

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ СЕРОТОНИНА НА АКТИВНОСТЬ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ ГИПОТАЛАМУСА У САМЦОВ КРЫС С НЕОНАТАЛЬНЫМ ДИАБЕТОМ

**© И. Б. Сухов, К. В. Деркач, О. В. Чистякова,
В. М. Бондарева, А. О. Шпаков¹**

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова
РАН, Санкт-Петербург, 194223;*

¹ электронный адрес: *alex_shpakov@list.ru*

При сахарном диабете 2-го типа (СД2) ослабляются функции серотониновой системы мозга, что ведет к метаболическим и гормональным дисфункциям. Одним из подходов для коррекции серотониновой системы мозга является повышение уровня серотонина в ЦНС. Цель работы состояла в изучении влияния 5-недельной обработки самцов крыс с неонатальной моделью СД2 интраназально вводимым серотонином (ИС) в суточной дозе 20 мкг на метаболические показатели и функциональную активность чувствительной к биогенным аминам и пептидным гормонам аденилатциклазной сигнальной системы (АЦСС) в гипоталамусе диабетических животных. Неонатальную модель СД2 получали путем воздействия стрептозотоцина (70 мг/кг) на 5-суточных крысят. В возрасте 4 мес животных с явными признаками СД2 разделили на две группы — с лечением (ДИС, n = 6) и без лечения ИС (Д0, n = 6). Лечение диабетических крыс ИС восстанавливало регуляцию АЦСС агонистами дофаминовых рецепторов 2-го типа (DA_2P) и меланокортиновых рецепторов 4-го типа (MK_4P), а также усиливало ингибирующее влияние серотонина на активность аденилатциклазы. Одной из основных причин этого было повышение экспрессии генов, кодирующих DA_2P , MK_4P и серотониновый receptor 1B-подтипа ($\text{C}_{1\text{B}}\text{P}$). В группе ДИС также менялось соотношение между сигнальными каскадами, включающими в себя различные типы серотониновых (G_s -сопряженные $\text{C}_{4,6,7}\text{P}/\text{G}_i$ -сопряженные C_1P), дофаминовых ($\text{DA}_1\text{P}/\text{DA}_2\text{P}$) и меланокортиновых ($\text{MK}_3\text{P}/\text{MK}_4\text{P}$) рецепторов, ответственных за регуляцию АЦСС. Наряду с восстановлением гормональной регуляции в гипоталамусе лечение ИС улучшало толерантность к глюкозе и повышало чувствительность тканей к инсулину. Полученные данные свидетельствуют о перспективности подхода, направленного на повышение уровня серотонина в ЦНС, для восстановления гипоталамических сигнальных путей и зависимых от них метаболических нарушений при СД2.

Ключевые слова: серотонин, сахарный диабет 2-го типа, гипоталамус, аденилатциклазная система, дофаминовый receptor, меланокортиновый receptor.

Принятые сокращения: АЦ — аденилатциклаза, АЦСС — аденилатциклазная сигнальная система, ГТТ — глюкозотолерантный тест, ДАР (в том числе DA_1P и DA_2P) — дофаминовые рецепторы (в том числе дофаминовые рецепторы 1-го и 2-го типов), ИГТТ — инсулиноглюкозотолерантный тест, MK_3P и MK_4P — меланокортиновые рецепторы 3-го и 4-го типов, СД1 и СД2 — сахарный диабет 1-го и 2-го типов, СИОЗС — селективные ингибиторы обратного захвата серотонина, СР (в том числе C_1P и C_6P) — серотониновые рецепторы (в том числе серотониновые рецепторы 1-го и 6-го типов), G_s - и G_i -белки — G-белки стимулирующего и ингибирующего типов, PACAP-38 — гипофизарный аденилатциклазу активирующий полипептид длиной 38 аминокислотных остатков (pituitary adenyl cyclase-activating polypeptide-38).

Чувствительная к серотонину сигнальная система мозга вовлечена в регуляцию пищевого поведения, двигательной активности, болевой чувствительности, репродуктивного поведения, функций сердечно-сосудистой системы и поджелудочной железы. Патологические изменения в этой системе при сахарном диабете 1-го и 2-го типов (СД1 и СД2) и метаболическом синдроме вызывают нарушение синаптической пластичности, дисбаланс нейронных связей и, как следствие, приводят к развитию нейродегенеративных заболеваний и когнитивному дефи-

циту (Herrera-Marquez et al., 2011; Шпаков, 2012; Prabhakar et al., 2015; Shpakov et al., 2015). Первопричинами этих изменений являются нарушение синтеза и метabolизма серотонина, его обратного захвата и транспорта между нейронами и глиальными клетками, а также снижение функциональной активности сигнальных белков, компонентов серотониновой сигнальной системы мозга. Так, у пациентов с СД и метаболическим синдромом снижаются концентрация общего триптофана, предшественника серотонина, уровень свободного триптофана и соот-

ношение свободного и общего триптофана, что влияет на биодоступность этой аминокислоты и в конечном итоге ведет к снижению уровня серотонина в ЦНС (Herrera et al., 2005; Manjarrez et al., 2006; Herrera-Marquez et al., 2011). Изменения внутримозгового уровня серотонина и его основного метаболита 5-гидроксииндулуксусной кислоты в условиях диабетической патологии приводят к изменению числа и соотношения серотониновых рецепторов (СР) и их функциональной активности, причем эти изменения являются специфичными в отношении как определенных областей мозга, так и различных типов СР.

Наиболее перспективными для восстановления серотиновой системы мозга при СД являются подходы, направленные на повышение уровня серотонина в ЦНС. Для этого широко применяют селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (СИОЗС), которые повышают концентрацию серотонина в синаптической щели вследствие подавления его обратного транспорта в нейроны. Показано, что применение СИОЗС для лечения депрессивных состояний у пациентов с СД не только приводит к улучшению их психического состояния, но и вызывает снижение массы тела и улучшает ряд метаболических показателей (Goodnick, 2001; Lustman, Clouse, 2005). Повышение уровня серотонина в ЦНС может быть достигнуто путем его центрального, интрацеребрального, введения, хотя этот подход мало применим в клинике и в большей степени подходит для экспериментов с использованием животных. Более перспективным является интраназальное введение нейромедиатора, которое не требует специального оборудования и не является травматичным. Ранее нами было показано, что интраназально вводимый серотонин (ИС), который поступает в различные отделы мозга, способен улучшать некоторые метаболические показатели и когнитивные функции у самок крыс с неонатальной моделью СД2 (Shpakov et al., 2012b). В то же время молекулярные механизмы, лежащие в основе восстанавливающего влияния ИС на нарушенную в условиях диабетической патологии центральную регуляцию энергетического обмена, в настоящее время изучены недостаточно (Shpakov et al., 2015). Имеется лишь одна работа о влиянии ИС на чувствительность аденилатциклазной сигнальной системы (АЦСС) к гормональным агентам в гипоталамусе крыс с моделью СД2, вызванной высокожировой диетой и низкой дозой стрептозотоцина (Derkach et al., 2015b). Однако в ней не изучали экспрессию генов, кодирующих рецепторные компоненты зависимых от G-белков гипоталамических сигнальных систем, а также не исследовали взаимосвязи между различными сигнальными каскадами.

Цель предпринятой работы состояла в изучении влияния длительного (на протяжении 5 нед) интраназального введения серотонина самцам крыс с неонатальной моделью СД2 на их метаболические показатели, толерантность к глюкозе, индуцируемую инсулином утилизацию глюкозы, а также на функциональную активность чувствительной к биогенным аминам и пептидным гормонам АЦСС в гипоталамусе диабетических животных. У диабетических крыс с лечением и без лечения ИС исследовали влияние на активность аденилатциклазы (АЦ) агонистов серотониновых (СР), дофаминовых (ДАР), адренергических и меланокортиковых рецепторов (МКР), которые опосредуют межнейрональные взаимодействия в гипоталамусе и вовлечены в центральный контроль энергетического обмена.

