

ВОССТАНОВЛЕНИЕ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ ГИПОТАЛАМУСА КАК ОДНА ИЗ ПРИЧИН УЛУЧШЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРЫС С НЕОНАТАЛЬНОЙ МОДЕЛЬЮ САХАРНОГО ДИАБЕТА ПРИ ИХ ОБРАБОТКЕ БРОМОКРИПТИНОМ МЕЗИЛАТОМ

© К. В. Деркач,¹ А. О. Иванцов,^{1,2} И. Б. Сухов,¹ А. О. Шпаков^{1,*}

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН Санкт-Петербург, 194223,
и ²Научно-исследовательский институт онкологии им. Н. Н. Петрова
Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Песочный, 197758;

* электронный адрес: alex_shpakov@list.ru

Одним из подходов для коррекции сахарного диабета 2-го типа (СД2) и его осложнений является применение бромокриптина мезилата (БКМ), селективного агониста дофаминовых рецепторов 2-го типа (DA₂R). Однако эффективность и механизмы действия БКМ при лечении тяжелых форм СД2 в настоящее время не изучены. Цель работы состояла в изучении влияния 4-недельной обработки самцов крыс с неонатальной моделью СД2 с помощью БКМ (300 мкг/кг ежедневно) на их метаболические показатели и на активность аденилатциклазной сигнальной системы (АЦСС) в гипоталамусе. Обработка БКМ восстанавливала толерантность к глюкозе и ее утилизацию экзогенным инсулином, нормализовала липидный обмен, снижая повышенные в условиях СД2 уровни триглицеридов и атерогенного холестерина. В гипоталамусе обработанных БКМ диабетических крыс восстанавливались регуляция АЦСС агонистами меланокортиновых рецепторов 4-го типа (МК₄R), DA₂R и серотониновых рецепторов 1В-подтипа и экспрессия гена *Mec4r*, кодирующего МК₄R. При этом обработка БКМ не влияла на уровень инсулина в крови и его продукцию панкреатическими β-клетками. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования БКМ для коррекции тяжелых форм экспериментального СД2 и показывают, что в основе терапевтического потенциала этого препарата лежит его способность восстанавливать чувствительные к моноаминам и пептидам меланокортинового семейства сигнальные системы гипоталамуса, ответственные за контроль энергетического обмена и инсулиновой чувствительности.

Ключевые слова: диабет, аденилатциклаза, гипоталамус, бромокриптин, меланокортиновый рецептор, дофаминовый рецептор, инсулиновая резистентность, толерантность к глюкозе

Принятые сокращения: АЦ — аденилатциклаза, АЦСС — аденилатциклазная сигнальная система, БКМ — бромокриптин мезилат, ГТТ — глюкозотолерантный тест, DA₁R и DA₂R — дофаминовые рецепторы 1-го и 2-го типов соответственно, ИГТТ — инсулин-глюкозотолерантный тест, МК₄R — меланокортиновый рецептор 4-го типа, α-МСГ — α-меланоцитстимулирующий гормон, 5-НОТ — 5-нилокситриптамин, СД2 — сахарный диабет 2-го типа, С_{1В}R — серотониновый рецептор 1В-подтипа, ТГ — триглицериды, Х-ЛПВП и Х-ЛПНП — комплекс холестерина с липопротеидами высокой и низкой плотности соответственно.

Сахарный диабет 2-го типа (СД2) представляет собой одну из самых распространенных эндокринных патологий. Наибольшую опасность представляют такие его осложнения, как диабетическая кардиомиопатия, нефропатия, нейропатия, ретинопатия, которые развиваются при длительном и тяжелом течении СД2 и приводят к частичной или полной потере работоспособности пациентов, а в ряде случаев к их преждевременной смерти. Вследствие этого разработка эффективных подходов для коррекции СД2 и его осложнений является одной из актуальных проблем современной эндокринологии. Наряду с уже ставшими традиционными подходами для лечения СД2, включающими в себя терапию сахароснижающими препаратами и инсулином, в последние годы интенсивно разрабатываются новые подходы, которые основаны на применении регуляторов сигнальных систем гипоталаму-

са, вовлеченных в контроль энергетического гомеостаза и инсулиновой чувствительности. К таким регуляторам относятся гормональные агенты (лептин, интраназально вводимый инсулин и глюкагоноподобный пептид-1), соединения, повышающие уровень нейромедиаторов и гормонов в ЦНС (селективные ингибиторы обратного захвата серотонина, ингибиторы дипептидилпептидазы-4 и инсулиндеградирующего фермента), а также усилители пострецепторных стадий сигнальной трансдукции (ингибиторы фосфотириозинфосфатаз) (Deuschle, 2013; Шпаков, Деркач, 2015; Ryan, 2015).

Большой интерес представляют агонисты D₂-дофаминовых рецепторов (DA₂R), в первую очередь коммерческий препарат бромокриптин мезилат (БКМ), который длительное время используют для лечения болезни Паркинсона и гиперпролактинемии. За последние 15 лет по-

лучены данные о том, что длительное введение БКМ пациентам с СД2 улучшает у них показатели липидного и углеводного обменов, снижает риск развития осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы (Scranton, Cincotta, 2010; Grunberger, 2013). Однако механизмы, лежащие в основе терапевтического эффекта БКМ, мало изучены. Мы предположили, что в основе эффекта лежит восстановление гипоталамических сигнальных систем, которые взаимодействуют с D₂-дофаминергической системой, являющейся мишенью для БКМ.

