

Регуляция потребления пищи в период беременности и лактации у мышей со сниженной активностью меланокортиновой системы

Е.Н. Макарова¹, И.В. Романова², Н.М. Бажан^{1, 3}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Активация меланокортиновых рецепторов (МКР) в гипоталамусе подавляет аппетит. Белок, родственник агутти (AgRP), и нейропептид Y (NPY) коэкспрессируются в нейронах гипоталамуса и повышают аппетит: NPY – через свои рецепторы на МКР-нейронах, AgRP связывается с МКР и вызывает их инактивацию. У нерожавших мышей генетическая блокада МКР (мутация *yellow* в локусе *agouti* *A^y*) повышает потребление пищи. Остается невыясненной роль МКР в регуляции аппетита в период беременности и лактации, когда потребление пищи значительно возрастает. В этой работе у мышей линии C57Bl/6J *a/a* (контроль) и *A^y/a* генотипов изучали экспрессию AgRP (меланокортиновая регуляция) и NPY (немеланокортиновая регуляция) в гипоталамусе в период беременности (7, 13, 18-й дни) и лактации (10-й и 21-й дни) и сопоставили ее с потреблением пищи. У виргинных *A^y/a* (блокада МКР) самок по сравнению с *a/a* самками потребление пищи было повышено, уровень мРНК и иммунореактивность AgRP понижены. Динамика возрастания потребления пищи по ходу беременности различалась у *A^y/a* и *a/a* мышей. Уровень мРНК NPY возрастал только у *a/a* самок, а уровень мРНК AgRP – у самок обоих генотипов, но у *A^y/a* был ниже, чем у контрольных. После родов потребление пищи, уровни мРНК нейропептидов и иммунореактивность AgRP в гипоталамусе не различались у *A^y/a* и *a/a* самок, экспрессия AgRP у лактирующих *A^y/a* самок была выше, чем у виргинных. Полученные результаты показывают, что блокада МКР снижает экспрессию AgRP у нерожавших самок мышей, беременность уменьшает, а лактация устраняет этот эффект. Повышение потребления пищи во время беременности связано с активацией синтеза NPY и AgRP и проведением орексигенного сигнала через МКР. Гиперфагия лактации не зависит от инактивации МКР-рецепторов.

Ключевые слова: *A^y* мыши; потребление пищи; беременность; лактация; меланокортиновые рецепторы; NPY; AgRP.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Макарова Е.Н., Романова И.В., Бажан Н.М. Регуляция потребления пищи в период беременности и лактации у мышей со сниженной активностью меланокортиновой системы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(2):138-144. DOI 10.18699/VJ16.124

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Makarova E.N., Romanova I.V., Bazhan N.M. Food intake regulation during pregnancy and lactation in mice with reduced activity of the melanocortin system. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(2):138-144. DOI 10.18699/VJ16.124

УДК 599.32:591.23+616-006.81.04
Поступила в редакцию 15.10.2015 г.
Принята к публикации 30.11.2015 г.
© АВТОРЫ, 2016

Food intake regulation during pregnancy and lactation in mice with reduced activity of the melanocortin system

E.N. Makarova¹, I.V. Romanova², N.M. Bazhan^{1, 3}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, RAS, St. Petersburg, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Hypothalamic melanocortin receptor (MCR) activation inhibits appetite. Neuropeptide Y (NPY) and Agouti Related Protein (AgRP) are coexpressed in some hypothalamic neurons and stimulate feeding, NPY via inhibition of MCR-expressing neurons, and AgRP via MCR4 antagonism. Mutation *yellow* at the mouse *agouti* locus (*A^y*) evokes MCR blockage and stimulates appetite in nulliparous females. The role of MCRs in food intake regulation during pregnancy and lactation is unclear. In this study we measured hypothalamic AgRP and NPY mRNA levels in virgin and mated C57Bl/6J *a/a* (control) and *A^y/a* females on days 7, 13, 18 of pregnancy, 10, 21 of lactation, and after offspring separation, AgRP immunoreactivity in virgin and lactating females, and correlated gene expression with food intake (FI). Virgin *A^y/a* compared to *a/a* females had higher FI and lower AgRP expression. Pregnant *A^y/a* and *a/a* mice showed different patterns of food intake and neuropeptide expressions. NPY mRNA levels increased during pregnancy only in *a/a* mice, while AgRP mRNA levels increased in both genotypes being lower in *A^y/a* than in *a/a* mice. In lactating *A^y/a* and *a/a* mice, AgRP expression and NPY mRNA level were similar. AgRP expression was higher in lactating than in virgin *A^y/a* mice. The results obtained demonstrate that in non-breeding female mice, MCR blockage is associated with AgRP expression inhibition which vanishes in lactation. In lactation, hyperphagia is independent of MCR blockage. In pregnancy, food intake regulation involves MCR signaling and activation of NPY and AgRP expression.

Key words: *A^y* mice; food intake; pregnancy; lactation; melanocortin receptors; NPY; AgRP.

Исследования механизмов поддержания энергетического гомеостаза приобрели особую актуальность в связи с широким распространением метаболических заболеваний, таких как ожирение и диабет. Как правило, ожирение развивается на фоне повышенного потребления пищи (гиперфагия) и сниженного расхода энергии (Konturek et al., 2005). Беременность и особенно лактация характеризуются выраженной гиперфагией, что может служить фактором, провоцирующим развитие ожирения. В период лактации потребление пищи возрастает в несколько раз по сравнению с нормой (Makarova et al., 2010). Регуляторные механизмы повышения аппетита у беременных и кормящих самок изучены недостаточно (Woodside et al., 2012). Исследования в этой области направлены в основном на изучение функции меланокортиновой системы.

