

*На правах рукописи*

**Михайлова Елена Викторовна**

**МЕЛАНОКОРТИНОВАЯ И СЕРОТОНИНОВАЯ СИСТЕМЫ  
ГИПОТАЛАМУСА И СРЕДНЕГО МОЗГА В НОРМЕ И ПРИ  
МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ У МЫШЕЙ И КРЫС**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
**диссертации на соискание ученой степени**  
**кандидата биологических наук**

**03.03.01 – ФИЗИОЛОГИЯ**

**03.01.04 – БИОХИМИЯ**

**Санкт–Петербург**  
**2020**

Работа выполнена в группе интегративной нейроэндокринологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук

Научные руководители:

**Романова Ирина Владимировна**, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, руководитель группы интегративной нейроэндокринологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук

**Шпаков Александр Олегович**, доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной эндокринологии и нейрохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук

Официальные оппоненты:

**Ордян Наталья Эдуардовна**, доктор биологических наук, заведующая лабораторией нейроэндокринологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук

**Цейликман Вадим Эдуардович**, доктор биологических наук, заведующий лабораторией перспективных исследований молекулярных механизмов стресса высшей медико-биологической школы Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет)» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Ярославский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения России

Защита диссертации состоится «16» февраля 2021 года в 11 часов на заседании диссертационного совета (Д.002.127.01) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук по адресу: 194223, г. Санкт-Петербург, пр. Мориса Тореза, 44, тел. (812)-552-79-01, электронная почта [office@iephb.ru](mailto:office@iephb.ru), сайт <http://www.iephb.ru>.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (194223, г. Санкт-Петербург, пр. Мориса Тореза, 44), а также на сайте ИЭФБ РАН: <http://www.iephb.ru/sovet.htm>

Автореферат разослан «    » \_\_\_\_\_ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук



/Р.Г. Парнова/

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы.** Меланокортиновая система мозга состоит из различных компонентов, интегративные взаимодействия которых определяет контроль многих функций мозга. Наиболее изученной функцией этой системы в настоящее время является регуляция пищевого поведения и энергетического баланса (Cone, 2005). Проопиомеланокортин (proopiomelanocortin, POMC) – молекула-предшественник меланокортиновых пептидов, которые с разной аффинностью способны связываться с собственными рецепторами пяти типов (MC1R-5R; Catania et al., 2004; Cone, 2005). В мозге особое внимание уделяют изучению функций MC3R и MC4R, поскольку показано участие именно этих рецепторов в контроле пищевого поведения и энергетического баланса. Тогда как о функциях других MCRs в мозге известно мало.

В мозге мРНК MC1R была впервые показана в области околосредоводопроводного серого вещества (Xia et al., 1995), где его роль первоначально рассматривалась в связи с вовлечением в процессы регуляции ноцицепции (Abdel-Malek et al., 2001). В последнее десятилетие интерес к изучению этого типа рецепторов в мозге существенно возрос, поскольку установлено, что через MC1R реализуется защитная функция меланокортинов, а именно нейропротекторные эффекты при заболеваниях, сопровождающихся нейровоспалением (при болезнях Альцгеймера, Паркинсона, ишемических поражениях) (Li, Taylor, 2008; Lisak, Benjamins, 2017; Benjamins et al., 2018; Xu et al., 2019). Однако экспрессию MC1R в разных структурах мозга в норме и при метаболических расстройствах не изучали.

Нейроны, экспрессирующие POMC, в большей степени располагаются в аркуатном ядре гипоталамуса (ARC). Их проекции выявлены в различных структурах мозга, в частности, в областях, где локализованы тела серотонинергических нейронов (Catania, 2008; Cone, 2005), но механизмы взаимодействия этих двух систем мозга исследованы крайне мало.

Серотониновая система мозга – самая крупная моноаминергическая система. Многообразие действий серотонина возможно благодаря наличию большого количества собственных рецепторов. Серотонин вовлечен в регуляцию важнейших функций мозга, включая контроль пищевого поведения и энергетического баланса (Walther, Bader, 2003; Oh, et al., 2016). Основным, но не единственным, источником серотонина в мозге являются ядра шва. Гипоталамус получает обильную иннервацию от нейронов дорзального и медианных ядер шва (Угрюмов, 1999). Известно, что в регуляцию энергетического баланса и пищевого поведения вовлечены 5-HT<sub>1B</sub> и 5-HT<sub>2C</sub> подтипы рецепторов серотонина, которые широко экспрессируются в гипоталамусе и, в частности, в ARC (Makarenko et al., 2002). Экспрессия 5-HT<sub>2C</sub>R рецепторов показана в POMC-нейронах (Doslíkova et al., 2013), что служит основой для активирующего действия серотонина на эти нейроны. При этом возможность экспрессии в POMC-нейронах рецепторов 5-HT<sub>1B</sub> подтипа, опосредующих тормозный эффект серотонина, не исследовали.

Рецепторы MC1R, MC3R и MC4R выявлены в разных отделах мозга, в том числе и в структурах, где располагаются серотонин-продуцирующие нейроны (Roselli-Rhefus, 1993; Lipper et al., 2014; Михрина и др., 2018). Экспрессия же этих рецепторов в самих

---

**Список сокращений:** Akt1 – протеинкиназа семейства B, ARC – аркуатное ядро гипоталамуса, DRN - дорзальное ядро шва, GAD65/67 – glutamate decarboxylase 65/67, GAPDH – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 5-HT – серотонин, 5-ГИУК – метаболит серотонина – 5-гидроксииндолуксусная кислота; 5-HT<sub>1BR</sub> и 5-HT<sub>2CR</sub> – рецепторы серотонина 1B- и 2C-подтипа; MC1R, MC3R и MC4R – меланокортиновые рецепторы 1, 3 и 4-го типа, VTA – вентральная тегментарная область, TTP2 – триптофангидроксилаза-2 – фермент биосинтеза серотонина мозга, фTTP2(ser-19) – фосфоформа TTP2.

серотонинергических нейронах не показана, однако решение этого вопроса является основой для доказательства возможности прямого действия меланокортинов на нейроны данной эргичности. В настоящее время высказывается предположение о том, что действие меланокортинов на серотонинергические нейроны мозга опосредовано через нейроны другой эргичности, например, через ГАМК-нейроны (Marston et al., 2010; Wyler et al., 2017).

Метаболический синдром (МС) – это комплекс метаболических, клинических и гормональных нарушений, в основе которого лежит патологическое ожирение. Ожирение может быть обусловлено генетическими факторами или изменением пищевых привычек. Центральной проблемой этого метаболического расстройства считаются резистентность тканей к инсулину и нарушение обмена глюкозы, окислительный стресс, дислипидемия и липотоксичность (Le Stunff et al., 2013). При МС наблюдается дисбаланс функционирования гормональных систем организма, в частности, и сигнальных систем мозга (Williams et al., 2011; Doslikova et al., 2011). Это патологическое состояние провоцирует развитие нейровоспалительных процессов (Gustafson et al., 2007; Hommelberg et al., 2009; Lawrence, 2009; Jais, Bruning, 2017). Показано, что МС сопровождается снижением уровня самого серотонина и его метаболизма, а также изменением экспрессии 5-HT<sub>1B</sub> и 5-HT<sub>2C</sub> рецепторов в гипоталамусе (Goodnick et al., 2001; Lustman et al., 2005; Shpakov, Derkach, Bershtein, 2015). Также известно, что взаимодействие между 5-HT<sub>1R</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>- и MC4R-зависимыми путями в гипоталамусе и других областях мозга в значительной степени способствует контролю потребления пищи, чувствительности к глюкозе и к инсулину (Lee et al., 1998; Simansky et al., 2002; Nonogaki et al., 2008; Shpakov, Derkach, Bershtein, 2015). Но вопрос о том, как в течении развития метаболических расстройств изменяется активность функционирования меланокортиновой и серотониновой систем мозга, а также каким образом изменяется их взаимодействие, требует уточнения.

**Целью настоящей работы** было изучить молекулярные основы, обеспечивающие взаимосвязи между меланокортиновой и серотониновой системами мозга в норме, а также выявить изменения в этих системах при метаболических расстройствах различной этиологии.

**Задачи** исследования состояли в следующем:

1. Провести анализ экспрессии в серотонинергических нейронах среднего мозга меланокортиновых рецепторов (MC1R, MC3R и MC4R).
2. Оценить в гипоталамусе экспрессию и распределение MC1R.
3. Исследовать в РОМС-нейронах аркуатного ядра гипоталамуса возможность экспрессии серотонинового рецептора 5-HT<sub>1B</sub>-подтипа.
4. Проанализировать уровень экспрессии и распределение в среднем мозге меланокортиновых рецепторов (MC3R, MC4R и MC1R) и в гипоталамусе серотониновых рецепторов (5-HT<sub>2C</sub>R и 5-HT<sub>1B</sub>R) при различных формах ожирения.
5. Исследовать распределение и активность скорость-лимитирующего фермента биосинтеза серотонина триптофангидроксилазы-2 в среднем мозге и гипоталамусе на фоне развития ожирения.

**Научная новизна.** Впервые в различных структурах мозга показана экспрессия меланокортинового рецептора MC1R. Этот рецептор выявлен в различных популяциях РОМС-нейронов, в том числе в РОМС-нейронах аркуатного ядра гипоталамуса, что ставит вопрос о его роли в мозге как ауторецептора. Впервые экспрессия MCR выявлена в серотонинергических нейронах ядер шва, что демонстрирует возможность прямого влияния меланокортиновых пептидов на биосинтез серотонина. В свою очередь,

экспрессия рецепторов серотонина, в частности 5-HT<sub>1B</sub>R, в POMC-нейронах, демонстрирует возможность прямого влияния серотонина на синтез меланокортиновых пептидов, в том числе через посредство 5-HT<sub>1B</sub>R-зависимых сигнальных путей в этих нейронах. В нейронах гипоталамуса впервые продемонстрирована экспрессия триптофангидроксилазы-2 и показано ее увеличение при различных формах ожирения. Впервые установлено, что при диета-индуцированном ожирении на фоне снижения уровня триптофангидроксилазы-2 в нейронах дорзального ядра шва отмечается увеличение ее фосфорилированной по серину-19 формы. Ассоциированное с этим увеличение фосфорилированной по серину-473 формы Akt1-киназы в нейронах дорзального ядра шва демонстрирует роль Akt1 в защитных механизмах, направленных на поддержание жизнеспособности серотонинергических нейронов в условиях снижения их функциональной активности при метаболических расстройствах.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

- 1) Прямое функциональное взаимодействие меланокортиновой и серотониновой систем определяется экспрессией меланокортиновых рецепторов в серотонинергических нейронах, а в POMC-нейронах рецепторов серотонина.
- 2) Развитие ожирения различной этиологии сопровождается дисфункцией как меланокортинового сигналинга в серотонинергических нейронах, так и серотонинового сигналинга в POMC-нейронах.
- 3) Уровень экспрессии триптофангидроксилазы-2, скорость-лимитирующего фермента биосинтеза серотонина, в серотонинергических нейронах зависит от этиологии ожирения, причем экспрессия этого фермента происходит и в нейронах гипоталамуса.
- 4) MC1R участвует в регуляции функциональной активности различных нейронов мозга, а экспрессия этого рецептора в POMC-нейронах может свидетельствовать о его возможной роли как ауторецептора.