Цель работы состояла в изучении влияния 4-недельной обработки БКМ крыс с неонатальной моделью СД2 на метаболические показатели и активность гипоталамической аденилатциклазной сигнальной системы (АЦСС), вовлеченной в регуляцию энергетического гомеостаза. Ранее нами и другими авторами был выявлен восстанавливающий эффект БКМ на метаболические показатели у крыс с метаболическим синдромом и СД2, вызванным высокожировой диетой (Nade et al., 2012; Деркач и др., 2014; Шпаков и др., 2014). В то же время эффективность обработки БКМ крыс с моделью СД2, в которой сочетаются инсулиновая резистентность и нарушения продукции инсулина β-клетками, более близкой СД2 человека, в настоящее время остается неизученной. Вследствие этого мы исследовали неонатальную модель СД2 с характерными для нее инсулиновой резистентностью и относительной инсулиновой недостаточностью, которую вызывали обработкой 5-суточных крысят стрептозотоцином (75 мг/кг), которая к 3-месячному возрасту приводит к появлению признаков СД2 (Shpakov et al., 2012). Выбор АЦСС для оценки влияния терапии БК на активность дофаминовой системы гипоталамуса был продиктован тем, что дофамин реализует действие на гипоталамические нейроны преимущественно через АЦСС, включающую в себя DA₁P или DA₂P, которые через G-белки стимулирующего (G_s) или ингибирующего (G_i) типа сопряжены с ферментом аденилатциклазой (АЦ), а также тем, что АЦСС вовлечена в реализацию регуляторных эффектов ряда других нейромедиаторов и нейрогормонов, чьи сигнальные системы в гипоталамусе тесно взаимодействуют с дофаминовой системой.

Материал и методика

Обработку диабетических (Д) крыс БКМ (перорально в суточной дозе 300 мкг/кг) начинали в 4-месячном возрасте и продолжали в течение 4 нед (Д+БКМ, n = 6). Контрольные крысы (К, n = 6) и оставшаяся часть диабетических животных (Д, n = 6) вместо БКМ получали плацебо. После окончания обработки БКМ крыс декапитировали под наркозом, забирали у них кровь для оценки биохимических показателей, извлекали ткани гипоталамуса для выделения тотальной РНК и оценки экспрессии генов рецепторных белков, а также для получения плазматических мембран и определения в них активности АЦ (Derkach et al., 2015). Наряду с этим извлекали ткани поджелудочной железы, которые фиксировали в 10%-ном формалине в 50 мМ фосфатном буфере (рН 7.4) и использовали для гистологического и иммуногистохимического анализа. За 1 нед до окончания эксперимента для оценки инсулиноиндуцированной утилизации глюкозы проводили инсулиноглюкозотолерантный тест (ИГТТ), для чего измеряли уровень глюкозы в течение 120 мин после однократного введения глюкозы (2 г/кг внутривенно)

и инсулина (Humalog, 0.8 МЕ/кг подкожно). За 1 сут до окончания эксперимента для оценки толерантности к глюкозе проводили глюкозотолерантный тест (ГТТ), в ходе которого измеряли уровень глюкозы в течение 120 мин после введения только одной глюкозы в той же дозе (Derkach et al., 2015).

Концентрацию глюкозы измеряли с помощью тест-полосок One Touch Ultra (США), концентрацию инсулина — с помощью набора Rat Insulin ELISA kit (Merckodia, Швеция), концентрацию триглицеридов (ТГ), общего холестерина и комплексов холестерина с липопротеидами высокой (Х-ЛПВП) и низкой (Х-ЛПНП) плотности — с помощью наборов Olvex Diagnosticum (Россия). Для иммуногистохимического анализа использовали моноклональные мышинные антитела к инсулину Ab-5 (INS05, Neomarkers, США, разведение 1 : 500). Процедуру иммуногистохимического окрашивания проводили, используя прибор Thermo Scientific Lab Vision Auto-stainer 720 (Thermo Fisher Scientific, США). Морфометрические измерения оцифрованных изображений срезов поджелудочной железы, иммуноокрашенных и окрашенных гематоксилин-эозином, проводили с помощью программного обеспечения AxioVision (Zeiss, Германия).

В ходе выделения плазматических мембран из гипоталамуса замороженную в жидком азоте ткань гомогенизировали с помощью Политрона в охлажденном 50 мМ Tris-HCl-буфере (рН 7.4), содержащем 5 мМ MgCl₂, 10 % сахарозы и ингибиторы протеаз (Буфер А) (Derkach et al., 2015). Гомогенат центрифугировали (1000 g, 10 мин), осадок отбрасывали, супернатант повторно центрифугировали (9000 g, 20 мин), образовавшийся осадок ресуспендировали в буфере А без сахарозы и центрифугировали при 35 000 g в течение 10 мин. Осажденные мембраны ресуспендировали в 50 мМ Tris-HCl-буфере (рН 7.4), содержащем 5 мМ MgCl₂, и использовали для определения активности АЦ.

Активность АЦ определяли радиоизотопным методом (Derkach et al., 2015) в реакционной смеси следующего состава: 50 мМ Tris-HCl (рН 7.5), 5 мМ MgCl₂, 0.1 мМ цАМФ, 1 мМ АТФ, 1 мкКи [α-³²P]-АТФ, 20 мМ креатинфосфата, 0.2 мг/мл креатинфосфокиназы и 25—50 мкг мембранного белка. Ферментативную реакцию проводили при 37 °С в течение 12 мин. Активность АЦ выражали в пмоль цАМФ/мин на 1 мг мембранного белка. Для определения активности АЦ использовали меченый субстрат [α-³²P]АТФ (1000 Ки/ммоль) (Изотоп, Россия), а также гормональные агенты — дофамин, серотонин, SKF 82958 (агонист DA₁P), бромкриптин (агонист DA₂P), α-меланоцитстимулирующий гормон (α-МСГ) (Sigma-Aldrich, США), THIQ (селективный агонист меланокортиновых рецепторов 4-го типа (МК₄P)) и 5-нонилокситриптамиин (5-НОТ, селективный агонист серотониновых рецепторов 1В-подтипа (C_{1В}P)) (Tocris Cookson Ltd., Великобритания).

