

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ  
ИМ. И.М. СЕЧЕНОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

---

*На правах рукописи*

**МИХАЙЛОВА ЕЛЕНА ВИКТОРОВНА**

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

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**03.03.01 – ФИЗИОЛОГИЯ**  
**03.01.04 – БИОХИМИЯ**

**Санкт–Петербург**  
**2020**

<b>ОГЛАВЛЕНИЕ</b> .....	2
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	5
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	6
<b>Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	12
1.1. Общая характеристика меланокортиновой системы.....	12
1.1.1. POMC и меланокортиновые пептиды.....	12
1.1.2. Меланокортиновые рецепторы.....	17
1.1.3. Вспомогательные белки меланокортиновых рецепторов.....	27
1.1.4. Белки семейства Агути.....	29
1.1.5. Махогани и Синдекан 3.....	31
1.1.6. Меланокортиновая система мозга.....	32
1.1.6.1. Анатомическое строение меланокортиновой системы мозга.....	32
1.1.6.2. Регуляция POMC-нейронов гипоталамуса.....	35
1.1.6.3. Экспрессия и функции меланокортиновых рецепторов в ЦНС.....	36
1.1.6.4. Агути-подобный белок (AgRP).....	38
1.2. Серотониновая система мозга.....	40
1.2.1. Анатомическая структура серотониновой системы мозга.....	40
1.2.2. Дополнительные источники биосинтеза серотонина в мозге.....	43
1.2.3. Биосинтез и метаболизм серотонина.....	43
1.2.4. Серотониновые рецепторы.....	45
1.2.5. Везикулярный транспорт и обратный захват серотонина.....	47
1.3. Взаимодействие меланокортиновой и серотониновой систем мозга.....	48
1.4. Метаболический синдром.....	49
1.4.1. Меланокортиновая система гипоталамуса при метаболическом синдроме.....	52
1.4.2. Серотониновая система мозга при метаболическом синдроме.....	53
<b>Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....	55
2.1. Экспериментальные животные и экспериментальные модели.....	55
2.1.1. Диета-индуцированное ожирение у мышей и крыс.....	56
2.1.2. Меланокортиновое ожирение - мыши Agouti yellow, генотип Ay/a, генетически предрасположенные к ожирению.....	56
2.1.3. Исследование метаболических параметров.....	56
2.2. Обработка материала.....	57
2.3. Иммуногистохимические методы.....	59
2.3.1. Биотин–стрептавидиновый метод.....	59

2.3.2. Одиночное флуоресцентное иммуномечение.....	60
2.3.3. Двойное флуоресцентное иммуномечение.....	60
2.4. Вестерн–блоттинг.....	62
2.5. Метод обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени.....	63
2.6. Получение изображений и их анализ.....	66
2.7. Определение уровня серотонина и его метаболита в ткани.....	67
2.8. Статистический анализ результатов.....	67
<b>Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....</b>	<b>69</b>
3.1. Исследование экспрессии MC1R в различных отделах мозга.....	69
3.1.1. Экспрессия MC1R в гипоталамусе и в среднем мозге мышей, в том числе в POMC-иммунопозитивных нейронах.....	69
3.1.2. Экспрессия MC1R в POMC-иммунопозитивных нейронах гиппокампа и коры больших полушарий.....	71
3.2. Исследование морфофункциональных взаимосвязей меланокортиновой системы с серотонинергическими нейронами мозга.....	73
3.2.1. Анализ экспрессии рецепторов серотонина в POMC-нейронах ARC.....	74
3.2.2. Анализ экспрессии меланокортиновых рецепторов в серотонинергических нейронах в среднем мозге.....	75
3.3. Метаболические характеристики исследованных мышей и крыс.....	77
3.4. Анализ функциональной активности серотонинергических нейронов среднего мозга при ожирении разной этиологии.....	79
3.4.1. При диета-индуцированном ожирении у мышей.....	79
3.4.2. При меланокортиновом ожирении у мышей Agouti yellow.....	82
3.4.3. При диета-индуцированном ожирении у крыс.....	83
3.4.4. Анализ экспрессии генов <i>Mcr</i> в среднем мозге у мышей и крыс при различных типах ожирения.....	84
3.4.5. Компенсаторные механизмы, направленные на увеличение биосинтеза серотонина в среднем мозге при разных формах ожирения у мышей и крыс.....	86
3.5. Анализ уровня мРНК триптофанидоксилазы-2 и серотонина в среднем мозге и гипоталамусе у мышей при ожирении.....	93
3.6. Анализ функциональной активности нейронов гипоталамуса при ожирении.....	94
3.6.1. Анализ взаимодействия серотониновой системы с POMC-нейронами гипоталамуса при диета-индуцированном ожирении у мышей C57BL/6J.....	95
3.6.2. Анализ взаимосвязи серотониновой системы с POMC-нейронами	

гипоталамуса при меланокортиновом ожирении у мышей Agouti yellow.....	97
3.6.3. Анализ взаимодействия серотониновой системы с POMC-нейронами гипоталамуса при диета-индуцированном ожирении у крысы Вистар.....	102
3.6.4. Исследование экспрессии TTP2 в нейронах гипоталамуса при ожирении.....	107
3.7. Роль MC1R в гипоталамусе при диета-индуцированном ожирении.....	111
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>114</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>116</b>
<b>СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>118</b>

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

**5-ГИУК**-5-гидроксииндолуксусная кислота

**АКТГ** – адренотропный гормон

**ARC** – arcuate hypothalamic nucleus, аркуатное ядро гипоталамуса

**ГЭБ** - гематоэнцефалический барьер

**ДИО** – диета-индуцированное ожирение

**КПЕ** – карбоксипептидаза E

**МАО** - моноамин оксидаза

**МС** – метаболический синдром

**МСГ** – меланоцитстимулирующий гормон

**ПКА** – протеинкиназа A

**ПКС** – протеинкиназа C

**ТПГ** – триптофангидроксилаза

**цАМФ** – циклический аденозинмонофосфат

**5-HT<sub>1</sub>** - серотониновые рецепторы

**5-HT**- серотонин

**AgRP** - агути-подобный пептид

**Akt** – RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, protein kinase B- $\alpha$ , - протеинкиназа B

**Ay/a** - Agouti yellow мыши

**ERK 1/2** – (extracellular signal-regulated kinase-1/2), киназы-1/2, регулируемые  
внеклеточными сигналами

**GPCR** - G-protein-coupled receptors, G-белок связанные рецепторы

**МАРК** – митоген-активируемые протеинкиназы

**MCR** – меланокортиновый рецептор

**MRAP** – вспомогательные белки меланокортиновых рецепторов

**NTS** – nucleus tractus solitarius, ядро одиночного тракта

**РС** - прогормонконвертаза

**PI3K** -phosphoinositide 3-kinases, фосфотидилинозитол-3-киназы

**РОМС** - проопиомеланокортин

**SN** – substantia nigra, черная субстанция среднего мозга

**VTA** – ventral tegmental area, вентральная тегментарная область

## 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 показана в POMC-нейронах (Doslikova 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>R 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 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 паталогическое 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>R и 5-HT<sub>2c</sub>R 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.

**Цель настоящей работы:** 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 POMC-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 POMC-нейронов, в том числе в POMC-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 взаимодействие 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 21 работы, из которых – 8 статей 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 с их обсуждением, выводов, заключения и списка литературы, включающего **329** источников (в том числе 15 в отечественных журналах). Работа изложена на **146** страницах компьютерного текста, иллюстрирована **56** рисунками и **8** таблицами.

**Благодарности.** Автор выражает искреннюю благодарность всем сотрудникам лаборатории молекулярной эндокринологии и нейрохимии ИЭФБ РАН за терпение и помощь в проведении исследований, а также сотрудникам группы интегративной нейроэндокринологии ИЭФБ РАН за постоянную поддержку.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1. Общая характеристика меланокортиновой системы

Меланокортиновая система – эволюционно древняя система, возникшая у позвоночных около 500 миллионов лет назад, однако ортологи ее элементов встречаются также у беспозвоночных животных и даже у сумчатых грибов (Harno et al., 2018; Rocha et al., 2019). Эта система состоит из большого числа компонентов, интегративное взаимодействие которых обеспечивает регуляцию различных функций организма как в периферических тканях, так и в мозге.

К элементам меланокортиновой системы относят:

- 1) проопиомеланокортин (proopiomelanocortin – POMC), прогормон, который является предшественником меланокортиновых пептидов:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -меланоцитстимулирующих гормонов (МСГ) и адренокортикотропного гормона (АКТГ), а также эндогенных опиоидов и некоторых других пептидов;
- 2) меланокортиновые рецепторы пяти типов (melanocortin receptor, MC1R-5R);
- 3) вспомогательные белки меланокортиновых рецепторов (melanocortin receptor accessory proteins – MRAP);
- 4) эндогенные антагонисты меланокортиновых рецепторов: белок Агути и агути-подобный пептид (AgRP) - белки семейства Агути;
- 5) трансмембранные гликопротеиды махогани и синдекан-3, являющиеся корецепторами к белку Агути и AgRP.

#### 1.1.1. POMC и меланокортиновые пептиды

По всей видимости, ген POMC возник более 500 миллионов лет назад путем инсерции меланокортиновых последовательностей в ген препроэндорфина (Harno et al., 2018; Rocha et al., 2019). Внутригенная дупликация у тетрапод привела к появлению  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -МСГ (Nakanishi et al., 1979; Navarro et al., 2016). У костистых рыб последовательность  $\gamma$ -МСГ в гене отсутствует, а у хрящевых рыб был обнаружен дополнительный меланокортиновый пептид, именуемый  $\delta$ -МСГ. Эти данные свидетельствуют о дивергенции последовательностей МСГ у разных таксонов рыб (Navarro et al., 2016).

Основную ключевую роль экспрессия POMC играет в нейронах мозга, клетках гипофиза и кожи. Помимо этого, POMC экспрессируется и в других тканях организма. Однако в большинстве исследований была показана именно экспрессия, но не трансляция и не процессинг белка, из-за наработки более короткого транскрипта мРНК,

который не подлежит трансляции и не служит для образования меланокортиновых пептидов (Harno et al., 2018).

Процессинг РОМС носит тканеспецифичный характер. В ходе процессинга РОМС расщепляется прогормонконвертазами (prohormone convertase, PC) по строго детерминированным последовательностям, содержащим двухосновные аминокислоты (лизин и аргинин). Тип PC, присутствующий в данной ткани, определяет то, какие пептиды будут продуцированы. В передней доле гипофиза изначально РОМС расщепляется до про-АКТГ и  $\beta$ -липотропина под действием PC1. На следующем этапе PC1 расщепляет про-АКТГ до АКТГ, про- $\gamma$ МСГ и добавочного пептида. Таким образом,  $\beta$ -липотропин, АКТГ, добавочный пептид и про- $\gamma$ МСГ – основные пептиды, которые высвобождаются в передней доле гипофиза (Harno et al., 2018).

В гипоталамусе, продолговатом мозге, промежуточной доле гипофиза и коже процессинг РОМС проходит более интенсивно. Помимо PC1 в этих тканях содержатся и другие ферменты, участвующие в расщеплении РОМС. АКТГ здесь под действием PC2 расщепляется до более короткой формы АКТГ (1-17) и CLIP (Corticotropin-like intermediate peptide, кортикотропин-подобный промежуточный пептид). Далее под действием карбоксипептидазы E (КПЕ) и N-ацетилтрансферазы АКТГ (1-17) превращается в  $\alpha$ -МСГ. PC2 также расщепляет  $\beta$ -липотропина до  $\gamma$ -липотропина и  $\beta$ -эндорфина. На последнем этапе  $\gamma$ -липотропин под действием PC2 переходит в  $\beta$ -МСГ. У человека про- $\gamma$ МСГ расщепляется сначала до  $\gamma_3$ -МСГ, а после  $\gamma_3$ -МСГ расщепляется до более коротких форм ( $\gamma_1$ - и  $\gamma_2$ -МСГ), по всей видимости, тоже под действием PC2 (Birch et al., 1991; Cone, 2005; Vicknell, 2008; Harno et al., 2018).

Меланокортиновые пептиды у разных видов млекопитающих достаточно консервативны, хотя имеется ряд исключений, которые имеют значение для физиологии. У крыс и мышей  $\gamma$ -липотропин не расщепляется до  $\beta$ -МСГ, поскольку у них отсутствуют последовательности, распознаваемые PC2 (Bennett, 1986; Cone, 2005). Также у мышей, крыс и морских свинок отсутствует  $\gamma_1$ -МСГ, который есть у человека, поскольку у лабораторных грызунов также отсутствуют последовательности из двухосновных аминокислот, фланкирующие  $\gamma_1$ -МСГ в молекуле  $\gamma_3$ -МСГ (Harno et al., 2018).

Меланокортиновые пептиды (АКТГ,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -МСГ), или меланокортины, получили свое название, поскольку все они обладают меланотропной и/или кортикотропной активностью. Все меланокортины имеют в своей структуре последовательность из четырех аминокислот His-Phe-Arg-Trp, которая отвечает за связывание с меланокортиновыми рецепторами (Ellacott, Cone, 2006). Помимо участия

в регуляции пигментации и функции надпочечников, меланокортины выполняют и другие важные физиологические функции в организме.

**$\alpha$ -МСГ** представляет собой последовательность в 13 аминокислотных остатков, которая соответствует N-концевому участку АКТГ, является идентичным для всех млекопитающих.  $\alpha$ -МСГ ацетируется по N-концу и аминируется по С-концу (Catania, 2008). Синтезируется преимущественно в латерально расположенных нейронах аркуатного ядра гипоталамуса (ARC), в промежуточной доле гипофиза, в меланоцитах кожи. Также  $\alpha$ -МСГ обнаружен в различных отделах ЦНС и периферических тканях (мозговом веществе надпочечника, желудке, почках). Такое распределение в организме определяет большое разнообразие функций этого пептида. Свое влияние оказывает преимущественно через MC1R, к которому обладает наибольшей аффинностью (Mountjoy et al., 1992).

В меланоцитах кожи участвует в регуляции пигментации покровов позвоночных, действуя через MC1R на биосинтез эумеланина. В 1976 году впервые было показано подавление аппетита и увеличение потребления воды при введении  $\alpha$ -МСГ крысам. Также был выявлен эффект  $\alpha$ -МСГ на ритмы бодрствования-сна и на потребление кислорода клетками мозга (Panskapp et al., 1976). Последующий ряд исследований также подтверждает действие этого пептида на мотивационное и пищевое поведение и на регуляцию энергетического гомеостаза (Lee, Wardlaw, 2007, McMin, 2000, Catania, 2008). Центральное введение  $\alpha$ -МСГ мышам, нокаутным по гену POMC, снижает потребление пищи на 35% по сравнению с ложнообработанными животными, а также приводит к снижению массы тела этих животных после трехдневного лечения (Tung et al., 2006).

$\alpha$ -МСГ, действуя на клетки иммунитета через MC1R рецепторы, способен снижать выработку ими провоспалительных цитокинов и стимулировать продукцию противовоспалительных агентов (Lipton, Catania, 1998; Catania et al., 2010; Wang et al., 2019). Предполагается протекторная роль  $\alpha$ -МСГ в регуляции нейровоспалений, как основного лиганда MC1R, присутствующего на клетках микроглии и сосудов ГЭБ (Lisak, Benjamins, 2017; Benjamins et al., 2018). Также этот пептид является важным регулятором функционирования гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси, оказывая действие через MC4R на нейроны медиальной части паравентрикулярного ядра гипоталамуса, вырабатывающие тиреолиберин (Lechan, Fekete, 2006).

У  $\alpha$ -МСГ существует и ряд других важных функций, включая регуляцию термогенеза в бурой и белой жировой тканях (Skibicka, Grill, 2008; Williams et al., 2003; Lee, Wardlaw, 2007), регуляцию различных поведенческих реакций, таких как груминг

и синдром потягивания-зевания, и участие в половом поведении (Argiolas et al., 2000), а также регуляцию функционирования экзокринных желез, через MC5R и деятельности сердечно-сосудистой системы (Cone, 2005).

**$\beta$ -МСГ.** Структура  $\beta$ -МСГ куда более вариабельна у позвоночных, чем  $\alpha$ -МСГ (Catania, 2008). У мышей и крыс  $\beta$ -МСГ не вырабатывается, тогда как у морских свинок возможно существование двух активных форм  $\beta$ -МСГ (Cone, 2005; Harno et al., 2018). Этот пептид продуцируется в гипоталамусе и промежуточной доле гипофиза, а также показано его присутствие в меланоцитах и кератоцитах эпидермиса. Наибольшей аффинностью обладает к MC4R. Отвечает за образование меланина в клетках кожи (Spencer et al, 2009). Наряду с  $\alpha$ -МСГ в гипоталамусе регулирует пищевое поведение и энергетический баланс (Harrold et al., 2003; Kirwan et al., 2018).

**$\gamma$ -МСГ** может существовать в трех активных формах  $\gamma_1$ -,  $\gamma_2$ - и  $\gamma_3$ -МСГ (Catania, 2008).  $\gamma_2$ -МСГ додекапептид, продуцируемый из  $\gamma_3$ -МСГ, который в последствии может быть расщеплен до  $\gamma_1$ -МСГ, состоящего из 11 аминокислот. Однако этот процесс может быть предотвращен путем гликозилирования Asn16 в  $\gamma_3$ -МСГ (Birch et al., 1991). У лабораторных грызунов возможно существование только более длинной формы  $\gamma_3$ -МСГ, тогда как у человека обнаруживаются все три варианта этого пептида.  $\gamma$ -МСГ пептиды обнаружены в гипофизе, плазме крови, сердечно-сосудистой системе, бронхах и почках (Catania, 2008). С высокой аффинностью связывается только с MC3R. Показано участие  $\gamma$ -МСГ во многих функциях и реакциях организма. Установлен кардиотонический эффект  $\gamma$ -МСГ при введении его внутривенно или в каротидную артерию, что может быть связано с активацией симпатической нервной системы, а также сопряжено с вазопрессинергическим путем регуляции кровеносной системы (Gruber, Eskridge, 1986). Рядом исследователей показана роль  $\gamma_2$ -МСГ в натрийурезе. Скорее всего, этот пептид действует непосредственно на интратенальные механизмы натрийуреза, поскольку при введении  $\gamma_2$ -МСГ как внутривенно, так и непосредственно в почечную артерию, не наблюдается изменений во внутриклубочковой фильтрации. Натрийурез в данном случае был интерпретирован как результат блокировки канальцевой реабсорбции натрия (Humphreys, 2004). Введение вирусной конструкции, вызывающей гиперэкспрессию  $\gamma$ -МСГ в область ARC и NTS мышам с диетиндуцированным ожирением способствует снижению массы тела, что может свидетельствовать о влиянии  $\gamma$ -МСГ на регуляцию энергетического метаболизма в ЦНС (Eerola et al., 2018). Отмечен противовоспалительный эффект  $\gamma$ -МСГ.  $\gamma$ -МСГ способен подавлять высвобождение простагландина E2 и NO в гипоталамусе,

индуцируемое IL-1 $\beta$  (Cragolini et al., 2006).  $\gamma$ -МСГ влияет на половое поведение, стимулируя высвобождение гонадолиберина в гипоталамусе (Stanley et al., 2003).

АКТГ - адренотропный гормон состоит из 39 аминокислотных остатков. У всех млекопитающих 1-24 АКТГ последовательность идентична, тогда как 24-39 имеет вариации. Последовательность 25-39 АКТГ играет существенную роль *in vivo*, защищая 1-24 участок от деградации. Это факт объясняет, почему большей биологической ролью *in vivo* обладает именно 1-24 участок АКТГ. Однако, поскольку 1-39 АКТГ является предшественником CLIP или 22-39 АКТГ, который тоже обладает биологической активностью и участвует в реализации иных физиологических функций, замены аминокислот на С-конце АКТГ следует, скорее всего, оценивать в отношении функций CLIP у разных видов животных. Как бы то ни было, рецептор CLIP до сих пор не обнаружен (Cone, 2000; Catania, 2008).

Синтезируется кортикотропными клетками передней доли гипофиза и кератоцитами кожи. Наибольшей аффинностью обладает к MC2R (собственный рецептор АКТГ), с остальными рецепторами связывается с разной степенью аффинности (Mountjoy et al., 1992, Irani et al., 2004; Cone, 2005). АКТГ является важным компонентом гипоталамо-гипофизарно-адреналовой оси. При стрессорном ответе выделяется под действием кортиколиберина (Филаретов, 1993). Стимулирует выработку и выброс глюкокортикоидов клетками надпочечников (Mountjoy et al., 1992). Усиливает липолиз, действуя на адипоциты (эффект отмечен у разных видов животных) (Boston, 1999; Cone, 2000). Отмечено влияние АКТГ на циркадные ритмы разных организмов (Dibner et al., 2010). Показана роль АКТГ на развитие и регенерацию костной ткани. В 2005 году в остеобластах впервые обнаружены MC2R (Zhong et al., 2005). А впоследствии установлен доза-зависимый эффект АКТГ на пролиферацию остеобластов и их дифференцировку (Isales et al., 2010). АКТГ играет важную роль в регуляции воспалительных процессов, подавляя выработку хемокинов и IL-1 $\beta$ , снижая деятельность NO-синтазы, активируя выработку противовоспалительных агентов. Таким образом, АКТГ может влиять на воспалительные процессы как косвенно, через стимуляцию выработки глюкокортикоидов, так и напрямую, действуя через MCR на иммунных клетках (Wang et al., 2019). В коже АКТГ, наряду с  $\alpha$ -МСГ, регулирует пигментацию и пролиферацию меланоцитов (Cone, 2000). Кроме того, АКТГ регулирует многие поведенческие реакции (груминг, синдром потягивания-зевоты) и половое поведение (Argiolas et al., 2000; Cone, 2005).



### 1.1.2. Меланокортиновые рецепторы

Меланокортиновые рецепторы (MCRs) – члены семейства G-белок связанных рецепторов (GPCR - G-protein-coupled receptors). Каждый тип MCR является продуктом экспрессии отдельного гена. Впервые MCRs были клонированы в 1992 году двумя независимыми группами ученых (Mountjoy et. al., 1992; Chhajlani, Wikberg, 1992), что привело к значительному прорыву в понимании механизмов биологических эффектов, производимых меланокортиновыми пептидами. Всего на сегодняшний день известно 5 типов MCRs (Cone, 2000).

MCRs обладают стандартными для GPCR структурными характеристиками: они состоят из 7  $\alpha$ -спиральных трансмембранных доменов, соединенных между собой тремя экстраклеточными и тремя внутриклеточными пептидными петлями, имеют экстраклеточный N-конец и внутриклеточный C-конец. Эти рецепторы являются одними из самых маленьких представителей GPCR с очень короткими N- и C-концами (Cooray, Clark, 2011). Все типы MCRs имеют N-гликозилированные участки на N-концах, консервативные цистеиновые последовательности на C-конце и сайты взаимодействия с ПКА и ПКС (Catania et al., 2004).

Передача сигнала при связывании лиганда с MCRs может быть как G-белок-опосредованной, так и G-белок-независимой. Связывание MCRs с агонистами на поверхности клетки регулируется или вспомогательными белками меланокортиновых рецепторов (MRAP), или  $\beta$ -аррестинами (Rodrigues et al., 2014).

Традиционно GPCR сигналинг опосредуется преимущественно взаимодействием с гетеротримерными G-белками, которые состоят из  $\alpha$ -субъединицы, связывающей ГДФ, и недиссоциируемого комплекса  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединиц. Связывание лиганда ускоряет обмен ГДФ на ГТФ на  $\alpha$ -субъединице, запуская диссоциацию G-белка и рецептора, а также диссоциацию  $\beta\gamma$ -гетеродимера и ГТФ-связанной  $\alpha$ -субъединицы. Передача сигнала терминируется гидролизом ГТФ и последующей реассоциацией ГДФ-связанной неактивной  $\alpha$ -субъединицы с  $\beta\gamma$ -комплексом до следующего цикла активации рецептора (Rodrigues et al., 2014).

В соответствии с гомологией последовательностей и сходством функционирования  $\alpha$ -субъединицы G-белков подразделяют на четыре класса: Gs, Gq/11, Gi/o и G12/13 (Wettschureck, Offermanns, 2005). Сигнальные каскады, запускаемые при активации GPCR, напрямую зависят от подтипа G-белка, с которым связан рецептор. Например, Gs-белок взаимодействует с аденилатциклазой, и таким образом регулирует уровень внутриклеточного цАМФ и последующую активацию ПКА. Gi/o-белок, напротив, инактивирует аденилатциклазу и блокирует активацию

ПКА. Через Gq/11 запускаются IP3 сигнальные пути, происходит активация ПКС и регулируется уровень внутриклеточного  $Ca^{2+}$ . G12/13-сигналинг, по всей видимости, регулируется р-ГТФазами, и также способен влиять на активность ПКА и ПКС (Wettschureck, Offermanns, 2005; Tasken, Aandahl 2004). GPCR часто могут связываться с несколькими G-белками, тем самым иницируя сложную внутриклеточную сигнальную сеть, а не простую каскадную последовательность (Wettschureck, Offermanns, 2005; Gudermann et al., 1996; Woehler, Ponimaskin, 2009).

Также, как и  $\alpha$ -субъединица,  $\beta\gamma$ -гетеродимерный комплекс обладает регуляторной активностью, хотя ранее считалось, что он не имеет отношения к передаче сигнала через GPCR. Было установлено, что  $\beta\gamma$ -субъединицы модулируют ряд внутриклеточных путей, например, фосфоинозитид-3-киназный, MAP-киназный, ПКА- и ПКС-зависимые пути (Woehler, Ponimaskin, 2009; Goldsmith, Dhanasekaran, 2007; Gutkind, 2000; Luttrell, 2003).

Будучи членами семейства GPCR, все типы MCR связываются с Gs-белками (Gantz, Fong, 2003). Также MC3R, MC4R и MC5R способны связываться с Gi/o-белками (Chai et al., 2007; Rodrigues et al., 2012; Buch et al., 2009). Кроме того, MC4R может быть ассоциирован с Gq-белками (Newman et al., 2006).

При связывании любого типа MCRs с их агонистом происходит стабилизация активного состояния рецептора, тогда как антагонист препятствует взаимодействию рецептора и агониста (Ollmann et al., 1997).

За последнее время стало известно, что многие GPCR могут передавать сигнал в клетку независимо от G-белков. В G-белок-независимый сигналинг GPCR может входить широкий спектр разных ассоциированных с рецептором белков, включая GPCR-киназы,  $\beta$ -аррестины, Src-семейство тирозинкиназ, JAK/STAT-комплекс и белки, содержащие PDZ-домен (Sun et al., 2007). Некоторые из этих G-белок-независимых механизмов описаны и для MCRs. В G-белок-независимом сигналинге GPCR важную роль играют  $\beta$ -аррестины, а именно  $\beta$ -аррестин-1 и  $\beta$ -аррестин-2, которые широко экспрессируются в разных тканях (Luttrell, Lefkowitz, 2002). Для связывания GPCR с  $\beta$ -аррестинами необходимо фосфорилирование рецептора с цитоплазматической стороны по сериновым и тирозиновым последовательностям, производимое киназами рецепторов, связанных с G-белками (G protein-coupled receptor kinases - GRK). Этот процесс разобщает рецептор с G-белками (Calebiro et al., 2010). Затем GPCR интернализуется в эндосому и дефосфорилируется. В интернализации GPCR важную роль играют клатрин-опушенные везикулы: связывание  $\beta$ -аррестинов с GPCR облегчает сборку клатринового комплекса на плазматической мембране, а

регуляторные белки, координирующие формирование везикулы, способствуют интернализации рецепторов. В последствии рецептор возвращается на поверхность плазматической мембраны путем рециклинга эндосом или подвергается разрушению в лизосоме (Marxhese et al., 2008).

$\beta$ -аррестины также служат связующим звеном между GPCR и Src-семейством тирозинкиназ и играют важную роль в регуляции ERK 1/2 сигналинга. В некоторых случаях интернализированные GPCR образуют комплексы с  $\beta$ -аррестинами и всеми компонентами ERK 1/2 каскада, надолго закоривая сигналинг на эндосомы. Тогда как другие GPCR достаточно быстро после интернализации диссоциируют с  $\beta$ -аррестинами не образуя подобных эндосомальных комплексов (Defea, 2008; Luttrell, Lefkowitz, 2002; Shenoy, Lefkowitz, 2003; Lefkowitz, Shenoy, 2005).

Для всех типов MCR присуща интернализация при связи с лигандом, опосредуемая  $\beta$ -аррестинами. Для MC1R и MC4R показано участие GRK в интернализации (Sanchez-Laorden et al., 2007; Shinyama et al., 2003). Также дополнительно для MC2R и MC4R показаны пути интернализации посредством PKA-зависимых механизмы, которые не зависят от связывания рецепторов с  $\beta$ -аррестинами (Kilianova et al., 2006; Shinyama et al., 2003; Gao et al., 2003).

**Меланокортиновые рецепторы 1 типа.** Впервые экспрессия MC1R показана в меланоцитах и клетках меланомы (Chhajlani, Wikberg, 1992; Mountjoy, et al., 1992). Экспрессия MC1R в последствии была описана в ряде иммунных клеток (нейтрофилы, моноциты, макрофаги, В-лимфоциты, дендритные клетки, тучные клетки), что может свидетельствовать об участии этого типа рецепторов в противовоспалительном ответе (Star, et al., 1995, Catania, et al., 2004, Catania, et al., 2010), а также в кератоцитах, фибробластах, глиальных и эндотелиальных клетках, адипоцитах (Catania, et al., 2004; Catania, et al., 2010), клетках эпителия кишечника, клетках Лейдига, лютеиновых клетках, клетках секреторных эпителиев и в поперечно-полосатой мышечной ткани (Brzoska, et al., 2008).

У человека MC1R малоселективны между АКТГ и  $\alpha$ -МСГ, тогда как у мышей в большей степени аффинность MC1R проявляется к  $\alpha$ -МСГ (Brzoska, et al., 2008). Другие МСГ ( $\beta$ - и  $\gamma$ -МСГ) также способны связываться с MC1R и оказывать биологический эффект, однако их сродство к этим рецепторам существенно ниже (Розенкранц, и др., 2013).

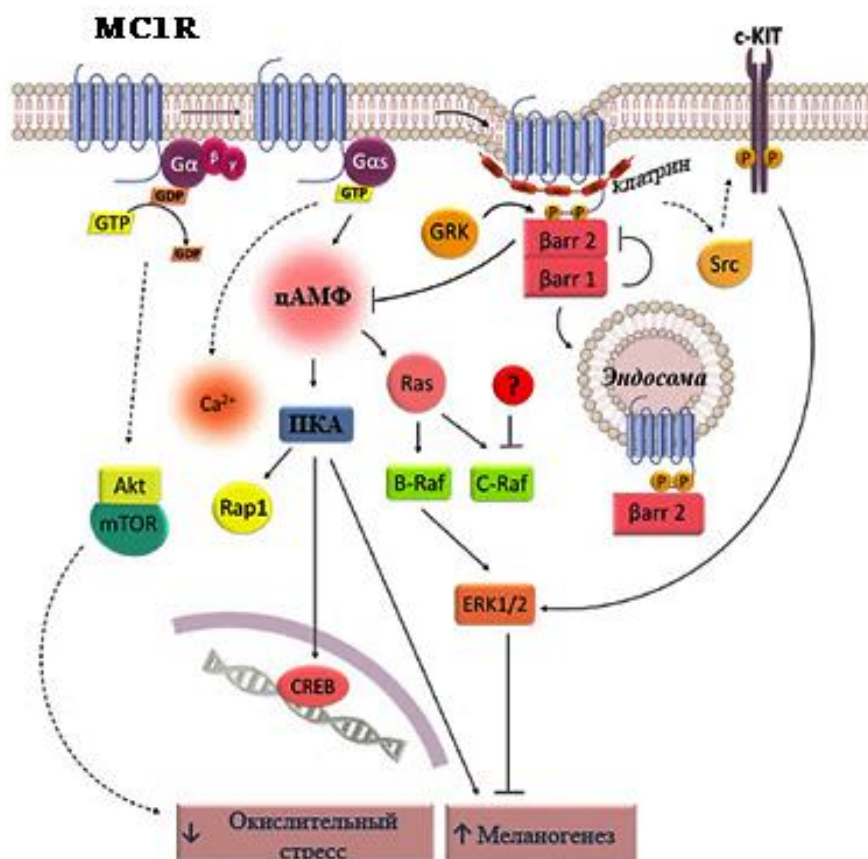
Антагонистами MC1R являются белок Агути у грызунов и его гомолог - агути-сигнальный пептид у человека (Kwon, et al., 1994). Экспрессия MC1R усиливается в присутствии собственного агониста (Abdel-Malek, et al., 2001).

MC1R существуют в виде гомо- и гетеродимеров на поверхности плазматической мембраны. Димеризация происходит в независимости от связывания этих рецепторов с лигандами и обусловлена как нековалентными взаимодействиями, так и образованием дисульфидных связей между мономерами (Zanna, et al., 2008; цит. по: Розенкранц, и др., 2013). MC1R часто образуют гетеродимеры с MC3R. При этом показано, что ни агонисты, ни антагонисты MC1R и MC3R на уровень образования гетеродимеров не влияют (Mandrika, et al., 2005).

MC1R связаны с Gs белками. Связывание MC1R с лигандом запускает целую сеть внутриклеточных каскадов (**рис. 1**). Активация аденилатциклазы приводит к увеличению уровня цАМФ. цАМФ активирует скорость-лимитирующего фермент тирозиназу, отвечающий за синтез меланина, что ведет к увеличению синтеза темных, фотопротективных эумеланинов в меланоцитах (Herraiz et. al., 2009). Также увеличение цАМФ внутри клетки приводит к активации протеинкиназы А (ПКА), которая имеет множество мишеней фосфорилирования. В частности, ПКА активирует транскрипционные факторы CREB и PGC1 $\alpha$ , что усиливает транскрипцию гена транскрипционного фактора микрофтальмии (microphthalmia transcription factor, *MITF*). Белок MITF участвует в регуляции ключевых моментов клеточного цикла, таких как дифференцировка и пролиферация клеток, а также в поддержании выживаемости клеток (Herraiz, et. al., 2017).

ПКА, активированная связыванием MC1R с лигандом в иммунных клетках, фосфорилирует киназу p38, чем инактивирует ее и ингибирует диссоциацию комплекса I $\kappa$ B-NF $\kappa$ B, что подавляет синтез провоспалительных цитокинов (Li, Taylor, 2008, цит. по: Herraiz et. al., 2017). В клетках пигментного эпителия сетчатки  $\alpha$ -МСГ, связываясь с MC1R, активирует Akt/mTOR сигнальный путь, чем снижает повреждаемость клеток пероксидом водорода и, тем самым, увеличивает их выживаемость в условиях окислительного стресса (Cheng et al., 2014 (цит. по: Rodrigues et al., 2014)).

Активированный агонистом MC1R способен коактивировать рецептор фактора роста тучных и стволовых клеток (с-KIT), обладающий тирозинкиназной активностью, в результате чего G-белок независимо запускается MAPK/ERK сигнальный путь, который играет роль в выживаемости, дифференцировке и пролиферации клеток (Rodrigues, Almeida, Gouveia, 2014; Herraiz, et. al., 2017), а также лежит в основе патологического процесса, приводящего к образованию меланомы (Розенкранц, и др., 2013).



**Рис. 1.** Сигнальные механизмы меланокортинового рецептора первого типа (MC1R) (с модификацией по: Rodrigues et al., 2014).

*Обозначения:* Akt – протеинкиназа B; mTOR – mammalian target of rapamycin; ERK1/2 – митогенактивируемые протеинкиназы; PKA – протеинкиназа A; Ras – малый ГТФ-связывающий белок Ras-семейства; CREB – цАМФ-зависимый транскрипционный фактор; GRK – киназа G-белок сопряженных рецепторов; B-Raf – прото-онкоген B-Raf, цитозольная серин/треониновая протеинкиназа семейства MAP3K; C-Raf – прото-онкоген C-Raf, цитозольная серин/треониновая протеинкиназа семейства MAP3K;  $\beta$ arr1 –  $\beta$ -аррестин-1;  $\beta$ arr2 –  $\beta$ -аррестин-2; c-KIT – рецептор фактора роста тучных и стволовых клеток; Src – C-концевая тирозинкиназа; Rap1 – малый ГТФ-связывающий белок Rap-семейства; GTP – гуанозинтрифосфат; GDP – гуанозиндифосфат.

Связывание MC1R с агонистами приводит не только к его активации, но и к активации двух киназ GRK2 и GRK6. В связи с этим продукция цАМФ в клетках, усиленная под воздействием меланокортинов, после достижения максимума начинает снижаться. GRK2 способна уменьшать постоянную, не зависящую от активации агонистами, активность MC1R. В свою очередь, GRK6 опосредует агонист-зависимую интернализацию рецептора путем фосфорилирования аминокислот в С-концевой цитоплазматической части белка. Недавние исследования показывают, что эта интернализация регулируется связыванием аррестинов с цитоплазматической частью рецептора (Розенкранц, и др. 2013; Rodrigues, et al., 2014). В этом процессе участвуют  $\beta$ -аррестин-1 и  $\beta$ -аррестин-2.  $\beta$ -аррестин-2 опосредует интернализацию и десенситизацию MC1R, снижая продукцию цАМФ, но не влияя при этом на активацию

комплекса ERK 1/2. В то время как  $\beta$ -аррестин-1 не влияет на эти процессы, но конкурирует с  $\beta$ -аррестином-2 за связывание с MC1R (Розенкранц, и др. 2013; Rodrigues, et al., 2012).

Мутации гена *Mclr* приводят к изменениям цвета шерсти у животных. У человека мутации в гене *MC1R* связаны с рыжим фенотипом волос и светлой плохо загорающей кожей, а также с повышенным риском развития меланомы (Abdel-Malek et al., 2001, Lee, Wardlaw, 2007; Розенкранц и др., 2013). Ряд вариантов МКР1 с мутациями, обеспечивающими рыжий цвет волос, теряет способность повышать уровень цАМФ в ответ на связывание с агонистом, но сохраняет способность к активации ERK 1/2 (Abdel-Malek et al., 2001).

**Меланокортиновые рецепторы 2 типа.** Главным образом MC2R экспрессируются в коре надпочечников, преимущественно в пучковой и клубочковой зонах, где регулирует выработку глюкокортикоидов, альдостерона и андрогенов (Mountjoy et al., 1992; Catania et al., 2004; Brzoska et al., 2008). Экспрессия MC2R показана в адипоцитах (Boston, Cone, 1996), где он участвует в липолитическом эффекте АКТГ (Boston, 1999; Lee, Wardlaw, 2007). MC2R также обнаружены в кератиноцитах, лимфоцитах и  $\beta$ -клетках поджелудочной железы (Brzoska et al., 2008; Slominski et al., 1996, цит. по Cooray, Clark, 2011). Основным и единственным лигандом MC2R является АКТГ, поэтому их также называют рецепторами АКТГ. Примечательно, что экспрессия MC2R так же, как и MC1R усиливается в присутствии своего лиганда (Abdel-Malek et al., 2001). MC2R связаны с Gs-белками. Активация MC2R при связывании с лигандом приводит к выработке цАМФ, что активирует ПКА. Также MC2R слабо активируют ERK1/2 комплекс (как ПКА-зависимо, так и независимо от интернализации комплекса лиганд-рецептор), что оказывает стимулирующий эффект на пролиферацию клеток. Также MC2R сигналинг приводит к фосфолированию киназы p38 (Roy et al., 2011, цит. по Rodrigues et al., 2014), что подавляет выработку провоспалительных цитокинов. MC2R также способны активировать ПКС. Активация ПКА и ПКС способствует усилению транскрипции ферментов синтеза стероидов, а также стимулирует клеточную пролиферацию и дифференциацию (Rodrigues et al., 2014).

**Меланокортиновые рецепторы 3 типа.** MC3R преимущественно экспрессируются в головном мозге. Также их экспрессия отмечена в иммунных клетках (макрофагах, лимфоцитах), клетках эпителия кишечника, в плаценте, желудке, двенадцатиперстной кишке, поджелудочной железе, гонадах, почках, скелетной и сердечной мышечной ткани (Mountjoy, et al., 1992; Catania, et al., 2004; Brzoska, et al.,

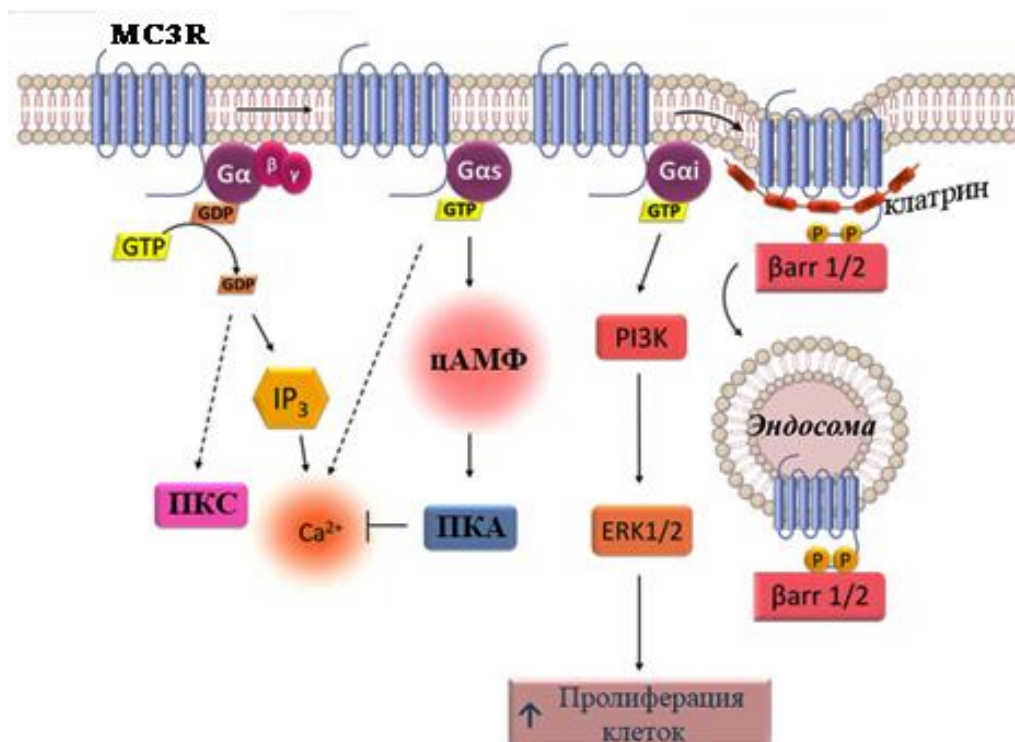
2008). Присутствие MC3R в различных тканях говорит о возможной их роли в регуляции функционирования сердечно-сосудистой системы, пищевого поведения, терморегуляции (Abdel-Malek, et al., 2001). В почках MC3R участвуют в регуляции натрийуреза (Chhajlani, 1996; Ni, et al., 2003).

В головном мозге MC3R часто локализируются в областях, содержащих POMC-нейроны. Показано, что в случае локализации MC3R непосредственно в POMC-нейронах, они могут выполнять функцию ауторецепторов. Активация MC3R в POMC-нейронах приводит к снижению функциональной активности последних по механизму обратной связи (Olney et al., 2014).

MC3R выявлены в среднем мозге в дофаминергических нейронах (Roselli-Rehfus, et al., 1993). Здесь их присутствие связывается с участием в становлении системы пищевого подкрепления (Pandit, et al., 2016), а также с регуляцией двигательной активности (Михрина и др., 2018). Экспрессия MC3R показана в ГАМК нейронах ARC и вентральной тегментарной области, показано их участие в регуляции двигательной активности (Михрина и др., 2018). MC3R могут быть связаны с Gs и Gi белками (Rodrigues, et al., 2014). MC3R, сопряженные с Gs при связывании с лигандом активируют цАМФ/ПКА зависимые пути (рис. 2).

Тогда как MC3R, связанные с Gi, активируют PI3K (Phosphoinositide 3-kinases - фосфотидилинозитол-3-киназы)/ERK1/2 пути. Оба пути лежат в основе деления и пролиферации клеток. С PI3K/ERK1/2 также связывают нейропротекторные эффекты меланокортинов, осуществляемые через MC3R. MC3R также способны повышать уровень внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> и взаимодействовать с ПКС. При этом некоторые исследователи отмечают, что в основе этого высвобождения Ca<sup>2+</sup> лежит активация MC3R IP<sub>3</sub> зависимых путей, приводящих к открытию Ca<sup>2+</sup>-каналов эндоплазматического ретикулума и высвобождению Ca<sup>2+</sup> (Konda, et al., 1994; Busca, et al., 2000; цит. по: Rodrigues, et al., 2014). Но в экспериментах других авторов не показано участия IP<sub>3</sub> в мобилизации Ca<sup>2+</sup> при передаче сигнала через MC3R (Mountjoy, et al., 2001).

В экспериментах на клеточной линии HEK293 показано, что связывание NDP- $\alpha$ -MSH (синтетического аналога  $\alpha$ -MCH) с MC3R активирует ERK1/2 модуль MAPK-киназного каскада посредством PI3K- и Gi/o- зависимого механизма, но независимо от ПКА, Ca<sup>2+</sup> или ПКС (Chai, et al., 2007). Аналогично на культуре нейронов выявлено, что присутствие MC3R ассоциировано с усилением пролиферации клеток, которое регулируется Akt (Nyan, et al., 2008, цит. по: Rodrigues, et al., 2014).



**Рис. 2.** Сигнальные механизмы меланокортинового рецептора третьего типа (MC3R) (по Rodrigues et al., 2014)

Обозначения: PKA – протеинкиназа А; PKC – протеинкиназа С; PI3K - фосфотидилинозитол-3-киназа;  $\beta$ arr1 –  $\beta$ -аррестин-1;  $\beta$ arr2 –  $\beta$ -аррестин-2; IP<sub>3</sub> – инозитол-3-фосфат; ERK1/2 – митогенактивируемые протеинкиназы; цАМФ – циклический аденозинмонофосфат; GTP – гуанозинтрифосфат; GDP – гуанозиндифосфат.

Нокаутные по MC3R мыши проявляют фенотип с ожирением. У них наблюдается гиперфагия, гиперлептинемия, гиперинсулинемия и резистентность к инсулину, однако нет проявлений гипергликемии (Butler et al., 2000; Chen et al., 2000). Также для этих мышей не характерно чрезмерное увеличение массы тела, но при этом увеличивается процентное содержание жировой ткани, которая замещает ткань скелетной мускулатуры и ткани печени. Эти процессы вызваны общим дисбалансом энергетического обмена (Butler et al., 2001; цит. по: Шпаков, Деркач 2015).

Повышение массы жировой ткани при дефиците MC3R в основном связано со снижением интенсивности липолитических процессов. Так у нокаутных по MC3R мышей обнаружено снижение липолиза белой жировой ткани даже в условиях голодания (Renquist et al., 2012; цит. по: Шпаков, Деркач, 2015). Вторым фактором, ведущим к повышению накопления жира, является гиподинамия, наблюдаемая у таких животных и в дневное, и в ночное время суток (Begriche et al., 2011; цит. по: Шпаков, Деркач, 2015). Однако роль MC3R в ожирении не столь однозначна, как у MC4R.



Отмечено, что у человека мутации гена, кодирующего *MC3R*, часто сопряжены с ожирением и диабетом 2-го типа (Mountjoy, 2010). Некоторые исследователи отмечают, что полиморфизм гена *MC3R* сопряжен с риском развития ожирения в детском возрасте (Feng, et al., 2005; Mencarelli, et al., 2011; цит. по: Rodrigues, et al., 2014).

**Меланокортиновые рецепторы 4 типа.** *MC4R* экспрессируются преимущественно в клетках мозга, расположенных в разных его областях, а также экспрессия этого рецептора обнаружена в клетках кишечника, клетках сосочкового слоя эпидермиса кожи, лимфоцитах, скелетной мускулатуре (Catania et al., 2004; Brzoska et al., 2008; Panaro et al. 2014; цит. по: Baldini, Phelan, 2019). Экспрессия гена *MC4R* обнаружена в клетках надпочечников, где они, по-видимому, участвуют в регуляции стероидогенеза (Dhillon et al., 2003), в остеобластах и клетках надкостницы, где они, вероятно, задействованы в регуляции роста и дифференцировки кости (Dumont et al., 2005).

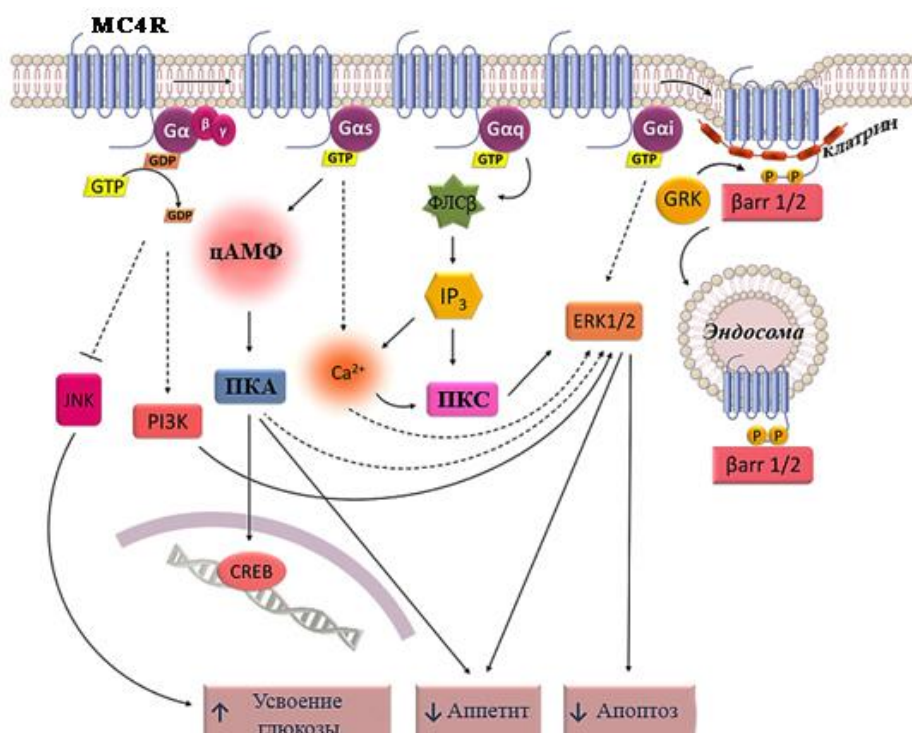
*MC4R* вовлечены в регуляцию пищевого поведения и метаболизма, участвуют в регуляции полового поведения, эректильной функции (Martin et al., 2004), процессов ноцицепции (Chu et al., 2012).

Показано, что *MC4R* могут быть связаны с Gs, Gq или Gi/o, и имеют возможность запускать разные внутриклеточные каскады (Rodrigues et al., 2014). Связанные с Gs-белками *MC4R* стимулируют цАМФ/ПКА пути. Те рецепторы, которые сопряжены с Gq-белками, активируют ПКС через ФЛСβ- и IP3-зависимые пути (Newman et al., 2006). ERK1/2 комплекс активируется как посредством Gi/o-белков, так и через Ca<sup>2+</sup>-, ПКА-, ПКС- или IP3-зависимые механизмы (Buch et al., 2009; Chai et al., 2006; Newman et al., 2006). ПКА-зависимая активация ERK1/2 сигналинга ассоциирована с подавлением аппетита, тогда как ПКА-независимая активация ERK1/2, по всей видимости, снижает апоптоз при повреждении нейронов. *MC4R*-сигналинг также ингибирует активность JNK, возможно это приводит к увеличению инсулин-стимулируемого захвата глюкозы (**рис. 3**) (Rodrigues, et al., 2014).

