drd2* and *Htr1b* genes was observed. Thus, the number and localization of different types of 5-HT<sub>1B</sub>R and DR on POMC-immunopositive neurons in mice was studied, and the specific changes in their content in the conditions of different types of obesity were identified.

*Key words:* dopamine receptor, 5-hydroxytryptamine receptor, proopiomelanocortin, hypothalamic arcuate nuclei, agouti-mice.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 6. P. 683—691. 2018

Одним из ключевых компонентов системы регуляции пищевого поведения и энергетического обмена являются интегративные взаимодействия между пептидергическими и моноаминергическими системами гипоталамуса и других отделов мозга. Имеются основания полагать, что важную роль в реализации таких взаимодействий играют серотониновая и дофаминовая системы, функционирующие в гипоталамусе, в том числе в нейронах аркуатных ядер (АРК) гипоталамуса. Так, на экспрессирующих проопиомеланокортин (ПОМК) нейронах АРК локализованы серотониновые рецепторы 2С-подтипа (5-HT<sub>2C</sub>R) [2, 15]. Их связывание с агонистами приводит к активации ПОМК-нейронов, результатом чего является снижение приема пищи, улучшение гомеостаза и нормализация глюкозного метаболизма [6, 10]. В свою очередь нокаут гена *Htr2c* приводит к гиперфагии и ожирению [5]. Несмотря на то что данные о локализации 5-HT<sub>1B</sub>R на ПОМК-нейронах отсутствуют, известно, что они могут частично компенсировать ослабление 5-HT<sub>2C</sub>R-сигнальных путей в условиях фармакологического ингибирования 5-HT<sub>2C</sub>R, а при совместном введении агонистов 5-HT<sub>1B</sub>R и 5-HT<sub>2C</sub>R активирующий эффект 5-HT<sub>2C</sub>R-агонистов на ПОМК-нейроны усиливается [10, 15]. Нами ранее была показана локализация дофаминовых рецепторов 1-го и 2-го типов (D<sub>1</sub>R и D<sub>2</sub>R) на ПОМК-нейронах крыс и мышей [20]. Предполагается, что мезолимбическая дофаминовая система влияет на функциональную активность меланокортиновой системы, локализованной в АРК и паравентрикулярных ядрах гипоталамуса, и через их посредство контролирует пищевое поведение и глюкозный гомеостаз на периферии, но механизмы этих влияний и участие в них чувствительных к дофамину АРК-нейронов не изучены [21]. Известно, что в условиях ожирения, вызванного повышенным потреблением высококалорийной пищи или генетическими причинами, в ЦНС запускаются компенсаторные реакции, направленные на подавление аппетита и нормализацию энергетического обмена. Имеются основания полагать, что в эти механизмы вовлечены серотониновая и

дофаминовая системы гипоталамуса [1, 13, 25, 28], однако доказательства этого отсутствуют.

Цель исследования состояла в сравнительном изучении содержания и локализации 5-HT<sub>1B</sub>R, 5-HT<sub>2C</sub>R, D<sub>1</sub>R и D<sub>2</sub>R в нейронах АРК гипоталамуса, продуцирующих ПОМК, у контрольных C57Bl/6J (*a/a*) мышей и у мышей с диета-индуцированным (ДИО) и меланокортиновым ожирением (МО). Исследование двух типов ожирения было обусловлено необходимостью выяснения того, являются ли вызываемые ими изменения локализации и экспрессии рецепторных компонентов серотониновой и дофаминовой систем в АРК гипоталамуса специфичными, что имеет большое практическое значение для разработки подходов для коррекции и предотвращения различных типов ожирения.

## МЕТОДИКА

Для опытов использовали самок черных C57Bl/6J мышей (генотип *a/a*) и желтых C57Bl/6J мышей (агути) с мутацией в локусе *agouti* (генотип *A<sup>y</sup>/a*), которая приводила к гиперэкспрессии агути-сигнального пептида, ингибирующего меланокортиновые рецепторы (МКР). Мыши C57Bl/6J (*a/a*) были получены из питомника Рапполово (Ленинградская область, Россия), агути-мыши — из вивария Института цитологии и генетики (Новосибирск, Россия). Все эксперименты проводили в полном соответствии с требованиями Этического комитета ИЭФБ РАН, European Communities Council Directive 1986 (2010/63/EEC) и правилами, изложенными в «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals».