Для проведения количественной ОТ-ПЦР из гипоталамуса крыс с помощью набора РИБО-золь-В (ФГУН ЦНИИЭ, Россия) выделяли тотальную РНК и проверяли образцы на отсутствие деградации. Обратную транскрипцию (ОТ-ПЦР) образцов, содержащих 1 мкг РНК, проводили с помощью набора RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., США) и смеси случайных праймеров (Random Hexamer Primer). Предварительно образцы обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific Inc., США), чтобы разрушить примеси ДНК. ПЦР-амплификацию проводили в смеси

Влияние обработки БКМ крыс с неонатальной моделью СД2 на массу тела, уровни глюкозы и инсулина, показатели липидного обмена, число и диаметр панкреатических островков и число в них β-клеток

Показатель	Группа К	Группа Д	Группа Д+БКМ
Масса тела, г	285 ± 15	309 ± 13	315 ± 17
Глюкоза, мМ	3.9 ± 0.3	5.8 ± 0.5 ^a	4.9 ± 0.3 ^b
Инсулин, нг/мл	0.65 ± 0.26	0.44 ± 0.07	0.50 ± 0.16
Триглицериды, мМ	0.87 ± 0.19	1.41 ± 0.17 ^a	1.07 ± 0.20 ^b
Общий холестерин, мМ	4.58 ± 0.36	6.28 ± 0.49 ^a	5.34 ± 0.41 ^b
Х-ЛПВП, мМ	2.73 ± 0.35	2.70 ± 0.21	2.75 ± 0.23
Х-ЛПНП, мМ	1.52 ± 0.18	2.52 ± 0.16 ^a	2.04 ± 0.16 ^b
Соотношение Х-ЛПНП/Х-ЛПВП	0.559 ± 0.063	0.938 ± 0.088 ^a	0.742 ± 0.031 ^b
Число островков	39 ± 13	35 ± 14	31 ± 7
Диаметр островков, мкм	163 ± 18	101 ± 10 ^a	114 ± 15
Число клеток в островке	175 ± 46	107 ± 26	96 ± 14
Число β-клеток в островке	135 ± 40	49 ± 14 ^a	52 ± 5

Примечание. Данные представлены средними значениями со стандартным отклонением или ошибкой среднего (для панкреатических островков и β-клеток). ^aРазличия между группами К и Д и ^b различия между группами Д и Д+БКМ достоверны при $P < 0.05$. Для всех случаев $n = 6$.

(25 мкл), содержащей 10 нг продукта ОТ-ПЦР, 0.4 мкМ прямого и обратного праймеров, реагент qPCRmix-HS SYBR+LowROX (Евроген, Россия). Нуклеотидные последовательности прямых и обратных праймеров, используемых для оценки экспрессии генов *Mc4r*, *Mc3r*, *Drd1*, *Drd2* и *Htr1b*, кодирующих соответственно МК₄Р, МК₃Р, ДА₁Р, ДА₂Р и С_{1В}Р, представлены в работе Сухова с коллегами (2016). Амплификационный сигнал детектировали с помощью прибора 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., США). Для проведения ОТ-ПЦР использовали следующий режим: 1) предварительная денатурация (95 °С, 5 мин); (2) трехэтапная амплификация и количественный анализ, включающий в себя 38 циклов (95 °С, 30 с; 56 °С, 30 с; 72 °С, 30 с); 3) кривая плавления — 95 °С, 15 с; 60 °С, 60 с; разогрев образца до 95 °С с детекцией каждые 1 % времени нагрева; выдерживание в течение 30 с; охлаждение до 60 °С в течение 15 с. На кривой плавления в каждой реакции, содержащей образец, получали один пик, димеры праймеров отсутствовали. Время отжига рассчитывали с помощью программы Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). В качестве эндогенного контроля использовали ген глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (*Gapdh*). Анализ результатов проводили с использованием порогового метода ΔΔC_t. Значения RQ рассчитывали по отношению к контрольной группе.

Статистический анализ данных проводили с помощью программы Microsoft Office Excel 2007. Данные представлены в виде средних значений и их стандартных отклонений из трех независимых экспериментов. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали *t*-критерий Стьюдента, для сравнения групп — дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони. Различия оценивали как достоверные при $P < 0.05$.

Результаты

В группе Д отмечали характерные черты СД2 — умеренную гипергликемию, нарушение липидного обмена (повышение уровней ТГ, общего холестерина и Х-ЛПНП,

соотношения Х-ЛПНП/Х-ЛПВП). Были выявлены нарушения инсулинпродуцирующей функции поджелудочной железы, на что указывало снижение диаметра панкреатических островков и числа β-клеток в островке, а также тенденция к снижению концентрации инсулина в крови (см. таблицу). С помощью ГТТ и ИГТТ было показано, что в группе Д нарушена толерантность к глюкозе и снижена ее утилизация под действием вводимого инсулина (рис. 1).

Обработка диабетических крыс с помощью БКМ приводила к снижению концентрации глюкозы (хотя она и оставалась выше, чем в контроле), уровня ТГ, общего холестерина и атерогенного Х-ЛПНП и нормализации соотношения Х-ЛПНП/Х-ЛПВП (см. таблицу). В группе Д+БКМ отмечали восстановление толерантности к глюкозе и ее утилизации под действием экзогенного инсулина (рис. 1). Так, значение AUC_{0–120} (площадь под кривой зависимости концентрации глюкозы от времени) в группе Д+БКМ было ниже, чем в группе Д как в ГТТ (1472 ± 63 против 2056 ± 105, $P = 0.000024$), так и в ИГТТ (621 ± 29 против 863 ± 60, $P = 0.00018$). При этом различий между группами Д и Д+БКМ по уровню инсулина, числу панкреатических островков и β-клеток не выявлено (см. таблицу). Полученные данные указывают на то, что вызываемое БКМ улучшение глюкозного гомеостаза и липидного обмена связано не с восстановлением инсулинпродуцирующей функции поджелудочной железы, а с повышением чувствительности тканей к инсулину.

