

ВЛИЯНИЕ ДИЕТА-ИНДУЦИРОВАННОГО И МЕЛАНОКОРТИНОВОГО ОЖИРЕНИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ ТРИПТОФАНГИДРОКСИЛАЗЫ 2 В НЕЙРОНАХ СРЕДНЕГО МОЗГА И ГИПОТАЛАМУСА МЫШЕЙ

© 2020 г. Е. В. Михайлова¹, Д. Л. Свиридова¹, И. В. Романова¹*,
К. В. Деркач¹, А. О. Шпак¹

¹*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия*

*E-mail: irinaromanova@mail.ru

Поступила в редакцию 31.03.2020 г.

После доработки 01.05.2020 г.

Принята к публикации 30.05.2020 г.

Серотониновая система мозга играет ключевую роль не только в регуляции поведения и когнитивных функций, но и в контроле пищевого поведения и энергетического обмена. В это вовлечены серотонинергические нейроны среднего мозга, экспрессирующие фермент триптофангидроксилазу 2-го типа (ТПГ-2), катализирующую синтез серотонина, и гипоталамические нейроны, экспрессирующие серотониновые рецепторы. В настоящее время изменения экспрессии и распределения ТПГ-2 в нейронах среднего мозга при ожирении остаются мало изученными. Наряду с этим предполагается, что серотонин может синтезироваться и в гипоталамических нейронах, оказывая влияние на серотониновую систему гипоталамуса, но данные об экспрессии и возможной локализации ТПГ-2 в гипоталамических нейронах отсутствуют. Целью работы было изучение экспрессии ТПГ-2 в среднем мозге и ее распределение в нейронах аркуатных, паравентрикулярных и супраоптических ядер гипоталамуса у мышей с диета-индуцированным ожирением (ДИО) и у агути-мышей с генетически-обусловленным ожирением меланокортинового типа. В гипоталамусе мышей C57Bl/6J выявлена экспрессия гена ТПГ-2 и с помощью двойного иммуномечения впервые показана локализация фермента в иммунопозитивных к проопиомеланокортину (ПОМК) нейронах аркуатных ядер и в иммунопозитивных к вазопрессину нейронах паравентрикулярных и супраоптических ядер. При обоих типах ожирения количество ТПГ-2-иммунопозитивных гранул в ПОМК- и вазопрессин-иммунопозитивных нейронах повышалось, хотя экспрессия гена *Tph2* повышалась только у агути-мышей. В среднем мозге ДИО-мышей содержание ТПГ-2 снижалось, в то время как у агути-мышей оно не менялось. Эти результаты свидетельствуют о важной роли синтезируемого в гипоталамусе серотонина, который совместно с серотонином, поступающим из среднего мозга, вовлечен в компенсаторные изменения гипоталамического сигналинга при ожирении. Обнаружение ТПГ-2-иммунопозитивных гипоталамических нейронов различной эргичности, способных синтезировать серотонин, указывает на существование новых механизмов аутокринной и паракринной серотониновой регуляции в гипоталамусе, в том числе при ожирении.

Ключевые слова: серотонин, триптофангидроксилаза-2, средний мозг, гипоталамус, диета-индуцированное ожирение, агути-мышцы

DOI: 10.31857/S0869813920100064

Нейротрансмиттер серотонин в мозге человека, обезьян и грызунов синтезируется преимущественно в среднем мозге, в том числе в серотонинергических нейронах ядер шва В7 и В8 (dorsal and median raphe nuclei, DRN and MRN), которые посылают проекции в гипоталамус [1–4]. В дальнейшем по отросткам этих серотонинергических нейронов серотонин поступает в соседние области мозга, включая гипоталамические ядра, где специфически связывается с расположенными там серотониновыми рецепторами и осуществляет регуляцию таких процессов, как нейрональная пластичность, память, пищевое поведение, углеводный и липидный обмен, а также контролирует функции сердечно-сосудистой системы [5–8]. Синтез серотонина в ЦНС осуществляется с помощью фермента – триптофангидроксилазы 2-го типа (ТПГ-2), которая катализирует превращение 5-гидрокситриптофана в серотонин (скорость-лимитирующая стадия синтеза серотонина) и потому является основным маркером серотонинергических нейронов мозга [9, 10]. Показана положительная корреляция между интенсивностью синтеза серотонина в нейронах и уровнем в них экспрессии и активности ТПГ-2 [11, 12].

Серотониновая система мозга, а также различные отделы гипоталамуса играют определяющую роль в контроле пищевого поведения и энергетического обмена и претерпевают значительные изменения в условиях метаболических расстройств – ожирения и метаболического синдрома. Вследствие этого значительный интерес представляет сравнительное изучение активности системы синтеза серотонина в среднем мозге и гипоталамусе, а также интегративных взаимосвязей между серотонинергическими нейронами среднего мозга и нейронами аркуатного, паравентрикулярного и супраоптического ядер гипоталамуса в норме и при различных метаболических расстройствах. Несмотря на значительное число работ, посвященных функциональным изменениям серотониновой системы при ожирении и метаболическом синдроме, их влияние на экспрессию гена и белка для ТПГ-2 в среднем мозге мало изучено [13]. В отношении распределения ТПГ-2 в гипоталамических структурах имеется только одна работа, в которой с помощью иммуногистохимического подхода показано наличие ТПГ-2-иммунопозитивных гранул в латеральном гипоталамусе, но при этом неясно, являются ли иммунопозитивные структуры окончаниями отростков серотонинергических нейронов, приходящих из среднего мозга, или они соответствуют экспрессирующим ТПГ-2 гипоталамическим нейронам различной эргичности [14]. Следует отметить, что вопрос об источниках серотонина в гипоталамусе и о возможности его синтеза серотонина в гипоталамических нейронах *de novo* остается открытым.