Интернализация *MC4R* при связывании их с лигандом происходит тем же путем, что и у *MC1R*, и аналогичным образом опосредуется GRK2 и GRK6 и β-аррестинами (Rodrigues et al., 2014).

При исследовании участия *MC4R* в пищевом поведении было показано, что связывание рецептора с α-МСГ снижает потребление пищи, в то время как AgRP повышает аппетит и потребление пищи, действуя и как нейтральный антагонист, и как обратный агонист *MC4R* (Chen et al., 2006). Мутации в гене *MC4R* приводят к гиперфагии и ожирению у людей и животных (Baldini, Phelan, 2019). Точечные мутации

области, кодирующей MC4R являются причиной развития патологического ожирения у людей в 5% случаев, тогда как два



**Рис. 3.** Сигнальные механизмы меланокортинового рецептора четвертого типа (MC4R) (по Rodrigues et al., 2014)

*Обозначения:* ERK1/2 – митогенактивируемые протеинкиназы; PKA – протеинкиназа А; CREB – цАМФ-зависимый транскрипционный фактор; GRK – киназа G-белок сопряженных рецепторов; βarr1 – β-аррестин-1; βarr2 – β-аррестин-2; IP3 – инозитол-3-фосфат; PI3K - фосфотидилинозитол-3-киназа; ФЛСβ – фософолипаза Сβ; JNK – с-Jun N-концевая киназа; цАМФ – циклический аденозинмонофосфат; GTP – гуанозинтрифосфат; GDP – гуанозиндифосфат.

варианта полиморфизма гена MC4R напротив связаны с резистентностью к ожирению (Geller et al., 2004; Stutzmann et al., 2007).

**Меланокортиновые рецепторы 5 типа.** MC5R экспрессируются в организме достаточно повсеместно. Впервые MC5R были обнаружены в скелетной мускулатуре, сальных железах и адипоцитах (Mountjoy et al., 1992). Позже появились данные о локализации этих рецепторов в легких, желудке, мозге, надпочечниках и ряде экзокринных желез (поджелудочная, слёзная, предстательная и др.) (Chen et al., 1997). Невысокий уровень экспрессии MC5R наблюдается в тимусе, селезёнке, почке, семенниках и множестве других периферических органов (Cone, 2000). Также MC5R присутствуют в иммунных клетках: лимфоцитах и тучных клетках (Brzoska et al., 2008).

Отмечается экспрессия MC5R и в головном мозге (Catania et al., 2008). MC5R способны активировать два параллельных сигнальных пути: Gs/цАМФ/ПКА и Gi/PI3K/ERK1/2, посредством которых запускается фосфорилирование CREB и экспрессия c-fos, соответственно. Также известно, что при связывании MC5R с лигандом происходит увеличения уровня внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> и запускается активация JAK/STAT (Buggy, 1998). ERK1/2 сигналинг происходит двухфазным образом с ранним промежуточным пиком, зависящим от активности Gi-белка и вторичным пиком, более растянутым во времени, регулируемым Gi-белком и β-аррестинами. MC5R интернализируются независимо от β-аррестинов, но, по всей видимости, эти молекулы скаффолда поддерживают ERK1/2 сигналинг в цитоплазме, что регулирует MC5R-зависимый спад реэтерификации жирных кислот в адипоцитах. Уровень MC5R-зависимого липолиза регулируется активацией ПКА (Rodrigues et al., 2014).

Хотя MC5R экспрессируется повсеместно, его функции до сих пор малопонятны. Считается, что MC5R участвуют в процессах терморегуляции, синтеза секрета экзокринных желез, секреции феромонов стресса (Cone, 2000).

Таким образом, наиболее важными характеристиками всех типов MCRs являются различная аффинность к агонистам и антагонистам, активация различных сигнальных каскадов и отсутствие функциональной однородности между разными видами MCR в семействе. Активация MCRs запускает различные сигнальные пути, которые опосредуют разнообразные физиологические процессы. В зависимости от типа ткани и от типа клеток в пределах одной ткани MCR могут быть сопряжены с разными G-белками и активировать/ингибировать разные вторичные посредники (Rodrigues, et al., 2014).

### **1.1.3. Вспомогательные белки меланокортиновых рецепторов**

Вспомогательные белки меланокортиновых рецепторов (melanocortin receptor accessory proteins - MRAP) были открыты в 2005 году (Metherell et al., 2005). В семейство MRAP входит два представителя MRAP1 и MRAP2. У людей существует две изоформы MRAP1: MRAP1α и MRAP1β, которые являются продуктами одного гена и получают путем альтернативного сплайсинга (Metherell et al., 2005). MRAP – небольшие белки, имеющие всего один трансмембранный домен, контактирующие с MCR и регулирующие их транспорт в мембрану и сигналинг. MRAP1 и MRAP2 имеют сайт гликозилирования на N-концевых участках. Изоформы MRAP1α и MRAP1β имеют идентичные N-концевые участки и трансмембранные домены, однако отличаются по C-концевым участкам (Coogay, Clark, 2011). В надпочечниках обе изоформы MRAP1

колокализуются с MC2R, где необходимы для нормальной транспортировки MC2R в плазматическую мембрану и адекватного функционирования рецептора уже на поверхности мембраны, а также регулируют связывание MC2R с АКТГ. Мутации MRAP1 приводят к дисфункциям MC2R и тяжелым наследственным заболеваниям (Metherell et al., 2005; Sebag, Hinkle, 2009). Хотя MRAP1 являются облигатными вспомогательными белками MC2R, они могут контактировать и с другими типами MCR (Rouault, et al., 2017). Экспрессия MRAP1 была обнаружена в тканях надпочечников, гонадах, жировой ткани, клетках кожи и в тонком кишечнике, гипофизе, мозге, костной ткани (Metherell et al., 2005).

MRAP2 также, как и MRAP1, требуется для транспортировки MC2R на поверхность мембраны из ЭПР, но не является необходимым для поддержания сигналинга этого рецептора. MRAP2 способны взаимодействовать и с другими типами MCR (Cooray, Clark, 2011). Экспрессия MRAP2 обнаружена в широком спектре разных тканей и органов, включая ткани печени, надпочечников, кишечника, мозга, тимус, гипофиз, жировую ткань (Asai et al., 2013).

MRAP1 и MRAP2 кроме человека, встречаются у разных видов животных. Гены этих белков у разных видов достаточно консервативны (Webb, Clark, 2010; Rouault et al., 2017). На данный момент известно, что на поверхности мембраны как MRAP1, так и MRAP2 образуют антипараллельные гомо- и гетеродимеры, что является уникальной структурой для протеома эукариот (Rouault et al., 2017).

И хотя MRAP исследуются достаточно широко, об их физиологической роли известно немного. Показано, что MRAP1 не являются необходимыми для экспрессии MC1R, MC3R, MC4R и MC5R на поверхности клетки, однако обнаружено, что они могут снижать экспрессию MC5R и MC4R (Chan et al., 2009). Также выявлено, что MRAP1 и MRAP2 играют важную роль ингибиторов функций MC1R, MC3R, MC4R и MC5R (Chan et al., 2009). В головном мозге MRAP широко экспрессируются в области гипоталамуса, где также представлены MC3R и MC4R, что может свидетельствовать об их роли в регуляции MCRs в ЦНС (Cooray, Clark, 2011). Нокаутные по MRAP2 мыши проявляют фенотип с ожирением, которое проявляется гораздо позже, чем у мышей, нокаутным по MC4R, при этом у этих животных не наблюдается ощутимой гиперфагии и значительного снижения активности (Asai et al., 2013). При введении синтетических агонистов MC4R мышам, нокаутным по MRAP2, сохраняется нормальный анорексигенный эффект, что свидетельствует о сохранности функций MC4R. Интересно, что у двойных нокаутных по MC4R/MRAP2 животных развивается ожирение, но при этом вес тела у них меньше, чем у нокаутных только по MC4R мышей

(Asai et al., 2013). Эти данные показывают, что MRAP2 могут регулировать энергетический баланс как через модуляцию работы MC4R, так и независимо от MC4R (Rouault et al., 2017).

У людей мутация в гене MRAP2 может приводит к снижению функционирования MC4R и вызывать развитие патологического ожирения (Schonpor et al., 2016, цит. по Rouault et al., 2017). Тогда как роль MRAP2 в регуляции энергетического обмена показана несколькими группами ученых, то роль MRAP2 в регуляции обмена глюкозы пока остается неясной (Rouault et al., 2017).

Интересно, что MRAP могут связываться и регулировать деятельность не только MCR, но и других рецепторов. В частности, показано взаимодействие MRAP2 и кинектисиновых рецепторов (относятся к GPCR, связываются с прокинетином – гормоном, регулирующим деятельность гладкой мускулатуры кишечника). Кинектисиновые рецепторы экспрессируются в тех же областях гипоталамуса, что и MC4R, и выполняют сходные функции: снижение потребления пищи. MRAP2 *in vitro* подавляет встраивание кинектисиновых рецепторов в мембрану и их сигналинг. Аналогичным образом MRAP2 взаимодействует и с орексиновыми рецепторами. Это, возможно, дополнительный путь регуляции энергетического гомеостаза посредством MRAP2 (Rouault et al., 2017).

#### **1.1.4. Белки семейства Агути**

К белкам семейства относятся белок Агути и агути-подобный пептид (Agouti-gene related protein - AgRP). Это естественные эндогенные антагонисты MCR, которые играют важную роль в регуляции энергетического баланса, пигментации и механизмах приспособления к окружающей среде (Ollmann et al., 1997; Vastermark et al., 2012). Эти белки имеют значительное структурное и функциональное сходство, их гены возникли от одного предкового гена на заре эволюции позвоночных. Однако они экспрессируются в разных тканях. Белок Агути экспрессируется в периферических тканях, а AgRP – в мозге и надпочечниках (Dinulescu, Cone, 2000; Vastermark et al., 2012).

С-концевые домены Агути и AgRP достаточно консервативны, установлено, что они содержат 10 ключевых сигнальных последовательностей цистеина. Эти последовательности связаны пятью дисульфидными мостиками, образуя так называемый цистеиновый узел, и имеют важное значение при связывании с MCRs (Jackson et al., 2006). Ранее считалось, что ортологи Агути и AgRP есть только в геноме позвоночных (Jackson et al., 2006), однако впоследствии гены белков, содержащих

подобные сигнальные последовательности на С-концевом участке (особый паттерн Агути-подобных белков), были обнаружены также у членистоногих, моллюсков и даже у грибов (Ascomycota; Vastermark et al., 2012). N-концевые домены этих белков идентичны по длине и последовательности экзонов, но при этом имеют мало сходства по аминокислотному составу. Физиологические функции N-концевых доменов белков семейства Агути мало понятны (Jackson et al., 2006).

Агути и AgRP являются обратными агонистами MCRs и, таким образом, обладают потенциалом регулировать MCRs, даже в отсутствие меланокортинов (Nijenhuis et al., 2001).

Термин «агути» относится к окраске волос, обычно наблюдаемой у млекопитающих, которая характеризуется субапикальной желтой полосой на черном или коричневом фоне. Белок Агути является паракринным сигнальным фактором, который блокирует взаимодействие  $\alpha$ -МСГ с MC1R меланоцитов волосяного фолликула млекопитающих, контролируя таким образом окраску шерсти (Lu et al., 1994). Однако показано, что доминантные мутации гена *агути* вызывают вместе с желтой окраской меха у мышей, ожирение, резистентность к инсулину, повышенный соматический рост и предрасположенность к развитию опухолей. При выделении гена, кодирующего *агути*, показано, что эти множественные эффекты были связаны с нерегулируемой сверхэкспрессией Агути во всех тканях (Bultman, et al., 1992). В последствии было выявлено, что ожирение у этих мутантных мышей является вторичным по отношению к эктопической экспрессии Агути в гипоталамусе, где он действует как антагонист  $\alpha$ -МСГ на MC4R (Lu, et al., 1994).

AgRP был выявлен в мозге, а также и в периферических тканях (Ollmann, et al., 1997). Показано, что AgRP является конкурентным антагонистом MC3R и MC4R, который “уравновешивает” функционирование обоих типов рецепторов. К другим MCR AgRP проявляет меньшее сродство. В мозге его основная роль - орексигенный (то есть стимулирующий аппетит) эффект из-за его способности блокировать действие меланокортинов на MC3R и MC4R. Однако существуют данные о том, что AgRP может действовать на пищевое поведение независимо от меланокортинов (Tolle, Low, 2008). Очень низкий уровень циркулирующего в крови AgRP был обнаружен как у крыс, так и у человека (Shen, et al., 2002). Интересный вопрос, на который еще предстоит ответить, - это физиологическая роль AgRP в надпочечниках. Надпочечник - это ткань со второй по величине концентрацией AgRP. Однако, как сообщается, надпочечники человека и крысы экспрессируют только рецепторы MC2R и MC5R, которые не имеют сродства к AgRP. Надпочечник, по-видимому, не является источником AgRP,

переносимого с кровью, так как у крысы адrenaлэктомия не влияет на его уровень в крови (Ollmann, et al., 1997).

### **1.1.5. Махогани и Синдекан-3**

Махогани – трансмембранный гликопротеин, являющийся корецептором для белков семейства Агути (Gunn, Varsh, 2000; Irani et al., 2004). Экстраклеточная часть мышиноного белка махогани на 93% идентична таковой у человеческого аттрактина. Как махогани, так и аттрактин (трансмембранная изоформа) экспрессируются в мозге, легких, желудке, почках и семенниках (Gunn, Varsh, 2000). В периферических тканях махогани взаимодействует с MC1R и модулирует действие белка Агути, тем самым участвуя в регуляции пигментации, переключая меланогнез с синтеза феомеланина на эумеланин (He et al., 2003). В ЦНС взаимодействует с MC3R и влияет на энергетический баланс организма (Irani et al., 2004). Существуют три предполагаемые модели действия белка махогани: 1) непосредственно снижает активность MCRs, вызывая их десенсibilизацию или интернализацию; 2) действует как низкоаффинный корецептор для белка Агути, повышая стабильность взаимодействия белка Агути с MCR или его концентрацию возле рецепторов; 3) играет ключевую роль в формировании нейрональной конструкции, необходимой для транспортировки антагонист-содержащих секреторных везикул к MCR (Dinulescu et al., 1998; Dinulescu, Cone, 2000; Irani et al., 2004). Существуют также данные о взаимодействии махогани и MC4R, а также о влиянии махогани на синтез и везикулярный транспорт этих рецепторов, что также может оказывать действие на энергетический обмен организма (Dinulescu, Cone, 2000; Overton, Leibel, 2011).

Синдекан-3 – член семейства гепаран-сульфат протеогликанов. Трансмембранные формы синдеканов часто выступают в качестве корецепторов в клетках, связывая различные ростовые факторы, гормоны, пептиды и передавая сигналы в клетку. Экспрессия синдеканов тканеспецифична, в ЦНС экспрессируется только синдекан-3 (Strader et al., 2004; Reizes et al., 2006). Экспрессия Синдекана-3 показана в гипоталамусе, в частности, в его латеральной части, паравентрикулярном и перивентрикулярном ядрах, дорзомедиальных ядрах, ARC, что предполагает его роль в регуляции пищевого поведения и энергетического метаболизма (Strader et al., 2004; Reizes et al., 2003). На разных животных моделях показана корреляция экспрессии синдекана-3 и развитием ожирения (Reizes et al., 2001; Strader et al., 2004). Подобная взаимосвязь показана и у человека (Ha et al., 2006). Механизм действия этого протеогликана мало изучен. Но считается, что он является ко-рецептором, который

облегчает связывание AgRP с MC4R. Показано, что комплекс AgRP и синдекана-3 может снижать сродство меланокортинов к MC4R и блокировать передачу сигнала в клетку (Reizes et al., 2006). На клеточной линии HEK293 выявлено, что ко-экспрессия MC4R и синдекана-3 на поверхности клеток увеличивает ингибиторный эффект AgRP на выработку цАМФ, вызванную связыванием меланокортинов с MCR (Reizes et al., 2001). Однако некоторые ученые предполагают, что эффект синдекана-3 на пищевое поведение может быть независим от AgRP и требует дальнейшего изучения (Creemers et al., 2006).

### **1.1.6. Меланокортиновая система мозга**

В головном мозге наиболее изучены две основные популяции нейронов, экспрессирующих POMC, которые располагаются в гипоталамусе и продолговатом мозге (Cone, 2005). Меланокортиновая система мозга уникальна тем, что многие нейроны-мишени, экспрессирующие MCRs, окружены как POMC-иммунопозитивными отростками, из которых осуществляется выведение меланокортиновых пептидов (агонистов MCRs), так и AgRP-иммунопозитивными отростками, из которых выводится антагонист MCRs. Однако ряд данных указывает на тот факт, что некоторые нейроны мозга получают только сигнал агониста (Bagnol et al., 1999).

Кроме основных популяций, группы нейронов, экспрессирующих POMC, обнаружены в гиппокампе (Shen et al., 2016), а также в различных отделах коры больших полушарий (Chen, Yang, 2000).

#### **1.1.6.1. Анатомическое строение меланокортиновой системы мозга**

В головном мозге млекопитающих меланокортиновая система состоит из двух основных подсистем:

1) **Меланокортиновая система гипоталамуса**, которая представлена POMC- и AgRP-экспрессирующими нейронами, локализованными в ARC (или в его гомологе у приматов и человека - маммилло-инфундибулярном ядре, Siljee et al., 2013). У грызунов показано, что в ARC POMC ко-экспрессируется в одних нейронах с CART-пептидом (cocaine- and amphetamine-regulated transcript), а AgRP - с нейропептидом-Y (Schwartz, Morton, 2002).

2) **Меланокортиновая система ствола мозга**, представленная нейронами, экспрессирующими POMC, которые локализованы в различных субпопуляциях ядра одиночного тракта (nucleus tractus solitarius – NTS; Cone, 2005).



ARC представляет собой совокупность нейронов медиобазального гипоталамуса, примыкающая к срединному возвышению и третьему желудочку мозга. Срединное возвышение относится к циркумвентрикулярным органам, то есть, к таким структурам мозга, которые, в отличие от других областей, где есть гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), имеют высокопроницаемые капилляры. Циркумвентрикулярные органы контактируют как с кровеносным руслом, так и с цереброспинальной жидкостью, облегчая специфические виды связи между ЦНС и периферическим кровотоком. Они являются интегративным звеном нейроэндокринных функций (Johnson, Gross, 1993). Срединное возвышение выполняет роль шлюза для высвобождения нейрогормонов гипоталамуса (Palkovits, 1984). Через фенестрированные капилляры этой области нейрогормоны из ЦНС транспортируются в кровь (Scott, Pepe, 1987). Вентромедиальная область ARC также имеет относительно высокую проницаемость капилляров, что указывает на то, что это ядро может играть регуляторную роль в восприятии и передаче гормональных сигналов. Также показаны двухсторонние взаимодействия ARC и срединного возвышения (Shaver et al., 1992).

Тела POMC-нейронов располагаются по всей протяженности ARC в rostro-каудальном направлении (Watson et al., 1978; цит. по: Cone, 2005). От POMC-нейронов ARC образуется плотный пучок отростков, который отходит рострально к передней комиссуре, к ряду ядер в области перегородки, включая ядро ложа конечной полоски и латеральное ядро перегородки, а также к прилежащему ядру. От POMC-нейронов, расположенных более каудально, отходят проекции в паравентрикулярную область таламуса и в центральное ядро миндалина. В области гипоталамуса наиболее плотные проекции отростков наблюдаются в паравентрикулярном ядре и перифорникальной области. Менее плотные проекции выявляются в различных областях гипоталамуса. Также POMC-нейроны ARC посылают две нисходящих совокупности проекций в ствол мозга. Одна из них проходит через околосредоводное серое вещество и дорсомедиальную покрывку среднего мозга, и как считается, иннервирует ростральную часть NTS. Вторая группа проекций, которая считается преобладающей, проходит через вентральную область покрывки и иннервирует ростральную часть NTS, вентролатеральную часть двойного ядра в продолговатом мозге и спинной мозг (Cone, 2005).

Популяция POMC-нейронов продолговатого мозга располагается в NTS. В первую очередь NTS – зона иннервации афферентными волокнами от кишечника. Афферентные ветви, отходящие от разных отделов желудочно-кишечного тракта, приходят в NTS по всей его протяженности от каудального к ростральному концу

(Altschuler et al., 1989; цит. по: Cone, 2005). В ростральной части NTS представляет собой билатерально симметричное ядро, которое соединяется воедино в каудальной части (комиссуральная область) NTS (Saper, 1995; цит. по: Cone, 2005). Дорсальное двигательное ядро блуждающего нерва (*nucleus dorsalis nervi vagi* - DMV), которое является важным эфферентным центром для кишечника, граничит с NTS вентрально и обильно иннервируется его волокнами (Cone, 2005). Дорсально от NTS располагается самое заднее поле (*area postrema* - AP). NTS, DMV и AP образуют дорсальный вагальный комплекс (ДВК) – важную область, отвечающую за замыкания рефлексов блуждающего нерва. ДВК обеспечивает регуляцию пищеварительных процессов (Cone, 2005). AP, также как и срединное возвышение, относится к циркумвентрикулярным органам, являясь важнейшим сенсором гуморальных факторов, приходящих с периферии и передатчиком этой информации прилежащим структурам (Gross, 1992).

Ряд данных показывает важную роль меланокортинового сигналинга в стволе головного мозга в насыщении и ваго-вагальных рефлексах. Во-первых, наличие экспрессии POMC в NTS (Joseph et al., 1983; цит. по: Cone, 2005). Во-вторых, это иннервация стволовых структур POMC нейронами ARC (Cone, 2005).

Отростки POMC-нейронов NTS обнаружены во многих областях каудальной части среднего мозга и в спинном мозге. Некоторые структуры имеют двойную иннервацию от POMC-нейронов NTS и ARC, среди них голубое пятно (*locus coeruleus*), парабранхиальное ядро, ростральная часть NTS, DMV и латеральное ретикулярное ядро (Cone, 2005). Исследование проекций POMC-нейронов NTS, проведенное на мозге мыши, показало наличие проекций из этой области в коре больших полушарий, в ряде ядер мозжечка и моста, паравентрикулярном ядре гипоталамуса (Wang et al., 2015). Таким образом, приведенные данные демонстрируют, что в некоторые области мозга поступают проекции POMC-нейронов, расположенных в ARC и NTS.

Также важнейшей частью меланокортиновой системы мозга является популяция нейронов, экспрессирующая AgRP – эндогенный антагонист MC3R и MC4R.

Отростки AgRP-нейронов более тонкие, чем POMC-нейронов, и имеют больше четковидных расширений. AgRP-иммунопозитивные отростки обнаружены в основном в тех областях, где зарегистрирована наибольшая плотность POMC-иннервации. Это преимущественно область дорсо-медиального гипоталамуса, паравентрикулярное ядро, задний отдел гипоталамуса, область передней комиссуры (Broberger et al., 1998). Также проекции этих нейронов показаны в среднем мозге (в области вентральной покрышки, сером околосредном веществе, дорсальном ядре шва), промежуточном мозге (голубом пятне, двигательном ядре тройничного нерва,

парабрахиальном ядре), продолговатом мозге (медиальной и латеральной частях NTS, в двойном ядре), но там их плотность значительно ниже, чем отростков POMC-нейронов (Bagnol et al., 1999). В ARC расширения AgRP-отростков плотно примыкают к POMC-нейронам, что свидетельствует о тесной взаимосвязи этих популяций нейронов в данной области (Bagnol et al., 1999).

#### **1.1.6.2. Регуляция POMC-нейронов гипоталамуса**

Меланокортиновая система гипоталамуса является наиболее изученной, особенно в связи с тем, что показана ее роль в регуляции энергетического баланса организма (Cone, et al., 2005). Эта система играет ключевую роль в формировании функциональной взаимосвязи между мозгом и периферическими органами и тканями. Она уникальна тем, что может воспринимать и интегрировать сигналы от большого числа гормонов, питательных веществ и афферентных входов, а также быстро и эффективно отвечать на изменения гомеостаза (Cone, 2005). Она отвечает за регуляцию уровня глюкозы в крови, чувствительности тканей к инсулину, пищевого поведения, липидного обмена. Сбои в ее функционировании приводят к нарушениям обмена веществ: вызывают инсулиновую резистентность, гиперфагию (переедание), ожирение и сахарный диабет второго типа или, напротив, выражаются в подавлении аппетита и кахексии (Catania, 2008; Cone, 2005).

Как было упомянуто ранее, ARC граничит со срединным возвышением, циркумвентрикулярным органом, следовательно, нейроны этой области являются высоко чувствительными сенсорами к сигналам, приходящим от периферических тканей. Кроме того, в область ARC приходят проекции от разных нейрохимических систем мозга, включая моноаминергические, ГАМКергическую и другие (цит. по Угрюмов, 1999). Кроме того, дофаминергические и ГАМКергические нейроны также располагаются в области самого ARC (Brown et al., 2016). Таким образом, как POMC, так и AgRP нейроны этой области регулируются циркулирующими гормонами (лептином, инсулином, грелином, эстрогенами, глюкокортикоидами, глюкогон-подобным пептидом-1, нейропептидом Y), а также нутриентами и сигнальными факторами, вырабатываемыми самой ЦНС (Nuzzaci et al., 2015). Возможность осуществления регуляции POMC- и AgRP-нейронов различными факторами подтверждается присутствием на их поверхности различных специфических к ним рецепторов (Muraki et al., 2004; Makarenko, Meguid, Ugrumov, 2002; Doslikova et al., 2013; Romanova et al., 2018). Также в телах POMC-нейронов обнаружены рецепторы к IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ , что свидетельствует о возможности регуляции центрального

меланокортинового сигналинга про-воспалительными факторами (Scarlett, Marks, 2005).

### 1.1.6.3. Экспрессия и функции меланокортиновых рецепторов в ЦНС

Впервые в структурах ЦНС были выявлены MC3R и MC4R. Именно функции этих рецепторов остаются наиболее изученными и изучаемыми в мозге до настоящего времени, несмотря на то, что с конца 20-го века накопились данные о возможности экспрессии в мозге и остальных MCRs (Xia, et al., 1995; Cone, 2005; Cone, et al., 2006).

**MC3R** экспрессируются в гипоталамусе, таламусе, гиппокампе, центральном ядре миндалины, коре головного мозга, черной субстанции, вентральной области покрышки, продолговатом мозге и ядрах шва (Roselli-Rehfus, et al., 1993). MC3R в ARC расположены как в POMC-нейронах, так и на нейронах, продуцирующих AgRP, что может служить доказательством участия MC3R в передаче сигналов между POMC- и AGRP-нейронами. При этом экспрессия MC3R в самих POMC-нейронах ARC свидетельствует о его роли как ауторегулятора (Bagnol et al., 1999).

**MC4R** также интенсивно экспрессируется во многих областях мозга. Они обнаружены в коре головного мозга, латеральном септуме, вентральной области покрышки, прилежащем ядре и центральном ядре миндалины и в небольших количествах, в вентральной части стриатума, а также в гиппокампе (Bagnol et al., 1999; Kishi et al., 2003). Самые высокие уровни экспрессии и самая высокая плотность MC4R характерна для структур гипоталамуса. Они обнаружены в преоптической области, ядре ложа концевой пластинки, паравентрикулярном, супраоптическом и аркуатном ядрах, в области латерального гипоталамуса, что указывает на исключительно важную роль гипоталамической меланокортиновой системы в опосредовании регулирующих эффектов меланокортиновых пептидов, особенно их метаболические и поведенческие эффекты. В иммуногистохимических исследованиях на крысах доказан факт того, что MC3R и MC4R экспрессируются в AGRP- и POMC-нейронах ARC (Bagnol et al., 1999). С помощью гибридизации *in situ* и иммуногистохимии показано, что мРНК MC3R идентифицируется в 55% AGRP-иммунопозитивных нейронов ростральной части ARC и в 28% клеток в каудальных отделах ARC, а в среднем 44% AgRP-иммунопозитивных нейронов. Точно так же обнаружено, что мРНК MC3R присутствовала в 43% POMC-нейронов в ростральной части и в 13% в каудальной части ARC (в среднем – в 31% POMC-нейронов). Однако, ни в AGRP-нейронах, ни в POMC-нейронах не показали экспрессию мРНК MC4R.

В мозге мРНК **MC1R** была обнаружена впервые в области околосредоводного серого вещества (Xia et al., 1995), что стало предположением об их участии в иммуномодуляторном и противовоспалительном эффектах меланокортинов (Abdel-Malek et al., 2001). Однако функции MC1R в ЦНС до недавнего времени изучались крайне мало. Недавние исследования показали участие MC1R в нейропротекторном действии меланокортиновых пептидов. В частности, установлено, что MC1R экспрессируются в нейронах компактной части черной субстанции (substantia nigra, SN). В этом случае MC1R рассматриваются как потенциальная мишень при терапии болезни Паркинсона, поскольку мутация в гене *MC1R* повышает риск возникновения данного заболевания. У мышей, имеющих мутацию по *Mc1r* (сдвиг рамки считывания, происходящий из-за делеции всего одного нуклеотида), в результате которой рецептор синтезируется, но не функционирует должным образом, происходит снижение численности тирозингидроксилаза-иммунопозитивных нейронов в компактной части SN (Chen et al., 2017). Через MC1R в клетках олигодендроглии, астроцитах, Шванновских клетках  $\alpha$ -МСГ оказывает протективное действие на клетки глии при рассеянном склерозе и других нейрональных заболеваниях (Lisak, Benjamins, 2017; Benjamins et al., 2018). MC1R присутствуют в клетках эндотелия сосудов, формирующих гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Здесь они участвуют в механизмах, защищающих ГЭБ от разрушения под действием провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$  и IL-1, поддерживая выживаемость клеток (Harazin et al., 2018). Роль MC1R в ЦНС, в частности в гипоталамусе, при ожирении до сих пор не исследовалась, поскольку основные функции при метаболическом дисбалансе отводятся MC3R и MC4R.

У позвоночных **MC2R** в мозге экспрессируются только на стадии позднего органогенеза свидетельствует о важной роли этих рецепторов в развитии мозга во время эмбриогенеза. Попытки установить экспрессию MC2R в зрелом мозге млекопитающих на данный момент успехом не увенчались (Catania et al., 2008; Catania et al., 2010). При исследовании экспрессии меланокортиновых рецепторов в клетках мозга при атеросклерозе, экспрессия MC2R в норме не обнаружена, однако возможность включения экспрессии MC2R при патологии исследована не была (Lisak, Benjamins, 2017).

Роль **MC5R** во взрослом мозге человека и разных видов животных не ясна. Экспрессия гена, кодирующего MC5R, первоначально была обнаружена в головном мозге человека (Chhajlani, et al., 1993) и мыши. В мозге крысы мРНК MC5R обнаружена в обонятельном бугорке, черной субстанции, полосатом теле, мозговом веществе,

мозжечке, гипоталамусе, гиппокампе, среднем мозге и коре головного мозга. Однако другие исследования говорят об обратном факте того, что мРНК MC5R отсутствует в мозге взрослых особей крыс или мышей (Mountjoy et al., 1999; Griffon et al., 1994). Но экспрессия MC5R у эмбрионов мыши может свидетельствовать об их участии в развитии коры больших полушарий (Catania et al., 2008). Также рассматривается роль MC5R в протекторных механизмах в мозге при патологических состояниях, таких как атеросклероз. Некоторые исследователи считают, что MC5R выступают в качестве акцептора АКТГ в зрелом мозге, вместо MC2R рецепторов, экспрессия которых в норме в зрелом мозге не обнаружена (Lisak, Benjamins, 2017; Benjamins et al., 2018).

Эндогенным антагонистом MCR, который экспрессируется в мозге, является AgRP. В норме белок Агути в ЦНС не обнаружен. Коррецептором к AgRP является синдекан-3.

#### **1.1.6.4. Агути-подобный пептид (AgRP)**

Ген, кодирующий агути-подобный пептид, был клонирован в 1997 году, и назван так в связи с высокой гомологией с белком Агути (Ollmann et al., 1997). У человека AgRP имеет длину 132 аминокислот, а мышинный гомолог состоит из 131 аминокислот и на 81% идентичен человеческому. AgRP также, как и белок Агути, имеет цистеиновые последовательности на С-концевом домене, которые связываются пятью дисульфидными мостиками и формируют сигнальный фрагмент (Shutter et al., 1997).

В клетке после синтеза AgRP подвергается постраницсионным модификациям и при помощи PC1/3, PC2 и PC5/6a, которые экспрессируются в самих AgRP-нейронах, превращается в три активных фрагмента: AgRP (25-51), (54-82) и (83-132) (Ollmann et al., 1997; Creemers et al., 2006). Способностью блокировать MCRs обладает только AgRP (83-132), тогда как функция двух остальных фрагментов оставались не известными (Quillan et al., 1998; Pichad, Waite, 2005).

AgRP является конкурентным антагонистом действия  $\alpha$ -MCH на MC3R и MC4R. Он блокирует агонист-опосредованную сигнальную активность MC3R и MC4R (Ollmann et al., 1997; Shutter et al., 1997). Однако действие AgRP не ограничивается блокированием доступа основного лиганда на рецепторе. Этот белок способен действовать и как обратный агонист, передавая свой биологический сигнал через MCRs независимо от меланокортинов (Chai et al., 2003; Slominski et al., 2005; Tolle, Low, 2008).

Связывание AgRP с MC3R/4 может запускать и эндоцитоз, опосредованный  $\beta$ -аррестинами, аналогичный таковому, который наблюдается при связывании этих рецепторов с меланокортинами. Таким образом, AgRP может запускать G-белок-

независимые аррестининовые сигнальные каскады, приводящие к активации митоген-активируемых протеинкиназ (Nijenhuis et al., 2001; Breit et al., 2006).

Помимо действия на MC3R и MC4R, AgRP может связываться и с MC5R, но с очень низкой аффинностью. Первоначально для MC1R/2 связывания с AgRP не было показано (Ollmann et al., 1997), тогда как по последним данным AgRP способен связываться и с этими типами рецепторов, но с меньшей аффинностью (Rodrigues et al., 2014).

В отличие от гена *Agti*, экспрессия гена *AGRP* имеет сходный характер у мыши и человека. Человеческий и мышинный AgRP в мозге экспрессируется в ARC, также обнаружена его экспрессия в субталамическом ядре. В экспериментах *in vitro* показано, что в гипоталамусе у мышей AgRP повышает свою собственную экспрессию (Charbonneau et al., 2004).

Наибольшая плотность AgRP-иммунопозитивных отростков выявляются в ряде ядер гипоталамуса (ARC, паравентрикулярное и дорсомедиальное ядра), в меньшей степени в структурах мозга, где располагаются проекции POMC-нейронов, что предполагает ключевую роль AgRP в регуляции энергетического метаболизма млекопитающих. Показано, что AgRP является орексигенным (повышающим аппетит) пептидом (Cone, 2005). Конкурируя с  $\alpha$ -MCH за связывание с MC4R в гипоталамусе, AgRP принимает непосредственное участие в регуляции потребления пищи, а также задействован в изменении массы тела и углеводно-жирового обмена (Ebihara et al., 1999; Stutz et al., 2005). В ростральной части ARC (где функции ГЭБ снижены) в AgRP-нейронах экспрессируются рецепторы к лептину (Hahn et al., 1998) и грелину (Barsh, Schwartz, 2002).

В экспериментах с внутрижелудочковым введением AgRP (83-132) показано, что нейропептид блокирует анорексигенный эффект агонистов MC3R и MC4R, что приводит к увеличению потребления пищи и изменению энергетического баланса (Nagan et al., 2000). Однако при гиперлептинемии в периферической крови на фоне активации аппетита и увеличения массы тела наблюдается уменьшение мРНК AgRP в ARC (Бажан и др., 2005; Багинская и др., 2007), что противоречит его роли орексигенного фактора

Работы последних лет свидетельствуют и о других функциях AgRP. AgRP нейроны регулируют превращение белой жировой ткани в бурую (Ruan et al., 2014), метаболизм глюкозы в бурой жировой ткани (Steculorum et al., 2016) и термогенез (Burke et al., 2017), а также показано влияние активации AgRP нейронов на скорость

расщепления питательных веществ и накопление жиров (Cavalcanti-de-Albuquerque et al., 2019).

Кроме гипоталамуса AgRP-иммунореактивные отростки выявлены и в других отделах мозга, в том числе в областях локализации серотонинергических и дофаминергических (SN, VTA, околосредовое серое вещество), норадренергических, вазопрессинергических нейронов (Bagnol et al., 1999; Романова, 2012; Михрина, Романова, 2013), что предполагает влияние AgRP на моноаминергические структуры. Исследование фрагментов AgRP 83-132 и AgRP 25-51 выявило их влияние на дофаминергические нейроны мозга. В частности, при их воздействии было показано уменьшение фосфорилирования тирозингидроксилазы в дофаминергических нейронах мозга через различные сигнальные пути, что приводило к уменьшению уровня дофамина (Mikhrina, Romanova, 2015; Михрина, и др., 2018). Функциональное значение фрагмента AGRP 54-82 остается не изученным и его роль в регуляции нейронов разной эргичности не показана.

## **1.2. Серотониновая система мозга**

Серотониновая система является самой обширной моноаминергической системой в мозге позвоночных, и одновременно самой трудной для исследования. Она играет важную роль в регуляции пищевого поведения, циркадных ритмов, цикла сон-бодрствование, эмоций и настроения, температуры тела, тревожности, полового поведения, двигательной активности и целого ряда других вегетативных функций (Ещенко, 2004; Walther, Vader, 2003; Oh et al., 2016).

Основным моноамином этой системы является серотонин (5- гидрокситриптамин, 5-НТ). Он действует как гормон и митоген, а также и как нейротрансмиттер (Oh et al., 2016).

### **1.2.1. Анатомическая структура серотониновой системы мозга**

Нейроны, синтезирующие серотонин, концентрируются в так называемых ядрах шва. Ядра шва располагаются по срединной линии ствола мозга, составляя центральную часть ретикулярной формации. По одной из классификаций NeuroNames (ID : 2495, данные сайта <http://braininfo.rprc.washington.edu>) ядра шва условно делят на группы, соответственно структуре мозга, в которой они располагаются. К ним относят:

а) ядра шва продолговатого мозга (*nucleus raphe obscurus* (темное ядро шва), *nucleus raphes magnus* (большое ядро шва), *nucleus raphes pallidus* (бледное ядро шва));



б) ядра шва ретикулярной формации моста (*nucleus raphes pontis* (мостовое ядро шва), *nucleus sublingualis* (подъязычное ядро));

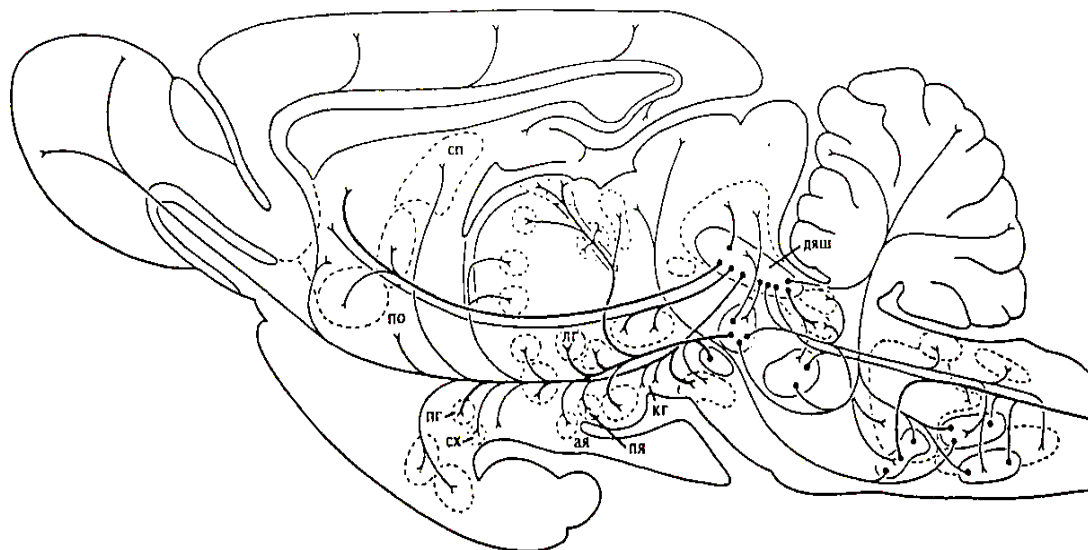
в) ядра шва ретикулярной формации среднего мозга (*nucleus superior centralis* (верхнее центральное ядро шва, оно же медианное), *nucleus raphes dorsalis* (дорзальное ядро шва)).

По более ранней классификации ядра шва обозначают В1-В9. Их разделяют на две группы: ростральную и каудальную. К ростральной группе относят: мостовое ядро шва (В5), дорзальное ядро шва (В7), медианные ядра шва (В6, В8). Каудальная группа состоит из: большого ядра шва (В3), темного ядра шва (В2), бледного ядра шва (В1). Также, согласно данной классификации, серотонинергические нейроны располагаются в двух зонах, которые не соответствуют конкретным анатомическим структурам (В4 и В9) (Бохан и др., 2013).

Серотонинергические нейроны посылают проекции практически ко всем структурам ЦНС. Группы каудальных клеток (В1-В4) обеспечивают первичные нисходящие проекции серотонинергических нейронов, в то время как группы ростральных клеток (В5-В9) дают начало первичным восходящим проекциям. Мишенями нисходящих проекций являются области мозжечка, среднего мозга, моста и продолговатого мозга, а также большинство сегментов спинного мозга. Мишенями же восходящих проекций серотонинергических нейронов являются кора больших полушарий, гиппокамп, таламус, гипоталамус, стриатум и миндалина (Trulson, Jacobs, 1979).

Основным источником серотониновой иннервации гипоталамуса является дорзальное и медианное ядра шва (В7 и В8) (**Рис. 4**) (Steinbuch, Nieuwenhuys, 1981, 1983; Montange, Calas, 1988; цит. по Угрюмов, 1999). Гипоталамус получает обильную иннервацию серотонинергическими волокнами. Наибольшая концентрация серотонинергических входов отмечена в трех областях: латеральной, медиальной и инфундибулярной (Descarries, Beaudet, 1978; Steinbuch, Nieuwenhuys, 1981). В области латерального гипоталамуса серотонинергические волокна концентрируются в медиальном пучке переднего мозга, откуда их проекции идут в отделы-мишени гипоталамуса. Наибольшая плотность серотонинергических волокон в медиальной области обнаружена в супрахиазматическом ядре, что характерно для большинства млекопитающих, исключая приматов (Descarries, Beaudet, 1978; Steinbuch, Nieuwenhuys, 1981; Ueda et al., 1983). Наибольшая плотность серотонинергических афферентных входов в инфундибулярной области приходится на аркуатное ядро (Steinbuch, Nieuwenhuys, 1981; Kiss, Halasz, 1985), и несколько в меньшей степени

иннервированы вентромедиальные и дорсомедиальное ядра гипоталамуса (Steinbuch, Nieuwenhuys, 1981; Frankfurt, Azmitia, 1983). Помимо ядер гипоталамуса серотонинергические отростки проецируются в наружную и внутреннюю зоны срединного возвышения (Montange, Calas, 1988), а также на все отделы гипофиза, причем в наибольшей степени на его промежуточную долю (Leranth et al., 1983).



**Рис. 4.** Афферентные проекции серотонинергических нейронов ядра шва (по Steinbusch, Nieuwenhuys, 1983, приведено по Угрюмов, 1999).

*Обозначения:* ая – аркуатное ядро; дяш – дорзальное ядро шва; кг – каудальная гипоталамическая область; лг – латеральный гипоталамус; пг – переднее гипоталамическое ядро; по – преоптическая область; пя – премаммилярное ядро; сп – септум; сх – супрахиазматическое ядро.

Серотонинергические аксоны образуют синаптические контакты с нейронами-мишенями на уровне ядер гипоталамуса (Tramu et al., 1983). На уровне тел нейросекреторных нейронов-мишеней в гипоталамических ядрах серотонин выступает в качестве нейротрансмиттера, регулирующего через синапсы синтез и выделение аденогипофизотропных нейрогормонов (Johns et al., 1982).

Установлены потенциальные источники серотониновой иннервации разных отделов гипоталамуса. Нейроны медианного ядра шва иннервируют супрахиазматическое ядро, передний гипоталамус и медиальную преоптическую область. Волокна дорзального ядра шва входят в переднее перивентрикулярное ядро и срединное возвышение. Показано, что АРК, переднелатеральная гипоталамическая область и другие отделы гипоталамуса получают смешанную иннервацию от дорзального и медианного ядер шва (Montange, Calas, 1988; Everitt et al., 1992; цит. по: Угрюмов, 1999).

### **1.2.2. Дополнительные источники биосинтеза серотонина в мозге**

Хотя ядра шва и являются основным местом локализации серотонинергических нейронов, однако достаточно большое количество серотонинергических нейронов находится в других областях мозга (Бохан и др., 2013). Серотонин обнаружен в нейронах черной субстанции, миндалевидного комплекса, в области зрительного бугра, вентральной покрышки, а также в продолговатом и спинном мозге (Ещенко, 2004). Также в перечисленных областях не так давно обнаружена экспрессия триптофангидроксилазы 2 (ТРГ2 - скорость-лимитирующего фермента биосинтеза серотонина в ЦНС), что может свидетельствовать именно о биосинтезе серотонина в данных структурах (Carkaci-Sallietal., 2011).

Высказывалось предположение, что серотонин может синтезироваться и нейронами медиобазального гипоталамуса, о чем свидетельствует сохранение высокой концентрации серотонина и фермента его биосинтеза триптофангидроксилазы (ТПГ) в этой области после ее хирургической деафферентации (Brownstein et al., 1976; цит. по: Угрюмов, 1999). Например, нейроны дорсомедиального ядра обладают рядом свойств, присущих для серотонинергических нейронов: специфическим обратным захватом серотонина, внутриклеточным накоплением серотонина, дегенерацией под действием специфического нейротоксина – 5,7-гидрокситриптамина. Тем не менее, ТПГ в них на тот момент не была обнаружена (Угрюмов, 1999).

В отношении распределения ТПГ, специфичной для мозга (ТПГ2) в гипоталамических структурах имеется только одна работа, в которой с помощью иммуногистохимического подхода показано наличие ТПГ2-иммунопозитивных гранул в латеральном и медиальном гипоталамусе, но при этом не ясно, являются ли иммунопозитивные структуры окончаниями отростков серотонинергических нейронов, приходящих из среднего мозга, или они соответствуют экспрессирующим ТРГ2 гипоталамическим нейронам различной эргичности (Clark et al., 2008).

### **1.2.3. Биосинтез и метаболизм серотонина**

Серотонин (5-НТ) – древний моноаминовый нейротрансмиттер, принадлежащий к группе биогенных аминов. Он широко распространен у позвоночных и беспозвоночных животных, а также встречается у грибов и растений. Как и другие моноамины, он синтезируется из ароматической аминокислоты и действует как нейротрансмиттер и нейромодулятор в пределах нервной системы, или способен выделяться в кровеносное русло и функционировать в качестве (нейро)гормона (Vleugels et al., 2015).

Впервые серотонин был выделен в 1935 году из клеток слизистой желудочно-кишечного тракта итальянским ученым В. Эрспамером. И определен как моноамин, действующий на гладкую мускулатуру кишечника, потому первоначально был назван энтерамином (Gothert, 2013). Позднее, в 1948 году, группа ученых из США открыла вещество в сыворотке крови, которое обладает вазоконстрикторным эффектом. Это вещество было названо серотонином (от лат. «*serum*» (сыворотка), и греческого - «*τόνος*» (тонус)) (Rapport et al., 1948). В 1952 году было показано, что энтерамин и серотонин – это одно и то же вещество (Feldberg, Toh, 1953). А в 1953 году серотонин был обнаружен в головном мозге (Twarog, Page, 1953).

Синтез серотонина происходит в два этапа. Предшественником этого моноамина является аминокислота триптофан. На первом этапе триптофан гидроксилируется по пятому положению индольного кольца посредством триптофангидроксилазы (ТРГ, также известна под названием триптофан-5-монооксигеназа) с получением 5-гидрокситриптофана. На втором этапе 5-гидрокситриптофан декарбоксилируется с помощью декарбоксилазы ароматических L-аминокислот с получением 5-НТ. Оба этапа биосинтеза серотонина происходят в серотонинергических нейронах (Grahame-Smith, 1967). После синтеза серотонин упаковывается в везикулы для последующего экзоцитоза (Lam et al., 2010).

Скорость-лимитирующим ферментом биосинтеза серотонина является триптофангидроксилаза (ТПГ), который относится к суперсемейству ароматических аминокислотных гидроксилаз вместе с фенилаланин- и тирозингидроксилазой (Fitzpatrick, 1999). На сегодняшний день у позвоночных известно две изоформы ТПГ, которые обозначаются соответственно ТПГ1 и ТПГ2 по очередности их открытия. Эти изозимы являются продуктами двух разных генов (Walther, Bader, 2003). ТПГ1 и ТПГ2 - высоко гомологичные белки. Все структурные и функциональные свойства, присущие ТПГ1, имеются и у ТПГ2 (Martinez et al., 2001; Wang et al., 2002). Более того, аминокислотные последовательности ТРГ1 и ТРГ2 идентичны на 71% (McKinney et al., 2005). ТПГ2 преимущественно синтезируется в ЦНС, тогда как ТРН1 экспрессируется в кишке, пинеальной железе, селезенке и тимусе (Walther, Bader, 2003).

Активность ТПГ2 определяется ее фосфорилированием через различные сайты серина, что сопряжено с различными внутриклеточными посредниками. Известны 4 активные фосфорилированные формы этого фермента. Ser58 и Ser260 - сайты фосфорилирования для CaMKII и Ser58 - для PKA (Kuhn et al., 1997; Kumer et al., 1997; Yohrling et al., 2000). Сайт фосфорилирования Ser19, имеющийся у ТПГ2, отсутствует в ТПГ1. Этот сайт является гомологичным сайту Ser19 тирозингидроксилазы

(McKinney et al., 2005, Kowlessur, Kaufman, 1999), и может фосфорилироваться как CaMKII, так и PKA (McKinney et al., 2005). PKA дополнительно фосфорилирует Ser104 TRG2, но активация киназы происходит при связывании с триптофангидроксилазой белков 14-3-3 (Winge et al., 2008). Связывание 14-3-3 белков дополнительно активирует и стабилизирует ТПГ2. Кроме того, связывание 14-3-3 белков ингибирует дефосфорилирование ТПГ2 и тем самым продлевает ее активацию (Banik et al., 1997; Winge et al., 2008). Мутации в сайтах фосфорилирования и нарушения процессов фосфорилирования приводят к сбоям в биосинтезе серотонина.

Метаболизм серотонина протекает в два этапа, состоящих из окислительного деаминирования при участии фермента моноаминоксидазы (МАО, в первую очередь МРО-А) с получением 5-гидроксииндол-3-ацетальдегида, который далее окисляется альдегиддегидрогеназой до 5-гидроксииндолуксусной кислоты (Lam et al., 2010).