Поскольку одним из механизмов регуляции чувствительности к инсулину является активность моноаминергических и меланокортиновой сигнальных систем гипоталамуса (Шпаков, Деркач, 2015), мы изучили влияние обработки диабетических крыс БКМ на регуляцию активности гипоталамической АЦСС агонистами МК₄Р и ДА₁Р, которые сопряжены с АЦ через G_s-белки, и агонистами ДА₂Р и С_{1В}Р, которые сопряжены с АЦ через G_i-белки. В группе Д стимулирующее АЦ действие α-МСГ (неселективного агониста МКР) и ТНIQ (агониста МК₄Р), реализуемые через МК₄Р, а также экспрессия гена *Mc4r* были снижены (рис. 2, 3). Обработка БКМ восстанавливала эти показатели и снижала экспрессию гена

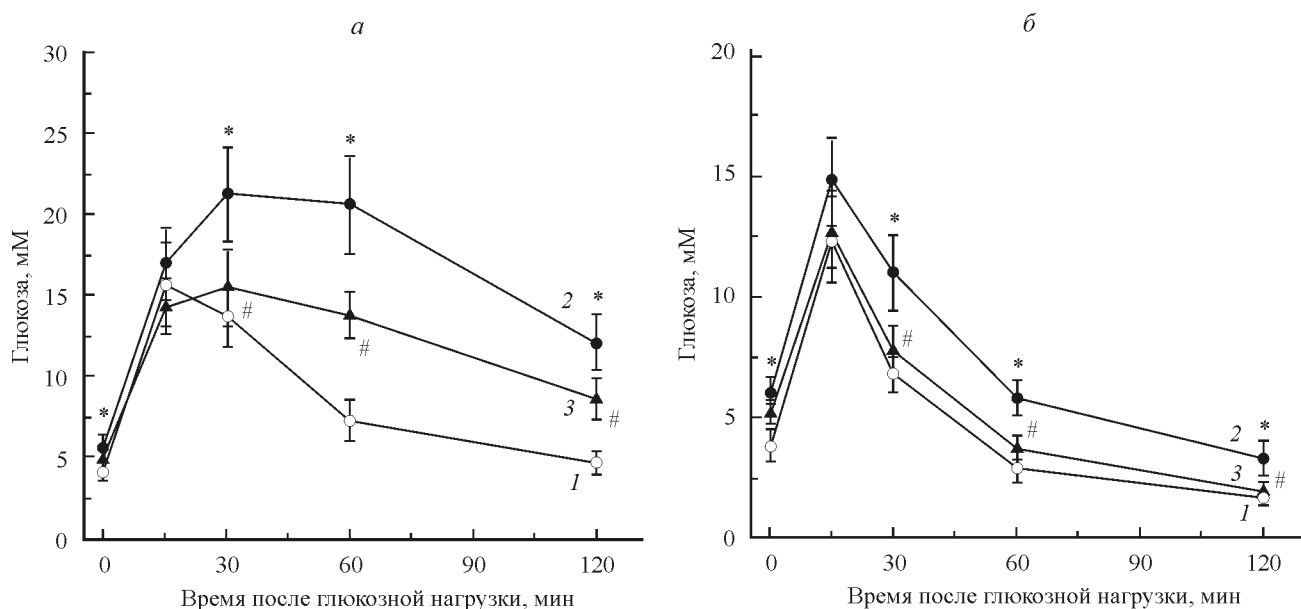


Рис. 1. Влияние обработки диабетических крыс БКМ на динамику изменений концентрации глюкозы в крови животных после глюкозной нагрузки (а) и при совместном введении глюкозы и инсулина (б).

а — глюкозотолерантный тест, б — инсулиноглюкозотолерантный тест. 1 — группа контроля (К), 2 — группа диабетических крыс (Д), 3 — группа диабетических крыс, получавших БКМ (Д+БКМ). Для всех случаев n = 6. Различия между группами К и Д (*) и между группами Д и Д+БКМ (#) достоверны при P < 0.05.

Mс3r, кодирующего МК₃Р, активация которого ведет к снижению активности МК₄Р-зависимых каскадов (рис. 3). Эти данные указывают на то, что обработка диабетических крыс БКМ нормализует МК₄Р-сигнализацию.

В группе Д сохранялось стимулирующее АЦ действие дофамина и SKF 82958, осуществляемое через ДА₁Р, и ослаблялось ингибирующее АЦ действие дофамина и бромокриптина, реализуемое через ДА₂Р (рис. 2). Экспрессия гена *Drd1* не менялась, в то время как экспрессия гена *Drd2* снижалась (рис. 3). Обработка БКМ восстанавливала ингибирующие эффекты дофамина и бромокриптина и повышала стимулирующие эффекты дофамина и SKF 82958 и экспрессию гена *Drd1* (рис. 2, 3). При этом экспрессия гена *Drd2* существенно не менялась. Таким образом, ДА₂Р-сигнализация в гипоталамусе диабетических крыс, обработанных БКМ, частично восстанавливается, и этот процесс сопровождается усилением ДА₁Р-сигнализации.

Изучение регуляции АЦ агонистами серотониновых рецепторов показало, что стимулирующие эффекты серо-