Целью работы было изучение экспрессии ТПГ-2 в среднем мозге и распределение ТПГ-2 в нейронах аркуатных, паравентрикулярных и супраоптических ядер гипоталамуса у мышей с диета-индуцированным ожирением (ДИО) и у агути-мышей с ожирением меланокортинового типа. Для исследования были выбраны два типа ожирения, различающихся по этиологии и патогенезу – ожирение у мышей линии C57Bl/6J (*a/a*), индуцированное комбинированной высокожировой и высокоуглеводной диетой, сходное с абдоминальным ожирением у человека [13], и генетически-обусловленное ожирение у агути-мышей, вызванное мутацией в локусе *agouti* (*Ay/a*), результатом которой является повышенная экспрессия агути-сигнального пептида, эндогенного ингибитора меланокортиновых рецепторов, опосредующих анорексигенные эффекты α -меланоцитстимулирующего гормона [15]. Для мечения нейронов в аркуатных ядрах гипоталамуса использовали антитела к проопиомеланокортину (ПОМК), прекурору анорексигенных пептидов меланокортинового семейства, который интенсивно экспрессируется в этой области гипоталамуса [15, 16]. Для иммуномечения нейронов в паравентрикулярном и супраоптическом ядрах гипоталамуса, где локализованы тела вазопрессин-иммунопозитивных нейронов (нейросекреторных клеток), использовали антитела к вазопрессину [17].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований. Все эксперименты проводили в соответствии с правилами, разработанными Комитетом по биоэтике ИЭФБ РАН (15.02.2018 г.), правилами и требованиями, изложенными в документах “European Communities Council Directive (2010/63/ЕЕС) и правилами, изложенными в “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”. На проведение экспериментов получено разрешение Комитета по биоэтике ИЭФБ РАН.

В экспериментах использовали виргинных самок мышей C57Bl/6J (*a/a*) и самок агути-мышей C57Bl/6J (*Ay/a*), генетически предрасположенных к ожирению. Возраст животных в начале эксперимента во всех группах составил четыре месяца. Мыши C57Bl/6J (*a/a*) были получены из питомника Рапполово (Ленинградская область, Россия), агути-мыши – из вивария Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия). После двух недель адаптации мыши C57Bl/6J (*a/a*) были разделены на две группы – контроль, который содержали на стандартном сухом корме (контроль-1), и ДИО-мыши, которые получали высококалорийную диету в течение 16 недель (группа ДИО). Высококалорийная диета включала животный жир, обогащенный насыщенными жирными кислотами (свиное сало), и 30%-ный раствор сахарозы, который животным давали вместо питьевой воды. Агути-мыши (*Ay/a*) и контрольные для них мыши C57Bl/6J генотипа *a/a* того же возраста (контроль-2) содержались на стандартной диете.

Уровни инсулина и лептина в крови, взятой из сердца животных в конце эксперимента, определяли с помощью наборов Mouse Insulin ELISA (Merckodia AB, Швеция) и ELISA Kit for Leptin (Cloud-Clone Corp., США). Уровень глюкозы в крови после ее забора из хвостовой вены измеряли с помощью глюкометра Life Scan Johnson & Johnson (Дания) и тест-полосок One Touch Ultra (США). Нагрузку глюкозой осуществляли из расчета 2 г/кг массы тела животного после шестичасового голодания, и оценивали уровень глюкозы через 120 мин после нагрузки, как описано ранее [18].

Для изучения оценки экспрессии гена *Tph2*, кодирующего ТПП-2 (NM_173391.3), в гипоталамусе и среднем мозге использовали ПЦР в реальном времени, сопряженную с обратной транскрипцией (ОТ), для приготовления которой использовали 1 мкг общей РНК и набор RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Протокол реакции и используемые реактивы были описаны ранее [15]. Амплификацию осуществляли в 96-луночных планшетах в смеси (25 мкл), содержащей 10 нг ОТ-продукта из ткани среднего мозга или 20 нг ОТ-продукта из ткани гипоталамуса, по 0.4 мкМ прямого и обратного праймеров, а также реакционной смеси с красителем SYBR Green и референсным красителем ROX (qPCRmix-HS SYBR + LowROX, Eurogen, Россия). Каждую пробу повторяли 3 раза. Для определения экспрессии гена *Tph2* использовали праймеры, синтезированные фирмой Eurogen (Россия) – CAATCGAGTTCGGCCTTTGCG (For) и GCGTCCTGAAAGGTGGTGAT (Rev). В качестве референсных использовали ген *Hprt1* (KR817915), кодирующий гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазу – AGCCGACCGTTCCTGTCAT (For) и GGTCATAACCTGGTTCATCATCAC (Rev), а также ген *18s* рибосомальной РНК (NR_003278) – GGGAGCCTGAGAAACGGC (For) и GG-GTCGGGAGTGGGTAATTT (Rev). Амплификационный сигнал детектировали с помощью амплификатора 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies ABI, США). Количественный анализ относительного уровня мРНК проводили с помощью метода delta-delta Ct.

Концентрацию серотонина (5-НТ) и его метаболита 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК) в гипоталамусе мышей *Ay/a* с ожирением и контрольных для

них мышей генотипа *a/a* определяли с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с электрохимической детекцией на хроматографе Beckman Coulter (США) [19]. Хроматографическая система включала инжектор Rheodyne 7125 с петлей объемом 20 мкл, колонку Phenomenex (250.0 × 4.6 мм) с сорбентом Sphere Clone 5 и ODS(2) и амперометрический детектор LC-4C BAS. Определение концентраций исследуемых веществ проводили при потенциале +0.70 В. Подвижная фаза включала 5.5 мМ цитратно-фосфатного буфера, содержащего 0.7 мМ октансульфоновой кислоты, 0.5 мМ ЭДТА и 8% ацетонитрила (рН 3.0). Скорость элюции подвижной фазы составила 1 мл/мин, время анализа одной пробы – около 20 мин. Результаты представлены в процентах относительно контрольного, принятого за 100%, уровня серотонина и 5-ГИУК в гипоталамусе мышей генотипа *a/a*.

Для иммуногистохимических исследований ($n = 4$ в каждой группе) мышей анестезировали хлоралгидратом (400 мг/кг, в/б), транскраниально перфузировали 0.1 М Na^+ -фосфатным буфером (PB, рН 7.4) и раствором 4%-ного параформальдегида в 0.2 М PB. Мозг дофиксировали в течение ночи в том же фиксаторе (4°C), для криопротекции помещали в 30%-ный раствор сахарозы в 0.02 М PB с 0.9% NaCl (PBS, рН 7.4) и через 3 суток замораживали с помощью изопентана при –42°C. Из области гипоталамуса были приготовлены фронтальные срезы мозга толщиной 16 мкм с помощью криостата Leica CM-1510 (Leica, Германия), которые монтировали на стеклах. На срезах мозга контрольных мышей (контроль-1 и контроль-2), ДИО-мышей и агути-мышей (*Au/a*) проводили двойное флуоресцентное иммуномечение, для чего использовали ранее разработанный протокол [15]. Для блокировки неспецифического связывания перед нанесением блокирующего раствора проводили преинкубацию в течение 30 мин в 100 мМ растворе глицина, разведенного в PBS. Для реакции использовали смесь первичных антител кролика к ТПГ-2 (Millipore Corp., США; 1 : 500) с антителами мыши к ПОМК (Abscam, Великобритания; 1 : 1000) или вазопрессину (антитела любезно предоставлены профессором Harold Gainer, NIH, США; 1 : 1000). Также использовали смесь вторичных антител (Invitrogen, США; 1 : 1000), конъюгированных с различными флуорохромами – цыпленка против Ig кролика – Alexa-488 и осла против Ig мыши – Alexa-568. После промывки в PBS срезы инкубировали в течение 2 мин с красителем DAPI (Sigma, США; 1 : 2000), промывали, заключали под покровное стекло с помощью среды Mowiol (Sigma, США) и хранили при 4°C до ее полимеризации. Специфичность иммуногистохимической реакции проверяли с помощью негативного контроля (реакции без первичных или вторичных антител).