Материал и методика

Для индукции СД2 использовали самцов крыс Wistar в возрасте 5 сут. Животным внутрибрюшинно вводили стрептозотоцин в дозе 70 мг/кг (Sigma, США), растворенный в 0.1 М Na^+ -цитратном буфере (рН 4.5). Тестирование обработанных таким образом животных начинали в возрасте 3 мес, когда у них отмечали повышение уровня глюкозы и нарушение липидного метabolизма. Контрольной группе вместо раствора стрептозотоцина в те же сроки вводили 0.1 М Na^+ -цитратный буфер (рН 4.5). Забор крови у крыс для измерения уровня глюкозы и инсулина проводили из хвостовой вены под местным наркозом. После окончания эксперимента животных наркотизировали, декапитировали и забирали у них образцы крови, а также ткани гипоталамуса для исследования. Все эксперименты выполняли в строгом соответствии с правилами, разработанными и утвержденными Этическим комитетом ИЭФБ РАН (23. 12. 2010), а также в соответствии с правилами и требованиями, предусмотренными Директивой 1986 Европейского парламента (European Communities Council Directive, 1986) и изложенными в Руководстве по уходу и использованию лабораторных животных (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010).

4-месячных самцов крыс, у которых по результатам тестирования был диагностирован СД2, разделили на две группы, одну из которых лечили интраназально вводимым серотонином в суточной дозе 20 мкг на 1 крысу в течение 5 нед (группа ДИС, $n = 6$), в то время как другая группа (группа Д0, $n = 6$) вместо ИС в том же объеме и в те же сроки получала растворитель серотонина — 0.1 М Na^+ -цитратный буфер (рН 4.5). Введение крысам ИС проводили ежедневно утром в 10.00, как описано ранее (Derkach et al., 2015b). Животное переворачивали на спину и в каждую ноздрю дозатором вводили по 10 мкл раствора серотонина.

Для исследования толерантности к глюкозе за 48 ч до декапитации проводили глюкозотolerантный тест (ГТТ), для чего крысам внутрибрюшинно вводили 40%-ный раствор глюкозы из расчета 2 г/кг. Измерение уровня глюкозы в крови животных проводили непосредственно перед инъекцией (0 мин) и далее через 15, 30, 60 и 120 мин после глюкозной нагрузки. Для исследования инсулиновой чувствительности, определяемой по интенсивности инсулинависимой утилизации глюкозы, за 7 сут до декапитации проводили инсули ноглюкозотolerантный тест (ИГТТ). Для этого крысам одновременно вводили 40%-ный раствор глюкозы (доза 2 г/кг, внутрибрюшинно) и рекомбинантный человеческий инсулин Humalog (доза 0.8 МЕ/кг, подкожно). Измерение уровня глюкозы проводили непосредственно перед инъекцией глюкозы и инсулина (0 мин) и далее через 15, 30, 60 и 120 мин. Уровень глюкозы в крови определяли с помощью тест-полосок One Touch Ultra (США) и глюкометра фирмы Life Scan Johnson & Johnson (Дания). Концентрацию инсулина в образцах крови измеряли с использованием твердофазного иммуноферментного анализа с помощью наборов Rat Insulin ELISA (Mercodia AB, Швеция).

Для проведения количественной ПЦР в реальном времени из образцов тканей гипоталамуса выделяли тканевую РНК, для чего использовали набор РИБО-золь-В (ФГУН ЦНИИЭ, Россия). В дальнейшем проверяли образцы РНК на отсутствие деградации. Образцы, которые содержали 1 мкг РНК, обратно транскрибировали с испо-

льзованием набора RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., США) и Random Hexamer Primer. Перед обратной транскрипцией образцы обрабатывали ДНКазой-І (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Амплификацию ПЦР-продуктов осуществляли в смеси (25 мкл), содержащей 10 нг продукта обратной транскрипции, 0,4 мкМ прямого и обратного праймеров, реагент qPCRmix-HS SYBR+LowROX (ЕвроГен, Россия). Амплификационный сигнал детектировали с помощью прибора 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., США). Для проведения количественной ПЦР в реальном времени использовали предварительную денатурацию при 95 °С в течение 5 мин и затем 38 циклов амплификации (95 °С, 30 с; 56 °С, 30 с; 72 °С, 30 с), которые включали в себя стадии денатурации, отжига праймеров, элонгации и детекции флуоресцентного сигнала. По окончании циклов амплификации строили кривые плавления в интервале от 60 до 95 °С с детекцией через каждые 0,2 градуса. На кривой плавления для каждой реакции, содержащей образец, получали один пик, димеры праймеров отсутствовали. Температуру отжига рассчитывали с помощью программы Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Для оценки экспрессии генов использовали следующие прямые (For 5'-3') и обратные (Rev 5'-3') праймеры: ген *Drd1* (NM_012546.3) — ACATCTGGGTAGC-CTTGACATC и TACCTGTCCACGCTGATCACG (размер продукта амплификации в парах оснований bp = 76), ген *Drd2* (NM_012547.1) — GCA~~G~~CAGTCGAGCTTCA-GA и CGC~~G~~TGTTCACTGGGAAACT (bp = 124), ген *Htr1b* (NM_022225.1) — TCCGGGTCTCCTGTGTACGT и GGC~~G~~GTCTGAGACTCGCACTT (bp = 51), ген *Mc3r* (NM_001025270.3) — CAGCACATGGATAATATCTC-GACTCT и GGCAATGCCAGGAGGTT (bp = 78), ген *Mc4r* (NM_013099.2) — TGGGTGTCAAAAGCCTGTTGG и GCGTCCGTGTCCCGTACTG (bp = 181), а также референсные гены *Gapdh* и *Actb* для глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и β-актина соответственно.

Выделение фракций плазматических мембран из тканей гипоталамуса осуществляли, как описано ранее (Derkach et al., 2015b). Для этого извлеченные ткани гомогенизировали в 50 mM Tris-HCl-буфере (pH 7.4), содержащем 5 mM MgCl₂, 10%-ную сахарозу и коктейль ингибиторов протеаз при 4 °С. Гомогенат центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин, получившийся осадок отбрасывали, супернатант центрифугировали повторно при 9000 g в течение 20 мин. Вновь образовавшийся осадок супендировали в том же буфере, но без сахарозы и центрифугировали при 35 000 g в течение 10 мин. Осажденные мембранные супензии в 50 mM Tris-HCl-буфере (pH 7.4), содержащем 5 mM MgCl₂, и использовали для определения в них активности АЦ.

Для изучения активности АЦ и ее чувствительности к гормонам использовали форсколин, креатинфосфат, креатинфосфокиназу из мышц кролика, АТФ, цАМФ, полученные из фирмы Sigma-Aldrich (США), а также гормональные агенты — серотонин, дофамин, норадреналин, DA₁P-агонист 3-аллил-6-хлор-1-фенил-2,3,4,5-тетрагидро-1H-3-бензазепин-7,8-диол (SKF 82958), DA₂P-агонист бромокриптина, смешанный C_{1/2}P-агонист 5-метокси-N,N-диметилтриптамин (5-MeO-ДМТ), неселективный МКР-агонист α-MСГ и гипофизарный АЦ-активирующий полипептид-38 (PACAP-38) производства фирмы Sigma-Aldrich (США). Селективный МКР-агонист N-[(1R)-1-[(4-хлорофенил)метил]-2-[4-циклогексил-4-(1H-1,2,4-

триазол-1-илметил)-1-пиперидинил]-2-оксоэтил]-1,2,3,4-тетрагидро-3-изохинолинкарбоксамид (THIQ), C_{1B}P-агонист 5-нонилокситриптамин (5-НОТ) и C₆P-агонист 5-хлор-2-метил-3-(1,2,3,6-тетрагидро-4-пиридинил)-1H-индол (EMD-386088) были получены из фирмы Tocris Cookson Ltd. (Великобритания). Для катализируемой АЦ реакции в качестве радиоактивно меченого субстрата использовали [α -³²P]АТФ (150 ГБк/ммоль) (ОАО Всерегиональное объединение «Изотоп», Россия).