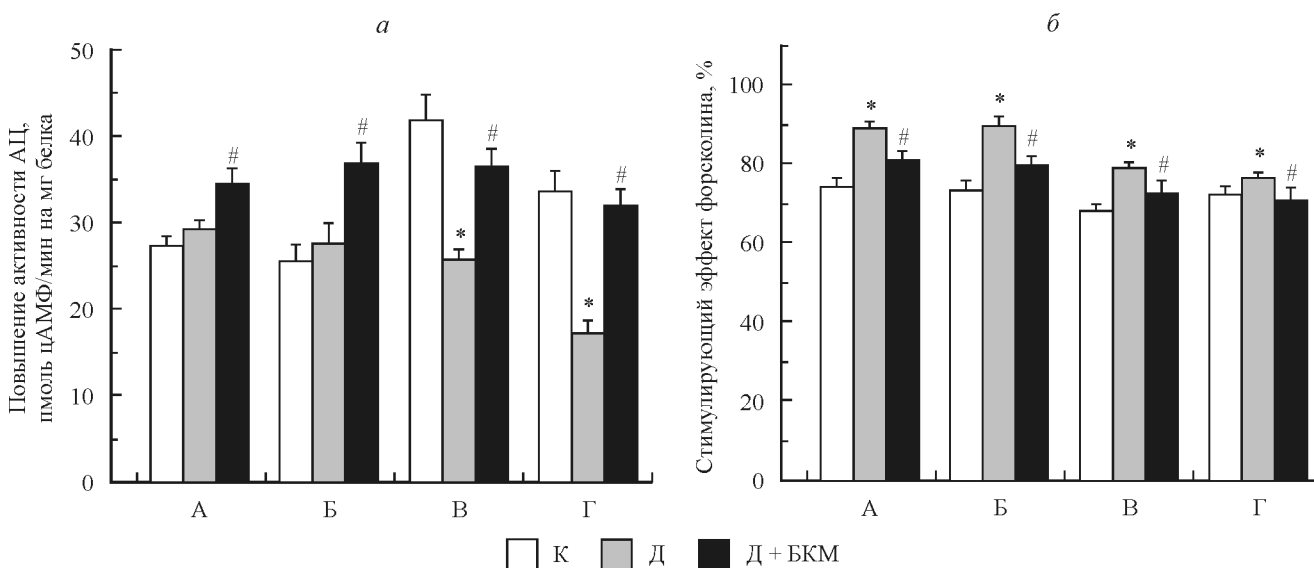


Рис. 2. Влияние обработки диабетических крыс БКМ на стимуляцию (а) и ингибирование (б) гормонами активности аденилатциклазы (АЦ) в гипоталамусе крыс с неонатальной моделью СД2.

а: А — дофамин (10⁻⁵ М), Б — SKF 82958 (10⁻⁵ М), В — α-МСГ (10⁻⁶ М), Г — ТНИQ (10⁻⁶ М). Прирост активности представляет собой превышение над базальной активностью аденилатциклазы. б: А — дофамин, Б — бромокриптин, В — серотонин, Г — 5-НОТ (все — 10⁻⁵ М). Ингибирующий эффект оценивали по влиянию гормона на стимулированную форсколином (10⁻⁵ М) активность АЦ, которую в его отсутствие принимали за 100 %. Различия между группами К и Д (*) или Д и Д+БКМ (#) достоверны при P < 0.05.

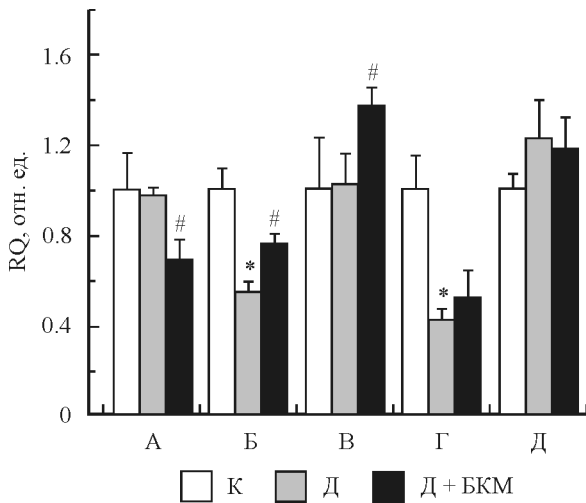


Рис. 3. Влияние обработки диабетических крыс БКМ на экспрессию генов гормональных рецепторов в гипоталамусе крыс с неонатальной моделью СД2.

мРНК генов: А — *Mc3r*, Б — *Mc4r*, В — *Drd1*, Г — *Drd2*, Д — *Htr1b*. Уровень экспрессии нормировали по уровню экспрессии мРНК гена *Gapdh*, значения RQ рассчитаны по отношению к контрольной группе. Различия между группами К и Д (*) или Д и Д+БКМ (#) достоверны при $P < 0.05$.

тонина, реализуемые через G_s -сопряженные рецепторы C_4P , C_6P и C_7P , в группах Д и Д+БКМ не отличались от контроля (данные не представлены), в то время как ингибирующее АЦ действие серотонина, реализуемое через C_1P , и соответствующий эффект 5-НОТ (агониста $C_{1B}P$) в группе Д в небольшой степени снижались и восстанавливались в группе Д+БКМ (рис. 2, б). Экспрессия гена *Htr1b*, кодирующего $C_{1B}P$, в обеих группах мало отличалась от контроля (рис. 3).

Обсуждение

Полученные нами результаты показывают, что длительная обработка крыс с неонатальным СД2 с помощью БКМ приводит к улучшению глюкозного гомеостаза, снижению инсулиновой резистентности и липидного обмена, что выражалось в нормализации толерантности к глюкозе, повышении утилизации глюкозы под действием экзогенного инсулина, в снижении уровня ТГ и соотношения Х-ЛПНП/Х-ЛПВП. Эти данные согласуются с результатами клинических исследований, в ходе которых при лечении пациентов с диабетической патологией с помощью БКМ отмечали улучшение гликемического контроля, снижение уровня инсулина, гликированного гемоглобина, а также улучшение показателей липидного обмена (Pijl et al., 2000; Scranton, Cincotta, 2010; Mikhail, 2011; Vinik et al., 2012; Grunberger, 2013). В меньшей степени изучено влияние БКМ на метаболические показатели у животных с экспериментальными моделями СД2 и метаболического синдрома. Нами показано, что длительная, в течение 2 мес, обработка БКМ крыс с СД2, который вызывали высокожировой диетой и однократным введением низкой дозы стрептозотоцина, приводила к улучшению у диабетических животных углеводного и липидного обменов (Деркач и др., 2014; Шпаков и др., 2014). Другие авторы при 6-недельной обработке БКМ крыс с метаболическим синдромом, вызванным потреб-

лением ими высокофруктозной диеты, отмечали снижение массы тела, а также уровней инсулина, ТГ и атерогенного холестерина (Nade et al., 2012). Снижение массы тела и частичное восстановление чувствительности к инсулину обнаружено также при 2-недельной обработке БКМ сирийских хомячков, имеющих выраженную инсулиновую резистентность (Luo et al., 2000).

