

*На правах рукописи*

**МИХРИНА**

**Анастасия Леонидовна**

**Роль агути-подобного пептида в регуляции  
дофаминергических и норадренергических нейронов мозга**

**АВТОРЕФЕРАТ**

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

**03.03.01 – ФИЗИОЛОГИЯ**

**Санкт-Петербург**

**2015**

Работа выполнена в лаборатории сравнительной сомнологии и нейроэндокринологии  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институте  
эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук

Научный руководитель: **Романова Ирина Владимировна**  
доктор биологических наук,  
ведущий научный сотрудник

Официальные оппоненты:

**Ордян Наталья Эдуардовна**, доктор биологических наук, ФГБУН Институт  
физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, заведующая  
лабораторией нейроэндокринологии

**Шабанов Петр Дмитриевич**, доктор медицинских наук, профессор, ФГБВОУ ВПО  
«Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» Министерства обороны  
Российской Федерации, заведующий кафедрой фармакологии

**Ведущая организация:** ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и  
нейрофизиологии Российской академии наук

Защита диссертации состоится « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2016 г года в 11 часов на  
заседании диссертационного совета (Д.002.127.01) при Институте эволюционной  
физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук по адресу:  
194223, г. Санкт-Петербург, пр. Мориса Тореза, 44.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Института  
эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук,  
а также на сайте <http://www.iephb.ru/sovet.htm>

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук



Р.Г. Парнова

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы.** Дофамин и норадреналин играют огромную роль в регуляции многих функций организма. В мозге эти катехоламины участвуют в иннервации большого числа структур и, соответственно, вовлечены в регуляцию разных функций и форм поведения (двигательная активность, цикл бодрствование-сон, стресс, когнитивные процессы, пищевое поведение, ноцицепция и др.). Изменение баланса катехоламинов является причиной возникновения различных заболеваний, в частности нейродегенеративных (болезнь Паркинсона, эпилепсия и др.). Поэтому изучение механизмов регуляции биосинтеза катехоламинов остается актуальной проблемой физиологии и медицины. В регуляции дофамин- и норадренергических нейронов участвуют различные пептиды. При выявлении новых пептидов в областях, где локализованы катехоламинергические нейроны, возникает вопрос о возможности и характере их функционального влияния на эти нейроны.

Агути-подобный пептид (AGRP—agouti related peptide/agouti gene related protein) идентифицирован около 20 лет назад (Ollmann, et al., 1997). В мозге мРНК AGRP выявлена только в нейронах аркуатного ядра гипоталамуса (Bagnol, et al., 1999). Было показано, что из промоллекулы в ходе посттрансляционных изменений образуется три активных фрагмента AGRP: 25-51, 54-82 и 83-132 (Creemers, 2006). Последний фрагмент AGRP 83-132 является наиболее изученным. Различные литературные источники свидетельствуют об участии AGRP в регуляции пищевого поведения как эндогенного антагониста меланокортиновых рецепторов 3-го и 4-го (МКР3 и МКР4) типов (Yang, et al., 1999; Stanley, et al., 2001; Schwartz, Mortin, 2002), блокирование которых в гипоталамусе приводит к активации аппетита и изменению энергетического баланса организма (Cone, 2005; Lee, Wardlaw, 2007). Однако AGRP-иммунопозитивные отростки выявлены далеко за пределами гипоталамуса, в частности в областях, где локализованы тела дофаминергических (черная субстанция, вентральная тегментарная область и др.) и норадренергических (голубое пятно, ядро одиночного тракта) нейронов (Bagnol, et al., 1999; Haskell-Luevano, et al., 1999; Романова, 2012). Результаты,

---

**Список сокращений:** ВП-вазопрессин; ГАД 65/67 – глутаматдекарбоксилаза 65/67; МКР3/МКР4 – меланокортиновые рецепторы 3-го и 4-го типов; ТГ – тирозингидроксилаза; фТГ(40) – фосфорилированная по серину-40 ТГ; фТГ(31) – фосфорилированная по серину-31 ТГ; ДБГ - дофамин-β-гидроксилазы; AGRP – agouti related peptide (агути-подобный пептид); VTA – ventral tegmental area (вентральный тегментум); LC – locus coeruleus (голубое пятно); NTS – nucleus tractus solitaries (ядро одиночного тракта); SN- substantia nigra.

полученные разными авторами, свидетельствуют о функциональной роли AGRP 83-132 и как агониста МКР3 и МКР4 (Sternson, 2012), а также о возможном действии AGRP 83-132 через другие типы рецепторов (Pritchard, White, 2005; Fu, den Pol, 2008).

В настоящее время в литературе появились данные о “непищевых” функциях AGRP (Романова, 2012; Lippert, Ellacott, Cone, 2014). Были выявлены морфологические связи между AGRP- и дофаминергическими нейронами мозга, продемонстрировано уменьшение уровня тирозингидроксилазы (ключевого фермента синтеза катехоламинов) в дофаминергических нейронах мозга под влиянием AGRP 83-132 (Романова, 2012). Однако, остается невыясненным функциональное значение других фрагментов AGRP (25-51 и 52-82) и каково влияние AGRP на норадренергические нейроны.

МКР3 и МКР4 широко экспрессируются в мозге (Roselli-Rhefus, 1993; Liu, et al., 2003; Lippert, et al., 2014). Однако вопрос об их локализации требуется уточнить для выяснения механизмов влияния AGRP на дофамин- и норадренергические нейроны мозга. Также не известно, оказывают ли дофаминергические нейроны влияние на AGRP-ергические нейроны аркуатного ядра гипоталамуса, изменяется ли уровень AGRP при нарушении баланса дофамина в мозге. Выяснение этих вопросов важно для понимания роли AGRP при патологиях дофаминергической системы и, возможно, позволит выяснить участие AGRP в развитии компенсаторных механизмов мозга при различных функциональных нарушениях.

В гипоталамусе вазопрессинергические нейроны получают мощную дофаминергическую и норадренергическую иннервацию (Wagner, et al., 1995; Cheung, et al., 1998; Угрюмов, 1999). В областях локализации вазопрессинергических нейронов выявляются и AGRP-иммунопозитивные отростки (Bagnol, et al., 1999; Haskell-Luevano, et al., 1999). Однако каковы морфофункциональные взаимоотношения между AGRP и вазопрессинергическими нейронами остается невыясненным.

**Цель настоящей работы:** исследование морфофункциональных взаимодействий AGRP- с дофаминергическими и норадренергическими нейронами мозга.

В связи с этим были поставлены следующие **задачи:**

- 1) Выявить морфологические связи между AGRP- и норадренергическими нейронами мозга.
- 2) Оценить возможность влияния различных активных фрагментов AGRP на дофамин- и норадренергические нейроны мозга.