Анализ флуоресцентного иммуномечения проводили с помощью конфокального микроскопа DMI6000 и лазерной установки SP5 II (Leica Microsystems, Германия). Последовательное сканирование проводили с помощью иммерсионного объектива х63, лазеров с длиной волны возбуждения 488 и 568 нм. Съемку структур соответствующей контрольной и экспериментальной групп производили парами при одинаковых установках при максимальной интенсивности свечения по Z-позиции.

Интенсивность свечения ТПГ-2 в нейронах анализировали количественно с помощью пакета программ Leica LAS AF. Для анализа выбирали нейроны, в которых область, где локализовано ядро, располагалась в центре и была окружена перикарионом. Значения интенсивности свечения нормировали по их значениям в контроле. Изображения с DAPI анализировали с помощью микроскопа Carl Zeiss Axio Imager A1 с флуоресцентной установкой (HB-100) (Carl Zeiss, Германия), что было необходимо для подтверждения локализации ТПГ-2 в перикарионе исследуемых нейронов.

Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, США). Оценку нормальности распределения

Таблица 1. Масса тела, уровни глюкозы, инсулина и лептина у мышей с различными моделями ожирения в сравнении с контрольными животными**Table 1.** The body weight and the glucose, insulin and leptin levels in mice with different models of obesity as compared to control animals

Показатель Indicators	Контроль-1, C57Bl/6J, <i>n</i> = 10 Control-1, C57Bl/6J	ДИО-мыши, C57Bl/6J, <i>n</i> = 10 DIO mice, C57Bl/6J	Контроль-2, C57Bl/6J, <i>n</i> = 11 Control-2, C57Bl/6J	Агути-мыши C57Bl/6J (<i>Ay/a</i>), <i>n</i> = 11 Agouti mice, C57Bl/6J (<i>Ay/a</i>)
Масса тела, г Body weight, g	19.8 ± 0.7	24.4 ± 0.9 ^a	20.3 ± 1.0	38.8 ± 1.7 ^b
Глюкоза, мМ* Glucose, mM*	4.8 ± 0.4	6.7 ± 0.6 ^a	4.9 ± 0.5	11.2 ± 1.4 ^b
Глюкоза (120 мин), мМ** Glucose (120 min), mM**	4.9 ± 0.6	7.4 ± 0.4 ^a	4.9 ± 0.5	12.8 ± 1.3 ^b
Инсулин, нг/мл Insulin, ng/mL	0.36 ± 0.07	0.59 ± 0.07 ^a	0.31 ± 0.09	1.11 ± 0.22 ^b
Лептин, нг/мл Leptin, ng/mL	1.09 ± 0.21	2.43 ± 0.43 ^a	1.18 ± 0.17	12.97 ± 0.95 ^b

* – уровень постпрандиальной глюкозы, ** – уровень глюкозы через 120 мин после глюкозной нагрузки (2 г глюкозы на 1 кг массы тела).

Все значения представлены как $M \pm SD$. ^a – различия между контролем-1 и ДИО-мышами статистически значимы при $p < 0.05$; ^b – различия между контролем 2 и агути-мышами с генотипом *Ay/a* статистически значимы при $p < 0.05$.

* – the postprandial glucose level, ** – the glucose level 120 min after glucose loading (2 g/glucose per kg of body weight).

All values are presented as the $M \pm SD$. ^a – the differences between control-1 and DIO mice are significant at $p < 0.05$; ^b – the differences between control-2 and agouti mice with the *Ay/a* genotype are significant at $p < 0.05$.

данных проводили с использованием теста D'Agostino–Pearson. В случае нормального распределения ($\alpha = 0.05$) различия между группами результатов метаболических, биохимических и ПЦР-анализа оценивали с помощью непарного *t*-теста, а результатов иммуногистохимических исследований оценивали с помощью парного *t*-теста. Различия считали статистически значимые при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У ДИО- и агути-мышей имелись отчетливо выраженное ожирение, постпрандиальная гипергликемия, гиперинсулинемия и гиперлептинемия, что указывает на развитие у них метаболического синдрома с характерными для него нарушенной толерантностью к глюкозе и инсулиновой резистентностью (табл. 1). При этом метаболические нарушения у агути-мышей с генотипом *Ay/a* были выражены в значительно большей степени, чем у ДИО-мышей.

С помощью ПЦР в реальном времени было показано, что экспрессия гена *Trp2* в среднем мозге ДИО-мышей ($n = 6$) достоверно снижается по сравнению с контрольной группой ($n = 6$), в то время как в гипоталамусе экспрессия этого гена при ДИО не менялась (рис. 1А). У агути-мышей (*Ay/a*, $n = 7$) не было выявлено изменений экспрессии гена *Trp2* в среднем мозге по сравнению с соответствующим контролем ($n = 7$), в то время как его экспрессия в гипоталамусе повышалась (рис. 1В).

Эти данные указывают на различия в экспрессии гена *Trp2* в среднем мозге и гипоталамусе мышей с различными типами ожирения. Поскольку ТПГ-2 является основным ферментом синтеза серотонина в ядрах шва и других отделах мозга [10],

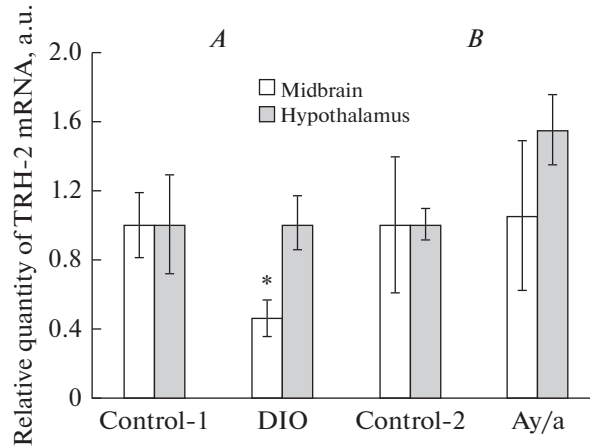


Рис. 1. Экспрессия гена *Trh2* в среднем мозге и гипоталамусе мышей C57BL/6J с диета-индуцированным ожирением (ДИО) (A) и мышей Agouti yellow (*Ay/a*) с меланокортиновым типом ожирения (B) по сравнению с соответствующими контрольными группами. * – достоверность отличий ($p < 0.05$).