Активность АЦ определяли радиоизотопным методом, как описано ранее (Shpakov et al., 2010), в реакционной смеси следующего состава: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 0.1 mM цАМФ, 1 мМ АТФ, 20—40 кБк [α -³²P]-АТФ, 20 мМ креатинфосфата, 0.2 мг/мл креатинфосфокиназы и 25—50 мкг мембранных белка. Ферментативную реакцию проводили при 37 °С в течение 12 мин. Активность АЦ выражали в пмоль цАМФ/мин на 1 мг мембранных белка. Базальную активность АЦ определяли в отсутствие гормональных и негормональных регуляторов фермента, в то время как ингибирующие эффекты гормонов оценивали по их влиянию на АЦ, предварительно стимулированную форсколином (10⁻⁵ M).

Статистический анализ данных проводили с помощью программы ANOVA. Данные представляли в виде $M \pm SD$ из трех независимых экспериментов, оценивая различия между пробами как достоверные при $p < 0.05$.

Результаты

У 5-месячных самцов крыс с СД2 отмечали повышение массы тела и концентрации глюкозы в крови, а также снижение уровня инсулина, хотя в последнем случае различия с контролем не были статистически значимыми. Лечение диабетических животных ИС в течение 5 нед приводило к снижению уровня глюкозы, но не влияло на массу тела и уровень инсулина (см. таблицу). В группе Д0 была нарушена толерантность к глюкозе и снижена индуцированная инсулином утилизация глюкозы, на что указывает динамика изменения концентрации глюкозы в ГТТ и ИГТТ (рис. 1, 2). Лечение ИС приводило к отчетливо выраженному улучшению толерантности к глюкозе и к усилению ее утилизации тканями. На это указывает достоверное снижение в группе ДИС в сравнении с группой Д0 концентрации глюкозы в крови крыс через 15—60 мин после глюкозной нагрузки в ГТТ и через 60 и 120 мин после совместного введения глюкозы и инсулина в ИГТТ (рис. 1, 2). Полученные данные свидетельствуют

Масса тела, уровни глюкозы и инсулина у самцов контрольных и диабетических крыс и влияние на эти показатели интраназально вводимого серотонина (M ± SD)

Группа	Масса тела, г	Уровень глюкозы, ммоль/л	Уровень инсулина, нг/мл
Контроль (К; n = 6)	278 ± 16	4.1 ± 0.2	0.60 ± 0.21
Д0 (n = 6)	309 ± 13 ^a	5.8 ± 0.4 ^a	0.44 ± 0.07
ДИС (n = 6)	318 ± 14	4.8 ± 0.3 ^b	0.54 ± 0.20

Примечание. Различия между группами К и Д0 (^a) и между группами Д0 и ДИС (^b) достоверны при $p < 0.05$.

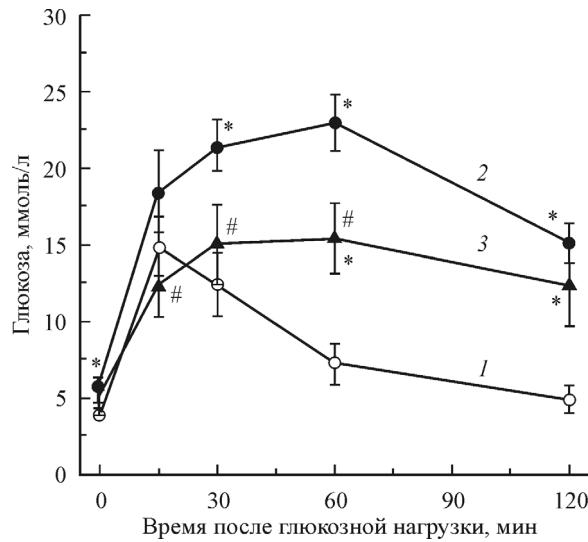


Рис. 1. Уровень глюкозы при проведении глюкозотолерантного теста в крови контрольных самцов крыс, крыс с неонатальной моделью сахарного диабета 2-го типа и влияние на этот показатель интраназально вводимого серотонина.

1 — контроль, 2 — группа Д0, 3 — группа ДИС. Различия между контролем и группой Д0 или между контролем и группой ДИС (звездочка), а также между группами Д0 и ДИС (решетка) достоверны при $p < 0.05$.

Данные представлены в виде $M \pm SD$.

об улучшении чувствительности тканей к инсулину и частичном восстановлении углеводного метаболизма у крыс с неонатальным СД2 при их лечении ИС.

Гипоталамус является основным интегратором сигналов, которыми обмениваются центр и периферия, а гипоталамические сигнальные системы непосредственно отвечают за центральную регуляцию периферического метаболизма. Вследствие этого в условиях СД2 и лечения диабетических крыс ИС большое значение имеет изучение функциональной активности гипоталамической

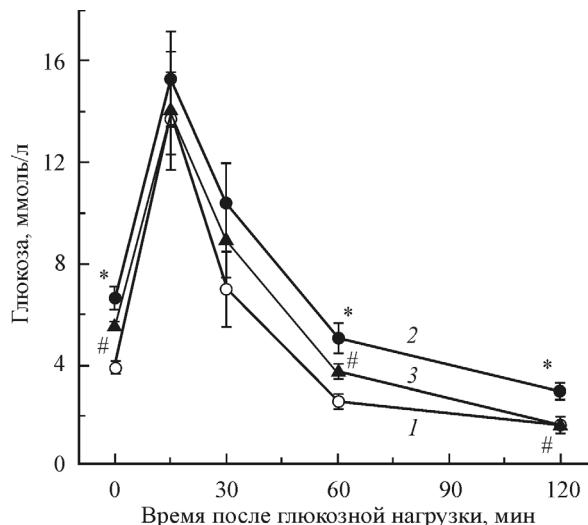


Рис. 2. Уровень глюкозы при проведении инсулиноглюкозотолерантного теста в крови контрольных крыс, животных с неонатальной моделью сахарного диабета 2-го типа и влияние на этот показатель интраназально вводимого серотонина.

1 — контроль, 2 — группа Д0, 3 — группа ДИС. Различия между контролем и группой Д0 (звездочка) и между группами Д0 и ДИС (решетка) достоверны при $p < 0.05$. Данные представлены в виде $M \pm SD$.

АЦСС, чувствительной к пептидам меланокортикового семейства, дофамину, серотонину и другим эндогенным гормональным регуляторам, которые вовлечены в контроль пищевого поведения, контролируют энергетический обмен и чувствительность тканей к инсулину. Нами были изучены как стимулирующие эффекты гормонов на активность АЦ, которые реализуются через сопряженные с G_s-белками рецепторы, так и ингибирующие эффекты, осуществляемые через рецепторы, функционально сопряженные с G_i-белками.

Лечение диабетических крыс вызывало усиление стимулирующих АЦ эффектов дофамина и селективного D₁R-агониста SKF 82958, а также восстанавливало сниженные при СД2 стимулирующие эффекты агонистов G_s-сопряженных M₁R — α-МСГ и THIQ на базальную активность АЦ. Так, в группе ДИС стимулирующие эффекты дофамина и SKF 82958 повышались на 27 и 38 % в сравнении с контролем (рис. 3). В свою очередь стимулирующие эффекты α-МСГ и THIQ, которые в группе Д0 составили 61 и 52 % от таковых в контроле, при лечении диабетических крыс ИС повышались до 84 и 90 % (рис. 4). Стимулирующие АЦ эффекты серотонина и селективного C₁R-агониста EMD-386088, которые почти не менялись при СД2, заметно снижались при обработке диабетических крыс ИС, что может рассматриваться как компенсаторная реакция на длительное повышение уровня серотонина в мозге (рис. 3). Стимулирующий АЦ эффект пептидного гормона PACAP-38, действующего через сопряженные с G_s-белками рецепторы VIP/PACAP-семейства, был достоверно снижен при СД2 и при лечении ИС частично восстанавливался, но различия в этом случае не были статистически значимыми. Стимулирующий АЦ эффект норадреналина в исследуемых группах менялся слабо. Полученные данные свидетельствуют о том, что в группе ДИС восстанавливаются ослабленные в условиях диабетической патологии сигнальные каскады, регулируемые M₁R-агонистами и PACAP-38, повышается чувствительность АЦ к D₁R-агонистам и снижается чувствительность фермента к агонистам G_s-сопряженных CR.

