

ВЛИЯНИЕ ВВЕДЕНИЯ БЛОКАТОРОВ УГЛЕВОДНОГО И ЛИПИДНОГО ОБМЕНА НА ЭКСПРЕССИЮ МРНК НЕКОТОРЫХ НЕЙРОПЕПТИДОВ ГИПОТАЛАМУСА

В.Г.Сергеев, И.Г.Акмаев

Институт экспериментальной эндокринологии (рук. — акад. РАМН проф. И.Г.Акмаев) эндокринологического научного центра РАМН

Для выяснения роли нейропептида Y, проопиомеланокортина и меланинконцентрирующего гормона в механизмах пищевого поведения, вызываемого снижением уровней доступных жирных кислот и глюкозы в организме, методом гибридизации *in situ* исследовали действие однократного введения 2-деоксиглюкозы или 2-меркаптоацетата на уровни экспрессии мРНК исследованных нейропептидов в гипоталамусе крыс. Уровни мРНК нейропептида Y в нейронах аркуатных ядер достоверно увеличиваются в условиях недостатка доступной для тканей организма глюкозы, тогда как синтез меланинконцентрирующего гормона в нейронах латеральной гипоталамической области повышается также при дефиците доступных жирных кислот. Эти данные свидетельствуют о том, что глико- и липодепривация являются разными метаболическими сигналами, активирующими различные нейропептидные звенья системы мозга, контролирующей пищевое поведение.

Ключевые слова: гипоталамус, нейропептиды, пищевое поведение, антиметаболиты

Введение животным 2-деоксиглюкозы (2-ДГ) или 2-меркаптоацетата (МА) — селективных блокаторов углеводного и липидного обмена соответственно — приводит к значительному увеличению потребления пищи [7]. Эти данные легли в основу гипотезы о том, что периферические сигналы об уровнях глюкозы и жирных кислот регулируют активность областей мозга, вовлеченных в контроль пищевого поведения [4].

Гипоталамус играет центральную роль в интеграции метаболических сигналов. Целый ряд гипоталамических нейропептидов, выявленных в недавнее время, таких как нейропептид Y (НП-Y), производные проопиомеланокортина (ПОМК) и меланинконцентрирующий гормон (МКГ) вовлечены в механизмы регуляции пищевого поведения. НП-Y принадлежит к семейству панкреатических полипептидов, и его хроническое введение в желудочки мозга приводит к гиперфагии и увеличению массы тела [11,13]. Экспрессия мРНК НП-Y и концентрация пептида в аркуатных ядрах гипоталамуса значительно возрастают

в период голодания; аналогичная картина наблюдается у животных с генетическим ожирением [5,6]. Получены данные о том, что утилизация глюкозы является важным сигналом для продукции НП-Y в гипоталамусе [1]. Производное ПОМК — α -меланоцитстимулирующий гормон — снижает потребление пищи, активируя центральные меланокортиновые рецепторы [8]. Данные исследований МКГ в нейронах латеральной гипоталамической области также свидетельствуют об их вовлеченности в контроль энергетического баланса и пищевого поведения. Обнаружено, в частности, что уровни мРНК МКГ увеличиваются во время голодания, а введение этого пептида в желудочки мозга стимулирует потребление пищи [9,10]. Приведенные данные о регуляторной роли нейропептидов в механизмах пищевого поведения позволяют предположить, что по крайней мере некоторые из них могут осуществлять свою функцию посредством мониторинга утилизации жирных кислот и глюкозы в организме.