Меланокортиновая система мозга считается одной из основных (если не основной) системой, задействованной в регуляции потребления и расхода энергии (Mountjoy, 2015). Она включает в себя нейроны, экспрессирующие меланокортиновые рецепторы 3-го и 4-го типа (МКР3, МКР4), представленные в различных областях мозга (Mountjoy et al., 1994), а также две субпопуляции нейронов, локализованные в аркуатном ядре гипоталамуса (АРК), которые секретируют лиганды этих рецепторов. Одна субпопуляция нейронов синтезирует меланоцитстимулирующий гормон (МСГ), предшественником которого является проопиомеланокортин (ПОМК), другая – белок, родственник агуты (Agouti gene Related Protein, AgRP), и нейропептид Y (NPY). МСГ и AgRP конкурируют за связывание с МКР и оказывают противоположное действие на баланс энергии: связывание МСГ с МКР4 активирует нейрональные пути, приводящие к снижению потребления пищи и увеличению расхода энергии, тогда как связывание AgRP с этим рецептором, напротив, увеличивает потребление пищи и снижает расход энергии (Mountjoy, 2015). NPY через собственные рецепторы ингибирует МКР4-экспрессирующие нейроны, что также увеличивает аппетит (Sternson, Atasoy, 2014).

Показано, что у кормящих самок крыс (Mann et al., 1997; Suzuki et al., 2014) снижена экспрессия ПОМК и повышена экспрессия AgRP и NPY в нейронах гипоталамуса, что, по мнению авторов, и вызывает гиперфагию, поскольку это приводит к инактивации МКР и повышению аппетита. Однако генетическая блокада МКР, которую вызывает мутация *yellow* в локусе *aguti* (A^y) у мышей, не оказывает влияния на потребление пищи в период лактации (Makarova et al., 2010). Это говорит о том, что у лактирующих самок повышение аппетита не связано с проведением сигнала через МКР.

Оптогенетические исследования меланокортиновой системы продемонстрировали, что снижение потребления пищи, вызванное фотостимуляцией ПОМК нейронов, связано с проведением сигнала через МКР, тогда как увеличение в потреблении пищи, вызванное фотостимуляцией AgRP/NPY-синтезирующих нейронов, не зависит от меланокортиновых рецепторов (Aronne et al., 2011). Возможно, отсутствие влияния генетической блокады МКР на потребление пищи в период лактации связано с независимой от МКР активностью AgRP/NPY нейронов гипоталамуса.

Целью настоящей работы было изучение гипоталамической экспрессии AgRP и NPY и сопоставление ее с потреблением пищи у мышей с мутацией A^y в период беременности и лактации.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. Эксперименты проводились в соответствии с российскими (Приказ МЗ СССР от 12.08.1977 г. № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных») и Международными европейскими биоэтическими стандартами (86/609-ЕЕС) по содержанию и обращению с лабораторными животными.

В работе использовали мышей линии C57Bl/6J, несущих мутацию *yellow* в локусе *aguti* (A^y/a генотип) из вивария Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск). Контролем служили мыши стандартного линейного *aguti* генотипа (a/a) этой линии. Животных кормили гранулированным кормом для конвенционального содержания и разведения (ЗАО «Ассортимент – Агро», Москва, Сергиев Посад, Россия), содержали при режиме освещения 12 ч свет : 12 ч темнота и свободном доступе к воде и пище.

Потребление пищи. Самок в возрасте 8–9 нед спаривали с самцами, покрытие регистрировали по вагинальной пробке, день обнаружения пробки считали нулевым днем беременности. Покрытых самок содержали поодиночке и ежедневно измеряли потребление пищи в течение всей беременности и первых десяти дней после родов. Детенышей отсаживали в возрасте 4 нед, у самок после отсадки детенышей измеряли недельное потребление пищи в течение 3 нед.

Измерение уровня мРНК AgRP и NPY и иммунореактивности AgRP в гипоталамусе. Покрытых самок умерщвляли декапитацией на 7-, 13-, 18-й дни беременности, 10- и 21-й дни после родов и через три недели после отсадки детенышей. Извлекали гипоталамусы и помещали в жидкий азот. Для сравнения использовали виргинных самок в возрасте 8–10 нед. В каждую контрольную или экспериментальную группу входило не менее шести особей.

Уровень мРНК NPY и AgRP оценивали методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) как отношение количества мРНК исследуемого гена к количеству мРНК β -актина мыши.

Проведение ОТ-ПЦР. Из гипоталамуса выделяли общую РНК, используя TRI reagent (Sigma, США), согласно инструкции. Для обратной транскрипции использовали M-MuLV обратную транскриптазу (НПО «СибЭнзим») и олиго-dT в качестве праймера, в пробу вносили один мкг общей РНК.

С помощью электрофореза в агарозном геле оценивали количество амплифицированных фрагментов кДНК NPY и AgRP по отношению к фрагменту мышинового β -актина. Электрофорез продуктов ПЦР для обоих нейропептидов и β -актина проводили в одном геле в стандартных условиях, окрашивали гели бромистым этидием, детекцию свечения в УФ проводили в стандартных условиях, для оценки оптической плотности бэндов использовали про-

грамму GelPro. Для каждого образца РНК проводили по две реакции обратной транскрипции, для каждого образца кДНК – по две ПЦР, в результате чего значение экспрессии для каждой особи рассчитывалось как среднее из четырех. В качестве праймеров для ПЦР использовали для NPY смысловой 5'-tggttgaggcattctggctgagg-3', антисмысловой 5'-ttctggggcggtttctgtgct-3' (Shimokawa et al., 2002); для AgRP – смысловой 5'-gaaggcctgaccaggctctgttcc-3', антисмысловой 5'-tttgatgtcacgcacgatttccc-3'; для β -актина – смысловой 5'-gtgggcccgccttaggcaccag-3', антисмысловой 5'-ctcttgatgtcacgcacgatttcc-3' (Ziotopoulou et al., 2000).