Лечение диабетических крыс ИС полностью восстанавливало ингибирующие эффекты гормональных агентов, действующих через G_i-сопряженные C₁R (5-НОТ и 5-МеO-ДМТ) и D₂R (дофамин и бромокриптин), на стимулированную форсколином активность АЦ. При этом ингибирующий эффект C₁R-агонистов даже превосходил таковой в контроле (рис. 5). В группе ДИС усиливался ингибирующий эффект пептидного гормона соматостатина, который был выше такового в группах К и Д0. Ингибирующий эффект норадреналина ослаблялся в группе ДИС в сравнении с контролем, но не отличался от такового в группе Д0. Эти данные указывают на то, что повышение уровня серотонина в ЦНС вследствие его интраназального введения не только приводит к восстановлению ингибирующих АЦ каскадов в гипоталамусе диабетических крыс, но и усиливает активность некоторых из них.

Оценка экспрессии генов, кодирующих G-белоксопряженные рецепторы, показала значительное снижение экспрессии генов Drd2 и Mc4r, повышение экспрессии гена Htr1b и отсутствие изменений экспрессии генов Drd1 и Mc3r в гипоталамусе диабетических крыс (рис. 6). Лечение ИС приводило к полному восстановлению экспрессии генов Drd2 и Mc4r. Экспрессия генов Drd1 и Htr1b повышалась, причем в случае гена Htr1b она в 2.5 раза

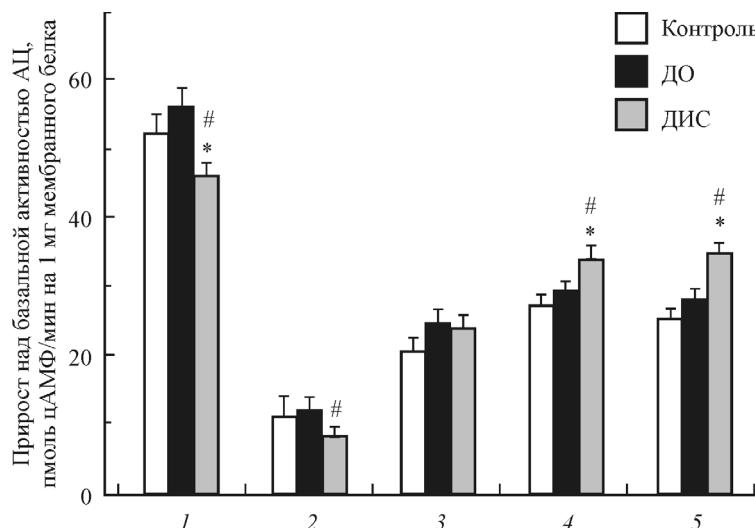


Рис. 3. Стимулирующие эффекты биогенных аминов и их синтетических аналогов на активность АЦ в плазматических мембранах гипоталамуса контрольных крыс, животных с неонатальной моделью сахарного диабета 2-го типа и влияние на этот показатель интраназально вводимого серотонина.

1 — серотонин, 2 — EMD-386088, 3 — норадреналин, 4 — дофамин, 5 — SKF 82958. Все гормоны использовали в концентрации 10^{-5} М. По вертикали — прирост активности АЦ над базальным уровнем активности фермента, пмоль цАМФ/мин на 1 мг мембранных белка. Различия между контролем и группой ДИС (звездочка) и между группами ДО и ДИС (решетка) достоверны при $p < 0.05$. Данные представлены в виде $M \pm SD$.

превосходила таковую в контроле. Экспрессия гена *Mc3r* снижалась в сравнении как с группой ДО, так и с контролем (рис. 6).

Обсуждение

Поскольку уровень серотонина в мозге при СД1 и СД2, как правило, снижен вследствие нарушения его синтеза и нейронального транспорта, подходы, которые направлены на повышение внутримозговой концентрации серотонина и его концентрации в синаптической щели, являются перспективными с точки зрения восстановления серотониновой сигнальной системы мозга и зависимых от нее метаболических функций. До настоящего времени основным подходом здесь было применение СИОЗС. Однако для этих препаратов при их длительном применении характерны побочные эффекты, которые во многом связаны с воздействием СИОЗС не только на центральные, но и на периферические серотонинергические нейроны, которые вовлечены в контроль сердечно-сосудистой системы и энергетического обмена (Watanabe et al., 2011; El-Merahbi et al., 2015). Нами применен подход, основанный на доставке серотонина в ЦНС путем его интраназального введения. Интраназальный способ введения в последние годы очень широко применяется для введения как сравнительно небольших молекул, к которым относится серотонин, так и значительных по размеру полипептидов, нуклеиновых кислот и даже целых клеток (Derkach et al., 2015a; Li et al., 2015; Miyake, Bleier, 2015). Результаты проведенного нами исследования указывают на то, что длительное, на протяжении 5 нед, введение ИС в значительной степени восстанавливает энергетический и гормональный статус организма, нарушенный в условиях диабетической патологии, что свидетельствует о высокой эффективности такого подхода. Ранее мы продемонстрировали эффективность интраназального способа введения серотонина при лечении крыс с моделью СД2, вызванной высокожировой ди-

етой и низкими дозами стрептозотоцина (Derkach et al., 2015b).

Развитие неонатальной модели СД2 у самок крыс, согласно данным наших ранних исследований, приводит к

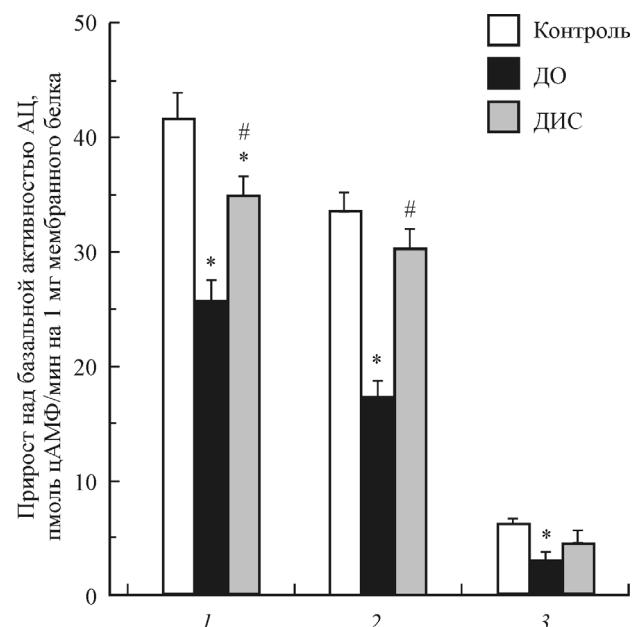


Рис. 4. Стимулирующие эффекты агонистов меланокортиновых рецепторов и PACAP-38 на активность АЦ в плазматических мембранах гипоталамуса контрольных крыс, животных с неонатальной моделью сахарного диабета 2-го типа и влияние на этот показатель интраназально вводимого серотонина.

1 — α -МСГ, 2 — THIQ, 3 — PACAP-38. Все гормоны использовали в концентрации 10^{-7} М. По вертикали — прирост активности АЦ над базальным уровнем активности фермента, пмоль цАМФ/мин на 1 мг мембранных белка. Различия между контролем и группой ДИС (звездочка), а также между группами ДО и ДИС (решетка) достоверны при $p < 0.05$. Данные представлены в виде $M \pm SD$.