Для выяснения роли перечисленных нейропептидов в механизмах пищевого поведения, вызываемого снижением уровней доступных жир-

ных кислот и глюкозы в организме, мы изучили действие однократного введения 2-ДГ или МА на потребление пищи и уровни экспрессии мРНК НП-У, ПОМК и МКГ в гипоталамусе крыс.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В эксперименте использованы 16 крыс-самцов линии Sprague-Dawley массой 300-350 г. Животные содержались в условиях стандартного светового дня (включение света в 6.00 ч, выключение — в 18.00 ч) при постоянной температуре (22°C) со свободным доступом к воде и пище. Опыт проводили в дневное время (12.00-15.00 ч), когда грызуны проявляют низкую активность пищевого потребления. Массу сухого корма измеряли до и после опыта. Крысам экспериментальных групп (по 4 животных в каждой) интраперитонеально инъецировали 2-ДГ ("Sigma", 60 мг/кг в 1 мл физраствора) или МА ("Sigma", 600 мкмоль/кг в 1 мл физраствора). Крысам контрольной группы ($n=8$) вводили 1 мл физиологического раствора. Через 3 ч после введения растворов животных декапитировали, извлекали мозг и быстро замораживали для дальнейшего исследования методом гибридизации *in situ*. Криостатные срезы гипоталамуса крыс толщиной 14 мкм монтировали на предметные стекла ("Fisher Sci"), высушивали и инкубировали в течение 16 ч при 42°C в радиоактивно-меченном зонде, комплементарном нуклеотидам 1297-1344 для мРНК НП-У, 1-33 мРНК ПОМК и 479-527 мРНК МКГ ("Scandinavian Gene Synthesis"). Зонды разводили в гибридизационном растворе, содержащем

50% формамида, 0.015 М цитратного буфера, 0.02% БСА, 0.02% фикола, 0.02% поливинилпирролидона, 1% N-лауролсаркозина, 10% декстрана, 500 мг/л денатурированной ДНК семенных лососей и 200 мМ дитиотрейтола. После гибридизации срезы в течение 1 ч отмывали в цитратном буфере при 55°C, высушивали на воздухе и покрывали эмульсией ("Ulford"). После экспозиции, время которой для разных пептидов составило от нескольких дней до 6 нед, стекла со срезами проявляли ("Kodak"), фиксировали в растворе "Kodak 3000", окрашивали толuidиновым голубым и подсчитывали количество гранул серебра над мечеными клетками в микроскопе "Nikon Microphot-FX", оснащенном темнопольным конденсором. Меченой клетку считали в случае пятикратного превышения количества гранул над ней по сравнению с фоном. Всего подсчитывали не менее 200 клеток со срезов гипоталамуса каждого животного. Статистический анализ полученных данных проводили при помощи *t* критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Через 3 ч после введения 2-ДГ или МА масса потребленного корма животными достоверно ($p<0.01$) превышала таковую в контрольной группе (рис. 1, а).

Авторадиографическая метка, соответствующая мРНК НП-У, обнаруживалась в нейронах медиального отдела аркуатных ядер (рис. 2, а). Нейроны, экспрессирующие мРНК ПОМК, локализовались в вентролатеральном отделе ар-

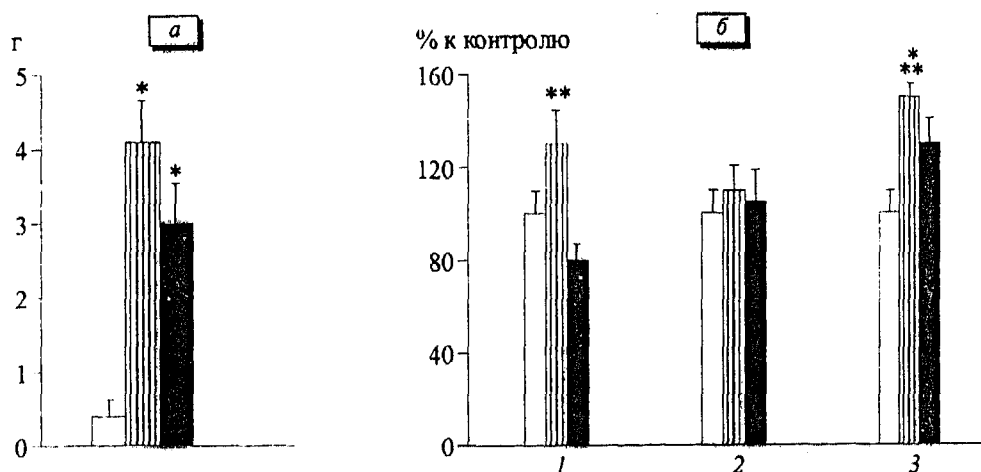


Рис. 1. Влияние 2-деоксиглюкозы (заштрихованные столбики) и 2-меркаптоацетата (темные столбики) на пищевое потребление через 3 ч после интраперитонеального введения (а) и на уровень экспрессии мРНК нейропептидов (б) в нейронах гипоталамуса крыс.