Часть 4-месячных мышей C57Bl/6J (*a/a*) переводили на диету, включающую насыщенные жиры (свиное сало) и 30%-ный раствор сахарозы (вместо питьевой воды), которую животные получали в течение 9 недель, в результате чего развивалось ДИО (группа ДИО, *n* = 12). Агути-мыши с МО (А, *n* = 12), как и контрольные животные (К, *n* = 12), находились на стандартной диете. В эксперименте все животные были одинакового возраста. Образцы крови для оценки уровней инсулина и лептина и показателей липидного обмена были взяты из сердца в конце эксперимента под анестезией хлоралгидратом (400 мг/кг). Концентрацию инсулина в крови измеряли с помощью набора «Mouse Insulin ELISA» (Merckodia AB, Швеция), концентрацию лептина — с помощью набора «ELISA Kit for Leptin» (Cloud-Clone Corp., США). Уровни общего холестерина (ОХ) и триглицеридов (ТГ) определяли с помощью колориметрических методов с использованием наборов «Olvex Diagnosticum» (Россия). Уровень глюкозы в крови после ее забора из хвостовой вены оценивали с помощью глюкометра «Life Scan Johnson & Johnson» (Дания) и тест-полосок «One Touch Ultra» (США). Для оценки толерантности к глюкозе использовали глюкозотолерантный тест (ГТТ), для чего мышам вводили глюкозу в дозе 2 г/кг (после 6-часового голодания), измеряли уровень глюкозы через 15, 30, 60 и 120 мин после глюкозной нагрузки и оценивали площадь под кривой «концентрация глюкозы (мМ)—время (мин)» (AUC<sub>0–120</sub>), как описано ранее [7]. После декапитации мышей под наркозом из мозга выделяли ткани гипоталамуса для проведения ПЦР.

Для иммуногистохимического анализа мышей анестезировали хлоралгидратом, последовательно перфузировали 0.1 М фосфатным буфером (PBS, pH 7.4), содержащим 0.9 % NaCl, и раствором 4%-ного параформальдегида в 0.2 М PBS. После перфузии мозг извлекали, дофиксировали в том же растворе 4%-ного параформальдегида в течение ночи (4 °С), промывали 0.02 М PBS, выдерживали в 30%-ном растворе сахарозы в PBS (48 ч) и замораживали, как описано ранее [20]. Фронтальные срезы мозга приготавливали на криостате «Leika Microsystems» (Германия). Для иммунохимического анализа использовались срезы АРК толщиной 12 микрон, монтированные на стеклах «Super frost/Plus» (Германия). После промывки 0.02 М PBS, содержащим 0.1 % Triton X-100 (PBS/Triton), срезы обра-

батывали сывороткой (3 % сыворотки козы и 2 % БСА) в PBS/Triton (1 ч, 22 °C). Для двойного иммуномечения срезы инкубировали (48 ч, 4 °C) в смеси первичных антител мыши к ПОМК (разведение 1:1000, Abcam, Англия) и кролика к D<sub>1</sub>R (1:200, Abcam, Англия), или кролика к D<sub>2</sub>R (1:200, Chemicon International, США), или кролика к 5-HT<sub>1B</sub>R (1:100, USBiological, США), или кролика к 5-HT<sub>2C</sub>R (1:100, Elabscience, США). После промывки в PBS срезы инкубировали (1 ч, 22 °C) в темноте в смеси, содержащей вторичные конъюгированные с флуорохромом антитела (Invitrogen, США, 1:1000): куриные против кролика (Alexa-488) и ослиные против мыши (Alexa-568). Для изучения флуоресценции использовали конфокальный лазерный сканирующий микроскоп «TCS SP5 II» (Leica Microsystems, Германия) с объективом х63, программой «Leisa LAS AF» и программное обеспечение «Adobe Photoshop» (Adobe, США). Из каждого мозга сканировали по 10—12 срезов АРК в ростокаудальном направлении. Интенсивность флуоресценции ПОМК и рецепторов на ПОМК-нейронах анализировали после нормализации соответствующего фона на изображении.