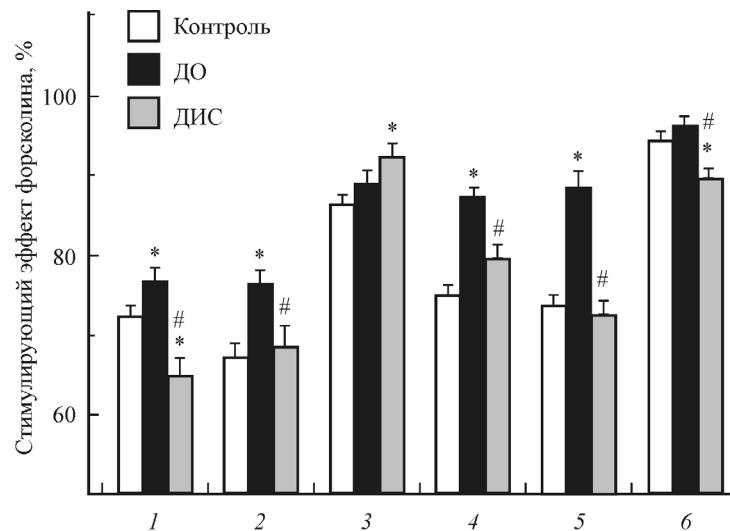


Рис. 5. Ингибирующие эффекты гормональных агентов на стимулированную форсколином активность АЦ в плазматических мембранах гипоталамуса контрольных самцов крыс, крыс с неонатальной моделью сахарного диабета 2-го типа и влияние на этот показатель интраназально вводимого серотонина.

1 — 5-НОТ, 2 — 5-МеO-ДМТ, 3 — норадреналин, 4 — дофамин, 5 — бромокриптина, 6 — соматостатин. Все гормоны были использованы в концентрации 10^{-5} М, за исключением соматостатина (10^{-7} М). По вертикали — стимулирующий эффект форсколина (10^{-5} М) в процентах, который в отсутствие гормонов принят за 100 %. Различия между контролем и группой ДО и между контролем и группой ДИС (звездочка), а также между группами ДО и ДИС (решетка) достоверны при $p < 0.05$. Данные представлены в виде $M \pm SD$.

значительным нарушениям функций гормональных сигнальных систем мозга, что выражается в изменении чувствительности АЦ к действию нейрогормонов (Shpakov et al., 2012a, 2012b). Настоящее исследование было выполнено на самцах крыс, которые в раннем онтогенезе более чувствительны к стрептозотоцину, а объектом исследований являлся гипоталамус, играющий ключевую, интегрирующую, роль в передаче и обработке гормональных и метаболических сигналов между центром и периферией. В результате проведенных исследований показано, что у самцов крыс с неонатальным СД2 нарушаются

как стимулирующие АЦ каскады, активируемые пептидами меланокортикового семейства и PACAP-38, так и ингибирующие каскады, активируемые агонистами G_i-сопряженных дофаминовых и серотониновых рецепторов. Это связано как с изменением экспрессии генов, кодирующих гормональные рецепторы, так и с дисбалансом ингибирующих и стимулирующих сигнальных путей, регулируемых одним и тем же нейротрансмиттером — дофамином или серотонином. Следствием таких изменений является нарушение взаимодействия между различными гипоталамическими сигнальными система-

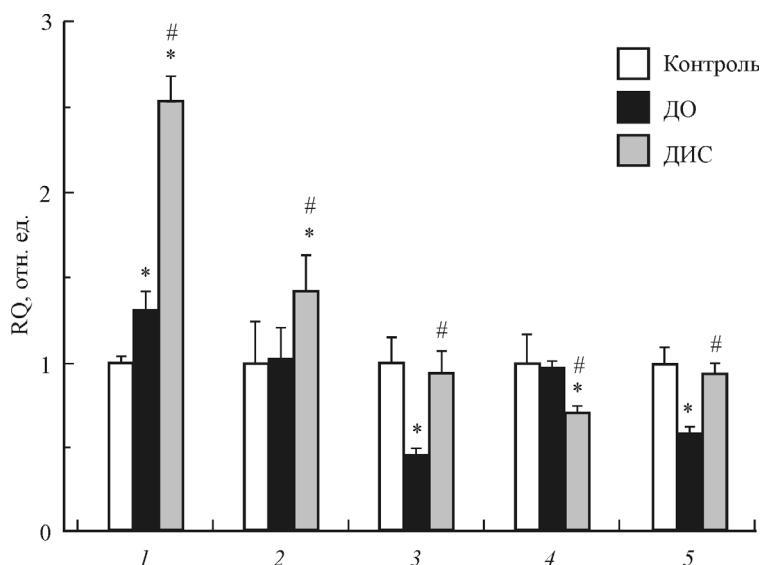


Рис. 6. Экспрессия мРНК генов, кодирующих G-белоксопряженные рецепторы, в гипоталамусе крыс с неонатальным сахарным диабетом 2-го типа с лечением и без лечения интраназально вводимым серотонином в сравнении с контрольными животными.

1 — *Htr1b*, 2 — *Drd1*, 3 — *Drd2*, 4 — *Mc3r*, 5 — *Mc4r*. По вертикали — относительный уровень экспрессии генов (RQ, отн. ед.), нормированный по уровню экспрессии генов *Gapdh* и *Actb*. Значения RQ рассчитаны по отношению к контрольной группе крыс. Различия между контролем и группой ДО или между контролем и группой ДИС (звездочка), а также между группами ДО и ДИС (решетка) достоверны при $p < 0.05$.

ми, а также между гипоталамическими и периферическими сигнальными системами.

Ключевую роль в нарушении гипоталамической регуляции при СД2 играют изменения в меланокортиковой системе, в первую очередь в МК₄Р-зависимой, которая функционально связана с моноаминергическими и пептидергическими системами мозга, осуществляющими контроль пищевого поведения, регулирует энергетический обмен. Ослабление МК₄Р-сигнальных путей ведет к гиперфагии, дисбалансу углеводного и липидного обменов, периферической инсулиновой резистентности, вследствие чего подходы, прямо или косвенно восстанавливающие эту систему, наиболее перспективны с точки зрения лечения патологического ожирения, метаболического синдрома и СД2 (Nogueiras et al., 2007; Farooqi, O’Rahilly, 2008; Haskell-Luevano et al., 2009; Шпаков, Деркач, 2012, 2015). Нами впервые установлено, что длительное лечение крыс с неонатальным СД2 с помощью ИС приводит к восстановлению чувствительности АЦ к МК₄Р-агонистам, а также к отчетливо выраженному повышению экспрессии гена *Mc4r*. Одной из причин этого, как мы полагаем, является восстановление функциональной активности C_{2c}P, которые через G_q-белки сопряжены с фосфолипазой С. Эти рецепторы колокализуются вместе с МК₄Р в чувствительных к проопиомеланокортику нейронах аркуатного ядра гипоталамуса, что обеспечивает функциональную связь C_{2c}P с гипоталамической меланокортиковой системой (Zhou et al., 2007; Nonogaki et al., 2008). Показано, что серотонин и C_{2c}P-агонисты, действуя даже в сравнительно низких концентрациях, способны активировать меланокортиковую систему в гипоталамических нейронах аркуатного ядра, что ведет к восстановлению чувствительности периферических тканей к инсулину и снижению уровня гормона в крови (Zhou et al., 2007). В этой связи необходимо отметить, что предпринятое нами лечение диабетических крыс ИС не только нормализует толерантность к глюкозе, но и в значительной степени повышает утилизацию глюкозы тканями, что свидетельствует о восстановлении чувствительности тканей к инсулину.