#### 1.2.4. Серотониновые рецепторы

Многообразие эффектов серотонина возможно благодаря наличию большого разнообразия собственных рецепторов. На сегодняшний день известно 7 типов и около 18 подтипов серотониновых рецепторов. Классификация рецепторов основывается на эволюционной линии, гомологии последовательностей и связи с запускаемыми внутриклеточными каскадами при связывании с лигандами (Gothert et al., 2020). Обозначаются рецепторы серотонина 5-HT<sub>1</sub>R - 5-HT<sub>7</sub>R (Nichols, Nichols, 2008).

Большая часть серотониновых рецепторов (6 типов) принадлежат к медленнодействующим метаботропным рецепторам, и похожи по строению на рецепторы дофамина и норадреналина. Они включают в себя внеклеточный N-конец, семь трансмембранных доменов, соединенных тремя внеклеточными и тремя внутриклеточными петлями, а также внутриклеточный C-конец (Kroeze et al., 2002). И только одна группа серотониновых рецепторов (5-HT<sub>3</sub>R) относится к лиганд-управляемым Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> ионным каналам (Barnes et al., 2009).

Некоторые семейства серотониновых рецепторов включают в себя только один тип (5-HT<sub>4</sub>R, 5-HT<sub>6</sub>R и 5-HT<sub>7</sub>R), а другие помимо типов содержат еще и подтипы: 5-HT<sub>1</sub>R включает подтипы 1A и 1B (1D $\beta$  у человека), 1D (1D $\alpha$  у человека), 1E и 1F; 5-HT<sub>2</sub>R включает 2A, 2B и 2C (ранее 1C); 5-HT<sub>3</sub>R включает подтипы 3A-E; 5-HT<sub>5</sub>R включает подтипы 5A и 5B (Hoyer et al., 2001; Lam et al., 2010; Gothert et al., 2020).

Представители семейства **5-HT<sub>1</sub>** сопряжены с Gi-белками, присоединение к ним лиганда приводит к ингибированию АЦ и, как следствие, к снижению активности цАМФ-зависимых протеинкиназ. Это семейство рецепторов широко распространено в

нервной системе. Они могут располагаться как на пресинаптической терминали (5-НТ<sub>1B</sub>R; 5-НТ<sub>1D</sub>R), так и на постсинаптической мембране, располагаясь на соме или дендрите нейрона (5-НТ<sub>1A</sub>R). Могут нести функцию ауторецепторов, регулируя выброс серотонина из терминали того же нейрона, так и распространены на пресинаптических областях нейронов других эргичностей, регулируя выброс дофамина, ГАМК, ацетилхолина и других медиаторов в мозге (Jonakuty, Gragnoli, 2008). Семейство 5-НТ<sub>1</sub>R опосредует широкий спектр эффектов серотонина в зависимости от подтипа рецептора и ткани, такие как вазоконстрикция, частота сердечных сокращений и регуляция функционирования нейронов другой эргичности в мозге. Кроме того, отмечено, что 5-НТ<sub>1</sub>R вовлечены в регуляцию сна, импульсивности, аппетита, депрессии и тревожности, а также в развитие алкогольной зависимости и агрессии (Barnes, Sharp, 1999; Hoyer et al., 2002; Cote et al., 2004; Glennon, 2003; Pytliak et al., 2011).

Рецепторы семейства **5-НТ<sub>2</sub>** (подтипы А, В, С), сопряженные с Gq/11-белками, реализуют свои эффекты в результате активации фосфолипазы С и запуска фосфоинозитидного каскада. Постсинаптические рецепторы этого семейства имеют наибольшую плотность в структурах мозга. 5-НТ<sub>2</sub> участвуют в процессах регуляции памяти, обучения, настроения, болевой чувствительности (Heisler et al., 2007; Patel, Dickenson, 2018). Активация 5-НТ<sub>2A</sub> в гипоталамусе влияет на выброс окситоцина, пролактина, АКТГ, ренина и кортикостерона (Van de Kar et al., 2001). Подтип 5-НТ<sub>2C</sub> является единственным, для которого генетический дефицит приводит к гиперфагии и ожирению, что указывает на то, что именно данный подтип рецептора играет решающую роль в серотониновой координации пищевого поведения и массы тела (Lam et al., 2010).

Семейство **5-НТ<sub>3</sub>** (подтипы А, В, С, D, E) относится к суперсемейству лиганд-управляемых ионных каналов с Cys-петлей. Они состоят из 5 субъединиц и проницаемы для ионов Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> и Ca<sup>2+</sup>. В высокой степени гомологичны никотиновым ацетилхолиновым рецепторам. 5-НТ<sub>3</sub>R широко экспрессируются в центральной и периферической нервной системе (Barnes, Sharp, 1999). Могут присутствовать как на постсинаптической, так и на пресинаптической мембранах. На пресинаптических мембранах способны регулировать выброс медиатора из пресинаптической терминали (Rondé, Nichols, 1998; van Hoof, Vijverberg, 2000). Эти рецепторы участвуют в регуляции центра тошноты и рвоты в продолговатом мозге, тревожности, эпилептических состояний (Gholipour et al., 2010), восприятия боли (Patel, Dickenson, 2018).

5-HT<sub>4</sub>R, 5-HT<sub>6</sub>R и 5-HT<sub>7</sub>R сопряжены с Gs-белками и стимулируют продукцию цАМФ в ответ на связывание с лигандом. Рецепторы 5-HT<sub>4</sub>R расположены преимущественно в желудочно-кишечном тракте, мочевом пузыре, сердце и надпочечниках, а также найдены в ЦНС. Они участвуют в сокращении мочевого пузыря, секреции глюкокортикоидов, а также сокращений предсердий (Cote et al., 2004; Glennon, 2003; Pytliak et al., 2011).

**5-HT<sub>5</sub>R** (подтипы А и В) сопряжены с Gi-белками. Экспрессируются в ЦНС исключительно. Функции их малоизучены до сих пор (Szeitz, Bandiera, 2018).

**5-HT<sub>6</sub>R** широко представлены в ЦНС, где они отвечают за выброс разнообразных медиаторов (дофамина, норадреналина, ГАМК и глутамата) (Schechter et al., 2008; Lacroix et al., 2004). Эти рецепторы играют роль в познании, обучении и контроле аппетита (Glennon, 2003).

**5-HT<sub>7</sub>R** широко представлены в различных тканях организма, в частности в головном мозге, желудочно-кишечном тракте и различных сосудах (Bard et al., 1993). В мозге достаточно обильно экспрессируются в гипоталамусе, таламусе, гиппокампе и коре больших полушарий. Вовлечены в регуляцию циркадианных ритмов, терморегуляцию, обучение и память, регуляцию сна. На периферии регулируют сокращения гладкой мускулатуры кишечника и участвуют в регуляции сердечно-сосудистых ритмов (Hedlund, Sutcliffe, 2004; Naumenko et al., 2014).

### **1.2.5. Везикулярный транспорт и обратный захват серотонина**

После синтеза серотонин пребывает в цитозоле серотонинергических нейронов. После прихода сигнала, везикулярный моноамин-транспортер (VMAT, vesicular monoamine transporter, в случае серотонина, это VMAT2) закачивает 5-НТ в везикулы, которые после сливаются с пресинаптической мембраной, высвобождая серотонин в синаптическую щель. Из синаптической щели серотонин захватывается обратно с помощью собственного транспортера (SERT). Захваченный из синаптической щели серотонин может быть снова упакован в везикулы или подвергнуться утилизации (Dwarkasing et al., 2016).

Нарушения рециклинга серотонина приводят к различным серьезным заболеваниям и расстройствам, ровно, как и могут являться следствиями патологических состояний (Eiden et al., 2004; Little et al., 2003; Cho et al., 2019).

Везикулярный моноамин-транспортер 2 (VMAT2) – трансмембранный белок, который транспортирует моноамины, преимущественно нейротрансмиттеры серотонин, дофамин, адреналин и норадреналин, из цитоплазмы в синаптические

везикулы (Eiden et al., 2004). При наркотических зависимостях наблюдается снижение иммунореактивности VMAT2, что сопряжено с развитием эмоциональных расстройств и нарушением рециклинга моноаминов (Little et al., 2003).

Серотониновый транспортер (SERT), также называемый натрий-зависимым транспортером серотонина, представляет собой трансмембранный белок, обеспечивающий обратный захват серотонина в присутствии ионов натрия и хлора. Множественные исследования свидетельствуют о взаимосвязи нарушений в синтезе и экспрессии SERT с развитием различных отклонений, включая алкогольную зависимость, обсессивно-компульсивное расстройство, социофобию, клиническую депрессию, шизофрению (Cho et al., 2019).

### **1.3. Взаимодействие меланокортиновой и серотониновой систем мозга**

Меланокортиновая и серотониновая системы – крупные медиаторные системы мозга, регулирующие целый ряд важнейших функций организма. В том числе, они участвуют в поддержании энергетического баланса организма, регуляции защитных функций, циклов сон-бодрствование, регуляции пищевого поведения, в формировании приспособительных реакций (Heisler et al., 2006; Marston et al., 2011).

Как уже было упомянуто, проекции серотонинергических нейронов дорсального и медианного ядер шва обильно иннервируют гипоталамус, в частности, аркуатное ядро (**Рис. 4**). Были выявлены синаптические контакты аксонов серотонинергических нейронов с POMC-нейронами в аркуатном ядре (Kiss et al., 1984). Показано, что свои эффекты на нейроны данной области серотонин оказывает через 5-HT<sub>2C</sub>R (Xu et al., 2008). Серотонин через 5-HT<sub>2C</sub>R активирует POMC-нейроны и ингибирует AgRP-нейроны, изменяя отношение анорексигенных и орексигенных факторов и, таким образом, уменьшая аппетит (Heisler et al., 2006; Sohn et al., 2011). Показано, что серотонин и селективные 5-HT<sub>2C</sub>R агонисты, действуя через этот тип рецепторов, стимулируют экспрессию POMC в POMC-нейронах и повышают экспрессию MC4R, вызывая, таким образом, активацию меланокортиновой системы гипоталамуса (Zhou et al., 2005, 2007; Lam et al., 2008).

Роль 5-HT<sub>1B</sub>R в гипоталамусе и участие их в регулировании энергетического баланса серотонином пока изучено недостаточно. Однако выявлено, что введение антагонистов этого типа рецепторов в паравентрикулярное (Lee et al., 1998; Macor et al., 1990) ядро и парабрахиальное ядро (Lee et al., 1998) вызывает снижение потребления пищи у крыс.



Проекции POMC- и AgRP-нейронов аркуатного ядра приходят в структуры среднего мозга, затрагивая области VTA, SN. Здесь экспрессия MC3R, MC4R и MC1R показана на дофамин- и ГАМК-ергических нейронах (Михрина и др., 2018; Benjamins et al., 2018). Однако не известно об экспрессии этих типов меланокортиновых рецепторов в серотонинергических структурах среднего мозга.

Данные, полученные при изучении крыс с аутоиммунными моделями длительного MC4R-дефицита, указывают на участие 5-HT<sub>1R</sub> во взаимодействии меланокортиновой и серотониновой сигнальными системами. Показано, что тормозные эффекты серотонина и селективного агониста 5-HT<sub>1B</sub>R в мозге крыс, иммунизированных к внеклеточному участку MC4R, заметно снижаются. Поскольку такая иммунизация приводит к снижению MC4R-сигнализации в гипоталамусе, то, по всей видимости, MC4R-зависимые пути осуществляют позитивную регуляцию 5-HT<sub>1B</sub>R-сигнальных каскадов в ЦНС (Шпаков и др., 2015).

Установлено, что введение в желудочки крысам меланотана-II приводит к повышению функциональной активности серотонинергических нейронов, тогда как введение AgRP, антагониста меланокортиновых рецепторов, приводит к ее снижению. Точные пути действия агонистов и антагонистов пока не установлены (Шпаков, Деркач, 2015).

Существует множество данных, свидетельствующих о непосредственном взаимодействии серотониновой и меланокортиновой систем мозга. Они выполняют сходные функции, изменения функционирования одной ведут к изменениям в другой, но ясной картины путей взаимной регуляции этих двух систем до сих пор нет.

#### **1.4. Общая характеристика метаболического синдрома**

Метаболический синдром (МС) – это комплекс метаболических, клинических и гормональных нарушений, в основе которого лежит патологическое ожирение. Во многих странах МС является серьезной медицинской проблемой. Всемирная организация здравоохранения охарактеризовала его как пандемию 21-го века. Развитию МС подвержены люди разных возрастных групп, в том числе дети и подростки. Центральной проблемой этого метаболического расстройства считаются резистентность тканей к инсулину и нарушение обмена глюкозы, окислительный стресс, дислипидемия и липотоксичность (Le Stunff et al., 2013).

МС неотрывно связан с тяжелым хроническим заболеванием – сахарным диабетом второго типа (СД 2-го типа). Исследования последних лет показывают важную роль гормональных факторов в этиологии и патогенезе МС и СД 2-го типа,

поскольку нарушения в гормональных сигнальных системах выявляются уже на стадии ожирения, предиабета и раннего СД 2-го типа (Shprakov et al., 2015). Особую роль здесь играют и гормональные сигнальные системы мозга, которые регулируются инсулином, лептином, нейропептидами и моноаминами, а также взаимодействие между ними (Cole et al., 2007; de la Monte et al., 2010; Shprakov, 2012). Функциональные нарушения в одной сигнальной системе мозга, которые могут быть обусловлены причинами разного генеза, непременно затрагивают и всю сеть сигнальных каскадов мозга, что ведет к изменению центральной регуляции функций периферических тканей, вызывая в них снижение чувствительности к инсулину и другим гормональным регуляторам (Williams et al., 2011).

Важнейшим фактором в развитии патологий при МС является нарушение липидного обмена. Избыточное накопление жиров в периферических тканях ведет к липотоксичности. Насыщенные жирные кислоты, такие как пальмитат, способны связываться с Toll-подобным рецептором 4-го типа (Milanski et al., 2009), что запускает цепь каскадов, приводящих в конечном итоге к активации NF-κB. С одной стороны, это приводит к развитию инсулиновой и лептиновой резистентности. С другой – к наработке провоспалительных факторов IL-1β, TNF-α и IL-6 (Yudkin et al., 1999; De Souza et al., 2005; Zhanget al., 2005; Hommelberg et al., 2009; Lawrence, 2009; Jais, Bruning, 2017), вызывает снижение экспрессии белков плотных контактов и нарушение целостности ГЭБ (Gustafson et al., 2007). Повышение проницаемости ГЭБ способствует проникновению в ЦНС различных токсичных метаболитов, провоспалительных факторов, иммунных клеток и активации микроглии, запуская развитие воспалительных процессов в нервной ткани. Особую роль в нейровоспалительных процессах играют микроглиальные клетки. Микроглиальные клетки появляются на поздних стадиях эмбрионального развития, беря свое начало от миелоидных предшественников, от которых также происходят клетки крови. Поэтому микроглия проявляет множество функциональных и молекулярных свойств, присущих макрофагам из периферических тканей. Они способны пролиферировать, поддерживая свою численность, и перемещаться (Gehrmann et al., 1995; Filiano et al., 2015). Микроглиальные клетки распознают чужеродные агенты с помощью рецепторов на поверхности их мембраны. А также могут выделять большие количества пероксида водорода и NO, способствуя развитию окислительного стресса, что одинаково токсично, как для чужеродных агентов, так и для нейронов (Gehrmann et al., 1995; Aloisi, 2001). Также микроглиальные клетки выделяют специфические протеазы и цитокины, в том числе IL-1β, который способен вызывать демиелинизацию аксонов и

разрушение синаптических связей (Aloisi, 2001). Поэтому в последнее время появляется все больше данных о связи МС с нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Паркинсона, Альцгеймера (Rom et al., 2019; Jayaraj et al., 2020), развитием деменции (Meneilly, Tessier, 2016; Dolan et al., 2020). Также по этим причинам при МС отмечается снижение когнитивных способностей и памяти (Rom et al., 2019).

Одной из самых ранних областей мозга, где начинается нейровоспаление, индуцированное МС, является гипоталамус (Prada et al., 2005). В медиобазальном гипоталамусе, где располагается срединное возвышение, обладающее в норме высокопроницаемыми капиллярами, в ответ на провоспалительные факторы, приходящие от периферических тканей, наблюдается наиболее стремительное увеличение количества микроглиальных клеток и их активация (van Dyken, Lacoste, 2018). Поражение главного регуляторного центра энергетического обмена приводит к усугублению лептиновой и инсулиновой резистентности и прогрессированию ожирения (Jais, Bruning, 2017; van Dyken, Lacoste, 2018).

Паталогические процессы в ЦНС при МС приводят к стрессу эндоплазматического ретикулума (СЭР) в нейронах, для которого характерны нарушения процессов конформационного созревания белков в эндоплазматическом ретикулуме и их посттрансляционной модификации, ослабление или полная потеря активности дефектных белков, что выражается в паталогических изменениях фундаментальных клеточных процессов (Zhang et al., 2008). Хронический СЭР в гипоталамусе, индуцируемый избыточным потреблением пищи, вызывает снижение чувствительности мозга и периферических тканей к инсулину и лептину, что характерно для предиабета и ранних стадий МС (Zhang et al., 2008; Ozcan et al., 2009).

Нейровоспалительные процессы и СЭР в мозге приводят к нарушению функционирования как гипоталамических сигнальных систем, так и других систем мозга, а также разбалансируют интегративные взаимодействия между ними.

При метаболическом синдроме в клетках различных органов изменяется активность Akt1-киназы – внутриклеточного фермента, члена семейства протеинкиназ В. Этот фермент 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). Akt1 в качестве субстрата имеет более 100 белков-мишеней, и вызывает разнообразные эффекты при взаимодействии с ними, включая их активацию, инактивацию, изменение внутриклеточной локализации и стабильности. Ранее считалось, что для всех

известных форм Akt субстраты одинаковы, однако сейчас известно, что именно Akt1 фосфорилирует белки, отвечающие за рост и выживание клеток (Hers et al., 2011). Показано, что при нейровоспалении Akt1 активируется через рецепторы к нейротрофическому фактору мозга (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF), и, посредством фосфорилирования ряда белков, стимулирует трансляцию и наработку этого фактора. BDNF является важным фактором поддержания жизнедеятельности нейронов и их пластичности (Giacobbo et al., 2019). Также активация Akt1-mTOR пути происходит при связывании MC1R со своим лигандом, что увеличивает выживаемость клеток в условиях окислительного стресса (Cheng et al., 2014; цит. по: Rodrigues et al., 2014). Также при связывании инсулина с собственным рецептором, происходит активация IRS-1 (insulin receptor substrate) белка путем его фосфорилирования, что запускает фосфорилирование Akt1. Показано, что Akt1 участвует в активации путей, ведущих к транскрипции и интеграции в мембрану транспортера глюкозы 4 (GLUT4), что стимулирует энергетический метаболизм и выживание клеток (Liu et al., 2017). Таким образом, Akt1 участвует в регуляции разнообразных внутриклеточных каскадов, в том числе и в клетках мозга при метаболическом синдроме, и изучение ее активности при данной патологии на сегодняшний день представляет большой интерес.

#### **1.4.1 Меланокортиновая система гипоталамуса при метаболическом синдроме**

Регуляция энергетического баланса требует слаженного функционирования нейронов гипоталамуса, которые чутко улавливают периферические сигналы и регулируют пищевое поведение и состояние метаболизма. Однако, как мутации в генах, кодирующих элементы меланокортиновой системы, так и дисфункции периферических тканей и органов, а также изменение пищевых привычек могут приводить к развитию метаболического синдрома (Valdearcos et al., 2017).

Рассогласование функционирования элементов меланокортиновой системы и изменение ее активности влекут за собой развитие разного рода патологий (Nargund et al., 2006). Активация MC4R улучшает функции ЦНС, в основе чего лежит нейропротекторное действие агонистов MC4R. Показано, что  $\alpha$ -МСГ и другие природные или синтетические лиганды меланокортиновых рецепторов защищают белок I $\kappa$ B $\alpha$  от фосфорилирования и, следовательно, ингибируют активацию NF- $\kappa$ B в периферических тканях и в головном мозге, что так же лежит в основе противовоспалительного механизма (Catania, 2007). Было показано увеличение уровня фосфорилированного NF- $\kappa$ B в отсутствие MC1R, что указывает на то, что этот рецептор вовлечен в противовоспалительные эффекты благодаря подавлению активации NF- $\kappa$ B

(Li, Taylor, 2008). Также  $\alpha$ -МСГ и производные от него пептиды способны увеличивать адаптивную пластичность, стимулировать регенерацию нейронов и глии (Tatro, 2006).

Установлено, что МС4R играют важную роль в адаптации к высокожировой диете. У мышей с нормальной экспрессией МС4R повышение доли жира в пищевом рационе приводит к ограничению потребления пищи и повышению двигательной активности. Тогда как у мышей, нокаутных по МС4R, повышение содержания жира в пище не приводит к снижению ее потребления, а также у них отмечается нарушение термогенеза, что связывают с нарушением липолиза в бурой жировой ткани. Все это приводит к повышению массы тела и жировой ткани в ответ на жирную диету (Butler et al., 2001).

Инактивирующие мутации в гене, кодирующем POMC, и нарушения процессинга этого прогормона приводят к раннему началу ожирения, гиперфагии, а также ассоциировано с рыжей окраской волос, нарушениями функций гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы (Challis et al, 2002; Lee et al., 2006).

Для мышей, нокаутных по гену МС3R, характерно умеренное ожирение, снижение мышечной массы, гиперлептинемия и гиперинсулинемия, но при этом у отсутствует гипергликемия (Butler et al., 2000; Chen et al., 2000). При нокауте гена МС3R пищевое поведение в значительной степени определяется характером диеты, возрастом и полом животных (Butler et al., 2000; Chen et al., 2000; Sutton et al., 2008).

Паталогические процессы, приводящие к МС и предиабетическим состояниям, также могут запускаться аутоиммунными расстройствами, при которых происходит выработка антител к элементам меланокортиновой системы: как к ее рецепторам, так и к пептидам (Fetissov et al., 2002; Шпаков, Деркач, 2015). Роль МС3R и МС4R в этиологии и патогенезе МС и СД 2-го типа наглядно демонстрируется в экспериментах с использованием аутоиммунных моделей, в которых вызывают иммунизацию экспериментальных животных пептидам, структурно соответствующим внеклеточным петлям МС3R и МС4R. Антитела, вырабатываемые против этих пептидов, изменяют активность МС3R и МС4R и нарушают функционирование меланокортиновой системы мозга (Шпаков, Деркач, 2015).

#### **1.4.2. Серотониновая система мозга при метаболическом синдроме**

Серотониновая система мозга также участвует в поддержании энергетического баланса организма и регуляции пищевого поведения. У пациентов с МС и диабетом 2-го типа показано снижение уровня свободного триптофана (аминокислоты – предшественника синтеза серотонина) в ЦНС. Снижение концентрации самого

серотонина и его метаболизма, происходящей вследствие изменения активности ТПГ2, ведет к нарушениям сигналинга серотонина в мозге, изменениям количества 5-HT<sub>2</sub> и их аффинности, и рассогласованию серотонин-опосредованной регуляции периферического метаболизма и инсулиновой чувствительности (Muldoon et al., 2004; Kloiber et al., 2010; Herrera-Marquez et al., 2011).

Данные о дефиците 5-НТ в головном мозге пациентов с диабетом позволяют предположить, что повышение уровня серотонина в ЦНС является действенным методом для нормализации пищевого поведения, расхода энергии, гликемического контроля и чувствительности к инсулину при диабете. Это подтверждается результатами лечения пациентов с депрессией с использованием селективных ингибиторов обратного захвата серотонина. При таком лечении наблюдается снижение массы тела, нормализация уровня глюкозы, снижение уровня гликозилированного гемоглобина в крови, улучшение чувствительность к инсулину, а также предотвращается развитие неврологических расстройств. Отмечено, что после длительного введения интраназально инсулина самкам крысы с неонатальным СД2 отмечается выравнивание метаболических параметров и когнитивные функции, а также восстановление чувствительности к инсулину (Goodnick et al., 2001; Lustman et al., 2005; Zhou et al., 2007; Shpakov et al., 2012).

Существует множество доказательств, что ослабление сигналинга 5-HT<sub>2C</sub>R ведет к набору массы тела, нечувствительности к глюкозе, гиперфагии, расстройству пищевого поведения, и меланокортиновая система гипоталамуса, тесно связанная с 5-HT<sub>2C</sub>R, участвует в этих метаболических и поведенческих изменениях. На мышцах с МС показано, что лечение их агонистами 5-HT<sub>2C</sub>R увеличивает чувствительность к глюкозе и снижает содержание инсулина в крови. МС4R и 5-HT<sub>2C</sub>R колокализированы в нейронах ARC гипоталамуса, и вместе непосредственно участвуют в воздействии агонистов 5-HT<sub>2C</sub>R на чувствительность к инсулину. 5-HT<sub>1</sub>R также имеют влияние на пищевое поведение (Simansky et al., 2002; Shpakov, Derkach, Bershtein, 2015).

Таким образом, взаимодействие между МС4R- с 5-HT<sub>1</sub>R- и 5-HT<sub>2C</sub>R- 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). Однако механизмы взаимодействия между компонентами меланокортиновой и серотониновой систем при метаболических нарушениях требуют более детального исследования.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Экспериментальные животные и экспериментальные модели

Все эксперименты проводили в соответствии с правилами, разработанными Комитетом по биоэтике ИЭФБ РАН, правилами и требованиями, изложенными в документах “European Communities Council Directive (2010/63/ЕЕС) и правилами, изложенными в “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”. На проведение экспериментов получено разрешение Комитета по биоэтике ИЭФБ РАН. 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 (боль, дискомфорт, страх и др.) животных до, в процессе и после проведения эксперимента).

В экспериментах использованы:

1. Самки мышей C57Bl/6J двух генотипов: a/a (5, 6 и 8 мес.) и Ay/a (Agouti yellow, 5 мес.).
2. Крысы неинбридной линии Вистар (половозрелые самцы 5 мес.).

#### 2.1.1. Диета-индуцированное ожирение у мышей и крыс

Для проведения эксперимента были взяты самцы крысы линии Вистар и самки мыши линии C57Bl/6J (a/a), которые на протяжении всего эксперимента находились в стандартных условиях вивария при 12–часовом световом режиме (12ч свет/12ч ночь, световой день начинался в 9.00, температура 23±2°C).

Крысы экспериментальной группы (n=15) с 26–дневного возраста содержались на кафетерий–диете, которая включала жировую смесь (52 % свиного сала) как добавку к стандартному сухому корму (19 % белка, 5 % жира, 4 % волокон, 9 % золы), а также 30%–ный раствор сахарозы вместо питьевой воды. Через 12 недель диеты у крыс развивалось диета–индуцированное ожирение (ДИО), которое определяли по метаболическим показателям (Romanova et al., 2018). Животные контрольной группы (n=15) того же пола и возраста, что и экспериментальные, вместо кафетерий–диеты получали только стандартный сухой корм и воду.

Мышей линии C57Bl/6J (a/a) экспериментальной группы с 4–х месячного возраста содержали на высококалорийной диете, аналогичную диете крыс группы ДИО. Продолжительность диеты составляла 8 недель (ДИО8, n=13) и 16 недель (ДИО16, n=13). Животные контрольных групп того же возраста в течение 8 (n=13) и 16 (n=13) недель соответственно получали стандартный корм и воду.

### **2.1.2. Меланокортиновое ожирение - мыши *Agouti yellow*, генотип *Ay/a*, генетически предрасположенные к ожирению**

Для эксперимента использованы самки мышей C57/6J двух генотипов: *a/a* и *Ay/a*. Мыши обеих групп одинакового возраста и веса (12–13 г) были доставлены из вивария Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск) и адаптированы к условиям вивария ИЭФБ им. И.М. Сеченова РАН. Генотип *Ay/a* характеризуется доминантной (спонтанной) мутацией гена Агути и развитием меланокортинового ожирения (МО) после 10–ти недельного возраста. Таким образом, мыши *Ay/a* постепенно набирают массу тела и отличаются по весу от мышей дикого типа (*a/a*) того же возраста. Для исследования были использованы 5–ти месячные мыши *a/a* (22–25 г;  $n=13$ ) и *Ay/a* (36–40 г;  $n=21$ ).

### **2.1.3. Исследование метаболических параметров**

У мышей и крыс определяли массу тела (г.). Перед экспериментом были проведены глюкозотолерантный тест (ГТТ) и инсулин глюкозотолерантный тест (ИГТТ). 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)» ( $AUC_{0-120}$ ), как описано ранее (Romanova et al., 2018), что позволяет судить о развитии толерантности к глюкозе.

В ИГТТ, который производился за 10 дней до декапитации, инсулин (Humalog, 0.8 IU/кг массы тела животного) и глюкозу (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. Оценивали площадь под кривой для глюкозы и инсулина от 0 до 120 мин ( $AUC_{0-120}$ ), как описано ранее (Derkach et al., 2015). Результаты ИГТТ позволяют оценить развитие толерантности к глюкозе и инсулину.

У животных во время эксперимента оценивали массу жировой ткани (г). Кровь для измерения метаболических параметров забирала из сердца, отстаивали при +4° С, центрифугировали при комнатной температуре (при 8000 g) и отбирали сыворотку, которую замораживали при -80° С.



## 2.2. Обработка материала

Уровни инсулина и лептина в сыворотке крови определяли с помощью наборов «Mouse Insulin ELISA» или «Rat Insulin ELISA» (Merckodia AB, Швеция) и «ELISA Kit for Leptin» (Cloud-Clone Corp., США). Уровни общего холестерина (ОХ) и триглицеридов (ТГ) определяли с помощью колориметрических методов с использованием наборов «Olvex Diagnosticum» (Россия).

**Фиксацию мозга** для иммуногистохимических методов исследования проводили с помощью транскардиальной перфузии. Через сердце по кровяному руслу посредством перфузионного насоса пропускали 0.1 М Na<sup>+</sup>-фосфатный буфер (PB, pH 7.4) и раствор 4%-ного параформальдегида в 0.2 М PB. Мозг извлекали, дофиксировали в течение ночи в том же фиксаторе (+4° С) и после криопротекции в 30%-ном растворе сахарозы, растворенной в 0.02 М PB с 0.9 % NaCl (PBS), замораживали в изопентане (Sigma, США) при - 42° С (на сухом льду) и хранили при - 80° С.

Для иммуногистохимических исследований с помощью криостата (Leica, Германия) были приготовлены чередующиеся серии фронтальных срезов мозга мыши (16 мкм) и крысы (20 мкм). Каждый 11 срез монтировали на стекла Superfrost/plus (Menzel, Германия) или накапливали в холодном PBS для реакций на свободноплавающих срезах, которые начинали в этот же день. С помощью бинокулярной лупы выбирали срезы, соответствующие необходимой для изучения структуре, руководствуясь атласами мозга крысы (Paxinos, Watson, 1998) или мыши (Paxinos, Franklin, 2001). Стекла с монтированными срезами хранили при - 20° С. Накануне проведения иммуногистохимической реакции стекла высушивали при комнатной температуре в течение ночи.

**Приготовление проб** для определения серотонина в ткани проводили по протоколу, описанный ранее (Lambertsen et al., 2012). Замороженную ткань гипоталамуса взвешивали и погружали в 4 объема водного раствора холодной перхлорной кислоты (0.1 М). После гомогенизации и центрифугирования 10 мин при +4° С (12000g) надосадок переносили в пробирки – эппендорфы, которые находились на сухом льду. Пробы хранили при - 86° С до определения серотонина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

**Экстрагирование общей РНК** проводили по протоколу, предложенному производителем реактивов (TRI Reagent–Protocols). Замороженную ткань мозга взвешивали и погружали в реагент TRI Reagent (Mol. Research Cen. Inc., США) из расчета 1 мл реагента на 50–100 мг ткани. Гомогенат выдерживали 5 мин при

комнатной температуре, центрифугировали 10 мин при + 4°C (12000g) и отделяли надосадов, в который добавляли хлороформ, стабилизированный этанолом, (0.2 мл на 1 мл TRI Reagent), хорошо взбалтывали на вортексе и выдерживали при комнатной температуре 2–3 мин. Затем пробирки центрифугировали + 4° С (12000g) 15 мин., что приводило к разделению содержимого в пробирках на 3 слоя. Была отобрана верхняя (прозрачная) водная фаза, в которую добавляли 0.5 ml изопропанола, взбалтывали и инкубировали 5 – 10 минут при комнатной температуре, центрифугировали 10 минут при + 4° С (12000g). Надосадов аккуратно сливали так, что осадок, который плотно прилипал к стенке микропробирки, был виден и оставался на месте. Затем к осадку добавляли 1 мл 75% холодного этанола, после чего образцы с РНК либо переносили на – 25° С (и хранили до растворения РНК), либо обрабатывали дальше по протоколу. Центрифугировали 5 мин при 7500 g (+4° С), сливали этанол, добавляли новую порцию чистого 75% этанола, взбалтывали на вортексе и центрифугировали 5 минут при 7500 g (+4° С). В стерильном обработанном УФ ламинаре из микропробирок тщательно сливали этанол и образцы подсушивали на воздухе 5–10 минут. Далее к образцам добавляли DEPC–воду, тщательно перемешивали с помощью дозатора, каждую пробу разделяли на несколько порций по 10 мкл и хранили при –86° С. Для определения концентрации общей мРНК использовали спектрофотометр «Implen NanoPhotometer P330» (Implen, Германия), чувствительность которого позволяет в 1 мкл определить количество РНК в нанограммах. Измерения проводили в интервале поглощения нуклеиновыми кислотами света длиной волны 260/ 280нм, чистоты РНК считалась чистой при соотношении D260/D280,  $\geq 1,6$ .

**Приготовление проб для Вестерн–блоттинга.** Замороженную ткань гипоталамуса взвешивали, размораживали и гомогенизировали в десятикратном растворе лизирующего буфера (0.02M TRIS (hydroxymethylami–nomethane), 0.15M NaCl, 0.001M EDTA, 1% Triton X–100, pH 7.5), в который добавляли коктейль ингибиторов протеаз (Sigma, США) и ингибиторов фосфотаз (PhosStop) согласно инструкции производителя (RocheDiagnostic, Канада). После центрифугирования в течение 15 мин (12000g) убирали осадок и проводили выравнивание белка в лизате методом Бредфорд. Два объема лизата разводили одним объемом подогретого 3–х кратного SDS–буфера (6% SDS – sodium dodecyl sulfate, 0.2M 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. Готовые пробы хранили при – 25° С.

## 2.3. Иммуногистохимические методы

### 2.3.1. Биотин–стрептавидиновый метод

Иммуногистохимический метод с использованием немеченых антител и иммуногистохимические реакции проводили по общепринятой методике (Хернет, Гаттер, 1999). После предварительной промывки в PBS и в ряде случаев, при проведении реакции на срезах, монтированных на стекла, кроме срезов мозга эмбрионов, проводили демаскировку антигена кипячением 2–3 мин в растворе цитрата натрия (рН 6.0). После охлаждения до комнатной температуры проводили промывку в нескольких порциях PBS и PBS с 0.1% TRITON X–100 (PBST). Затем проводили 30 мин блокировку эндогенной пероксидазы 0.3 % раствором перекиси водорода на PBST. После нескольких промывок в PBST была проведена блокировка неспецифического связывания при комнатной температуре 1 час в 5%–ном блокирующем растворе, содержащем 2% бычий сывороточный альбумин и 3 % нормальную сыворотку козы, разведенные на PBST. Затем при + 4°C в течение 48 ч были проведены инкубации с первичными антителами, соответствующими выявляемому антигену (табл. 1). После инкубации и тщательной промывки в PBST в течение 1 ч срезы инкубировали при комнатной температуре в соответствующих вторичных антителах, конъюгированных с биотином (табл. 1).

**Таблица 1.** Комбинации антител, использованные для проведения иммуногистохимических реакций с помощью биотин–стрептавидинового метода.

Антиген	Первичные антитела (хозяин, концентрация, фирма–производитель)	Вторичные антитела (хозяин, концентрация, фирма– производитель)
триптофангидроксилаза-2	кролик, 1:1000, Millipore, США	Овца против Ig кролика, конъюгированные с биотином, 1:300; VectorLabs., Великобритания
фосфо-(сер-19)трипто- фангидроксилаза-2	кролик, 1:400, Affinity Biosciences, США	
РОМС	мышь, 1:1000, Abcam, Великобритания	овца против Ig мыши, конъюгированные с биотином, 1:300; VectorLabs., Великобритания

После промывки в PBS срезы на 1 ч при комнатной температуре помещали в раствор стрептовидин–пероксидазы (BioLegend, США), разведенной на PBS 1:700. Во всех случаях для визуализации пероксидазы использовали 0.05% раствор диаминобензидина с 0.03 % перекисью водорода на PBS. Реакцию контролировали с помощью бинокулярной лупы до появления фонового окрашивания (время реакции составляло 8–12 мин). Срезы промывали дистиллированной водой. Далее стекла

подвергали стандартной гистологической обработке, заключали в прозрачную среду Bio-Mount (Bio-Optica, Италия) и высушивали. Специфичность окраски проверяли с помощью негативного контроля (без первых антител). Позитивным контролем считали выявление белков в структурах, ранее описанных в литературе.

### 2.3.2. Одиночное флуоресцентное иммуномечение

Исследования проводили на срезах, монтированных на стекла, которые предварительно были высушены при комн. температуре. После промывки в PBS и демаскировки антигена кипячением 5 мин. в растворе цитрата Na (pH 6.0) стекла охлаждали до комнатной температуры, промывали 30 мин. в PBST и обрабатывали раствором 100 мМ глицина, растворенного на PBS, 30 мин. и 1 ч инкубировали в 5% блокирующем растворе (смесь сывороток: 2% козы и 3% быка, растворенные на PBST). Затем проводили инкубацию в первичных антителах (**табл. 2**), которые разводили в 2% блокирующем растворе. Инкубацию проводили при +4° С 48–72 ч. во влажной камере. После тщательной промывки в PBS в течение 1 ч. при комнатной температуре проводили инкубацию (при затемнении) в смеси соответствующих вторичных антител, конъюгированных с флуоресцентной меткой (**табл. 2**). После тщательной промывки в

**Таблица 2.** Комбинации антител, использованные для одиночного флуоресцентного иммуномечения.

Антиген	Первичные антитела (хозяин, концентрация, фирма–производитель)	Вторичные антитела (хозяин, концентрация, фирма–производитель)
триптофангидроксилаза-2	кролик, 1:1000, Millipore, США	цыпленок против Ig кролика, конъюгированные с Alexa- 488, 1:1000; Invitrogen, США
Iba1	кролик, 1:500, Novusbio., США	
MC1R	кролик, 1:1000, Elabscience, США	

PBS на срезы наносили ядерный краситель DAPI (Sigma, США, 1:2000), промывали в PBS, заключали с помощью среды Mowiol под покровное стекло и хранили при +4° С до полимеризации. Для контроля специфичности реакции проводили реакции без соответствующих первых или вторичных антител.

### 2.3.3. Двойное флуоресцентное иммуномечение

Для исследования распределения двух веществ одновременно в структурах мозга и их колокализации мы использовали общепринятый метод «коктейля» (Хернет, Гаттер, 1999). Свободноплавающие срезы или стекла с монтированными срезами

(после демаскировки антигена) после тщательной промывки в PBS и PBST 30 мин обрабатывали раствором 100 мМ глицина на PBS, 1 ч инкубировали в 5% блокирующем растворе (смесь сывороток: 2% козы и 3% быка, растворенные на PBST) и инкубировали в смеси двух первичных антител (**табл. 3**), которые разводили в 2%

**Таблица 3.** Комбинации антител, использованные для двойного флуоресцентного иммуномечения.

Комбинация антигенов	Первичные антитела (хозяин, концентрация, фирма– производитель)	Вторичные антитела (хозяин, концентрация, фирма– производитель)	
<b>РОМС</b>	мышь, 1:1000; Abcam, Великобритания	цыпленок–против Ig кролика, конъюгированные с Alexa–488, 1:1000; Invitrogen, США + осел–против Ig мыши, конъюгированные с Alexa–568, 1:1000; Invitrogen, США	
+ <b>MC1R</b>	кролик, 1:200; Elabscience Biotechnology Ltd., США		
+ <b>тирозингидроксилаза</b>	кролик, 1:2000, Abcam, Великобритания		
+ <b>триптофангидроксилаза-2</b>	кролик, 1:1000; Millipore, США		
+ <b>5-HT<sub>1B</sub></b>	кролик, 1:100; USBiologicals, США		
+ <b>5-HT<sub>2C</sub></b>	кролик, 1:100; Elabscience Biotechnology Ltd., США		
<b>MC1R</b>	кролик, 1:300, Elabscience Biotechnology Ltd., США		
+ <b>вазопрессин</b>	мышь, 1:1000, НИИ, США		
+ <b>GAD65</b>	мышь, 1:1000; Abcam, Великобритания		
+ <b>орексин-А</b>	мышь, 1:1000; R&Dsystems, США		
<b>триптофангидроксилаза-2</b>	кролик, 1:1000; Millipore, США		
+ <b>BDNF</b>	мышь, 1:300, Abcam, Великобрит.		
<b>GAD65+</b> <b>GAD67</b>	мышь, 1:1000, Abcam, Великобритания; мышь, 1:1000, Millipore, США		
+ <b>MC3R</b>	кролик, 1:100, Sigma, США		
+ <b>MC4R</b>	кролик, 1:100, PhoenixIncorp., США		
+ <b>триптофангидроксилаза-2</b>	кролик, 1:1000; Millipore, США		
+ <b>вазопрессин</b>	мышь, 1:1000, НИИ, США		
+ <b>тирозингидроксилаза</b>	мышь, 1:2000, Sigma, США		
<b>5-HT</b>	коза, Immunostar, США		коза–против Ig овцы, конъюгированные с Alexa–543, 1:1000; Invitrogen, США + цыпленок–против Ig кролика, конъюгированные с Alexa–488, 1:1000; Invitrogen, США
+ <b>MC1R</b>	кролик, 1:300, Elabscience, США		
+ <b>фосфо(серин-19) триптофангидроксилаза-2</b>	кролик, 1:300 Affinity Biosciences, США		
+ <b>Akt1(total)</b>	кролик, 1:200, Cell Signaling Technology, США		
+ <b>фосфо(серин-473)Akt1</b>	кролик, 1:200, Cell Signaling Technology, США		
<b>триптофангидроксилаза-1</b>	овца, 1:500; Millipore, США		
+ <b>MC3R</b>	кролик, 1:100, Sigma, США		
+ <b>MC4R</b>	кролик, 1:100, PhoenixIncorp., США		

блокирующем растворе. Инкубацию проводили при + 4° С 48–72 ч. После тщательной промывки в PBS в течение 1 ч. при комнатной температуре проводили инкубацию (при затемнении) в смеси соответствующих вторичных антител, конъюгированных с различными флуоресцентными метками (табл. 3). После тщательной промывки в PBS свободноплавающие срезы натягивали на стекла и подсушивали. В ряде случаев дополнительно наносили в течение 2 мин ядерный краситель DAPI (Sigma, США, 1:2000) и промывки в PBS. Стекла со срезами заключали с помощью среды Mowiol под покровное стекло и хранили при + 4° С до полимеризации. Для контроля специфичности реакции проводили реакции без соответствующих первых или вторичных антител.

#### **2.4. Вестерн-блоттинг**

В день проведения электрофореза пробы размораживали, центрифугировали и разводили в SDS-буфере (к 300 мкл 6% sodium dodecyl sulfate, 0,2M TRIS-HCl, 15% глицерин, 3% бромфеноловый синий, добавляли 900 мкл дистиллированной воды и 30 мкл β-меркаптоэтанол, pH 6,7). Затем пробы нагревали в течение 5 минут при 95°С, после чего их сразу же охлаждали на льду. Белки в пробах разделяли с помощью электрофореза в 10% бис-АА акриламидном геле по Лэммли (SDS-PAGE, Laemmli, 1970), использовали оборудование для Вестерн-блоттинга (Bio-Rad Laboratories, США). Из каждой пробы для электрофореза брали по 5 – 15 мкл, а в первую лунку помещали 5 мкл окрашенного маркера молекулярного веса (prestained protein molecular weight marker; Fermentas, США). Разделение белков проводили сначала при напряжении 80 В, а через 15–20 мин увеличивали до 130 В. Гель с белковыми фракциями переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham, Великобритания) в течение 1 ч. Из мембраны белковым маркерам вырезали полоски, соответствующие молекулярному весу белка-интереса (согласно документам фирмы-производителя антител). Полоски мембран после блокировки 30 мин. в 4% блокирующем растворе (сухое молоко, разведенное на TRIS – buffer saline с 0.1 % Tween-20 – TBST, pH 7,6). Мембраны инкубировали в течение ночи при + 4°С в первичных антителах, соответствующих выявляемому антигену (табл. 4). Далее после промывки в нескольких порциях TBST проводили инкубацию в соответствующих вторичных антителах (при комнатной температуре 1 ч), конъюгированных с пероксидазой хрена, разведенные на 4% блокирующем растворе (табл. 4). Визуализацию сигнала проводили с помощью хемилюминисцентной системы ECL-Prime и рентгеновской пленки

(Amersham, Великобритания), которую проявляли стандартным фотонабором (Реактив–фото, Россия). Для каждого белка подбирали несколько экспозиций.

**Таблица 4.** Комбинации антител, использованные для Вестерн–блоттинга.

Антиген	Первичные антитела (хозяин, концентрация, фирма, производитель)	Вторичные антитела (хозяин, концентрация, фирма, страна)
GAPDH, Mr=37 кД	мышь, 1:20000, Abscam, Великобритания	Коза против Ig мыши, конъюгированные с пероксидазой, 1:20000; Sigma, США
триптофангидроксиаза-2, Mr=56 кД	кролик, 1:2000, Millipore, США	Коза против Ig кролика, конъюгированные с пероксидазой 1: 5000-10000; Sigma, США
5-HT <sub>1B</sub> Mr=45 кД	кролик, 1:1000, US Biological, США	
5-HT <sub>2C</sub> Mr=52 кД	кролик, 1:1000, Elabscience Biotechnology Ltd., США	
MC1R Mr=36 кД	кролик, 1:500, Elabscience Biotechnology Ltd., США	
АКТГ(1-24) Mr=17 кД	кролик, 1:2000, Millipore, США	
Iba1, Mr=17 кД	кролик, 1:500, Novusbio., США	

## 2.5. Метод обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени

Был использован метод обратной транскрипции (ОТ) и ПЦР в реальном времени. Методические рекомендации для работы этим методом даны в пособиях (Ребриков, и др., 2009; Зорина В.В., 2012). ОТ проведена по протоколу и набором реактивов фирмы-производителя ОТ MMLV RT kit SK021 (Evrogen, Москва). В качестве праймера–затравки использовали random (dT). В пробах объемом 25 мкл содержалось 1µг тотальной РНК. Полученную ОТ (с кДНК) хранили при – 80° С и использовали для ПЦР в реальном времени. Характеристики подобранных праймеров для ткани крысы и мыши приведены ниже (табл. 5 и 6).

Главными критериями в выборе праймеров для ПЦР был низкий коэффициент самокомплементарности, процент GC повторов не больше 45%, температуры плавления не меньше 55 °С. Для ПЦР были использованы праймеры, подобранные с помощью программы Primer Blast и различных литературных источников. Синтез прямого (F, forward) и обратного (R, reverse) праймеров проведен фирмой Evrogen (табл. 5, 6). В качестве контрольных генов для крысы был использован ген *Gapdh*, а для мыши - *hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (Hprt1)*, который, является наиболее стабильным у грызунов (Pazos et al., 2014) и ген, кодирующий *18s* рибосомальную РНК. Каждая пара праймеров перед постановкой ПЦР в эксперименте была проверена на эффективность, для чего

проводили ПЦР в реальном времени с последовательным десятикратным разведением кДНК в пробах и последующим построением стандартной кривой данных. Непосредственно перед проверкой приготавливали рабочие–стоковые растворы праймеров (100 мкМоль).

**Таблица 5.** Характеристики праймеров крысы, использованных для ПЦР в «реальном времени» (5'–3').

Ген	Положение	Последовательность	Длина продукта, пн	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	TCCGGTCTCCTGTGTACGT	51	NM_022225.1
	R	GGCGTCTGAGACTCGCACTT		
<i>5-Ht2c</i>	F	CGAGTCCGTTTCTCGTCTAGCT	98	NM_012765.3
	R	TTGGCCTATGCTTGCAGGTA		
<i>Gapdh</i>	F	GTGTCCTACCCCAATGTATCC	74	NM_017008.4
	R	GATGTCATCATACTTGGCAGGTTT		

Реакции проводили в планшетах для ПЦР, каждую пробу повторяли 3 раза. ПЦР амплификация проводилась в объеме 25 мкл содержащих 40 нг ОТ-продукта (при определении экспрессии гена *Trh2* в гипоталамусе использовали 80 нг), 0.4 мкМ прямого и обратного праймера и реагент qPCRmix–HS SYBR LowROX (Евроген, Москва, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Каждый цикл реакции (всего 40 циклов) состоял из четырех этапов и подбирался по литературе: предварительная денатурация 5 мин при 95° С, далее денатурация 40 секунд при 95° С, отжиг с праймерами в течение 10 сек (или 30 сек) при 55-59° С (в зависимости от характеристик праймера), стадия наращивания продукта 35 сек при 75° С. Так как для детекции продукции был использован интеркалирующий краситель SYBR



Green, то на последнем этапе цикла делали кривую плавления конечного продукта реакции 40 минут при 95° С и 57° С. В качестве негативного контроля для обратной транскрипции служили пробы с мРНК, но без фермента обратной транскриптазы, а для контроля самой ПЦР служили пробы с праймером, но без продукта обратной транскрипции.

**Таблица 6.** Характеристики праймеров мыши, использованных для ПЦР в «реальном времени» (5'-3')

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_0012718 06.1
	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	AGCCGACCGGTTCTGTTCAT	72	NM_013556.2
	R	GGTCATAACCTGGTTCATCAC		
<i>18S</i>	F	GGGAGCCTGAGAAACGGC	68	NR_003278.3
	R	GGGTCGGGAGTGGGTAATTT		

Аmplификационный сигнал был детектирован прибором 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,

при котором определяется значение порогового цикла реакции  $C_t$ , как точки пересечения графика накопления ДНК–продукта и пороговой линии. Далее по формулам 1 и 2 высчитывалось  $\Delta\Delta C_t$ , а по конечной формуле 3 для каждого гена определяли количество конечного продукта, выраженное в относительных единицах (RQ – relative quantity – количество мРНК гена интереса относительно референсного гена):

1)  $\Delta C_t$  образца интереса =  $C_t$  целевого гена –  $C_t$  эндогенного контроля;  $\Delta C_t$  контроля =  $C_t$  целевого гена –  $C_t$  эндогенного контроля;

2)  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$  образца интереса –  $\Delta C_t$  контроля

3)  $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$

После детектирования сигнала контроль качества ПЦР-продукта проводили с помощью электрофореза в 30%-ном агарозном геле. Первую лунку в геле заполняли маркером молекулярного веса ДНК (Синтол, Россия), остальные лунки заполняли 10 мкл продукта-ПЦР (выбирали продукт из одной лунки триплета) с бромистым этидием. Свечение продукта в геле анализировали с помощью УФ-лампы оборудования хемидок (Biorad, Великобритания).