Fig. 1. The expression of the *Trh2* gene in the midbrain and hypothalamus of C57BL/6J mice with diet-induced obesity (DIO) (A) and Agouti yellow (*Ay/a*) mice with the melanocortin type of obesity (B) as compared with the corresponding control groups. * – the difference is significance at the $p < 0.05$.

то имеются основания полагать, что выявленные изменения экспрессии гена *Trh2* будут коррелировать с изменениями уровня серотонина, который играет ключевую роль в контроле пищевого поведения и энергетического баланса. Для проверки этого с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ были оценены уровни серотонина и его основного метаболита 5-ГИУК в гипоталамусе агути-мышей. Показано, что как уровень серотонина, так и 5-ГИУК, в гипоталамусе агути-мышей ($n = 7$) были повышены в сравнении с контрольной группой ($n = 7$) при отсутствии значимых изменений в соотношении 5-ГИУК/5-НТ (рис. 2). Результаты количественного анализа уровня серотонина в гипоталамусе агути-мышей хорошо коррелирует с изменениями в этой области мозга экспрессии гена, кодирующего ТПГ-2.

Другими авторами при изучении овариэктомированных обезьян *Callithrix jacchus* из семейства игрунковых, находящихся на высокожировой диете, было показано небольшое снижение базального уровня экспрессии гена *Trh2* в среднем мозге и полное отсутствие в отличие от животных, находящихся на низкокалорийной диете, стимулирующего эффекта на нее эстрогенов, важнейших активаторов экспрессии гена *Trh2* в ЦНС [20]. У японских макаков, которые родились от матерей, находящихся на высокожировой диете, вне зависимости от того, находились ли они в дальнейшем, после молочного вскармливания, на нормальной или на высокожировой диете, отмечали достоверное снижение экспрессии гена *Trh2* в дорсальном ядре шва. Парадоксально, но у обезьян, родившихся от матерей, находящихся на нормальной диете и при этом получавших высокожировую диету, уровень экспрессии гена *Trh2* в этой области среднего мозга имел тенденцию к снижению, но статистически значимо от контрольной группы не отличался [21].

При изучении влияния ДИО на уровни ТПГ-2 у грызунов были получены следующие результаты. В мозге мышей, которые на протяжении семи недель получали высокожировую диету, экспрессия гена *Trh2* сохранялась на уровне, близком к таковому в контроле [22]. Содержание белка ТПГ-2 в ядре шва у крыс с ожирением, вызванным семинедельной высококалорийной диетой, статистически значимо

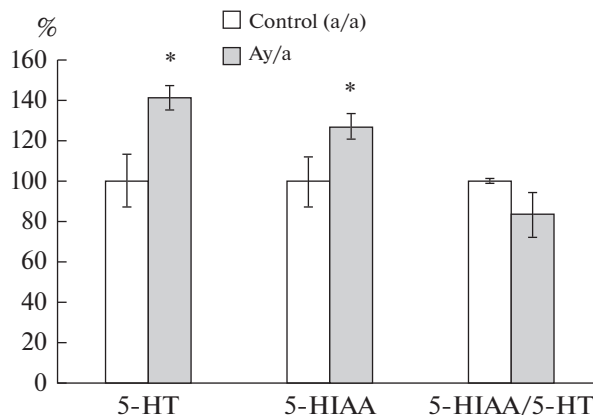


Рис. 2. Оцениваемое с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ содержание серотонина (5-НТ) и его метаболита 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-НИАА), а также их соотношение в гипоталамусе агути-мышей (*Ay/a*) с меланокортиновым ожирением в сравнении с контрольными мышами (*a/a*) того же возраста.

Данные представлены в процентах от контроля, * — достоверность различий между агути-мышьями и контрольной группой ($p < 0.05$).

Fig. 2. The content of serotonin (5-HT) and its metabolite 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), as well as their ratio in the hypothalamus of agouti mice (*Ay/a*) with the melanocortin obesity as compared to control mice (*a/a*) of the same age, estimated using reverse-phase HPLC.

The data are presented as a percentage of control, * — the difference between agouti mice and control group is significant at the $p < 0.05$.

также не отличалось от такового в контроле [23]. Следует, однако, отметить, что в обеих работах исследовали либо мозг в целом [22], либо только дорсальное и медианное ядра шва [23], в то время как мы изучали средний мозг. Необходимо обратить внимание на то, что содержание ТППГ-2 в дорсальном и медианном ядрах шва у обезьян в условиях нарушенного питания матерей менялось разнонаправленно — в дорсальном ядре шва оно снижалось, а в медианном ядре возрастало [21]. Выявленные нами различия между ДИО-мышьями и агути-мышьями в отношении изменений экспрессии гена *Trh2* в среднем мозге могут быть обусловлены тем, что в случае ДИО изменения являются результатом компенсаторной реакции уже сформированной серотонинергической системы мозга на избыточное потребление калорий, направленной на снижение гиперфагии. В случае же агути-мышья с генетически детерминированным меланокортиновым типом ожирения эти компенсаторные изменения могли произойти еще в раннем онтогенезе, что, как мы полагаем, и обуславливает нормальные значения экспрессии ТППГ-2 и синтеза серотонина в среднем мозге.

Обнаружение экспрессии гена, кодирующего ТППГ-2 в гипоталамусе, хотя и существенно менее выраженной в сравнении со средним мозгом, поставило перед нами задачу идентифицировать нейроны, экспрессирующие этот фермент в структурах гипоталамуса. Имеющиеся сведения о наличии активности ТППГ-2 и присутствии иммунопозитивных к этому ферменту гранул в гипоталамусе не позволяют ответить на вопрос — является ли это результатом локализации ТППГ-2 в отростках и окончаниях серотонинергических нейронов среднего мозга или это указывает на присутствие в гипоталамусе нейронов различной эргичности, способных экспрессировать ТППГ-2 [24, 14]. Нами с помощью двойного иммуномечения было впервые