Для проведения ПЦР тотальную РНК выделяли из гипоталамических структур мышей, используя наборы «РИБО-золь-В» (Россия), и образцы, содержащие 1 мкг РНК, обратно транскрибировали с помощью набора «RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit» (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Амплификацию проводили в смеси (25 мкл), содержащей 10 нг ПЦР-продукта, 0,4 мкМ прямого и обратного праймеров, qPCRmix-HS SYBR+LowROX (Евроген, Россия). Амплификационный сигнал детектировали с помощью прибора «7500 Real-Time PCR System» (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., США). Экспрессию генов для рецепторов оценивали с помощью следующих праймеров: *Htr1b* — GCTGGACTGCTTTGTGAACACCGA (For) и AATGGAGGTGACCGAGGATGTGGA (Rev), *Htr2c* — TCACGAACACTTTGCTTTCG (For) и GTTCAATTCCGCGACTAAGG, *Drd1* — GTAGCCATTATGATCGTCAC (For) и GATCAGACAGTGTCTTCAG (Rev), *Drd2* — CTGGAGAGGCAGAACTGGAG (For) и TAGACGACCCAGGGCATAAC (Rev). В качестве контроля использовали ген для гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы и 18S-рибосомальную РНК. Данные рассчитывали с использованием метода delta-delta C<sub>t</sub> и выражали как изменение экспрессии гена по отношению к таковой в контроле.

Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения «GraphPad Prism 7» (GraphPad Software, США). Оценку нормальности распределения данных проводили с помощью теста D'Agostino—Pearson. В случае нормального распределения ( $\alpha = 0.05$ ) различия между группами оценивали с помощью непарного *t*-теста и рассматривали как статистически значимые при  $p < 0.05$ . Данные представлены как  $M \pm SEM$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У мышей с ДИО и МО отмечали повышение массы тела и жировой ткани, повышение уровней глюкозы, инсулина, лептина, ОХ и ТГ. Наряду с этим отмечали нарушение толерантности к глюкозе, на что указывает повышение уровня глюкозы через 120 мин после глюкозной нагрузки и значений AUC<sub>0–120</sub> для концентрационных глюкозных кривых в ГТТ у ДИО- и МО-мышей в сравнении с контролем (табл. 1). Метаболические и гормональные нарушения у агути-мышей были выражены в большей степени, чем у ДИО-мышей, за исключением показателей липидного обмена. Так, масса жировой ткани у агути-мышей была в 12 раз выше, чем в контроле, в то время как у ДИО-мышей она превышала контрольные значения только в 2 раза. Доля жировой ткани у контрольных, ДИО и МО-мышей составила 1,5, 2,6 и 9,4 % соответственно. У агути-мышей в гораздо большей степени, чем у ДИО-мышей, были выражены гиперлептинемия и гиперинсулинемия. Так, уровень лептина у агути-мышей повышался в сравнении с конт-

Т а б л и ц а 1

Масса тела, жировой ткани, уровни глюкозы, гормонов и липидов, а также уровни глюкозы через 120 мин после нагрузки и значения  $AUC_{0-120}$  в ГТТ у мышей с ДИО и МО в сравнении с контрольными животными