**Теоретическая и практическая значимость.** Результаты, полученные в ходе выполнения настоящего исследования, являются фундаментальными и связаны с изучением структурно-нейрохимических основ, обеспечивающих взаимовлияние POMC-продуцирующих нейронов аркуатного ядра гипоталамуса и серотонинергических нейронов среднего мозга, в том числе локализованных в ядрах шва. Полученные новые данные существенно расширяют представления об источниках биосинтеза серотонина в структурах мозга в норме и при метаболических расстройствах различной этиологии, а также свидетельствуют о важной роли меланокортиновой системы в регуляции функциональной активности серотонинергических нейронов ядер шва и о существовании компенсаторных путей, обеспечивающих баланс серотонина при нарушениях функций серотонинергических нейронов среднего мозга. Эти данные отчетливо демонстрируют участие меланокортиновой системы мозга как в регуляции энергетического баланса и пищевого поведения, так и в осуществлении нейропротекторной функции, в том числе в условиях патологии. Все это создает надежную теоретическую основу для разработки новых подходов для изучения интегративных гормональных систем мозга и для коррекции нарушений в них, возникающих при метаболических расстройствах. Полученные результаты и сделанные на их основе выводы могут быть использованы в курсах лекций и практических занятий для студентов биологических и медицинских факультетов университетов и медицинских институтов.

**Апробация работы.** Результаты исследования представлены и обсуждены на XV и XVI Всероссийских совещаниях с международным участием, VIII и IX школах по эволюционной физиологии, посвященных памяти академика Л.А. Орбели (Санкт-Петербург, 2016, 2020); на Всероссийском симпозиуме с международным участием

«Стресс: физиологические эффекты, патологические последствия и способы их предотвращения», посвященном памяти профессора А.А. Филаретова (Санкт-Петербург, 2017); на «Molecular neurobiology today and tomorrow» Fourth biennial German-Russian symposium Joint meeting of the Berlin-Brandenburg Academy of Sciences and Humanities and Russian Academy of Sciences (Москва, 2017); на XIII Международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2017, 2018); на Всероссийских научных форумах студентов и молодых ученых с международным участием «Студенческая наука» (Санкт-Петербург, 2017, 2018, 2019); на XXIII Съезде физиологического общества И.П. Павлова (Воронеж, 2017); на Всероссийских конференциях и школах с международным участием «Оптогенетика и оптофармакология», «Оптогенетика+» (Санкт-Петербург, 2018, 2020); на Всероссийской молодежной конференции с международным участием «Современные аспекты интегративной физиологии» (Санкт-Петербург, 2018); на XIV Конгрессе международной ассоциации морфологов (Астрахань, 2018); на Конференция с международным участием «Физиология и биохимия сигнальных систем», посвященной 100-летию со дня рождения академика Т.М. Турпаева (Москва, 2018); на XII Международном конгрессе «Метаболический синдром, сахарный диабет 2-го типа и атеросклероз» (MSDA) (Санкт-Петербург, 2017); на Всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология», посвященной 170-летию со дня рождения И.П. Павлова (Санкт-Петербург, 2019).

#### **Финансовая поддержка работы**

Исследование проведено с использованием оборудования ЦКП ИЭФБ РАН на средства гранта РФФИ № 16–15–10388, государственного бюджета по госзаданию № АААА–А18–118012290427–7; субсидии Комитета по науке и высшей школе г. Санкт-Петербурга (распоряжение от 05.12.2019 №233; диплом ПСП №19345).

**Личный вклад автора.** Все представленные в диссертационной работе экспериментальные данные получены лично автором или при его непосредственном участии. Автор проводил статистическую обработку полученных данных, их анализ, принимал участие в подготовке публикаций по материалам работы.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано более 20 работ, из которых 8 – статьи в рецензируемых журналах, остальные – статьи и тезисы и в других печатных изданиях.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, описания результатов исследования и их обсуждения, выводов, заключения и списка литературы, включающего 329 источников (в том числе 15 в отечественных изданиях). Работа изложена на 146 страницах, иллюстрирована 56 рисунками и 8 таблицами.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

#### **Экспериментальные животные и экспериментальные модели**

Эксперименты были выполнены согласно дизайну исследования, одобренному Этическим комитетом ИЭФБ РАН, European Communities Council Directive 1986 (2010/63/ЕЕС), и правилам, изложенным в “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”. При планировании и проведении экспериментов на животных соблюдены «принципы **3R**»: **Replacement** (использование альтернативных методов), **Reduction** (минимизация количества животных в эксперименте), **Refinement** (минимизация факторов безосновательного стрессирования животных до, во время и после проведения эксперимента, таких как боль, дискомфорт, страх).

Для экспериментов были использованы: самки мыши C57BL/6J (генотип a/a), самки мыши Agouti yellow (генотип Ay/a), самцы крысы Вистар.

#### **Диета–индуцированное ожирение у крыс и мышей.**

Крысы экспериментальной группы (n=15) с 26–дневного возраста получали кафетерий–диету, которая включала жировую смесь (52 % свиного сала), как добавку к стандартному сухому корму (19% белка, 5% жира, 4% растительных волокон, 9% золы), а также 30%-ный раствор сахарозы вместо питьевой воды. Через 12 недель диеты у крыс развивалось диета-индуцированное ожирение (ДИО), которое верифицировали по изменению метаболических показателей по сравнению с контрольными крысами (Romanova, et al., 2018), получавших стандартный корм (n=15).

Мышей C57Bl/6J (a/a) экспериментальной группы с 4–месячного возраста содержали на высококалорийной диете, аналогичной таковой для крыс, в течение 8 (ДИО8, n=13) и 16 недель (ДИО16, n=13). Контрольные мыши (n=26) соответствующего возраста потребляли стандартный сухой корм и воду.

Мыши Agouti yellow (Ay/a) генетически предрасположенные к развитию ожирения (*меланокортиновое ожирение*), характеризуются доминантной (спонтанной) мутацией гена *агути*, быстро набирают массу тела вследствие усиленного приема пищи и отличаются по весу от мышей того же возраста с генотипом a/a, вследствие чего после 10-ти недельного возраста у них развивается ожирение. В экспериментах использованы 5-месячные самки мышей Ay/a (36-40 г, n=21) и контрольные мыши с генотипом a/a (22-25 г., n=13), метаболические показатели между двумя группами достоверно различались. Мыши двух генотипов одинакового возраста и с одинаковой начальной массой тела (12–13 г) были привезены из вивария Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск) и адаптированы к условиям вивария ИЭФБ РАН.

**Оценка метаболических параметров.** У мышей и крыс определяли массу тела (г). До эксперимента были проведены глюкозотолерантный тест (ГТТ) у мышей и крыс, и инсулин глюкозотолерантный тест (ИГТТ) у крыс. В ГТТ после 6 ч голодания животным вводили глюкозу (2 г/кг массы тела животного). С помощью тест-полосок «One Touch Ultra» (США) и глюкометра «Life Scan Johnson & Johnson» (Дания) из крови, взятой из хвостовой вены, измеряли уровень глюкозы через 15, 30, 60 и 120 мин после глюкозной нагрузки и оценивали площадь под кривой (area under the curve, AUC) «концентрация глюкозы (мМ) – время (мин)» (AUC<sub>0-120</sub>), как описано ранее (Derkach et al., 2015), что позволяет судить о развитии толерантности к глюкозе. В ИГТТ, который производили за 10 дней до декапитации, инсулин подкожно (Humalog, 0.8 IU/кг массы тела животного) и глюкозу внутрибрюшинно (2 г/кг массы тела животного) вводили одновременно. Образцы плазмы крови забирались до (0 мин) и после введения инсулина и глюкозы через 15, 30, 60 и 120 мин. Проводили анализ уровня глюкозы с помощью глюкометра и инсулина с помощью Rat Insulin ELISA kits (Merckodia AB, Sweden). Оценивали площадь под кривой для глюкозы и инсулина от 0 до 120 мин (AUC<sub>0-120</sub>), как описано ранее (Derkach et al., 2015). Результаты ИГТТ позволяют оценить развитие толерантности к глюкозе и инсулину.

#### **Обработка материала**

Животных наркотизировали внутрибрюшинно хлорал гидратом (400 мг/кг).

У животных оценивали массу жировой ткани (г).

**Для оценки уровня инсулина** кровь забирали из сердца, отстаивали при +4° С, центрифугировали при комнатной температуре (при 8000 g), сыворотку замораживали при -20° С. Концентрацию инсулина в сыворотке крови определяли с помощью Rat Insulin или Mouse Insulin ELISA kits (Merckodia AB, Sweden) соответственно.

**Для иммуногистохимических исследований мозг фиксировали** с помощью транскардиальной перфузии (0.1M фосфатный буфер, РВ, затем 4% параформальдегидом, разведенном в 0.2M РВ, рН 7.4), промывали несколькими порциями холодного 0.02 M РВ,

содержащего 0.9% NaCl (PBS), и погружали в 30% раствор сахарозы в PBS (4° С) в течение 3 суток, после чего мозг замораживали в изопентане (Sigma), охлажденном до – 42° С и хранили при – 80° С.

С помощью криостата (Leica, Германия) были изготовлены чередующиеся серии фронтальных срезов мозга, которые монтировали на стекла Super Frost/plus. Свободноплавающие срезы (20 мкм) помещали в охлажденный PBS.

**Приготовление проб для определения серотонина и его метаболита** в ткани проводили по общепринятому протоколу (Lambertsen, et al., 2012). Замороженную ткань гипоталамуса погружали в 4-х кратный объем водного раствора холодной перхлорной кислоты (0.1 М), гомогенизировали, 10 мин центрифугирования при +4°С (12000g), надосадов замораживали и хранили при – 80°С.

**Экстрагирование общей РНК** проводили по протоколу фирмы-производителя (TRI Reagent–Protocols, США). Замороженную ткань гипоталамуса погружали в TRI Reagent (Mol.ResearchCen.Inc., США) из расчета 1 мл реагента на 50–100 мг ткани. После осаждения в изопропанол и промывки в двух порциях холодного 75%-ного этанола осадок растворяли в стерильной воде. Для определения концентрации общей мРНК использовали спектрофотометр «Implen NanoPhotometer P330» (США). Измерения проводили в интервале максимума поглощения нуклеиновыми кислотами (длина волны 260/ 280 нм), РНК считали чистой при соотношении D260/D280  $\geq$  1.6.

**Пробы для Вестерн–блоттинга.** Ткань гипоталамуса гомогенизировали в десятикратном растворе лизирующего буфера (0.02 М Tris (hydroxymethylami–nomethane), 0.15 М NaCl, 0.001 М EDTA, 1% Triton X–100, pH 7.5), с добавлением ингибиторов протеаз (Sigma) и фосфатаз (PhosStop, RocheDiagnostic) согласно инструкции производителя. После центрифугирования (15 мин при 12000g) собирали надосадов. Выравнивание белка в лизате проводили методом Бредфорда. Два объема лизата разводили одним объемом 3–х кратного SDS–буфера (6% SDS – sodium dodecyl sulfate, 0.2 М Tris–HCl, 15% глицерин, 3% бромфеноловый синий, 10%  $\beta$ –меркаптоэтанол, pH 6.7) и в течение 5 минут нагревали на водяной бане при 95° С. Пробы хранили при – 25° С.

**Биотин–стрептавидиновая иммуногистохимическая методика** была использована для анализа уровня белков в структурах мозга. После демаскировки антигена кипячением в растворе цитрата натрия, pH 6.0, стекла со срезами инкубировали в растворе первичных антител: кролика к ТПГ2 (Millipore, 1:1000), кролика к фосфо(серин-19)ТПГ2 (Affinity Biosciences, 1:400) или мыши к POMC (Abcam, 1:1000) в течение 48 ч (4° С). Также использовали вторичные антитела козы, конъюгированные с биотином (Vector Labs): против Ig кролика (1:300) или против Ig мыши (1:400). После промывки в PBS срезы на 1 ч при комнатной температуре помещали в раствор стрептовидин–пероксидазы (BioLegend), разведенной в PBS (1:700). Во всех случаях для визуализации пероксидазы использовали 0.05% раствор диаминобензидина с 0.03 % перекисью водорода в PBS. После тщательной промывки стекла подвергали стандартной гистологической обработке. Специфичность реакции проверяли с помощью негативного контроля (реакцией без первичных или вторичных антител). Позитивным контролем считали выявление белков в структурах, ранее описанных в литературе.