- 3) Оценить характер распространения МКР3 и МКР4 в дофамин- и норадренергических структурах мозга.
- 4) Оценить морфофункциональное состояние вазопрессинергических нейронов гипоталамуса при изменении баланса AGRP в мозге.
- 5) Выяснить, изменяется ли функциональная активность AGRPергических нейронов при изменении баланса катехоламинов в мозге.

**Научная новизна.** Впервые продемонстрировано дозозависимое тормозное влияние различных активных фрагментов AGRP на биосинтез дофамина в мозге млекопитающих. Выявлено уменьшение уровня ферментов синтеза норадреналина в нейронах голубого пятна после воздействия AGRP. Показана взаимосвязь между уровнем AGRP и функциональным состоянием дофамин- и норадренергических нейронов мозга, что, в частности, определяет характер двигательной активности. МКР выявлены в дофаминергических (МКР3/4), норадренергических (МКР3), ГАМКергических (МКР3/4) нейронах мозга. Показано, что тормозное влияние AGRP на дофаминергические и норадренергические нейроны мозга может осуществляться как через блокаду МКР3 и МКР4 (фрагмент 83-132), а также и через другие механизмы, не связанные с G-белок-связанными рецепторами (фрагмент 25-51). Впервые показано тормозное влияние AGRP на вазопрессинергические нейроны гипоталамуса, которое может осуществляться как прямым действием, так и опосредованным, через регуляцию функциональной активности нейронов-посредников, в частности дофамин- и норадренергических. Показано, что меланокортиновое ожирение (у мышей Agouti yellow) сопровождается активацией дофаминергической и вазопрессинергической систем. Впервые выявлена функциональная связь, демонстрирующая возможность влияние дофамина на AGRPергические нейроны через D1 рецепторы, что, очевидно, может быть компенсаторным механизмом, регуляция которого является многофакторным процессом. Впервые показано, что нейродегенеративное заболевание, связанное с увеличением уровня дофамина в мозге (аудиогенная эпилепсия) сопровождается увеличением экспрессии как AGRP, так и МКР4.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. AGRPергические нейроны мозга оказывают тормозное воздействие не только на дофаминергические, но и на норадренергические нейроны мозга.
2. Присутствие МКР3 и МКР4 непосредственно в телах дофаминергических и МКР3 в телах норадренергических нейронов является структурной основой для осуществления тормозного эффекта фрагмента AGRP 83-132 на дофамин и

норадренергические нейроны мозга. Присутствие этих рецепторов в телах ГАМКергических нейрон свидетельствует о роли AGRP как модулятора взаимодействия ГАМК с дофамин- и норадренергическими нейронами.

3. Фрагменты AGRP 83-132 и 25-51 оказывают тормозное влияние на биосинтез дофамина.

4. Локализация D1 рецепторов дофамина непосредственно на телах AGRPергических нейронов свидетельствует о наличии функциональной связи, осуществляющей регуляторное влияние дофамина на AGRPергические нейроны.

5. Изменение баланса катехоламинов в мозге оказывает влияние на экспрессию AGRP в гипоталамусе.

**Теоретическая и практическая значимость.** Исследование носит фундаментальный характер и направлено на понимание нейрхимических механизмов взаимосвязи меланокортиновой системы с дофамин- и норадренергическими нейронами мозга, а также расширяет понимание роли AGRPергических нейронов гипоталамуса в осуществлении не только регуляции пищевого поведения, но и других функций, в которые вовлечены дофамин- и норадренергические системы (нейросекреция, двигательная активность, стресс, цикл бодрствование-сон и др.). Полученные результаты могут быть использованы в курсах лекций и практических занятий для студентов биологических и медицинских факультетов университетов и медицинских институтов, а также для разработки новых методов диагностики нарушения функционирования дофаминергической и норадренергической систем и определения фармацевтических стратегий для их коррекции. Полученные данные могут быть использованы как теоретическая основа при разработке противосудорожных препаратов, блокирующих МКР в мозге.

**Апробация работы.** Результаты исследования представлены и обсуждены на VI-й Всероссийской конференции с международным участием “Механизмы функционирования висцеральных систем”, посвященной 50-летию открытия А.М. Уголевым мембранного пищеварения (Санкт-Петербург, 2008), на конференции “Механизмы нервных и нейроэндокринных регуляций”, посвященной 90-летию со дня рождения академика Т.М. Турпаева (Москва, 2008), на BSN annual meeting (Edinburg, Великобритания, 2009), на XXI и XXII-м съездах физиологического общества им. И.П. Павлова (Калуга, 2010; Волгоград, 2013), на VIII и IX Всероссийской конференции “Нейроэндокринология” (Санкт-Петербург, 2010, 2015), на VI-IX Всероссийских конференциях с международным участием “Актуальные проблемы сомнологии” (Санкт-Петербург, 2008; Москва 2010, 2012, 2014), на XIV

Международном совещании и VII школе по эволюционной физиологии (Санкт-Петербург, 2011), на 10-м Симпозиуме «Catecholamines and other neurotransmitters in stress» (Smolenice Castle, Slovakia, 2011), на VIII Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы функционирования висцеральных систем», посвященной 220-летию со дня рождения акад. К.М. Бэра (Санкт-Петербург, 2012), на Всероссийской конференции «Братья Орбели и развитие современной науки» (Санкт-Петербург, 2012), на IX и X международном междисциплинарном Конгрессе «Нейронауки для медицины и психиатрии» (Судак, Крым, Украина, 2013; Россия, 2014), на 10-м Конгрессе «Neurohypophyseal neurohormones» (Bristol, Великобритания, 2013), на 3-й юбилейной международной конференции «Neuroscience and Biological Psychiatry» (Yerevan, Армения, 2013), на Всероссийской конференции молодых ученых «Нейробиология интегративных функций мозга» (Санкт-Петербург, 2013), на Всероссийской конференции с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга» (Санкт-Петербург, 2014), на IV Международной междисциплинарной конференции «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций» (Москва, 2015).

**Финансовая поддержка работы.** Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты №№ 07-04-01258, 12-04-01543 и 14-04-31565-мол\_а), гранта ОПТЭК.

**Личный вклад автора.** Результаты, представленные в работе, получены лично автором и при его непосредственном участии в проведении экспериментов. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

**По теме диссертации опубликовано** 20 печатных работ, из которых 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, выводов, заключения и списка литературы, включающего 204 источника, из которых 31 отечественный. Работа изложена на 129 страницах, иллюстрирована 66 рисунками.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

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

Использованы 4-х месячные самцы крысы линии Вистар и дочерней линии Крушинского-Молодкиной (КМ), характеризующейся генетической предрасположенностью к аудиогенным судорожным припадкам из популяции,

выведенной на кафедре ВНД СПбГУ Е.А. Рябинской и поддерживаемой в виварии ИЭФБ РАН. Перед исследованием самцы КМ были тестированы на наличие судорожной активности в.н.с. ИЭФБ РАН С.И. Ватаевым, которая развивалась по сценарию клонико-тонических судорожных припадков (Ватаев, и др., 2014). В работе также использованы половозрелые самки мыши C57Bl/6J одного возраста и стадии овариального цикла нормального генотипа а/а и генотипа Ау/а (Agouti yellow), у которых развивается ожирение. Эксперименты начинали в период активного бодрствования животных (с 9 до 11.00). Опыты на животных проводили с учетом этического кодекса по проведению медико-биологических исследований.