Все эти данные указывают на эффективность БКМ для нормализации инсулиновой чувствительности и энергетического гомеостаза как в клинике при лечении больных с СД2 и метаболическим синдромом, так и при обработке животных с различными моделями этих заболеваний, включая изученную нами неонатальную модель СД2. Эта модель соответствует тяжелой форме длительно текущего СД2 у человека и характеризуется сильно выраженными метаболическими нарушениями, которые обусловлены как инсулиновой резистентностью, так и снижением продукции инсулина β -клетками поджелудочной железы. Нами показано, что БКМ не оказывает заметного влияния на продукцию инсулина, число панкреатических островков и число β -клеток у диабетических крыс (см. таблицу). На основании этого нами сделан вывод о том, что основной вклад в улучшение гликометаболических показателей вносит вызываемое БКМ повышение чувствительности тканей к инсулину, в пользу чего свидетельствует усиление утилизации глюкозы под действием экзогенно вводимого инсулина в ИГТТ в группе Д+БКМ в сравнении с диабетической группой, не получавшей лечения (рис. 1). Таким образом, полученные нами данные указывают на то, что в основе терапевтического эффекта БКМ в условиях СД2 как в клинике, так и в экспериментальных условиях лежит нормализация опосредуемой через DA_2P дофаминовой регуляции инсулиновой чувствительности, а не усиление продукции инсулина панкреатическими островками. Косвенным подтверждением этого является тот факт, что БКМ эффективен при восстановлении гликемического контроля в условиях выраженной инсулиновой резистентности, которая не ассоциирована со снижением функций β -клеток (Luo et al., 2000; Nade et al., 2012).

Влияние дофаминовой системы на энергетический обмен и периферическую инсулиновую чувствительность осуществляется в основном через центральные механизмы, которые включают DA_2P -дофаминовую и функционально взаимодействующие с ней сигнальные системы гипоталамуса, в первую очередь меланокортиновую и серотониновую (Шпаков, Деркач, 2015). Эти механизмы нарушаются в условиях СД2 и метаболического синдрома, что может быть вызвано нарушением нейронального транспорта дофамина, ослаблением активности DA_2P -дофаминовой системы, изменениями соотношения DA_1P - и DA_2P -сигнальных путей и функционального взаимодействия между DA_2P -дофаминовой и другими сигнальными системами в гипоталамусе (Pijl et al., 2000; Beaulieu et al., 2007; Mebel et al., 2012; Grunberger, 2013). Как отмечалось выше, ключевую роль в регуляции функций гипоталамических нейронов дофамина, серотонином и пептидами меланокортинового семейства играет чувствительная к ним АЦСС, активность которой меняется в условиях диабетической патологии.

Ранее нами было установлено нарушение функционирования АЦСС, чувствительной к агонистам DA_2P и MK_2P , в гипоталамусе крыс с СД2, вызванным высокожировой диетой и низкой дозой стрептозотоцина (Derkach et al., 2015). В настоящем исследовании в гипоталамусе

диабетических крыс выявлено ослабление ингибирующего действия на АЦ дофамина и D₂-агониста бромокриптина, а также значительное снижение экспрессии гена *Drd2*, кодирующего DA₂P. Поскольку через посредство гипоталамических DA₂P осуществляются ингибирование сигнальных путей, усиливающих продукцию глюкозы и липидов в печени, а также активация путей, ответственных за повышение чувствительности периферических тканей к инсулину (Kerr et al., 2010; Grunberger, 2013), ослабление DA₂P-сигнализации в гипоталамических нейронах ведет к энергетическому дисбалансу и инсулиновой резистентности. Длительная активация DA₂P при обработке диабетических крыс БКМ нормализовала функции DA₂P-сигнальных путей и, таким образом, положительно влияла на энергетический обмен и инсулиновую чувствительность. При этом в группе Д+БКМ в сравнении с группой Д частично восстанавливался ингибирующий АЦ эффект D₂-агонистов, в то время как сильно сниженная при СД2 экспрессия гена *Drd2* почти не менялась. Отсутствие восстановления экспрессии гена *Drd2*, вероятно, связано с негативным влиянием на нее длительного повышения уровня D₂-агониста бромокриптина в ЦНС. Этим можно объяснить и компенсаторное усиление стимулирующих АЦ DA₁P-сигнальных путей в гипоталамусе диабетических крыс, получавших БКМ. Весьма важно, что экспрессия гена *Drd2* в группе Д+БКМ сохранялась, в то время как у контрольных крыс, обработанных БКМ в тех же дозах и в те же сроки, она снижалась (данные не представлены).

Ослабление DA₂P-сигнализации в гипоталамических нейронах приводит к гиперактивации симпатической нервной системы миокарда, что влечет за собой развитие кардиомиопатии, одного из наиболее распространенных осложнений СД2 (Scranton, Cincotta, 2010). В связи с этим неудивительно, что восстановление DA₂P-сигнальных путей при лечении БКМ является одним из подходов для коррекции и предотвращения диабетической кардиомиопатии (Grunberger, 2013). Этот факт уже в настоящее время принимается во внимание при разработке комплексных схем лечения СД2 и метаболического синдрома, в которые включают агонисты DA₂P (Gaziano et al., 2012; Chamarthi et al., 2015). Ранее на другой, более мягкой модели СД2 нами было показано, что длительная обработка диабетических крыс БКМ приводит к восстановлению чувствительности АЦСС миокарда к действию агонистов β-адренергических рецепторов и способствует нормализации функций сердечно-сосудистой системы (Деркач и др., 2014).

Важный вклад в контроль пищевого поведения, инсулиновой чувствительности и глюкозного и липидного метаболизма вносит меланокортиновая сигнальная система гипоталамуса, включающая в себя в качестве сенсорного компонента МК₄P (Fan et al., 2000; Nogueiras et al., 2007; Morgan et al., 2015). В гипоталамусе крыс с неонатальной моделью СД2 активность МК₄P-меланокортиновой системы была сильно ослаблена, на что указывали значительное ослабление стимуляции МК₄P-агонистами активности АЦ и снижение экспрессии гена *Mc4r*, кодирующего МК₄P. Имеются многочисленные данные о том, что ослабление функций МК₄P в гипоталамусе приводит к ожирению, инсулиновой резистентности, нарушению толерантности к глюкозе и дислипидемии (Morgan et al., 2015). При этом взаимосвязь между ослаблением функций гипоталамической МК₄P-меланокортиновой системы и развитием метаболических нарушений выявлена не

только у экспериментальных животных, но и у пациентов с СД2 и метаболическим синдромом, имеющих мутации в гене *Mc4r* и нарушенный синтез меланокортиновых пептидов (Farooqi et al., 2003; Тао, 2009). Проведенная нами обработка диабетических крыс БКМ привела не только к восстановлению экспрессии гена *Mc4r* и стимуляции АЦ при действии α-МСГ и селективного МК₄P-агониста ТНIQ, но и к снижению экспрессии гена *Mc3r*, который кодирует МК₃P. Имеются данные о том, что МК₃P является негативным регулятором МК₄P-сигнальных путей (Pandit et al., 2011).