**Двойное флуоресцентное иммуномечение** проводили методом «коктейля» (Хернет, Гаттер, 1999) для анализа распределения двух белков в структурах мозга. Свободноплавающие срезы или стекла с монтированными срезами (после демаскировки антигена кипячением в растворе цитрата натрия, pH 6.0) промывали в PBS и PBST, 30 мин обрабатывали 100 мМ раствором глицина, растворенного в PBS, 1 ч инкубировали в 5% блокирующем растворе (смесь сывороток: 2% козы и 3% быка в PBST) и инкубировали в смеси двух первичных антител, которые разводили в 2% блокирующем растворе. Инкубацию проводили при + 4° С в течение 48–72 ч. Использовали смесь следующих комбинаций первичных антител: мыши к POMC (Abcam, 1:1000) и кролика к MC1R (Elabscience, 1:1000), или кролика к ТГ (Abcam, 1:2000), или кролика к ТПГ2



(Millipore, 1:1000), или кролика к 5-HT<sub>1B</sub>R (USBiologicals, 1:100), или кролика к 5-HT<sub>2C</sub>R (Elabscience, 1:100); кролика к MC1R (Elabscience, 1:300) с антителами мыши к вазопрессину (NIH, 1:1000), или GAD65 (Abcam, 1:1000), или орексину-A (R&Dsystems, 1:1000); смесь антител мыши к GAD65 и GAD67 (Abcam, 1:1000, Millipore, 1:1000) с антителами кролика к MC3R (Sigma, 1:100), или кролика к MC4R (PhoenixIncorp., 1:100); антитела кролика к ТПГ2 (Millipore, 1:1000) с антителами мыши к вазопрессину (NIH, 1:1000), или ТГ (Sigma, 1:2000), или BDNF (Abcam, 1:300); антитела козы к серотонину (Immunostar, 1:3000) с антителами кролика к MC1R (Elabscience, 1:300), или фосфо(серин-19)ТПГ2 (Affinity Biosciences, 1:300), или Akt1(total) (Cell Signaling, 1:200), или Akt1 фосфо(серин-473) (Cell Signaling, 1:200); антитела овцы к ТПГ (Millipore, 1:500) с антителами кролика к MC3R (Sigma, 1:100) или MC4R (PhoenixIncorp., 1:100). После тщательной промывки в PBS (1 ч, комн. t) проводили инкубацию в смеси соответствующих вторичных антител, конъюгированных с флуоресцентными метками (Invitrogen, 1:1000): цыпленка против кролика (Alexa-488) или осла против мыши (Alexa-568) или козы против овцы (Alexa-543). После тщательной промывки в PBS свободноплавающие срезы натягивали на стекла и подсушивали. Стекла со срезами заключали под покровное стекло с помощью среды Mowiol и хранили при + 4° С. В ряде случаев перед заключением на срезы дополнительно наносили ядерный краситель DAPI (Sigma, США, 1:2000). Для проверки специфичности реакций использовали негативный контроль (реакции без первичных или вторичных антител).

**Метод обратной транскрипции (ОТ) и ПЦР в реальном времени** использовали для анализа уровня экспрессии генов. ОТ проводили согласно протоколу фирмы-производителя реагентов (Evrogen, Россия). В качестве праймера-затравки использовали random (dT). В пробах объемом 25 мкл содержалось 1 µg totalной РНК (2 µg для гена, кодирующего ТПГ2 в гипоталамусе). Для ПЦР использовали праймеры, подобранные с помощью программы «Primer Blast». Синтез прямого (forward) и обратного (reverse) праймеров проведен фирмой Evrogen (табл. 1 и 2).

**Таблица 1.** Праймеры для крысы, использованные для ПЦР в «реальном времени».

Ген	Положение	Последовательность	Длина продукта, пп	NCBI номер
<i>Pomc</i>	F	AGGACCTCACCACGGAAAG	109	NM_139326.2
	R	GTCAAGGGCTGTTCATCTCC		
<i>AgRP</i>	F	TGAAGAAGACAGCAGCAGACC	189	NM_033650.1
	R	TGAAGAAGCGGCAGTAGCAC		
<i>Mc3r</i>	F	GTCACCATCACCATCCTGCTGGG	132	NM_001025270.3
	R	CAGGTAGGTGTTGAAGTGCGCCG		
<i>Mc4r</i>	F	TGGGTGTCATAAGCCTGTTGG	181	NM_013099.2
	R	GCGTCCGTGTCCGTA CTG		
<i>5-Ht1b</i>	F	TCCGGGTCTCCTGTGTACGT	51	NM_022225.1
	R	GGCGTCTGAGACTCGCACTT		
<i>5-Ht2c</i>	F	CGAGTCCGTTTCTCGTCTAGCT	98	NM_012765.3
	R	TTGGCCTATGCTTGCAGGTA		
<i>Gapdh</i>	F	GTGTTCCSTACCCCAATGTATCC	74	NM_017008.4
	R	GATGTCATCATACTTGGCAGGTTT		

**Таблица 2.** Праймеры для мыши, использованные для ПЦР в «реальном времени».

Ген	Положение	Последовательность	Длина продукта, пн	NCBI номер
<i>Pomc</i>	F	CAGTGCCAGGACCTCACC	72	NM_008895.4
	R	CAGCGAGAGGTCGAGTTTG		
<i>AgRP</i>	F	ACAACCTGCAGACCGAGCAGAA	98	NM_001271806.1
	R	CGACGCGGAGAACGAGACT		
<i>Mc1r</i>	F	CTCCACAGACCGCTTCCTAC	141	NM_008559.2
	R	ACATACAGGCACCAAGGCTC		
<i>Mc3r</i>	F	CAAGGAGATTCTCTGCGGCT	101	NM_008561.3
	R	TCCCGTCTGAGCGTTGTTTT		
<i>Mc4r</i>	F	GGGTCGGAAACCATCGTCAT	124	NM_016977.4
	R	TGCAAATGGATGCGAGCAAG		
<i>Tph2</i>	F	CAATCGAGTTCGGCCTTTGC	141	NM_173391.3
	R	GCGTCCTGAAAGGTGGTGAT		
<i>5-Ht1b</i>	F	GCTGGACTGCTTTGTGAACACCGA	223	NM_010482.2
	R	AATGGAGGTGACCGAGGATGTGGA		
<i>5-Ht2c</i>	F	TCACGAACACTTTGCTTTTCG	116	NM_008312.4
	R	GTTC AATTCGCGGACTAAGG		
<i>Hprt1</i>	F	AGCCGACCGTTCTGTTCAT	72	NM_013556.2
	R	GGTCATAACCTGGTTCATCATCAC		
<i>18S</i>	F	GGGAGCCTGAGAAACGGC	68	NR_003278.3
	R	GGGTCGGGAGTGGGTAATTT		

В качестве контрольных генов для мыши использовали *hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (Hprt1)* и ген, кодирующий 18S рибосомальную РНК, а для крысы ген *Gapdh*. Температура плавления праймеров составила 55–57 °С. Реакции проводили в планшетах для ПЦР, каждую пробу анализировали в трех повторах. Амплификация проводилась в объеме 25 мкл, содержащем 40 нг ОТ-продукта, 0.4 мкМ прямого и обратного праймера и реагент qPCRmix–HS SYBR LowROX с интеркалирующим красителем SYBR Green в соответствии с протоколом производителя (Evrogen). Каждый цикл реакции (всего 40 циклов) состоял из 4 этапов: предварительная денатурация 5 мин при 95° С, денатурация 40 с при 95° С, отжиг с праймерами в течение 10 с (или 30 с) при 55–59° С (в зависимости от праймера), стадия наращивания продукта 35 с при 75° С. На последнем этапе цикла делали кривую плавления конечного продукта реакции 40 мин в диапазоне от 95° до 57° С. В качестве негативного контроля для ОТ служили пробы с мРНК, но без фермента обратной транскриптазы, а для контроля самой ПЦР - пробы с праймером, но без ОТ-продукта. Амплификационный сигнал детектировали с использованием прибора 7500 Real–Time PCR System (Life Technologies ABI, США). Результаты обрабатывали с помощью программ 7500 Software v.2.0.6 и Expression Suite Software v.1.0.3. Для сравнения графиков, полученных в результате ПЦР в «реальном времени», использовали пороговый метод  $\Delta\Delta C_t$ , с помощью которого определяли количество конечного продукта, выраженное в относительных единицах (RQ – relative quantity – количество мРНК гена интереса относительно референсного гена).

**Вестерн-блоттинг.** Белки в пробах разделяли с помощью электрофореза в 10% полиакриламидном геле (SDS-PAGE; Laemmli, 1970), используя оборудование для Вестерн-блоттинга (Bio-Rad Laboratories, США). Для электрофореза брали 10 мкг белка. Для определения содержания белка-интереса использовали окрашенный маркер молекулярного веса (Fermentas). Гель с белковыми фракциями переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham) в течение 1 ч. После блокировки 30 мин в 4% блокирующем растворе мембраны инкубировали в течение ночи (4° С) с первичными **антителами кролика к** ТПГ2 (Millipore, 1:2000), 5-НТ<sub>1В</sub>R (US Biological, 1:1000), 5-НТ<sub>2С</sub>R (Elabscience, 1:1000), МС1R (Elabscience, 1:500), АКТГ(1-24) (Millipore, 1:2000), Iba1 (Novusbio, 1:500). Для определения содержания контрольного белка использовали первичные антитела **мыши** к GAPDH (Abcam, 1:2000). После промывки в TBST проводили инкубацию с вторичными антителами (комн. t, 1 ч), конъюгированными с пероксидазой хрена. Использовали вторичные антитела козы (Sigma): против Ig кролика (1:2000) или Ig мыши (1:10000). Сигнал визуализировали с помощью хемилюминесцентной системы ECL-Prime и рентгеновской пленки (Amersham).

**Анализ изображения.** Изображения структур получали с помощью микроскопа Carl Zeiss (Германия) в проходящем свете со встроенной видеокамерой Imager A 4.1, программного обеспечения для захвата изображения AxioVision – 4.7.2. На снимках оценивали оптическую плотность иммунопозитивного вещества в нейронах с помощью программы Image J (НИН, США). У каждого животного анализировали по 8-10 снимков. Результаты представлены как оптическая плотность в условных единицах (у. ед.).

Анализ флуоресцентного изображения проводили с помощью микроскопа DM16000 и лазерной сканирующей конфокальной установки Leica TCS SP5-II (Leica Microsystems, Германия) или мультифотонной установки. Для последовательного сканирования использовали иммерсионный объектив х63 и лазеры с длиной волны возбуждения 488, 568 или 543 нм (355 нм для DAPI). Количественный анализ изображения (Füzesi et al., 2007) проводили с помощью пакета программного обеспечения Leica (LAS AF Lite). На снимках (10–12), полученных при одинаковых оптических установках в наиболее интенсивной области свечения по Z-позиции, обводили тела иммунопозитивных нейронов и копировали Ehel-файлы с характеристиками *gray values* для каждого исследованного канала, значения которых делили на уровень фона и вычисляли среднее для каждого среза. Подготовку микрофотографий к демонстрации проводили с помощью программы Photoshop CS3.

**Метод обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)** с электрохимической детекцией осуществляли на хроматографе Beckman Coulter (США) и использовали для определения концентрации серотонина и его метаболита – 5-ГИУК. ВЭЖХ-система включала инжектор Rheodyne 7125 с петлей на 20 мкл для нанесения образцов, колонку Phenomenex (250.0 x 4.6 мм) с сорбентом Sphere Clone 5 u 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-фосфатный буфер с 0.7 мМ октансульфоновой кислотой, 0.5 мМ ЭДТА и 8% ацетонитрила (рН 3.0). Скорость элюции подвижной фазы составляла 1 мл/мин, время анализа одной пробы – около 20 мин. Конечная концентрация была выражена в процентах относительно контроля.