### **Эксперименты in vitro**

Мозг мышей (генотип а/а) весом 20-22 г. помещали в стерильных условиях в питательную среду (DMEM с 10 000 ед. пенициллина) и вырезали из него необходимую область 1,5-2 мм, ориентируясь по координатам атласа мозга мыши (Paxinos, Franklin, 2001). В инкубаторе, поддерживающем температуру 37° С и концентрацию газов 95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>, проводили 30-минутную преинкубацию срезов в DMEM с 50 мкг/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 20% инактивированной нормальной сыворотки крови лошади. Далее для опыта с инкубацией с AGRP 83-132 или AGRP 25-51 срезы из области гипоталамуса, VTA или LC, инкубировали 3 часа в той же питательной среде с добавлением PBS (фосфатный буфер с 0,9% NaCl, pH 7,4) или 200 нМ AGRP (83-132 или 25-51, Phoenix Pharmaceuticals Inc., США), растворенных в PBS. Для эксперимента с инкубацией в среде с неселективным блокатором МКР3/4 (SHU 9119) и AGRP 83-132 сначала 1 ч проводили первую инкубацию срезов из области гипоталамуса, VTA или LC: в чистой среде - контрольные образцы или в среде с 20 нМ SHU 9119 (Phoenix Inc., США) – опыт. Затем 3 ч проводили вторую инкубацию, для чего меняли среду: контрольные образцы – чистая среда, а опытные разделили на 2 группы 1) среда с SHU 9119 (20 нМ) и 2) с SHU 9119 (20 нМ) и AGRP 83-132 (200 нМ). Образцы (n=5-6) замораживали для приготовления проб для Вестерн-блоттинга или погружали в 4% забуференный параформальдегид (+ 4° С) для морфологических исследований.

### **Эксперименты in vivo**

**Депривация сна.** Крысам Вистар в течение 6 ч посредством мягкого прикосновения к вибриссам не давали дремать, застывать, что препятствовало наступлению поведенческого сна (Оганесян, и др., 2007). После мягкого эфирного наркоза крыс декапитировали, мозг контрольных крыс (в период активного бодрствования, n=6), через 6 ч депривации (n=6) и через 2 ч после прекращения депривации (n=6) был заморожен в сухом льду. В ткани дорзального и вентрального стриатума определяли концентрацию дофамина.

**Тест “открытое поле” и иммобилизационный стресс.** Самцы крыс линии Вистар (n=50) были тестированы в “открытом поле” по показателям, характеризующим двигательную активность (Буреш, и др., 1991): учитывалось количество секторов, пройденных на периферии, число вертикальных стоек, число выходов в центр арены, суммарное время пребывания на периферии и в центре арены. Это позволило разделить животных на “активных” и “пассивных”. В каждой группе было отобрано по 10 животных (по 5 – контрольные, по 5 - для жесткой иммобилизации на спине путем фиксации конечностей).

Контрольные (n=10) и после стресса (n=10) крысы были подвергнуты легкому эфирному наркозу и декапитации. Гипоталамус и мозжечок погружали в 4% параформальдегид (+ 4° С), средний мозг был заморожен в сухом льду для приготовления проб для Вестерн-блоттинга.



**Введение пептидов в средний мозг.** Мыши C57Bl/6J генотипа а/а (20-22 г., n=34) были наркотизированы хлорал гидратом (400 мг/кг) и зафиксированы в стереотаксисе для мелких животных (СЭЖ-5, Россия). С помощью шприца Гамильтон билатерально проведены инъекции по 0,5 мкл AGRP 83-132 (0,2 или 0,6 нмоль) или AGRP 25-51 (0,6 нмоль): AP= -3,6 мм, L=0,5 мм, V=4,2 мм (Paxinos, Franklin, 2001). Контрольным мышам вводили по 0,5 мкл 0,9% NaCl. Через 3 ч после второго введения мышей декапитировали, стриатум замораживали в сухом льду и хранили при - 80° С для анализа дофамина в ткани. Средний мозг замораживали для приготовления проб для Вестерн-блоттинга или погружали в 4% забуференный параформальдегид (+ 4° С) для морфологических исследований.

**Моделирование дефицита катехоламинов с помощью внутрибрюшинного введения альфа-метил-пара-тирозина (аМПТ) - блокатора синтеза катехоламинов или SCH 39166 - антагониста D1 рецепторов дофамина.**

В первый день эксперимента мышам вводили по 200 мкл: 0,9% NaCl (контроль, n=13), аМПТ (Sigma, США; 200 мг/кг, n=13) или SCH 39166 (Tocris, США; 0,3 мг/кг, n=13). Во второй день мышам вводили 0,9% NaCl, аМПТ (100 мг/кг), или SCH 39166 (0,3 мг/кг). В третий день эксперимента мышам вводили те же количества препаратов, что и во второй день, но инъекции повторяли 3 раза с интервалом 2 ч. Мозг фиксировали для морфологических исследований или замораживали для Вестерн-блоттинга и анализа уровня экспрессии генов (ПЦР).

**Биотин-стрептавидиновый метод и световая микроскопия.** Исследования проводили на свободноплавающих (20 мкм) и монтированных на стекла срезах (в этом случае проводили демаскировку антигена) по описанной ранее методике (Романова, Михрина, 2012). Для исследования проведены инкубации с первыми антителами (+ 4° С, 48 ч): кролика против AGRP (Phoenix Inc., США, 1:1000), кролика против тирозингидроксилазы (ТГ, Abcam, Великобритания, 1:2000), кролика против фТГ(31), (Invitrogen, США, 1:500), кролика против фТГ(40) (Invitrogen, США, 1: 1000), кролика против ДБГ (Abcam, Великобритания, 1:2000), кролика против ВП (Abcam, Великобритания, 1:200), мыши против D1-рецепторов дофамина (D1, Chemicon, США, 1:200), кролика против D2-рецепторов дофамина (D2, Millipore, 1:300), кролика против фосфорилированной ERK 1/2 (фERK, Cell Signaling, США, 1:500). Используются вторые антитела либо против кролика, либо против мыши, конъюгированные с биотином (VectorLab., Великобритания, 1:300). Специфичность окраски проверяли с помощью инкубации без первых антител. Изображения изучаемых структур были получены с помощью микроскопа Axio A1 (Karl Zeiss, Германия) со встроенной видеокамерой Imager 4.1. На снимках проводили анализ оптической плотности (ОП) иммунореактивного вещества в условных единицах (у. ед.) с помощью программ Scion Image Analysis (4.0b, NIH) или Photo-M (Черниговский, [http:t\\_lambda.chat.ru](http:t_lambda.chat.ru)).