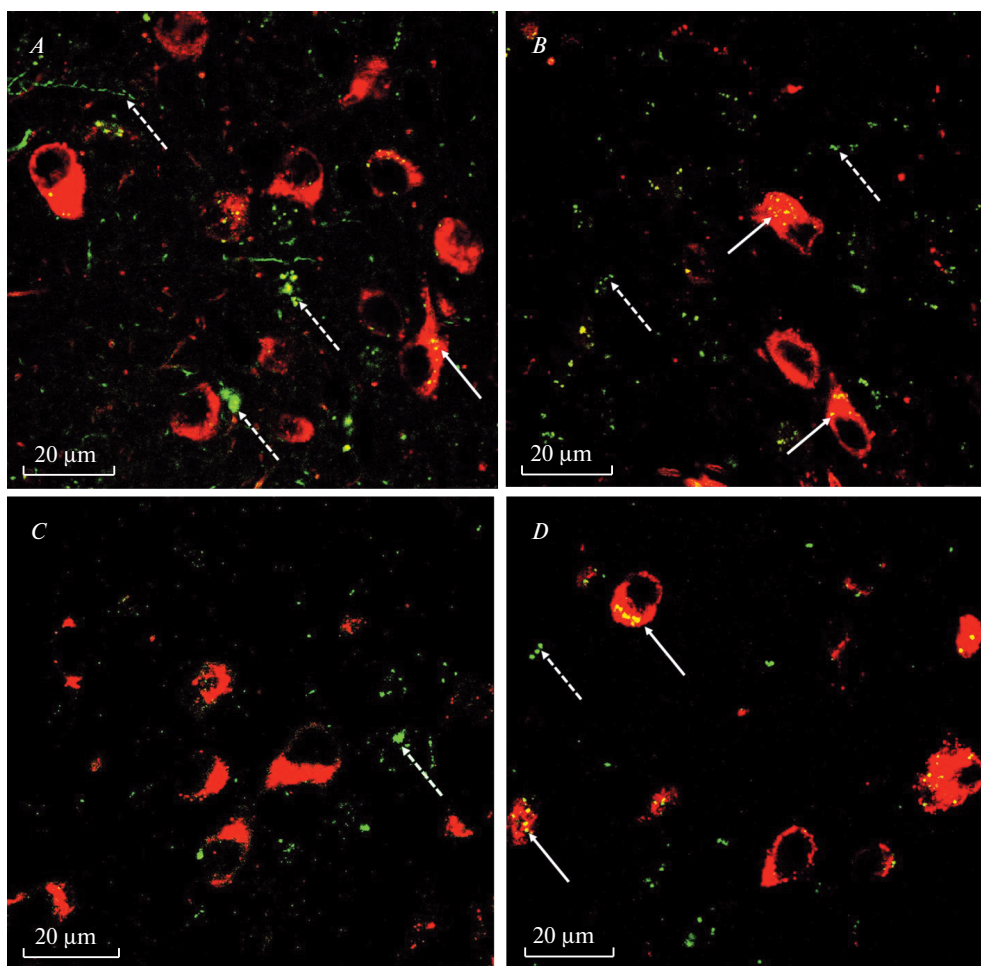


Рис. 3. Двойная иммуногистохимическая реакция к триптофангидроксилазе-2 и проопиомеланокортину в аркуатных ядрах гипоталамуса мышей.

A – контроль-1; *B* – ДИО; *C* – контроль-2; *D* – агути-мыши с генотипом *Ay/a*.

Представлено иммуномечение ТПГ-2 (зеленый) и ПОМК (красный). Сплошными стрелками отмечены иммунопозитивные к ТПГ-2 гранулы в телах ПОМК-иммунопозитивных нейронов, прерывистыми стрелками – иммунопозитивные к ТПГ-2 гранулы в других структурах аркуатных ядер. Масштаб – 20 мкм.

Fig. 3. Double immunohistochemical reaction to tryptophan hydroxylase-2 and proopiomelanocortin (POMC) in the arcuate nuclei of the mice hypothalamus.

A – control-1; *B* – DIO; *C* – control-2; *D* – agouti mice with the *Ay/a* genotype.

The immunolabeling of TRH-2 (green) and POMC (red) is presented. The solid arrows indicate the immunopositive granules for TRH-2 in the POMC-immunopositive neurons, and the dashed arrows indicate the immunopositive granules for TRH-2 in the other structures of the arcuate nuclei. The scale bars – 20 µm.

показано, что во всех изученных группах мышей в аркуатных ядрах гипоталамуса имелись иммунопозитивные к ТПГ-2 гранулы, в том числе локализованные в телах ПОМК-иммунопозитивных нейронов (рис. 3). В паравентрикулярных ядрах также отмечали ТПГ-2-иммунопозитивные гранулы, часть которых была расположена в