**Статистический анализ** результатов биохимических и иммуногистохимических исследований проводили с помощью программы GraphPad Prism 7. Оценку нормальности распределения данных проводили с использованием теста Шапиро-Уилка. В случае ненормального распределения сравнение двух независимых групп проводилось с помощью U-критерия Манна-Уитни. В случае нормального распределения сравнение двух независимых групп проводили с помощью t-критерия Стьюдента (p<0.05). Анализ результатов Вестерн-блоттинга проводили с помощью t-критерия Стьюдента и

представляли как среднее оптической плотности  $\pm$  стандартная ошибка (mean  $\pm$  sem) в условных единицах (у. ед.). Количество животных указано как **n**, однако при анализе иммуногистохимических данных от каждого животного получали 8-10 снимков исследуемой структуры, на которых анализировали все клетки.

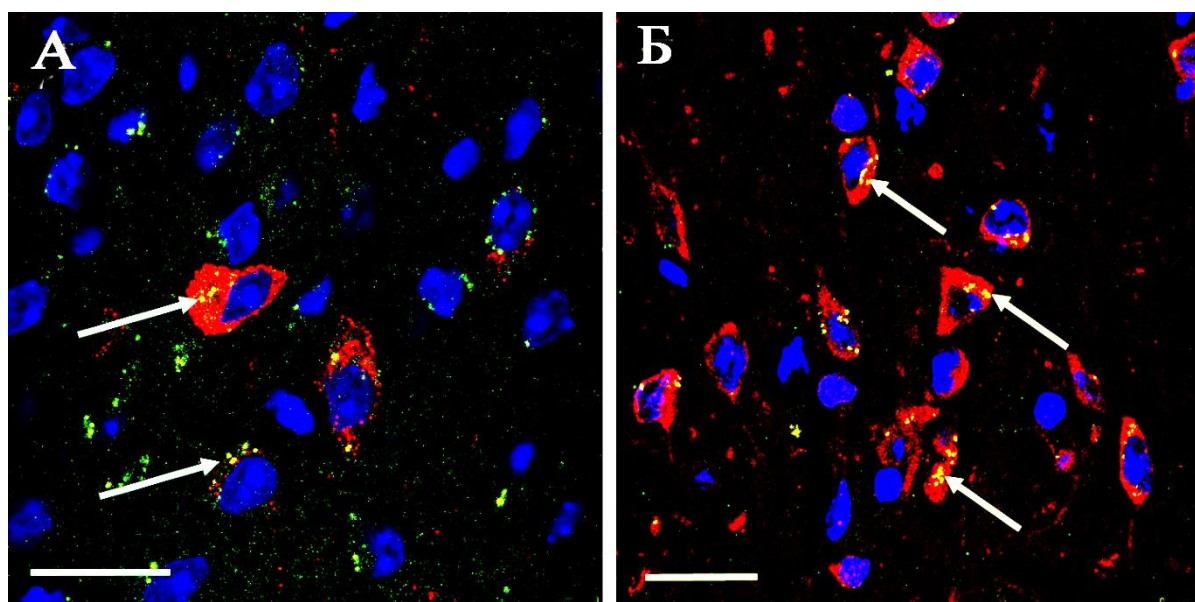
Для статистического анализа результатов флуоресцентного изображения проводили нормализацию данных относительно соответствующего контрольного уровня (принятого за 1) и использовали парный *t*-критерий Стьюдента для сравнения контроль–опыт. Результаты представлены как среднее интенсивности свечения  $\pm$  стандартная ошибка в условных единицах (у. ед.).

Статистический анализ данных ПЦР проводили с помощью программного обеспечения «GraphPad Prism 7» («GraphPad Software», США). Оценку нормальности распределения данных проводили с использованием теста Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения ( $\alpha=0.05$ ) различия между группами оценивали с помощью непарного *t*-теста. Данные ПЦР представлены как mean  $\pm$  sem. Линейную зависимость между величинами определяли с помощью коэффициента корреляции Пирсона (*R*).

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Исследование экспрессии MC1R в различных отделах мозга

Данные ПЦР демонстрируют одинаковый уровень экспрессии гена *Mclr* в гипоталамусе и в среднем мозге мыши. Результаты двойного флуоресцентного иммуномечения свидетельствуют об экспрессии MC1R в гипоталамусе в нейронах различной эргичности: в вазопрессинергических нейронах супраоптического и паравентрикулярного ядер, в перифорникальной и преоптической областях, в аркуатном ядре в POMC- (рис. 1А) и ТГ-иммунопозитивных нейронах. MC1R также выявлены в



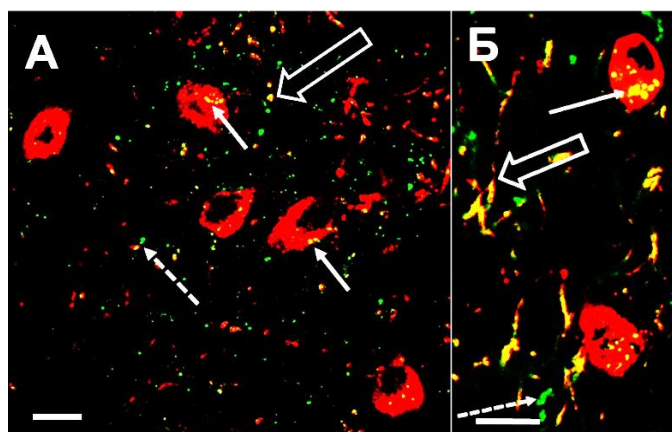
**Рис. 1.** Двойное флуоресцентное иммуномечение POMC (красный) и MC1R (зеленый) в аркуатном ядре гипоталамуса (А) и в центральной части ядра одиночного тракта (Б) мыши. Синий - ядерный краситель DAPI. Стрелки - MC1R в телах POMC-нейронов, масштаб 20 мкм.

РОМС-нейронах гиппокампа, коры больших полушарий, ядра одиночного тракта (**рис. 1Б**), в 5-НТ-нейронах дорзального (DRN) и медиального (MRN) ядер шва (raphe nuclei), в VTA, норадренергических нейронах голубого пятна.

Экспрессия MC1R в различных структурах мозга, в частности в гипоталамусе, свидетельствует о важной роли MC1R-опосредованного пути в регуляции нейронов мозга и, соответственно, контролируемых ими функций. Полученные нами данные демонстрируют присутствие MC1R в РОМС-нейронах гипоталамуса и других отделах мозга, что свидетельствует о возможной функциональной роли MC1R как ауторецептора. В связи с этим можно предположить, что как MC1R-, так и MC3R-опосредованные пути, могут контролировать экспрессию РОМС и баланс между этими путями может зависеть от различных факторов и функционального состояния организма.

### Исследование серотониновых рецепторов в РОМС-нейронах ARC

Отростки серотонинергических нейронов, расположенных в DRN и MRN, поступают в гипоталамус (Угрюмов, 1999), где участвуют в контроле функциональной активности различных типов нейронов через разные подтипы 5-НТР. Непосредственно в РОМС-нейронах ARC ранее были выявлены 5-НТ<sub>2C</sub>R (Doslikova et al., 2013). С помощью двойного флуоресцентного иммуномечения в РОМС-нейронах ARC у мышей и крыс нами впервые были выявлены 5-НТ<sub>1B</sub>R (**рис. 2**).



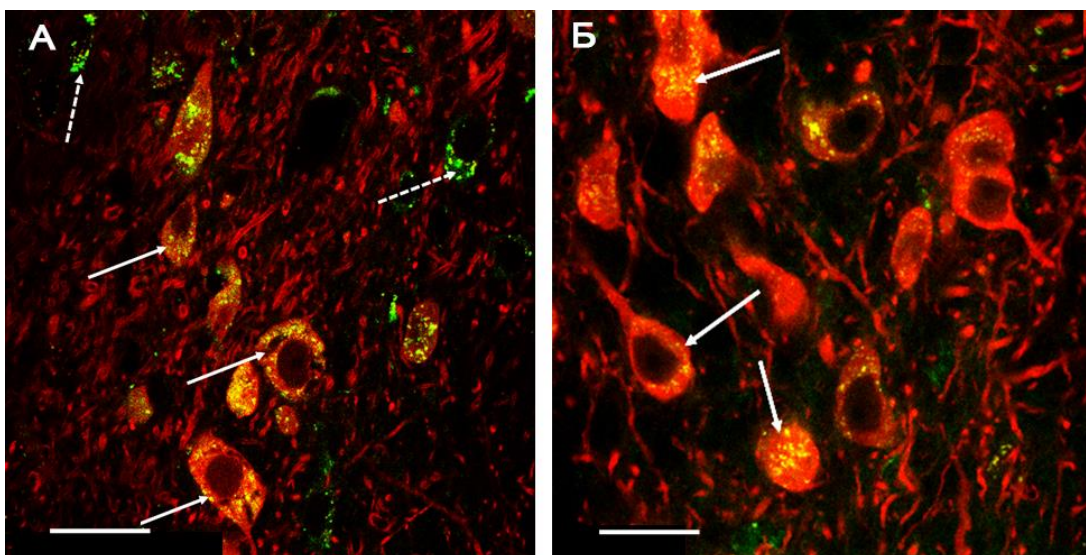
*Рис. 2.* Двойное флуоресцентное иммуномечение РОМС (красный) и 5-НТ<sub>1B</sub>R (зеленый) в ARC мыши C57BL/6J (А) и Ay/a (Б). Сплошные стрелки - 5-НТ<sub>1B</sub>R в телах РОМС-нейронов, фигурные - в их отростках, пунктирные стрелки - 5-НТ<sub>1B</sub>R в структурах другой эргичности ARC. Масштаб 10 мкм.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в РОМС-нейронах экспрессируются оба подтипа 5-НТР, вовлеченных в контроль пищевого поведения и энергетического обмена, как активирующих 5-НТ<sub>2C</sub>R, так и тормозных 5-НТ<sub>1B</sub>R.

### Исследование MC3R и MC4R в серотонинергических нейронах мозга

С помощью двойного флуоресцентного иммуномечения у крысы MC3R и MC4R выявлены в ТПП-иммунопозитивных нейронах, локализованных в DRN (**рис. 3**) и MRN, а также в GAD65-иммунопозитивных нейронах, расположенных вокруг них. Эти данные демонстрируют возможность как прямого, так и опосредованного влияния меланокортиновых пептидов на функциональную активность серотонинергических нейронов мозга через различные пути внутриклеточной сигнализации, опосредованные через различные типы MCR – MC1R, MC3R и MC4R.





**Рис. 3.** Двойное флуоресцентное иммуномечение MC3R (А) или MC4R (Б) и ТПГ в нейронах DRN крысы. *Сплошные стрелки* – MC3R или MC4R в телах 5-НТ-нейронов, *пунктирные стрелки* – MC3R или MC4R в структурах другой эргичности. Масштаб 25 мкм.

Полученные данные демонстрируют экспрессию 5-НТR в POMC-нейронах и MCR в серотонинергических нейронах, что свидетельствует о существовании морфофункциональных взаимосвязей между меланокортиновой и серотониновой системами мозга.

### Функциональная характеристика моделей метаболического синдрома у грызунов

Для изучения влияния метаболических расстройств на функциональное состояние серотониновой и меланокортиновой систем в мозге грызунов у них были индуцировано ожирение с помощью высококалорийной диеты. В качестве генетической модели MC использовали агути-мышей. Масса тела и жировой ткани, метаболические и гормональные показатели у мышей и крыс с ДИО представлены в **таблицах 3 и 4**, демонстрируя развитие у них признаков, характерных для MC.