**Двойное иммуномечение, флуоресцентная и конфокальная микроскопия.** Исследования проводили на мозге перфузированных животных. Свободноплавающие (20 мкм) или монтированные на стекла срезы инкубировали (48-72 ч., + 4° С) в «коктейле» первых антител: мыши против ТГ (Sigma, США, 1:1000) и кролика против AGRP (1:500), или кролика против МКР3 (Sigma, США, 1:100), или кролика против МКР4 (PhoenixIncoгp., США, 1:100), или кролика против ДБГ (1:1000), или кролика против фосфорилированной по серину-99 ПКА (фПКА, Abcam, Великобритания, 1:200); мыши против ГАД 65 и 67 (Millipore, США, 1:500) и кролика против МКР3 (1:100) или кролика против МКР4 (1:100); мыши против вазопрессина (1:1000) и

кролика против AGRP (1:500), или кролика против МКР3 (1:100), или кролика против МКР4 (1:100), или кролика против фПКА (1:200); мыши против Д1 (1:200) и кролика против AGRP (1:500) или кролика против ВП (Abcam, Великобритания, 1:200). На двух соседних последовательных срезах была проведена реакция с антителами кролика против ВП (1:200) и кролика против Д2 (Millipore, США, 1:200). Мышинные антитела против ВП были подарены профессором Гарольдом Гейнером, (NIH/NINDS, США). Использованы вторичные антитела (козы против кролика и осла против мыши), конъюгированных с различными флуорохромами: Alexa-488 или Alexa-568 (Invitrogen, США); или CY3 (Jackson Immunology Research Laboratory, США). В ряде случаев после вторичных антител срезы обрабатывали ядерным красителем DAPI (Sigma, США, 1:2000). В качестве контроля использовали реакции без первых антител. Анализ препаратов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss (Германия) и лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica XP-5 (Германия) и пакетов программ Leica LAS AF Lite.

**Вестерн-блоттинг.** Протокол и использованные реагенты ранее подробно описаны (Михрина, Романова, 2013). Были использованы первичные антитела в соответствующих разведениях: кролика против AGRP (1:500, M=12кД), мыши против ТГ (1:2000, M=60 кД), мыши против ГАД 65 или 67 (1:2000, M=65 и 67кД), кролика против фТГ(31) (1:500, M=60), кролика против фПКА (1:1000, M=51), кролика против фЕРК 1/ 2 (1:500, M=40 и 42 кД), мыши против GAPDH (glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase, Abcam, Великобритания, 1:10000, M=37 кД); вторые антитела, конъюгированных с пероксидазой (Sigma, США): козы против мыши (1:60000) или козы против кролика (1: 20000).

**Метод гибридизации in situ.** Метод использован для выявления мРНК вазопрессина на срезах мозга в структурах гипоталамуса. Использована методика, описанная ранее (Черниговская, и др., 2001) и коммерческий набор, содержащий дигоксигенин-меченые нуклеотиды (Boehringer Mannheim, Германия). Плазида, содержащая мРНК вазопрессина, любезно предоставлена Е.В. Черниговской.

**Метод обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени.** Обратная транскрипция (ОТ) проведена по протоколу и набором реактивов фирмы Синтол (Россия, Москва). В качестве праймера-затравки использовали oligo(dT). В пробах в объеме 25 мкл содержалось 1µg тотальной РНК. Полученную кДНК использовали для ПЦР в реальном времени. Синтез праймеров проведен фирмами Синтол и Евроген (Москва).

**Таблица 1.** Структура праймеров, используемых для оценки уровня экспрессии генов AGRP, ГАД65, ГАД67, HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl- transferase), у мыши.

Ген	Праймеры	
	Прямой 5'-3'	Обратный 5'-3'
AGRP	АСААСТGCAGACCGAGCAGAA	CGAGCGGAGAACCAGACT
ГАД65	ТСААСТААГТСССАСССТААГ	СССТГТАГАГТСААТАССТГС
ГАД67	СТСАГГСТГТАТГТСАГАТГТТС	ААГСАГТСАСАГАГАТТГГТС
HPRT	АГССГАССГГТТСТГТКАТ	ГГТКАТААССТГГТТКАТКАТКАС

Реакции проводили в планшетах для ПЦР, каждую пробу повторяли 3 раза. ПЦР амплификация проводилась в объеме 25 мкл, содержащем 40 нг продукта ОТ-ПЦР, 0,4 мкМ прямого и обратного праймера (для крысиного AGRP и GAPDH 0,2 мкМ), реагент qPCRmix-HS SYBR+LowROX (Евроген, Москва). В качестве негативного контроля для

ОТ служили пробы с мРНК без фермента, а для ПЦР - пробы с праймером, но без продукта ОТ. В таблицах 1 и 2 приведены последовательности использованных праймеров.

**Таблица 2.** Структура праймеров, используемых для оценки уровня экспрессии генов AGRP, Д2 рецепторов дофамина, МКР3, МКР4, GAPDH у крысы.

Ген	Праймеры	
	Прямой 5'-3'	Обратный 5'-3'
AGRP	GAAGAAGACAGCAGCAGACC	TGAAGAAGCGGCAGTAGCAC
Д2	GCAGCAGTCGAGCTTTCAGA	CGCCTGTTCACTGGGAAACT
МКР3	CAGCACATGGATAATATCTTCGACTCT	GGCAATGGCCAGGAGGTT
МКР4	TGGGTGTCATAAGCCTGTTGG	GCGTCCGTGTCCGTA CTG
GAPDH	GTGTTCCSTACCCCAATGTATCC	GATGTCATCATACTTGGCAGGTTT

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, использовали пороговый метод, результат выражен как  $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

#### **Определение содержания дофамина и его метаболита в ткани.**

Дофамин и его метаболит ДОФУК (диоксифенилуксусная кислота) определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с электрохимической детекцией (Krasnova, et al., 2000) на хроматографической системе «Beckman» и электрохимического детектора LC-4B «BAS» с использованием аналитической колонки «Zorbax C18» («Agilent Technologies», США). Конечная концентрация выражена в нг/мг ткани.

#### **Статистический анализ результатов.**

Статистический анализ данных, полученных с помощью иммуногистохимических методов, проводили с помощью непарного t-критерия Стьюдента при уровне значимости  $p < 0,05$  с помощью программы Microsoft Excel 2003. При сравнении двух групп животных (контроль-опыт) за n было принято количество срезов. Результаты представлены в у. ед. как среднее арифметическое ОП в каждой группе животных  $\pm$  средняя квадратическая погрешность ( $mean \pm SE$ ) и как процент изменения по сравнению с контрольным (100%) уровнем. При статистическом анализе данных, полученных методом ПЦР и ВЭЖХ, использовали ANOVA-тест ( $p < 0,05$ ).