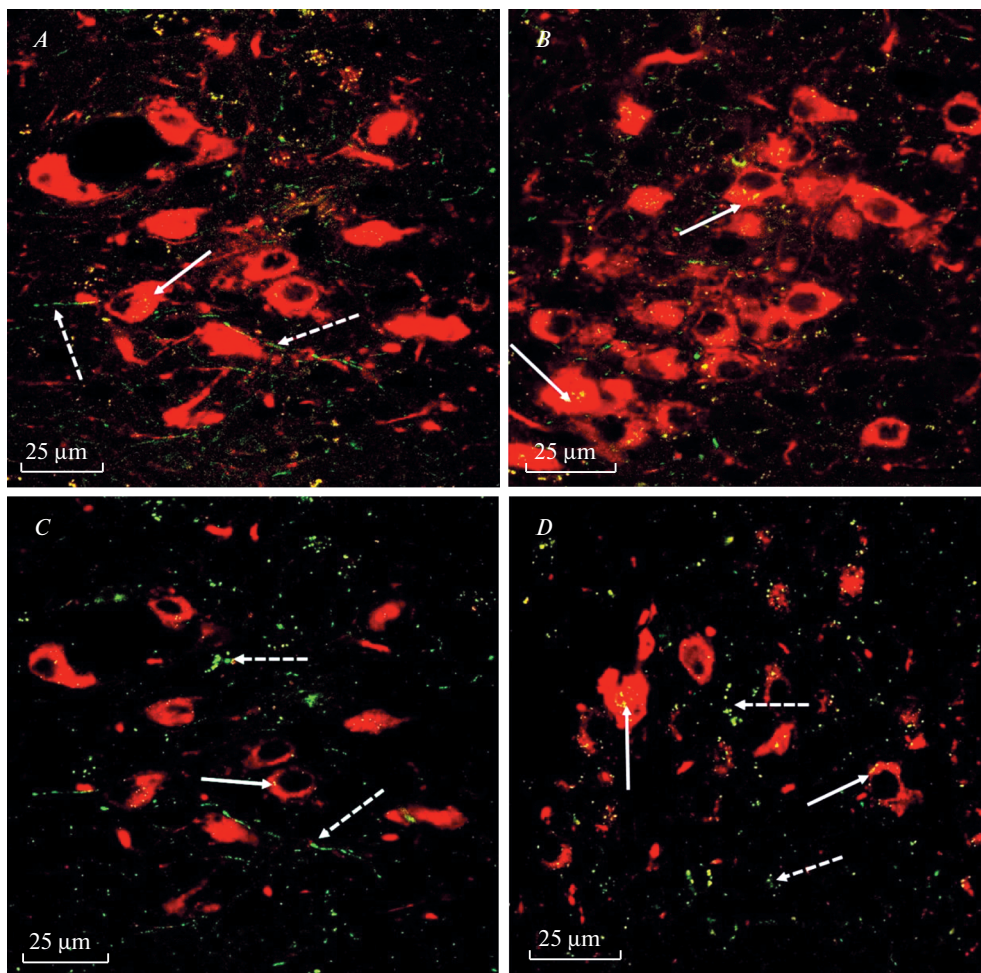


Рис. 4. Двойная иммуногистохимическая реакция к триптофангидроксилазе-2 и вазопрессину в паравентрикулярных ядрах гипоталамуса мышей.

A – контроль-1, *B* – ДИО, *C* – контроль-2, *D* – агути-мыши с генотипом *Ay/a*.

Представлено иммуномечение ТПГ-2 (зеленый) и вазопрессина (красный). Сплошными стрелками отмечены иммунопозитивные к ТПГ-2 гранулы в телах вазопрессин-иммунопозитивных нейронов, прерывистыми стрелками – иммунопозитивные к ТПГ-2 гранулы в других структурах паравентрикулярных ядер. Масштаб – 25 мкм.

Fig. 4. Double immunohistochemical reaction to tryptophan hydroxylase-2 and proopiomelanocortin (POMC) in the paraventricular nuclei of the hypothalamus of mice.

A – control-1; *B* – DIO; *C* – control-2; *D* – agouti mice with the *Ay/a* genotype.

The immunolabeling of TRH-2 (green) and POMC (red) is presented. The solid arrows indicate the immunopositive granules for TRH-2 in the vasopressin-immunopositive neurons, and the dashed arrows indicate the granules immunopositive for TRH-2 in the other structures of the paraventricular nuclei. The scale bars – 25 µm.

вазопрессин-иммунопозитивных нейронах (рис. 4). Сходная картина отмечалась и в супраоптических ядрах гипоталамуса (фотографии не приведены). Полученные данные свидетельствуют о том, что в различных гипоталамических структурах фер-

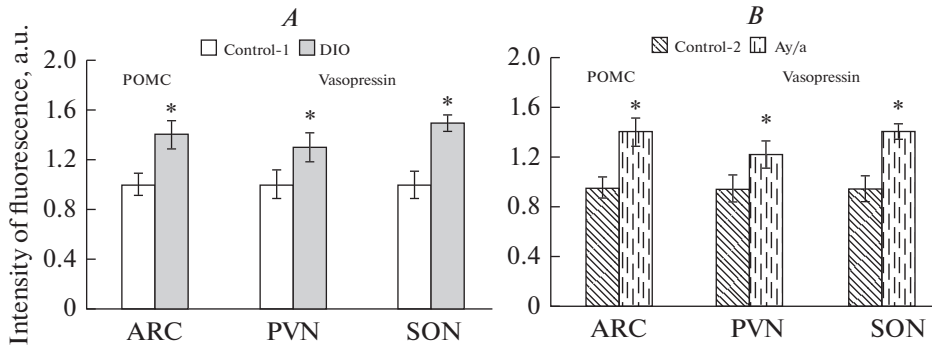


Рис. 5. Интенсивность свечения триптофангидроксилазы-2 в POMC- и вазопрессин-иммунопозитивных нейронах гипоталамуса мышей с ДИО (A) и с генетически обусловленным меланокортиновым ожирением (агути мыши с генотипом *Ay/a*) (B).

ARC, PVN и SON – аркуатные, паравентрикулярные и супраоптические ядра гипоталамуса. Данные представлены в условных единицах (у. ед.). * – различия между группой с ожирением и соответствующей контрольной группой статистически значимы при $p < 0.05$.

Fig. 5. The intensity of the luminescence of tryptophan hydroxylase-2 in the POMC- and vasopressin-immunopositive neurons of the hypothalamus of the mice with DIO (A) and genetically-induced melanocortin obesity (agouti mice with the *Ay/a* genotype) (B).

ARC, PVN, and SON are the arcuate, paraventricular, and supraoptic nuclei of the hypothalamus. The data are presented in arbitrary units (a. u.). * – the differences between the obese and corresponding control group are significant at $p < 0.05$.

мент ТПГ-2 может быть локализован не только в отростках и окончаниях нейронов среднего мозга (изолированные иммунопозитивные гранулы к ТПГ-2-антителам), но и в гипоталамических нейронах, экспрессирующих различные гипоталамические нейрогормоны – POMC, прекурсор меланокортиновых пептидов, и вазопрессин.

Далее с помощью двойного иммуномечения оценивали количество иммунопозитивных к ТПГ-2 гранул, локализованных в POMC- и вазопрессин-иммунопозитивных нейронах гипоталамуса, у ДИО- и агути-мышей в сравнении с контрольными животными. Показано, что у мышей с различными типами ожирения иммунопозитивность к ТПГ-2 в POMC-нейронах аркуатного ядра и в вазопрессин-иммунопозитивных нейронах паравентрикулярных и супраоптических ядер была выше, чем в контроле (рис. 3–5). В наибольшей степени такое повышение выявлялось в вазопрессин-иммунопозитивных нейронах супраоптических ядер, в наименьшей степени – в вазопрессин-иммунопозитивных нейронах паравентрикулярных ядер (рис. 5). Повышение экспрессии ТПГ-2 в гипоталамических нейронах может быть обусловлено необходимостью усиления серотониновой регуляции в гипоталамусе в условиях ожирения, направленной на снижение потребления высококалорийной пищи при ДИО и на ослабление орексигенных влияний, вызванных подавлением меланокортинового сигналинга в гипоталамусе при гиперэкспрессии агути-сигнального пептида, антагониста меланокортиновых рецепторов, у агути-мышей. Это согласуется с ролью серотонина как нейрогормона, ослабляющего орексигенные каскады в гипоталамусе [25, 26]. Как было показано нами ранее, в условиях ДИО и меланокортинового ожирения в гипоталамусе также повышается экспрессия серотониновых рецепторов 1В- и 2С-подтипов, в том числе на POMC-иммунопозитивных нейронах, что также указывает на компенсаторное

усиление серотонинового сигналинга в условиях ожирения [13]. Интраназальное введение крысам с ДИО серотонина или совместное введение мышам агонистов серотониновых рецепторов 1В- и 2С-подтипов снижает у них потребление пищи, что приводит к снижению массы тела животных и в случае ДИО-крыс нормализует их метаболические показатели [18, 27].