## 2.6. Получение изображений и их анализ

Изображения изучаемых структур мозга в проходящем свете были получены с помощью микроскопа Carl Zeiss (Германия) со встроенной видеокамерой Imager 4.1, программного обеспечения для захвата изображения AxioVision– 4.7.2. (в .jpg или .tiff форматах). На снимках проводили оценку оптической плотности иммунопозитивного материала в программе Image J (НИН, США) или Photo–М (Черниговский, [http:t\\_lambda.chat.ru](http:t_lambda.chat.ru)). Интенсивность реакции на участках мозга (в нейронах, отростках), содержащих иммунопозитивное вещество в изучаемой структуре, оценивали по сравнению с интенсивностью фоновой реакции. На каждом снимке (стандартная площадь) обводили все иммунопозитивные нейроны (35–50). Для каждого животного в анализируемой структуре оценивали 8–12 снимков. Оптическая плотность рассчитывалась как средний десятичный логарифм отношения яркости фона к яркости точки объекта и площади объекта и выражены в условных единицах (у.ед.). Обращали внимание на распределение иммунопозитивного вещества в структурах.

Анализ препаратов с двойным мечением проводили с помощью микроскопа DMI6000 и лазерной сканирующей конфокальной установки Leica TCS SP–II («Leica Microsystems», Германия) или мультифотонной установки. Проводили последовательное сканирование с помощью иммерсионного объектива х63 и лазеров с

длиной волны возбуждения 488, 568 или 543 нм (а также 355 нм для DAPI). Количественный анализ флуоресцентного изображения (Füzesi, et al., 2007) анализировали с помощью пакета программ Leica LAS AF Lite. На снимках (10–12), полученных при одинаковых оптических установках в наиболее интенсивной области свечения по Z–позиции конфокального микроскопа, обводили тела иммунопозитивных нейронов и копировали Exel–файлы с характеристиками gray values для каждого исследованного канала, значения которых делили на уровень соответствующего фона и вычисляли среднее для каждого среза. Подготовку микрофотографий к демонстрации проводили с помощью программы Photoshop CS3.

## **2.7. Определение уровня серотонина и его метаболита в ткани**

Концентрации серотонина, метаболита серотонина – 5–гидроксииндолуксунной кислоты (5–ГИУК), определяли методом обращеннофазной высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией на хроматографе Beckman Coulter (США) (Krasnova, et al., 2000). Хроматографическая 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 минут. Конечная концентрация была выражена в процентах относительно контрольного уровня.

## **2.8. Статистический анализ результатов**

Статистический анализ данных биохимических и иммуногистохимических исследований проводили в программе 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–критерий Манна–Уитни. В случае нормального распределения сравнение двух независимых групп проводили с помощью t–критерия Стьюдента, при уровне значимости  $p < 0.05$  отличия считались достоверными.

Результаты Вестерн–блоттинга анализировали с помощью t–критерия Стьюдента и представлены как среднее оптической плотности  $\pm$  стандартная ошибка ( $mean \pm sem$ ) в условных единицах (у.ед.).

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.). Количество животных указано как *n*, однако при анализе иммуногистохимических данных от каждого животного получали 8-10 снимков анализируемой структуры (пункт 2.6).

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  $\text{mean} \pm \text{sem}$ .

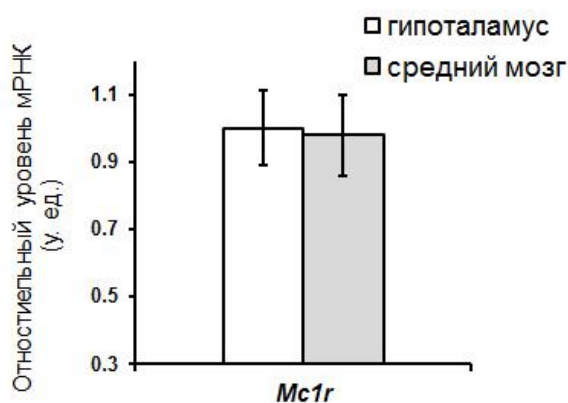
Линейную зависимость между величинами определяли с помощью коэффициента корреляции Пирсона (*R*).

## Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Исследование экспрессии MC1R в различных отделах мозга.

#### 3.1.1. Экспрессия MC1R в гипоталамусе и в среднем мозге мышей, в том числе в POMC-иммунопозитивных нейронах

Результаты, полученные с помощью ПЦР в реальном времени, демонстрируют стабильную экспрессию гена *Mclr* в гипоталамусе и в среднем мозге мыши (n=8), причем уровень экспрессии *Mclr* в этих отделах мозга не различался (рис. 5). Для исследования гипоталамуса и среднего мозга для амплификации было использовано одинаковое количество ОТ-продукта, реакции проводили при одинаковом температурном режиме и при равном количестве циклов.

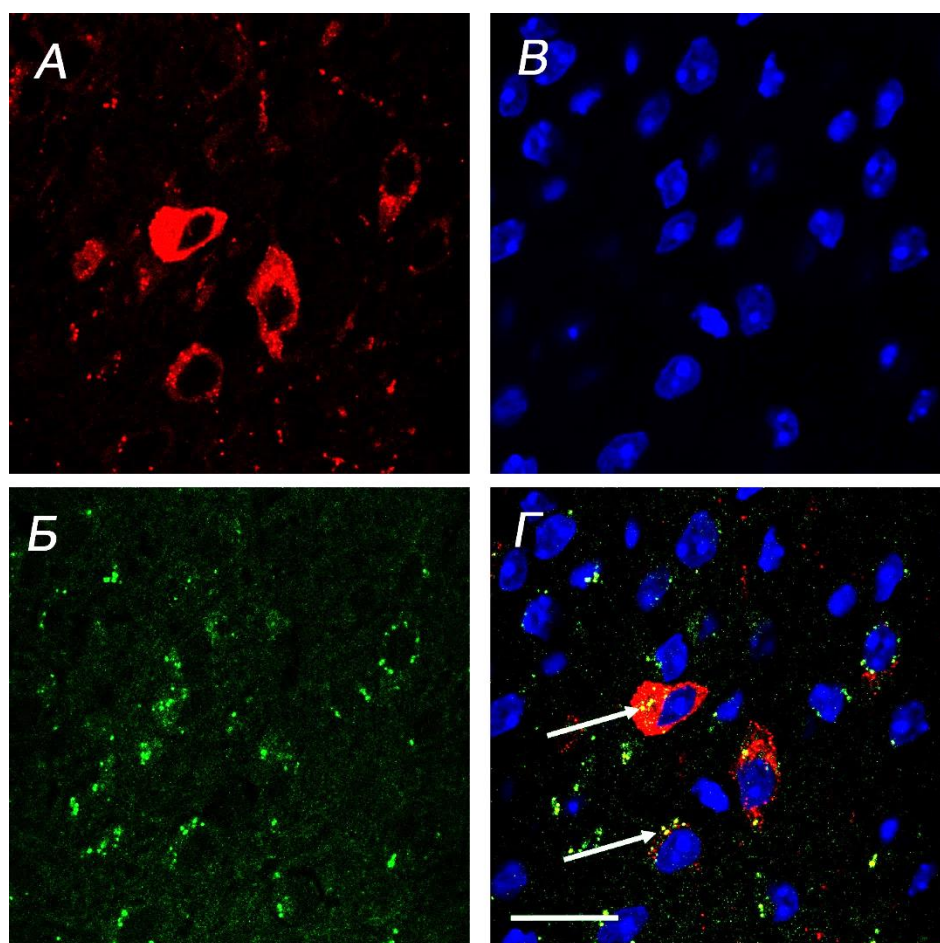


**Рис. 5.** Экспрессия гена *Mclr* в гипоталамусе и среднем мозге мышей C57Bl/6J. Результаты представлены в условных единицах (у. ед.).

Результаты флуоресцентного иммуномечения MC1R в гипоталамусе мыши свидетельствуют об интенсивной экспрессии этого рецептора в различных структурах гипоталамуса. С помощью двойного флуоресцентного иммуномечения было показано, что MC1R экспрессируются в нейронах аркуатного ядра (ARC) гипоталамуса, иммунопозитивных к проопиомеланокортину (POMC), а также и в нейронах ARC другой эргичности (рис. 6). Экспрессия MC1R выявлена в нейросекреторных клетках паравентрикулярного и супраоптического ядер гипоталамуса, как в вазопрессин-иммунопозитивных клетках, так и в нейронах другой эргичности. Интенсивная экспрессия MC1R выявляется в нейронах перифорникальной области гипоталамуса, где локализованы тела орексинергических, ГАМКергических и других типов нейронов. В преоптической области гипоталамуса экспрессия MC1R выявляется в меньшей степени, чем в медиальном гипоталамусе.

Таким образом, полученные данные демонстрируют экспрессию MC1R в структурах, где показано присутствие POMC-иммунопозитивных отростков (Bagnol, et

al., 1999). Выявленная с помощью иммунохимических методов экспрессия MC1R в самих POMC-продуцирующих нейронах ARC свидетельствует о возможной роли MC1R как ауторецептора.



**Рис. 6.** Двойное флуоресцентное иммуномечение POMC и MC1R в аркуатном ядре гипоталамуса мыши. Иммуногистохимические реакции к POMC (A, красный) и MC1R (Б, зеленый), реакция к ядерному красителю DAPI (B, синий) и их совмещение (Г); n=4. Стрелки указывают на MC1R, локализованные в телах POMC-иммунопозитивных нейронов, масштаб 20 мкм.

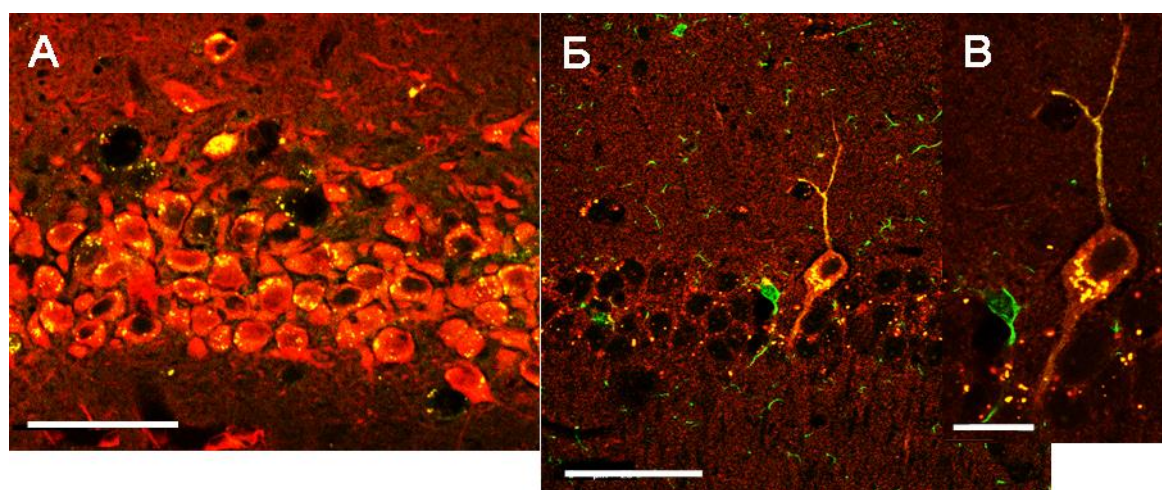
В современной литературе утвердилось мнение о тканеспецифичной экспрессии MCRs. В мозге в основном исследована экспрессия и локализация MC3R и MC4R, играющие исключительно важную роль в регуляции пищевого поведения и энергетического обмена (Schwartz, Mortin, 2002; Cone, 2006). При этом показано, что MC3R и MC4R могут экспрессироваться в одном нейроне, а MC3R выявлены в POMC-нейронах ARC. Введение специфического антагониста MC3R приводило к уменьшению уровня мРНК POMC. Это свидетельствует о роли MC3R в ARC как ауторецептора, регулирующего продукцию меланокортиновых пептидов - его собственных агонистов (Bagnol et al., 1999; Cone, 2006; Olney, 2014; и др.), вовлеченных

в петлю обратной связи. Однако данных об экспрессии MC3R в других формациях POMC-нейронов мозга в доступной нам литературе мы не обнаружили.

### 3.1.2. Экспрессия MC1R в POMC-иммунопозитивных нейронах других формаций мозга

Результаты исследования, проведенного с помощью двойного флуоресцентного иммуномечения и конфокального микроскопа, демонстрируют экспрессию MC1R и в других областях мозга, в частности, в POMC-иммунопозитивных нейронах гиппокампа (рис. 7, 8) и коры больших полушарий (рис. 9), NTS (рис. 10).

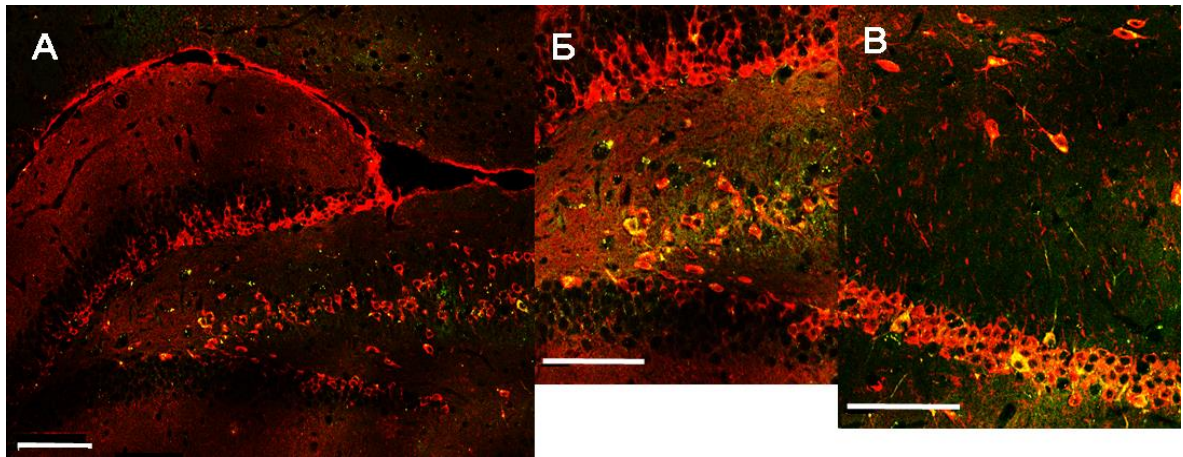
В нейронах гиппокампа MC1R наиболее обильно выявляются в поле CA3 в основном в телах POMC-иммунопозитивных нейронов (рис. 7А). В поле CA1 MC1R отчетливо выявляются не только в телах, но и в отростках как POMC-иммунопозитив-



**Рис. 7.** Двойное флуоресцентное иммуномечение POMC (красный) и MC1R (зеленый) в поле CA3 (А) и CA1 (Б, В) гиппокампа мыши; n=3. Масштаб 50 мкм (А и Б), 20 мкм (В).

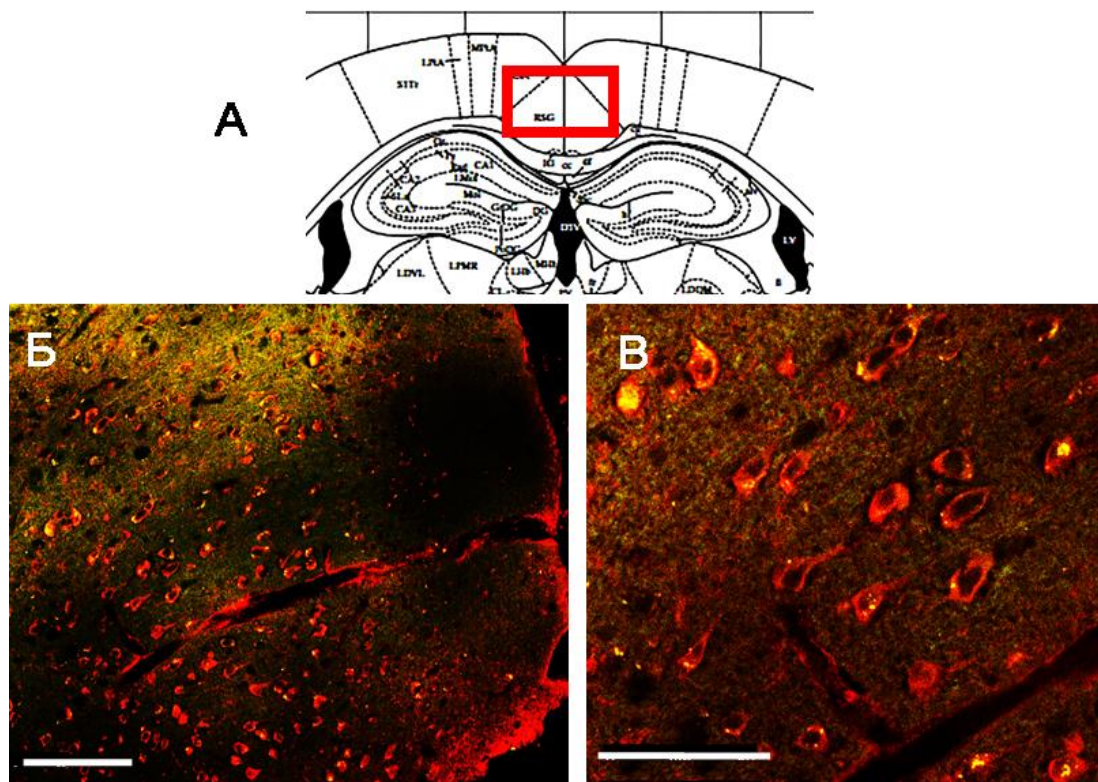
ных, так и иммунонегативных нейронов (рис. 7Б, В). В области зубчатой извилины MC1R выявляются не во всех POMC-иммунопозитивных нейронах: в некоторых мелких POMC-иммунопозитивных клетках (рис. 8 А, Б) MC1R не выявляются, однако в других POMC-иммунопозитивных клетках MC1R отчетливо выявляются как в телах, так и в отростках (рис. 8В).

В разных отделах коры больших полушарий выявляются небольшие группы POMC-иммунопозитивных нейронов. В частности, в области retrosplenial granular



**Рис. 8.** Двойное флуоресцентное иммуномечение POMC (красный) и MC1R (зеленый) в разных отделах зубчатой извилины гиппокампа мыши; n=3. Масштаб: 100 мкм.

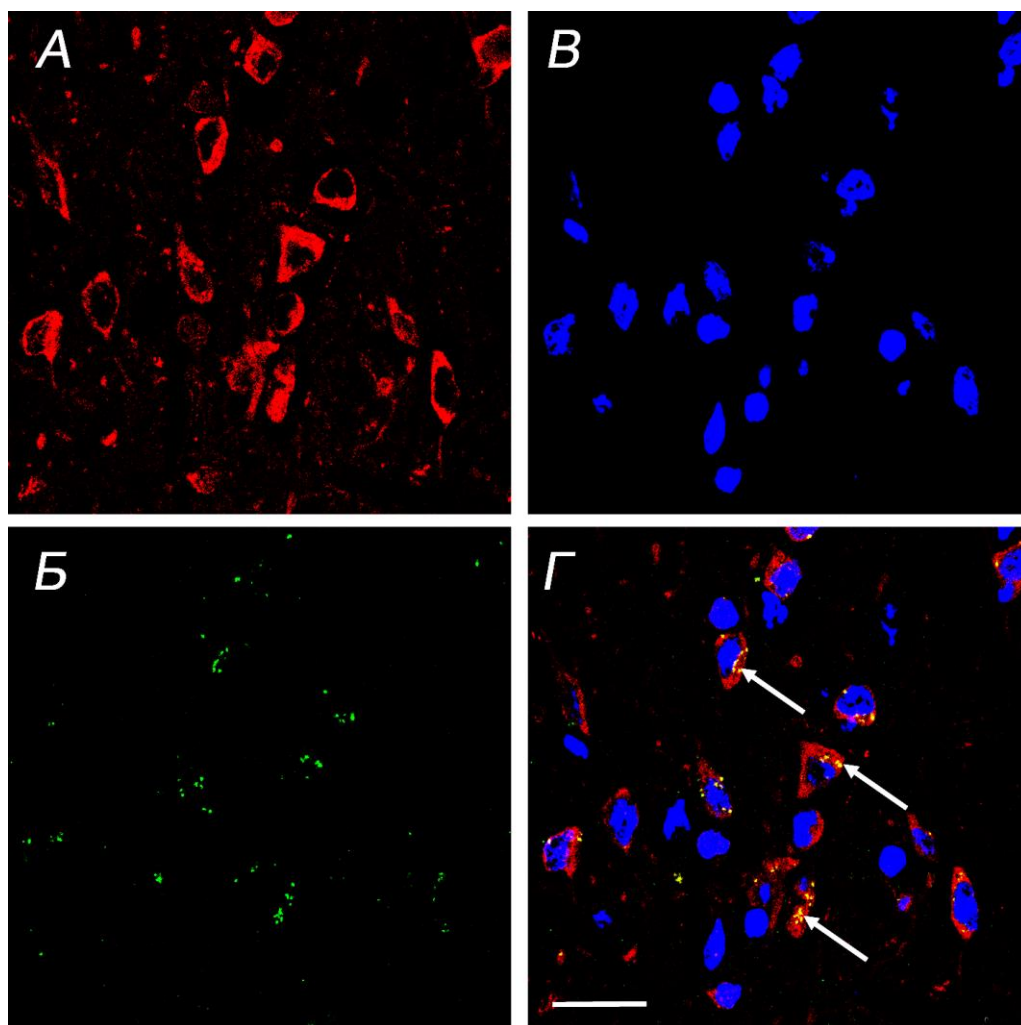
cortex, расположенной непосредственно над гиппокампом (**рис. 9А**), в POMC-положительных нейронах стабильно выявляются MC1R (**рис. 9Б, В**).



**Рис. 9.** Двойное флуоресцентное иммуномечение POMC (красный) и MC1R (зеленый) в нейронах коры больших полушарий мыши, n=3 (retrosplenial granular cortex согласно атласу мозга мыши – А, Paxinos, Franklin, 2001) мыши. Масштаб: 100 мкм (Б) и 50 мкм (В).

В NTS MC1R выявляются в POMC-иммунопозитивных нейронах, локализованных в различных субпопуляциях (медиальной, вентральной, центральной).





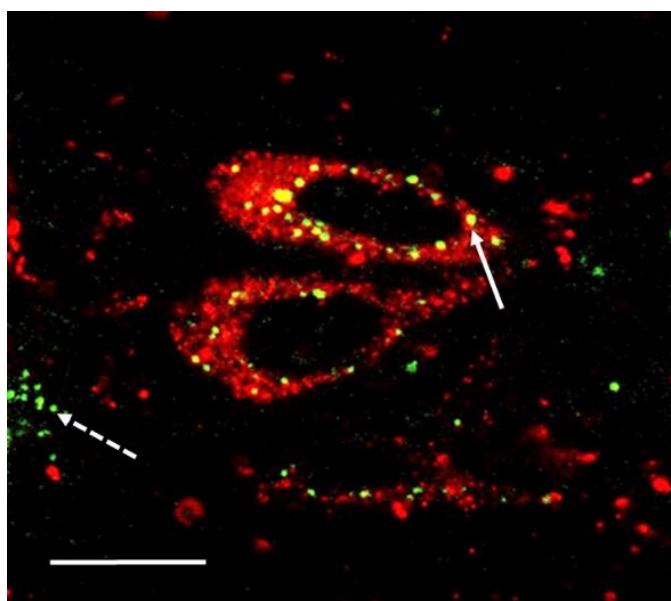
**Рис. 10.** Двойное флуоресцентное иммуномечение POMC и MC1R в центральной крупноклеточной части ядра одиночного тракта мыши. Иммуногистохимические реакции к POMC (А, красный) и MC1R (Б, зеленый), реакция к ядерному красителю DAPI (В, синий) и их совмещение (Г); n=4. Стрелки указывают на MC1R, локализованные в телах POMC-иммунопозитивных нейронов, масштаб 20 мкм.

Таким образом, представленные нами данные свидетельствуют о широком распространении MC1R в различных структурах мозга и впервые демонстрируют его локализацию в нейронах разных эргичностей, что, очевидно, свидетельствует о важной роли MC1R-опосредованного пути в регуляции функциональной активности нейронов мозга и, соответственно, контролируемых ими функций. Полученные нами данные демонстрируют присутствие MC1R в различных популяциях POMC-нейронов мозга, что свидетельствует о возможности функциональной роли MC1R как ауторецептора. В связи с этим можно предположить, что как MC1R-, так и MC3R-опосредованные пути, могут контролировать экспрессию POMC и баланс между этими путями может зависеть от различных факторов и функционального состояния организма.

### **3.2. Исследование морфофункциональных взаимосвязей меланокортиновой системы гипоталамуса с серотонинергическими нейронами мозга**

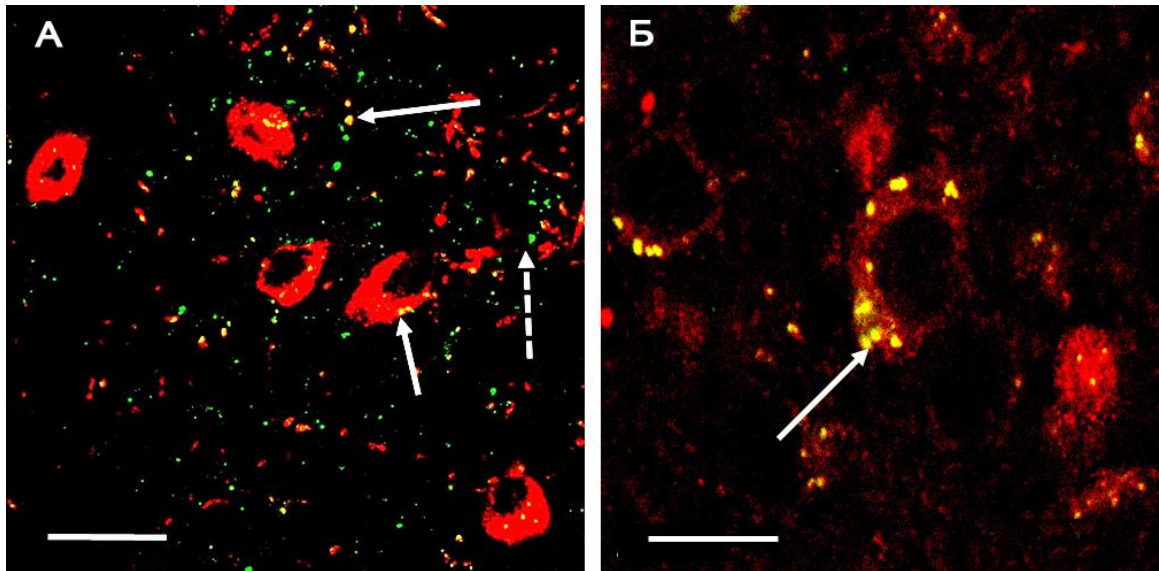
### 3.2.1. Изучение экспрессии рецепторов серотонина в POMC-нейронах ARC гипоталамуса

Известно, что отростки серотонинергических нейронов среднего мозга, расположенных в ядрах шва (raphe nuclei, RN) – дорзальном (DRN) и медианном (MRN), поступают в гипоталамус (Угрюмов, 1999), где участвуют в иннервации различных типов нейронов. В гипоталамусе выявлены различные подтипы 5-HT<sub>R</sub>, в частности в ARC с помощью иммуногистохимического подхода показана экспрессия 5-HT<sub>1A</sub>-, 5-HT<sub>2C</sub>- и 5-HT<sub>1B</sub> подтипов рецепторов (Muraki, et al., 2004; Makarenko, Meguid, Ugumov, 2002; Doslikova, et al., 2013). Непосредственно в POMC-нейронах выявлена экспрессия рецептора 5-HT<sub>2C</sub> подтипа (Doslikova, et al., 2013). С помощью двойного флуоресцентного иммуномечения 5-HT<sub>1B</sub>R были выявлены нами в телах и отростках POMC-иммунопозитивных нейронов ARC у крысы и мыши (рис. 11, 12), а также и в POMC-иммунонегативных структурах. При этом у мышей анализ срезов



**Рис. 11.** Двойное флуоресцентное иммуномечение 5-HT<sub>1B</sub>R (зеленый) и POMC (красный) в аркуатном ядре гипоталамуса крысы, n=4. Сплошные стрелки - 5-HT<sub>1B</sub>R в телах и отростках POMC-нейронов (желтое), пунктирные стрелки - 5-HT<sub>1B</sub>R в других структурах. Масштаб 20 мкм.

из разных отделов ARC свидетельствует об увеличении уровня 5-HT<sub>1B</sub> рецепторов в rostro-каудальном направлении (рис. 12), что, по-видимому, свидетельствует об участии 5-HT<sub>1B</sub>R в регуляции взаимодействий между самими POMC-нейронами в пределах ARC.

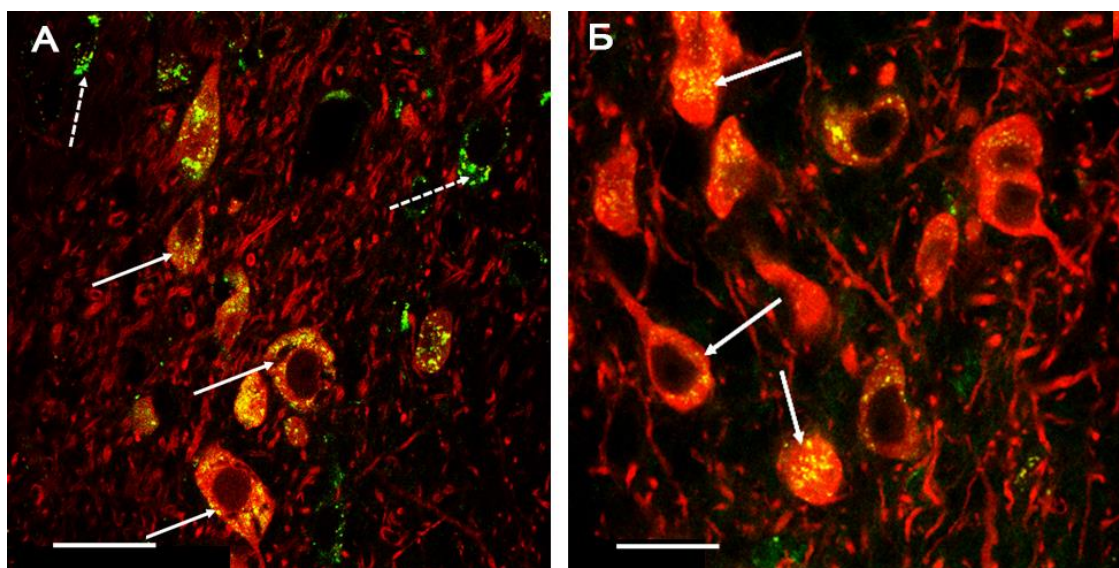


**Рис. 12.** Двойное флуоресцентное иммуномечение 5-НТ<sub>1В</sub> (зеленый) и POMC (красный) в аркуатном ядре гипоталамуса мыши C57BL/6J: А – ростральный отдел ARC, Б – каудальный отдел; n=4. Сплошные стрелки - 5-НТ<sub>1В</sub> в телах и отростках POMC-нейронов (желтое), пунктирные стрелки - 5-НТ<sub>1В</sub> в других структурах. Масштаб 20 мкм.

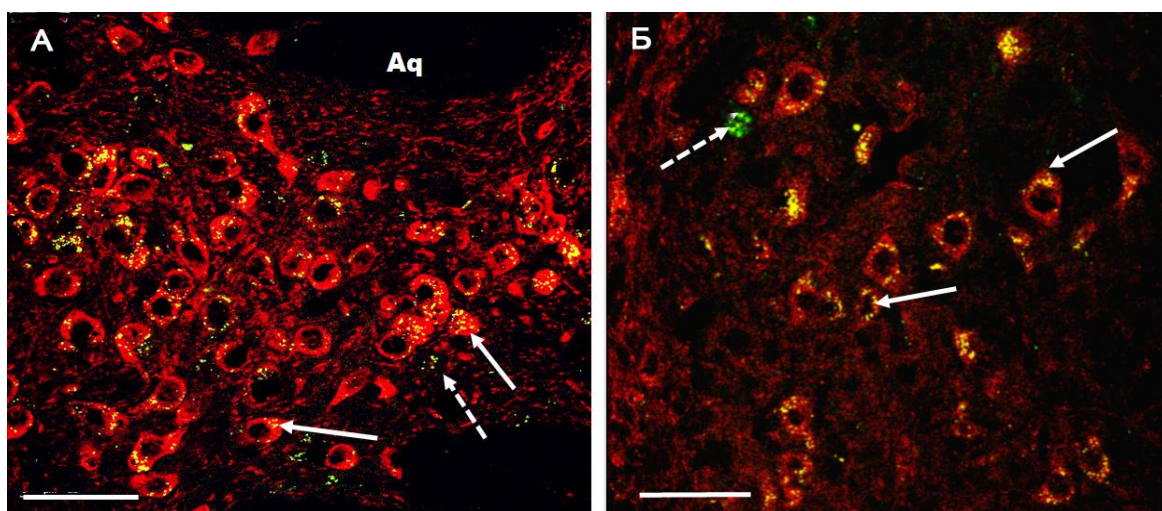
Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в POMC-нейронах осуществляется экспрессия обоих типов 5-НТ<sub>1В</sub>Р, которые вовлечены в контроль пищевого поведения и энергетического обмена, как активирующих 5-НТ<sub>2С</sub>Р, так и тормозных 5-НТ<sub>1В</sub>Р.

### 3.2.2. Изучение экспрессии меланокортиновых рецепторов в серотонинергических нейронах в среднем мозге

С помощью двойного флуоресцентного иммуномечения у крысы MC3R и MC4R выявлены в серотонинергических нейронах, локализованных DRN (рис. 13), а также и в GAD-иммунопозитивных нейронах, расположенных вокруг. При этом MC1R выявлены в 5-НТ-иммунопозитивных нейронах как в DRN и вентральном RN, так и в вентральной тегментарной области (ventral tegmental area – VTA; рис. 14). Проекции POMC-нейронов выявлены в различных областях среднего мозга млекопитающих, в частности в областях RN и VTA (Bagnol, et al., 1999). Длительное время VTA считали чисто дофаминергической формацией, так как здесь выявлена экспрессия тирозингидроксилазы – ключевого фермента синтеза катехоламинов (Björklund, Lindval, 1984; Oades, 1987). Однако позднее было показано, что в этой области также экспрессируется и триптофангидроксилаза-2 (ТПГ2, Sarkaci-Salli, et al., 2011) и,



**Рис. 13.** Двойное флуоресцентное иммуномечение MC3R (А) или MC4R (Б) и триптофангидроксилазы в нейронах дорзального ядра шва крысы; n=4. *Сплошные стрелки* – MC3R или MC4R, локализованные в телах серотонинергических нейронов, *пунктирные стрелки* – MC3R или MC4R в структурах другой эргичности, масштаб 25 мкм.



**Рис. 14.** Двойное флуоресцентное иммуномечение MC1R (зеленое) и 5-НТ (красный) в дорзальном ядре шва (А) и вентральной тегментарной области (Б) мыши; n=4. *Сплошные стрелки* – MC1R в телах 5-НТ-иммунопозитивных нейронов, *пунктирные стрелки* - в структурах другой эргичности. *Обозначение:* Аq – полость сильвиева водопровода, масштаб 50 мкм.

соответственно, синтез дофамина и серотонина происходит, по-видимому, в одних нейронах, что свидетельствует о тесной функциональной взаимосвязи между сигнальными системами серотонина и дофамина (Шпаков, Деркач, 2015; Romanova, et al., 2018).

Ранее MC3R и MC4R в VTA были выявлены как в дофаминергических нейронах, так и в нейронах, экспрессирующих GAD65/67 – ферменты биосинтеза ГАМК

(Михрина, и др., 2018). Полученные нами данные впервые демонстрируют возможность прямого и опосредованного влияния меланокортиновых пептидов на функциональную активность серотонинергических нейронов мозга через различные пути внутриклеточной сигнализации, опосредованные MC1R, MC3R и MC4R рецепторами.

### **3.3. Метаболические характеристики мышей и крыс при ожирении**

Совокупность полученных нами данных указывает на то (**табл. 7**), что у мышей, находящихся на высококалорийной диете в течение 8 недель, метаболические изменения были выражены в меньшей степени в сравнении с животными, которые находились на диете в течение 16 недель. Необходимо отметить, что в условиях 16-ти недельной диеты масса тела и жировой ткани, уровни глюкозы и инсулина в крови мышей (группа ДИО16) были достоверно выше, чем в контроле. В группе ДИО16 на фоне ожирения отмечали снижение чувствительности тканей к инсулину, о чем свидетельствует повышение индекса инсулиновой резистентности, рассчитанное как произведение концентраций глюкозы и инсулина, которое в группе ДИО16 было на 97% выше, чем в контроле, и на 34% и 57% выше, чем в группах ДИО8 и ДИО16Р. В группе ДИО16 также отмечали гиперлептинемия – повышение уровня лептина на 114% в сравнении с контролем ( $p < 0.05$ ), что является признаком развития резистентности тканей к лептину. Эти данные в целом согласуются с нашими ранними результатами (Heydendael, Jacobson, 2009; Михайлова и др., 2018) и с данными других авторов, изучавших метаболические и гормональные показатели у ДИО-мышей (Sousa-Lima et al., 2016; Yashiro, et al., 2016).

Мыши Ау/а (с мутацией) несмотря на то, что находились на стандартной диете, имели массу тела, в два раза превышающую таковую у контрольных мышей, и в значительной степени увеличенную долю жировой ткани. У них также отмечали повышенные уровни глюкозы, инсулина и лептина (**табл. 7**). Эти данные свидетельствуют о развитии у мышей Ау/а гипергликемии, гиперинсулинемии и сильно выраженной гиперлептинемии, что является характерной чертой снижения у них активности меланокортиновых сигнальных путей (Shpakov, Derkach, 2017).

Также у некоторых групп были определен уровень триглицеридов в крови, что составило  $2.02 \pm 0.08$  мг/дл у контрольных мышей,  $2.97 \pm 0.12^*$  у мышей ДИО8 и  $2.89 \pm 0.11^*$  у мышей Ау/а, где \* - достоверное отличие от контрольного уровня ( $p < 0.05$ ). Уровень общего холестерина у этих групп составил  $4.11 \pm 0.14$  мг/дл,  $5.23 \pm 0.23^*$  и  $5.02 \pm 0.18^*$  соответственно.

**Таблица 7.** Масса тела, доля жировой ткани, уровни глюкозы, инсулина и лептина в крови у ДИО-мышей и агути-мышей

	<b>K1/K2 n=13/13</b>	<b>ДИО8 n=13</b>	<b>ДИО16 n=13</b>	<b>ДИО16P n=9</b>	<b>Ay/a n=21</b>
масса тела, г	20.1±1.0 / 20.5±0.6	22.7±1.6	24.9±1.3*	22.1±1.7	43.6±1.5*
доля жира, %	1.33±0.19 / 1.49±0.23	2.41±0.42*	2.85±0.51*	1.97±0.45*	10.02±0.51*
глюкоза, мм	5.6±0.7 / 5.4±0.5	6.5±0.8	7.2±0.5*	6.4±0.9	9.8±1.3*
инсулин, нг/мл	0.30±0.08 / 0.29±0.07	0.38±0.11	0.46±0.09*	0.33±0.14	0.87±0.15*
лептин, нг/мл	1.38±0.30 / 1.51±0.32	2.39±0.34*	2.96±0.48*	1.97±0.52	11.41±3.17*

K1 – шестимесячные контрольные мыши для групп ДИО8 и Ay/a, K2 – восьмимесячные контрольные мыши для групп ДИО16 и ДИО16P. Все значения представлены, как  $M \pm SD$ .

У крыс, получавших в течение 12 недель высококалорийную кафетерий-диету, развивались отчетливо выраженные признаки метаболического синдрома. У них отмечали достоверное повышение массы тела и жировой ткани, повышение уровней инсулина и лептина в крови, что свидетельствует о развитии гиперинсулинемии и гиперлептинемии, а также повышение базального и стимулированного глюкозной нагрузкой уровней глюкозы (**табл. 8**). В пользу нарушения толерантности к глюкозе свидетельствуют данные о повышении значения ( $AUC_{0-120}$ ), которое соответствует интегрированной площади под концентрационной кривой для глюкозы в глюкозотолерантном тесте (ГТТ). На развитие в группе ДИО инсулиновой резистентности, наряду с гиперинсулинемией, указывают повышенный индекс инсулиновой резистентности, представляющий собой произведение концентраций глюкозы и инсулина натощак, а также повышение значений  $AUC_{0-120}$  для концентрационной кривой для эндогенного инсулина в ГТТ, а также  $AUC_{0-120}$  для кривой концентрации глюкозы в инсулин-глюкозотолерантном тесте (ИГТТ) (**табл. 8**).

**Таблица 8.** 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 ГТТ и ИГТТ у крыс с ожирением в сравнении 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*
Лептин, нг/мл	0.60±0.07	2.88±0.40*
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*
ИГТТ, 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 контрольными крысами и крысами с ожирением статистически значимы при  $p < 0.05$ .

Таким образом, вследствие 12-недельной кафетерий-диеты у крыс происходят значительные метаболические и гормональные изменения, вызванные избыточным потреблением калорий, которые соответствуют общепринятым характеристикам МС. Аналогичные изменения наблюдаются у мышей после 8 и 16-ти недель содержания на высококалорийной диете и у мышей Au/a, которые употребляли обычную, но в большем объеме пищу.

### **3.4. Анализ функциональной активности серотонинергических нейронов среднего мозга при ожирении**

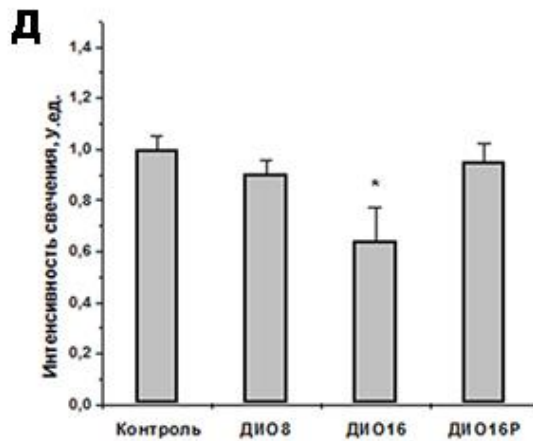
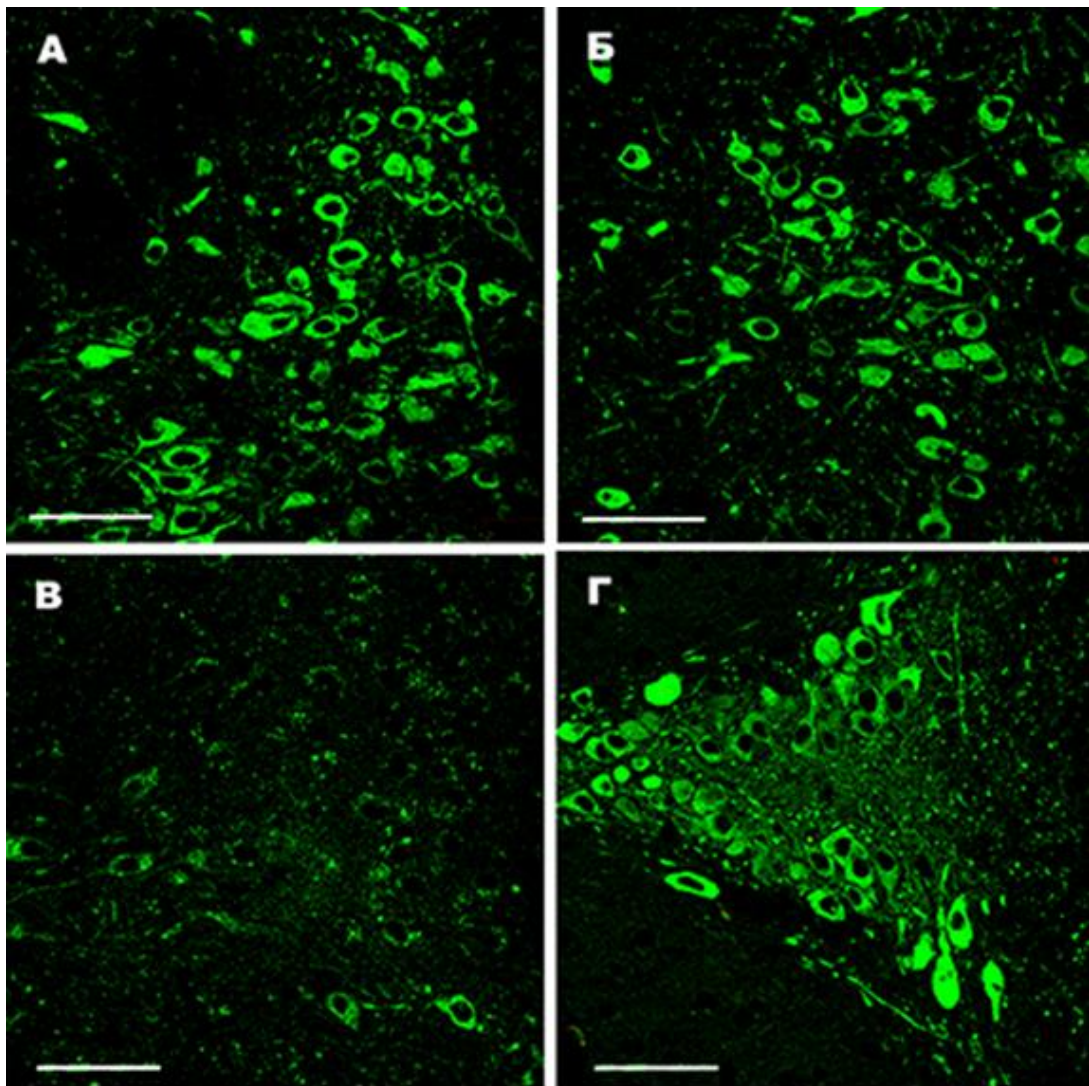
#### **3.4.1. Диета-индуцированное ожирение у мышей**

При изучении с помощью иммуногистохимических методов уровня фермента ТПГ2 в DRN у мышей при ДИО было показано, что в группе мышей ДИО8 с

относительно слабо выраженными метаболическими нарушениями существенных изменений иммуноэкспрессии ТПГ2 в DRN не наблюдается, в то время как в группе ДИО16 уровень ТПГ2 был снижен на 36% ( $p < 0.05$ ) по сравнению с таковым у контрольных животных (**рис. 15**). Поскольку DRN вносит основной вклад в общий пул серотонина, синтезируемого в ЦНС, то значительное снижение экспрессии ТПГ2 в DRN свидетельствует о дефиците серотонина в мозге, что согласуется с данными о снижении внутримозгового уровня серотонина в ЦНС при ожирении и МС (Muldoon, et al., 2004; Herrera-Marquez, et al., 2011; Shpakov, Derkach, Berstein, 2015), а также об эффективности восполнения его дефицита с помощью интраназально вводимого серотонина (Derkach, et al., 2015) и селективных ингибиторов обратного захвата серотонина, таких как флуоксетин (Deuschle, 2013). Показано также, что пациенты с ожирением и инсулиновой резистентностью имеют сниженную активность ТПГ2 (Kloiber, et al., 2010).

Представляет интерес тот факт, что в DRN уровень ТПГ2 у ДИО-мышей с резистентностью к высококалорийной диете (ДИО16Р) не менялся в сравнении с контролем и достоверно отличался от такового у ДИО-мышей, чувствительных к диете (ДИО16) (**рис. 15 Г, Д**). Полученные данные указывают на то, что сохранение активности серотониновых сигнальных путей и, как можно полагать, всей интегративной системы сигнальных каскадов мозга запускает адаптационные механизмы, препятствующие негативному влиянию высококалорийной диеты на метаболические и гормональные показатели у ДИО-мышей. Другие авторы также выявляли группы животных, устойчивых к высококалорийной диете, хотя и не связывали резистентность с активностью серотониновых путей в ЦНС (Kim, et al., 2013). Выдвигаются две основные гипотезы развития резистентности к диете. Первая основывается на различиях в способности белой жировой ткани аккумулировать избыточное количество калорий, поступающих с пищей, что, в свою очередь, определяется способностью жировой ткани образовывать новые кровеносные сосуды. Усиление ангиогенеза в белой жировой ткани способствует ее разрастанию и является фактором, усиливающим ДИО (Rupnick, et al., 2002; Fukumura, et al., 2003).



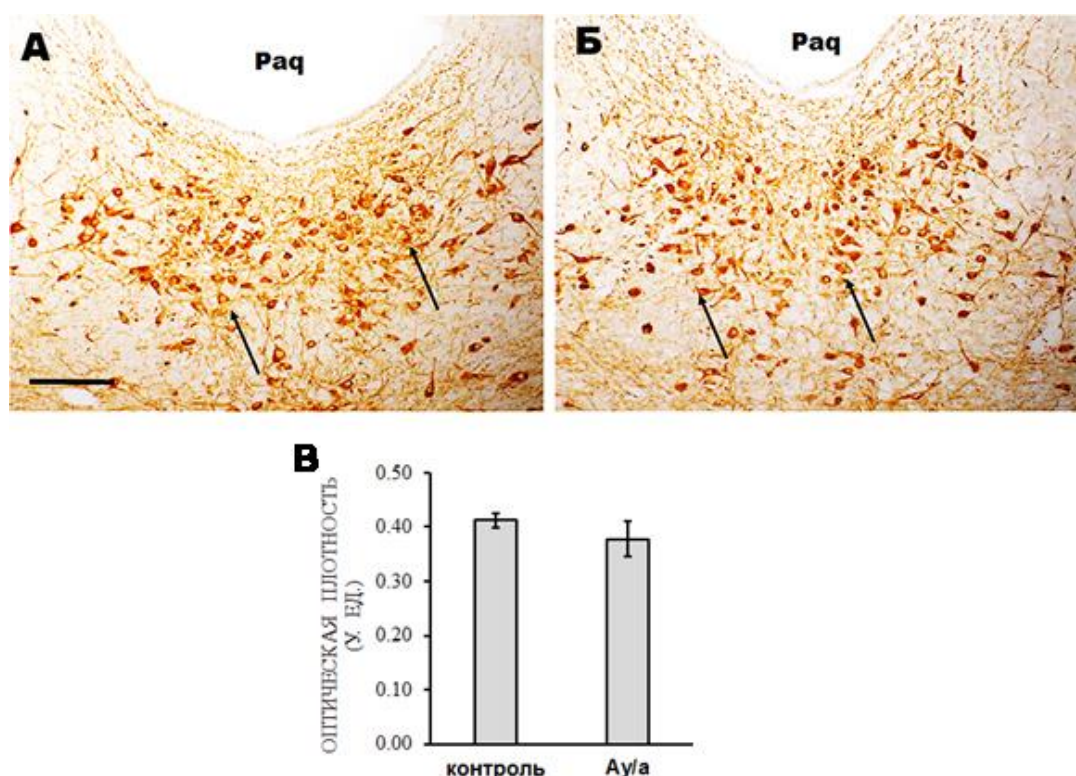


**Рис. 15.** Флуоресцентного иммуномечения триптофангидроксилазы-2 в дорсальном ядре шва у мышей C57Bl/6J с диета-индуцированным ожирением: А – контроль (n=5), Б – ДИО8 (n=5), В – ДИО16 (n=5), Г – ДИО16Р (n=5); масштаб 50 мкм. Д – количественный анализ интенсивности свечения, (\*) - достоверность различий по сравнению с контролем,  $p < 0.05$ . Значения интенсивности свечения у ДИО-мышей нормированы по отношению к контрольной группе, где этот показатель принят за 1 в у. ед.