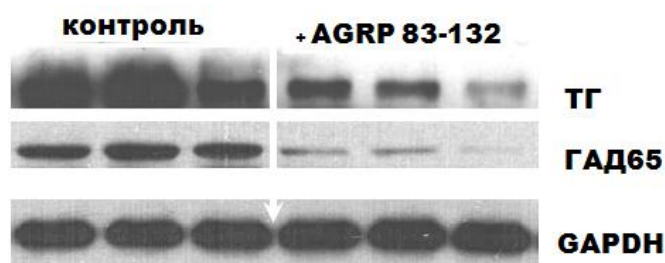
## **ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Исследование локализации AGRP-иммунопозитивных отростков в норадренергических структурах**

С помощью конфокальной микроскопии в норадренергических областях (LC, NTS) у мыши и крысы мы показали локализацию AGRP-иммунопозитивных отростков непосредственно вокруг тел норадренергических нейронов. Обильная сеть AGRP-иммунопозитивных отростков также выявлена и в зоне *peri-LC*, где по данным литературы (Aston-Jones, et al., 2004) и нашим собственным наблюдениям локализованы ГАМКергические нейроны.

### Влияние AGRP 83-132 на норадренергические и ГАМКергические нейроны

С помощью Вестерн-блоттинга был проведен анализ экспрессии ферментов синтеза норадреналина и ГАМК в переживающих срезах LC после 3 ч инкубации в среде с 200 нМ AGRP 83-132. Результаты демонстрируют уменьшение экспрессии ТГ на 52% ( $p < 0,05$ ) и уменьшение экспрессии ГАД65 – на 68% ( $p < 0,05$ ; рис. 1).



*Рис. 1.* Анализ экспрессии ТГ и ГАД65 в LC мыши после инкубации переживающих срезов мозга в среде с AGRP 83-132 (200 нМ). GAPDH – контрольный белок.

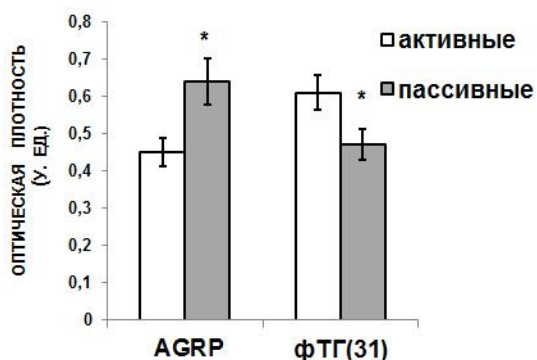
Полученные данные демонстрируют ингибирующее влияние AGRP 83-132 на экспрессию ТГ и ГАД65, что свидетельствует о тормозном действии этого фрагмента на функциональную активность норадренергических и ГАМКергических нейронов. Изменение уровня фермента синтеза ГАМК в норадренергических структурах после инкубации с AGRP 83-132 может говорить о роли AGRP как модулятора функциональных взаимодействий норадреналин - ГАМК.

### Изменение уровня AGRP и ТГ в среднем мозге в зависимости от степени двигательной активности

В гипоталамусе анализ нейронов аркуатного ядра (АРК) у “пассивных” крыс свидетельствует о более высоком уровне экспрессии AGRP (на 27%,  $p < 0,05$ ) и более низком уровне экспрессии ТГ (на 24%,  $p < 0,05$ ) по сравнению с “активными”. После 30-минутной иммобилизации не выявлено достоверных изменений экспрессии AGRP, но при этом в одинаковой степени наблюдалось увеличение экспрессии ТГ на 45% ( $p < 0,05$ ) у “пассивных” и на 40% ( $p < 0,05$ ) у “активных” крыс по сравнению с соответствующими контрольными животными.

В среднем мозге (VTA), где AGRP-иммунопозитивные отростки выявляются вокруг дофаминергических нейронов, анализ, проведенный с помощью Вестерн-блоттинга, выявил у “пассивных” крыс более высокий уровень экспрессии AGRP (на 42%,  $p < 0,05$ ) и более низкие уровни экспрессии ТГ (на 32%,  $p < 0,05$ ) и фТГ(31) (на 30%,  $p < 0,05$ ) по сравнению с “активными” крысами (рис. 2). После иммобилизации выявлено увеличение экспрессии фТГ(31) у “активных” (на 33%,  $p < 0,05$ ) и у “пассивных” (на 32%,  $p < 0,05$ ) крыс по сравнению с соответствующими контрольными группами, но изменения экспрессии AGRP в обеих группах не обнаружено (рис. 2).

Полученные данные демонстрируют, что в VTA, также как и в АРК, т.е. в областях, где локализованы тела дофаминергических нейронов, наблюдается взаимосвязь между уровнями иммунореактивного AGRP и фТГ(31). Увеличение экспрессии ТГ и фТГ(31) наблюдалось после иммобилизационного стресса при отсутствии изменения уровня AGRP.



*Рис. 2. Анализ экспрессии AGRP и фТГ(31) в VTA у “активных” и “пассивных” крыс. \* -  $p < 0,05$  при сравнении с контролем. По оси абсцисс: оптическая плотность в условных единицах (у. ед.).*

Ранее было показано, что после более длительного стрессорного воздействия (6 ч депривации сна - ДС), когда было выявлено достоверное увеличение ОП AGRP в нейронах АРК и в их отростках в VTA, наблюдалось достоверное уменьшение ОП ТГ как в дофаминергических нейронах среднего мозга, так и ОП фТГ(31) в их отростках в стриатуме (Романова, 2012; Романова, Михрина, 2013).

Известно, что при стрессе происходит увеличение концентрации АКТГ в крови, что приводит к усилению продукции кортикостероидов (Aguilera, et al., 2008), которые оказывают активирующее влияние на AGRPергические нейроны (Lee, et al., 2013). Такой стрессор как 6-часовая ДС, в отличие от 30 минут иммобилизации, является длительным стрессорным воздействием, при котором выявлено увеличение уровня AGRP, что привело к подавлению и/или истощению активности в дофаминергических системах.