Таким образом, в гипоталамусе мышей C57Bl/6J выявлена экспрессия гена, кодирующего ТПГ-2, и с помощью двойного иммуномечения впервые показана локализация этого фермента в ПОМК-иммунопозитивных нейронах аркуатных ядер и в вазопрессин-иммунопозитивных нейронах паравентрикулярных и супраоптических ядер гипоталамуса. При ДИО и меланокортиновом ожирении количество ТПГ-2-иммунопозитивных гранул в ПОМК- и вазопрессин-иммунопозитивных нейронах повышалось, хотя экспрессия гена *Tph2* повышалась только у агути-мышей. В среднем мозге ДИО-мышей содержание ТПГ-2 снижалось, в то время как у агути-мышей оно не менялось. Эти результаты свидетельствуют о важной роли синтезируемого в гипоталамусе серотонина, который совместно с серотонином, поступающим в гипоталамус из среднего мозга, вовлечен в компенсаторные изменения гипоталамического сигналинга у мышей с ожирением и ассоциированными с ним метаболическими и гормональными расстройствами. Обнаружение гипоталамических ТПГ-2-иммунопозитивных нейронов различной эргичности, способных синтезировать серотонин, указывает на существование новых механизмов аутокринной и паракринной серотониновой регуляции в гипоталамусе, в том числе, реализуемых при ожирении.

Исследование проведено с использованием оборудования ЦКП ИЭФБ РАН.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено на средства государственного бюджета по госзаданию № АААА-А18-118012290427-7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Halliday G.M., Tork I.* Serotonin-like immunoreactive cells and fibres in the rat ventromedial mesencephalic tegmentum. *Brain Res. Bull.* 22: 725–735. 1989.
2. *Baker K.G., Halliday G.M., Hornung J.P., Geffen L.B., Cotton R.G., Tork I.* Distribution, morphology and number of monoamine-synthesizing and substance P-containing neurons in the human dorsal raphe nucleus. *Neuroscience.* 42: 757–775. 1991.
3. *Chen G.L., Novak M.A., Hakim S., Xie Z., Miller G.M.* Tryptophan hydroxylase-2 gene polymorphisms in rhesus monkeys: association with hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and in vitro gene expression. *Mol. Psychiatry.* 11(10): 914–928. 2006. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001870>
4. *Carkaci-Salli N., Salli U., Kuntz-Melcavage K.L., Pennock M.M., Ozgen H., Tekin I., Freeman W.M., Vrana K.E.* TPH2 in the ventral tegmental area of the male rat brain. *Brain Res. Bull.* 84(6): 376–80. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.01.006>
5. *Nezafati M.H., Eshraghi A., Vojdanparast M., Abtahi S., Nezafati P.* Selective serotonin reuptake inhibitors and cardiovascular events: A systematic review. *J. Res. Med. Sci.* 21: 66. 2016. eCollection 2016. <https://doi.org/10.4103/1735-1995.189647>
6. *Yabut J.M., Crane J.D., Green A.E., Keating D.J., Khan W.I., Steinberg G.R.* Emerging Roles for Serotonin in Regulating Metabolism: New Implications for an Ancient Molecule. *Endocr. Rev.* 40(4): 1092–1107. 2019. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00283>
7. *Bacqué-Cazenave J., Bharatiya R., Barrière G., Delbecque J-P., Bouguiyoud N., Di Giovanni G., Cattaert D., De Deurwaerdère P.* Serotonin in Animal Cognition and Behavior. *Int. J. Mol. Sci.* 21(5): E1649. 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21051649>
8. *Bamalan O.A., Al Khalili Y.* Physiology, Serotonin. *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020–2019.