**Таблица 3.** Масса тела, доля жировой ткани, уровни глюкозы, инсулина и лептина в крови ДИО-мышей и агути-мышей

Показатель	К1, n=13	ДИО8, n=13	ДИО16, n=13	К2, n=13	Ау/а, n=21
масса тела, г	20.1±1.0	22.7±1.6	24.9±1.3*	20.5±0.6	43.6±1.5*
доля жира, %	1.33±0.19	2.41±0.42*	2.85±0.51*	1.49±0.23	10.02±0.51*
глюкоза, мМ	5.6±0.7	6.5±0.8	7.2±0.5*	5.4±0.5	9.8±1.3*
инсулин, нг/мл	0.30±0.08	0.38±0.11	0.46±0.09*	0.29±0.07	0.87±0.15*

К1 – шестимесячные контрольные мыши для групп ДИО8 и Ау/а, К2 – восьмимесячные контрольные мыши для группы ДИО16. Все значения представлены, как  $M \pm SD$ .

**Таблица 4.** Масса тела, жировой ткани, уровни глюкозы, инсулина, лептина, а также уровни глюкозы через 120 мин после нагрузки и значения AUC<sub>0-120</sub> для глюкозной и инсулиновой кривых в глюкозотолерантном (ГТТ) или инсулин-глюкозотолерантном тесте (ИГТТ) у крыс с ожирением (ДИО) по сравнению с контрольными животными

Показатель	Контрольные крысы, n=15	ДИО-крысы, n=15
Масса тела, г	332±8	385±13*
Масса жировой ткани, г	10.0±1.1	18.1±1.7*
Глюкоза, мМ	3.9±0.1	5.1±0.3*
Инсулин, нг/мл	0.43±0.07	0.76±0.09*
ГТТ, глюкоза (120 мин), мМ	4.9±0.2	6.9±0.4*
ГТТ, глюкозная кривая, AUC <sub>0-120</sub>	955±30	1317±42*
ГТТ, инсулиновая кривая, AUC <sub>0-120</sub>	119±13	222±17*
ИГТТ, глюкозная кривая, AUC <sub>0-120</sub>	540±16	818±30*

Все значения представлены как  $M \pm SEM$ . \* - различия между ДИО и контрольными крысами статистически значимы при  $p < 0.05$ .

### Серотониновая и меланокортиновая система при ДИО и генетически-обусловленном ожирении

**Функциональная активность серотонинергических нейронов среднего мозга при ожирении.** С использованием иммуногистохимических методов не было выявлено существенных изменений содержания фермента биосинтеза серотонина ТПГ2 в нейронах DRN у мышей группы ДИО8, но показано его уменьшение (на 36%,  $p < 0.05$ ) в группе ДИО16. У мышей Au/a не выявлено различий оптической плотности ТПГ2 по сравнению с контрольной группой. У ДИО-крыс оптическая плотность ТПГ2 в нейронах DRN снижалась на 40% по сравнению с контролем ( $p < 0.05$ ). Полученные данные свидетельствуют о том, что функциональное состояние серотонинергических нейронов DRN при ожирении меняется в зависимости от типа ожирения и продолжительности высококалорийной диеты: при диета-индуцированном ожирении в течение 16 недель у мышей C57Bl/6J и 12 недель у крыс Вистар наблюдаются однонаправленные изменения в нейронах DRN, характеризующиеся уменьшением уровня ТПГ2 в них.

**Экспрессия MCR в среднем мозге при различных типах ожирения.** Результаты ПЦР у мышей при ДИО16 свидетельствуют об уменьшении уровня экспрессии генов *Mc3r* (на 36%,  $p < 0.05$ ) и *Mc4r* (на 51%,  $p < 0.05$ ) по сравнению с контролем, при этом для гена *Mclr* отмечается тенденция к снижению его экспрессии (на 35%,  $p > 0.05$ ). У мышей Au/a выявлено уменьшение экспрессии *Mc3r* на 57% ( $p < 0.05$ ) и *Mc4r* на 39% ( $p < 0.05$ ), а экспрессия *Mclr* не менялась. У крыс с ДИО в серотонинергических нейронах DRN анализ результатов двойного флуоресцентного иммуномечения свидетельствует об уменьшении уровня MC3R (на 26%,  $p < 0.05$ ) и MC4R (на 13%,  $p > 0.05$ ) по сравнению с контролем. Таким образом, при разных формах ожирения в среднем мозге наблюдается ослабление меланокортинового сигналинга, однако степень изменений варьирует в зависимости от формы ожирения. У крыс ДИО снижение MC3R и MC4R непосредственно в серотонинергических нейронах DRN на фоне уменьшения в них уровня ТПГ2 свидетельствует в пользу функциональной взаимосвязи между меланокортиновой и серотониновой системами. У мышей Au/a отсутствие изменений уровня ТПГ2 в DRN на фоне снижения экспрессии *Mc3r* и *Mc4r*, может свидетельствовать в пользу существования компенсаторных механизмов, направленных на поддержание нормального уровня ТПГ2.

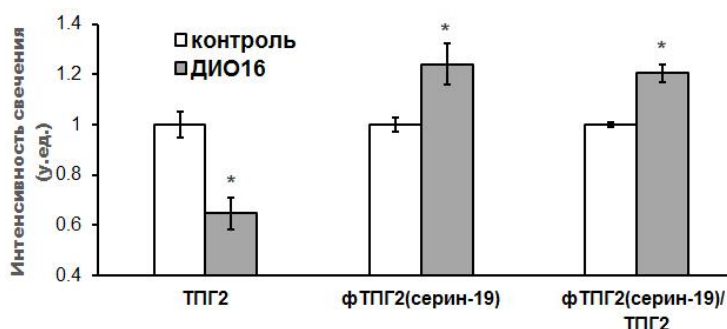
## Компенсаторные механизмы, направленные на повышение биосинтеза серотонина в среднем мозге при разных формах ожирения

На фоне уменьшения уровня ТПГ2 в «классических» серотонинергических нейронах DRN было отмечено увеличение уровня этого фермента в других нейронах, в том числе в нейронах вентральной тегментарной области (VTA), где, как было показано другими авторами, также присутствует мРНК ТПГ2 (Carkaci-Salli et al., 2011). С помощью двойного флуоресцентного иммуномечения в нейронах VTA у мышей при ДИО16 было показано увеличение содержания ТПГ2 на 62% ( $p<0.05$ ), а у ДИО-крыс увеличение на 24% по сравнению с контролем ( $p<0.05$ ).

У мышей Au/a, несмотря на отсутствие изменений содержания ТПГ2 в DRN, в VTA, как и у ДИО-мышей, содержание фермента повышалось на 42% ( $p<0.05$ ).

У мышей при ДИО16 анализ двойного флуоресцентного иммуномечения свидетельствует об увеличении в 5-HT-нейронах DRN уровня фосфорилированной формы ТПГ2 - фТПГ2 (серин-19) на 24 % ( $p<0.05$ ) что, при снижении уровня общей формы ТПГ2, приводит к изменению их соотношения в нейронах (рис. 4), указывая на ускорение перехода ТПГ2 в активную, фосфорилированную форму. При этом статистический анализ демонстрирует положительную корреляцию ( $R=0.05$ ): более высокому уровню в нейронах DRN фТПГ2(серин-19) соответствует более высокий уровень 5-HT в них.

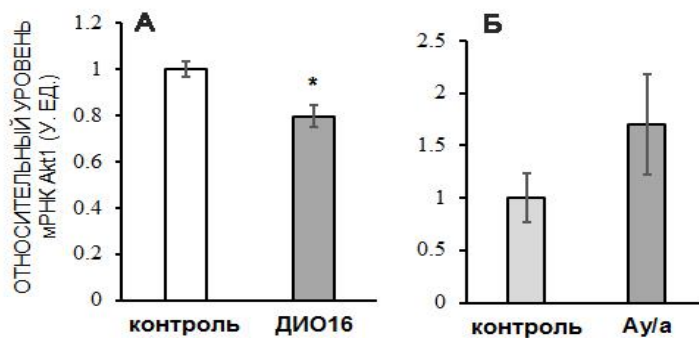
Фермент Акт-киназа (протеинкиназа В) является важным эффекторным компонентом различных сигнальных путей, в том числе регулируемых инсулином и



**Рис. 4.** Анализ общей и фосфорилированной форм ТПГ2 в нейронах DRN мыши при ДИО16. Достоверность различий (\*) между группами ( $p<0.05$ ).

лептином. Akt1 - внутриклеточный фермент, член семейства протеинкиназ В, является важнейшим звеном фосфатидилинозитол-3-киназного (PI3K) пути, имеет множество субстратов и вовлечен в регуляцию роста, пролиферации и выживаемости клеток (Chen, et al., 2001; Cho, et al., 2001). В гипоталамических нейронах он играет ключевую роль в контроле пищевого поведения и центральной регуляции энергетического обмена. Также Akt1 активирует транскрипционный фактор NF-κB (nuclear factor-kappa B) и включает транскрипцию генов выживания (Liu, et al., 2017). Об активации фермента Akt1-киназы свидетельствует ее фосфорилирование по остатку серина-473 и (или) треонина-308, причем фосфорилирование по остатку серина-473 является функционально более важным и отвечает за гипоталамическую регуляцию пищевого поведения и периферического энергетического обмена (Morton, et al., 2005). Результаты ПЦР демонстрируют в среднем мозге у мышей снижение экспрессии гена *Akt1* (на 21%,  $p<0.05$ ; рис. 5А) при ДИО16, в отличие от мышей Au/a, у которых, не выявлено достоверных изменений, но отмечается тенденция к увеличению экспрессии *Akt1* (рис. 5Б).





**Рис. 5.** Экспрессия гена *Akt1* в среднем мозге мышей при ДИО16 (А) и Ау/а (Б).

\* - достоверность отличия от соответствующего контроля ( $p < 0.05$ ).

Анализ двойного флуоресцентного иммуномечения у мышей при ДИО16 свидетельствует об уменьшении уровня общей формы Akt1 в 5-НТ-нейронах DRN (на 16%,  $p < 0.05$ ), а уровень фосфорилированной по серину-473 формы Akt1, напротив, возрастал (на 23%,  $p < 0.05$ ). Таким образом, соотношение фосфо- к общей форме Akt1 увеличивалось на 46% ( $p < 0.05$ ), что свидетельствует об ускоренном переходе общей формы Akt1 в активную фосфорилированную форму. Статистический анализ демонстрирует положительную корреляцию ( $R = 0.68$ ) между уровнем 5-НТ и фосфо-Akt1. При этом в нейронах DRN у мышей выявлено уровня BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) на 35% ( $p < 0.05$ ) при ДИО16, а у мышей Ау/а достоверных изменений не обнаружено.

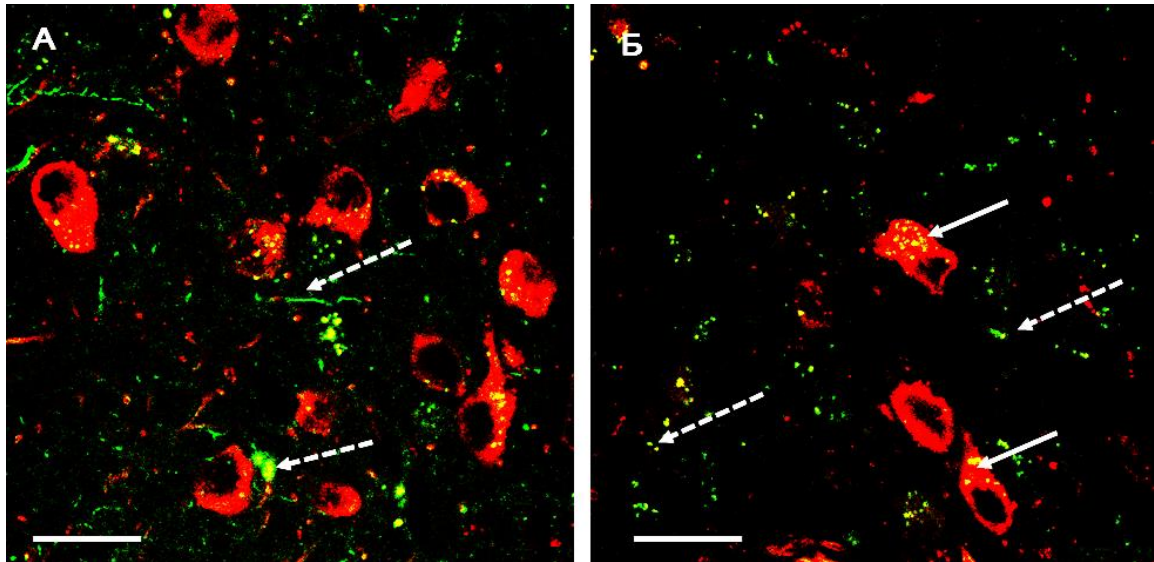
Таким образом, у мышей при ДИО увеличение уровня фосфорилированных форм ТПГ2 и Akt1 можно рассматривать как компенсаторные механизмы, направленные на поддержание активности и жизнеспособности серотонинергических нейронов, в то время как при меланокортиновом ожирении, по-видимому, работают иные механизмы компенсации.