По осям ординат — масса потребленного корма (а) и среднее число гранул серебра над клеткой (б).

1 — нейропептид У, 2 — проопиомеланокортин, 3 — меланинконцентрирующий гормон.

* $p<0.01$, ** $p<0.05$ по сравнению с контролем (светлые столбики)

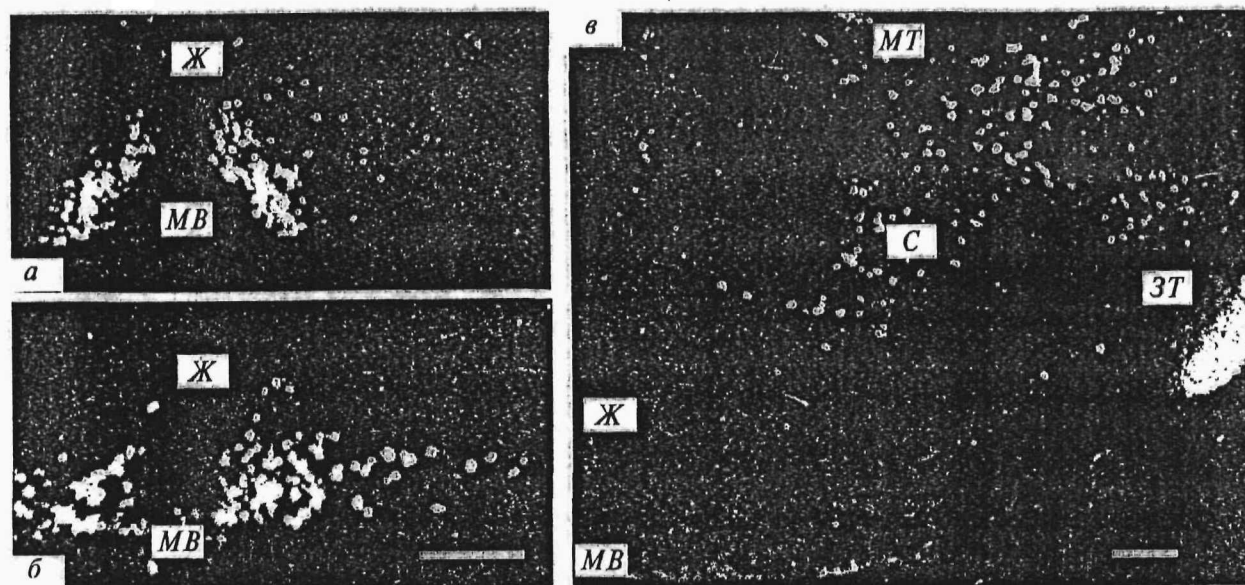


Рис. 2. Локализация нейронов, экспрессирующих мРНК нейропептида Y (а), проопиомеланокортина (б) и меланинконцентрирующего гормона (в) в гипоталамусе крыс. Фотографии в темном поле.

Ж — III желудочек, МВ — медиальный выступ, С — свод, МТ — маммилоталамический тракт, ЗТ — зрительный тракт. Длина линии 200 мкм.

куатных ядер и периакуатной медиобазальной гипоталамической области (рис. 2, б). Гибридизационный сигнал, соответствующий мРНК МКГ, отмечался в нейронах латеральной гипоталамической области и *zona incerta* (рис. 2, в). Подсчет гранул серебра над нейронами показал, что введение 2-ДГ вызывает рост экспрессии мРНК НП-У и МКГ (на 28.4 и 48.2% соответственно), тогда как инъекция МА вызывает увеличение автордиографического мечения только в нейронах, синтезирующих МКГ на 30.1% (рис. 1, б).