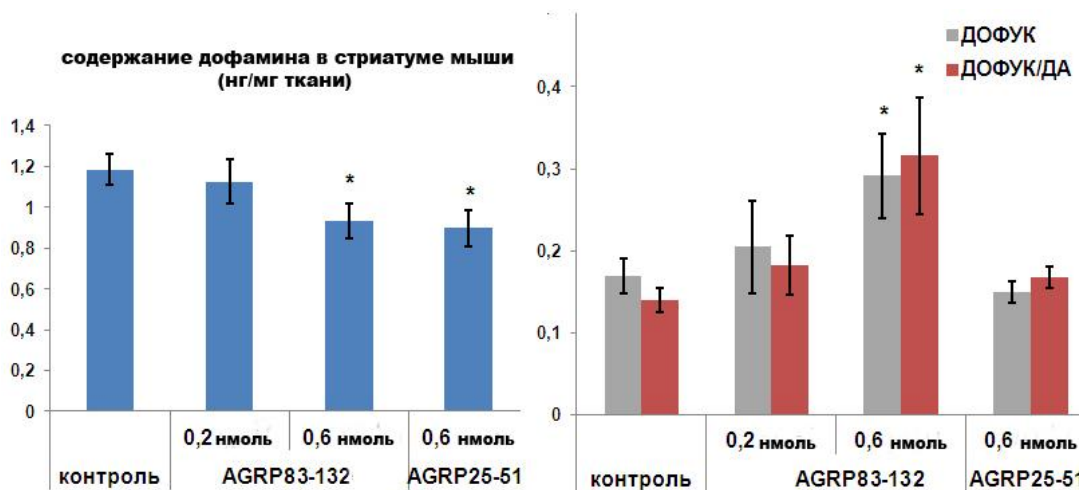
Полученные данные демонстрируют дозозависимый характер влияния AGRP на дофаминергические нейроны, тормозный эффект которого проявляется в зависимости от степени стрессорного воздействия.

### **Влияние AGRP на биосинтез дофамина в экспериментах in vivo**

Результаты ВЭЖХ демонстрируют уменьшение концентрации дофамина в стриатуме после введения в средний мозг 0,6 нмоль AGRP 25-51 (на 23%,  $p < 0,05$ ) или 0,6 нмоль AGRP 83-132 (на 24%,  $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем.

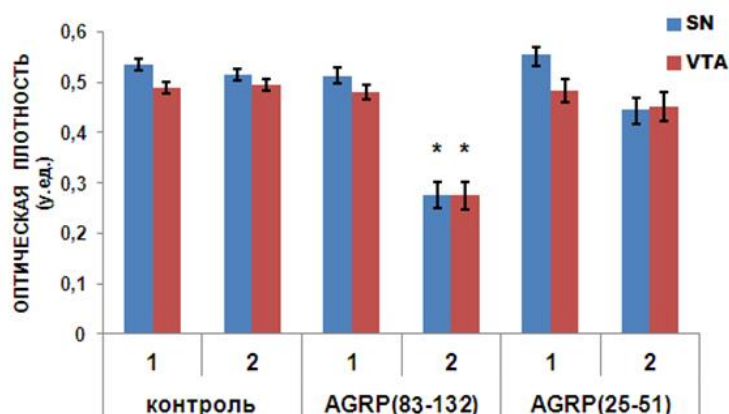
Результаты Вестерн-блоттинга ткани вентральной части среднего мозга, куда были введены белки, свидетельствуют об отсутствии изменения экспрессии ТГ после введения 0,2 нмоль обоих фрагментов AGRP и демонстрируют уменьшение

экспрессии ТГ (на 24%,  $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем после введения 0,6 нмоль AGRP 83-132. После введения 0,6 нмоль AGRP 25-51 не выявлено изменения экспрессии ТГ в среднем мозге, несмотря на то, что выявлено уменьшение концентрации дофамина в стриатуме.



**Рис. 3.** Анализ содержания дофамина (ДА) и диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК), в стриатуме мыши после введения в средний мозг 0,2 и 0,6 нмоль AGRP 83-132 и AGRP 25-51; \* -  $p < 0,05$  при сравнении с контролем.

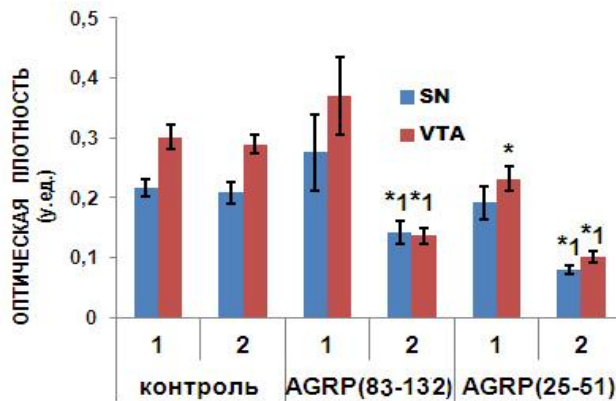
На срезах из области среднего мозга было изучено влияние обоих фрагментов AGRP на различные пути фосфорилирования ТГ. После введения 0,6 нмоль AGRP 83-132 вокруг области инъекции выявлено уменьшение ОП фТГ(40) в нейронах SN (на 46%,  $p < 0,05$ ) и VTA (на 45%,  $p < 0,05$ ) по сравнению с соответствующей областью в контроле (рис. 4). После введения 0,6 нмоль AGRP 25-51 не выявлено достоверных изменений ОП фТГ(40).



**Рис. 4.** Анализ уровня фТГ(40) в нейронах SN и VTA мыши после введения 0,6 нмоль AGRP (83-132) и AGRP (25-51). 1 – латеральная от инъекции область, 2 – область вокруг инъекции; \*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

После введения 0,6 нмоль AGRP 83-132 в области вокруг инъекции выявлено уменьшение ОП фТГ(31) в нейронах SN (на 33%,  $p < 0,05$ ) и VTA (на 53%,  $p < 0,05$ ) по сравнению с соответствующей зоной в контроле. После введения 0,6 нмоль AGRP 25-51

выявлено уменьшение ОП фТГ(31) в нейронах SN (на 62%,  $p < 0,05$ ) и VTA (на 65%,  $p < 0,05$ ) по сравнению с соответствующей зоной в контроле (рис. 5).