Уровень AgRP в аркуатном (АРК) и паравентрикулярном (ПВЯ) ядрах гипоталамуса у лактирующих самок (с 7-го по 14-й дни лактации) и у виргинных самок (соответствующего возраста) оценивали с помощью иммуногистохимии. В каждую экспериментальную группу вошло по пять самок. Животные были подвергнуты острому эфирному наркозу и перфузированы транскардиально 0,1 М фосфатным буфером и 4 %-м параформальдегидом. Этапы обработки материала для иммуногистохимического исследования были описаны ранее (Mikhrina, Romanova, 2015). Исследования проведены на фронтальных свободно плавающих срезах мозга толщиной 20 мкм, приготовленных с помощью криостата (Leika, Германия). Каждый десятый срез был окрашен толлуидиновым синим для идентификации паравентрикулярного и аркуатного ядер гипоталамуса, согласно атласу мозга мыши (Paxinos, Franklin, 2001).

Для выявления AgRP-иммунопозитивных структур был использован каждый четвертый срез гипоталамуса. После предварительной обработки и блокировки эндогенной пероксидазы в растворе 0,3 %-й перекиси водорода, разведенной на 100 %-м метаноле, срезы инкубировали 48 ч при +4 °C с антителами кролика к AGRP 83-132 (Phoenix Inc., CA, США) в разведении 1 : 1000. Затем были использованы вторичные антитела козы против кролика, конъюгированные с биотином (VectorLab., США, 1 : 300) и комплекс стрептавидин-пероксидаза (Sigma, США, 1 : 1000).

Визуализацию реакции проводили 0,05 %-м диаминобензидином с 0,015 %-й перекисью водорода. Срезы натягивали на стекла, покрытые желатином, высушивали при комнатной температуре и после стандартной гистологической обработки заключали под покровное стекло с помощью прозрачной среды Bio-maunt (Bio-Optica, Италия). Для проверки специфичности антител были проведены негативные контроли (реакции без первых или вторых антител).

Изображения структур на препаратах мозга были получены с помощью микроскопа Zeiss (Imager A1, Германия) со встроенной телевизионной камерой и программы Axio-Vision 4.8. На снимках с помощью программы Scion Imager (NIH, 4.1) была определена оптическая плотность (ОП) иммунореактивного вещества (на 1 мкм²).

Статистическая обработка. Для оценки влияния сроков беременности или лактации на потребление пищи использовали двухфакторный дисперсионный анализ (2-way ANOVA) с градациями факторов «генотип самки (*a/a*, *A^y/a*)» и «день беременности» или «день лактации». Для оценки различий в потреблении пищи между *a/a* и *A^y/a*

самками после отъема детенышей использовали критерий Стьюдента для каждой недели. Для оценки влияния срока беременности и лактации на уровень мРНК нейропептидов использовали однофакторный дисперсионный анализ (1-way ANOVA) для каждого генотипа в отдельности и двухфакторный дисперсионный анализ с градациями факторов «генотип самки» и «срок беременности (0, 7, 13, 18) или лактации (10, 21)» с последующей оценкой межгрупповых различий с помощью апостериорного критерия Дункана (post-hoc Duncan). Для оценки влияния лактации на иммунореактивность AgRP в ядрах гипоталамуса использовали двухфакторный дисперсионный анализ с градациями факторов «генотип самки» и «репродуктивный статус (виргинные, лактация)». Результаты представлены в виде значений среднего $\pm$ ошибка среднего. Для оценки межгрупповых различий в случае необходимости использовали критерий Стьюдента.

Результаты

Потребление пищи. До спаривания *A^y/a* самки потребляли больше пищи, чем *a/a* самки ($3,1 \pm 0,1$ г/день, $n = 9$, $3,6 \pm 0,1$ г/день, $n = 9$, *a/a* и *A^y/a* соответственно, $p < 0,01$, тест Стьюдента). Достоверные различия по потреблению пищи сохранялись в первые три дня после покрытия (рис. 1).

Хотя самки обоих генотипов демонстрировали возрастание в потреблении пищи по ходу беременности, динамика этого возрастания у них различалась, о чем свидетельствует достоверное взаимодействие факторов генотип $\times$ день беременности ($p < 0,01$, 2-way ANOVA), (рис. 1). Вплоть до седьмого дня беременности *A^y/a* самки потребляли больше пищи, чем *a/a* самки, а в период с 11-го по 15-й дни беременности – меньше. Во время лактации, когда потребление пищи было максимальным, а также в течение первой недели после отъема детенышей *A^y/a* и *a/a* самки съедали одинаковое количество корма, но со второй недели после отъема детенышей, *A^y/a* самки начинали потреблять больше пищи (рис. 1). Таким образом, гиперфагия, вызванная блокадой меланокортиновых рецепторов, наблюдалась только у небеременных и нелактирующих самок либо на начальных стадиях беременности.

Уровень мРНК нейропептидов. У небеременных *A^y/a* и *a/a* самок в возрасте спаривания (8–9 нед) уровень мРНК NPY не различался, а уровень мРНК AgRP был вдвое ниже у *A^y/a* самок (рис. 2).