Важную роль в реализации метаболических эффектов ИС могут играть C₁P, которые опосредуют ингибирующий эффект серотонина на активность АЦ. В условиях СД2 ингибирующий эффект C₁P-агонистов снижается. В наибольшей степени это относится к 5-МеO-DMT, смешанному C_{1/2}P-агонисту, в то время как ингибирующий эффект селективного C_{1B}P-агониста 5-HOT снижается не столь значительно. Показано также, что экспрессия гена *Htr1b* в гипоталамусе диабетических крыс возрастает. На основании этого можно предположить, что при СД2 в основном ослабляется передача ингибирующего серотонинового сигнала через подтипы C₁P, отличные от C_{1B}P. Лечение крыс ИС в значительной степени усиливает ингибирующий АЦ эффект 5-HOT, вследствие чего он пре-восходил этот эффект в контроле. Отмечалось также отчетливо выраженное повышение экспрессии гена *Htr1b*. В свою очередь эффект 5-МеO-DMT хотя и восстанавливался, но не усиливался в сравнении с контролем. Это дает основание предположить, что при лечении ИС C_{1B}P-зависимый путь негативной регуляции АЦСС, пре-валирующий в гипоталамических нейронах, не только в полной мере восстанавливается, но и усиливается, в то время как другие серотониновые пути, вовлеченные в ингибирование АЦ, меняются в меньшей степени. Необходимо отметить, что данные о роли C₁P в этиологии и патогенезе метаболических расстройств, в том числе СД2,

ограничиваются нашими ранними работами (Shpakov et al., 2012b; Derkach et al., 2015b), а также исследованием Nonogaki с соавторами (Nonogaki et al., 2008), которые показали, что обработка мышей, нокаутных по C_{2c}P, с помощью неселективного C_{1B/2C}P-агониста *m*-хлорфенилпи-перазина снижает у них аппетит и частично восстанавливает чувствительность тканей к инсулину, что указывает на взаимосвязь между C_{1B}P и МК₄Р- зависимыми сигнальными путями в гипоталамусе.

Усиление ингибирующих АЦ каскадов и повышение экспрессии гена *Htr1b* при лечении диабетических крыс ИС было сопряжено с заметным ослаблением стимулирующих АЦ серотониновых сигналов, в том числе реализуемых через C₆P, на что указывает достоверное снижение в группе ДИС стимулирующего АЦ эффекта селективного C₆P-агониста EMD-386088. Это может быть связано с запуском компенсаторных механизмов в условиях значительной и продолжительной во времени гиперактивации сопряженных с G_s-белками СР. Ранее нами было показано, что длительная, в течение 2 мес, обработка здоровых крыс ИС приводит к снижению активности гипоталамических G_s-сопряженных СР (Derkach et al., 2015b).

Дофаминовая сигнальная система гипоталамуса, которая представлена в основном G_s-сопряженными DA₁P и G_i-сопряженными DA₂P, сильно меняется как при неонатальном СД2, так и при лечении крыс ИС. В группе Д0 ингибирующие АЦ эффекты дофамина и DA₂P-агониста бромокриптина ослаблялись на 49 и 56 %, а экспрессия гена *Drd2* снижалась на 54 %, в то время как DA₁P-зависимые каскады не менялись. В группе ДИС ингибирующие АЦ эффекты дофамина и бромокриптина и экспрессия гена *Drd2* полностью восстанавливались, в то время как стимулирующие АЦ эффекты дофамина и DA₁P-агониста SKF 82958 и экспрессия гена *Drd1* заметно возрас-тали. Повышение активности DA₁P-сигнальных путей можно рассматривать как компенсаторный механизм, направленный на ограничение активации ингибирующих дофаминовых путей в условиях обработки ИС. Следует также отметить, что усиление ингибирующего действия DA₂P-агонистов на АЦ может быть вызвано не только возрастанием числа DA₂P, но и повышением функциональной активности G_i-белков, ответственных за передачу ингибирующих гормональных сигналов к ферменту АЦ, что было продемонстрировано нами ранее при изучении других моделей СД (Шпаков и др., 2006).

Полученные нами данные, с одной стороны, указывают на тесные взаимосвязи между дофаминовой и серотониновой системами гипоталамуса, а с другой — на важную роль дисбаланса в дофаминовых сигнальных путях в развитии диабетической патологии. Поскольку, как отмечалось выше, между серотониновой и дофаминовой системами имеется тесная взаимосвязь, а серотониновая система в свою очередь взаимодействует с меланокортико-вой системой, можно сделать вывод о том, что и дофаминовая система вовлечена во взаимодействие с меланокортиковой системой. Вследствие этого некоторые эффекты агонистов ДАР, в первую очередь DA₂P, могут осуществляться через посредство МК₄Р- зависимых каскадов, как, впрочем, и наоборот, а нарушения в дофаминовой системе могут индуцировать нарушения в меланокортиковой системе, вызывая метаболические расстройства. В пользу существования взаимосвязи между дофаминовой и меланокортиковой системами свидетельствуют данные ряда авторов. Так, фармакологическое или генетическое выключение МК₄Р у эксперименталь-

ных животных подавляет их поведенческие реакции в ответ на кокаин, реализуемые преимущественно через DA_2P (Hsu et al., 2005; Cui, Lutter, 2013). Продолжительное ингибирование MK_4P с помощью антител к N-концевому участку этого рецептора приводит к заметному ослаблению DA_2P -зависимых каскадов в ЦНС (Деркач и др., 2014б; Шпаков и др., 2015).

Тот факт, что ИС оказался высокоэффективным при лечении крыс с неонатальным СД2, свидетельствует о перспективности развития технологий, направленных на повышение уровня этого нейромедиатора в ЦНС для коррекции метаболических расстройств, в том числе СД2. При этом идентификация нарушений в гипоталамических сигнальных системах, функционально связанных с серотониновой системой и меняющихся при ее коррекции с помощью ИС, позволяет выявить другие мишени для лечения СД2. Среди них меланокортиновая и дофаминовая системы, функции которых, как показано нами, сильно ослаблены при СД2, а также инсулиновая сигнальная система, активность которой в ЦНС при СД2 также снижается вследствие нарушения транспорта инсулина через гематоэнцефалический барьер и снижения функциональной активности компонентов инсулиновой системы (Liu et al., 2011; Шпаков, 2015; Shpakov et al., 2015). С учетом взаимосвязей между сигнальными системами гипоталамуса необходима разработка подходов, включающих в себя комплексное применение ИС и активаторов DA_2P , MK_4P и инсулиновой сигнальных систем. Одним из возможных путей является комбинированное применение ИС с DA_2P -агонистом бромокриптином и интраназально вводимым инсулином, тем более что в отношении бромокриптина уже получены положительные результаты по его использованию в условиях клиники для лечения метаболических расстройств у пациентов с паркинсонизмом, а также в экспериментальных условиях для лечения крыс с экспериментальным СД2 (Nade et al., 2012; Garber et al., 2013; Grunberger, 2013; Деркач и др., 2014а; Шпаков и др., 2014), а в отношении интраназального инсулина имеются данные об успешном его применении для повышения периферической инсулиновой чувствительности и улучшения гликемического контроля как при экспериментальном СД, так и в клинике при лечении пациентов с болезнью Альцгеймера и СД2 (Shpakov et al., 2012а, 2013; Freiherr et al., 2013; Shpakov, Derkach, 2013; Novak et al., 2014; Zhang et al., 2015).