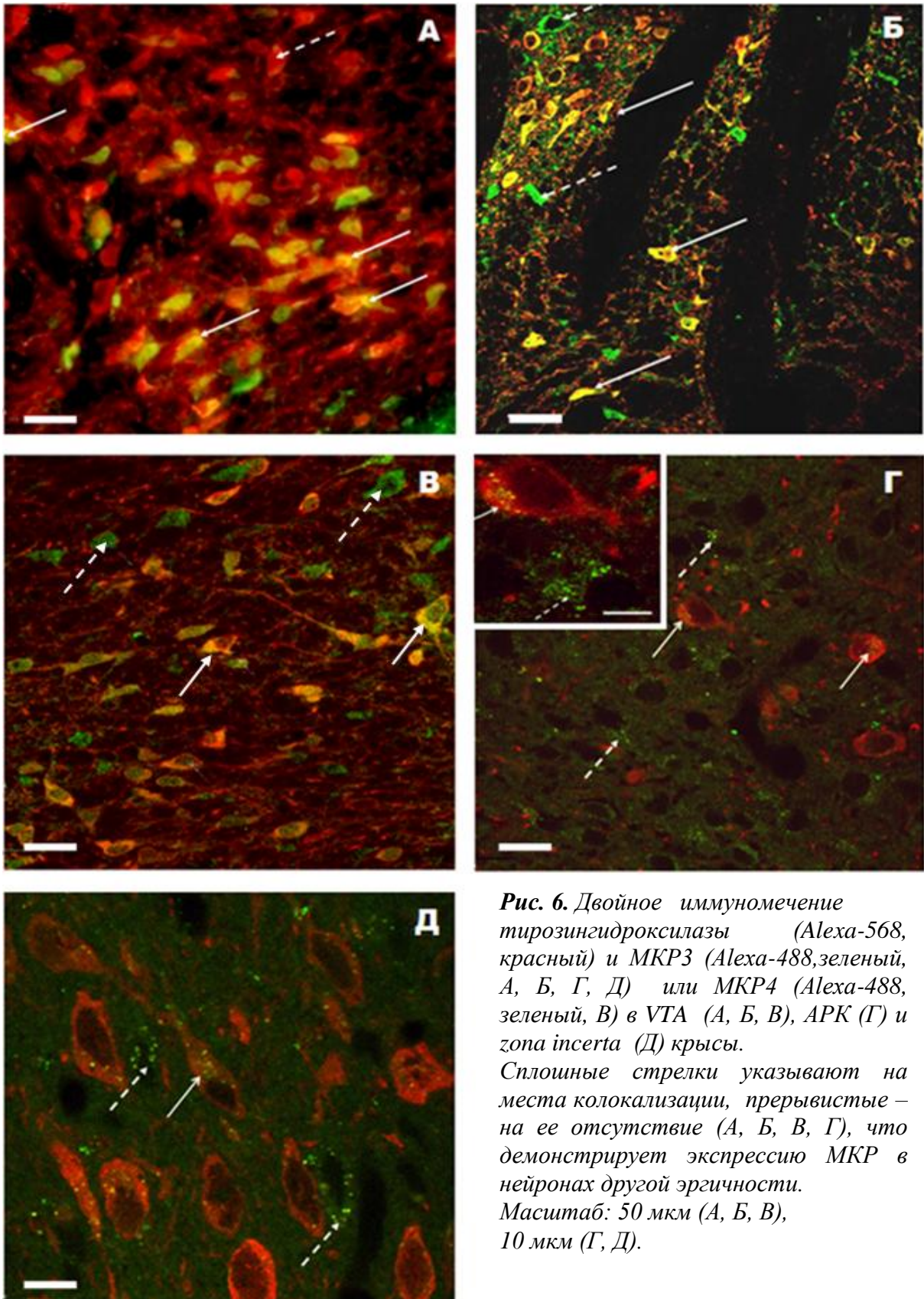
**Рис. 5.** Анализ уровня фТГ(31) в нейронах SN и VTA мыши после введения 0,6 нмоль AGRP 83-132 и 25-51. 1 – латеральная от инъекции область, 2 – область вокруг инъекции; достоверность отличий при  $p < 0,05$ : \* – по сравнению с контролем, 1 – по сравнению с зоной 1 соответствующей группы.

Полученные результаты свидетельствуют об изменении активности nigростриатной дофаминергической системы в нашем эксперименте и демонстрируют дозозависимый тормозный характер влияния обоих активных фрагментов AGRP на биосинтез дофамина в стриатуме, где располагаются клетки-мишени дофаминергических нейронов среднего мозга. Тормозный эффект обоих фрагментов AGRP на дофаминергические нейроны связан с влиянием на ТГ, но разными путями. Введение AGRP 83-132 вызвало как снижение уровня общей формы ТГ, так и уменьшение фосфорилирования ТГ по серину-40, связанного с G-белок-зависимыми механизмами, так и с уменьшением фосфорилирования ТГ по серину-31, что зависит от активности ERK 1/2 модуля MAPK-киназного каскада (Hauck, et al., 1992; Grattan, Kokey, 2008, Daubner, et al., 2011). Полученные данные свидетельствуют о роли AGRP 83-132 как эндогенного антагониста МКР. Фрагмент AGRP 25-51, как известно, не связан с влиянием на МКР (Pritchard, White, 2005) и в нашем эксперименте повлиял на дофаминергические нейроны через сигнальные пути, в которые вовлечены ERK 1/2 модули, что вызвало уменьшение фосфорилирования ТГ по серину-31 и привело к уменьшению биосинтеза дофамина в стриатуме.

### **Исследование механизмов влияния AGRP на дофамин- и норадренергические нейроны мозга**

#### **Локализация МКР3 и МКР4 в дофамин- и норадренергических структурах мозга**

В литературе имеются данные о присутствии МКР3 и МКР4 в нейронах АРК (Bagnol., et al., 1999; Kishi, et al., 2003). Показано, что в AGRP- и ПОМКергических



**Рис. 6.** Двойное иммуномечение тирозингидроксилазы (Alexa-568, красный) и МКР3 (Alexa-488, зеленый, А, Б, Г, Д) или МКР4 (Alexa-488, зеленый, В) в VTA (А, Б, В), АРК (Г) и zona incerta (Д) крысы.

Сплошные стрелки указывают на места колокализации, прерывистые – на ее отсутствие (А, Б, В, Г), что демонстрирует экспрессию МКР в нейронах другой эргичности.

Масштаб: 50 мкм (А, Б, В), 10 мкм (Г, Д).

нейронах экспрессируются МКР3, но не МКР4, что свидетельствует о роли МКР3 как ауторецептора. Результаты, полученные нами с помощью двойной флуоресцентной микроскопии, демонстрируют присутствие МКР3 в дофаминергических нейронах всех изученных структур (АРК, перивентрикулярное ядро, zona incerta, SN, VTA,



околоводопроводное серое вещество). В этих областях МКР3 выявлены не во всех дофаминергических нейронах, но также обнаружены и в нейронах другой эргичности, в частности в ГАМКергических.

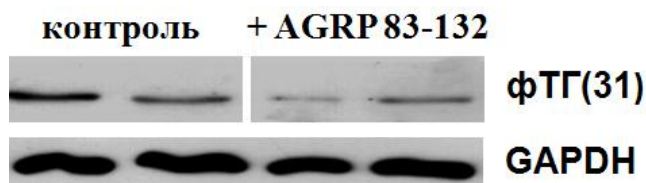
МКР4 выявляются в гипоталамусе в большей степени, чем в среднем мозге. МКР4 не выявлены в дофаминергических нейронах SN. В VTA МКР4, как и МКР3, выявляются не во всех дофаминергических нейронах, но их экспрессия показана и в нейронах другой эргичности, в частности ГАМКергических.

Данные о присутствии МКР3 и МКР4 непосредственно в телах дофаминергических нейронов свидетельствуют о возможности прямого влияния AGRP на дофаминергические нейроны и его роли как эндогенного антагониста МКР3/4. Полученные нами данные демонстрируют и возможность опосредованного влияния AGRP через нейроны других эргичностей, в частности ГАМКергические, что свидетельствует о роли AGRP как модулятора функциональных взаимодействий дофаминергических нейронов с другими нейронами мозга.