Еще одной гипоталамической сигнальной системой, вовлеченной в регуляцию пищевого поведения, глюкозного гомеостаза и инсулиновой чувствительности, является серотониновая система. Однако роль отдельных типов серотониновых рецепторов и регулируемых ими сигнальных каскадов здесь изучена недостаточно. Имеются данные в пользу участия G_i-сопряженных C_{1B}P и G_q-сопряженных C_{2C}P в центральной регуляции периферического метаболизма (Шпаков, Деркач, 2015). Показано, что селективные ингибиторы обратного захвата серотонина и интраназально вводимый серотонин улучшают метаболические показатели и повышают индуцированный инсулином захват глюкозы в условиях диабетической патологии (Lustman, Clouse, 2005; Derkach et al., 2015). При изучении активности серотониновых сигнальных путей, реализуемых через G_i-сопряженные C₁P, в гипоталамусе крыс с неонатальным СД2 нами обнаружено, хотя и менее выраженное в сравнении с D₂-агонистами, снижение ингибирующего АЦ действия серотонина и селективного C_{1B}P-агониста 5-НОТ. В то же время в отличие от DA₂P экспрессия гена *Htr1b*, кодирующего C_{1B}P, в группе Д существенно не менялась, указывая на то, что основные изменения в чувствительной к C_{1B}P-агонистам АЦСС затрагивают ее пострецепторные звенья, как мы полагаем, ее трансдукторный компонент — G_i-белок. Это предположение согласуется с данными об ослаблении функций G_i-белков в мозге и периферических тканях при экспериментальном СД2 (Shpakov, Derkach, 2013). Обработка диабетических крыс БКМ привела к восстановлению ингибирующего действия C_{1B}P-агониста 5-НОТ, что можно рассматривать как еще один из путей положительного влияния БКМ на центральную регуляцию энергетического гомеостаза. Однако тонкие молекулярные механизмы взаимодействия между дофаминовой и меланокортиновой сигнальными системами в гипоталамусе в норме и в условиях диабетической патологии требуют дальнейшего изучения.

Таким образом, длительная обработка БКМ крыс с неонатальным СД2 приводит к нормализации глюкозного гомеостаза, индуцированной инсулином утилизации глюкозы, липидного метаболизма, восстанавливает регуляцию гипоталамической АЦСС агонистами МК₄P, DA₂P и C_{1B}P, но не влияет на уровень инсулина и его продукцию β-клетками. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования БКМ для лечения тяжелых форм СД2 со сниженной функцией поджелудочной железы и демонстрируют, что терапевтический потенциал БКМ в отношении СД2 во многом определяется его способностью восстанавливать гипоталамические системы, контролирующие энергетический обмен и инсулиновую чувствительность.