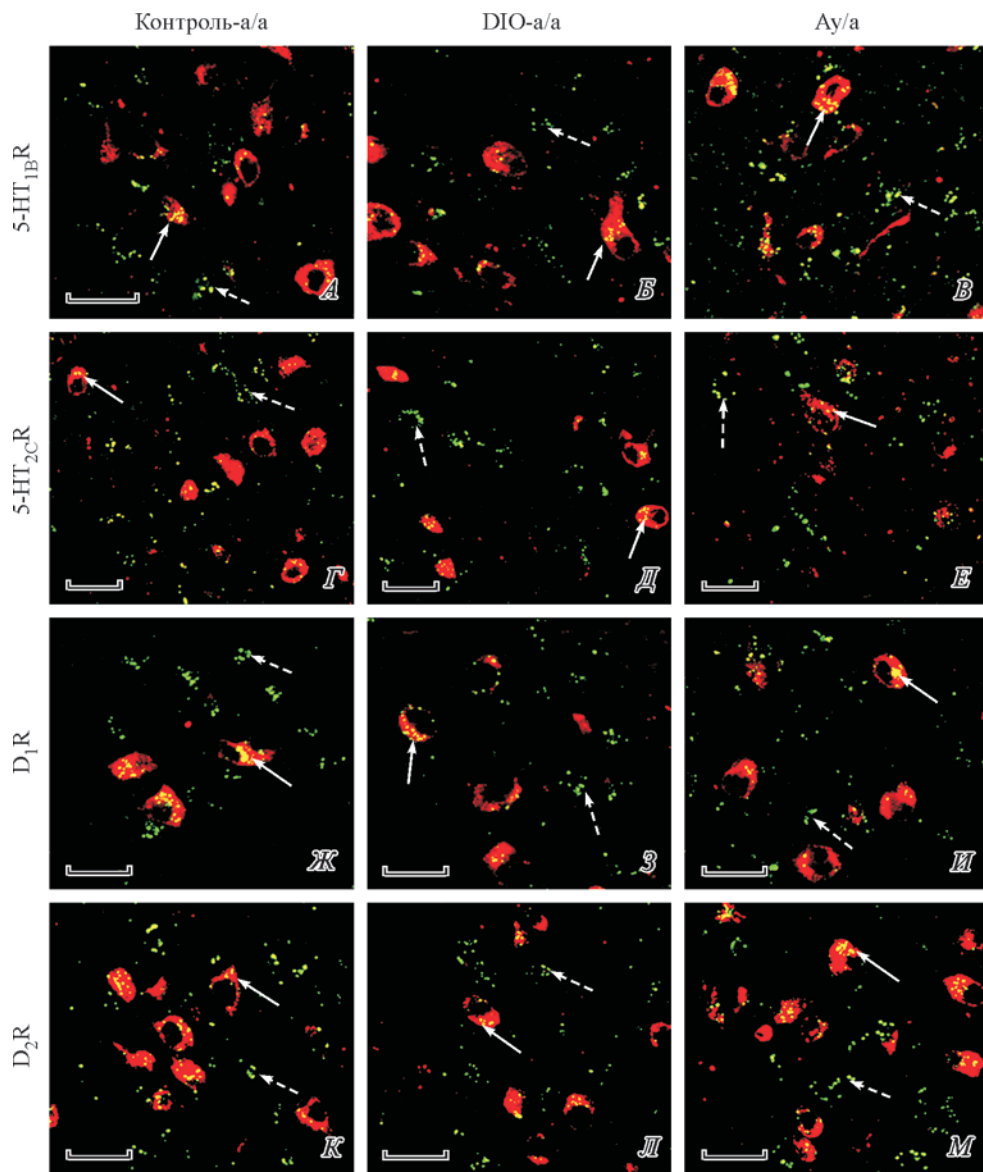
Показатель	Контроль, C57Bl/6J (a/a) мыши	ДИО-мыши	Агути-мыши C57Bl/6J (A <sup>y</sup> /a)
Масса тела, г	20.2 ± 0.4	24.1 ± 0.5*	37.9 ± 0.7*
Масса жировой ткани, г	0.30 ± 0.02	0.63 ± 0.06*	3.56 ± 0.18*
Глюкоза, mM	4.9 ± 0.3	6.5 ± 0.3*	10.1 ± 0.6*
ГТТ, глюкоза (120 мин), mM	5.1 ± 0.4	6.9 ± 0.4*	12.2 ± 0.7*
ГТТ, $AUC_{0-120}$	921 ± 28	1197 ± 52*	2447 ± 144*
Инсулин, нг/мл	0.32 ± 0.03	0.48 ± 0.04*	1.02 ± 0.09*
Лептин, нг/мл	1.24 ± 0.10	2.29 ± 0.21*	13.61 ± 0.74*
Триглицериды, мг/дл	2.02 ± 0.08	2.97 ± 0.12*	2.89 ± 0.11*
Общий холестерин, мг/дл	4.11 ± 0.14	5.23 ± 0.23*	5.02 ± 0.18*

Примечание (здесь и в табл. 2). Все значения представлены как  $M \pm SEM$ . \* Различия между контрольными мышами и животными с ожирением статистически значимы при  $p < 0.05$ .

ролем и ДИО-мышами в 11 и 6 раз, а уровень инсулина — на 219 и 113 % соответственно (табл. 1).