Профиль экспрессии NPY и AgRP менялся в ходе репродуктивного процесса и зависел от *агути* генотипа самок. У *a/a* мышей уровень мРНК нейропептидов возрастал во время беременности и снижался после родов (рис. 2, 1-way ANOVA, $F_{5,36} = 4,6$, $p < 0,01$ для NPY; $F_{5,35} = 3,9$, $p < 0,01$ для AgRP). При этом уровень мРНК NPY прогрессивно возрастал до 13-го дня беременности и затем не менялся до конца беременности (рис. 2). Уровень мРНК AgRP достоверно увеличивался по сравнению с контролем и предшествующим периодом только на 18-й день беременности (рис. 2). На 10-й день лактации уровень мРНК NPY был снижен по сравнению с 13-м и 18-м днями беременности, мРНК AgRP – по сравнению с 18-м днем беременности. Уровень мРНК обоих нейропептидов на 10-й и 21-й дни

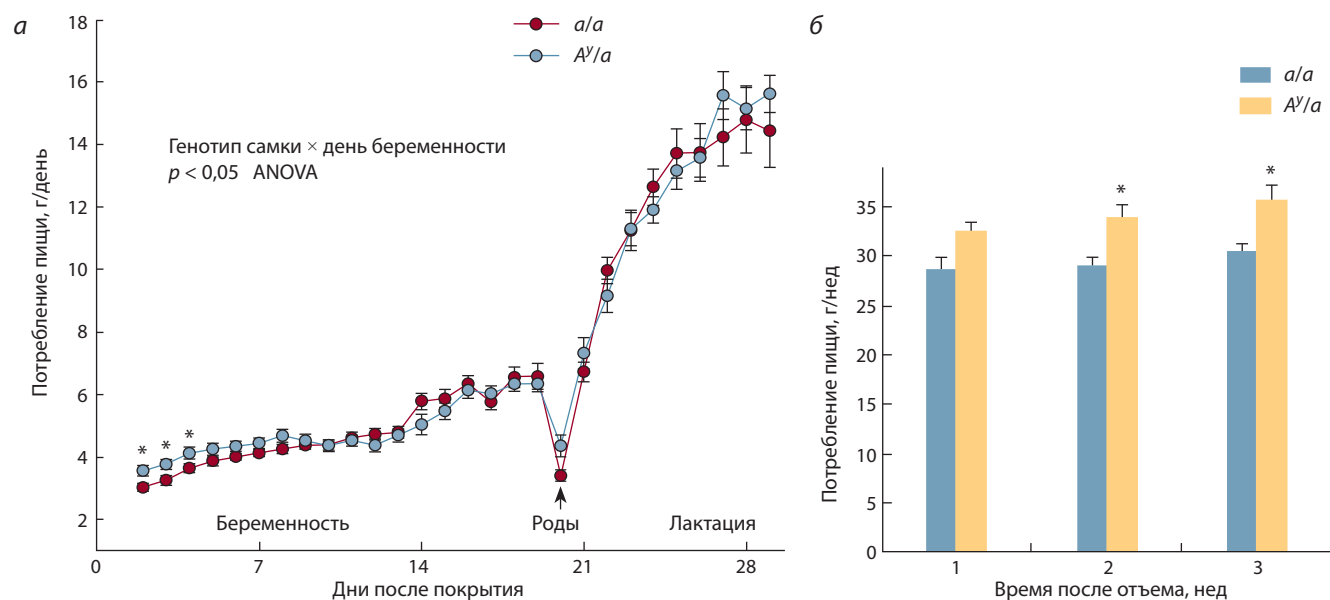


Рис. 1. Суточное потребление пищи (г/день) в течение беременности и 10 дней лактации (а) и недельное потребление пищи (г/нед) в течение трех недель после отъема потомства (б) у a/a и A^y/a самок мышей.

Результаты представлены в виде среднего и ошибки среднего для каждой точки и столбца. * $p < 0,01$, критерий Стьюдента, между a/a и A^y/a .