В соответствии со второй гипотезой, ключевую роль в регуляции чувствительности организма к высококалорийной диете играет активность сигнальных систем гипоталамуса и других отделов мозга, ответственных за функционирование систем вознаграждения и подкрепления, контроль аппетита и энергетического обмена и за взаимодействие между этими системами. На примере ДИО-грызунов показано, что существует врожденная генетическая предрасположенность к развитию резистентности тканей мозга к инсулину и лептину, а также к развитию нарушений синтеза и обмена серотонина и других моноаминов в гипоталамусе. Чем быстрее на фоне избыточного потребления калорий возникают такие нарушения, тем ниже устойчивость к высококалорийной диете (Levin, 2010). Наши результаты свидетельствуют в пользу второй, «сигнальной», гипотезы ДИО-резистентности.

### 3.4.2. Меланокортиновое ожирение у мышей *Agouti yellow*

Исследование оптической плотности ТПГ2 (а также и ее фосфорилированной формы) в нейронах DRN у *Ay/a* мышей не выявило существенных отличий этого показателя от контрольного уровня (**рис. 16**). Эти результаты, по-видимому, свидетель-



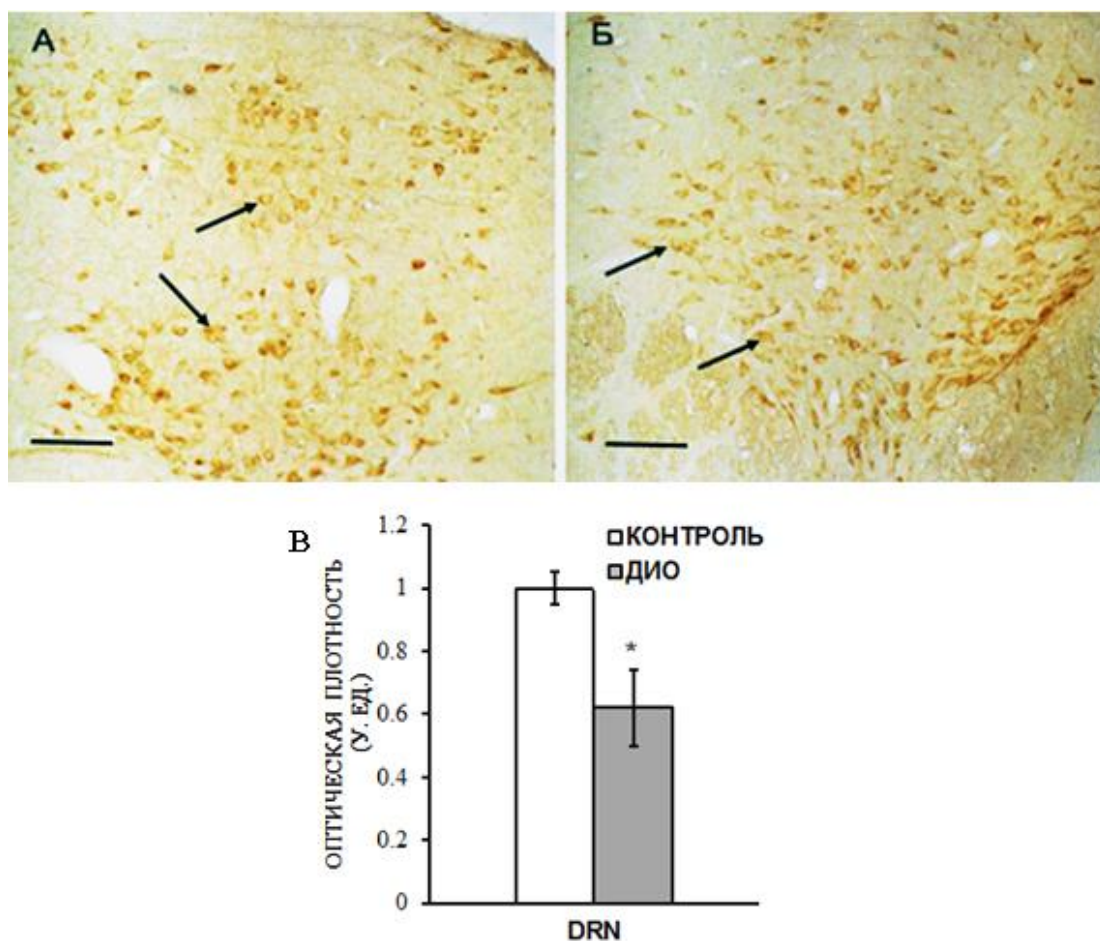
**Рис. 16.** Иммуногистохимическая реакция к триптофангидроксилазе-2 в дорсальном ядре шва у контрольных C57Bl/6J (А, n=5) и агути (Б, n=5) мышей. *Обозначение:* Pdq – periaqueductal gray. *Стрелки* указывают на тела иммунопозитивных нейронов. Масштаб 100 мкм. В – количественный анализ оптической плотности, данные представлены в условных единицах (у. ед.).

ствуют о том, что у мышей при меланокортиновом ожирении, в отличие от диета-индуцированного, несмотря на однонаправленные изменения метаболических параметров (табл. 7), нейроны DRN к их изменению менее чувствительны, что, возможно, связано с различиями в регуляции этих нейронов у мышей Au/a.

### 3.4.3. Диета-индуцированное ожирение у крыс

Анализ иммуногистохимических реакций к ТПГ2 в среднем мозге крысы свидетельствует об уменьшении уровня оптической плотности этого фермента при ДИО в нейронах DRN в среднем на 40% ( $p < 0.05$ ; рис. 17) по сравнению с контролем.

Таким образом, при диета-индуцированном ожирении в течение 16 недель у мышей C57Bl/6J и 12 недель у крысы Вистар наблюдаются однонаправленные изменения в нейронах DRN, характеризующиеся уменьшением уровня ТПГ2.

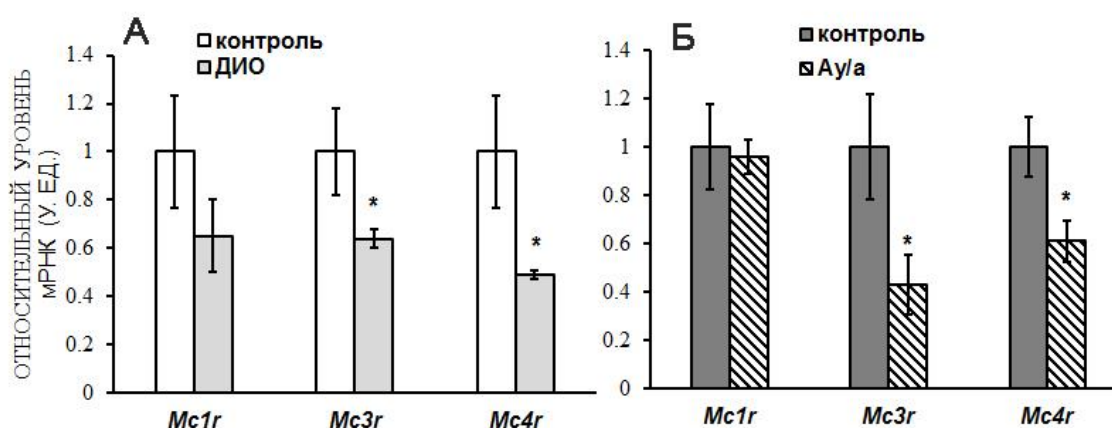


**Рис. 17.** Иммуногистохимическая реакция к ТПГ2 в DRN крысы в контроле (А, n=5), при ДИО (Б) и количественный анализ оптической плотности ТПГ2 (В, n=5). Стрелки - тела ТПГ2-иммунопозитивных нейронов, масштаб 100 мкм. Достоверность отличий (\*) между группами ( $p < 0.05$ ). Данные представлены в условных единицах (у. ед.).

### 3.4.4. Анализ экспрессии генов *Mcr* в среднем мозге у мышей и крыс при различных типах ожирения

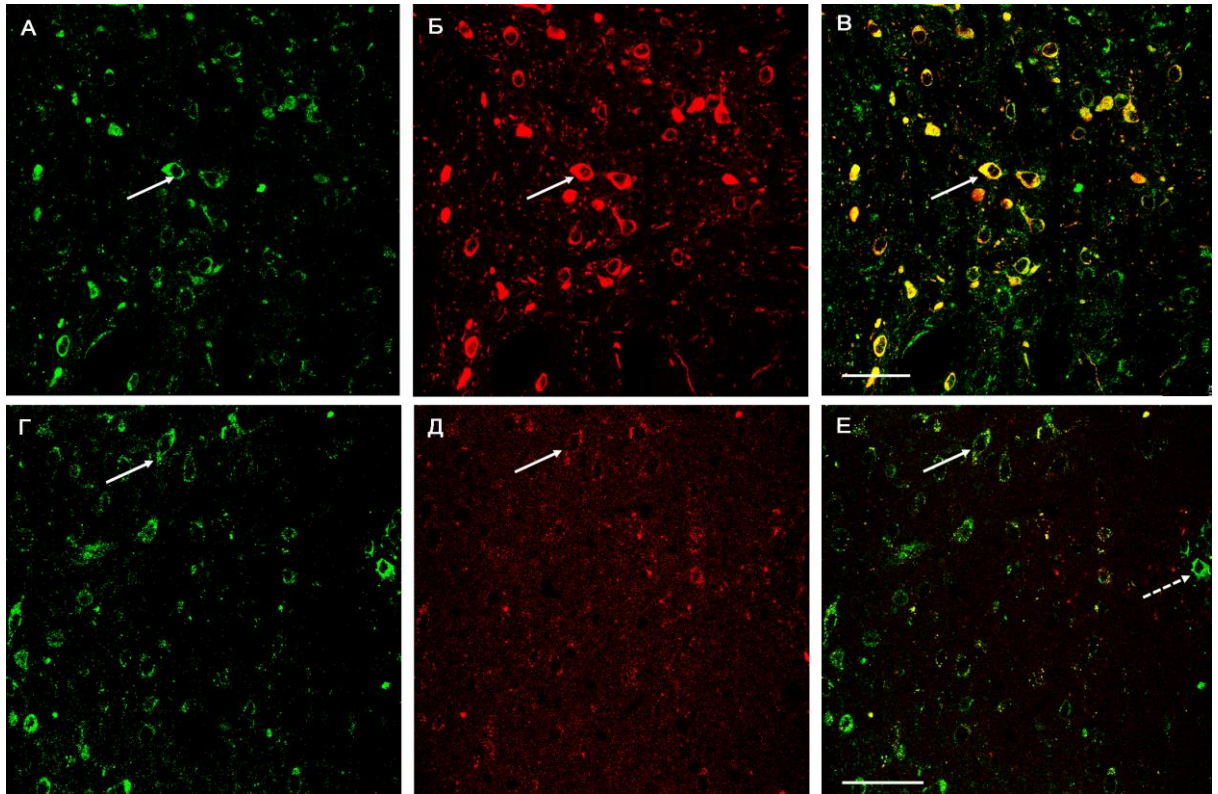
Нами показано уменьшение экспрессии генов *Mc1r*, *Mc3r* и *Mc4r* в среднем мозге мышей (рис. 18), что может свидетельствовать о снижении чувствительности нейронов к меланокортиновым пептидам. У мышей ДИО16 выявлено уменьшение уровня экспрессии *Mc3r* (на 36%,  $p < 0.05$ ) и *Mc4r* (на 51%,  $p < 0.05$ ) по сравнению с этими показателями в контроле. Для *Mc1r* отмечена лишь тенденция к снижению (на 35%,  $p > 0.05$ ), так как эти изменения не были статистически значимыми (рис. 18А).

У мышей *Ay/a* выявлено уменьшение экспрессии *Mc3r* на 57% ( $p < 0.05$ ) и *Mc4r* на 39% ( $p < 0.05$ ). Уровень экспрессии *Mc1r* при этом не менялся (рис. 18Б). У мышей *Ay/a* на фоне уменьшения уровня экспрессии *Mc3r* и *Mc4r* (рис. 18Б) не выявлено уменьшения уровня ТПГ2 в DRN, что, по-видимому, свидетельствует о существовании компенсаторных механизмов, препятствующих снижению ТПГ2.



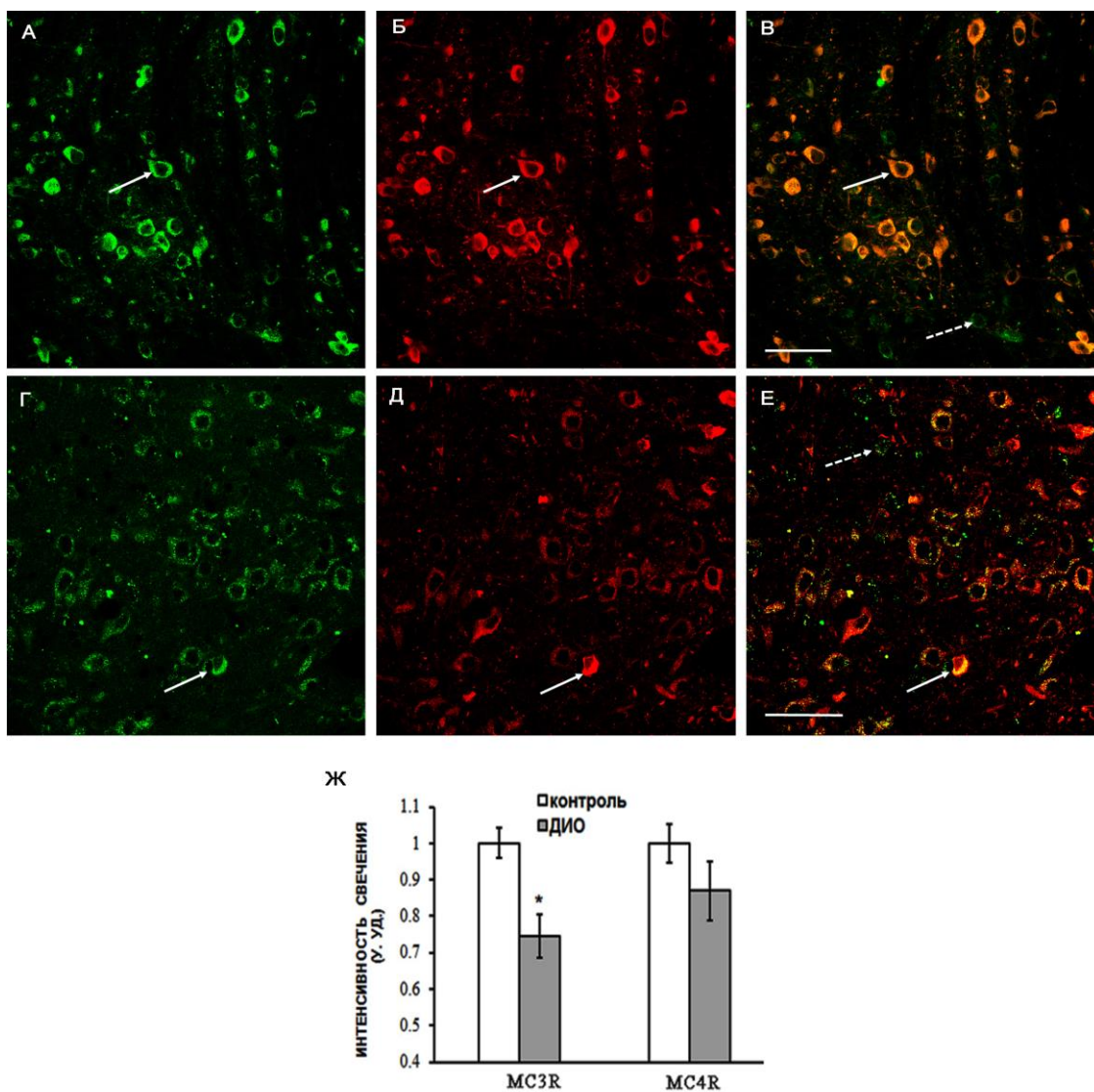
**Рис. 18.** Анализ экспрессии генов, кодирующих *Mcr*, в среднем мозге мышей при диета-индуцированном ожирении 16 недель (А) и мышей *Ay/a* (Б). \* - достоверность отличий от соответствующего контроля ( $p \leq 0.05$ ). Данные представлены в условных единицах (у. ед.);  $n=8$  в каждой группе.

У крыс с ДИО был проведен количественный анализ двойного флуоресцентного иммуномечения MC3R и MC4R в ТПГ-иммунопозитивных нейронах DRN. Полученные данные демонстрируют уменьшение уровня MC3R на 26% ( $p < 0.05$ ) и MC4R на 13% ( $p > 0.05$ ) по сравнению с соответствующим контрольным уровнем (рис. 19, 20).



**Рис. 19.** Двойное флуоресцентное иммуномечение MC4R и ТПГ в DRN у контрольной (А, Б, В) и ДИО (Г, Д, Е) крысы. *Сплошные стрелки* – иммунопозитивные к MC4R (А, Г) и ТПГ (Б, Д) структуры, а также их колокализация (В, Е). *Пунктирные стрелки* – MC4R в ТПГ-негативных структурах (В, Е). Масштаб 50 мкм.

Таким образом, при разных формах ожирения в среднем мозге отмечено снижение меланокортинового сигналинга, однако степень изменений отличается в зависимости от формы ожирения. При этом у крыс ДИО снижение МКР3 и МКР4 показано непосредственно в ТПГ-иммунопозитивных нейронах DRN на фоне уменьшения в них уровня ТПГ2. Полученные данные свидетельствуют в пользу предположения о прямой функциональной взаимосвязи между меланокортиновой и серотониновой системами.



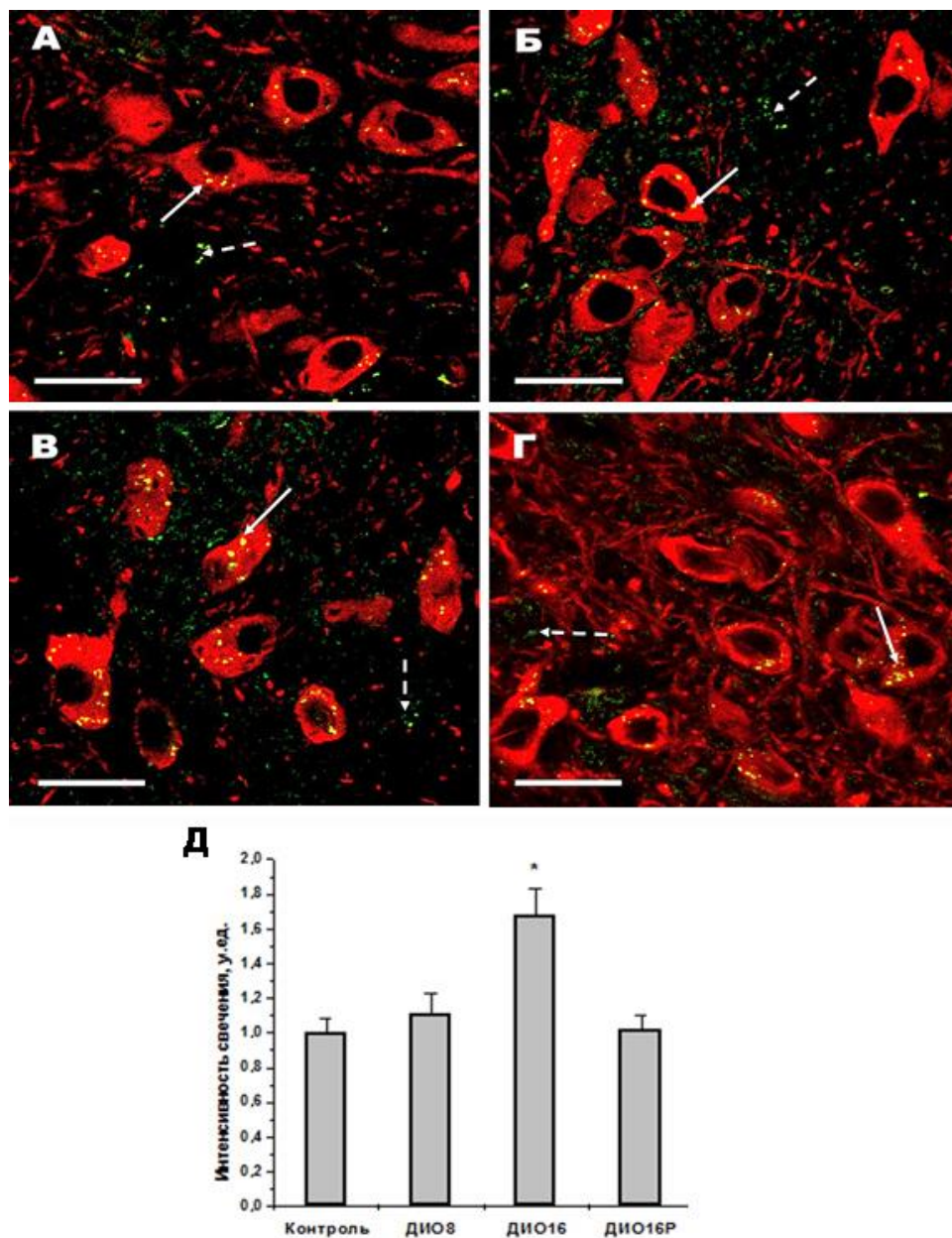
**Рис. 20.** Двойное флуоресцентное иммуномечение MC3R и ТПГ в DRN у контрольных (А, Б, В) и ДИО (Г, Д, Е) крыс. *Сплошные стрелки* – иммунопозитивные к MC3R (А, Г) и ТПГ (Б, Д) структуры, а также их колокализация (В, Е). *Пунктирные стрелки* – MC3R в ТПГ-негативных структурах (В, Е). Масштаб 50 мкм.

Ж - количественный анализ уровня меланокортиновых рецепторов в триптофангидроксилаза-иммунопозитивных нейронах DRN крысы при ДИО. (\*) - достоверность отличий от соответствующего контроля ( $p < 0.05$ ). Данные представлены в условных единицах (у. ед.);  $n=4$  в каждой группе.

### 3.4.5. Компенсаторные механизмы, направленные на увеличение биосинтеза серотонина в среднем мозге при разных формах ожирения у мышей и крыс

У мышей при ДИО на фоне уменьшения уровня ТПГ2 в «классических» серотонинергических нейронах DRN было отмечено увеличение уровня этого фермента в других нейронах, в том числе в нейронах VTA (на 62%,  $p < 0.05$ ), где, как было показано, также присутствует мРНК ТПГ2 (Carkaci-Salli, et al., 2011). Однако увеличение интенсивности свечения ТПГ2 в тирозингидроксилаза-иммунопозитивных нейронах было выявлено только у мышей ДИО16 (**рис. 21**), а у ДИО8 и ДИО16Р

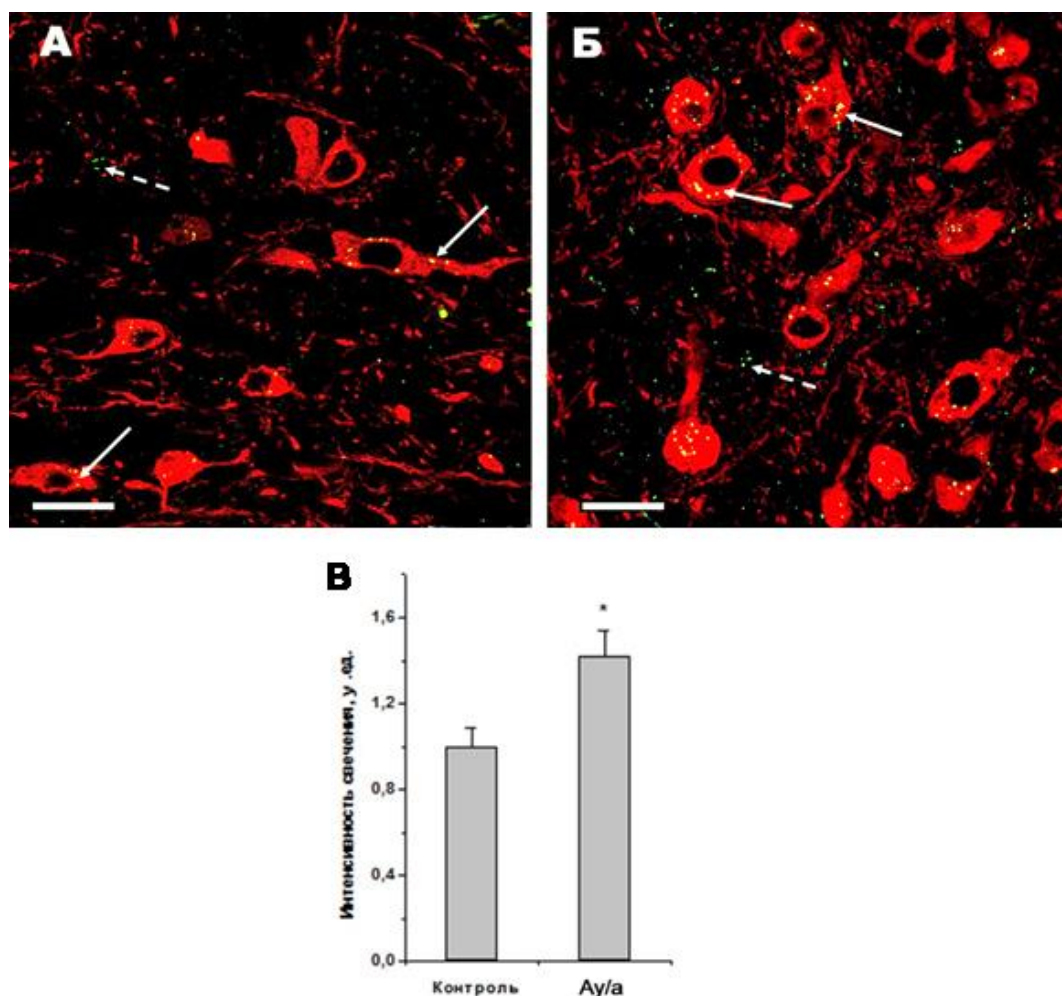
изменений выявлено не было. Полученные данные, как мы полагаем, свидетельствуют о компенсаторном значении повышения уровня ТПГ2 в других нейронах на фоне уменьшения уровня этого фермента в нейронах DRN – основном источнике продукции серотонина.



**Рис. 21.** Двойное флуоресцентное иммуномечение триптофангидроксилазы-2 в тирозингидроксилаза-иммунопозитивных клетках вентральной тегментарной области у мышей C57Bl/6J с диета-индуцированным ожирением. А – контроль (n=5), Б – ДИО8 (n=5), В – ДИО16 (n=5), Г – ДИО16Р (n=5), Д – количественный анализ интенсивности свечения ТПГ2 в нейронах. *Сплошные стрелки* – ТПГ2, локализованная в дофаминергических нейронах, *пунктирные стрелки* – ТПГ2, локализованная в других структурах, масштаб 20 мкм. (\*) - достоверность различий с контролем ( $p < 0.05$ ), результаты представлены в условных единицах (у. ед.).

У мышей Au/a несмотря на то, что в DRN не было выявлено изменения уровня ТПГ2, в VTA, как и у ДИО-мышей, отмечается повышение уровня этого фермента на 42% ( $p < 0.05$ ; **рис. 22**).

У крыс при ДИО анализ флуоресцентного иммуномечения свидетельствует об увеличении в нейронах VTA интенсивности свечения ТПГ (до 24%,  $p < 0.05$ ) по сравнению с уровнем у контрольных животных.

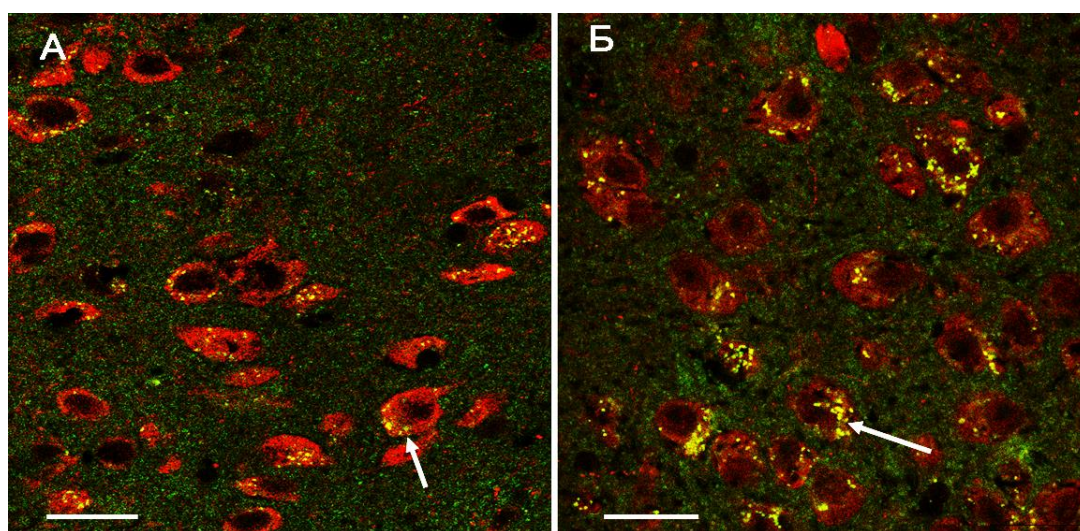


**Рис. 22.** Двойное флуоресцентное иммуномечение триптофангидроксилазы-2 и тирозингидроксилазы в вентральной тегментарной области у мышей Au/a с меланокортиновым ожирением. А – контроль (n=5), Б – Au/a (n=5). *Сплошные стрелки* – ТПГ2, локализованная в дофаминергических нейронах, *пунктирные стрелки* – ТПГ2 в других структурах. Масштаб 20 мкм. В – количественный анализ интенсивности свечения, \* - достоверность отличия от контроля ( $p < 0.05$ ), данные представлены в условных единицах (у. ед.)

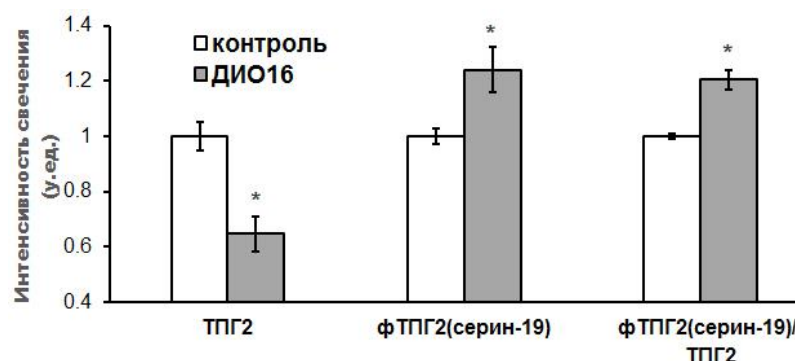
Таким образом, нами впервые показано, что в VTA у чувствительных к высококалорийной диете мышей C57Bl/6J с ДИО продолжительностью 16 недель, у мышей Au/a с меланокортиновым типом ожирения, а также у крыс с ДИО меняется уровень ТПГ2 – скорость лимитирующего фермента синтеза серотонина.



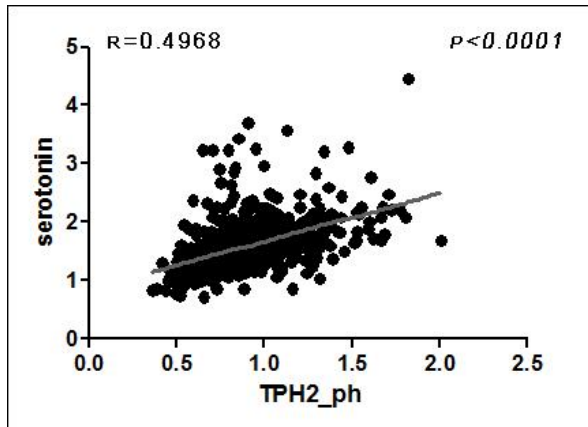
У мышей при ДИО16 в серотонинергических нейронах DRN был проведен анализ фосфорилированной по серину-19 формы ТПГ2 - фТПГ2 (серин-19). Анализ двойного флуоресцентного иммуномечения (рис. 23, 24) свидетельствует об увеличении в 5-НТ-нейронах уровня фТПГ2 (серин-19) на 24 % ( $p < 0.05$ ) что, на фоне снижения уровня общей формы этого фермента (рис. 15, 24) приводит к увеличению соотношения фосфорилированная/общая форма и, по-видимому, свидетельствует об ускорении перехода общей формы в фосфорилированную. Статистический анализ данных выявил положительную корреляцию ( $r = 0.5$ ) между количеством в нейронах 5-НТ и уровнем фосфорилированной формы ТПГ2 (рис. 25).



**Рис. 23.** Двойное флуоресцентное иммуномечение фосфорилированной по серину-19 ТПГ2 (зеленый) в 5-НТ-нейронах DRN (красный) у контрольных (А, n=4) и ДИО16 (Б, n=4) мышей. Стрелки - фосфо-ТПГ2-иммунопозитивные гранулы. Масштаб 25 мкм.



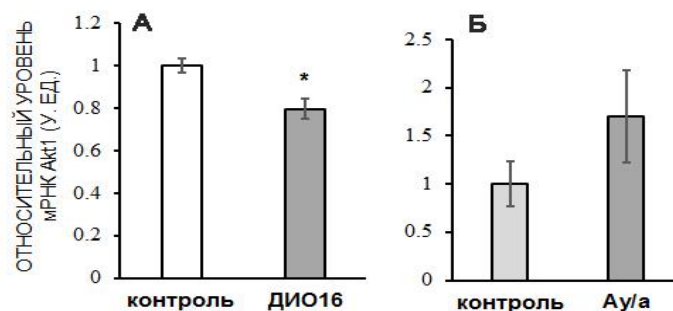
**Рис. 24.** Анализ общей и фосфорилированной форм ТПГ2 в нейронах DRN мыши при ДИО16. Достоверность различий (\*) – между группами ( $p < 0.05$ ).



**Рис. 25.** Статистический анализ фосфорной формы ТПГ2 в 5-НТ-нейронах DRN мышей при ДИО16.

Фермент Akt-киназа является важным эффекторным компонентом различных сигнальных путей, в том числе регулируемых инсулином и лептином. Akt1 – внутриклеточный фермент, член семейства протеинкиназ В. Этот фермент является важнейшим звеном фосфатидилинозитол-3-киназного (PI3K) пути и имеет множество субстратов и вовлечена в регуляцию роста, пролиферации и выживаемости клеток (Chen et al., 2001; Cho et al., 2001), а в гипоталамических нейронах играет ключевую роль в контроле пищевого поведения и центральной регуляции энергетического обмена (Liu et al., 2017). Об активации фермента Akt1-киназы свидетельствует ее фосфорилирование по остатку серин-473 и (или) треонин-308, причем фосфорилирование по остатку серин-473 является функционально более важным и отвечает за гипоталамическую регуляцию пищевого поведения и периферического энергетического обмена (Morton, et al., 2005).

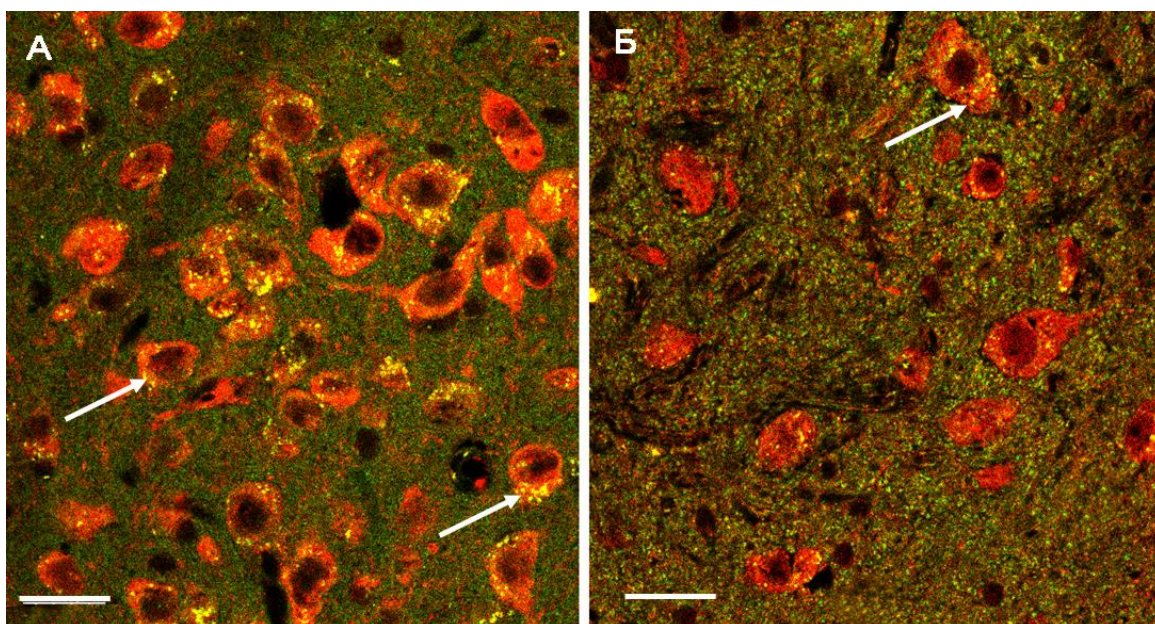
Результаты ПЦР свидетельствуют о снижении экспрессии гена *Akt1* в среднем мозге у мышей ДИО16 по сравнению с контрольной группой на 21% ( $p < 0.05$ ; **рис. 26А**), в отличие от мышей *Ay/a*, у которых, не выявлено достоверных изменений, но отмечается отчетливая тенденция к увеличению экспрессии *Akt1* (**рис. 26Б**).



**Рис. 26.** Экспрессия гена *Akt1* в среднем мозге мышей при ДИО16 (А) и *Ay/a* (Б).

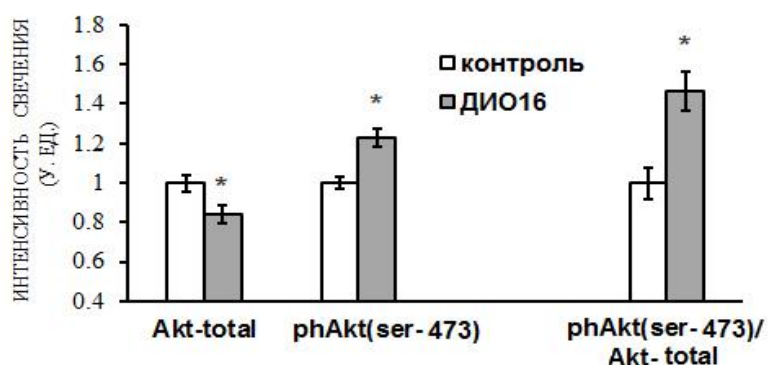
\* - достоверность отличия от соответствующего контроля ( $p < 0.05$ );  $n = 8$  в каждой группе.

Анализ двойного флуоресцентного иммуномечения также подтверждает уменьшение уровня общей формы Akt1 в 5-НТ-нейронах DRN (на 16%,  $p < 0.05$ ; **рис. 27, 28**) у мышей ДИО16.



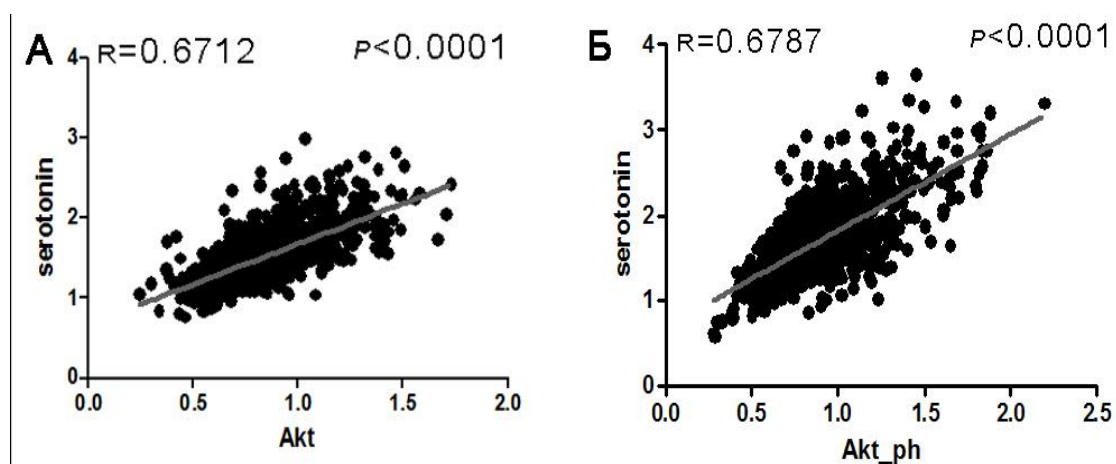
**Рис. 27.** Двойное флуоресцентное иммуномечение Akt1 в 5-НТ-нейронах DRN у контрольных (А,  $n=4$ ) и ДИО16 (Б,  $n=4$ ) мышей. Стрелки - Akt1-иммунопозитивные гранулы в телах 5-НТ-нейронов. Масштаб 25 мкм.

При этом уровень фосфорилированной по серину-473 формы Akt1, напротив, возрастал (**рис. 28, 29, 30**) на 23% ( $p < 0.05$ ). Таким образом, соотношение фосфорилированной к общей форме Akt1 возросло на 46% ( $p < 0.05$ ), что свидетельствует об ускоренном переходе общей формы Akt1 в активную фосфорилированную по серину-473 форму.

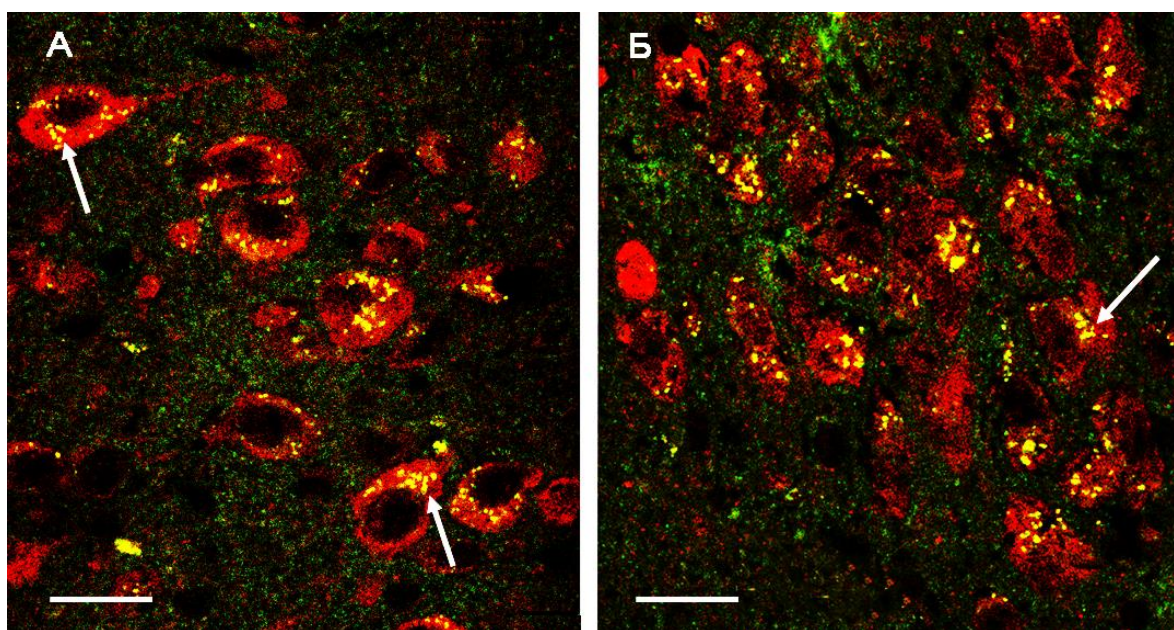


**Рис. 28.** Анализ активности Akt1 в 5-НТ-иммунопозитивных нейронах DRN у мышей при диета-индуцированном ожирении (ДИО16). \* - достоверность отличия от соответствующего контроля ( $p < 0.05$ ).

Статистический анализ свидетельствует о существовании положительной корреляции между количеством 5-НТ в нейронах DRN и содержанием в них Akt1 ( $r=0.67$ ) или ее фосфорилированной формы ( $r=0.68$ ; **рис. 29**).



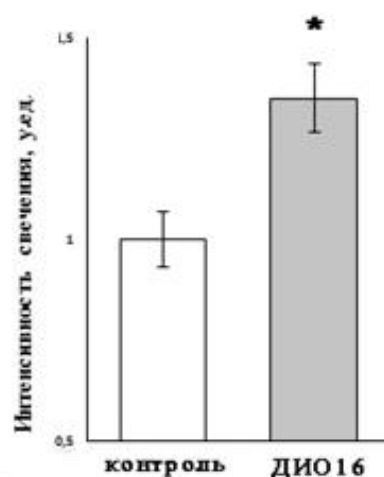
**Рис. 29.** Статистический анализ общей (А) и фосфо-формы Akt1 (Б, серин-473) в 5-НТ-нейронах DRN при ДИО16.



**Рис. 30.** Двойное флуоресцентное иммуномечение фосфо-Akt (серин-473) в 5-НТ-нейронах DRN у контрольных (А,  $n=4$ ) и ДИО16 (Б,  $n=4$ ) мышей. Стрелки указывают на фосфо-Akt1-иммунопозитивные гранулы в телах 5-НТ-нейронов. Масштаб 20 мкм.

Известно, что при ожирении запускаются нейровоспалительные процессы в мозге (Gehrmann et al., 1995; Filiano et al., 2015). Показано, что при нейровоспалении Akt1 активируется через рецепторы к нейротрофическому фактору мозга (Brain-derived

neurotrophic factor - BDNF), и, посредством фосфорилирования ряда белков, стимулирует трансляцию и наработку этого фактора. BDNF является важным фактором поддержания жизнедеятельности нейронов и их пластичности (Giacobbo et al., 2019). Анализ полученных нами данных свидетельствует о повышении уровня BDNF в нейронах DRN у мышей при ДИО16 на 35% ( $p < 0.05$ , **Рис. 31**). У мышей с меланокортиновым ожирением достоверных изменений уровня BDNF в нейронах DRN выявлено не было (1,05±0,06 у. ед. по сравнению с контрольным 1±0,07 у. ед. уровнем).

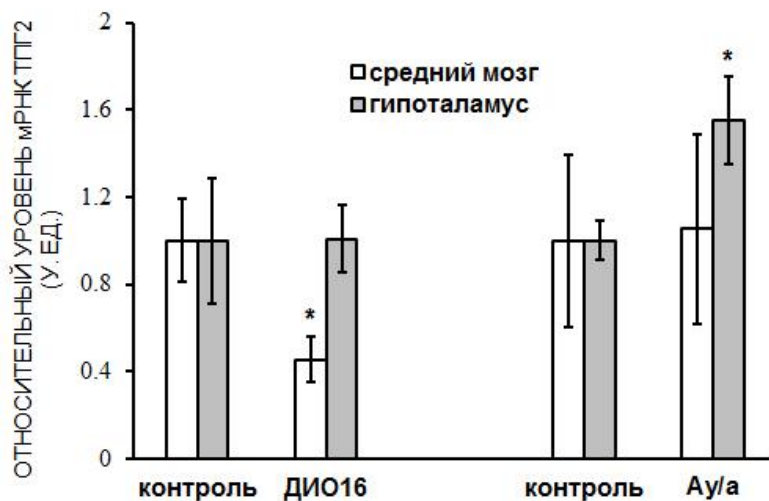


**Рис. 31.** Анализ уровня BDNF в 5-НТ-нейронах DRN мышей при ДИО16. (\*) - достоверность отличия от соответствующего контроля ( $p < 0.05$ );  $n=4$  в каждой группе.

Таким образом, при диета-индуцированном ожирении у мышей увеличение уровня фосфорилированных форм TSG2, Akt1 и BDNF можно рассматривать как компенсаторные механизмы, направленные на поддержание активности и жизнеспособности серотонинергических нейронов. Тогда как при меланокортиновом ожирении, по-видимому, работают иные механизмы компенсации.

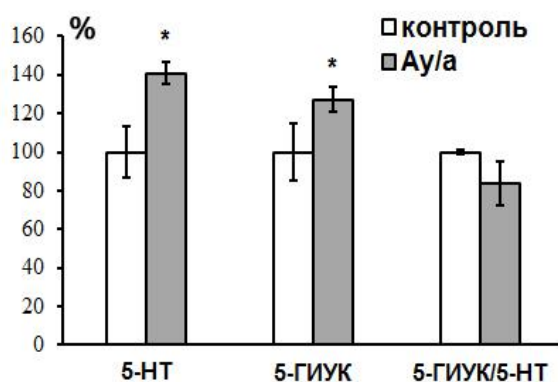
### **3.5. Анализ уровня мРНК триптофангидроксилазы-2 и серотонина в среднем мозге и гипоталамусе у мышей при ожирении**

Результаты ПЦР свидетельствуют о том, что у мышей при ДИО16 уровень мРНК TSG2 в среднем мозге уменьшается (на 55%,  $p < 0.05$ ) по сравнению с соответствующей контрольной группой (**рис. 32**), при этом в гипоталамусе не наблюдается изменений. У мышей Au/a в среднем мозге, напротив, не выявлено изменения уровня мРНК TSG2, при этом в гипоталамусе отмечается увеличение его уровня ( $p < 0.05$ ) по сравнению с соответствующим контролем (на 58 %, **рис. 32**).



**Рис. 32.** Анализ уровня мРНК ТПГ2 в среднем мозге и гипоталамусе мышей C57BL/6J при диета-индуцированном ожирении в течение 16 недель (ДИО16) и меланокортиновом ожирении у мышей Agouti yellow (Ay/a) по сравнению с соответствующим контролем, (\*) - достоверность отличий ( $p < 0.05$ );  $n=8$  в каждой группе.

Полученные результаты с одной стороны подтверждаются результатами анализа уровня белка ТПГ2 в нейронах DRN (рис. 15, 16). С другой стороны, если в среднем мозге у мышей ДИО16 экспрессия гена *Trh2* падает, то следовало бы ожидать и уменьшения уровня мРНК в гипоталамусе, так как нейроны DRN посылают проекции в гипоталамус, являясь там основным источником серотонина. Несмотря на отсутствие в среднем мозге различий как уровня экспрессии гена *Trh2*, так и белка ТПГ2 в нейронах DRN (рис. 32, 16), в гипоталамусе мышей Ay/a, напротив, выявлено увеличение уровня мРНК ТПГ2, что также подтверждается и результатами ВЭЖХ, демонстрирующими увеличение концентраций серотонина и его метаболита в гипоталамусе (рис. 33). Таким образом, остается не ясным, что является источником серотонина в гипоталамусе кроме DRN.