Обнаруженное усиление синтеза мРНК НП-У в нейронах аркуатных ядер в случае блокирования метаболизма углеводов и отсутствие выраженной реакции после введения липидного антиметаболита могут отражать избирательную вовлеченность этого пептида в регуляцию углеводного обмена. Об этой возможности свидетельствует тот факт, что введение НП-У в желудочки мозга стимулирует потребление животными корма, богатого углеводами [11]. Полученные данные об избирательной активации НП-У в условиях блокады углеводного обмена подтверждают предположение о том, что дефицит доступных глюкозы и жирных кислот стимулирует пищевое потребление посредством активации различных нейрональных путей и нейропептидергических систем [3]. Галанинергические нейроны роstralного отдела паравентрикулярных ядер гипоталамуса, синтетическая активность которых, по данным литературы, при вве-

дении МА снижается, могут представлять нейропептидергическую систему мозга, реактивную к дефициту жирных кислот в организме [12].

Обнаруженное в нашем опыте повышение уровня экспрессии мРНК МКГ как в случае глюко-, так и липодепривации свидетельствует о том, что МКГ-эргические нейроны латеральной гипоталамической области могут служить общим компонентом различающихся нейропептидергических систем, ответственных за мониторинг жирных кислот и глюкозы. Ранее выдвинуто предположение, что нейроны, синтезирующие МКГ, принимают участие в интеграции процессов, связанных с эмоциональной реактивностью, возбуждением и исследовательской активностью [2]. В связи с этим можно предположить, что активация центральных систем, контролирующей потребление пищи в условиях дефицита основных энергетических субстратов, протекает с участием МКГ-эргической системы латеральной гипоталамической области как эмоционального и исследовательского компонента пищевого поведения.

Полученные данные свидетельствуют о наличии в гипоталамусе нейронов, селективно реагирующих на изменение углеводного обмена (нейроны аркуатных ядер, относящихся к действию НП-У), и нейронов, повышающих свою активность при недостатке любого из основных энергетических метаболитов (МКГ-эргические нейроны латеральной гипоталамической обла-

сти). Эти нейрональные системы могут представлять различные компоненты системы мозга, контролирующей пищевое поведение путем мониторинга жирных кислот и углеводов в организме.

ЛИТЕРАТУРА

1. Akabayashi A., Zaia C.T., Silva I. et al. // Brain Res. - 1993. - Vol. 621. - P. 343-348.
2. Baker B.B. // Trends Endocrinol. Metab. - 1994. - Vol. 5. - P. 120-126.
3. Calingasan N.Y., Ritter S. // Am. J. Physiol. - 1994. - Vol. 250. - P. 546-552.
4. Campfield L.A. // Appetite. - 1997. - Vol. 29. - P. 135-152.
5. Kalra S.P., Dube M.G., Sahu A. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1991. - Vol. 88. - P. 10931-10935.
6. Kesterson R.A., Huszar D., Lynch C.A. et al. // Mol. Endocrinol. - 1997. - Vol. 11. - P. 630-637.
7. Langhans W., Scharrer E. // Metabolic control of eating, energy expenditure and the bioenergetics of obesity / Ed. A.P. Simopoulos. - Basel, 1992. - P. 1-67.
8. Ludwig D.S., Mountjoy K.G., Tatro J.B. // Am. J. Physiol. - 1998. - Vol. 274. - P. 627-633.
9. Qu D., Ludwig D.S., Gammeltoft S. et al. // Nature. - 1996. - Vol. 380. - P. 243-247.
10. Sakurai T., Amemiya A., Ishii M. et al. // Cell. - 1998. - Vol. 92. - P. 573-585.
11. Stanley B.G., Kyrkouli S.E., Lampert S., Leibowitz S.F. // Peptides. - 1986. - Vol. 7. - P. 1189-1192.
12. Wang J., Akabayashi A., Yu H.J. et al. // Brain Res. - 1998. - Vol. 804. - P. 7-20.
13. Zarevski N., Cusin I., Vettor R., Rohner-Jeanrenaud B. // Endocrinology. - 1992. - Vol. 133. - P. 1753-1758.

Получено 05.01.00