**Анализ экспрессии гена *Trh2*** у мышей свидетельствует о том, что уровень мРНК ТПГ2 при ДИО16 в среднем мозге был на 55% ниже контрольного уровня ( $p < 0.05$ ), в то время как в гипоталамусе отличий не выявлено. У мышей Ау/а уровень мРНК ТПГ2 в среднем мозге не менялся, но в гипоталамусе был выше контрольного на 58% ( $p < 0.05$ ). Так как серотонинергические нейроны среднего мозга (DRN) иннервируют структуры гипоталамуса, то при уменьшении их функциональной активности следовало бы ожидать уменьшения уровня мРНК ТПГ2 и, соответственно, фермента биосинтеза серотонина и самого серотонина в гипоталамусе.

Результаты Вестерн-блоттинга демонстрируют в гипоталамусе мышей Ау/а увеличение содержания ТПГ2 (на 22%,  $p < 0.05$ ), а у крыс с ДИО отсутствие достоверных отличий от контрольного уровня. **Результаты ВЭЖХ** демонстрируют увеличение уровня 5-НТ (на 40%,  $p < 0.05$ ) и его метаболита 5-ГИУК (на 30%,  $p < 0.05$ ) в гипоталамусе мышей Ау/а. Полученные данные ставят вопрос о существовании дополнительных источников серотонина в гипоталамусе при ДИО.

Результаты двойного иммуномечения показывают слабо выраженную иммунореактивность к ТПГ2 у контрольных особей в различных нейронах гипоталамуса (вазопрессин-, РОМС-, ТГ, орексинергических), а также увеличение в них уровня ТПГ2 у мышей при ДИО16, Ау/а и крыс при ДИО. Так, в РОМС-нейронах ARC увеличение уровня ТПГ2 у мышей при ДИО16 составило 40% ( $p < 0.05$ ), а у мышей Ау/а – 50% ( $p < 0.05$ ) по сравнению с соответствующим контролем.

Ранее с помощью гибридизации *in situ* мРНК ТПГ2 кроме DRN показана и в других структурах мозга (в VTA, амигдале, гиппокампе), но в значительно меньших количествах

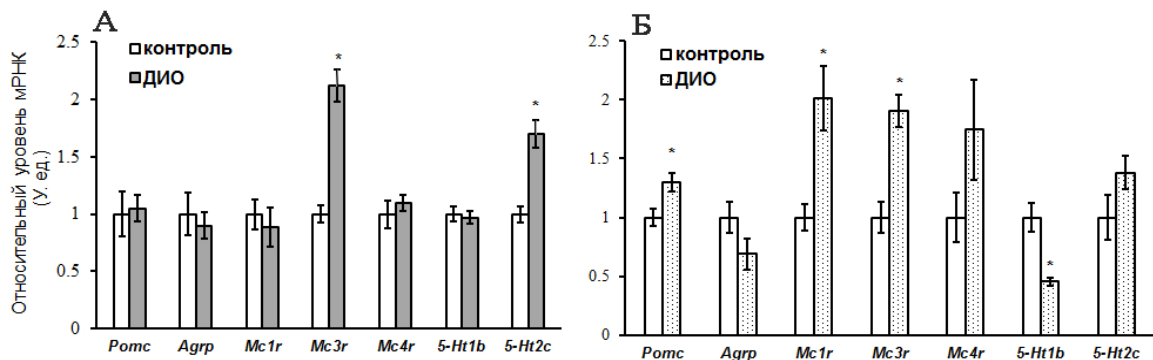


**Рис. 6.** Двойное флуоресцентное иммуномечение РОМС (красный) и ТПГ2 (зеленый) в аркуатном ядре гипоталамуса мыши C57Bl/6J: А – контроль, Б – при ДИО16. Сплошные стрелки – ТПГ2 в телах РОМС-иммунопозитивных нейронов, пунктирные стрелки – в структурах другой эргичности. Масштаб 20 мкм.

(Carkaci-Salli et al., 2011). Выявление в нейронах гипоталамуса ТПГ2 предполагает их способность к синтезу серотонина, что указывает на существование новых механизмов аутокринной и паракринной серотониновой регуляции в гипоталамусе, в том числе реализуемых при ожирении.

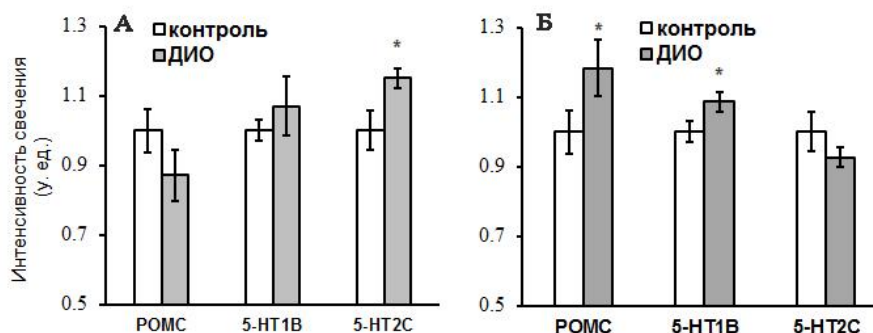
### Взаимодействие серотонинергической системы с РОМС-нейронами гипоталамуса при ожирении

Данные ПЦР демонстрируют, что в гипоталамусе мышей ДИО8 отсутствуют изменения экспрессии генов, кодирующих большинство компонентов меланокортиновой сигнальной системы (*Pomc*, *Agrp*, *Mc1r*, *Mc4r*), в то время как экспрессия гена *Mc3r* была повышена в 2.5 раза ( $p < 0.05$ ) (рис. 7А). На этом фоне экспрессия гена *5-Ht1b* (5-НТ<sub>1b</sub>R) не менялась, а экспрессия гена *5-Ht2c* (5-НТ<sub>2c</sub>R), напротив, возрастала в 1.7 раза ( $p < 0.05$ ). У мышей группы ДИО16 в гипоталамусе (рис. 7Б) выявлено увеличение



**Рис. 7.** Анализ экспрессии генов в гипоталамусе мышей при ДИО, развивающемся в течение 8 (А) и 16 недель (Б). Достоверность отличий (\*) от соответствующего контроля ( $p < 0.05$ ). Данные представлены в условных единицах (у. ед.).

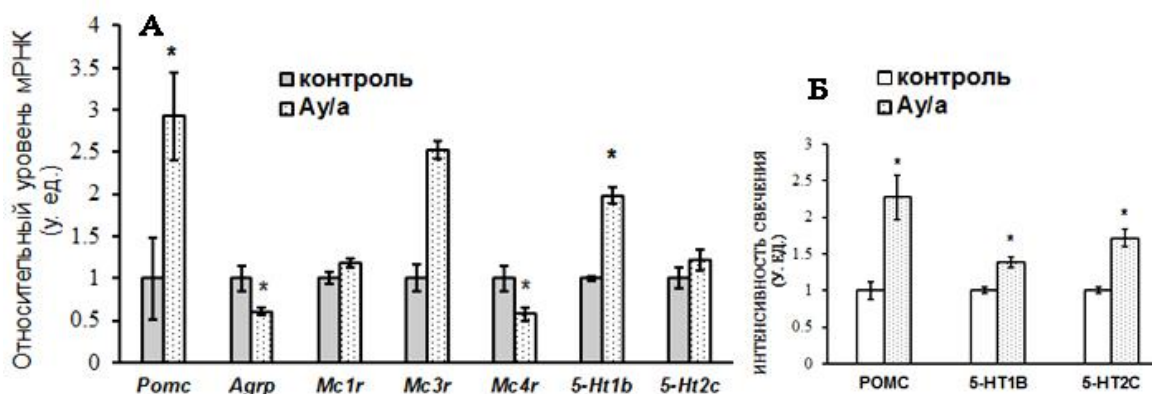
экспрессии генов, кодирующих компоненты меланокортиновой системы: *Pomc* (на 26%,  $p < 0.05$ ), *Mclr* (в 2.5 раза,  $p < 0.05$ ), *Mc3r* (в 2 раза,  $p < 0.05$ ); при этом наблюдалась лишь тенденция к снижению экспрессии *Agpr* и увеличению экспрессии *Mc4r* ( $p > 0.05$ ). При этом отмечали уменьшение уровня мРНК 5-HT<sub>1B</sub>R (на 50%,  $p < 0.05$ ) и тенденцию к увеличению уровня мРНК 5-HT<sub>2C</sub>R ( $p > 0.05$ ). Таким образом, при развитии ожирения (от 8 до 16 недель) у мышей отмечаются изменения экспрессии как компонентов меланокортиновой, так и серотониновой систем: увеличение POMC, MCR, а также снижение уровня экспрессии 5-HT<sub>1B</sub>R и 5-HT<sub>2C</sub>R.



**Рис. 8.** Интенсивность свечения POMC и 5-НTR в POMC-нейронах ARC у мышей с ДИО продолжительностью 8 (А) или 16 (Б) недель. Достоверность различий (\*) по сравнению с соответствующим контролем ( $p < 0.05$ ). Данные представлены в условных единицах (у. ед.).

Анализ двойного флуоресцентного иммуномечения POMC-иммунопозитивных нейронов ARC у мышей при ДИО8 не выявил достоверных изменений в них уровня 5-HT<sub>1B</sub>R (**рис. 8А**), при этом уровень 5-HT<sub>2C</sub>R возрастал не только в POMC-нейронах (на 20%,  $p < 0.05$ ), но и в структурах ARC другой эргичности. При этом не было выявлено достоверного изменения уровня POMC в нейронах ARC. У мышей при ДИО16 в POMC-нейронах (**рис. 8Б**) выявлено увеличение уровня POMC (на 24%,  $p < 0.05$ ), что согласуется с результатами ПЦР. Однако уровень 5-HT<sub>1B</sub>R в POMC-нейронах, по сравнению с результатами ПЦР, напротив, возрастал (на 15%,  $p < 0.05$ ), а уровень 5-HT<sub>2C</sub>R достоверно не менялся (**рис. 8Б**).

У мышей Au/a результаты ПЦР свидетельствуют об изменении в гипоталамусе уровня мРНК как компонентов меланокортиновой, так и серотониновой систем (**рис. 9А**).



**Рис. 9.** Анализ экспрессии генов в гипоталамусе (А) и интенсивность свечения POMC и 5-НTR в POMC-нейронах ARC (Б) у мышей Au/a. Достоверность различий (\*) по сравнению с соответствующим контролем ( $p < 0.05$ ), данные представлены в условных единицах (у. ед.).