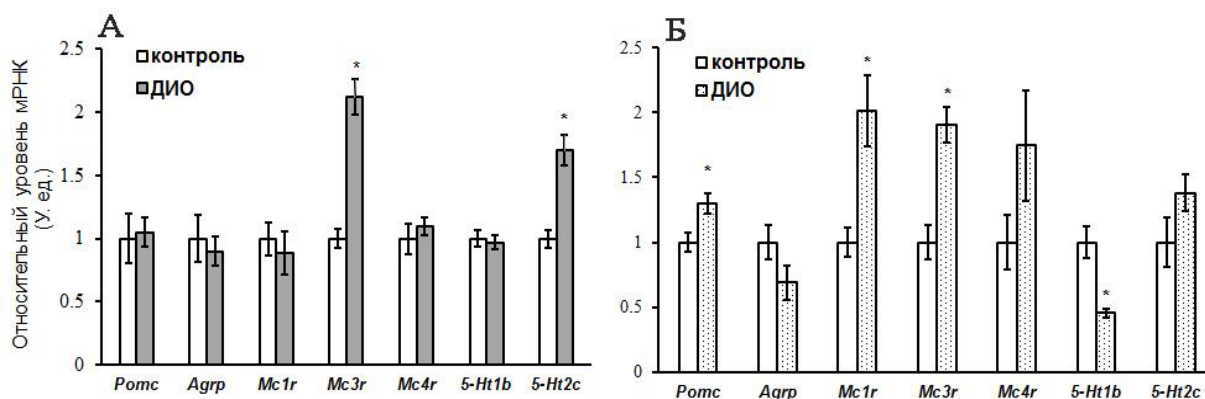


**Рис. 33.** Результаты ВЭЖХ демонстрируют содержание серотонина (5-НТ) и его метаболита гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК) в гипоталамусе мышей Ay/a при меланокортиновом ожирении ( $n=8$ ) по сравнению с контрольными C57Bl/6J мышами ( $n=7$ ) того же возраста. Данные представлены в процентах, (\*) - достоверность отличий между группами ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.6. Анализ функциональной активности нейронов гипоталамуса при ожирении

### 3.6.1. Анализ взаимодействия серотониновой системы с POMC-нейронами гипоталамуса при диета-индуцированном ожирении у мышей C57BL/6J

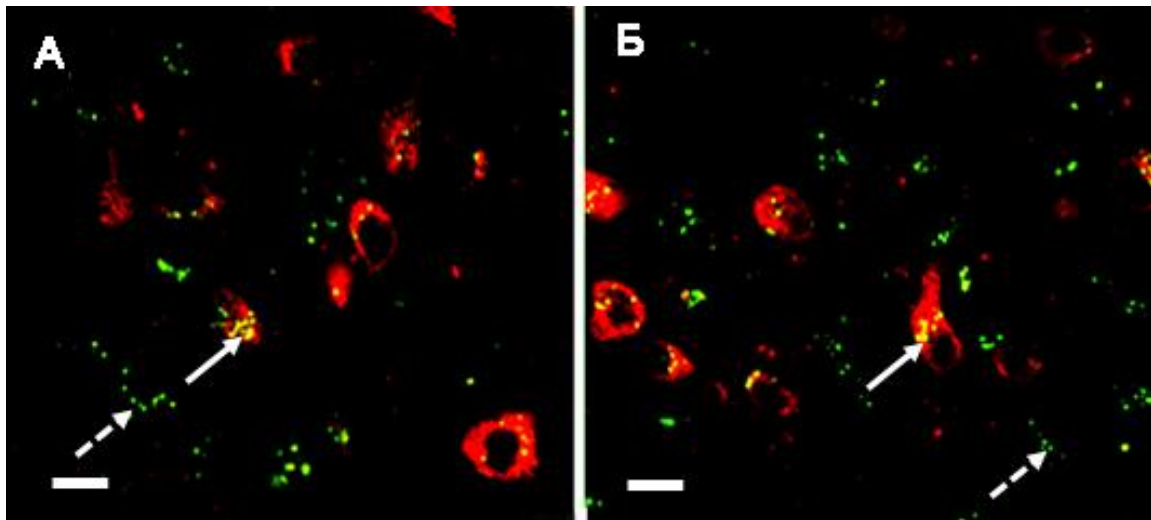
Результаты ПЦР демонстрируют в гипоталамусе мышей ДИО8 (рис. 34А) отсутствие изменения экспрессии генов, кодирующих большинство компонентов меланокортиновой сигнальной системы (*Pomc*, *Agrp*, *Mc1r*, *Mc4r*), однако экспрессия



**Рис. 34.** Анализ экспрессии генов в гипоталамусе мышей при диета-индуцированном ожирении, развивающемся в течение 8-ми (А) и 16 недель (Б). Достоверность отличий (\*) от соответствующего контроля ( $p < 0.05$ ). Результаты представлены в условных единицах (у. ед.);  $n=8$  в каждой группе.

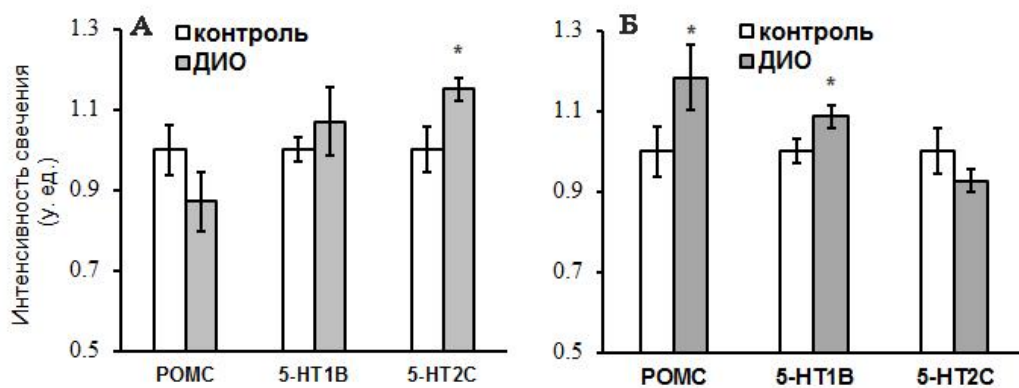
гена *Mc3r* была повышена в 2.5 раз ( $p < 0.05$ ). На этом фоне экспрессия гена *5-Ht1b* рецепторов не менялся, а экспрессия гена *5-Ht2c*, напротив, возрастала в 1.7 раз ( $p < 0.05$ ) по сравнению с ее уровнем в контроле. У мышей ДИО16 в гипоталамусе (рис. 34Б) выявлено увеличение экспрессии генов, кодирующих компоненты меланокортиновой системы: *Pomc* (на 26%,  $p < 0.05$ ), *Mc1r* (в 2.5 раз,  $p < 0.05$ ), *Mc3r* (в 2 раза,  $p < 0.05$ ); при этом наблюдалась лишь тенденция к уменьшению уровня экспрессии *Agrp* ( $p > 0.05$ ) и увеличению уровня экспрессии *Mc4r* ( $p > 0.05$ ). На этом фоне отмечается уменьшение уровня мРНК 5-НТ<sub>1В</sub>R рецепторов (на 50%,  $p < 0.05$ ) и лишь тенденция к увеличению уровня мРНК 5-НТ<sub>2С</sub>R рецепторов ( $p > 0.05$ ).

Анализ двойного флуоресцентного иммуномечения POMC-иммунопозитивных нейронов ARC у мышей ДИО8 не выявил достоверных изменений в них уровня 5-НТ<sub>1В</sub> рецепторов (рис. 35, 36А), при этом уровень 5-НТ<sub>2С</sub> рецепторов возрастал не только в POMC-нейронах (на 20%,  $p < 0.05$ ), но и в структурах ARC другой эргичности (рис. 36А, 37Б). При этом было отмечено некоторое снижение уровня POMC в нейронах ARC (рис. 36А), однако эти изменения не были статистически значимыми. У мышей ДИО16 в POMC-нейронах (рис. 36Б) выявлено увеличение уровня POMC (на 24%,  $p < 0.05$ ), что



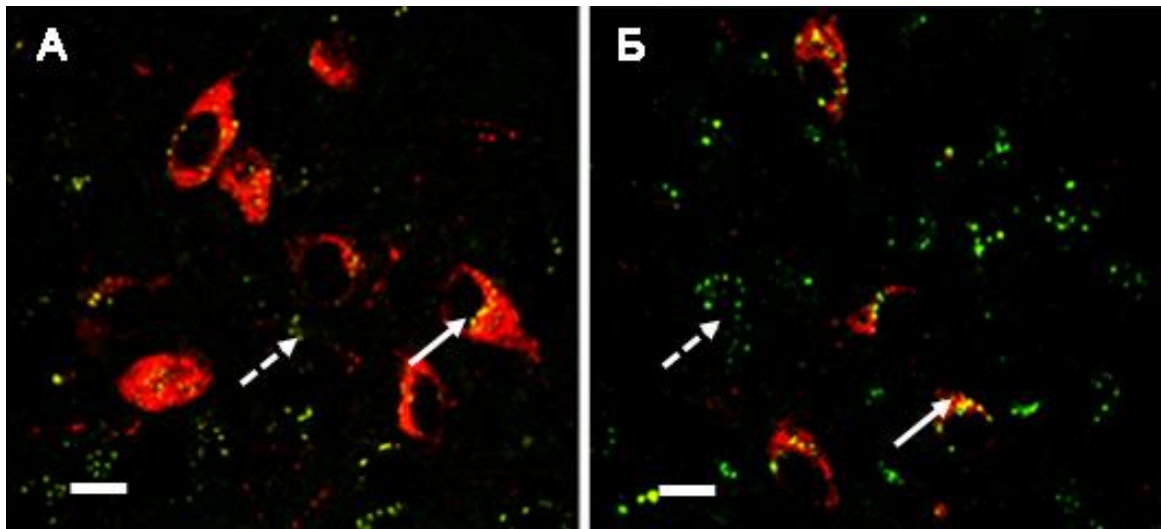
**Рис. 35.** Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание 5-НТ<sub>1В</sub>Р (зеленый) и РОМС (красный) в аркуатном ядре гипоталамуса контрольной (А, n=4) и ДИО8 (Б, n=4) мыши. Сплошные стрелки - 5-НТ<sub>1В</sub> тела РОМС-нейронов, пунктирные стрелки - 5-НТ<sub>1В</sub> в других структурах. Масштаб 10 мкм.

согласуется с результатами ПЦР (рис 34Б). Однако уровень 5-НТ<sub>1В</sub> рецепторов в РОМС-нейронах, по сравнению с результатами ПЦР, напротив, возрос (на 15%,  $p < 0.05$ ), а уровень 5-НТ<sub>2С</sub> рецепторов достоверно не менялся (рис. 36Б).



**Рис. 36.** Интенсивность свечения РОМС и рецепторов серотонина в РОМС-иммунопозитивных нейронах ARC у мышей при диета-индуцированном ожирении (ДИО) в течение 8 (А) или 16 (Б) недель. Достоверность различий (\*) по сравнению с соответствующим контролем ( $p < 0.05$ ). Данные представлены в условных единицах (у. е.);  $n=4$  в каждой группе.



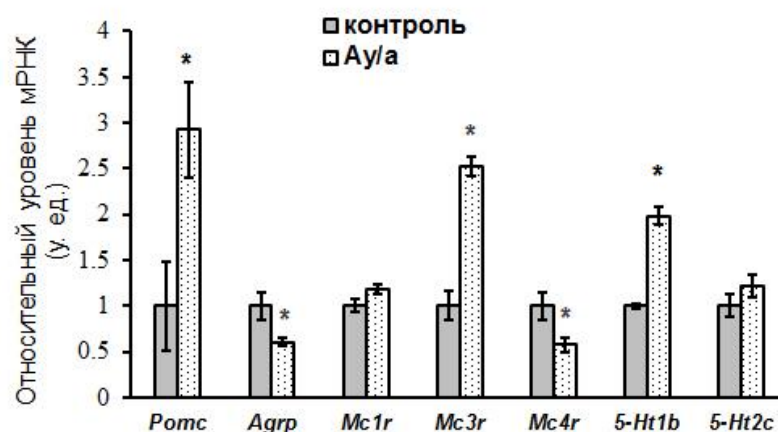


**Рис. 37.** Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание 5-НТ<sub>2c</sub>R (зеленый) и РОМС (красный) в аркуатном ядре гипоталамуса контрольной (А, n=4) и ДИО8 (Б, n=4) мышей. Сплошные стрелки - 5-НТ<sub>2c</sub>R тела РОМС-нейронов, пунктирные стрелки - 5-НТ<sub>2c</sub>R в других структурах. Масштаб 10 мкм.

Полученные данные свидетельствуют о том, что развитие ожирения у мышей сопровождается перераспределением в РОМС-нейронах АРС рецепторов серотонина.

### 3.6.2. Анализ взаимосвязи серотониновой системы с РОМС-нейронами гипоталамуса при меланокортиновом ожирении у мышей *Agouti yellow*

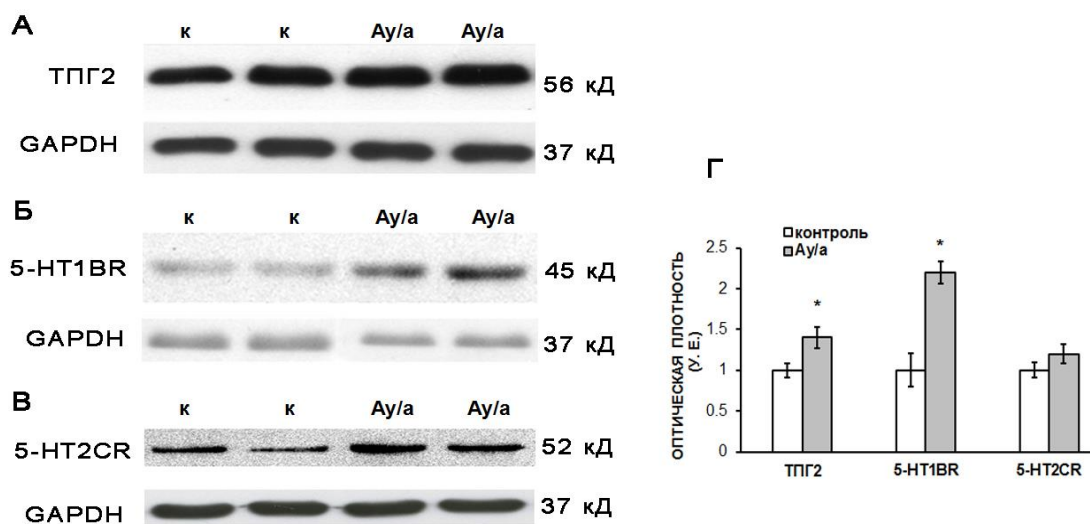
Результаты ПЦР свидетельствуют об изменении в гипоталамусе мышей *Ay/a* уровня мРНК как компонентов меланокортиновой, так и серотониновой сигнальных систем (рис. 38). Выявлено увеличение уровня мРНК РОМС (в 2.7 раз,  $p < 0.05$ ) и



**Рис. 38.** Анализ экспрессии генов в гипоталамусе мышей *Ay/a*. Достоверность отличий (\*) от соответствующего контроля ( $p < 0.05$ ). Данные представлены в условных единицах (y. ед.), n=8 в каждой группе.

MC3R (в 2.5 раз,  $p < 0.05$ ) при уменьшении уровня экспрессии 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> рецепторов (в 2 раза,  $p < 0.05$ ) при отсутствии изменений уровня мРНК 5-HT<sub>2C</sub> рецепторов (рис. 38).

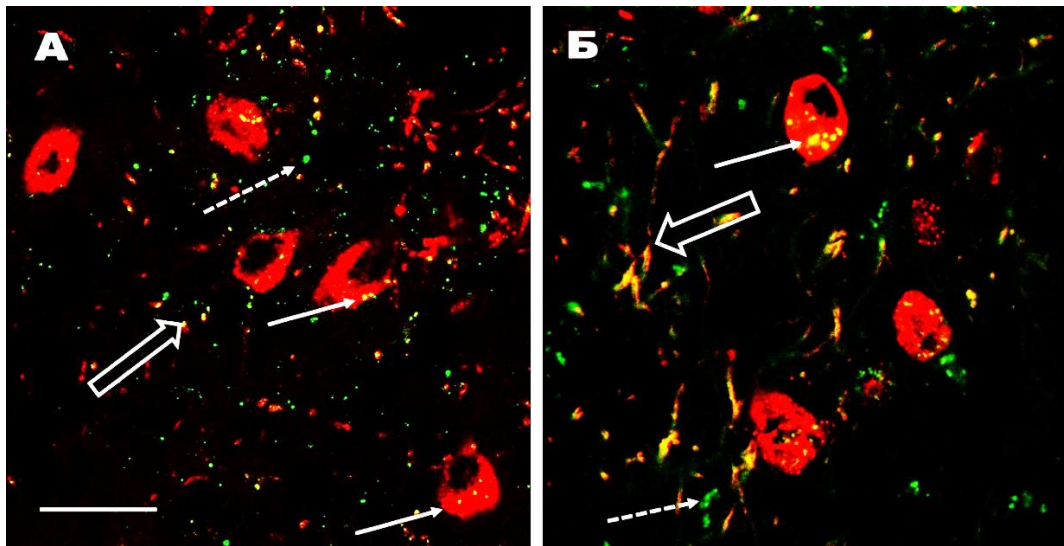
Результаты Вестерн блоттинга (рис. 39) демонстрируют увеличение у мышей Au/a в гипоталамусе уровня белка ТПГ2 (на 22%,  $p < 0.05$ ), 5-HT<sub>1B</sub>R (в 2 раза,  $p < 0.05$ ) и 5-HT<sub>2C</sub>R (на 20%,  $p \leq 0.05$ ).



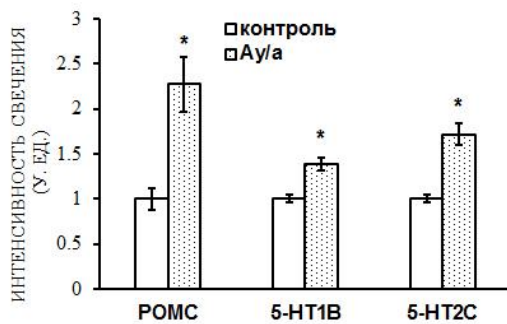
**Рис. 39.** Вестерн-блоттинга белков ТПГ2 (А), 5-HT<sub>1B</sub>R (Б) и 5-HT<sub>2C</sub>R (В) рецепторов серотонина в гипоталамусе мышей Au/a и контрольных C57Bl/6J (к); Г – количественный анализ оптической плотности, данные представлены в условных единицах (у. е.), достоверность различий (\*) между группами ( $p < 0.05$ ),  $n = 5$  в каждой группе; GAPDH – контрольный белок.

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 уровня 5-HT<sub>1B</sub> (рис. 40Б, 41), а также увеличение 5-HT<sub>2C</sub> рецепторов как в телах POMC-нейронов (на 70%,  $p < 0.05$ ), так и в структурах другой эргичности по сравнению с соответствующим контрольным уровнем (рис. 41, 42Б). На этом фоне отмечается увеличение и самого POMC в телах и отростках нейронов ARC.

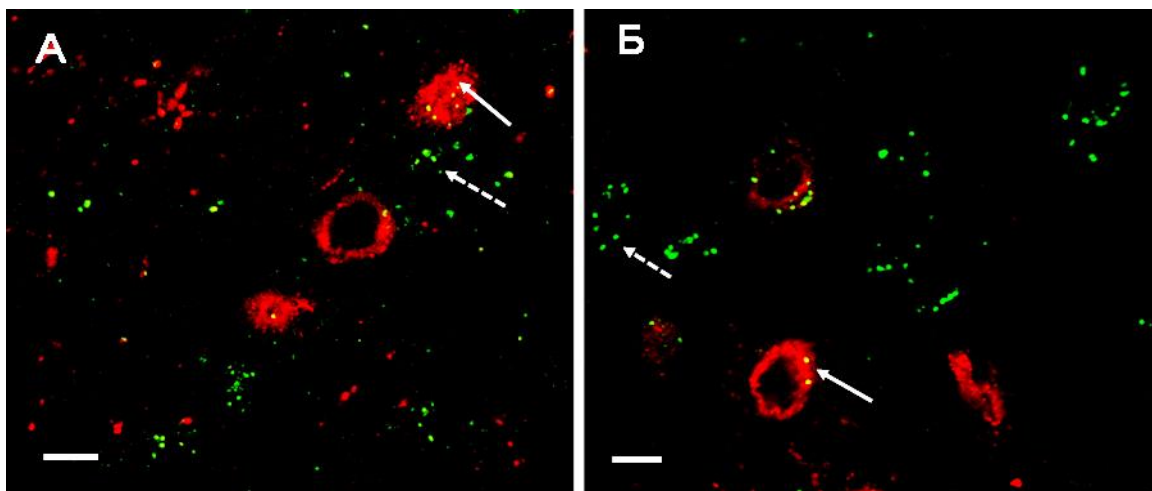
Полученные данные свидетельствуют о нарушении энергетического обмена и периферической чувствительности к лептину и инсулину у мышей с ожирением, вызванным как длительным потреблением высококалорийной пищи, так и нарушением меланокортиновой сигнализации. В случае ДИО известно, что развитие лептиновой и инсулиновой резистентности приводит к нарушению транспорта лептина и инсулина через гематоэнцефалический барьер к гипоталамическим нейронам, основным мише-



**Рис. 40.** Двойное иммуномечение 5-НТ<sub>1В</sub>R (зеленый) и РОМС (красный) в аркуатном ядре гипоталамуса контрольной (А) и Аy/a (Б) мыши. Сплошные стрелки - 5-НТ<sub>1В</sub>R телах РОМС-нейронов (желтое), фигурные стрелки - 5-НТ<sub>1В</sub>R в отростках РОМС-нейронов, пунктирные стрелки - 5-НТ<sub>1В</sub>R в других структурах. Масштаб 20 мкм.



**Рис. 41.** Интенсивность свечения рецепторов серотонина в РОМС-иммунопозитивных нейронах АРС у мышей Аy/a (n=4) по сравнению с контрольными для них мышами (генотип а/а, n=4) того же возраста. Достоверность различий (\*) между группами (p<0.05).



**Рис. 42.** Двойное иммуномечение 5-НТ<sub>2С</sub>R (зеленый) и РОМС (красный) в аркуатном ядре гипоталамуса контрольной (А) и Аy/a (Б) мыши. Сплошные стрелки - 5-НТ<sub>2С</sub>R в телах РОМС-нейронов (желтое), пунктирные стрелки - 5-НТ<sub>2С</sub>R в других структурах ядра. Масштаб 10 мкм.

ням их действия (Banks, Farrell, 2003; Banks, Owen, Erickson, 2012). Следствием этого является ослабление лептиновой и инсулиновой сигнализации в гипоталамусе, что снижает регуляторные эффекты лептина и инсулина на расход энергии, углеводный и липидный обмен (Shprakov, 2016). Результатом этого является возрастание доли жировой ткани и усугубление дислипидемии и гипергликемии, что и было выявлено нами у мышей с ДИО. В случае меланокортинового ожирения основным фактором, ведущим к метаболическим и гормональным дисфункциям, является ослабление меланокортиновых сигнальных путей в гипоталамусе, реализуемых через MC4R. Это связано с гиперпродукцией AgRP - эндогенного антагониста этих рецепторов у мышей *Ay/a* вследствие мутации в *Agouti*-локусе (Ebihara, et al., 1999; Makarova, et al., 2010). Имеются экспериментальные свидетельства того, что гипоталамические MC4R играют исключительно важную роль в контроле энергетического гомеостаза (Nogueiras, et al., 2007; Shprakov, Derkach, 2017). Нокаут гена, кодирующего MC4R, а также фармакологическое или аутоиммунное ингибирование MC4R приводят к гиперфагии, ожирению, дислипидемии, нарушенной толерантности к глюкозе, инсулиновой и лептиновой резистентности (Derkach, et al., 2014; Nogueiras, et al., 2007; Obici, et al., 2001; Shprakov, et al., 2015). К такому же результату приводят и мутации в гене, кодирующем MC4R у человека, о чем свидетельствует высокая частота обнаружения таких мутаций у пациентов с ожирением и метаболическим синдромом (Pan, et al., 2013; Тао, 2009).

Анализ уровня 5-HT<sub>1B</sub>R и 5-HT<sub>2C</sub>R в POMC- нейронах ARC свидетельствует о том, что у контрольных мышей доля 5-HT<sub>1B</sub>R в POMC-негативных нейронах ARC была выше, чем в POMC-иммунопозитивных нейронах (**рис. 35**). В случае 5-HT<sub>2C</sub>R такой закономерности выявлено не было (**рис. 37**). Эти данные хорошо согласуются с тем фактом, что 5-HT<sub>2C</sub>R играют определяющую роль в активации POMC-нейронов серотонином, в то время как 5-HT<sub>1B</sub>R осуществляют модулирующее влияние серотонина на этот эффект, и только в условиях подавления активности 5-HT<sub>2C</sub>R в ARC гипоталамуса, рецепторы 5-HT<sub>1B</sub>R могут частично компенсировать их функции (Burke et al., 2014; Doslikova et al., 2013; Martin-Gronert et al., 2016). Механизмы такой компенсации не до конца ясны, поскольку могут включать как непосредственное воздействие серотонина на POMC-нейроны через локализованные на них 5-HT<sub>1B</sub>R, так и опосредованное влияние серотонина на эти нейроны через регуляцию 5-HT<sub>1B</sub>R, локализованных на нейронах другой эргичности.

У мышей в группе ДИО8 число и распределение 5-HT<sub>1B</sub>R в POMC-нейронах существенно не менялось, в то время как число 5-HT<sub>2C</sub>R возрастало (**рис. 36А**).

Повышение числа 5-HT<sub>2C</sub>R в POMC-иммунопозитивных и POMC-иммунонегативных нейронах ARC (**рис. 37**) хорошо коррелировало с повышением экспрессии гена *5-Htr2c* в гипоталамусе у мышей ДИО8, что было показано с помощью ПЦР (**рис. 34А**).

У мышей Ау/а отмечена несколько иная картина. Содержание 5-HT<sub>1B</sub>R и 5-HT<sub>2C</sub>R в POMC-нейронах возрастало (**рис. 41**). Данные ПЦР также выявили значительное повышение экспрессии гена *5-Htr1b*, а экспрессия гена *5-Htr2c* повышалась в небольшой степени, что может быть обусловлено нейрон-специфичными изменениями в экспрессии 5-HT<sub>2C</sub>R в условиях меланокортинового ожирения (**рис. 38**).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что у мышей в условиях ожирения (ДИО8 и Ау/а) в POMC-нейронах повышается содержание 5-HT<sub>2C</sub>R, что, с учетом роли этих рецепторов в активации серотонином POMC-нейронов, может рассматриваться, как один из важнейших компенсаторных механизмов, направленных на нормализацию пищевого поведения и энергетического гомеостаза. У мышей при ДИО16 в POMC-нейронах уровень 5-HT<sub>2C</sub>R снижался, при этом 5-HT<sub>1B</sub>R, также, как и в группе Ау/а, был достоверно выше контрольного уровня (**рис. 36Б, 41**).

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

Следует отметить, что у мышей с ДИО и Ау/а в ARC как в POMC-нейронах, так и в нейронах другой эргичности, отмечено усиление дофаминовых D2-рецептор-зависимых сигнальных путей, о чем свидетельствует значительное повышение соотношения D2/D1 рецепторов дофамина (Михайлова, и др., 2018; Romanova, et al., 2018). Это может иметь большое значение для усиления гипоталамических путей D2-рецепторов, которые вовлечены в снижение активности дофаминовых сигнальных путей, гиперактивированных в условиях метаболических расстройств. В последние годы показано, что агонист рецепторов D2 бромокриптин оказывает выраженный терапевтический эффект при лечении ожирения и метаболического синдрома как в клинике, так и в экспериментальных условиях (Derkach, et al., 2017; Scranton, et al., 2010). Не исключено, что важный вклад в это вносит вызываемая бромокриптином стимуляция D2-рецепторов в ARC, в первую очередь в нейронах, экспрессирующих POMC.

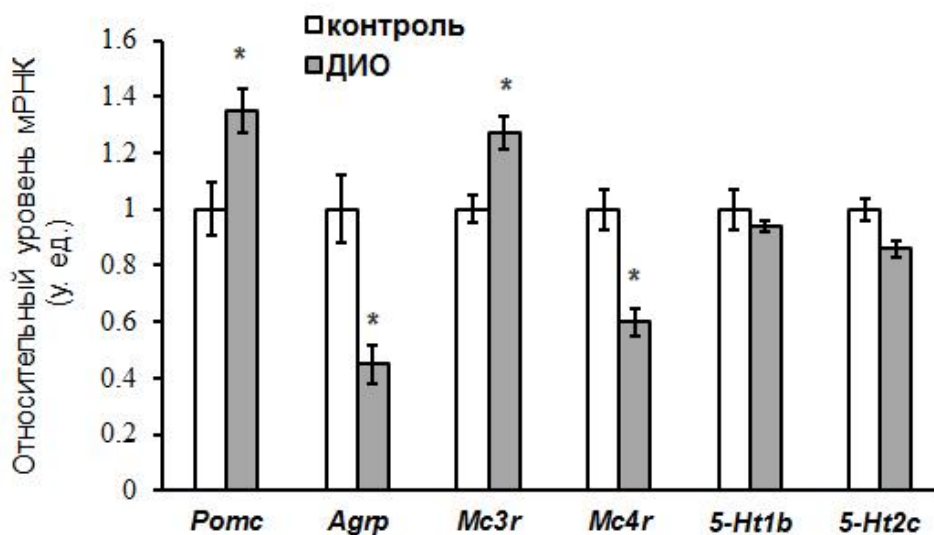
Одним из важнейших факторов, контролирующих пищевое поведение и расход энергии, является орексин-А и его сигнальные пути в гипоталамических нейронах

(Imperatore, et al., 2017; Coborn, et al., 2017). Вследствие этого, в условиях нарушения пищевого поведения и ожирения активность орексинергических нейронов и экспрессия орексина-А и основных компонентов орексиновой сигнальной системы, в первую очередь орексиновых рецепторов, может претерпевать существенные изменения (Tanno, et al., 2013; Nobunaga, et al., 2014; González, et al., 2018). Эти изменения зависят от природы и продолжительности действия факторов, вызывающих метаболические расстройства, а также от тяжести метаболических и гормональных нарушений (Chieffi, et al., 2017; Imperatore, et al., 2017; González, et al., 2018).

Ранее у мышей ДИО и Ау/а из нашего эксперимента было показано изменение активности орексинергической системы гипоталамуса (Морина и др., 2019). Было установлено, что у мышей, находящихся на высококалорийной диете, уровень орексина-А в перифорникальной области гипоталамуса и экспрессия генов препро-орексина и орексинового рецептора 1-го типа в гипоталамусе меняются в зависимости от продолжительности диеты: у мышей ДИО8 они повышаются, у мышей ДИО16 – снижались к контрольным значениям, а у мышей Ау/а выявлено снижение содержания иммунопозитивного орексина-А в перифорникальной области гипоталамуса. Это можно рассматривать как компенсаторную реакцию, развивающуюся в условиях длительного, сильно выраженного ожирения и направленную на уменьшение потребления калорий мышами Ау/а, что демонстрирует в гипоталамусе изменение соотношения орексигенных/анорексигенных факторов при метаболических расстройствах.

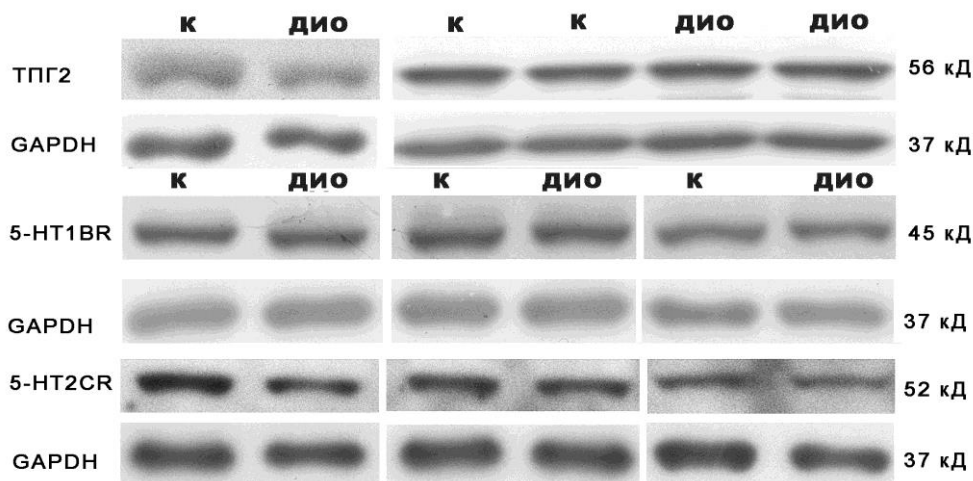
### **3.6.3. Анализ взаимодействия серотониновой системы с РОМС-нейронами гипоталамуса при диета-индуцированном ожирении у крыс Вистар**

Анализ уровня мРНК в гипоталамусе крыс при ДИО (**рис. 43**) свидетельствует об увеличении уровня РОМС (на 35%,  $p < 0.05$ ) и МС3R (на 27%,  $p < 0.05$ ), уменьшении AgRP (на 55%,  $p < 0.05$ ) и МС4R (на 40%,  $p < 0.05$ ). При этом достоверных изменений уровня мРНК 5-HT<sub>1B</sub> и 5-HT<sub>2C</sub> рецепторов выявлено не было.



**Рис. 43.** Анализ экспрессии генов в гипоталамусе крысы при диета-индуцированном ожирении. Достоверность отличий (\*) по сравнению с контролем ( $p < 0.05$ ). Данные представлены в условных единицах (у. ед.),  $n=10$  в каждой группе.

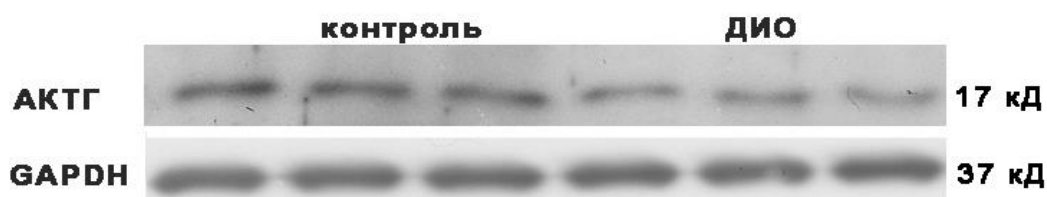
Результаты Вестерн-блоттинга свидетельствуют об отсутствии достоверных отличий уровня белка ТПГ2 у крыс ДИО по сравнению с контрольными (рис. 44). При ДИО уровень белка 5-НТ<sub>1В</sub> и 5-НТ<sub>2С</sub> рецепторов достоверно не изменялся, что согласуется с результатами ПЦР.



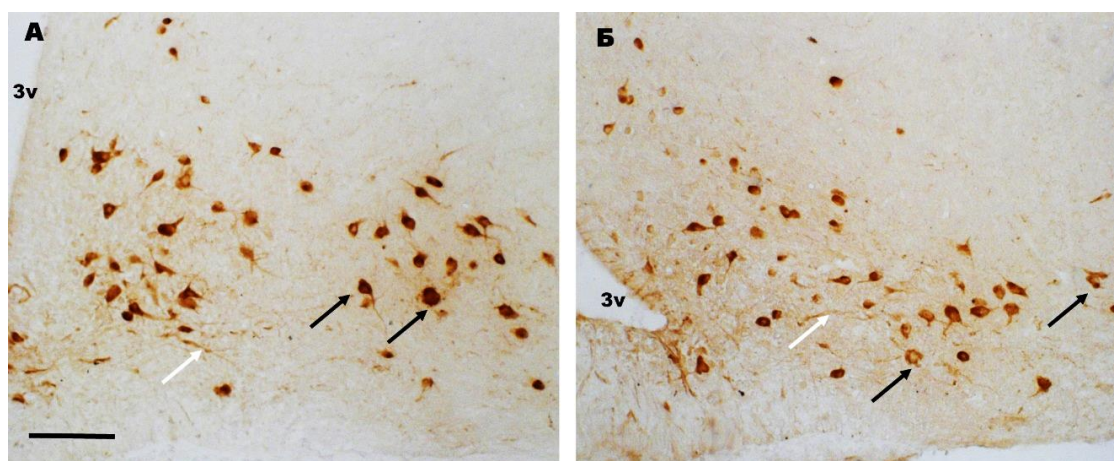
**Рис. 44.** Вестерн-блоттинг гипоталамуса крысы демонстрируют уровень белка ТПГ2, рецепторов серотонина 5-НТ<sub>1В</sub> и 5-НТ<sub>2С</sub> при диета-индуцированном ожирении (ДИО,  $n=5$ ) по сравнению с контрольными (к,  $n=5$ ) крысами. Данные представлены из разных гелей, GAPDH – контрольный белок.

При этом с помощью Вестерн-блоттинга в гипоталамусе крыс с ДИО выявлено уменьшение уровня белка АКТГ – продукта POMC (рис. 45) и предшественника  $\alpha$ -МСГ, а количественный анализ иммуногистохимических реакций (рис. 46)

свидетельствует об уменьшении оптической плотности РОМС в нейронах ARC (на 24% по сравнению с контролем,  $p < 0.05$ ).

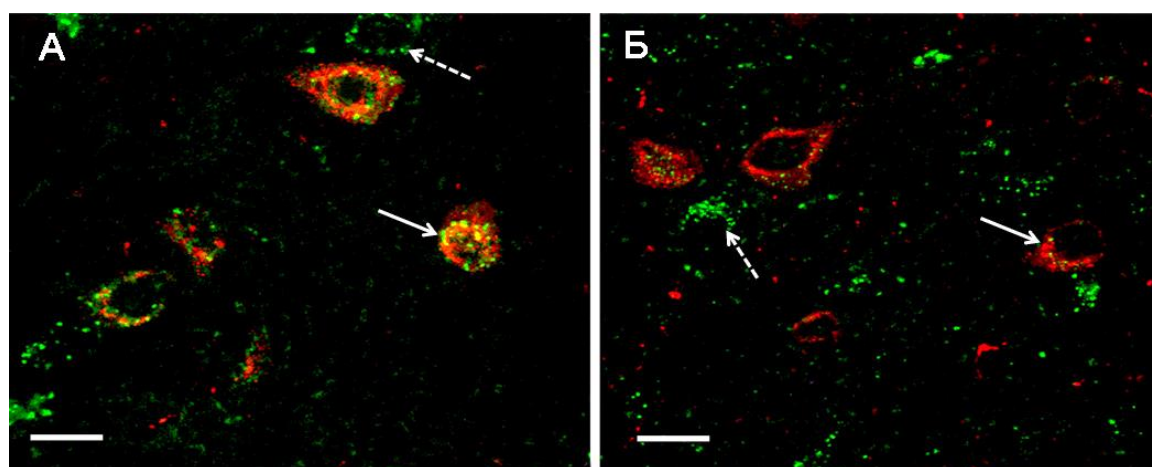


**Рис. 45.** Вестерн-блоттинг гипоталамуса крысы демонстрируют уровень белка АКТГ при диета-индуцированном ожирении (ДИО,  $n=6$ ) по сравнению с контрольными ( $n=6$ ) крысами; GAPDH – контрольный белок.



**Рис. 46.** Иммуногистохимическая реакция к РОМС в аркуатном ядре гипоталамуса у контрольных (А,  $n=5$ ) и ДИО (Б,  $n=5$ ) крыс. *Обозначения:* 3v – третий желудочек мозга, *черные стрелки* – тела РОМС-иммунопозитивных нейронов, *белые* – их отростки. Масштаб 50 мкм.

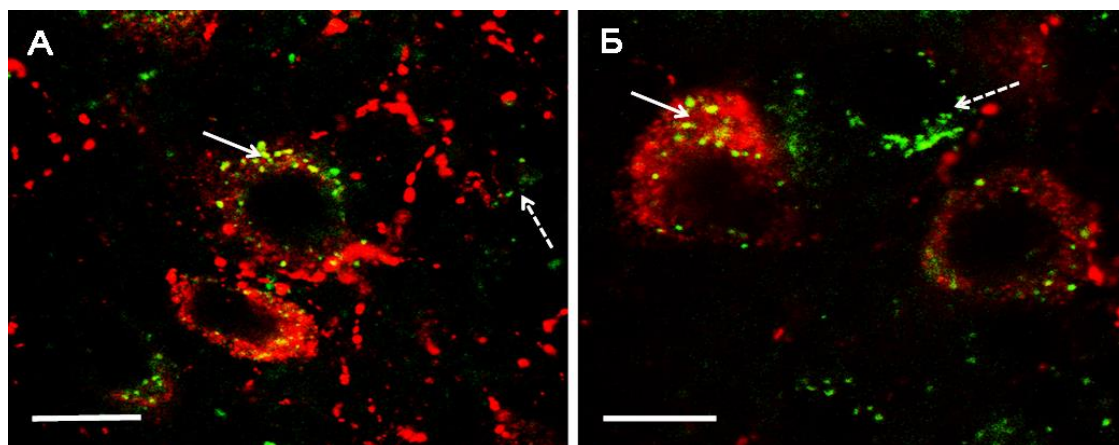
У крыс при ДИО при анализе двойного флуоресцентного иммуномечения в телах РОМС-нейронов ARC не выявлено достоверных изменений уровня 5-HT<sub>1B</sub> или 5-HT<sub>2C</sub> рецепторов (**рис. 47, 48, 49**). При этом отмечается увеличение уровня этих



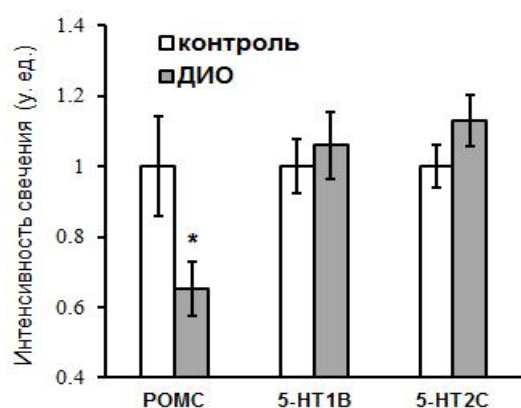
**Рис. 47.** Двойное иммуномечение 5-HT<sub>1B</sub>R (зеленый) и РОМС (красный) в аркуатном ядре гипоталамуса контрольной (А) и Ау/а (Б) мыши. Масштаб 10 мкм. *Сплошные стрелки* – рецепторы в РОМС-нейронах, *прерывистые* – в структурах другой эргичности.



рецепторов в нейронах другой эргичности в ARC. На этом фоне также отмечено уменьшение уровня POMC в нейронах (на 35%,  $p < 0.05$ ) по сравнению с контрольным уровнем (рис. 49).



**Рис. 48.** Двойное иммуномечение 5-НТ<sub>2С</sub> рецепторов (зеленый) и POMC (красный) в аркуатном ядре гипоталамуса крысы контрольной (А) и при ДИО (Б). Масштаб 10 мкм. Сплошные стрелки – рецепторы в POMC-нейронах, прерывистые – в других структурах



**Рис. 49.** Интенсивность свечения POMC и рецепторов серотонина в POMC-позитивных нейронах ARC у крыс при диета-индуцированном ожирении. Достоверность различий (\*) между группами ( $p < 0.05$ ). Результаты представлены в условных единицах (y. ed.);  $n = 4$  в каждой группе.

Представленные выше данные свидетельствуют о существовании различий в изменении меланокортиновой и серотониновой сигнализации в гипоталамусе при развитии разных форм ожирения у мышей и крыс.

При анализе результатов ПЦР при всех исследованных формах ожирения (рис. 34, 38, 43) в гипоталамусе отмечаются одинаковые изменения компонентов меланокортиновой системы: увеличение уровня мРНК POMC и MC3R, уменьшение уровня мРНК AgRP. При этом, если у крыс и мышей Au/a отмечается уменьшение уровня мРНК MC4R, то у мышей при ДИО16, напротив, уровень мРНК MC4R был повышен. Экспрессия генов серотониновых рецепторов, вовлеченных в контроль пищевого поведения (5НТ<sub>1В</sub> и 5НТ<sub>2С</sub>) в гипоталамусе зависело от типа ожирения, при этом у крыс при ДИО не было выявлено изменения их экспрессии.

Показано, что уменьшение экспрессии AgRP приводит к ослаблению аппетита вследствие снижения расхода энергии и повышения накопления жира, как запасного питательного вещества. Причем этот его эффект AgRP даже более выражен, чем его стимулирующее влияние на аппетит как орексигенного фактора (Biebermann, et al., 2012; Thomas, Xue, 2017). Нокаут гена, кодирующего AgRP, приводит к снижению аппетита и повышению энергетического обмена в периферических тканях (Thomas, et al., 2017). Регуляторные эффекты AgRP во многом связаны с ингибированием активности MC4R, локализованных в паравентрикулярном ядре гипоталамуса. К сходным результатам приводит генетическое, фармакологическое или аутоиммунное ингибирование активности MC4R (Anderson, et al., 2016; Biebermann, et al., 2012; Derkach, et al., 2014; Shpakov, Derkach, Berstein, 2015). Ранее было показано, что у крыс с ДИО из нашего эксперимента экспрессия нейропептида-Y, который продуцируется теми же нейронами, что и AgRP, не менялась, а экспрессия гена препро-орексина и уровень белка орексина-A в нейронах перифорникальной области гипоталамуса, достоверно снижалась (Романова, и др., 2018). Следует отметить, что нейропептид-Y отвечает за быстрое, но преходящее повышение аппетита, в отличие от AgRP, стимулирующее действие которого на аппетит запаздывает, но продолжается длительное время (Krashes, et al., 2013). Полученные данные указывают на то, что у крыс с ожирением нарушается динамика развития мотивации к приему пищи.

Повышение продукции орексина-A отмечается в период голодания, в то время как при избыточном потреблении пищи или при повышении ее калорийности уровень этого пептида, напротив, снижается (Huang, et al., 2007), что и было нами обнаружено у крыс, потребляющих высококалорийную кафетерий-диету (Романова, и др., 2018). Поскольку рецепторы к орексину-A выявляются в нейронах ARC и, в частности в POMC-нейронах, то это обеспечивает регуляторное влияние орексина-A на них (Morello et al., 2016; Imperatore et al., 2017; Sakurai et al., 1998). Показано, что усиление экспрессии орексиновых пептидов или введение в мозг орексина-A вызывает подавление функциональной активности POMC-нейронов и продукцию ими меланокортиновых пептидов, что и лежит в основе орексигенного влияния орексина-A (Sakurai et al., 1998; Shiraishi et al., 2000). В случае снижения уровня орексина-A в орексин-экспрессирующих нейронах или при использовании соединения SB334867, селективного антагониста орексиновых рецепторов 1-го типа отмечается, повышение активности POMC-нейронов (Haynes et al., 2000; Imperatore et al., 2017). Эти данные согласуются с полученными нами результатами о том, что на фоне снижения

продукции орексина-А нейронами перифорникальной области гипоталамуса, отмечалось повышение экспрессии POMC в ARC гипоталамуса крыс с ожирением.

Таким образом, в условиях индуцированного кафетерий-диетой ожирения в различных областях гипоталамуса запускаются компенсаторные процессы, направленные на усиление анорексигенных и подавление орексигенных влияний, что должно обеспечить ослабление гиперфагии и уменьшение негативных последствий избыточного потребления калорий. Показано, что важную роль в этом играет ослабление продукции мощного орексигенного фактора орексина-А в перифорникальной области гипоталамуса, и смещение баланса в сторону продукции активаторов MC4R в ARC.

Однако, несмотря на увеличение экспрессии *Pomc* в нашем эксперименте, уровень его продуктов (белка POMC и его продукта АКТГ – предшественника αМСГ) снижался (**рис. 45, 46, 49**), что, по-видимому, может быть связано с видоспецифичной активностью проконвертаз (ферментов процессинга POMC) в условиях гиперлипидемии и стресса эндоплазматического ретикулума (Marinho et al., 2018; Sakir I. et al., 2013).

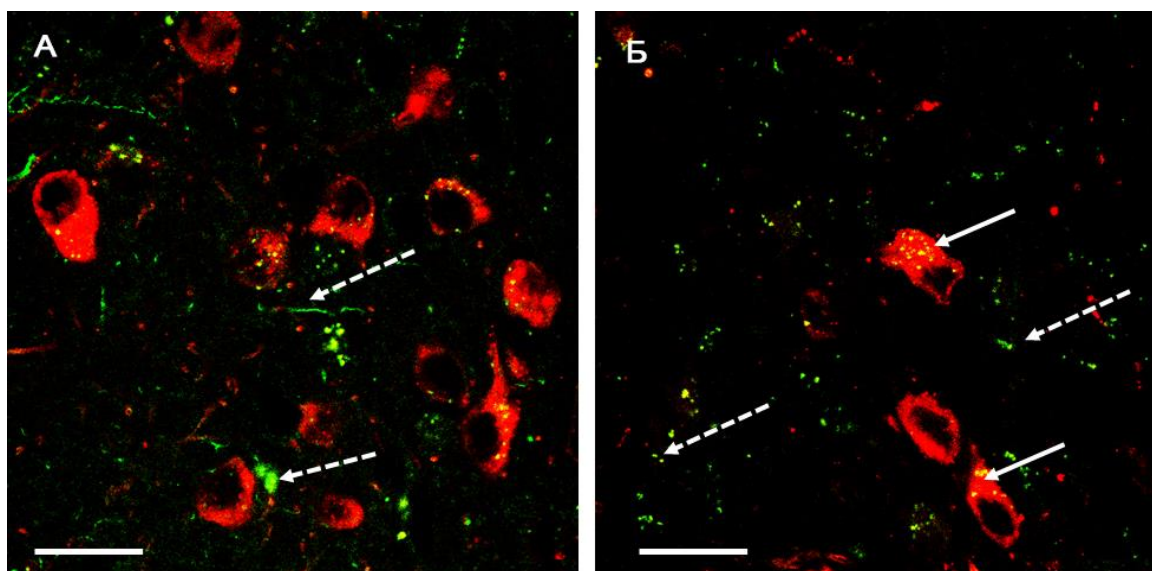
Полученные данные позволяют заключить, что изменения серотониновой сигнализации в POMC-нейронах существенно зависят от типа ожирения и факторов, которые являются его ключевыми причинами, приводящими к ожирению и МС. Следовательно, терапевтические подходы и мишени фармакологических препаратов при лечении ДИО или генетически обусловленных форм ожирения, в том числе связанных с ослаблением меланокортиновой системы, также должны различаться. Это свидетельствует о важном практическом значении изучения молекулярных изменений гормональной сигнализации, в частности серотониновой, в POMC-экспрессирующих нейронах, в условиях ожирения и других метаболических расстройств.