Таким образом, нами впервые установлено, что интраназальное введение серотонина крысам с экспериментальным СД2 в значительной степени восстанавливает у них функциональную активность гипоталамических DA_2P - и MK_4P - зависимых сигнальных путей, повышает экспрессию DA_2P и MK_4P в гипоталамусе, усиливает ингибирующее влияние серотонина на активность АЦ, меняет соотношение между гипоталамическими сигнальными каскадами, реализуемыми через различные типы серотониновых (G_s -сопряженные $\text{C}_{4,6,7}\text{P}/G_i$ -сопряженные C_1P), дофаминовых ($\text{DA}_1\text{P}/\text{DA}_2\text{P}$) и меланокортиковых ($\text{MK}_3\text{P}/\text{MK}_4\text{P}$) рецепторов. Все эти изменения в гипоталамических сигнальных системах тесно взаимосвязаны и, как мы полагаем, являются основными молекулярными причинами вызываемого ИС частичного восстановления толерантности к глюкозе и ее утилизации под действием как экзогенного, так и эндогенного инсулина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-15-00413). Спек-

трофотометрические исследования выполнены на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием для физиологических, биохимических и молекулярно-биологических исследований ИЭФБ РАН.

Список литературы

- Деркач К. В., Бондарева В. М., Мойсеюк И. В., Шпаков А. О. 2014а. Влияние 2-месячного лечения бромокриптином на активность аденилатциклазной сигнальной системы в миокарде и семенниках крыс с сахарным диабетом 2-го типа. Цитология. 56 (12) : 907—918. (Derkach K. V., Bondareva V. M., Moiseyuk I. V., Shpakov A. O. 2015. The effect of 2-month bromocriptine treatment on the activity of the adenylate cyclase signaling system in the myocardium and testes of rats with type 2 diabetes. Cell Tissue Biol. 9 (5) : 395—405.)
- Деркач К. В., Шпакова Е. А., Жарова О. А., Шпаков А. О. 2014б. Метаболические изменения у крыс, иммунизированных БСА-конъюгатом пептида, производного N-концевого участка меланокортинового рецептора 4-го типа. Докл. РАН. 458 (1) : 102—105. (Derkach K. V., Shpakova E. A., Zharkova O. A., Shpakov A. O. 2014. 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.)
- Шпаков А. О. 2012. Функциональное состояние регулируемых биогенными аминами и ацетилхолином сигнальных систем мозга при сахарном диабете. Цитология. 54 (6) : 459—468. (Shpakov A. O. 2012. The functional state of biogenic amines- and acetylcholine-regulated signaling systems of the brain in diabetes mellitus. Tsitologiya. 54 (6) : 459—468.)
- Шпаков А. О. 2015. Функциональная активность инсулиновой сигнальной системы в норме и при сахарном диабете 2-го типа. Рос. физiol. журн. им. И. М. Сеченова. 101 (10) : 1103—1127. (Shpakov A. O. 2015. Functional activity of insulin signaling system in norm and in type 2 diabetes mellitus. Ros. Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova. 101 (10) : 1103—1127.)
- Шпаков А. О., Деркач К. В. 2012. Пептидергические сигнальные системы мозга при сахарном диабете. Цитология. 54 (10) : 733—741. (Shpakov A. O., Derkach K. V. 2013. Peptidergic signaling brain systems in diabetes mellitus. Cell Tissue Biol. 7 (3) : 212—220.)
- Шпаков А. О., Деркач К. В. 2015. Гормональные системы мозга и сахарный диабет 2-го типа. СПб.: Изд-во Политехнич. ун-та. 252 с.
- Шпаков А. О., Деркач К. В., Жарова О. А., Шпакова Е. А. 2015. Функциональная активность аденилатциклазной системы в мозге крыс с метаболическим синдромом, вызванным иммунизацией пептидом 11—25 меланокортинового рецептора 4-го типа. Нейрохимия. 32 (1) : 37—47. (Shpakov A. O., Derkach K. V., Zharkova O. A., Shpakova E. A. 2015. 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.)
- Шпаков А. О., Деркач К. В., Чистякова О. В., Бондарева В. М. 2014. Влияние лечения бромокриптином на активность аденилатциклазной системы в мозге крыс с сахарным диабетом 2-го типа, вызванным высокожировой диетой. Докл. РАН. 459 (2) : 243—247. (Shpakov A. O., Derkach K. V., Chistyakova O. V., Bondareva V. M. 2014. The influence of bromocriptine treatment on activity of the adenylyl cyclase system in the brain of rats with type 2 diabetes mellitus induced by high-fat diet. Dokl. Biochem. Biophys. 459 (1) : 186—189.)
- Шпаков А. О., Кузнецова Л. А., Плеснева С. А., Бондарева В. М., Гурьянов И. А., Власов Г. П., Перцева М. Н. 2006. Снижение функциональной активности G-белков, компонентов гормоночувствительной аденилатциклазной сигнальной системы, при экспериментальном диабете 2-го типа. Бюл. эксперим. биол. мед. 142 (12) : 641—645. (Shpakov A. O., Kuznetso-