Полученные данные свидетельствуют о нарушении энергетического обмена и периферической чувствительности к лептину и инсулину у мышей с ожирением, вызванным как длительным потреблением высококалорийной пищи, так и нарушением меланокортиновой сигнализации. В случае ДИО известно, что развитие лептиновой и инсулиновой резистентности приводит к нарушению транспорта лептина и инсулина через гематоэнцефалический барьер к гипоталамическим нейронам, основным мишеням их действия [3, 4]. Следствием этого является ослабление лептиновой и инсулиновой сигнализации в гипоталамусе, что снижает регуляторные эффекты лептина и инсулина на расход энергии, углеводный и липидный обмен [23]. Результатом этого является возрастание доли жировой ткани и усугубление дислипидемии и гипергликемии, что и было выявлено нами у ДИО-мышей. В случае МО основным фактором, ведущим к метаболическим и гормональным дисфункциям, является ослабление меланокортиновых сигнальных путей в гипоталамусе, реализуемых через МКР 4-го типа. Это связано с гиперпродукцией агути-сигнального пептида, эндогенного антагониста этих рецепторов, у агути-мышей вследствие мутации в *Agouti*-локусе [11, 14]. Имеются экспериментальные свидетельства того, что гипоталамические МКР 4-го типа играют исключительно важную роль в контроле энергетического баланса [16, 24]. Нокаут гена, кодирующего МКР 4-го типа, а также фармакологическое или аутоиммунное ингибирование МКР 4-го типа приводят к гиперфагии, ожирению, дислипидемии, нарушенной толерантности к глюкозе, инсулиновой и лептиновой резистентности [9, 16, 17, 26]. К такому же результату приводят и мутации в гене, кодирующем МКР 4-го типа у людей, о чем свидетельствует высокая частота обнаружения таких мутаций у пациентов с ожирением и метаболическим синдромом [18, 27].

На следующем этапе исследований с помощью двойного иммуноочечения были изучены количество и локализация 5-НТ<sub>1B</sub>R, 5-НТ<sub>2C</sub>R, D<sub>1</sub>R и D<sub>2</sub>R на ПОМК-иммунопозитивных нейронах АРК гипоталамуса у контрольных мышей, и показано, что все эти рецепторы на них присутствуют, хотя и в различных количествах (см. рисунок). Так, содержание 5-НТ<sub>2C</sub>R на ПОМК-нейронах было существенно больше, чем 5-НТ<sub>1B</sub>R. При этом 5-НТ<sub>2C</sub>R были выявлены как в телах, так и в отростках ПОМК-нейронов, в то время как 5-НТ<sub>1B</sub>R располагались, в основ-



Локализация 5-HT<sub>1B</sub>R, 5-HT<sub>2C</sub>R, D<sub>1</sub>R и D<sub>2</sub>R в ПОМК-иммунопозитивных нейронах аркуатного ядра гипоталамуса контрольных, ДИО- и МО-мышей.

Двойная иммуногистохимическая реакция к ПОМК (Алеха-488) и 5-HT<sub>1B</sub>R (А, Б, В), 5-HT<sub>2C</sub>R (Г, Д, Е), D<sub>1</sub>R (Ж, З, И) или D<sub>2</sub>R (К, Л, М) у контрольных мышей (А, Г, Ж, К), ДИО-мышей (Б, Д, З, Л) и агути-мышей (В, Е, И, М). Сплошные стрелки указывают на места локализации рецептора в ПОМК-иммунопозитивных нейронах, прерывистые — на локализацию рецепторов в нейронах другой эргичности. Масштаб: 20 мкм.

ном, в отростках. Обнаружено также, что доля 5-HT<sub>1B</sub>R на нейронах, в которых ПОМК не экспрессируется, была выше, чем доля этих рецепторов на ПОМК-иммунопозитивных нейронах, в то время как в случае 5-HT<sub>2C</sub>R такой закономерности выявлено не было. Эти данные хорошо согласуются с тем фактом, что 5-HT<sub>2C</sub>R играют определяющую роль в активации ПОМК-нейронов серотонином, в то время как 5-HT<sub>1B</sub>R осуществляют модулирующее влияние серотонина

Т а б л и ц а 2

Плотность 5-HT<sub>1B</sub>R, 5-HT<sub>2C</sub>R, D<sub>1</sub>R и D<sub>2</sub>R на ПОМК-иммунопозитивных АРК-нейронах и экспрессия генов, кодирующих эти рецепторы, в АРК гипоталамуса контрольных мышей и животных с ДИО и МО