#### **3.6.4. Анализ экспрессии ТПГ2 в нейронах гипоталамуса при ожирении**

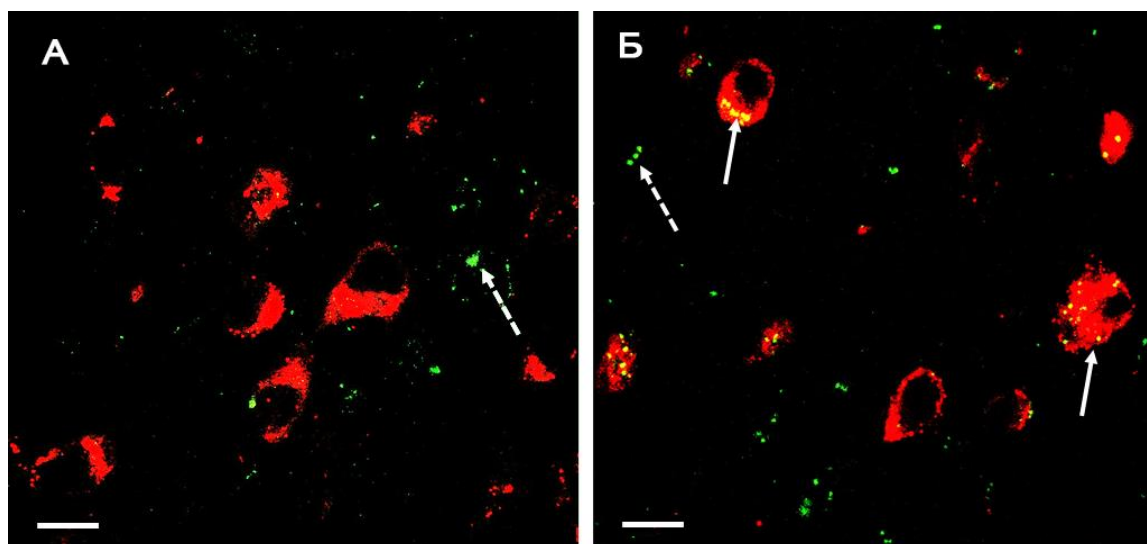
Полученные нами данные демонстрируют в гипоталамусе и среднем мозге у мышей при ДИО16 и Ау/а дисбаланс экспрессии гена *Tng2* и увеличение в гипоталамусе его белка или даже серотонина (**рис. 32, 33, 39**). В гипоталамусе крыс при ДИО отмечается отсутствие отличий или даже увеличение уровня белка ТПГ2 по сравнению с уровнем в контроле (**рис. 44**). Ранее мРНК ТПГ2 кроме DRN выявлена и в других структурах мозга (VTA, амигдале, гиппокампе, и др.), но в значительно меньших количествах (Carkaci-Salli, et al., 2011). Для того, чтобы ответить на вопрос о возможных источниках ТПГ2 в гипоталамусе мы провели двойное флуоресцентное

иммуномечение ТПГ2 с различными маркерами нейронов, локализованных в гипоталамусе.

Полученные результаты демонстрируют очень слабую иммуноэкспрессию ТПГ2 в POMC-нейронах ARC у контрольных мышей (рис. 50А, 51А), а также увеличение уровня этого фермента при разных формах ожирения (рис. 50Б, 51Б).

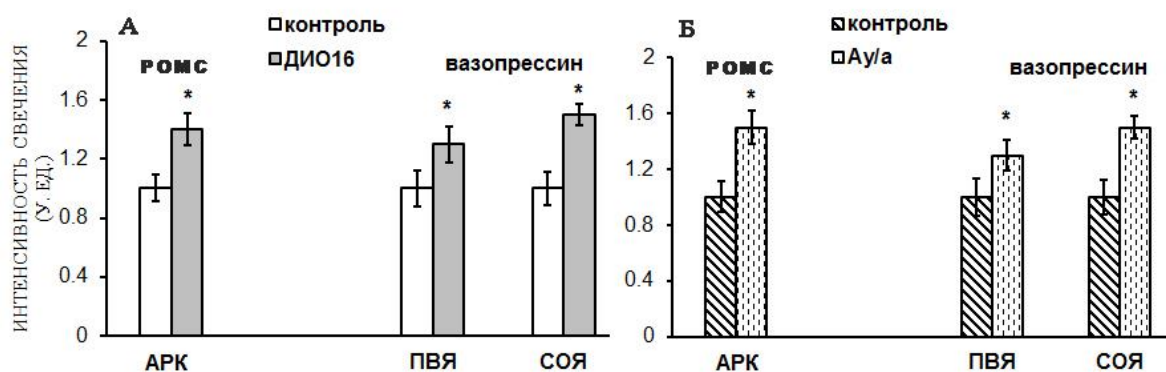


**Рис. 50.** Двойное флуоресцентное иммуномечение POMC (красный) и ТПГ2 (зеленый) в аркуатном ядре гипоталамуса мыши C57Bl/6J: А – контроль, Б – при диета-индуцированном ожирении. Сплошные стрелки – ТПГ2 в телах POMC-иммунопозитивных нейронов, пунктирные стрелки – в структурах другой эргичности. Масштаб 20 мкм.



**Рис. 51.** Двойное флуоресцентное иммуномечение POMC (красный) и ТПГ2 (зеленый) в аркуатном ядре гипоталамуса мыши: А – контроль (генотип a/a) и Б - Agouti yellow (генотип Ay/a). Сплошные стрелки – ТПГ2 в телах POMC-иммунопозитивных нейронов, пунктирные стрелки – в структурах другой эргичности. Масштаб 10 мкм.

Аналогичные изменения в POMC-нейронах ARC выявлены и у крыс с ДИО. Увеличение уровня ТПГ2 у мышей при ожирении также выявлено в вазопрессинергических нейросекреторных клетках паравентрикулярного и супраоптического ядер гипоталамуса, в орексинергических нейронах перифорникальной области, в тирозингидроксилаза-иммунопозитивных нейронах ARC и, по-видимому, и в других типах нейронов в гипоталамусе. Результаты количественного анализа уровня ТПГ2 в POMC- и вазопрессин-иммунопозитивных нейронах приведены на **рис. 52**.



**Рис. 52.** Интенсивность свечения триптофангидроксилазы-2 в POMC- и вазопрессин-иммунопозитивных нейронах гипоталамуса мышей с ДИО16 (**А**) и с генетически обусловленным меланокортиновым ожирением (мыши Au/a, **Б**) ARC, ПВЯ и СОЯ - аркуатные, паравентрикулярные и супраоптические ядра гипоталамуса. Данные представлены в условных единицах (у. ед.). Достоверность различий (\*) между группой с ожирением и соответствующим контролем ( $p < 0.05$ );  $n = 5$  в каждой группе.

Полученные данные свидетельствуют об увеличении уровня ТПГ2 в POMC-нейронах ARC у мышей ДИО16 на 40% ( $p < 0.05$ ) (**рис. 52А**) и у мышей Au/a на 50% ( $p < 0.05$ ) (**рис. 52Б**) по сравнению с соответствующим контрольным уровнем.

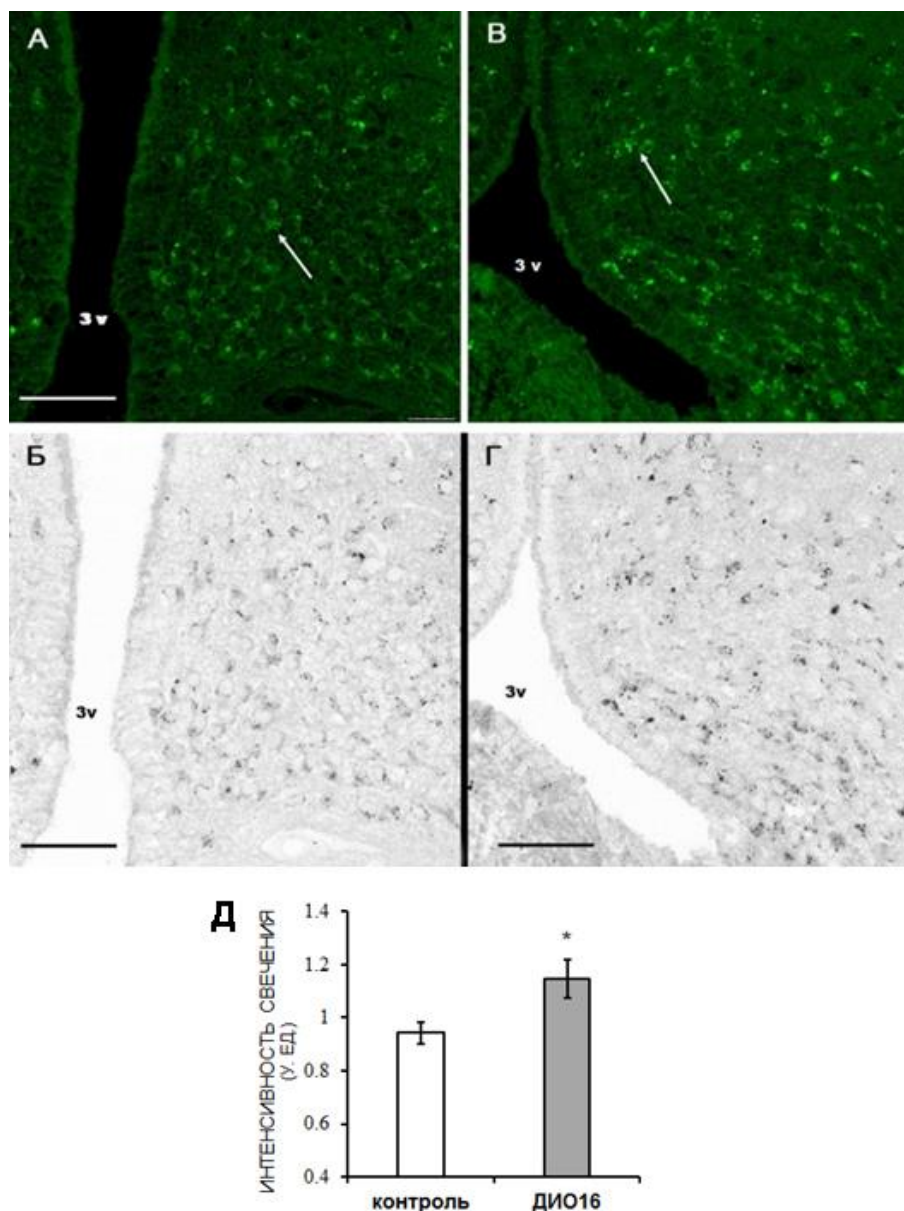
Имеющиеся в литературе сведения о наличии активности ТПГ2 и присутствии иммунопозитивных к этому ферменту гранул в гипоталамусе не позволяют ответить на вопрос – является ли это результатом локализации ТПГ2 в отростках и окончаниях серотонинергических нейронов среднего мозга или это указывает на присутствие в гипоталамусе нейронов различной эргичности, способных экспрессировать ТПГ2 (Deguchi, Barchas, 1972; Clark. et al., 2008). Полученные данные свидетельствуют о том, что в различных гипоталамических структурах фермент ТПГ2 может быть локализован не только в отростках и окончаниях нейронов среднего мозга (изолированные иммунопозитивные гранулы к ТПГ2), но и в гипоталамических нейронах, экспрессирующих различные гипоталамические нейрогормоны – POMC, прекурсор меланокортиновых пептидов, вазопрессин и др.

Повышение экспрессии ТПГ2 в гипоталамических нейронах может быть обусловлено необходимостью усиления серотониновой регуляции в гипоталамусе в условиях ожирения, направленной на снижение потребления высококалорийной пищи при ДИО и на ослабление орексигенных влияний, вызванных подавлением меланокортинового сигналинга в гипоталамусе при гиперэкспрессии агути-сигнального пептида, антагониста меланокортиновых рецепторов, у агути-мышей. Это согласуется с ролью серотонина, как нейрого르몬а, ослабляющего орексигенные каскады в гипоталамусе (Burke, et al., 2014; Shprakov, Derkach, Berstein, 2015). Как было показано нами, в условиях ДИО и меланокортинового ожирения в гипоталамусе также повышается экспрессия серотониновых рецепторов 1В- и 2С-подтипов, в том числе на РОМС-иммунопозитивных нейронах, что также указывает на компенсаторное усиление серотонинового сигналинга в условиях ожирения (Михайлова, и др., 2019). Интраназальное введение крысам с ДИО серотонина или совместное введение мышам агонистов серотониновых рецепторов 1В- и 2С-подтипов снижает у них потребление пищи, что приводит к снижению массы тела животных и в случае ДИО-крыс нормализует их метаболические показатели (Derkach, et al., 2015; Doslikova, et al., 2013).

Таким образом, в гипоталамусе мышей проведен анализ экспрессии гена, кодирующего ТПГ2, а с помощью двойного иммуномечения впервые показана локализация этого фермента в РОМС-иммунопозитивных нейронах ARC и в вазопрессин-иммунопозитивных нейронах паравентрикулярных и супраоптических ядер гипоталамуса. При ДИО и меланокортиновом ожирении количество ТПГ2-иммунопозитивных гранул в РОМС- и вазопрессин-иммунопозитивных нейронах повышалось, хотя экспрессия гена *Trh2* повышалась только у Ау/а мышей. В среднем мозге у мышей ДИО содержание ТПГ2 снижалось, в то время как у Ау/а мышей оно не менялось. Эти результаты свидетельствуют о важной роли синтезируемого в гипоталамусе серотонина, который совместно с серотонином, поступающим в гипоталамус из среднего мозга, вовлечен в компенсаторные изменения гипоталамического сигналинга у мышей с ожирением и ассоциированными с ним метаболическими и гормональными расстройствами. Обнаружение гипоталамических ТПГ2-иммунопозитивных нейронов различной эргичности, способных синтезировать серотонин, указывает на существование новых механизмов аутокринной и паракринной серотониновой регуляции в гипоталамусе, в том числе реализуемых при ожирении.

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

Нами было показано увеличение в гипоталамусе уровня мРНК MC1R в 2.5 раз ( $p < 0.05$ ) у мышей при ДИО16 (рис. 34Б), в отличие от мышей ДИО8 и Ау/а, у которых уровень мРНК MC1R в гипоталамусе не менялся (рис. 34А, 38). Также у мышей ДИО16 в гипоталамусе было выявлено увеличение на 26% ( $p < 0.05$ ) уровня мРНК POMC (рис. 34Б). Нами было проведено флуоресцентное иммуномечение MC1R в гипоталамусе мышей ДИО16 (рис. 53 А-Г). Анализ интенсивности свечения MC1R в гипоталамусе у

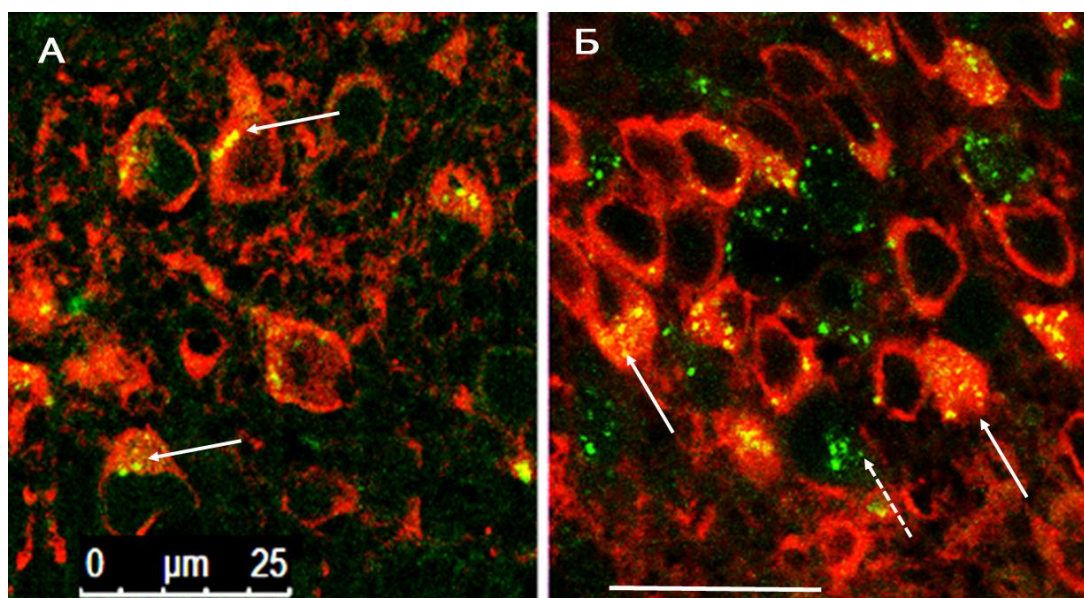


**Рис. 53.** Флуоресцентное иммуномечение MC1R в аркуатном ядре гипоталамуса (зеленый) у контрольных (А, Б) и при диета-индуцированном 16 недель ожирении (В, Г) мышей. Б и Г – инвертированное изображение. Обозначение: 3 v – третий желудочек мозга, масштаб 50 мкм. Д – количественный анализ интенсивности свечения, (\*) - достоверность различий по сравнению с контролем ( $p < 0.05$ );  $n=4$  в каждой группе.

мышей ДИО16 подтверждают данные ПЦР и свидетельствуют об увеличении уровня белка MC1R и, в частности, в ARC на 22% ( $p < 0.05$ ) по сравнению с контрольным уровнем (рис. 53Д).

На фоне увеличения в гипоталамусе мышей ДИО16 уровня мРНК POMC (рис. 34Б) отмечается и увеличение уровня белка POMC в нейронах ARC на 24% ( $p < 0.05$ ) по сравнению с контрольным уровнем (рис. 36Б).

Анализ двойного флуоресцентного иммуномечения свидетельствует об увеличении уровня MC1R как в POMC-иммунопозитивных нейронах, так и в нейронах другой эргичности ARC при ДИО16 (рис. 54). Количественный анализ выявил увеличение уровня MC1R в POMC-иммунопозитивных нейронах в 2 раза (до  $2.2 \pm 0.2$  у. ед.,  $p < 0.05$ ) по сравнению с уровнем контроля ( $1.0 \pm 0.3$  у. ед.).

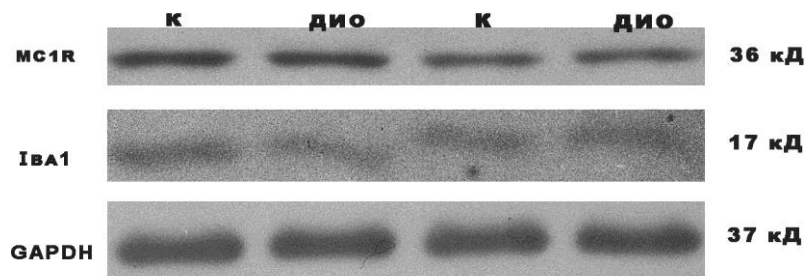


**Рис. 54.** Двойное флуоресцентное иммуномечение MC1R (зеленый) и POMC (красный) в аркуатном ядре гипоталамуса мыши: А – контроль ( $n=4$ ), Б – при диет-индуцированном 16 недель ожирении ( $n=4$ ). Сплошные стрелки – MC1R, локализованные в телах POMC-иммунопозитивных нейронов, пунктирные стрелки – MC1R в структурах другой эргичности. Масштаб 25 мкм.

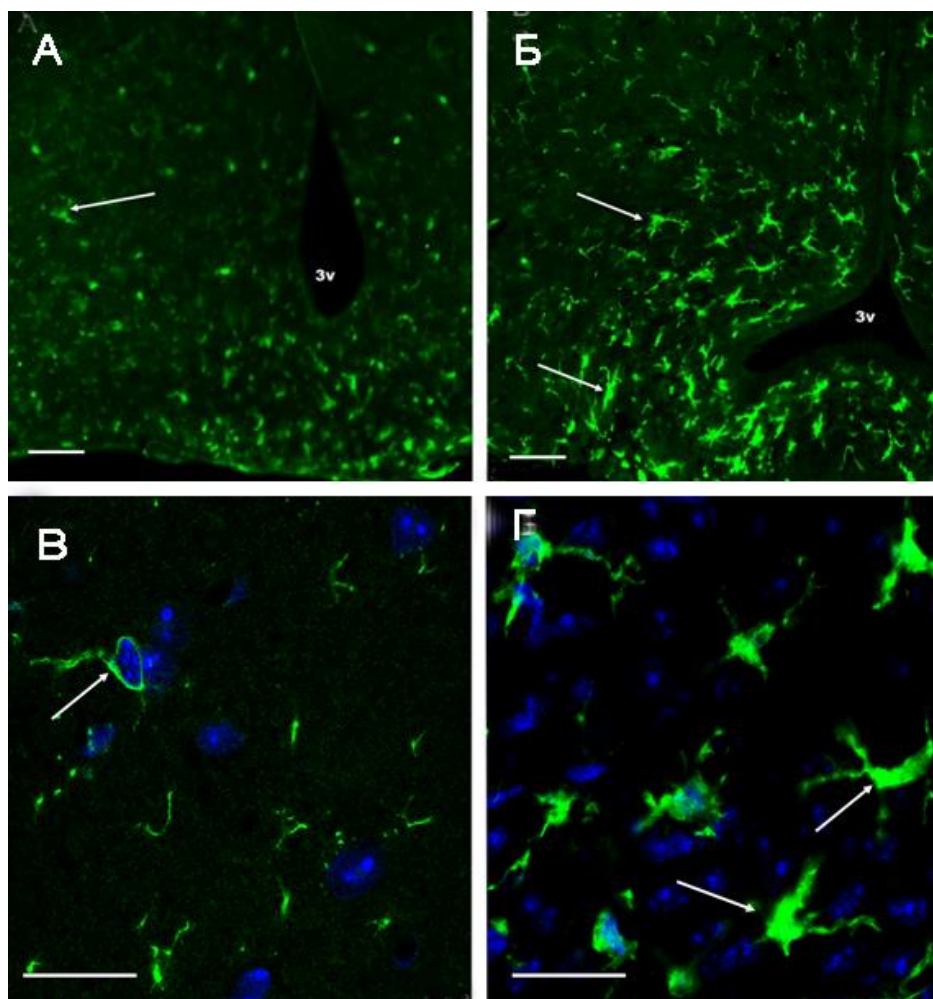
У крыс при ДИО несмотря на то, что уровень мРНК POMC в гипоталамусе был достоверно выше контрольного уровня (рис. 43), оптическая плотность POMC в нейронах ARC, напротив, достоверно снижалась (рис. 46, 49). При этом результаты Вестерн-блоттинга не выявили отличия уровня MC1R в гипоталамусе крыс при ДИО (рис. 55). С учетом данных об участии MC1R в воспалительных процессах и, в частности, в реакциях нейровоспаления (Xu, et al., 2019), нами были проведены



иммуногистохимические реакции в гипоталамусе к белку Iba1 – маркеру микроглии. Анализ препаратов с флуоресцентным иммуномечением свидетельствует о повышении в ARC у мышей при ДИО16 (рис. 56 Б, Г) по сравнению с контрольными мышами (рис. 56 А, В) количества Iba1-иммунопозитивных клеток (до  $165 \pm 17$  по сравнению с  $102 \pm 17$



**Рис. 55.** Вестерн-блоттинга демонстрируют в гипоталамусе крысы при ДИО (n=5) уровень белка MC1R и Iba1 по сравнению с контролем (к, n=5); GAPDH – контрольный белок.



**Рис. 56.** Аркуатное ядро гипоталамуса мыши, флуоресцентное иммуномечение Iba-1 (зеленый) в контроле (А, В, n=4) и при диета индуцированном 16 недель ожирении (Б, Г, n=4). Синее – ядра клеток (В, Г – DAPI). Стрелки указывают на тела Iba-1-иммунопозитивных клеток. Обозначение: 3v – третий желудочек мозга, масштаб 50 мкм (А, Б) и 20 мкм (В, Г).

в контроле,  $p < 0.05$ ) и об увеличении в них толщины и количества выявляемых отростков, заполненных иммунопозитивным веществом. Интенсивность свечения Iba1 в телах иммунопозитивных клеток возрастала на 32% ( $p < 0.05$ ) по сравнению с ее уровнем у контрольных мышей. В гипоталамусе крыс при ДИО не было выявлено изменений уровня белка Iba1 по сравнению с контрольными крысами (**рис. 55**). Такие отличия с мышами-ДИО16, по всей видимости, могут быть обусловлены видоспецифичностью. Мы предполагаем, что у крыс подобные патологические изменения проявляются на более поздних сроках ожирения.

В настоящее время в литературе обсуждается вопрос о протективных 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, может быть направлено на реализацию протективных свойств меланокортиновых пептидов.

## 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. Проекция 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 (Doslikova 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 ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Багинская Н.В., Макарова Е.Н., Бажан Н.М. Морфологические характеристики состояния ткани печени и белого жира в процессе развития меланокортинового ожирения у самок мышей линии C57Bl/6J, мутантных по гену *Agouti yellow* // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2007. Т. 93. № 3. С. 318–328.
2. Бажан Н.М., Яковлева Т.В., Багинская Н.В., Шевченко А.Ю., Макарова Е.Н. Изменения углеводно-жирового обмена в ходе развития меланокортинового ожирения у мышей с мутацией *Agouti yellow* // Росс. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 2005. Т. 91. № 12. С. 1445-1454.
3. Бохан Н. А., Иванова С. А., Левчук Л. А. Серотониновая система в модуляции депрессивного и аддитивного поведения // Н. А. Бохан, С. А. Иванова, Л. А. Левчук. Томск: Изд-во «Иван Фёдоров», 2013. 102 с.
4. Ещенко Н.Д. Биохимия психических и нервных болезней. Избранные разделы: Учебное пособие // Н.Д. Ещенко. СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2004. 200 с.
5. Зорина В.В. Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР). Методическое пособие. ДНК-технология. М. 2012. - [www.dna-technology.ru](http://www.dna-technology.ru)
6. Михайлова Е.В., Романова И.В., Деркач К.В., Бондарева В.М., Шпаков А.О. Количество и локализация серотониновых и дофаминовых рецепторов на гипоталамических проопиомеланокортин-иммунопозитивных нейронах мышей и их изменения при диета-индуцированном и меланокортиновом ожирении // Рос. Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2018. Т. 104. № 6. С. 683–691. DOI: 10.7868/S0869813918060114.
7. 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 покрывке среднего мозга у мышей // Ж. эвол. биохим. физиол. 2019. Т.55 (4). С. 60-68.
8. Михрина А.Л. Роль агути-подобного пептида в регуляции дофаминергических и норадренергических нейронов мозга: Автореф. дис. канд. биологических наук. СПб. 2015. 24 с. <http://iephb.ru/wp-content/uploads/referat43.pdf>
9. Михрина А.Л., Чернышев М.В., Михайлова Е.В., Савельева Л.О., Романова И.В. Участие агутиподобного пептида в регуляции двигательной активности // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2018. Т. 104 (7). С. 769-779.

10. Ребикова Д.В., Саматов Г.А., Д.Ю. Трофимов, Семенов П.А., Савилова А.М., Кофиади И.А., Абрамов Д.Д. ПЦР в «реальном времени». М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. 223 с
11. Розенкранц А.А., Слестникова Т.А., Дурыманов М.О., Соболев А.С. Меланокортиновые рецепторы первого типа и меланома // Биохимия. 2013.Т. 78 (11). С. 1564 – 1575.
12. Угрюмов М.В. Механизмы нейроэндокринной регуляции // М.В. Угрюмов. М.: Наука, 1999. 299 с.
13. Филаретов А.А. Закономерности функционирования гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы // Успехи физиологических наук. 1993. Т. 24. № 2. С. 70-83.
14. Шпаков А.О. Гормональные системы мозга и сахарный диабет 2-го типа // А.О. Шпаков, К.В. Деркач. СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2015. 252 с.
15. Шпаков А.О., Деркач К.В., Жарова О.А., Шпакова Е.А. Функциональная активность аденилатциклазной системы в мозге крыс с метаболическим синдромом, вызванным иммунизацией пептидом 11-25 меланокортинового рецептора 4-го типа // Нейрохимия. 2015. Т. 32 (1). С. 37-47.
16. Abdel-Malek Z.A., Scott M.C., Furumura M., Lamoreux M.L., Ollmann M., Barsh G.S., Hearing V.J. The melanocortin 1 receptor is the principal mediator of the effects of agouti signaling protein on mammalian melanocytes // J.Cell Sci. 2001. V. 114 (5). P. 1019-1024.
17. Aloisi F. Immune function of microglia // Glia. 2001. V. 36 (2). P.165-179.
18. Argiolas A., Melis M., Murgia S., Schioth H. ACTH- and alpha-MSH-induced grooming, stretching, yawning and penile erection in male rats: site of action in the brain and role of melanocortin receptors // Brain Res. Bull. 2000. V. 51 (5). P. 425-431.
19. Asai M., Ramachandrapa S., Joachim M., Shen Y., Zhang R., Nuthalapati N., Ramanathan V., Strohlic D.E., Ferket P., Linhart K., Ho C., Novoselova T.V., Garg S., Ridderstrale M., Marcus C., Hirschhorn J.N., Keogh J.M., O'Rahilly S., Chan L.F., Clark A.J., Farooqi I.S., Majzoub J.A. Loss of function of the melanocortin 2 receptor accessory protein 2 is associated with mammalian obesity // Science. 2013. V. 341. P. 275–278.
20. Bagnol D., Lu X.Y., Kaelin C.B., Day H.E., Ollmann M., Gantz I., Akil H., Barsh G.S., Watson S.J. Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between Agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain // J Neurosci. 1999. V.19 (18). RC26.

21. Baldini G., Phelan K. D. The melanocortin pathway and control of appetite-progress and therapeutic implications // *Journal of Endocrinology*. 2019. V. 241. P. 1-33.
22. Banik U., Wang G.A., Wagner P.D., Kaufman S. Interaction of phosphorylated tryptophan hydroxylase with 14-3-3 proteins // *J. Biol. Chem.* 1997. V.272. P.26219–26225.
23. Bard J.A., Zgombick J., Adham N., Vaysse P., Branchek T.A., Weinshank R.L. Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT7) positively linked to adenylate cyclase // *The Journal of Biological Chemistry*. 1993. V. 268 (31). P. 23422–23426.
24. Barnes N.M., Sharp T.A review of central 5-HT receptors and their function // *Neuropharmacology*. 1999. V.38 (8). P.1083–1152.
25. Barnes N. M., Hales T. G., Lummis S. C. R., Peters J. A. The 5-HT3 Receptor--The Relationship Between Structure and Function // *Neuropharmacology*. V. 56 (1). P. 273-284.
26. Benjamins J. A., Nedelkoska L., Lisak R. P. Melanocortin receptor subtypes are expressed on cells in the oligodendroglial lineage and signal ACTH protection // *J. Neuro. Res.* 2018. V. 96 (3). P. 1–9.
27. Benjannet S., Rondeau N., Day R., Chretien M., Seidah N.G. PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88 (9). P. 3564-3568.
28. Bennett H.P. Biosynthetic fate of the amino-terminal fragment of pro-opiomelanocortin within the intermediate lobe of the mouse pituitary // *Peptides*. 1986. V. 7. P. 615–622.
29. Bicknell A.B. The tissue-specific processing of pro-opiomelanocortin // *J. Neuroendocrinol.* 2008. V. 20 (6). P. 692-699.
30. Birch N.P., Estivariz F.E., Bennett H.P., Loh Y.P. Differential glycosylation of N-POMC1-77 regulates the production of gamma 3-MSH by purified pro-opiomelanocortin converting enzyme. A possible mechanism for tissue-specific processing // *FEBS Lett.* 1991. V. 290. P.191-194.
31. Bortolato M., Pivac N., Seler D.M., Perkovic M.N., Pessia M., Giovanni G.Di. The role of serotonergic system at the interface of aggression and suicide // *Neuroscience*. 2013. V. 236. P. 160–185.
32. Boston B.A., The role of melanocortins in adipocyte function // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1999. V. 885. P. 75–84.
33. Boston, B.A., Cone, R.D. Characterization of melanocortin receptor subtype expression in murine adipose tissues and in the 3T3-L1 cell line // *Endocrinology*. 1996. V. 137 (5). P. 2043–2050.



34. Breit A., Wolff K., Kalwa H., Jarry H., Buch T., Gudermann T. The natural inverse agonist agouti-related protein induces arrestin-mediated endocytosis of melanocortin-3 and -4 receptors // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281 (49). P. 37447-37456.
35. Broberger C., Johansen J., Johansson C., Schalling M., Hokfelt T. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95, P. 15043–15048.
36. Brown R.S.E., Kokay I.C., Phillipps H.R., Yip S.H., Gustafson P., Wyatt A., Larsen C.M., Knowles P., Ladyman S.R., LeTissier P., Grattan D.R. Conditional Deletion of the Prolactin Receptor Reveals Functional Subpopulations of Dopamine Neurons in the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus // *J. Neurosci.* 2016. V. 36 (35). P. 9173-9185.
37. Brzoska T., Luger T.A., Maaser C., Abels C., Bohm M. Alpha-melanocyte-stimulating hormone and related tripeptides: biochemistry, antiinflammatory and protective effects in vitro and in vivo, and future perspectives for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases // *Endocr Rev.* 2008. V. 29 (5). P. 581-602.
38. Buch T.R., Heling D., Damm E., Gudermann T., Breit A. Pertussis toxin-sensitive signaling of melanocortin-4 receptors in hypothalamic GT1-7 cells defines agouti-related protein as a biased agonist // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 26411–26420.
39. Buckman L.B., Hasty A.H., Flaherty D.K., Buckman C.T., Thompson M.M., Matlock B.K., Weller K., Ellacott K.L. Obesity induced by a high-fat diet is associated with increased immune cell entry into the central nervous system // *Brain Behav. Immun.* 2014. V. 35. P. 33-42.
40. Buggy J.J. Binding of alpha-melanocyte-stimulating hormone to its G-protein-coupled receptor on B-lymphocytes activates the Jak/STAT pathway // *Biochem J.* 1998. V. 331 (1). P. 211-216.
41. Bultman S.J., Michaud E.J., Woychik R.P. Molecular Characterization of the Mouse Agouti Locus // *Cell.* 1992. V. 71 (7). P. 1195-1204.
42. Burke L.K., Darwish T., Cavanaugh A.R., Virtue S., Roth E., Morro J., Liu S.M., Xia J., Dalley J.W., Burling K., Chua S., Vidal-Puig T., Schwartz G.J., Blouet C. mTORC1 in AGRP neurons integrates exteroceptive and interoceptive food-related cues in the modulation of adaptive energy expenditure in mice // *Elife.* 2017. V. 6. e 22848.
43. Burke L.K., Doslikova B., D'Agostino G., Garfield A.S., Farooq G., Burdakov D., Low M.J., Rubinstein M., Evans M.L., Billups B., Heisler L.K. 5-HT obesity medication efficacy via POMC activation is maintained during aging // *Endocrinology.* 2014. 155 (10): 3732–3738.

44. Butler A.A., Kesterson R.A., Khong K., Cullen M.J., Pellemounter M.A., Dekoning J., Baetscher M., Cone R.D. A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse // *Endocrinology*. 2000. V. 141(9). P. 3518-3521.
45. Calebiro D., Nikolaev V.O., Persani L., Lohse M.J. Signaling by internalized G-protein-coupled receptors // *Trends. Pharmacol. Sci.* 2010. V. 31. P. 221–228.
46. Cakir I., Cyr N.E., Perello M., Litvinov B.P., Romero A., Stuart R.C., Nillni E.A. Obesity induces hypothalamic endoplasmic reticulum stress and impairs proopiomelanocortin (POMC) post-translational processing // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288 (24). P. 17675–17688.
47. Carkaci-Salli N., Salli U., Kuntz-Melcavage K.L., Pennock M.M., Ozgen H., Tekin I., Freeman W.M., Vrana K.E. TPH2 in the ventral tegmental area of the male rat brain // *Brain Res. Bull.* 2011. V. 84 (6). P. 376-380.
48. Catania A. Neuroprotective actions of melanocortins: a therapeutic opportunity // *Trends Neurosci.* 2008. V. 31 (7). P. 353–360.
49. Catania A., Gatti S., Colombo G., Lipton J.M. Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation // *Pharmacological Reviews*. 2004. V. 56 (1). P. 1-29.
50. Catania A., Lonati C., Sordi A., Carlin A., Leonardi P., Gatti S. The melanocortin system in control of inflammation // *The Scientific World Journal*. 2010. V.10. P. 1840–1853.
51. Cavalcanti-de-Albuquerque J.P., Bober J., Zimmer M.R., Dietrich M.O. Regulation of substrate utilization and adiposity by *Agrp* neurons // *Nat. Commun.* 2019. V. 10 (1). Article 311.
52. Chai B., Li J.Y., Zhang W., Ammori J.B., Mulholland M.W. Melanocortin-3 receptor activates MAP kinase via PI3 kinase // *Regul. Pept.* 2007. V. 139. P.115–121.
53. Chai B., Li J.Y., Zhang W., Newman E., Ammori J., Mulholland M.W. Melanocortin-4 receptor-mediated inhibition of apoptosis in immortalized hypothalamic neurons via mitogenactivated protein kinase // *Peptides*. 2006. V. 27. P. 2846–2857.
54. Challis B.G., Pritchard L.E., Creemers J.W.M., Delplanque J., Keogh J.M., Luan J., Wareham N.J., Yeo G.S.H., Bhattacharyya S., Froguel P., White A., Farooqi I.S., O'Rahilly S. A Missense Mutation Disrupting a Dibasic Prohormone Processing Site in Pro-Opiomelanocortin (POMC) Increases Susceptibility to Early-Onset Obesity Through a Novel Molecular Mechanism // *Hum. Mol. Genet.* 2002. V. 11 (17). P. 1997-2004.
55. Chan L. F., Webb T. R., Chung T. T., Meimaridou E., Cooray S. N., Guasti L., Chapple J.P., Egertova M., Elphick M.R., Cheetham M.E., Metherell L.A., Clark A.J. MRAP and MRAP2 are bidirectional regulators of the melanocortin receptor family // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009. V. 106. P. 6146–6151.

56. Charbonneau C., Bai F., Richards B.S., Argyropoulos G. Central and peripheral interactions between the agouti-related protein and leptin // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. V. 319 (2). P. 518-524.
57. Chen A.S., Marsh D.J., Trumbauer M.E., Frazier E.G., Guan X.M., Yu H., Rosenblum C.I., Vongs A., Feng Y., Cao L., Metzger J.M., Strack A.M., Camacho R.E., Mellin T.N., Nunes C.N., Min W., Fisher J., Gopal-Truter S., MacIntyre D.E., Chen H.Y., Ploeg Van der L.H. Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass // *Nat. Genet.* 2000. V. 26 (1). P. 97-102.
58. Chen J., Yang W. Influence of acute and chronic treadmill exercise on rat brain POMC gene expression // *Med. Sci. Sports Exerc.* 2000. V. 32 (5). P. 954–957.
59. Chen M., Celik A., Georgeson K.E., Harmon C.M., Yang Y. Molecular basis of melanocortin-4 receptor for AGRP inverse agonism // *Regul Pept.* 2006. V. 136 (1-3). P. 40-49.
60. Chen X., Chen H., Cai W., Maguire M., Ya B., Zuo F., Logan R., Li H., Robinson K., Vanderburg C.R., Yu Y., Wang Y., Fisher D. E., Schwarzschild M. A. The melanoma-linked “redhead” *mc1r* influences dopaminergic neuron survival // *Ann Neurol.* 2017. V. 81 (3). P. 395–406.
61. Chen W.S., Xu P.Z., Gottlob K., Chen M.L., Sokol K., Shiyanova T., Roninson I., Weng W., Suzuki R., Tobe K., Kadowaki T., Hay N. Growth Retardation and Increased Apoptosis in Mice With Homozygous Disruption of the *Akt1* Gene // *Genes. Dev.* 2001. V. 15 (17). P. 2203-2208.
62. Chhajlani V. Distribution of cDNA for melanocortin receptor subtypes in human tissues // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1996. V. 38. P. 73–80.
63. Chhajlani V., Wikberg J.E. Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA // *FEBS Lett.* 1992. V. 309 (3). P. 417-420.
64. Cho H., Thorvaldsen J.L., Chu Q., Feng F., Birnbaum M.J. *Akt1/PKBalpha* Is Required for Normal Growth but Dispensable for Maintenance of Glucose Homeostasis in Mice // *J Biol Chem.* 2001. V. 276 (42). P. 38349-38352.
65. Cho W., Shin W.S., An I., Bang M., Cho D.Y., Lee S.H. Biological Aspects of Aggression and Violence in Schizophrenia // *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* 2019. V. 17 (4). P. 475-486.
66. Chu H., Sun J., Xu H., Niu Z., Xu M. Effect of periaqueductal gray melanocortin 4 receptor in pain facilitation and glial activation in rat model of chronic constriction injury // *Neurol Res.* 2012. V. 34 (9). P. 871-888.

67. Clark J.A., Flick R.B., Pai L.Y., Szalayova I., Key S., Conley R.K., Deutch A. Y., Hutson P.H., Mezey E. Glucocorticoid modulation of tryptophan hydroxylase-2 protein in raphe nuclei and 5-hydroxytryptophan concentrations in frontal cortex of C57/Bl6 mice // *Mol Psychiatry*. 2008. V. 13(5). P. 498–506.
68. Clark J.A., Flick R.B., Pai L.Y., Szalayova I., Key S., Conley R.K., Deutch A. Y., Hutson P.H., Mezey E. Glucocorticoid modulation of tryptophan hydroxylase-2 protein in raphe nuclei and 5-hydroxytryptophan concentrations in frontal cortex of C57/Bl6 mice // *Mol Psychiatry*. 2008. V. 13(5). P. 498–506.
69. Claycombe K., Xue B., Mynatt R., Zemel M., Moustaid-Moussa N. Regulation of leptin by agouti // *Physiological Genomics*. 2000. V. 2. P. 101-105.
70. Cole A.R., Astell A., Green C., Sutherland C. Molecular connexions between dementia and diabetes // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2007. V. 31 (7). P. 1046-1063.
71. Cone R.D. Anatomy and regulation of the central melanocortin system // *Nat. Neurosci.* 2005. V. 8 (5). P. 571-578.
72. Cooray S.N., Clark A. J. Melanocortin receptors and their accessory proteins // *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2011. V. 331. P. 215–221.
73. Cote F., Fligny C., Fromes Y., Mallet J., Vodjdani G. Recent advances in understanding serotonin regulation of cardiovascular function // *Trends in Molecular Medicine*. 2004. V.10 (5). P. 232–238.
74. Cragolini A.B., Caruso C., Lasaga M., Scimonelli T.N. Alpha-MSH and gamma-MSH modulate early release of hypothalamic PGE2 and NO induced by IL-1beta differently // *Neurosci. Lett.* 2006. V. 409 (3). P. 168-172.
75. Creemers J.W., Pritchard L.E., Gyte A., Le Rouzic P., Meulemans S., Wardlaw S.L., Zhu X., Steiner D.F., Davies N., Armstrong D., Lawrence C.B., Luckman S.M., Schmitz C.A., Davies R.A., Brennan J.C., White A. Agouti-related protein is posttranslationally cleaved by proprotein convertase 1 to generate agouti-related protein (AGRP)83-132: interaction between AGRP83-132 and melanocortin receptors cannot be influenced by syndecan-3 // *Endocrinology*. 2006. V. 147(4). P. 1621-1631.
76. de Kloet A.D., Pioquinto D.J., Nguyen D., Wang L., Smith J.A., Hiller H., Summers C. Obesity induces neuroinflammation mediated by altered expression of the renin-angiotensin system in mouse forebrain nuclei // *Physiol. Behav.* 2014. V. 136. P. 31-38.
77. de la Monte S.M., Tong M., Nguyen V., Setshedi M., Longato L., Wands J.R. Ceramide-mediated insulin resistance and impairment of cognitive-motor functions // *J. Alzheimers Dis.* 2010. V. 21 (3). P. 967-984.

78. De Souza, C. T., Araujo, E. P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R. L., Boschero, A. C., Saad M. J., Velloso L. A. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus // *Endocrinology*. 2005. V. 146. P. 4192–4199.
79. Defea K. Beta-arrestins and heterotrimeric G-proteins: collaborators and competitors in signal transduction // *Br. J. Pharmacol.* 2008. V. 153 (1). S. 298–309.
80. Deguchi T., Barchas J. Regional distribution and developmental change of tryptophan hydroxylase activity in rat brain. *J Neurochem.* 1972. V. 19 (3). P. 927-929.
81. Derkach K., Zakharova I., Zorina I., Bakhtyukov A., Romanova I., Bayunova L., Shpakov A. The evidence of metabolic-improving effect of metformin in Ay/a mice with genetically-induced melanocortin obesity and the contribution of hypothalamic mechanisms to this effect // *PLOS One*. 2019. V. 14 (3). e0213779. doi: 10.1371/journal.pone.0213779.
82. Derkach K.V., Bondareva V.M., Chistyakova O.V., Berstein L.M., Shpakov A.O. The effect of long-term intranasal serotonin treatment on metabolic parameters and hormonal signaling in rats with high-fat diet/low-dose streptozotocin-induced type 2 diabetes // *Int. J. Endocrinol.* 2015. V. 2015. P. 245459. doi:10.1155/2015/245459.
83. Descarries L., Beaudet A. The serotonin innervations of adult rat hypothalamus // *Colloq. Intern. CNRS*. 1978. V.280. P.135-153.
84. Deuschle M. Effects of antidepressants on glucose metabolism and diabetes mellitus Type 2 in adults // *Curr. Opin. Psychiatry*. 2013. V. 26. P. 60–65.
85. Dhillon W., Small C., Gardiner J., Bewick G., Whitworth E. et al. Agouti-related protein has an inhibitory paracrine role in the rat adrenal // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 301. P. 102–107.
86. Dibner C., Schibler U., Albrecht U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks // *Annu. Rev. Physiol.* 2010. V. 72. P. 517-549.
87. Dinulescu D.M., Cone R.D. Agouti and Agouti-related protein: analogies and contrasts // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275 (10). P. 6695–6698.
88. Dinulescu D.M., Fan W., Boston B.A., McCall K., Lamoreux M.L., Moore K.J., Montagno J., Cone R.D. Mahogany (mg) stimulates feeding and increases basal metabolic rate independent of its suppression of agouti // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95 (21). P. 12707-12712.

89. Dolan C., Glynn R., Lawlor B. A Systematic Review and Delphi Study to Ascertain Common Risk Factors for Type 2 Diabetes Mellitus and Dementia and Brain-Related Complications of Diabetes in Adults // *Can J Diabetes*. 2020. pii: S1499-2671(20)30004-6
90. Doslikova B., Garfield A.S., Shaw J., Evans M.L., Burdakov D., Billups B., Heisler L.K. 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist anorectic efficacy potentiated by 5-HT<sub>1B</sub> receptor agonist coapplication: an effect mediated via increased proportion of pro-opiomelanocortin neurons activated // *J. Neurosci*. 2013. V. 33 (23). P. 9800–9804.
91. Dumont L.M., Wu C.S., Tatnell M.A., Cornish J., Mountjoy K.G. Evidence for direct actions of melanocortin peptides on bone metabolism // *Peptides*. 2005. V. 26. P. 1929–1935.
92. Dwarkasing J.T., Witkamp R.F., Boekschoten M.V., Ter Laak M.C., Heins M.S., van Norren K. Increased hypothalamic serotonin turnover in inflammation-induced anorexia // *BMC Neurosci*. 2016. V.17 (1). P. 26.
93. Ebihara K., Ogawa Y., Katsuura G., Numata Y., Masuzaki H. et al. Involvement of agouti-related protein, an endogenous antagonist of hypothalamic melanocortin receptor, in leptin action // *Diabetes*. 1999. V. 48 (10). P. 2028-2033.
94. Eerola K., Virtanen S., Vahatalo L., Ailanen L., Cai M., Hruby V., Savontaus M., Savontaus E. Hypothalamic  $\gamma$ -melanocyte stimulating hormone gene delivery reduces fat mass in male mice // *J. Endocrinol*. 2018. V. 239. P. 19-31.
95. Eiden L.E., Schäfer MK, Weihe E, Schütz B. The vesicular amine transporter family (SLC18): amine/proton antiporters required for vesicular accumulation and regulated exocytotic secretion of monoamines and acetylcholine // *Pflugers Arch*. 2004. V. 447 (5). P. 636-40.
96. Ellacott K.L., Cone R.D. The role of the central melanocortin system in the regulation of food intake and energy homeostasis: lessons from mouse models // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci*. 2006. V. 361 (1471). P. 1265-1274.
97. Feldberg W., Toh C. C. Distribution of 5-hydroxytryptamine (serotonin, enteramine) in the wall of the digestive tract // *J. Physiol*. 1953. V. 119 (2-3). P. 352-362.
98. Fetissov S.O., Hallman J., Orelund L., Af Klinteberg B., Grenbäck E., Hulting A.-L., Hökfelt T. Autoantibodies Against Alpha -MSH, ACTH, and LHRH in Anorexia and Bulimia Nervosa Patients // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99 (26). P. 17155-17160.
99. Filiano A.J., Gadani S.P., Kipnis J. Interactions of innate and adaptive immunity in brain development and function // *Brain Res*. 2015. V. 1617. P.18–27.
100. Fitzpatrick P.F. Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases // *Annu. Rev. Biochem*. 1999. V. 68. P. 355–381.

101. Frankfurt H., Azmitia E. The effect of intracerebral injections of 5,7-dihydroxytryptamine and 6-hydroxydopamine on serotonin-immunoreactive cell bodies and fibers in the adult rat hypothalamus // *Brain Res.* 1983. V.261. P.91-99.
102. Fukumura D., Ushiyama A., Duda D.G., Xu L., Tam J., Krishna V., Chatterjee K., Garkavtsev I., Jain R.K. Paracrine regulation of angiogenesis and adipocyte differentiation during in vivo adipogenesis // *Circ. Res.* 2003. V 93 (9). P. 88–97.
103. Gantz I., Fong T.M. The melanocortin system // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003. V. 284. E.468–474.
104. Gao Z., Lei D., Welch J., Le K., Lin J., Leng S., Duhl D. Agonist-dependent internalization of the human melanocortin-4 receptors in human embryonic kidney 293 cells // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003. V. 307. P. 870–877.
105. Gehrman J., Matsumoto Y., Kreutzberg G.W. Microglia: Intrinsic Immuneffector Cell of the Brain // *Brain Res Brain Res Rev.* 1995. V. 20 (3). P.269-287.
106. Geller F., Reichwald K., Dempfle A., Illig T., Vollmert C., Herpertz S., Siffert W., Platzer M., Hess C., Gudermann T., Biebermann H., Wichmann H.E., Schäfer H., Hinney A., Hebebrand J. Melanocortin-4 receptor gene variant I103 is negatively associated with obesity // *Am. J. Hum. Genet.* 2004. V. 74 (3). P. 572-81.
107. Gholipour T., Ghasemi M., Riazi K., Ghaffarpour M., Dehpour A.R. (January). Seizure susceptibility alteration through 5-HT(3) receptor: modulation by nitric oxide // *Seizure.* 2010 V. 19 (1). P. 17–22.
108. Giacobbo B.L., Doorduyn J., Klein H.C., Dierckx R.A.J.O., Bromberg E., de Vries E.F.J. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation // *Mol Neurobiol.* 2019. V. 56 (5). P. 3295-3312.
109. Glennon R.A. Higher-end serotonin receptors: 5-HT(5), 5-HT(6), and 5-HT(7) // *Journal of Medicinal Chemistry.* 2003. V.46 (14). P. 2795–2812.
110. Glennon R.A. Higher-end serotonin receptors: 5-HT(5), 5-HT(6), and 5-HT(7) // *Journal of Medicinal Chemistry.* 2003.V.46 (14). P. 2795–2812.
111. Goldsmith Z.G., Dhanasekaran D.N. G protein regulation of MAPK networks // *Oncogene.* 2007. V. 26. P. 3122–3142.
112. Goodnick P.J. Use of antidepressants in treatment of comorbid diabetes mellitus and depression as well as in diabetic neuropathy // *Annu. Clin. Psychiatry.* 2001. V. 13. P. 31–41.
113. Gothert M. Serotonin discovery and stepwise disclosure of 5-HT receptor complexity over four decades. Part I. General background and discovery of serotonin as a basis for 5-HT receptor identification // *Pharmacol. Rep.* 2013. V. 65(4). P. 771-786.