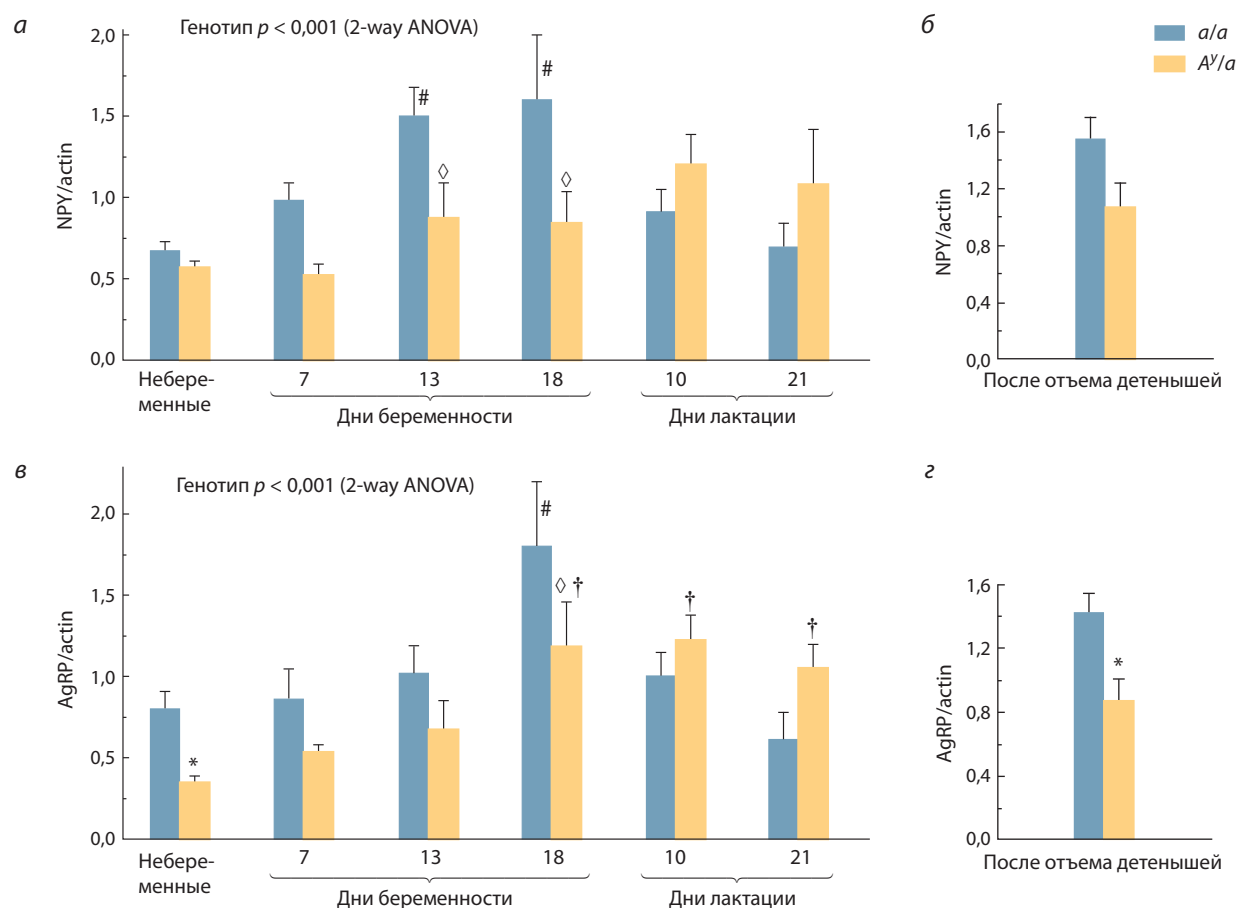


Рис. 2. Уровень мРНК NPY (а, б) и мРНК AgRP (в, г) в период беременности и лактации (а, в) и после отъема детенышей (б, г) у a/a и A^y/a мышей. По оси X отложены дни беременности или дни лактации, по оси Y – условные единицы, отражающие отношение оптической плотности ПЦР продукта мРНК нейропептидов к ПЦР продукту мРНК β -актина. Данные представлены в виде среднего и ошибки среднего. * $p < 0,05$, критерий Стьюдента, между a/a и A^y/a ; $\diamond p < 0,05$, post-hoc Duncan, между a/a и A^y/a ; # $p < 0,05$, post-hoc Duncan, между 13-м или 18-м днем беременности и остальными точками для a/a самок (а, в); † $p < 0,05$, post-hoc Duncan, между 10-м или 21-м днем лактации и небеременными самками для A^y/a самок (в).