Рецептор или его ген	Контроль, C57Bl/6J (a/a) мыши	ДИО-мыши	Агути-мыши C57Bl/6J (A <sup>y</sup> /a)
Нормализованная оптическая плотность по данным иммуномечения (усл. ед.)			
5-HT <sub>1B</sub> R	1.00 ± 0.03	1.08 ± 0.09	1.43 ± 0.05*
5-HT <sub>2C</sub> R	1.00 ± 0.05	1.18 ± 0.03*	1.72 ± 0.11*
D <sub>1</sub> R	1.00 ± 0.03	0.95 ± 0.03	0.79 ± 0.05*
D <sub>2</sub> R	1.00 ± 0.04	1.01 ± 0.03	1.32 ± 0.03*
Нормализованный уровень экспрессии мРНК целевых генов (отн. ед., RQ)			
<i>Htr1b</i>	1.00 ± 0.06	1.02 ± 0.03	1.92 ± 0.08*
<i>Htr2c</i>	1.00 ± 0.04	1.74 ± 0.09*	1.21 ± 0.05*
<i>Drd1</i>	1.00 ± 0.09	0.83 ± 0.07	0.77 ± 0.04*
<i>Drd2</i>	1.00 ± 0.13	0.47 ± 0.05*	2.34 ± 0.16*

на этот эффект, и только в условиях подавления активности 5-HT<sub>2C</sub>R в АРК гипоталамуса 5-HT<sub>1B</sub>R могут частично компенсировать их функции [6, 10, 15]. Механизмы такой компенсации не до конца ясны, поскольку могут включать как непосредственное воздействие серотонина на ПОМК-нейроны через локализованные на них 5-HT<sub>1B</sub>R, так и опосредованное влияние серотонина на эти нейроны через регуляцию 5-HT<sub>1B</sub>R, локализованных на нейронах другой эргичности. Обнаружено, что локализация значительной части D<sub>1</sub>R и D<sub>2</sub>R на ПОМК-нейронах совпадает, что может быть обусловлено образованием D<sub>1</sub>R/D<sub>2</sub>R-гетеродимерных комплексов. Следует отметить, что сигнальные характеристики таких комплексов существенно отличаются от гомодимерных комплексов DR, поскольку активированные комплексы D<sub>1</sub>R/D<sub>2</sub>R способны стимулировать 3-фосфоинозитидные и кальций-зависимые пути [12, 19], которые в ПОМК-нейронах являются мишенями также для лептина и инсулина.

В условиях ДИО число и распределение 5-HT<sub>1B</sub>R, D<sub>1</sub>R и D<sub>2</sub>R на ПОМК-нейронах существенно не менялось, в то время как число 5-HT<sub>2C</sub>R возрастало, хотя и в небольшой степени (см. рисунок; табл. 2). Повышение числа 5-HT<sub>2C</sub>R на ПОМК-нейронах хорошо коррелировало с повышением экспрессии гена *Htr2c* в АРК гипоталамуса ДИО-мышей, как было продемонстрировано с помощью ПЦР (табл. 2). Необходимо отметить, что у ДИО-мышей экспрессия гена *Drd2* при этом снижалась в 2 раза, хотя число D<sub>2</sub>R на ПОМК-нейронах не менялось. Можно предположить, что это обусловлено снижением экспрессии D<sub>2</sub>R на нейронах другой эргичности. У агути-мышей отмечали иную картину. Содержание 5-HT<sub>1B</sub>R, 5-HT<sub>2C</sub>R и D<sub>2</sub>R на ПОМК-нейронах возрастало, в то время как число D<sub>1</sub>R, напротив, снижалось (см. рисунок). Данные ПЦР также выявили значительное повышение экспрессии генов *Drd2* и *Htr1b* и снижение экспрессии гена *Drd1* в АРК гипоталамуса агути-мышей (табл. 2). Экспрессия гена *Htr2c* в этом случае повышалась в небольшой степени, что может быть обусловлено нейрон-специфичными изменениями в экспрессии 5-HT<sub>2C</sub>R в условиях МО.