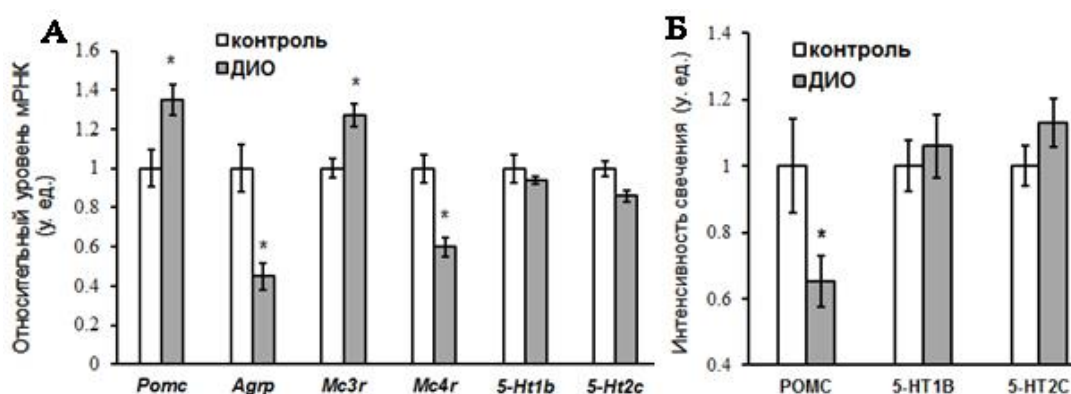
Выявлено увеличение уровня мРНК POMC (в 2.7 раза,  $p < 0.05$ ) и MC3R (в 2.5 раза,  $p < 0.05$ ) при уменьшении уровня мРНК AgRP (на 45%,  $p < 0.05$ ) и MC4R (на 50%,  $p < 0.05$ ). На этом фоне выявлено увеличение уровня мРНК 5-HT<sub>1B</sub>R (в 2 раза,  $p < 0.05$ ) при отсутствии изменений уровня мРНК 5-HT<sub>2C</sub>R.

Анализ двойного флуоресцентного иммуномечения у мышей Au/a свидетельствует об увеличении в телах (на 38%,  $p < 0.05$ ) и в отростках POMC-иммунопозитивных нейронов ARC содержания 5-HT<sub>1B</sub>R (рис. 9Б), а также об увеличении содержания 5-HT<sub>2C</sub>R как в телах POMC-нейронов (на 70%,  $p < 0.05$ ), так и в нейронах другой эргичности по сравнению с контролем (рис. 9Б). На этом фоне отмечается увеличение содержания и самого POMC в телах и отростках нейронов ARC.

Таким образом, если у мышей C57Bl/6J развитие ожирения сопровождается перераспределением в POMC-нейронах 5-HT<sub>1B</sub>R и 5-HT<sub>2C</sub>R, то при меланокортиновом ожирении наблюдается увеличение содержания обоих подтипов рецепторов, что, очевидно, обеспечивает определенный регуляторный механизм, контролирующей влияние серотонина на функциональную активность POMC-нейронов гипоталамуса.

У крыс при ДИО анализ уровня мРНК в гипоталамусе (рис. 10А) свидетельствует об увеличении экспрессии POMC (на 35%,  $p < 0.05$ ) и MC3R (на 27%,  $p < 0.05$ ), уменьшении экспрессии AgRP (на 55%,  $p < 0.05$ ) и MC4R (на 40%,  $p < 0.05$ ). При этом достоверных изменений уровня мРНК 5-HT<sub>1B</sub>R и 5-HT<sub>2C</sub>R выявлено не было. У крыс с ДИО анализ двойного флуоресцентного иммуномечения в телах POMC-нейронов ARC не выявил достоверных изменений уровня 5-HT<sub>1B</sub>R и 5-HT<sub>2C</sub>R (рис. 10Б). При этом отмечается увеличение уровня этих рецепторов в нейронах ARC другой эргичности. На этом фоне отмечено уменьшение уровня POMC в нейронах ARC (на 35%,  $p < 0.05$ ) по сравнению с контролем, что подтверждается и результатами Вестерн-блоттинга.

Т.о. изменения серотониновой сигнализации в POMC-нейронах существенно зависят от типа ожирения и факторов, которые являются его ключевыми причинами, приводящими к ожирению и МС. В условиях индуцированного кафетерий-диетой ожирения в различных областях гипоталамуса запускаются компенсаторные механизмы, направленные на усиление анорексигенных и подавление орексигенных влияний, что должно обеспечить ослабление гиперфагии и уменьшение негативных последствий избыточного потребления калорий.



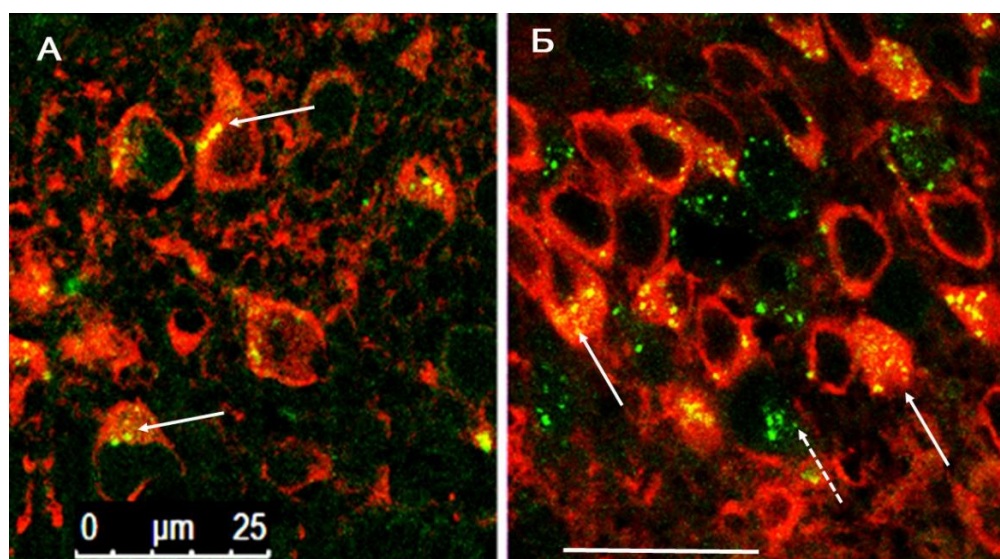
**Рис. 10.** Анализ экспрессии генов в гипоталамусе (А) и интенсивность свечения POMC и рецепторов серотонина в POMC-нейронах ARC (Б) у крыс при ДИО. Достоверность различий (\*) по сравнению с соответствующим контролем ( $p < 0.05$ ), данные представлены в условных единицах (у. ед.).

### Роль MC1R в гипоталамусе при диета-индуцированном ожирении

У мышей в гипоталамусе было показано увеличение уровня мРНК MC1R в 2.5 раза ( $p < 0.05$ ) при ДИО16 (рис. 7Б), в отличие от мышей при ДИО8 и Au/a, у которых уровень



мРНК MC1R в гипоталамусе не менялся (рис. 7А, 9А). У мышей при ДИО16 в гипоталамусе было выявлено увеличение на 26% ( $p < 0.05$ ) уровня мРНК POMC (рис. 7Б).



**Рис. 11.** Двойное флуоресцентное иммуномечение MC1R (зеленый) и POMC (красный) в ARC мыши: А – контроль, Б – ДИО продолжительностью 16 недель. Сплошные стрелки – MC1R в телах POMC-нейронов, прерывистые – MC1R в структурах другой эргичности. Масштаб 25 мкм.

У мышей при ДИО16 анализ флуоресцентного иммуномечения подтверждает данные ПЦР и свидетельствует об увеличении уровня MC1R в POMC-нейронах ARC в 2 раза ( $2.2 \pm 0.2$  по сравнению с  $1.0 \pm 0.3$  у. ед в контроле,  $p < 0.05$ ), как и самого POMC (на 24%,  $p < 0.05$ ; рис. 11).

Основываясь на данных об участии MC1R в реакциях нейровоспаления (Xu et al., 2019), в гипоталамусе ДИО16-мышей с помощью флуоресцентного иммуномечения было изучено содержание белка Iba1 - маркера микроглии. Было выявлено повышение в ARC количества Iba1-иммунопозитивных клеток (на 62%,  $p < 0.05$ ), увеличение толщины и количества их отростков, заполненных иммунопозитивным веществом, увеличение интенсивности свечения Iba1 в телах клеток (на 32%,  $p < 0.05$ ) по сравнению с контрольными мышами, что свидетельствует об активации микроглии при ДИО.

У ДИО-крыс, несмотря на то, что уровень мРНК POMC в гипоталамусе был достоверно выше контрольного (рис. 10А), уровень POMC в нейронах ARC, напротив, достоверно снижался (рис. 10Б). Результаты Вестерн-блоттинга свидетельствуют об отсутствии различий между уровнями MC1R или Iba1 в гипоталамусе контрольных и ДИО-крыс. Особенности изменений в экспрессии MC1R и Iba1 для ДИО-мышей и ДИО-крыс, как мы полагаем, обусловлены видоспецифичностью этих изменений. Кроме того, у крыс такие изменения могут проявляться на более поздних сроках ожирения.

В настоящее время в литературе обсуждается вопрос о нейропротективных свойствах меланокортиновых пептидов (Xu et al., 2019). Полученные нами данные свидетельствуют о том, что активация MC1R-опосредованного пути в POMC-нейронах ARC у мышей с ДИО может быть одной из причин увеличения уровня POMC в них, что, в условиях развития нейровоспаления, как мы полагаем, направлено на реализацию нейропротективных свойств меланокортинов и свидетельствует о возможной роли MC1R в этих нейронах как ауторецептора.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то, что исследования меланокортиновой и серотониновой систем мозга продолжают в течение многих лет, вопрос о функциональном взаимодействии между ними остается мало исследованным. Известно, что обе системы вовлечены в регуляцию важнейших функций организма. Они участвуют в поддержании энергетического баланса, контроле пищевого поведения, регуляции цикла бодрствование-сон, в формировании приспособительных реакций и др. Проекции POMC-нейронов обнаружены в областях мозга, где локализованы тела серотонинергических нейронов или их отростки. В свою очередь, отростки серотонинергических нейронов проецируются в гипоталамус, в частности, они выявлены в аркуатном ядре, где расположены POMC-нейроны, в которых показана экспрессия 5-HT<sub>2C</sub>R (Doslíkova et al., 2013). Эти данные указывают на существование функциональных взаимосвязей между меланокортиновой и серотониновой системами мозга, доказательства которых были получены в ходе проведенных нами исследований.

Впервые полученные данные об экспрессии в POMC-нейронах 5-HT<sub>1B</sub>R, существенно расширяют представления о роли серотонина в регуляции функций POMC-нейронов через различные сигнальные пути, сопряженные не только с активирующими (через 5-HT<sub>2C</sub>R), но и с тормозными (5-HT<sub>1B</sub>R) эффектами серотонина.

Ранее в мозге показана экспрессия меланокортиновых рецепторов MC3R и MC4R, а с помощью двойного иммуномечения эти рецепторы были выявлены в дофаминергических нейронах среднего мозга и гипоталамуса (Михрина и др., 2018). Полученные нами результаты свидетельствуют об экспрессии MC3R и MC4R в серотонинергических нейронах ядер шва, что свидетельствует о возможности прямого влияния меланокортиновых пептидов на функциональную активность серотонинергических нейронов мозга.

Результаты, представленные в настоящей работе, впервые демонстрируют экспрессию MC1R в различных ядрах гипоталамуса, а также и в серотонинергических нейронах ядер шва, что свидетельствует об участии MC1R-зависимого пути в регуляции функциональной активности различных нейронов мозга. Тот факт, что MC1R выявляются и в самих POMC-нейронах, локализованных не только в гипоталамусе, но и в других формациях мозга, свидетельствует о возможном функционировании MC1R как ауторецептора, регулирующего активность экспрессирующих их POMC-нейронов, что ранее было показано только для MC3R (Olney et al., 2014).

У мышей, потребляющих длительное время высококалорийную пищу, развивается MC, что сопровождается запуском в гипоталамусе воспалительного процесса, связанного с увеличением числа и активацией клеток микроглии. Увеличение при этом уровня MC1R, в том числе в POMC-нейронах аркуатного ядра, может свидетельствовать об участии MC1-меланокортиновой системы в защитных механизмах, направленных на увеличение выживаемости нейронов при окислительном стрессе, который развивается при ожирении.