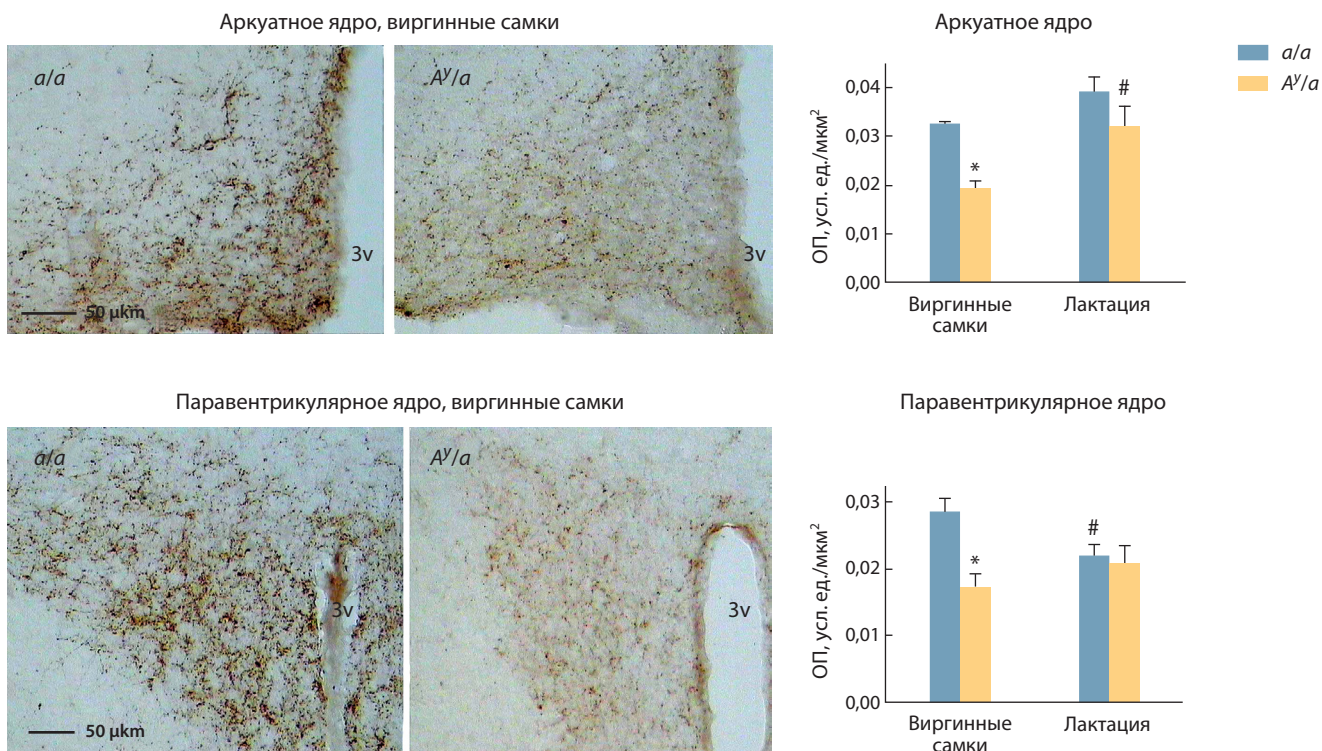


Рис. 3. Уровень иммунореактивности белка AgRP в аркуатном и паравентрикулярном ядрах гипоталамуса у виргинных и лактирующих *a/a* и *A^y/a* мышей.

По оси Y – оптическая плотность (ОП) в условных единицах на 1 мм². Данные представлены в виде среднего и ошибки среднего.

* $p < 0,05$, post-hoc Duncan, между *a/a* и *A^y/a*; # $p < 0,05$, post-hoc Duncan, между лактирующими и виргинными *A^y/a* (аркуатное ядро) и *a/a* (паравентрикулярное ядро) самками мышей.

лактации не имел достоверных различий с таковым у небеременных самок.

У *A^y/a* мышей однофакторный дисперсионный анализ не выявил влияния беременности и лактации на уровень мРНК NPY. Уровень мРНК AgRP возрастал по ходу беременности и затем не менялся (1-way ANOVA, $F_{5,38} = 3,8$, $p < 0,01$). У лактирующих *A^y/a* мышей уровень мРНК AgRP был выше, чем у небеременных самок (рис. 2).

Уровень мРНК NPY у *A^y/a* мышей по сравнению с *a/a* мышами был снижен в период беременности и не различался в период лактации, после отъема детенышей и у небеременных самок (рис. 2). Уровень мРНК AgRP у *A^y/a* мышей по сравнению с *a/a* мышами был снижен в период беременности, после отъема детенышей и у небеременных самок и не различался только в период лактации (рис. 2).

Анализ содержания AgRP в ядрах гипоталамуса. Иммуногистохимическое выявление AgRP на срезах гипоталамуса показало, что в APK уровень белка зависел как от *агути* генотипа самок ($p < 0,01$, $F_{1,16} = 13$, 2-way ANOVA), так и от их репродуктивного статуса ($p < 0,01$, $F_{1,16} = 11$, 2-way ANOVA). При этом достоверные генотипические отличия наблюдались только у небеременных самок: у *A^y/a* мышей уровень белка был снижен по сравнению с *a/a* мышами на 40 % ($p < 0,05$), (рис. 3).

Уровень белка возрастал у лактирующих самок обоих генотипов по сравнению с виргинными, но различия достигали статистической значимости только у *A^y/a* мышей,

у которых уровень белка возрастал на 66 % ($p < 0,05$), (рис. 3).

В ПВЯ, как и в APK, уровень AgRP зависел от *агути* генотипа самок ($p < 0,01$, $F_{1,16} = 8,64$, 2-way ANOVA), кроме того, было выявлено достоверное взаимодействие факторов генотипа и репродуктивного статуса ($p < 0,05$, $F_{1,16} = 5,58$, 2-way ANOVA). Как и в APK, в ПВЯ статистически достоверные генотипические различия были обнаружены только у виргинных самок (у *A^y/a* на 39 % ниже, чем у *a/a*, $p < 0,05$), (рис. 3). Однако, в отличие от APK, в ПВЯ уровень AgRP у лактирующих *a/a* самок достоверно снизился по сравнению с виргинными, а у *A^y/a* самок несколько возрос, хотя различия между виргинными и лактирующими самками не достигли статистической значимости.

Таким образом, в обоих ядрах представительство AgRP было снижено у виргинных самок *A^y/a* генотипа по сравнению с *a/a* генотипом. Во время лактации эти различия в обоих ядрах исчезали, но по разным причинам: в аркуатном ядре в основном за счет повышения уровня AgRP у *A^y/a* мышей, а в паравентрикулярном ядре главным образом за счет снижения уровня AgRP у *a/a* мышей (рис. 3).

Обсуждение

Мы проследили за изменением потребления пищи и гипоталамической экспрессией орексигенных нейропептидов

NPY и AgRP в ходе беременности, лактации и после отъема детенышей у самок с нормальной функцией меланокортиновой системы и блокадой МКР.

Прежде всего, было обнаружено, что у *A^{y/a}* самок в периоды, не связанные с увеличением энергозатрат на размножение (виргинные и после отъема детенышей), потребление пищи было повышено (из-за блокады МКР) (Miltnerberger et al., 1997), а экспрессия AgRP понижена по сравнению с *a/a* контролем, что совпадает с результатами, полученными ранее на самцах *A^{y/a}* мышей (Tsutsumi et al., 2002). Количество самого белка как в АРК, где он синтезируется, так и в ПВЯ, куда транспортируются гранулы с нейропептидами, также было снижено. Эти результаты свидетельствуют о том, что генетическая блокада меланокортиновых рецепторов приводит к компенсаторному снижению активности AgRP/NPY продуцирующих нейронов. Однако мы, как и другие авторы ранее (Kesterson et al., 1997), не обнаружили разницы по экспрессии мРНК NPY в гипоталамусе у виргинных *a/a* и *A^{y/a}* самок, что позволяет высказать предположение о возможности специфического подавления синтеза AgRP в AgRP/NPY-продуцирующих нейронах у *A^{y/a}* мышей. Опто- и фармакогенетические исследования показали, что секретируемые AgRP-позитивными нейронами медиаторы (AgRP, NPY и гамма-аминомасляная кислота (ГАМК)) различаются по характеру своего воздействия на аппетит (Sternson, Atasoy, 2014). AgRP через МКР4 оказывает долгосрочное активирующее влияние на потребление пищи, а NPY и ГАМК через собственные рецепторы повышают потребление пищи непосредственно после активации нейронов, при этом каждый из медиаторов способен заместить действие двух остальных при генетическом нокауте последних (Krashes et al., 2013). Возможно, каждый медиатор имеет собственные пути внутриклеточной регуляции синтеза и деградации.