Основываясь на полученных результатах, можно сделать следующие выводы. В условиях ожирения различной этиологии в ПОМК-нейронах повышается содержание 5-HT<sub>2C</sub>R, что с учетом роли этих рецепторов в активации серотонином ПОМК-нейронов может рассматриваться как один из важнейших компенсаторных механизмов, направленных на нормализацию пищевого поведения и энергетического баланса. У агути-мышей как на ПОМК-нейронах, так и в других

АРК-нейронах отмечали значительное повышение соотношения  $D_2R/D_1R$ , что свидетельствует об усилении  $D_2R$ -зависимых сигнальных путей. Это может иметь большое значение для усиления гипоталамических  $D_2R$ -путей, которые вовлечены в снижение активности дофаминовых сигнальных путей, гиперактивированных в условиях метаболических расстройств. В последние годы показано, что  $D_2R$ -агонист бромокриптин оказывает выраженный терапевтический эффект при лечении ожирения и метаболического синдрома как в клинике, так и в экспериментальных условиях [8, 22]. Не исключено, что важный вклад в это вносит вызываемая бромокриптином стимуляция  $D_2R$  в АРК гипоталамуса, в первую очередь в нейронах, экспрессирующих ПОМК. Полученные данные позволяют прийти к заключению о том, что изменения серотониновой и дофаминовой сигнализации в ПОМК-нейронах существенно зависят от типа ожирения и факторов, которые являются его ключевыми причинами. Следовательно, терапевтические подходы и мишени фармакологических препаратов при лечении ДИО и генетически обусловленных форм ожирения, в том числе связанных с ослаблением меланокортиновой системы, также должны различаться. Это свидетельствует о важном практическом значении изучения молекулярных изменений гормональной сигнализации, в том числе серотониновой и дофаминовой, в ПОМК-экспрессирующих нейронах в условиях ожирения и других метаболических расстройств.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 16-15-10388) с использованием оборудования ЦКП ИЭФБ РАН.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Деркач К. В., Романова И. В., Шпаков А. О. Функциональное взаимодействие между дофаминовой и меланокортиновой системами мозга. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 102 (12): 1393—1405. 2016.
- [2] Arai T., Maejima Y., Muroya S., Yada T. Rikkunshito and isoliquritigenin counteract 5-HT-induced 2C receptor-mediated activation of pro-opiomelanocortin neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Neuropeptides*. 47 (4): 225—230. 2013.
- [3] Banks W. A., Farrell C. L. Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity is acquired and reversible. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285 (1): E10—E15. 2003.
- [4] Banks W. A., Owen J. B., Erickson M. A. Insulin in the brain: there and back again. *Pharmacol. Ther.* 136 (1): 82—93. 2012.
- [5] Berghlund E. D., Liu C., Sohn J. W., Liu T., Kim M. H., Lee C. E., Vianna C. R., Williams K. W., Xu Y., Elmquist J. K. Serotonin 2C receptors in pro-opiomelanocortin neurons regulate energy and glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* 123 (12): 5061—5070. 2013.
- [6] Burke L. K., Doslikova B., D'Agostino G., Garfield A. S., Farooq G., Burdakov D., Low M. J., Rubinstein M., Evans M. L., Billups B., Heisler L. K. 5-HT obesity medication efficacy via POMC activation is maintained during aging. *Endocrinology*. 155 (10): 3732—3738. 2014.
- [7] 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. *Int. J. Endocrinol.* 2015: 245459. 2015.
- [8] Derkach K. V., Ivantsov A. O., Sukhov I. B., Shpakov A. O. Restoration of hypothalamic signaling systems as a cause of improved metabolic parameters in rats with neonatal diabetes model during treatment with bromocryptine mesylate. *Cell Tissue Biol.* 11 (3): 234—241. 2017.
- [9] Derkach K. V., Shpakova E. A., Zharova O. A., Shpakov A. O. The metabolic changes in rats immunized with BSA conjugate of peptide derived from the N-terminal region of type 4 melanocortin receptor. *Dokl. Biochem. Biophys.* 458: 163—166. 2014.
- [10] Doslikova B., Garfield A. S., Shaw J., Evans M. L., Burdakov D., Billups B., Heisler L. K. 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist anorectic efficacy potentiated by 5-HT<sub>1B</sub> receptor agonist coapplication: an effect mediated via increased proportion of pro-opiomelanocortin neurons activated. *J. Neurosci.* 33 (23): 9800—9804. 2013.



[11] Ebihara K., Ogawa Y., Katsuura G., Numata Y., Masuzaki H., Satoh N., Tamaki M., Yoshioka T., Hayase M., Matsuoka N., Aizawa-Abe M., Yoshimasa Y., Nakao K. Involvement of agouti-related protein, an endogenous antagonist of hypothalamic melanocortin receptor, in leptin action. *Diabetes*. 48: 2028—2033. 1999.