114. Göthert M., Bönisch H., Malinowska B., Schlicker E. Serotonin discovery and stepwise disclosure of 5-HT receptor complexity over four decades. Part II. Some contributions of Manfred Göthert // *Pharmacol Rep.* 2020. doi: 10.1007/s43440-019-00047-4
115. Grahame-Smith D.G. The biosynthesis of 5-hydroxytryptamine in brain // *Biochem J.* 1967. V.105. P.351–360.
116. Griffon N., Mignon V., Facchinetti P., Diaz J., Schwartz J.C., Sokoloff P. Molecular cloning and characterization of the rat fifth melanocortin receptor // *Biochem Biophys Res Commun.* 1994. V.200 (2). P.1007-1014.
117. Gross P. M. Circumventricular organ capillaries // *Progress in Brain Research.* 1992. V. 91. P. 219–233.
118. Gruber K.A., Eskridge S.L. Central vasopressin system mediation of acute pressor effect of  $\gamma$ -MSH // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 1986. V. 251. P. 134–137.
119. Gudermann T., Kalkbrenner F., Schultz G. Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1996. V. 36. P. 429–459.
120. Gunn T.M., Barsh G.S. Mahogany/attractin: en route from phenotype to function // *Trends Cardiovasc. Med.* 2000. V. 10 (2). P. 76-81.
121. Gustafson D. R., Karlsson C., Skoog I., Rosengren L., Lissner L., Blennow K. Mid-life adiposity factors relate to blood-brain barrier integrity in late life // *J. Intern. Med.* 2007. V. 262. P. 643–650.
122. Gutkind J.S. Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors // *Sci STKE* 2000. V. 2000 (40). pp. re1.
123. Ha E., Kim M.J., Choi B.K., Rho J.J., Oh D.J., Rho T.H., Kim K.H., Lee H.J., Shin D.H., Yim S.V., Baik H.H., Chung J.H., Kim J.W. Positive association of obesity with single nucleotide polymorphisms of syndecan 3 in the Korean population // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006. V. 91 (12). P. 5095-5099.
124. Hagan M.M., Rushing P.A., Pritchard L.M., Schwartz M.W., Strack A.M., Van Der Ploeg L.H., Woods S.C., Seeley R.J. Long-term orexigenic effects of AgRP-(83---132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2000. V. 279 (1). R. 47-52.
125. Hahn T.M., Breininger J.F., Baskin D.G., Shwartz M.W. Coexpression of AgRp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons // *Nature Neurosci.* 1998. V. 1. P. 271-272.



126. Harazin A., Bocsik A., Barna L., Kincses A., Varadi J., Fenyvesi F., Tubak V., Deli M. A., Vecsernyes M. Protection of cultured brain endothelial cells from cytokine-induced damage by  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone // *PeerJ*. 2018. V.6. e 4774.
127. Harno E., Gali Ramamoorthy T., Coll A.P., White A. POMC: The Physiological Power of Hormone Processing // *Physiol. Rev.* 2018. V. 98(4). P. 2381-2430.
128. Harrold J.A., Widdowson P.S., Williams G. Beta-MSH: A functional ligand that regulated energy homeostasis via hypothalamic MC4-R? // *Peptides*. 2003. V. 24. P. 397-405.
129. He L., Eldridge A.G., Jackson P.K., Gunn T.M., Barsh G.S. Accessory proteins for melanocortin signaling: attractin and mahogunin // *Ann NY Acad. Sci.* 2003. V. 994. P. 288-98.
130. Hedlund P.B., Sutcliffe J.G. Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT<sub>7</sub> receptor research // *Trends in Pharmacological Sciences*. 2004. V. 25 (9). P. 481–486.
131. Heisler L.K., Cowley M.A., Kishi T., Tecott L.H., Fan W., Low M.J., Smart J.L., Rubinstein M., Tatro J., Zigman J.M., Cone R.D., Elmquist J.K. Central serotonin and melanocortin pathways regulating energy homeostasis // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003. V. 994. P. 169–174.
132. Heisler L.K., Jobst E.E., Sutton G.M., Zhou L., Borok E., Thornton-Jones Z., Liu H.Y., Zigman J.M., Balthasar N., Kishi T., Lee C.E., Aschkenasi C.J., Zhang C.Y., Yu J., Boss O., Mountjoy K.G., Clifton P.G., Lowell B.B., Friedman J.M., Horvath T., Butler A.A. Elmquist JK, Cowley MA. Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake // *Neuron*. 2006. V. 51. P.239–249.
133. Heisler L.K., Zhou L., Bajwa P., Hsu J., Tecott L.H. Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> Receptors Regulate Anxiety-Like Behavior // *Genes Brain Behav.* 2007. V. 6 (5). P. 491-496.
134. Herraiz C., Garcia-Borron J. C., Jiménez-Cervantes C., Olivares C. MC1R signaling. Intracellular partners and pathophysiological implications // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2017. V. 1863. P. 2448–2461.
135. Herraiz C., Jimenez-Cervantes C., Zanna P., Garcia-Borron J. C. Melanocortin 1 receptor mutations impact differentially on signalling to the cAMP and the ERK mitogen-activated protein kinase pathways // *FEBS Letters*. 2009. V. 583. P. 3269–3274.
136. Herrera-Marquez R., Hernandez-Rodriguez J., Medina-Serrano J., Boyzo-Montes de Oca A., Manjarrez-Gutierrez G. Association of metabolic syndrome with reduced central serotonergic activity // *Metab. Brain Dis.* 2011. V. 26. P. 29–35.
137. Herrera-Marquez R., Hernandez-Rodriguez J., Medina-Serrano J., Boyzo-Montes de Oca A., Manjarrez-Gutierrez G. Association of metabolic syndrome with reduced central serotonergic activity // *Metab. Brain Dis.* 2011. V. 26. P. 29–35.

138. Heydendael W., Jacobson L. Glucocorticoid status affects antidepressant regulation of locus coeruleus tyrosine hydroxylase and dorsal raphe tryptophan hydroxylase gene expression // *Brain Res.* 2009. V. 1288. P. 69–78.
139. Hommelberg P. P., Plat J., Langen R. C., Schols A. M., Mensink, R. P. Fatty acid-induced NF-kB activation and insulin resistance in skeletal muscle are chain length dependent // *Am. J. Physiol. Metab.* 2009. V. 296. E114–E120.
140. Hoyer D., Hannon J.P., Martin G.R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002. V. 71 (4). P.533-554.
141. Humphreys M.H. Gamma-MSH, sodium metabolism, and salt-sensitive hypertension // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2004. V. 286 (3). P. 417-430.
142. Invernizzi R.W. Role of TPH-2 in brain function: news from behavioral and pharmacologic studies // *J. Neurosci. Res.* 2007. V. 85 (14). P. 3030-3035.
143. Irani B.G., Holder J.R., Todorovic A., Wilczynski A.M., Joseph C.G., Wilson K.R., Haskell-Luevano C. Progress in the development of melanocortin receptor selective ligands // *Curr. Pharm. Des.* 2004. V. 10 (28). P. 3443-3479.
144. Isales C.M., Zaidi M., Blair H.C. ACTH is a novel regulator of bone mass // *Ann. NY Acad. Sci.* 2010. V. 1192. P. 110-116.
145. Ishizuka T. Molecular cloning and functional expression of a mouse adrenocorticotropin receptor gene // *Hokkaido Igaku Zasshi.* 1995. V. 70 (2). P. 253-260.
146. Jackson P.J., Douglas N.R., Chai B., Binkley J., Sidow A., Barsh G.S., Millhauser G.L. Structural and molecular evolutionary analysis of Agouti and Agouti-related proteins // *Chem. Biol.* 2006. V. 13 (12). P. 1297-1305.
147. Jais A., Brüning, J. C. Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease // *J. Clin. Invest.* 2017. V. 127. P. 24–32.
148. Jayaraj R.L., Azimullah S., Beiram R. Diabetes as a risk factor for Alzheimer's disease in the Middle East and its shared pathological mediators // *Saudi J. Biol. Sci.* 2020. V. 27 (2). P. 736-750.
149. Johns M.A., Azmitia E.C., Krieger D.T. Specific in vitro uptake of serotonin by cells in the anterior pituitary of the rat // *Endocrinology.* 1982. V.110. P.754-760.
150. Johnson A.K., Gross P.M. Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways // *FASEB J.* 1993. V. 7(8). P. 678-86.
151. Jonnakuty C., Gragnoli C. What do we know about serotonin? // *Journal of Cellular Physiology.* 2008. V. 217 (2). P.301–306.

152. Kanetsky P.A., Swoyer J., Panossian S., Holmes R., Guerry D., Rebbeck T.R. A polymorphism in the agouti signaling protein gene is associated with human pigmentation // *Am. J. Hum. Genet.* 2002. V. 70(3). P. 770-775.
153. Kilianova Z., Basora N., Kilian P., Payet M.D., Gallo-Payet N. Human melanocortin receptor 2 expression and functionality: effects of protein kinase A and proteinkinase C on desensitization and internalization // *Endocrinology.* 2006. V. 147. P. 2325–2337.
154. Kim D.H., Gutierrez-Aguilar R., Kim H.J., Woods S.C., Seeley R.J. Increased adipose tissue hypoxia and capacity for angiogenesis and inflammation in young diet-sensitive C57 mice compared with diet-resistant FVB mice // *Int. J. Obes. (Lond.).* 2013. V. 37. № 6. P. 853–860.
155. Kirwan P., Kay R.G., Brouwers B., Herranz-Perez V., Jura M., Larraufie P., Jerber J., Pembroke J., Bartels T., White A., Gribble F.M., Reimann F., Farooqi I.S., O'Rahilly S., Merkle F.T. Quantitative mass spectrometry for human melanocortin peptides in vitro and in vivo suggests prominent roles for  $\beta$ -MSH and desacetyl  $\alpha$ -MSH in energy homeostasis // *Mol. Metab.* 2018. V. 17. P. 82-97.
156. Kishi T., Aschkenasi C.J., Lee C. E., Mountjoy K.G., Saper C.B., Elmquist J.K. Expression of Melanocortin 4 Receptor mRNA in the Central Nervous System of the Rat // *J. Comp. Neurol.* 2003. V. 457(3). V. 213-235.
157. Kiss J., Halasz B. Demonstration of serotonergic axons terminating on luteinizing hormone-releasing hormone neurons in the preoptic area of the rat using a combination of immunocytochemistry and high resolution autoradiography// *Neuroscience.* 1985. V.14. P.69-78.
158. Kiss J., Leranth Cs., Halasz B. Serotonergic endings on VIP-neurons in the suprachiasmatic nucleus and on ACTH-neurons in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus: A combination of high resolution autoradiography and electron microscopic immunocytochemistry // *Neurosci. Lett.* 1984. V.44. P. 119-124.
159. Kloiber S., Kohli M.A., Brueckl T., Ripke S., Ising M., Uhr M., Menke A., Unschuld P.G., Horstmann S., Salyakina D., Muller-Myhsok B., Binder E.B., Holsboer F., Lucae S. Variations in tryptophan hydroxylase 2 linked to decreased serotonergic activity are associated with elevated risk for metabolic syndrome in depression // *Mol. Psychiatry.* 2010. V. 15. P. 736–747.
160. Kloiber S., Kohli M.A., Brueckl T., Ripke S., Ising M., Uhr M., Menke A., Unschuld P.G., Horstmann S., Salyakina D., Muller-Myhsok B., Binder E.B., Holsboer F., Lucae S. Variations in tryptophan hydroxylase 2 linked to decreased serotonergic activity are

- associated with elevated risk for metabolic syndrome in depression // *Mol. Psychiatry*. 2010. V. 15. P. 736–747.
161. Konda Y., Gantz I., DelValle J., Shimoto Y., Miwa H., Yamada T. Interaction of dual intracellular signaling pathways activated by the melanocortin-3 receptor // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269 (18). P.13162-13166.
162. Kowlessur D., Kaufman S. Cloning and expression of recombinant human pineal tryptophan hydroxylase in *Escherichia coli*: purification and characterization of the cloned enzyme // *Biochim Biophys Acta*. 1999. V.1434. P.317–330.
163. Kroeze W.K., Kristiansen K., Roth B.L. Molecular biology of serotonin receptors structure and function at the molecular level // *Curr. Top. Med. Chem.* 2002. V. 2. P. 507–528.
164. Kuhn D.M., Arthur Jr. R., States J.C. Phosphorylation and activation of brain tryptophan hydroxylase: identification of serine-58 as a substrate site for protein kinase A // *J. Neurochem.* 1997. V.68. P.2220–2223.
165. Kuhn D.M., Sakowski S.A., Geddes T.J., Wilkerson C., Haycock J.W. Phosphorylation and activation of tryptophan hydroxylase 2: identification of serine-19 as the substrate site for calcium, calmodulin-dependent protein kinase II // *J. Neurochem.* 2007. V. 103 (4). P. 1567-1573.
166. Kumer S.C., Mockus S.M., Rucker P.J., Vrana K.E. Amino-terminal analysis of tryptophan hydroxylase: protein kinase phosphorylation occurs at serine-58 // *J. Neurochem.* 1997. V.69. P.1738–1745.
167. Kwon H.Y., Bultman S.J., Löffler C., Chen W.J., Furdon P.J., Powell J.G., Usala A.L., Wilkison W., Hansmann I., Woychik R.P. Molecular structure and chromosomal mapping of the human homolog of the agouti gene // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. V.91 (21). P.9760-9764.
168. Lacroix L.P., Dawson L.A., Hagan J.J., Heidbreder C.A. 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist SB-271046 enhances extracellular levels of monoamines in the rat medial prefrontal cortex // *Synapse*. 2004. V. 51 (2). P. 158–164.
169. Lam D.D., Garfield A.S., Marston O.J., Shaw J., Heisler L.K. Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight // *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 2010. V.97. P. 84–91.
170. Lam D.D., Przydzial M.J., Ridley S.H., Yeo G.S., Rochford J.J., O'Rahilly S., Heisler L.K. Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist promotes hypophagia via downstream activation of melanocortin 4 receptors // *Endocrinology*. 2008. V. 149 (3). P. 1323-1328.

171. Lawrence, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2009. V. 1. a001651.
172. Le Stunff H., Coant N., Migrenne S., Magnan C. Targeting lipid sensing in the central nervous system: new therapy against the development of obesity and type 2 diabetes // *Expert. Opin. Ther. Targets.* 2013. V. 17 (5). P. 545-555.
173. Lechan R.M., Fekete C. Role of melanocortin signaling in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis // *Peptides.* 2006. V. 27 (2). P. 310-325.
174. Lee M., Wardlaw S.L. The central melanocortin system and the regulation of energy balance // *Front Biosci.* 2007. V. 12. P. 3994-4010.
175. Lee M.D., Aloyo V.J., Fluharty S.J., Simansky K.J. Infusion of the serotonin 1B (5-HT<sub>1B</sub>) agonist CP-93, 129 into the parabrachial nucleus potently and selectively reduces food intake in rats // *Psychopharmacology.* 1998. V. 136. P. 304–307.
176. Lee M.D., Aloyo V.J., Fluharty S.J., Simansky K.J. Infusion of the serotonin<sub>1B</sub> (5-HT<sub>1B</sub>) agonist CP-93,129 into the parabrachial nucleus potently and selectively reduces food intake in rats // *Psychopharmacology (Berl).* 1998. V. 136. P. 304–307.
177. Lefkowitz R.J., Shenoy S.K. Transduction of receptor signals by beta-arrestins // *Science.* 2005. V. 308. P. 512–517.
178. Leranth C., Palkovits M., Krieger D.T. Serotonin immunoreactive nerve fibers and terminalis in the rat pituitary – light and electron-microscopic studies // *Neurosci.* 1983. V. 9. P. 289-296.
179. Levin B.E. Developmental gene x environment interactions affecting systems regulating energy homeostasis and obesity // *Front. Neuroendocrinol.* 2010. V. 31. № 3. P. 270–283.
180. Li D., Taylor A.W. Diminishment of alpha-MSH anti-inflammatory activity in MC1r siRNA-transfected RAW264.7 macrophages // *Journal of Leukocyte Biology.* 2008. V. 84. P. 191-198.
181. Lipton J.M., Catania A.P. Antiinflammatory actions of the neuroimmunomodulator  $\alpha$ -MSH // *Immunol. Today.* 1997. V. 18. P. 140-145.
182. Lisak R.P., Benjamins J.A. Melanocortins, melanocortin receptors and multiple sclerosis. // *Brain Sci.* 2017. V. 7 (104). E.104.
183. Little K.Y., Krolewski D.M., Zhang L., Cassin B.J. Loss of striatal vesicular monoamine transporter protein (VMAT2) in human cocaine users // *Am. J. Psychiatry.* 2003. V. 160 (1). P. 47-55.

184. Liu Z., Sun Y., Qiao Q., Zhao T., Zhang W., Ren B., Liu Q., Liu X. Sesamol ameliorates high-fat and high-fructose induced cognitive defects *via* improving insulin signaling disruption in the central nervous system // *Food Funct.* 2017. V. 8. P. 710–719
185. Lowry P. 60 YEARS OF POMC: Purification and biological characterisation of melanotrophins and corticotrophins // *J. Mol. Endocrinol.* 2016. V. 56 (4). P. 1-12.
186. Lowry P.J., Silman R.E., Hope J., Scott A.P. Structure and biosynthesis of peptides related to corticotropins and beta-melanotropins // *Ann NY Acad Sci.* 1977. V. 297. P. 49-62.
187. Lu D., Willard D., Patel I.R., Kadwell S., Overton L., Kost T., Luther M., Chen W., Woychik R.P., Wilkison W.O. Agouti Protein Is an Antagonist of the Melanocyte-Stimulating-Hormone Receptor // *Nature.* 1994. V. 371 (6500). P. 799-802.
188. Lustman P.J., Clouse R.E. Depression in diabetic patients: the relationship between mood and glycemic control // *J. Diabetes Complications.* 2005. V. 19. P. 113–122.
189. Luttrell L.M. ‘Location, location, location’: activation and targeting of MAP kinases by G protein-coupled receptors // *J. Mol. Endocrinol.* 2003. V. 30. P. 117–126.
190. Luttrell L.M., Lefkowitz R.J. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals // *J. Cell. Sci.* 2002. V. 115. P. 455–465.
191. Luttrell L.M., Lefkowitz R.J. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals // *J. Cell. Sci.* 2002. V. 115. P. 455–465.
192. Macor J.E., Burkhart C.A., Heym J.H., Ives J.L., Lebel L.A., Newman M.E., Nielsen J.A., Ryan K., Schulz D.W., Torgersen L.K., et al., 3-(1, 2, 5, 6-Tetrahydropyrid-4-yl)pyrrolo[3, 2-b]pyrid-5-one: a potent and selective serotonin (5-HT<sub>1B</sub>) agonist and rotationally restricted phenolic analogue of 5-methoxy-3-(1, 2, 5, 6-tetrahydropyrid-4-yl)indole // *Journal of Medicinal Chemistry.* 1990. V. 33. P. 2087–2093.
193. Mains R.E., Eipper B.A., Ling N. Common precursor to corticotropins and endorphins // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977. V. 74. P. 3014–3018.
194. Makarenko I.G., Meguid M.M., Ugrumov M.V. Distribution of serotonin 5-hydroxytryptamine 1B (5-HT<sub>1B</sub>) receptors in the normal rat hypothalamus // *Neurosci. Lett.* 2002. V. 328 (2). P. 155-159.
195. Mandrika I., Petrovska R., Wikberg J. Melanocortin receptors form constitutive homo- and heterodimers // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 326. P. 349–354.
196. Marchese A., Paing M.M., Temple B.R., Trejo J. G-protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2008. V. 48. P. 601–629.

197. Marston O.J., Garfield A.S., Heisler L.K. Role of Central Serotonin and Melanocortin Systems in the Control of Energy Balance // *Eur. J. Pharmacol.* 2011. V. 660 (1). P. 70-79.
198. Marinho R., Munõz V.R., Pauli L.S.S., Ropelle E.C.C., de Moura L.P., Moraes J.C., Moura-Assis A., Cintra D.E., da Silva A.S.R., Ropelle E.R., Pauli J.R. Endurance training prevents inflammation and apoptosis in hypothalamic neurons of obese mice // *J. Cell Physiol.* 2018. V. 234. № 1. P. 880-890.
199. Marston O.J., Garfield A.S., Heisler L.K. Role of central serotonin and melanocortin systems in the control of energy balance // *Eur. J. Pharmacol.* 2011. V. 660 (1). P. 70-79.
200. Martin W.J., MacIntyre D.E. Melanocortin receptors and erectile function // *Eur Urol.* 2004. V. 45 (6). P. 706-713.
201. Martinez A., Knappskog P.M., Haavik J. A structural approach into human tryptophan hydroxylase and its implications for the regulation of serotonin biosynthesis// *Curr. Med. Chem.* 2001.V.8.P.1077–1091.
202. May L.T., Hill S.J. ERK phosphorylation: spatial and temporal regulation by G protein-coupled receptors // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2008. V. 40. P. 2013–2017.
203. McKinney J., Knappskog P.M., Haavik, J. Different properties of the central and peripheral forms of human tryptophan hydroxylase // *Journal of Neurochemistry.* 2005. V.92 (2). P. 311–320.
204. McMinn J.E., Wilkinson C.W., Havel P.J., Woods S.C., Schwartz M.W. Effect of intracerebroventricular alpha-MSH on food intake, adiposity, c-Fos induction, and neuropeptide expression // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2000. V. 279. P. 695-703.
205. Meneilly G.S., Tessier D.M. Diabetes, Dementia and Hypoglycemia // *Can. J. Diabetes.* 2016. V. 40 (1). P. 73-76.
206. Metherell L. A., Chapple J. P., Cooray S., David A., Becker C., Ruschendorf F., Naville D., Begeot M., Khoo B., Nürnberg P., Huebner A., Cheetham M.E., Clark A.J.. Mutations in MRAP, encoding a new interacting partner of the ACTH receptor, cause familial glucocorticoid deficiency type 2 // *Nat. Genet.* 2005. V. 37. P. 166–170.
207. Mikhrina A.L., Romanova I.V. A role of AGRP in regulating dopaminergic neurons in the brain // *Neurosci.Behav.Physiol.* 2015. V. 45 (5) P. 536—541.
208. Milanski, M., Degasperi, G., Coope, A., Morari, J., Denis, R., Cintra, D. E., Tsukumo D.M., Anhe G., Amaral M.E., Takahashi H.K., Curi R., Oliveira H.C., Carvalheira

- J.B., Bordin S., Saad M.J., Velloso L.A. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signalling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. P. 359–370.
209. Montange M., Calas A. Serotonin and endocrinology - the pituitary // *Neuronal serotonin.* 1988. P.271-303.
210. Morton G.J., Gelling R.W., Niswender K.D., Morrison C.D., Rhodes C.J., Schwartz M.W. Leptin regulates insulin sensitivity via phosphatidylinositol-3-OH kinase signaling in mediobasal hypothalamic neurons // *Cell Metab.* 2005. V2 (6). P.411-420.
211. Moscovitz A.E., Asif H., Lindenmaier L.B., Calzadilla A., Zhang C., Mirsaeidi M. The importance of melanocortin receptors and their agonists in pulmonary disease // *Front. Med. (Lausanne).* 2019. V. 6. P. 145 – 153.
212. Mountjoy K.G. Distribution and function of melanocortin receptors within the brain // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010. V. 681. P. 29–48.
213. Mountjoy K.G., Robbins L.S., Mortrud M.T., Cone R.D. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors // *Science.* 1992. V. 257 (5074). P.1248-1251.
214. Muldoon M.F., Mackey R.H., Williams K.V., Korytkowski M.T., Flory J.D., Manuck S.B. Low central nervous system serotonergic responsivity is associated with the metabolic syndrome and physical inactivity // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004. V. 89. P. 266–271.
215. Nakanishi S., Inoue A., Kita T., Nakamura M., Chang A.C.Y., Cohen S.N., Numa S. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-b-lipotropin precursor // *Nature* 1979. V. 278. P. 423–427.
216. Nargund R.P., Strack A.M., Fong T.M. Melanocortin-4 Receptor (MC4R) Agonists for the Treatment of Obesity // *J. Med. Chem.* 2006. V. 49 (14). P. 4035-4043.
217. Naumenko V.S., Popova N.K., Lacivita E., Leopoldo M., Ponimaskin E.G. Interplay between serotonin 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors in depressive disorders // *CNS Neuroscience & Therapeutics.* 2014. V. 20 (7). P. 582–590.
218. Navarro S., Soletto L., Puchol S., Rotllant J., Soengas J.L., Cerda-Reverter J.M. 60 YEARS OF POMC: POMC: an evolutionary perspective // *J. Mol. Endocrinol.* 2016. V. 56. P.113–118.
219. Negri L. Vittorio Erspamer (1909-1999) // *Medicina Nei Secoli Arte E Scienza.* 2006. V. 18 (1). P. 103-114.
220. Newman E.A., Chai B.X., Zhang W., Li J.Y., Ammori J.B., Mulholland M.W. Activation of the melanocortin-4 receptor mobilizes intracellular free calcium in immortalized hypothalamic neurons // *J. Surg. Res.* 2006. V. 132. P. 201–207.



221. Ni X.P., Pearce D., Butler A. A., Cone R. D., Humphreys M. H. Genetic disruption of gamma-melanocyte-stimulating hormone signaling leads to salt-sensitive hypertension in the mouse // *J. Clin. Invest.* 2003. V. 111. P. 1251–1258.
222. Nichols D.E., Nichols C.D. Serotonin receptors // *Chem. Rev.* 2008. V.108. P.1614–1641.
223. Nijenhuis W.A., Oosterom J., Adan R.A. AgRP (83-132) acts as an inverse agonist on the human-melanocortin-4 receptor // *Mol. Endocrinol.* 2001. V. 15 (1). P. 164-171.
224. Nonogaki K., Ohba Y., Sumii M., Oka Y. Serotonin systems upregulate the expression of hypothalamic NUCB2 via 5-HT<sub>2C</sub> receptors and induce anorexia via a leptin-independent pathway in mice // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 372. P. 186–190.
225. Novoselova T.V., Chan L.F., Clark A.J.L. Pathophysiology of melanocortin receptors and their accessory proteins // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2018. V. 32 (2). P. 93-106.
226. Nuzzaci D., Laderrière A., Lemoine A., Nédélec E., Pénicaud L., Rigault C., Benani A. Plasticity of the Melanocortin System: Determinants and Possible Consequences on Food Intake // *Front Endocrinol (Lausanne).* 2015. V. 6:143.
227. Oh C.-M., Park S., Kim H. Serotonin as a new therapeutic target for diabetes mellitus and obesity // *Diabetes Metab. J.* 2016. V. 40. P. 89-98.
228. Ollmann M.M., Wilson B.D., Yang Y.K., Kerns J.A., Chen Y., Gantz I., Barsh G.S. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein // *Science.* 1997. V. 278 (5335). P.135-138.
229. Olney J.J., Sprow G.M., Navarro M., Thiele T.E. The protective effects of the melanocortin receptor (MCR) agonist, melanotan-II (MTII), against binge-like ethanol drinking are facilitated by deletion of the MC3 receptor in mice // *Neuropeptides.* 2014. V. 48(1). P.47-51.
230. Overton J.D., Leibel R.L. Mahoganoid and mahogany mutations rectify the obesity of the yellow mouse by effects on endosomal traffic of MC4R protein // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286 (21). P. 18914-18929.
231. Ozcan L., Ergin A.S., Lu A., Chung J., Sarkar S., Nie D., Myers M.G. Jr., Ozcan U. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance // *Cell Metab.* 2009. V. 9 (1). P. 35-51.
232. Palkovits M. Neuropeptides in the hypothalamo-hypophyseal system: lateral retrochiasmatic area as a common gate for neuronal fibers towards the median eminence // *Peptides.* 1984. V. 5 (1). P. 35-39.

233. Pandit R., Omrani A., Luijendijk M.C.M., Vrind V.A.J. de, Rozen A.J. Van, Ophuis R.J.A.O., Garner K., Kallo I., Ghanem A., Liposits Z., Conzelmann K.-K., Vanderschuren L. J.M.J., Fleur S. E. la, Adan R.A.H. Melanocortin 3 receptor signaling in midbrain dopamine neurons increases the motivation for food reward // *Neuropsychopharmacology*. 2016. V. 41. P. 2241–2251.
234. Panskepp J., Reilly P., Bishop P., Meeker R.B., Vilberg T.R., Kastin A.J. Effects of alpha-MSH on motivation, vigilance and brain respiration // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1976. V. 5 (1). P. 59-64.
235. Patel R., Dickenson A.H. Modality selective roles of pro-nociceptive spinal 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors in normal and neuropathic states // *Neuropharmacology*. 2018. V. 143. 2018. P. 29-37.
236. Paxinos G., Franklin K.B.J. The mouse brain in stereotaxic coordinates // Academic press. CD-ROM, 2001.
237. Prada P. O., Zecchin H. G., Gasparetti A. L., Torsoni M. A., Ueno M., Hirata A. E., Corezola do Amaral M.E., Höer N.F., Boschero A.C., Saad M.J. Western diet modulates insulin signalling, c-JunN-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1 ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion // *Endocrinology*. 2005. V. 146. P. 1576–1587.
238. Pytliak M., Vargová V., Mechírová M., Felšöci M. Serotonin receptors – From molecular biology to clinical applications // *Physiological Research*. 2011. V.60 (1). P.15–25.
239. Quillan J.M., Sadee W., Wei E.T., Jimenez C., Ji L., Chang J.K. A synthetic human Agouti-related protein-(83-132)-NH<sub>2</sub> fragment is a potent inhibitor of melanocortin receptor function // *FEBS Lett.* 1998. V. 428 (1-2). P. 59-62.
240. Rapport M. M., Green A. A., Page I. H. Serum vasoconstrictor (serotonin) IV. Isolation and characterization // *The Journal of Biological Chemistry*. 1948. V. 176. P. 1243-1251.
241. Reizes O., Benoit S.C., Strader A.D., Clegg D.J., Akunuru S., Seeley R.J. Syndecan-3 modulates food intake by interacting with the melanocortin/AGRP pathway // *Ann N Y Acad Sci*. 2003. V. 994. P. 66-73.
242. Reizes O., Lincecum J., Wang Z., Goldberger O., Huang L., Kaksonen M., Ahima R., Hinkes M.T., Barsh G.S., Rauvala H., Bernfield M. Transgenic expression of syndecan-1 uncovers a physiological control of feeding behavior by syndecan-3 // *Cell*. 2001. V. 106 (1). P. 105-116.
243. Roberts J.L., Seeburg P.H., Shine J., Herbert E., Baxter J.D., Goodman H.M. Corticotrophin and b-endorphin: construction and analysis of recombinant DNA

complementary to mRNA for the common precursor // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979. V. 76. P. 2153–2157.

244. Rocha A., Godino-Gimeno A., Cerda-Reverter J.M. Evolution of proopiomelanocortin // *Vitam. Horm.* 2019. V. 111. P. 1-16.

245. Rodrigues A.R., Almeida H., Gouveia A.M. Intracellular signaling mechanisms of the melanocortin receptors: current state of the art // *Cell. Mol. Life Sci.* 2014. V. 72 (7). P. 1331-1345.

246. Rodrigues A.R., Almeida H., Gouveia A.M. Melanocortin 5 receptor signaling and internalization: role of MAPK/ERK pathway and b-arrestins 1/2 // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2012. V. 361. P. 69–79.

247. Rom S., Zuluaga-Ramirez V., Gajghate S., Seliga A., Winfield M., Heldt N.A., Kolpakov M.A., Bashkirova Y.V., Sabri A.K., Persidsky Y. Hyperglycemia-Driven Neuroinflammation Compromises BBB Leading to Memory Loss in Both Diabetes Mellitus (DM) Type 1 and Type 2 Mouse Models // *Mol. Neurobiol.* 2019. V.56 (3). P. 1883-1896.

248. 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 // *Neurochem. Res.* 2018. V.43 (4). P. 821-837.

249. Romanova I.V., Mikhailova E.V., Shpakov A.O. Melanocortin and leptin receptors on serotonergic neurons in the rat midbrain // *Neuroscience and behavioral physiology*. 2019. V. 49 (7). P. 832-837.

250. Rondé P., Nichols R.A. High Calcium Permeability of Serotonin 5-HT<sub>3</sub> Receptors on Presynaptic Nerve Terminals From Rat Striatum // *J Neurochem.* V. 70 (3). P. 1094-1103.

251. Roseberry A.G., Stuhrman K., Dunigan A.I. Regulation of the mesocorticolimbic and mesostriatal dopamine systems by  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone and agouti-related protein // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2015. V. 56. P. 15-25.

252. Roselli-Reh fuss L., Mountjoy K.G., Robbins L.S., Mortrud M.T., Low M. J., Tatro J. B., Entwistle M.L., Simerly R.B., Cone R.D. Identification of a receptor for  $\gamma$  melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system // *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 1993. V. 90 (19). P. 8856-60.

253. Rouault A.A.J., Lee A.A., Sebag J. A. Regions of MRAP2 required for the inhibition of orexin and prokineticin receptor signaling // *BBA - Molecular Cell Research*. 2017. V. 1864. P. 2322–2329.

254. Rouault A.A.J., Srinivasan D.K., Yin T.C., Lee A.A., Sebag J.A. Melanocortin Receptor Accessory Proteins (MRAPs): Functions in the

- melanocortin system and beyond // *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis. Dis.* 2017. V. 1863. P. 2462-2467.
255. Ruan H.B., Dietrich M.O., Liu Z.W., Zimmer M.R., Li M.D., Singh J.P., Zhang K., Yin R., Wu J., Horvath T.L., Yang X. O-GlcNAc transferase enables AgRP neurons to suppress browning of white fat // *Cell*. 2014. V. 159 (2). P. 306-317.
256. Rupnick M.A., Panigrahy D., Zhang C.Y., Dallabrida S.M., Lowell B.B., Langer R., Folkman M.J. Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. № 16. P. 10730–10735.
257. Sanchez-Laorden B.L., Jimenez-Cervantes C., Garcia-Borrón J.C. Regulation of human melanocortin 1 receptor signaling and trafficking by Thr-308 and Ser-316 and its alteration in variant alleles associated with red hair and skin cancer // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 3241–3251.
258. Scarlett J.M., Marks D.L. The use of melanocortin antagonists in cachexia of chronic disease // *Expert Opin Investig Drugs*. 2005. V. 14(10). P. 1233-1239.
259. Schechter L.E., Lin Q., Smith D.L., Zhang G., Shan Q., Platt B., Brandt M.R., Dawson L.A., Cole D., Bernotas R., Robichaud A., Rosenzweig-Lipson S., Beyer C.E. Neuropharmacological profile of novel and selective 5-HT<sub>6</sub> receptor agonists: WAY-181187 and WAY-208466 // *Neuropsychopharmacology*. 2008. V. 33 (6). P. 1323–1335.
260. Scott D.E., Pepe G.J. The fetal baboon median eminence as a circumventricular organ: I. Transmission electron microscopy // *Brain. Res. Bull.* 1987. V. 19 (1). P. 87-94.
261. Sebag J.A., Hinkle P.M. Regions of melanocortin 2 (MC2) receptor accessory protein necessary for dual topology and MC2 receptor trafficking and signaling // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 610–618.
262. Shaver S.W., Pang J.J., Wainman D.S., Wall K.M., Gross P.M. Morphology and function of capillary networks in subregions of the rat tuber cinereum // *Cell Tissue Res*. 1992. V. 267 (3). P. 437-448.
263. Shen Y., Tian M., Zheng Y., Gong F., Fu A. K.Y., Ip N. Y. Stimulation of the hippocampal POMC/MC4R circuit alleviates synaptic plasticity impairment in an alzheimer's disease model // *Cell Reports*. 2016. V. 17. P. 1819–1831.
264. Shenoy S.K., Lefkowitz R.J. (2003) Multifaceted roles of betaarrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling // *Biochem. J.* V. 375. P. 503–515.

265. Shinyama H., Masuzaki H., Fang H., Flier JS. Regulation of melanocortin-4 receptor signaling: agonist-mediated desensitization and internalization // *Endocrinology*. 2003. V. 144. P. 1301–1314.
266. Shpakov A.O., Derkach K.V. The melanocortin signal system of the hypothalamus and its functional state in type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2017. V. 47 (5). P. 495–507.
267. Shpakov A.O., Derkach K.V., Chistyakova O.V., Sukhov I.B., Shipilov V.N., Bondareva V.M. The brain adenylyl cyclase signaling system and cognitive functions in rat with neonatal diabetes under the influence of intranasal serotonin // *J. Metabolic Synd.* 2012. V. 1 doi.org/10.4172/jms.1000104
268. Shpakov A.O., Derkach K.V., Berstein L.M. Brain signaling systems in the Type 2 diabetes and metabolic syndrome: promising target to treat and prevent these diseases // *Future Sci OA*. 2015. V. 1 (3). FSO25.
269. Shpakov A.O., Chistyakova O.V., Derkach K.V., Moiseyuk I.V., Bondareva V.M. Intranasal insulin affects adenylyl cyclase system in rat tissue in neonatal diabetes // *Central Eur. J. Biol.* 2012. V. 7. P. 33-47.
270. Shutter J. R., Graham M., Kinsey A. C., Scully S., Luthy R., Stark K. L. Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice // *Genes Dev.* 1997. V. 11. P. 593–602.
271. Siljee J.E., Unmehopa U.A., Kalsbeek A., Swaab D.F., Fliers E., Alkemade A. Melanocortin 4 receptor distribution in the human hypothalamus // *Eur J. Endocrinol.* 2013. 168(3): 361-369.
272. Simansky K.J., Nicklous D.M. Parabrachial infusion of D-fenfluramine reduces food intake. Blockade by the 5-HT<sub>1B</sub> antagonist SB-216641 // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002. V. 71. P. 681–690.
273. Skibicka K.P., Grill H.J. Energetic responses are triggered by caudal brainstem melanocortin receptor stimulation and mediated by local sympathetic effector circuits // *Endocrinology*. 2008. V. 149. P. 3605–3616.
274. Slominski A., Wortsman J., Plonka P. M., Schallreuter K.U., Paus R., Tobin D.J.. Hair Follicle Pigmentation // *J. Invest. Dermatol.* 2005. V. 124 (1). P. 13-21.
275. Smith A. I., Funder J. W. Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues // *Endocr. Rev.* 1988. V. 9. P. 159–179.
276. Sohn J.W. Network of hypothalamic neurons that control appetite // *BMB Rep.* 2015.V. 48 (4). P. 229-233.

277. Sohn J.W., Xu Y., Jones J.E., Wickman K., Williams K.W., Elmquist J.K. Serotonin 2C receptor activates a distinct population of arcuate proopiomelanocortin neurons via TRPC channels // *Neuron*. 2011. V. 71. P. 488–497.
278. Sousa-Lima I., Park S.Y., Chung M., Jung H.J., Kang M.C., Gaspar J.M., Seo J.A., Macedo M.P., Park K.S., Mantzoros C., Lee S.H., Kim Y.B. Methylsulfonylmethane (MSM), an organosulfur compound, is effective against obesity-induced metabolic disorders in mice // *Metabolism*. 2016. V. 65. № 10. P. 1508–1521.
279. Spencer J. D., Schallreuter K. U. Regulation of Pigmentation in Human Epidermal Melanocytes by Functional High-Affinity  $\beta$ -Melanocyte-Stimulating Hormone/Melanocortin-4 Receptor Signaling // *Endocrinology*. 2009. V. 150 (3). P. 1250–1258.
280. Stanley S.A., Davies S., Smalla C.J., Gardinera J.V., Ghateia M.A., Smith D.M., Bloom S.R.  $\gamma$ -MSH increases intracellular cAMP accumulation and GnRH release in vitro and LH release in vivo // *FEBS Lett*. 2003. V. 543(1-3). P. 66-70.
281. Star R.A., Rajora N., Huang J., Stock R.C., Catania A., Lipton J.M. Evidence of autocrine modulation of macrophage nitric oxide synthase by alpha-melanocyte-stimulating hormone // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995. V. 92 (17). P. 8016-8020.
282. Steculorum S.M., Ruud J., Karakasilioti I., Backes H., Engstrom Ruud L., Timper K., Hess M.E., Tsaousidou E., Mauer J., Vogt M.C., Paeger L., Bremser S., Klein A.C., Morgan D.A., Frommolt P., Brinkkötter P.T., Hammerschmidt P., Benzing T., Rahmouni K., Wunderlich F.T., Kloppenburg P., Brüning J.C. AgRP Neurons Control Systemic Insulin Sensitivity via Myostatin Expression in Brown Adipose Tissue // *Cell*. 2016. V. 165 (1). P. 125-138.
283. Steinbusch H.W.M., Nieuwenhuys R. Localization of serotonin-like immunoreactivity in the central nervous system and pituitary of the rat, with special reference to the innervations of the hypothalamus // *Serotonin: Current aspects of neurochemistry and function*. 1981. P.7-35.
284. Steinbusch H.W.M., Nieuwenhuys R. The raphe nuclei of the rat brainstem: A cytoarchitectonic and immunocytochemical study // *Chemical neuroanatomy* / Ed P.C. Emson. N.Y.: Raven press, 1983. P. 131-207.
285. Stradler A.D., Reizes O., Woods S.C., Benoit S.C., Seeley R.J. Mice lacking the syndecan-3 gene are resistant to diet-induced obesity // *J. Clin. Invest*. 2004. V. 114 (9). P. 1354-1360.
286. Stutz A.M., Staszkiwicz J., Ptitsyn A., Argyropoulos G. Circadian expression of genes regulating food intake // *Obesity*. 2007. V. 15 (3). P. 607-615.

287. Stutzmann F., Vatin V., Cauchi S., Morandi A., Jouret B., Landt O., Tounian P., Levy-Marchal C., Buzzetti R., Pinelli L., Balkau B., Horber F., Bougneres P., Froguel P., Meyre D. Nonsynonymous polymorphisms in melanocortin-4 receptor protect against obesity: the two facets of a Janus obesity gene // *Hum. Mol. Genet.* 2007. V. 16 (15). P. 1837-1844.
288. Sun Y., McGarrigle D., Huang X.Y. When a G protein-coupled receptor does not couple to a G protein // *Mol. Biosyst.* 2007. V. 3. P. 849–854.
289. Sutton G.M., Perez-Tilve D., Nogueiras R., Fang J., Kim J.K., Cone R.D., Gimble J.M., Tschöp M.H., Butler A.A. The melanocortin-3 Receptor Is Required for Entrainment to Meal Intake // *J. Neurosci.* 2008. V. 28(48). P. 12946-1255.
290. Szeitz A., Bandiera S.M. Analysis and measurement of serotonin// *Biomedical Chromatography.* 2018. V.32. P.1-16.
291. Tasken K., Aandahl E.M. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A // *Physiol. Rev.* 2004. V. 84. P. 137–167.
292. Tatro J.B. Melanocortins Defend Their Territory: Multifaceted Neuroprotection in Cerebral Ischemia // *Endocrinology.* 2006. V. 147(3). P. 1122-1125.
293. Tolle V., Low M.J. In vivo evidence for inverse agonism of Agouti-related peptide in the central nervous system of proopiomelanocortin-deficient mice // *Diabetes.* 2008. V. 57 (1). P. 86-94.
294. Tramu G., Piller A., Leonardelli J. Serotonin axons of the ependyma and circumventricular organs in the forebrain of the guinea pig: An immunohistochemical study // *Cell Tissue Res.* 1983. V.228. P.297-311.
295. Trulsson M.E., Jacobs B.L. Raphe unit activity in freely moving cats: correlation with level of behavioral arousal // *Brain Res.* 1979. V.163. P.135–50.
296. Tung Y.C., Piper S.J., Yeung D., O’Rahilly S., Coll A.P. A comparative study of the central effects of specific proopiomelanocortin (POMC)-derived melanocortin peptides on food intake and body weight in pomc null mice // *Endocrinology.* 2006. V. 147. P. 5940–5947.
297. Twarog B. M., Page I. H. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination // *Am. J. Physiol.* 1953. V. 175 (1). P. 157-161.
298. Ueda S., Kawata M., Sano Y. Identification of serotonin and vasopressin immunoreactivities in the suprachiasmatic nucleus of four mammalian species// *Cell Tissue Res.* 1983. V.234. P.237-248.
299. Valdearcos M., Douglass J.D., Robblee M.M., Dorfman M.D., Stifler D.R., Bennett M.L., Gerritse I., Fasnacht R., Barres B.A., Thaler J.P., Koliwad S.K.

- Microglial Inflammatory Signaling Orchestrates the Hypothalamic Immune Response to Dietary Excess and Mediates Obesity Susceptibility // *Cell Metab.* 2017. V. 26 (1). P. 185-197.
300. Van de Kar L.D., Javed A., Zhang, Y., Serres F., Raap D. K., Gray T. S. 5-HT<sub>2A</sub> Receptors Stimulate ACTH, Corticosterone, Oxytocin, Renin, and Prolactin Release and Activate Hypothalamic CRF and Oxytocin-Expressing Cells // *J. Neurosci.* 2001. V. 21(10). P. 3572–3579.
301. Van Dyken P., Lacoste B. Impact of Metabolic Syndrome on Neuroinflammation and the Blood-Brain Barrier // *Front. Neurosci.* 2018. V.12. Article 930.
302. Van Hooft J.A., Vijverberg H.P. 5-HT (3) Receptors and Neurotransmitter Release in the CNS: A Nerve Ending Story? // *Trends Neurosci.* V. 23 (12). P. 605-610.
303. Vastermark A., Krishnan A., Houle M.E., Fredriksson R., Cerda-Reverter J.M., Schiöth H.B. Identification of Distant Agouti-like Sequences and Re-Evaluation of the Evolutionary History of the Agouti-related Peptide (AgRP) // *PLoS One.* 2012. V. 7 (7). e40982.
304. Vleugels R., Verlinden H., Broeck J. V. Serotonin, serotonin receptors and their actions in insects // *Neurotransmitter.* 2015. V. 2. e314.
305. Walther D. J., Bader M. A unique central tryptophan hydroxylase isoform // *Biochemical Pharmacology.* 2003. V.66. P. 1673–1680.
306. Wang D., He X., Zhao Z., Feng Q., Lin R., Sun Y., Ding T., Xu F., Luo M., Zhan C. Whole-brain mapping of the direct inputs and axonal projections of POMC and AgRP neurons // *Front Neuroanat.* 2015. V. 9. Article 40.
307. Wang L., Erlandsen H., Haavik J., Knappskog P.M., Stevens R.C. Threedimensional structure of human tryptophan hydroxylase and its implications on the biosynthesis of the neurotransmitters serotonin and melatonin // *Biochemistry.* 2002. V.41. P.12569–1274.
308. Wang W., Guo D.Y., Lin Y.J., Tao Y.X. Melanocortin Regulation of Inflammation // *Front. Endocrinol.* 2019. V. 10. Article 683.
309. Webb T.R., Clark A.J., Minireview: the melanocortin 2 receptor accessory proteins // *Mol. Endocrinol.* 2010. V. 24. P. 475–484.
310. Wettschureck N., Offermanns S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions // *Physiol. Rev.* 2005. V. 85. P. 1159–1204.
311. Wikberg J.E.C. Melanocortin receptors: perspectives for novel drugs // *Eur. J. Pharmacol.* 1999. V. 375 (1-3). P. 295-310.



312. Williams D.L., Bowers R.R., Bartness T.J., Kaplan J.M., Grill H.J. Brainstem melanocortin 3/4receptor stimulation increases uncoupling protein gene expression in brown fat // *Endocrinology*. 2003. V. 144. P. 4692–4697.
313. Williams K.W., Scott M.M., Elmquist J.K. Modulation of the central melanocortin system by leptin, insulin, and serotonin: co-ordinated actions in a dispersed neuronal network // *Eur. J. Pharmacol.* 2011. V. 660 (1). P. 2-12.
314. Winge I., McKinney J.A., Ying M., D'Santos C. S., Kleppe R., Knappskog P. M., Haavik J. Activation and stabilization of human tryptophan hydroxylase 2 by phosphorylation and 14-3-3 binding // *Biochem J.* 2008. V.410. P.195–204.
315. Woehler A., Ponimaskin E.G. G protein—mediated signaling: same receptor, multiple effectors // *Curr. Mol. Pharmacol.* 2009. V. 2. P. 237–248.
316. Wolf Horrell E. M., Boulanger M. C., D’Orazio J. A. Melanocortin 1 Receptor: Structure, Function, and Regulation // *Front Genet.* 2016. V. 7. P. 95-111.
317. Wyler S.C., Lord C.C., Lee S., Elmquist J.K., Liu C. Serotonergic Control of Metabolic Homeostasis // *Front. Cell Neurosci.* 2017. V. 11. Article 277.
318. Xia Y., Wikberg J.E., Chhajlani V. Expression of melanocortin 1 receptor in periaqueductal gray matter // *Neuroreport.* 1995. V. 6 (16). P. 2193-2196.
319. Xu W., Mo J., Ocak U., Travis Z. D., Enkhjargal B., Zhang T., Wu P., Peng J., Li T., Zuo Y., Shao A., Tang J., Zhang J., Zhang J. H. Activation of Melanocortin 1 Receptor Attenuates Early Brain Injury in a Rat Model of Subarachnoid Hemorrhage Via the Suppression of Neuroinflammation Through AMPK/TBK1/NF- $\kappa$ B Pathway in Rats // *Neurotherapeutics.* 2020. V.17. P. 294–300.
320. Yang Y. Structure, function and regulation of the melanocortin receptors // *Eur. J. Pharmacol.* 2011. V. 660 (1). P. 125–130.
321. Yang Y.K., Thompson D.A., Dickinson C.J., Wilken J., Barsh G.S., Kent S.B., Gantz I. Characterization of Agouti-related protein binding to melanocortin receptors // *Mol. Endocrinol.* 1999. V. 13 (1). P. 148-155.
322. Yashiro H., Takagahara S., Tamura Y.O., Miyahisa I., Matsui J., Suzuki H., Ikeda S., Watanabe M. A Novel Selective Inhibitor of Delta-5 Desaturase Lowers Insulin Resistance and Reduces Body Weight in Diet-Induced Obese C57BL/6J Mice // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 11. P. e0166198. doi: 10.1371/journal.pone.0166198.
323. Yohrling G.J., Jiang G.C., Mockus S.M., Vrana K.E. Intersubunit binding domains within tyrosine hydroxylase and tryptophan hydroxylase // *J. Neurosci. Res.* 2000. V.61. P.313–320.

324. Yudkin J. S., Stehouwer C. D. A., Emeis J. J., Coppel S. W. C-reactive protein in health subjects: association with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999. V. 19. P. 972–978.
325. Zhang X., Zhang G., Zhang H., Karin M., Bai H., Cai D. Hypothalamic IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity // *Cell*. 2008. V. 135. P. 61–73.
326. Zhang, X., Dong, F., Ren, J., Driscoll, M. J., and Culver, B. (2005). High dietary fat induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex // *Exp. Neurol.* V. 191. P. 318–325.
327. Zhong Q., Sridhar S., Ruan L., Ding K.H., Xie D., Insogna K., Kang B., Xu J., Bollag R.J., Isales C.M. Multiple melanocortin receptors are expressed in bone cells // *Bone*. 2005. V. 36 (5). P. 820-831.
328. Zhou L., Sutton G.M., Rochford J.J., Semple R.K., Lam D.D., Oksanen L.J., Thornton-Jones Z.D., Clifton P.G., Yueh C.Y., Evans M.L., McCrimmon R.J., Elmquist J.K., Butler A.A., Heisler L.K. Serotonin 2C receptor agonists improve type 2 diabetes via melanocortin-4 receptor signaling pathways // *Cell Metab.* 2007. V. 6 (5). P. 398-405.
329. Zhou L., Williams T., Lachey J.L., Kishi T., Cowley M.A., Heisler L.K. Serotonergic pathways converge upon central melanocortin systems to regulate energy balance // *Peptides*. 2005. V. 26 (10). P. 1728-1732.