- va L. A., Plesneva S. A., Bondareva V. M., Guryanov I. A., Vlasov G. P., Pertseva M. N. 2006. Decrease in functional activity of G-proteins hormone-sensitive adenylate cyclase signaling system, during experimental type II diabetes mellitus. Bull. Exp. Biol. Med. 142 (6) : 685—689.
- Cui H., Lutter M. 2013. The expression of MC₄Rs in D₁R neurons regulates food intake and locomotor sensitization to cocaine. Genes Brain Behav. 12 (6) : 658—665.
- Derkach K. V., Bogush I. V., Berstein L. M., Shpakov A. O. 2015a. The influence of intranasal insulin on hypothalamic-pituitary-thyroid axis in normal and diabetic rats. Horm. Metab. Res. 47 (12) : 916—924.
- Derkach K. V., Bondareva V. M., Chistyakova O. V., Bernstein L. M., Shpakov A. O. 2015b. 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. Article ID 245459. doi: 10.1155/2015/245459.
- El-Merahbi R., Löffler M., Mayer A., Sumara G. 2015. The roles of peripheral serotonin in metabolic homeostasis. FEBS Lett. 589 (15) : 1728—1734.
- Farooqi I. S., O’Rahilly S. 2008. Mutations in ligands and receptors of the leptin-melanocortin pathway that lead to obesity. Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab. 4 (10) : 569—577.
- Freiherr J., Hallschmid M., Frey W. H., 2nd, Brunner Y. F., Chapman C. D., Holscher C., Craft S., De Felice F. G., Benedict C. 2013. Intranasal insulin as a treatment for Alzheimer’s disease: a review of basic research and clinical evidence. CNS Drugs. 27 : 505—514.
- Garber A. J., Blonde L., Bloomgarden Z. T., Handelsman Y., Dagogo-Jack S. 2013. The role of bromocriptine-QR in the management of type 2 diabetes expert panel recommendations. Endocr. Pract. 19 : 100—106.
- Goodnick P. J. 2001. Use of antidepressants in treatment of comorbid diabetes mellitus and depression as well as in diabetic neuropathy. Annu. Clin. Psychiatry. 13 : 31—41.
- Grunberger G. 2013. Novel therapies for the management of type 2 diabetes mellitus: part 1. pramlintide and bromocriptine-QR. J. Diabetes. 5 : 110—117.
- Haskell-Luevano C., Schaub J. W., Andreasen A., Haskell K. R., Moore M. C., Koerper L. M., Rouzaud F., Baker H. V., Millard W. J., Walter G., Litherland S. A., Xiang Z. 2009. Voluntary exercise prevents the obese and diabetic metabolic syndrome of the melanocortin-4 receptor knockout mouse. FASEB J. 23 : 642—655.
- Herrera R., Manjarrez G., Hernandez J. 2005. Inhibition and kinetic changes of brain tryptophan-5-hydroxylase during insulin-dependent diabetes mellitus in the rat. Nutr. Neurosci. 8 : 57—62.
- Herrera-Marquez R., Hernandez-Rodriguez J., Medina-Serrano J., Boyzo-Montes de Oca A., Manjarrez-Gutierrez G. 2011. Association of metabolic syndrome with reduced central serotonergic activity. Metab. Brain Dis. 26 : 29—35.
- Hsu R., Taylor J. R., Newton S. S., Alvaro J. D., Haile C., Han G., Hruby V. J., Nestler E. J., Duman R. S. 2005. Blockade of melanocortin transmission inhibits cocaine reward. Eur. J. Neurosci. 21 : 2233—2242.
- Li Y. H., Feng L., Zhang G. X., Ma C. G. 2015. Intranasal delivery of stem cells as therapy for central nervous system disease. Exp. Mol. Pathol. 98 : 145—151.
- Liu Y., Liu F., Grundke-Iqbali I., Iqbal K., Gong C. X. 2011. Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer’s disease and diabetes. J. Pathol. 225 : 54—62.
- Lustman P. J., Clouse R. E. 2005. Depression in diabetic patients: the relationship between mood and glycemic control. J. Diabetes Complications. 19 : 113—122.
- Manjarrez G., Herrera R., Leon M., Hernandez R. J. 2006. A low brain serotonergic neurotransmission in children with type 1 diabetes detected through the intensity dependence of auditory-evoked potentials. Diabetes Care. 29 : 73—77.
- Miyake M. M., Bleier B. S. 2015. The blood-brain barrier and nasal drug delivery to the central nervous system. Amer. J. Rhinol. Allergy. 29 : 124—127.
- Nade V. S., Kawale L. A., Todmal U. B., Tajanpure A. B. 2012. Effect of bromocriptine on cardiovascular complications associated with metabolic syndrome in fructose fed rats. Indian J. Pharmacol. 44 : 688—693.
- Nogueiras R., Wiedmer P., Perez-Tilve D., Veyrat-Durebex C., Keogh J. M., Sutton G. M., Pfluger P. T., Castaneda T. R., Neischen S., Hofmann S. M., Howles P. N., Morgan D. A., Benoit S. C., Szanto I., Schrott B., Schürmann A., Joost H. G., Hammond C., Hui D. Y., Woods S. C., Rahmouni K., Butler A. A., Farooqi I. S., O’Rahilly S., Rohner-Jeanrenaud F., Tschöp M. H. 2007. The central melanocortin system directly controls peripheral lipid metabolism. J. Clin. Invest. 117 : 3475—3488.
- Nonogaki K., Strack A. M., Dallman M. F., Tecott L. H. 1998. Leptin-independent hyperphagia and type 2 diabetes in mice with a mutated serotonin 5-HT_{2C} receptor gene. Nat. Med. 4 : 1152—1156.
- Novak V., Milberg W., Hao Y., Munshi M., Novak P., Galica A., Manor B., Roberson P., Craft S., Abduljalil A. 2014. Enhancement of vasoreactivity and cognition by intranasal insulin in type 2 diabetes. Diabetes Care. 37 : 751—759.
- Prabhakar V., Gupta D., Kanade P., Radhakrishnan M. 2015. Diabetes-associated depression: the serotonergic system as a novel multifunctional target. Indian J. Pharmacol. 47 : 4—10.
- Shpakov A. O., Chistyakova O. V., Derkach K. V., Moiseyuk I. V., Bondareva V. M. 2012a. Intranasal insulin affects adenylyl cyclase system in rat tissues in neonatal diabetes. Central Eur. J. Biol. 7 : 33—47.
- Shpakov A. O., Derkach K. V. 2013. The functional state of hormone-sensitive adenylyl cyclase signaling system in diabetes mellitus. J. Signal Transduction. : 594213. doi: 10.1155/2013/594213.
- Shpakov A. O., Derkach K. V., Bernstein L. M. 2015. Brain signaling systems in the type 2 diabetes and metabolic syndrome: promising target to treat and prevent these diseases. Future Science OA (FSO). 1 : doi: 10.4155/fso.15.23.
- Shpakov A. O., Derkach K. V., Chistyakova O. V., Sukhov I. B., Shipilov V. N., Bondareva V. M. 2012b. The brain adenylyl cyclase signaling system and cognitive functions in rat with neonatal diabetes under the influence of intranasal serotonin. J. Metabolic Syndrome. 1 : doi: 10.4172/jms.1000104.
- Shpakov A., Derkach K., Moiseyuk I., Chistyakova O. 2013. Alterations of hormone-sensitive adenylyl cyclase system in the tissues of rats with long-term streptozotocin diabetes and the influence of intranasal insulin. Dataset Papers in Science. 2013 : 698435. doi: 10.7167/2013/698435.
- Shpakov A. O., Shpakova E. A., Tarasenko I. I., Derkach K. V., Vlasov G. P. 2010. The peptides mimicking the third intracellular loop of 5-hydroxytryptamine receptors of the types 1B and 6 selectively activate G proteins and receptor-specifically inhibit serotonin signaling via the adenylyl cyclase system. Int. J. Pept. Res. Ther. 16 : 95—105.
- Watanabe H., Rose M. T., Aso H. 2011. Role of peripheral serotonin in glucose and lipid metabolism. Curr. Opin. Lipidol. 22 : 186—191.
- Zhang H., Hao Y., Manor B., Novak P., Milberg W., Zhang J., Fang J., Novak V. 2015. Intranasal insulin enhanced resting-state functional connectivity of hippocampal regions in type 2 diabetes. Diabetes. 64 : 1025—1034.
- Zhou L., Sutton G. M., Rochford J. J., Semple R. K., Lam D. D., Oksanen L. J., Thornton-Jones Z. D., Clifton P. G., Yueh C. Y., Evans M. L., McCrimmon R. J., Elmquist J. K., Butler A. A., Heisler L. K. 2007. Serotonin 2C receptor agonists improve type 2 diabetes via melanocortin-4 receptor signaling pathways. Cell Metab. 6 : 398—405.

THE EFFECT OF LONG-TERM INTRANASALLY DELIVERED SEROTONIN
TREATMENT OF MALE RATS WITH THE NEONATAL DIABETES MELLITUS
ON THE ACTIVITY OF HYPOTHALAMIC SIGNALING SYSTEMS

I. B. Sukhov, K. V. Derkach, O. V. Chistyakova, V. M. Bondareva, A. O. Shpakov¹

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg, 194223;

¹ e-mail: alex_shpakov@list.ru

In the type 2 diabetes mellitus (T2DM) the functions of brain serotonin system are attenuated, leading to metabolic and hormonal dysfunctions. One of the approaches for the correction of the brain serotonin system is to increase the serotonin level in the central nervous system. The objective of this work was to study the effect of a five-week treatment of male rats with the neonatal T2DM model by intranasally administered serotonin (IS) at a daily dose of 20 µg/rat on metabolic parameters and functional activity of adenylyl cyclase signaling system (ACSS) sensitive to biogenic amines and peptide hormones in the hypothalamus of diabetic animals. The neonatal model of T2DM was induced by streptozotocin (70 mg/kg) treatment of five-day rats. At the age of 4 months the animals with typical signs of T2DM were divided into two groups, with IS treatment (DIS, n = 6) and without it (D0, n = 6). The IS treatment of diabetic rats restored the regulation of ACSS with the agonists of type 2 dopamine receptor (DA₂R) and of type 4 melanocortin receptor (MC₄R), and enhanced the inhibitory effect of serotonin on adenylyl cyclase activity. One of the main causes of this was the increase in the expression of genes encoding DA₂R, MC₄R and subtype 1B 5-hydroxytryptamine receptor (5-HT_{1B}R). In the DIS group the relationship between the signaling cascades involving different types of serotonin (G_s-coupled 5-HT_{4,6,7}R/G_i-coupled 5-HT₁R), dopamine (DA₁R/DA₂R) and melanocortin (MC₃R/MC₄R) receptors, which are responsible for the regulation of ACSS, was also changed. Along with the restoration of hypothalamic hormonal regulation, the IS treatment improved glucose tolerance and increased insulin sensitivity. The findings suggest that the prospects of this approach providing the increase of serotonin level in the central nervous system to restore hypothalamic signaling pathways and metabolic abnormalities dependent on them in T2DM.

Key words: serotonin, type 2 diabetes mellitus, hypothalamus, adenylyl cyclase system, dopamine receptor, melanocortin receptor.