Нами получены приоритетные данные, демонстрирующие возможность биосинтеза серотонина в нейронах гипоталамуса (в частности, в POMC-нейронах), что указывает на существование в гипоталамусе механизмов аутокринной и паракринной серотониновой регуляции, которые активируются при метаболических расстройствах, вызванных ожирением различной этиологии.

Известно, что протеинкиназа В (Akt1) участвует в регуляции нейронов гипоталамуса. В настоящей работе у мышей при длительном ДИО показана роль этого фермента в регуляции серотонинергических нейронов дорзального ядра шва. В этих нейронах, несмотря на снижение уровня Akt1-киназы и основного фермента биосинтеза серотонина – ТПГ2, отмечается увеличение их активных, фосфорилированных форм, а также повышение уровня BDNF, что можно рассматривать как компенсаторные механизмы, направленные на поддержание активности и жизнеспособности

серотонинергических нейронов. Эти данные могут быть использованы при разработке фармакологических стратегий для предотвращения патологических процессов, вызванных избыточной массой тела и МС. Однако у мышей с генетически-обусловленным меланокортиновым ожирением этого не было выявлено, что может свидетельствовать о существовании различных компенсаторных путей при ожирении различной этиологии.

Таким образом, в работе представлен целый ряд принципиально новых данных, которые демонстрируют тесное взаимодействие между меланокортиновой и серотониновой системами в различных отделах мозга, в первую очередь в гипоталамусе, определяют его возможную роль в функционировании всей интегративной гормональной сети в ЦНС, а также показывают, что функциональные изменения такого взаимодействия являются одними из молекулярных причин развития ожирения и МС.

## **ВЫВОДЫ:**

- 1) Непосредственное влияние меланокортиновой системы на функциональную активность серотонинергических нейронов мозга опосредовано различными типами меланокортиновых рецепторов (MC1R, MC3R и MC4R), которые экспрессируются в серотонинергических нейронах.
- 2) Экспрессия MC1R выявлена в гипоталамусе, что свидетельствует о функциональном значении этого рецептора в регуляции функций различных нейронов гипоталамуса. Экспрессия MC1R в POMC-продуцирующих нейронах мозга также свидетельствует о его возможной роли как ауторецептора.
- 3) В POMC-нейронах гипоталамуса впервые выявлены серотониновые рецепторы 1В-подтипа (5-HT<sub>1B</sub>R), уровень которых меняется при различных формах ожирения, что свидетельствует об участии 5-HT<sub>1B</sub>R-зависимого пути в регуляции функционирования POMC-нейронов.
- 4) Показано, что различные по этиологии формы ожирения различаются по степени изменения экспрессии и активности триптофангидроксилазы-2 в серотонинергических нейронах среднего мозга. При диета-индуцированном ожирении у крыс (12 недель) и мышей (16 недель) отмечается уменьшение уровня триптофангидроксилазы-2, а у мышей при менее продолжительном диета-индуцированном ожирении (8 недель) или с генетически обусловленным меланокортиновым ожирением уровень ТПГ2 существенно не меняется.
- 5) Различные формы ожирения сопровождаются повышением экспрессии триптофангидроксилазы-2 в нейронах гипоталамуса, в частности в POMC-нейронах, что способно нормализовать уровень серотонина в гипоталамусе, сниженный при этих метаболических нарушениях.
- 6) В гипоталамусе мышей с диета-индуцированным ожирением выявлено повышение экспрессии генов *Mclr* и *Pomc*, а также увеличение уровня MC1R в POMC-иммунопозитивных нейронах, что можно рассматривать как опосредованный через MC1R механизм, направленный на компенсаторное увеличение продукции POMC в нейронах мозга.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### - в журналах из списка ВАК

- 1) **Михайлова Е.В.**, Свиридова Д.Л., Романова И. В., Деркач К.В., Шпаков А.О. Влияние диета-индуцированного и меланокортинового ожирения на экспрессию триптофангидроксилазы 2 в нейронах среднего мозга и гипоталамуса мышей. *Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* – 2020. 106(10): 1238-1250.
- 2) **Михайлова Е.В.**, Романова И.В., Деркач К.В., Вишневская О.Н., Шпаков А.О. Влияние диета-индуцированного и меланокортинового ожирения на экспрессию триптофангидроксилазы 2 типа в дорсальном ядре шва и вентральной покрышке среднего мозга у мышей. *Ж. эвол. биохим. физиол.* Т.55 (4). С.60-68. **2019.** DOI: 10.1134/S0044452919040090
- 3) Морина И.Ю., **Михайлова Е.В.**, Романова И.В., Деркач К.В., Шпаков А.О. Орексин-А и его рецепторы в гипоталамусе мышей с диета-индуцированным и меланокортиновым ожирением. *Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 105 (4): 481-491. **2019.** DOI: 0.1134/S0869813919040046
- 4) Романова И.В., **Михайлова Е.В.**, Шпаков А.О. Иммунохимическая идентификация меланокортиновых и лептиновых рецепторов на серотонинергических нейронах среднего мозга крыс // *Росс физиол журнал им. И.М. Сеченова.* - **2018.** - Т. 104, №1. С.68-77.
- 5) 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 of Normal and Obese Rodents // *Neurochemical Research.* – **2018.** 43(4), 821-837. DOI: 10.1007/s11064-018-2485-z
- 6) Михрина А.Л., Чернышев М.В., **Михайлова Е.В.**, Савельева Л.О., Романова И.В. Участие AGRP в регуляции двигательной активности. *Российский физиол. журн им. И.М. Сеченова.* Т.104, №7. С. 769-779. **2018.** DOI: 10.7868/S0869813918070031
- 7) **Михайлова Е.В.**, Романова И.В., Деркач К.В., Бондарева В.М., Шпаков А.О. Содержание серотониновых и дофаминовых рецепторов на гипоталамических проопиомеланокортин-иммунопозитивных нейронах мышей с диета-индуцированным и меланокортиновым ожирением. *Российский физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* Т. 104, №6. С. 683-691. **2018.**
- 8) Романова И.В., **Михайлова Е.В.**, Шпаков А.О. Иммунохимическая идентификация меланокортиновых и лептиновых рецепторов на серотонинергических нейронах среднего мозга крыс. *Российский физиол. Журнал им. И.М. Сеченова.* Т.104, №1. С. 68-77. **2018.** [Romanova I.V., Mikhailova E.V., Shpakov A.O. Immunochemical identification of melanocortin and leptin receptors on serotonergic neurons in the rat midbrain. *Neuroscience and Behavioral Physiology.* 2019. 49 (7): 832-837. DOI: 10.1007/s11055-019-00809-w]

### - публикации в других печатных изданиях:

- 1) **Mikhailova E.V.** and Romanova I.V. Investigation of Mechanisms Aimed on Serotonin Biosynthesis Increasing in the Brain at the Dorsal Raphe Nucleus Neurons Dysfunction. *Журн. эвол. биохим. и физиол.* Т.56 (дополнительный выпуск №7). Материалы XVI Всероссийской конференции с междунар. участием «Совещание по эволюционной физиологии имени академика Л.А. Орбели (19-22 октября 2020) и IX Школы по эволюционной физиологии (22-24 октября 2020), Санкт-Петербург, Россия. P. 777. DOI: 10.31857/S004445292007205X
- 2) **Михайлова Е.В.**, Косицын Ю.М., Романова И.В. Роль меланокортинового рецептора 1 в мозге как ауторецептора. II Всероссийская научная конференция с международным участием «ОПТОГЕНЕТИКА+ 2020» и школа по современным методам неинвазивного контроля нейрональной активности. Сборник научных трудов. 22-26 апреля **2020** года, Санкт-Петербург. С.85-86.



- 3) Романова И.В., Михрина А.Л., **Михайлова Е.В.** Роль меланокортиновой системы в регуляции стрессорного ответа. Интегративная физиология. Т.1 (2). **2020**. С.144-147;
- 4) **Михайлова Е.В.**, Михрина А.Л., Романова И.В. Исследование морфофункциональных взаимосвязей между меланокортиновой и серотонинергической системами мозга. Тезисы всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология», посвященной 170-летию со дня рождения И.П. Павлова. 24-26 сентября **2019**, Санкт-Петербург. С. 159-160.
- 5) Романова И.В., Деркач К.В., Сухов И.Б., **Михайлова Е.В.**, Михрина А.Л., Шпаков А.О. Экспрессия дофаминовых, серотониновых и лептиновых рецепторов на проопиомеланокортин-позитивных нейронах у грызунов в норме и при ожирении. Материалы XIV Международного междисциплинарного Конгресса «Нейронаука для медицины и психологии», 4 - 10 июня **2018** г., Судак, Крым, РОССИЯ. С. 391-392.
- 6) **Михайлова Е.В.**, Деркач К.В., Шпаков А.О., Романова И.В. Взаимодействие серотониновой и лептиновой систем в мозге крыс при диета-индуцированном ожирении. Конференция с международным участием «Физиология и биохимия сигнальных систем», посвященная 100-летию со дня рождения академика Т.М. Турпаева. 23-25 октября **2018**, Москва. С.62-63.
- 7) Романова И.В., Михрина А.Л., **Михайлова Е.В.**, Шпаков А.О. Локализация рецепторных компонентов меланокортиновой, лептиновой и моноаминергических систем на телах нейронов гипоталамуса и среднего мозга, как основа их функционального взаимодействия. Сборник статей Межд. конф. «Рецепция и внутриклеточная сигнализация», 22–25 мая 2017 г., Пущино. **2017**. С. 67–72.
- 8) Bakhtyukov A.A., Romanova I.V., Mikhrina A.L., **Mikhailova E.V.**, Derkach K.V., Sukhov I.B., Shpakov A.O. The expression of the leptin, dopamine and serotonin receptors in hypothalamic POMC-neurons in norm and obesity. Артериальная гипертензия. **2017**. Т. 23. Приложение 1. (Сб. тезисов XII Межд. конгресса «Метаболический синдром, сахарный диабет 2-го типа и атеросклероз» (MSDA 2017), 8–10 июня 2017 г., Санкт-Петербург). С. 72–73.
- 9) **Mikhailova E.V.**, Romanova I.V., Mikhrina A.L., Shpakov A.O. Immunochemical evidence of interaction between dopamine, serotonin, melanocortin and leptin signaling systems in the hypothalamus and midbrain. Fourth biennial German–Russian symposium “Molecular Neurobiology Today and Tomorrow”, Moscow, Russia, April 5–9, **2017**. P. 46.
- 10) Романова И.В., Михрина А.Л., **Михайлова Е.В.**, Деркач К.В., Шпаков А.О. Колокализация компонентов лептиновой, меланокортиновой и моноаминергических систем в гипоталамических POMC-нейронах, ядре шва и VTA-области мозга крыс и мышей, как основа функционального взаимодействия этих систем. Мат. XXIII Съезда Физиологического общества им. И.П. Павлова, 18–22 сентября **2017** г., Воронеж. С. 1220–1222.
- 11) Романова И.В., Михрина А.Л., **Михайлова Е.В.**, Сухов И.Б., Деркач К.В., Шпаков А.О. Иммунохимические доказательства взаимодействия лептиновой, меланокортиновой и моноаминергических систем в гипоталамусе, ядре шва и вентральной тегментарной области у крыс. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. **2017**. Т. 15. Приложение 2. (Российская научная конф., посв. 125-летию акад. С.В. Аничкова «Фармакология регуляторных нейропептидов», 9–11 октября **2017** г., С-Петербург). С. 60.
- 12) **Михайлова Е.В.**, Михрина А.Л., Романова И.В. Морфофункциональные взаимодействия меланокортиновой и серотонинергической систем мозга при меланокортиновом ожирении у мышей. Материалы XV всероссийского совещания с международным участием и VIII школы по эволюционной физиологии, посвященных памяти академика Л.А. Орбели и 60-летию ИЭФБ РАН, 17-22 октября **2016** г., СПб. С. 157.