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

Список литературы

- Деркач К. В., Бондарева В. М., Мойсейук И. В., Шпаков А. О. 2014. 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. (Tsitologiya). 9 (5) : 395—405.)
- Сухов И. Б., Деркач К. В., Чистякова О. В., Бондарева В. М., Шпаков А. О. 2016. Влияние длительного интраназального введения серотонина на активность сигнальных систем гипоталамуса у самцов крыс с неонатальным диабетом. Цитология. 58 (3) : 219—228. (Sukhov I. B., Derkach K. V., Chistyakova O. V., Bondareva V. M., Shpakov A. O. 2016. The effect of prolonged intranasal administration of serotonin on the activity of hypothalamic signaling systems in male rats with neonatal diabetes. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 10 (4) : 314—323.)
- Шпаков А. О., Деркач К. В. 2015. Гормональные системы мозга и сахарный диабет 2-го типа. СПб.: Изд-во Политехнич. ун-та. 252 с. ISBN 978-5-7422-4955-9. (Shpakov A. O., Derkach K. V. 2015. The brain hormonal signaling systems and type 2 diabetes mellitus. St. Petersburg: Polytechnic Univ. Publ. 252 p. ISBN 978-5-7422-4955-9.)
- 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 adenylate cyclase system in the brain of rats with type 2 diabetes mellitus induced by high-fat diet. Dokl. Biochem. Biophys. 459 (1) : 186—189.)
- Beaulieu J. M., Gainetdinov R. R., Caron M. G. 2007. The Akt-GSK-3 signaling cascade in the actions of dopamine. Trends Pharmacol. Sci. 28 : 166—172.
- Chamarthi B., Gaziano J. M., Blonde L., Vinik A., Scranton R. E., Ezrokhi M., Ruddy D., Cincotta A. H. 2015. Timed bromocriptine-QR therapy reduces progression of cardiovascular disease and dysglycemia in subjects with well-controlled type 2 diabetes mellitus. J. Diabet. Res. 2015 : 157 698.
- Derkach K. V., Bondareva V. M., Chistyakova O. V., Bernstein L. M., Shpakov A. O. 2015. 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 : 245 459.
- Deuschle M. 2013. Effects of antidepressants on glucose metabolism and diabetes mellitus type 2 in adults. Curr. Opin. Psychiatry. 26 : 60—65.
- Fan W., Dinulescu D. M., Butler A. A., Zhou J., Marks D. L., Cone R. D. 2000. The central melanocortin system can directly regulate serum insulin levels. Endocrinology. 141 : 3072—3079.
- Farooqi I. S., Keogh J. M., Yeo G. S., Lank E. J., Cheetham T., O'Rahilly S. 2003. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. New Engl. J. Med. 348 : 1085—1095.
- Gaziano J. M., Cincotta A. H., Vinik A., Blonde L., Bohannon N., Scranton R. 2012. Effect of bromocriptine-QR (a quick-release formulation of bromocriptine mesylate) on major adverse cardiovascular events in type 2 diabetes subjects. J. Amer. Heart Assoc. 1 : E002279.
- Grunberger G. 2013. Novel therapies for the management of type 2 diabetes mellitus: part 1. Pramlintide and bromocriptine-QR. J. Diabetes. 5 : 110—117.
- Kerr J. L., Timpe E. M., Petkewicz K. A. 2010. Bromocriptine mesylate for glycemic management in type 2 diabetes mellitus. Ann. Pharmacother. 44 : 1777—1785.
- Luo S., Luo J., Cincotta A. H. 2000. Association of the antidiabetic effects of bromocriptine with a shift in the daily rhythm of monoamine metabolism within the suprachiasmatic nuclei of the Syrian hamster. Chronobiol. Int. 17 : 155—172.
- Lustman P. J., Clouse R. E. 2005. Depression in diabetic patients: the relationship between mood and glycemic control. J. Diabetes Complications. 19 : 113—122.
- Mebel D. M., Wong J. C., Dong Y. J., Borgland S. L. 2012. Insulin in the ventral tegmental area reduces hedonic feeding and suppresses dopamine concentration via increased reuptake. Eur. J. Neurosci. 36 : 2336—2346.
- Mikhail N. 2011. Quick-release bromocriptine for treatment of type 2 diabetes. Curr. Drug Deliv. 8 : 511—516.
- Morgan D. A., McDaniel L. N., Yin T., Khan M., Jiang J., Acevedo M. R., Walsh S. A., Ponto L. L., Norris A. W., Lutter M., Rahmouni K., Cui H. 2015. Regulation of glucose tolerance and sympathetic activity by MC4R signaling in the lateral hypothalamus. Diabetes. 64 : 1976—1987.
- 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., Neschén 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-Jeanraud F., Tschöp M. H. 2007. The central melanocortin system directly controls peripheral lipid metabolism. J. Clin. Invest. 117 : 3475—3488.
- Pandit R., de Jong J. W., Vanderschuren L. J., Adan R. A. 2011. Neurobiology of overeating and obesity: the role of melanocortins and beyond. Eur. J. Pharmacol. 660 : 28—42.
- Pijl H., Ohashi S., Matsuda M., Miyazaki Y., Mahankali A., Kumar V., Pipek R., Iozzo P., Lancaster J. L., Cincotta A. H., DeFronzo R. A. 2000. Bromocriptine: a novel approach to the treatment of type 2 diabetes. Diabetes Care. 23 : 1154—1161.
- Ryan G. 2015. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor use in patients with type 2 diabetes and cardiovascular disease or risk factors. Postgrad. Med. 127 : 842—854.
- Scranton R., Cincotta A. 2010. Bromocriptine — unique formulation of a dopamine agonist for the treatment of type 2 diabetes. Expert. Opin. Pharmacother. 11 : 269—279.
- Shpakov A. O., Chistyakova O. V., Derkach K. V., Moiseyuk I. V., Bondareva V. M. 2012. Intranasal insulin affects adenylate 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 adenylate cyclase signaling system in diabetes mellitus. J. Signal Transduction. 2013 : 594 213.
- Tao Y. X. 2009. Mutations in melanocortin-4 receptor and human obesity. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. 88 : 173—204.
- Vinik A. I., Cincotta A. H., Scranton R. E., Bohannon N., Ezrokhi M., Gaziano J. M. 2012. Effect of bromocriptine-QR on glycemic control in subjects with uncontrolled hyperglycemia on one or two oral anti-diabetes agents. Endocr. Pract. 18 : 931—943.

THE RESTORATION OF HYPOTHALAMIC SIGNALING SYSTEMS AS ONE
OF THE CAUSES TO IMPROVE THE METABOLIC PARAMETERS
IN BROMOCRYPTINE-TREATED RATS WITH NEONATAL MODEL OF DIABETES MELLITUS

*K. V. Derkach,¹ A. O. Ivantsov,^{1, 2} I. B. Sukhov,¹ A. O. Shpakov^{1, *}*

¹I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of RAS, St. Petersburg, 194223,
and ²N. N. Petrov Research Institute of Oncology, St. Petersburg, 197758;
e-mail: alex_shpakov@list.ru

One of the approaches to correct type 2 diabetes mellitus (T2DM) and its complications is the use of drug bromocryptine mesylate (BCM), a selective agonist of type 2 dopamine receptors (DA₂R). At the same time, the efficiency and the mechanisms of action of BCM in treatment of severe forms of T2DM are not currently understood. The objective was to study the effect of four-week treatment of male rats with neonatal T2DM model using BCM (300 mg/kg/day) on their metabolic parameters and activity of the adenylyl cyclase signaling system (ACSS) in the hypothalamus. The BCM treatment restored glucose tolerance and its utilization by exogenous insulin, and normalized lipid metabolism by lowering the levels of triglycerides and atherogenic cholesterol increased in T2DM. In the hypothalamus of BCM-treated diabetic rats, the regulation of ACSS by agonists of type 4 melanocortin receptor (MC₄R), DA₂R and 1B-subtype serotonin receptor, and the expression of *Mc4r* gene encoding MC₄R were restored. Meanwhile, the BCM treatment had no effect on plasma insulin level and insulin production by pancreatic β -cells. The obtained data indicate the significant prospects of BCM to treat severe forms of experimental T2DM, and show that the therapeutic potential of this drug includes its ability to restore the hypothalamic signaling systems sensitive to monoamines and peptide of the melanocortin family, which are responsible for the control of energy metabolism and insulin sensitivity.

Key words: diabetes mellitus, adenylyl cyclase, hypothalamus, bromocryptine, melanocortin receptor, dopamine receptor, insulin resistance, glucose tolerance