Сопоставление профилей экспрессии NPY и AgRP с потреблением пищи у нормальных (*a/a*) самок в ходе репродуктивного процесса показывает, что на начальных этапах беременности гиперфагия ассоциирована с ростом уровня мРНК NPY, в конце беременности – с повышенным уровнем мРНК обоих нейропептидов. Возможно, в первой половине беременности аппетит повышается за счет преимущественного действия NPY, которое во второй половине беременности усиливается связыванием AgRP с МКР4. Вовлеченность AgRP нейронов и меланокортиновых рецепторов в регуляцию аппетита в период беременности подтверждается и тем, что у *A^{y/a}* самок прирост в потреблении пищи по ходу беременности был менее выражен, чем у *a/a* самок, при этом у них была снижена экспрессия NPY и AgRP в течение всей беременности.

В период лактации меланокортиновая система уступает ведущую роль в регуляции энергетического гомеостаза другим, пока еще мало исследованным регуляторным механизмам. Об этом свидетельствуют снижение уровня мРНК NPY и AgRP у родивших *a/a* самок до значений, присущих виргинным самкам, а также отсутствие разницы в потреблении пищи у лактирующих *A^{y/a}* и *a/a* мышей. Стимуляция аппетита во время лактации может зависеть от немеланокортиновых сигнальных путей, которые активируются AgRP-нейронами через ГАМК, о чем свиде-

тельствуют результаты, представленные Phillips и Palmiter (2008). Авторы показали, что специфическое разрушение AgRP-нейронов на седьмой и девятый дни после родов как у нормальных мышей, так и у мышей с двойным нокаутом по генам *npy* и *agrp* приводило к резкому уменьшению в потреблении пищи. Современные исследования функции AgRP-нейронов показали, что их орексигенное действие опосредуется через взаимодействие AgRP с МКР4 в ядрах гипоталамуса и через МКР независимые пути в других структурах мозга (Wu, Palmiter, 2011). Снижение иммунореактивности AgRP в ПВЯ гипоталамуса у лактирующих *a/a* самок по сравнению с виргинными говорит о возможном перераспределении активности AgRP нейронов в пользу МКР-независимых сигнальных путей.

Изменение экспрессии мРНК AgRP у *A^{y/a}* мышей в процессе беременности, лактации и после отъема детенышей и отсутствие отличий как по уровню мРНК, так и по иммунореактивности белка в АРК во время лактации, говорят о том, что ингибирующее действие блокады МКР на экспрессию AgRP снимается в ходе репродуктивного процесса и вновь восстанавливается после его окончания. Активация синтеза AgRP в конце беременности как у *a/a*, так и у *A^{y/a}* самок может происходить под действием метаболических стимулов (например, снижения концентраций глюкозы в ходе беременности (Makarova et al., 2010) либо специфичных для беременности гормональных сигналов; в период лактации – под действием факторов, связанных с синтезом, сосанием и отдачей молока. Однако остается неизвестным, какие именно метаболические и гормональные сигналы влияют на активность AgRP-нейронов у беременных и кормящих самок (Woodside et al., 2012).

Неясно, имеет ли влияние на потребление пищи в период беременности и лактации изменение экспрессии AgRP у мышей с генетической блокадой меланокортиновых рецепторов, поскольку наличие МКР4 необходимо и достаточно для реализации орексигенного действия AgRP (Krashes et al., 2013). Нельзя исключить другие, не прямые, пути регуляторного влияния AgRP на аппетит, например, через влияние на активность других нейромедиаторов в AgRP-нейронах. О возможности таких взаимовлияний свидетельствуют эксперименты, которые показали, что нокаут гена *npy* не влияет на потребление пищи при активации AgRP-нейронов, но сопровождается при этом значительной интенсификацией передачи сигнала через ГАМК (Sternson, Atasoy, 2014).

Представленные в данной работе результаты указывают на возможную вовлеченность AgRP-нейронов гипоталамуса в не связанную с передачей сигнала через МКР регуляцию потребления пищи в период беременности и лактации, что не исключает и других путей регуляции. Стимулирующий эффект на аппетит в период беременности может оказывать возрастание уровня глюкокортикоидов по ходу беременности (Makarova et al., 2010), поскольку кортикотропин-релизинг фактор (КРФ) снижает аппетит (Drescher et al., 1994), а глюкокортикоиды по системе отрицательной обратной связи подавляют экспрессию КРФ в гипоталамусе (Brunton et al., 2008; da Costa et al., 2001). В период лактации значительное влияние на потребление пищи могут оказывать пролактин

и сосательные стимулы (Woodside et al., 2012). Регуляция энергетического гомеостаза в период беременности и лактации требует дальнейшего изучения с привлечением современных генетических и физиологических методов исследования.