9. *Walther D.J., Peter J.U., Bashammakh S., Hortnagl H., Voits M., Fink H., Bader M.* Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*. 299: 76. 2003.
10. *Heydendael W., Jacobson L.* Glucocorticoid status affects antidepressant regulation of locus coeruleus tyrosine hydroxylase and dorsal raphe tryptophan hydroxylase gene expression. *Brain Res*. 1288: 69–78. 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.06.082>
11. *Mosienko V., Bert B., Beis D., Matthes S., Fink H., Bader M., Alenina N.* Exaggerated aggression and decreased anxiety in mice deficient in brain serotonin. *Transl. Psychiatry*. 2(5): e122. 2012.
<https://doi.org/10.1038/tp.2012.44>
12. *Wang L., Han D., Yin P., Teng K., Xu J., Ma Y.* Decreased tryptophan hydroxylase 2 mRNA and protein expression, decreased brain serotonin concentrations, and anxiety-like behavioral changes in a rat model of simulated transport stress. *Stress*. 22(6): 707–717. 2019.
<https://doi.org/10.1080/10253890.2019.1625328>
13. *Mikhailova E.V., Romanova I.V., Derkach K.V., Vishnevskaya O.N., Shpakov A.O.* The Effect of Diet-Induced and Melanocortin Obesity on Expression of Tryptophan Hydroxylase 2 in the Dorsal Raphe Nucleus and Ventral Tegmental Area in Mice. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 55(4): 293–301. 2019.
<https://doi.org/10.1134/S0022093019040057>
14. *Clark J.A., Flick R.B., Pai L.Y., Szalayova I., Key S., Conley R.K., Deutch A.Y., Hutson P.H., Mezey E.* Glucocorticoid modulation of tryptophan hydroxylase-2 protein in raphe nuclei and 5-hydroxytryptophan concentrations in frontal cortex of C57/Bl6 mice. *Mol. Psychiatry*. 13(5): 498–506. 2008.
<https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002041>
15. *Romanova I.V., Derkach K.V., Mikhrina A.L., Sukhov I.B., Mikhailova E.V., Shpakov A.O.* The leptin, dopamine and serotonin receptors in hypothalamic POMC-neurons in normal and obese rodents. *Neurochem. Res*. 43(4): 821–837. 2018.
<https://doi.org/10.1007/s11064-018-2485-z>
16. *Bagnol D., Lu X.Y., Kaelin C.B., Day H.E., Ollmann M., Gantz I., Akil H., Barsh G.S., Watson S.J.* Anatomy of an Endogenous Antagonist: Relationship between Agouti-Related Protein and Proopiomelanocortin in Brain. *J. Neurosci.* 19: 1–7. 1999.
17. *Altstein M., Gainer H.* Differential biosynthesis and posttranslational processing of vasopressin and oxytocin in rat brain during embryonic and postnatal development. *J. Neurosci.* 8: 3967–3977. 1988.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-11-03967.1988>
18. *Derkach K., Zakharova I., Zorina I., Bakhtyukov A., Romanova I., Bayunova L., Shpakov A.* The evidence of metabolic-improving effect of metformin in Ay/a mice with genetically-induced melanocortin obesity and the contribution of hypothalamic mechanisms to this effect. *PLoS One*. 14(3), e0213779. 2019.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213779>
19. *Krasnova I.N., Bychkov E.R., Lioudyno V.I., Zubareva O.E., Dambinova S.A.* Intracerebroventricular administration of substance P increases dopamine content in the brain of 6-hydrodopamine lesioned rats. *Neuroscience*. 95(1): 113–117. 2000.
20. *Bethea C.L., Reddy A.P., Flowers M., Shapiro R.A., Colman R.J., Abbott D.H., Levine J.E.* High fat diet decreases beneficial effects of estrogen on serotonin-related gene expression in marmosets. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 58: 71–80. 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.11.008>
21. *Thompson J.R., Valleau J.C., Barling A.N., Franco J.G., De Capo M., Bagley J.L., Sullivan E.L.* Exposure to a High-Fat Diet during Early Development Programs Behavior and Impairs the Central Serotonergic System in Juvenile Non-Human Primates. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 8: 164. 2017.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00164>
22. *Pan Q., Liu Q., Wan R., Kalavagunta P.K., Liu L., Lv W., Qiao T., Shang J., Wu H.* Selective inhibition of intestinal 5-HT improves neurobehavioral abnormalities caused by high-fat diet mice. *Metab. Brain Dis.* 34(3): 747–761. 2019.
<https://doi.org/10.1007/s11011-019-0392-x>
23. *Park S., Harrold J.A., Widdowson P.S., Williams G.* Increased binding at 5-HT(1A), 5-HT(1B), and 5-HT(2A) receptors and 5-HT transporters in diet-induced obese rats. *Brain Res*. 847(1): 90–97. 1999.
24. *Deguchi T., Barchas J.* Regional distribution and developmental change of tryptophan hydroxylase activity in rat brain. *J. Neurochem.* 19 (3): 927–929. 1972.
25. *Burke L.K., Doslikova B., D'Agostino G., Garfield A.S., Farooq G., Burdakov D., Low M.J., Rubinstein M., Evans M.L., Billups B., Heisler L.K.* 5-HT obesity medication efficacy via POMC activation is maintained during aging. *Endocrinology*. 155 (10): 3732–3738. 2014.
26. *Shpakov A.O., Derkach K.V., Berstein L.M.* Brain signaling systems in the type 2 diabetes and metabolic syndrome: promising target to treat and prevent these diseases. *Future Sci. OA*. 1(3): FSO25. 2015.
<https://doi.org/10.4155/fso.15.23>
27. *Doslikova B., Garfield A.S., Shaw J., Evans M.L., Burdakov D., Billups B., Heisler L.K.* 5-HT_{2C} receptor agonist anorectic efficacy potentiated by 5-HT_{1B} receptor agonist coapplication: an

effect mediated via increased proportion of pro-opiomelanocortin neurons activated. *J. Neurosci.* 33 (23): 9800–9804. 2013.

The Effect of the Diet-Induced and Melanocortine-Type Obesity on the Expression of Tryptophan Hydroxylase 2 in Midbrain and Hypothalamus of Mice

E. V. Mikhailova^a, D. L. Sviridova^a, I. V. Romanova^{a,*},
K. V. Derkach^a, and A. O. Shpakov^a

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

**e-mail: irinaromanova@mail.ru*

The brain serotonin system plays a key role in the regulation of behavior and cognitive functions, but also in the control of food intake and energy metabolism. This involves the serotonergic midbrain neurons expressing the type 2 tryptophan hydroxylase (TPH-2), which catalyzes the synthesis of serotonin, and the hypothalamic neurons expressing the serotonin receptors. Currently, the changes in the expression and distribution of TPH-2 in midbrain neurons in obesity remain poorly understood. Along with this, it is assumed that serotonin can also be synthesized in the hypothalamic neurons, affecting the serotonin system within the hypothalamus, but there are no data on the expression and possible localization of TPH-2 in the hypothalamic neurons. The aim of the work was to study the TPH-2 expression in the midbrain and its distribution in the neurons of the arcuate, paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in mice with diet-induced obesity (DIO) and in agouti mice with genetically-induced obesity of the melanocortin type. The TPH-2 gene expression was detected in the hypothalamus of C57Bl/6J mice, and the double immunolabeling showed the localization of this enzyme in proopiomelanocortin (POMC)-immunopositive neurons and paraventricular of the arcuate nuclei and in vasopressin-immunopositive neurons of the paraventricular and supraoptic nucleus. In both types of obesity, the number of TPH-2-immunopositive granules in the POMC- and vasopressin-immunopositive neurons was increased, although the expression of the *Tph2* gene was increased only in agouti mice. In the midbrain of DIO mice, the content of TPH-2 was decreased, while in agouti mice it did not change. These results indicate the important role of serotonin synthesized in the hypothalamus, which, together with serotonin coming from the midbrain, is involved in the compensatory changes of hypothalamic signaling in obesity. The detection of TPH-2-immunopositive hypothalamic neurons of different types, capable of synthesizing serotonin, indicates the existence of new mechanisms of the autocrine and paracrine serotonin regulation in the hypothalamus, including the obesity conditions.

Keywords: serotonin, tryptophan hydroxylase-2, midbrain, hypothalamus diet-induced obesity, agouti mouse

ЦИТИРОВАТЬ:

Михайлова Е.В., Свиридова Д.Л., Романова И.В., Деркач К.В., Шпаков А.О. Влияние диет-индуцированного и меланокортинового ожирения на экспрессию триптофангидроксилазы 2 в нейронах среднего мозга и гипоталамуса мышей. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 106(10): 1238–1250.

DOI: 10.31857/S0869813920100064

TO CITE THIS ARTICLE:

Mikhailova E.V., Sviridova D.L., Romanova I.V., Derkach K.V., Shpakov A.O. The Effect of the Diet-Induced and Melanocortine-Type Obesity on the Expression of Tryptophan Hydroxylase 2 in Midbrain and Hypothalamus of Mice. *Russian Journal of Physiology.* 106(10): 1238–1250.

DOI: 10.31857/S0869813920100064