[12] Franco R., Martínez-Pinilla E., Lanciego J. L., Navarro G. Basic pharmacological and structural evidence for Class A G-protein-coupled receptor heteromerization. *Front. Pharmacol.* 7: 76. 2016.

[13] Heisler L. K., Jobst E. E., Sutton G. M., Zhou L., Borok E., Thornton-Jones Z., Liu H. Y., Zigman J. M., Balthasar N., Kishi T. Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake. *Neuron*. 51: 239—249. 2006.

[14] Makarova E. N., Yakovleva T. V., Shevchenko A. Y., Bazhan N. M. Pregnancy and lactation have anti-obesity and anti-diabetic effects in *Av/a* mice. *Acta Physiol. (Ox. f.)* 198 (2): 169—177. 2010.

[15] Martin-Gronert M. S., Stocker C. J., Wargent E. T., Cripps R. L., Garfield A. S., Jovanovic Z., D'Agostino G., Yeo G. S., Cawthorne M. A., Arch J. R., Heisler L. K., Ozanne S. E. 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors as hypothalamic targets of developmental programming in male rats. *Dis. Model Mech.* 9 (4): 401—412. 2016.

[16] Nogueiras R., Wiedmer P., Perez-Tilve D., Veyrat-Durebex C., Keogh J. M., Sutton G. M., Pfluger P. T., Castaneda T. R., Neschen S., Hofmann S. M. The central melanocortin system directly controls peripheral lipid metabolism. *J. Clin. Invest.* 117: 3475—3488. 2007.

[17] Obici S., Feng Z., Tan J., Liu L., Karkanias G., Rossetti L. Central melanocortin receptors regulate insulin action. *J. Clin. Invest.* 108: 1079—1085. 2001.

[18] Pan Q., Delahanty L. M., Jablonski K. A., Knowler W. C., Kahn S. E., Florez J. C., Franks P. W. Variation at the melanocortin 4 receptor gene and response to weight-loss interventions in the diabetes prevention program. *Obesity*. 21: 520—526. 2013.

[19] Perreault M. L., Shen M. Y., Fan T., George S. R. Regulation of c-fos expression by the dopamine D1-D2 receptor heteromer. *Neuroscience*. 285: 194—203. 2015.

[20] Romanova I. V., Mikhrina A. L., Shpakov A. O. Localization of the dopamine receptors of types 1 and 2 on the bodies of POMC-expressing neurons of the arcuate nucleus of the hypothalamus in mice and rats. *Dokl. Biol. Sci.* 472 (1): 11—14. 2017.

[21] Roseberry A. G., Stuhrman K., Dunigan A. I. Regulation of the mesocorticolimbic and mesostriatal dopamine systems by  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone and agouti-related protein. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 56: 15—25. 2015.

[22] Scranton R., Cincotta A. Bromocriptine — unique formulation of a dopamine agonist for the treatment of type 2 diabetes. *Exp. Opin. Pharmacother.* 11: 269—279. 2010.

[23] Shpakov A. O. The brain leptin signaling system and its functional state in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 52 (3): 177—195. 2016.

[24] Shpakov A. O., Derkach K. V. The melanocortin signal system of the hypothalamus and its functional state in type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome. *Neurosci. Behav. Physiol.* 47 (5): 495—507. 2017.

[25] Shpakov A. O., Derkach K. V., Berstein L. M. Brain signaling systems in the type 2 diabetes and metabolic syndrome: promising target to treat and prevent these diseases. *Future Sci. Open.* 1(3): FSO25. 2015.

[26] Shpakov A. O., Derkach K. V., Zharova O. A., Shpakova E. A. The functional activity of the adenylyl cyclase system in the brain of rats with metabolic syndrome that induced by immunization with the 11—25 peptide of the melanocortin receptor of the fourth type. *Neurochem. J.* 9 (1): 29—38. 2015.

[27] Tao Y. X. Mutations in melanocortin-4 receptor and human obesity. *Progr. Mol. Biol. Transl. Sci.* 88: 173—204. 2009.

[28] Volkow N. D., Wang G. J., Baler R. D. Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity. *Trends Cogn. Sci.* 15: 37—46. 2011.

Поступила 23 IV 2018