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что блокада меланокортиновых рецепторов оказывает ингибирующее влияние на экспрессию AgRP в аркуатном ядре гипоталамуса, но только у самок, не вовлеченных в репродуктивный процесс: во время беременности это ингибирующее влияние ослабевает и полностью исчезает при лактации. Регуляция потребления пищи различается у беременных и лактирующих самок. Регуляторные механизмы, повышающие потребление пищи в период беременности, включают в себя активацию синтеза NPY и AgRP в APK и проведение орексигенного сигнала через МКР. Ведущую роль в регуляции потребления пищи во время лактации берут на себя сигнальные пути, не связанные с функционированием меланокортиновых рецепторов.

Благодарности

Работа поддержана бюджетным финансированием по государственному заданию (проект № 0324-2015-0004) и РФФИ (проекты № 06-04-48517 и № 07-04-01258).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Aponte Y., Atasoy D., Sternson S.M. AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat. Neurosci.* 2011;14(3):351-355. DOI 10.1038/nn.2739
- da Costa A.P., Ma X., Ingram C.D., Lightman S.L., Aguilera G. Hypothalamic and amygdaloid corticotropin-releasing hormone (CRH) and CRH receptor-1 mRNA expression in the stress-hyporesponsive late pregnant and early lactating rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2001;91:119-130.
- Drescher V.S., Chen H.L., Romsos D.R. Corticotropin-releasing hormone decreases feeding, oxygen consumption and activity of genetically obese (ob/ob) and lean mice. *J. Nutr.* 1994;124:524-530.
- Kesterson R.A., Huszar D., Lynch C.A., Simerly R.B., Cone R.D. Induction of neuropeptide Y gene expression in the dorsal medial hypothalamic nucleus in two models of the agouti obesity syndrome. *Mol. Endocrinol.* 1997;11(5):630-637.
- Konturek P.C., Konturek J.W., Cześnikiewicz-Guzik M., Brzozowski T., Sito E., Konturek S.J. Neuro-hormonal control of food intake: basic mechanisms and clinical implications. *J. Physiol. Pharmacol.* 2005;56(Suppl. 6):5-25.
- Krashes M.J., Shah B.P., Koda S., Lowell B.B. Rapid versus delayed stimulation of feeding by the endogenously released AgRP neuron mediators GABA, NPY, and AgRP. *Cell Metab.* 2013;18(4):588-595. DOI 10.1016/j.cmet.2013.09.009
- Makarova E.N., Yakovleva T.V., Shevchenko A.Y., Bazhan N.M. Pregnancy and lactation have anti-obesity and anti-diabetic effects in A^y/a mice. *Acta Physiol. (Oxf).* 2010;198(2):169-177. DOI 10.1111/j.1748-1716.2009.02046.x
- Mann P.E., Rubin B.S., Bridges R.S. Differential proopiomelanocortin gene expression in the medial basal hypothalamus of rats during pregnancy and lactation. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1997;46(1/2):9-16.
- Mikhrina A.L., Romanova I.V. The role of AGRP in regulating dopaminergic neurons in the brain. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2015;45(5):536-541.
- Miltenberger R.J., Mynatt R.L., Wilkinson J.E., Woychik R.P. The role of the agouti gene in the yellow obese syndrome. *J. Nutr.* 1997;127:1902S-1907S.
- Mountjoy K.G. Pro-opiomelanocortin (POMC) neurones, POMC-derived peptides, melanocortin receptors and obesity: how understanding of this system has changed over the last decade. *J. Neuroendocrinol.* 2015;27(6):406-418. DOI 10.1111/jne.12285
- Mountjoy K.G., Mortrud M.T., Low M.J., Simerly R.B., Cone R.D. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol. Endocrinol.* 1994;8(10):1298-1308.
- Paxinos G.T., Franklin K.B.J. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Acad. Press, 2001.
- Phillips C.T., Palmiter R.D. Role of agouti-related protein-expressing neurons in lactation. *Endocrinology*. 2008;149(2):544-550.
- Shimokawa T., Kumar M.V., Lane M.D. Effect of a fatty acid synthase inhibitor on food intake and expression of hypothalamic neuropeptides. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2002;99(1):66-71.
- Sternson S.M., Atasoy D. Agouti-related protein neuron circuits that regulate appetite. *Neuroendocrinology*. 2014;100(2/3):95-102. DOI 10.1159/000369072
- Suzuki Y., Nakahara K., Maruyama K., Okame R., Ensho T., Inoue Y., Murakami N. Changes in mRNA expression of arcuate nucleus appetite-regulating peptides during lactation in rats. *J. Mol. Endocrinol.* 2014;52(2):97-109. DOI 10.1530/JME-13-0015
- Tsuruta Y., Yoshimatsu H., Hidaka S., Kondou S., Okamoto K., Sakata T. Hyperleptinemia in A^y/a mice upregulates arcuate cocaine- and amphetamine-regulated transcript expression. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2002;282(4):E967-973.
- Woodside B., Budin R., Wellman M.K., Abizaid A. Many mouths to feed: the control of food intake during lactation. *Front. Neuroendocrinol.* 2012;33(3):301-314. DOI 10.1016/j.yfrne.2012.09.002
- Wu Q., Palmiter R.D. GABAergic signaling by AgRP neurons prevents anorexia via a melanocortin-independent mechanism. *Eur. J. Pharmacol.* 2011; 660(1):21-27. DOI 10.1016/j.ejphar.2010.10.110
- Ziotopoulou M., Mantzoros C.S., Hileman S.M., Flier J.S. Differential expression of hypothalamic neuropeptides in the early phase of diet-induced obesity in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2000; 279(4):E838-E845.