Ранее экспрессия МКР3 и МКР4 показана в норадренергических (LC, NTS) областях мозга (Liu, et al., 2003). Полученные нами данные демонстрируют экспрессию МКР3 как непосредственно в норадренергических нейронах, так и в ГАМКергических. В норадренергических нейронах, в отличие от дофаминергических, мы не выявили МКР4. Полученные нами данные свидетельствуют как о возможности прямого влияния AGRP на норадренергические нейроны через МКР3, так и опосредованного, через нейроны других эргичностей, в частности ГАМКергических.

### **Влияние различных фрагментов AGRP на дофаминергические нейроны в экспериментах in vitro**

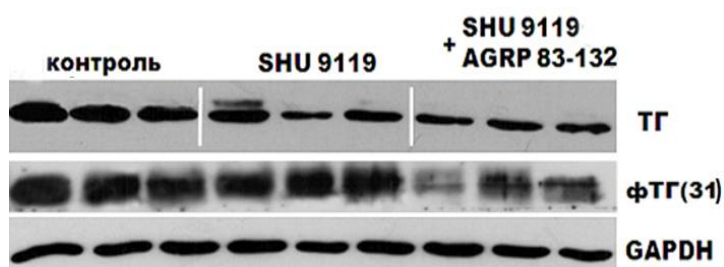
Ранее в экспериментах in vitro нами было показано уменьшение экспрессии ТГ после инкубации переживающих срезов VTA мыши в среде с AGRP 83-132 (Михрина, Романова, 2013). Анализ этих же проб демонстрирует уменьшение экспрессии фТГ(31) (на 44%,  $p < 0,05$ ) после инкубации с белком по сравнению с контролем (рис. 7), что



*Рис. 7. Анализ экспрессии фТГ(31) VTA мыши после инкубации с AGRP 83-132 (200 нМ), GAPDH – контрольный белок.*

подтверждает результаты, полученные в экспериментах in vivo, о возможности влияния фрагмента AGRP 83-132 не только на общую форму ТГ, но и на ее фосфорилирование по серину-31.

В эксперименте *in vitro* переживающие срезы из среднего мозга мыши инкубировали в среде с добавлением неселективного блокатора МКР3/МКР4 (SHU 9119), или SHU 9119 и AGRP 83-132. Анализ Вестерн-блотов ткани VTA



**Рис. 8.** Анализ экспрессии ТГ и фТГ(31) VTA мыши после инкубации с SHU 9119 (20 нМ) и AGRP 83-132 (200 нМ). GAPDH—контрольный белок.

свидетельствует об уменьшении экспрессии ТГ после 3 ч инкубации только с блокатором (на 25%,  $p < 0,05$  по сравнению с контролем, рис. 8). Аналогичные изменения наблюдались после 3 ч инкубации в среде с блокатором и AGRP 83-132 (уменьшение экспрессии ТГ на 26%,  $p < 0,05$  по сравнению с контролем, рис. 8). Однако достоверных отличий экспрессии ТГ между двумя экспериментальными группами не выявлено. Полученные данные подтверждают тормозное воздействие AGRP 83-132 на дофаминергические нейроны и его влияние на них как антагониста МКР3 и МКР4.

Анализ этих же проб демонстрирует отсутствие изменений экспрессии фТГ(31) после инкубации только с блокатором и уменьшение экспрессии фТГ(31) после инкубации в среде с блокатором и AGRP 83-132 (на 55% по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ ; рис. 8). Таким образом, несмотря на присутствие блокатора МКР3/4 AGRP 83-132 повлиял на фосфорилирование ТГ по серину-31.

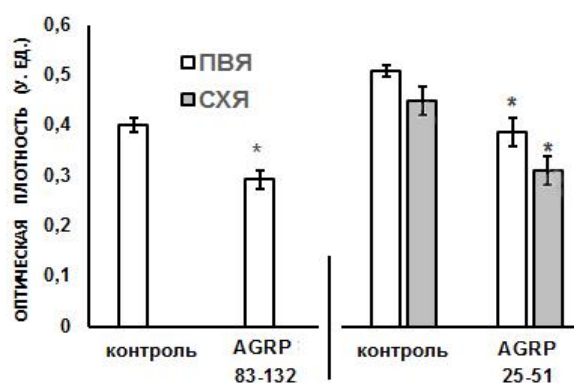
В эксперименте *in vitro* после 3 ч инкубации переживающих срезов мозга из VTA мыши в среде с добавлением AGRP 25-51 (200 нМ) не было выявлено достоверных изменений экспрессии ТГ. Эти результаты подтверждают результаты, полученные в эксперименте *in vivo*, и свидетельствуют о том, что фрагмент AGRP 25-51 не оказывает значимого влияния на общую форму ТГ.

### **Морфофункциональное взаимодействие AGRP- и вазопрессинергических нейронов гипоталамуса**

Двойное иммуномечение и конфокальная микроскопия демонстрируют локализацию AGRPергических отростков вокруг вазопрессинергических нейронов, а также МКР3 и МКР4 в телах вазопрессинергических нейронов паравентрикулярного (ПВЯ) и супраоптического (СОЯ) ядер гипоталамуса.

Возможность влияния различных фрагментов AGRP на вазопрессинергические нейроны была проверена в экспериментах *in vitro*.

После 3 ч инкубации переживающих срезов гипоталамуса в среде с AGRP 83-132 (200 нМ) с помощью биотин-стрептавидинового метода в нейронах ПВЯ выявлено уменьшение ОП вазопрессина (на 27%,  $p < 0,05$ , рис. 9) по сравнению с контролем;



**Рис. 9.** Анализ уровня иммунореактивности вазопрессина в гипоталамусе мыши после инкубации *in vitro* с AGRP 83-132 или 25-51 (200 нМ). \* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

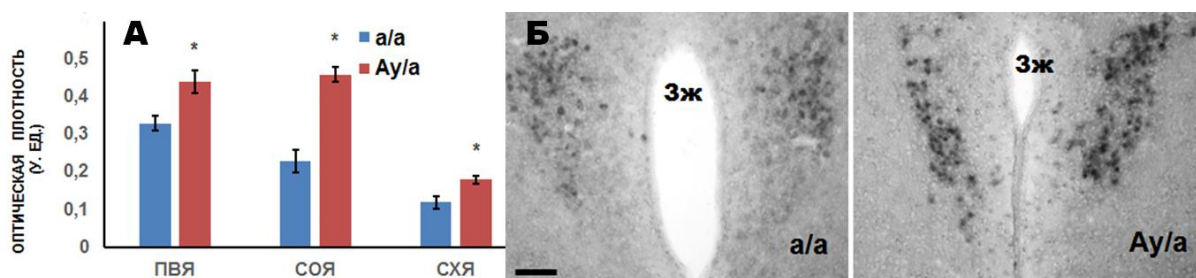
после 3 ч инкубации с AGRP 25-51 (200 нМ) выявлено уменьшение ОП вазопрессина в нейронах ПВЯ (на 24%,  $p < 0,05$ ) и СХЯ (на 31 %,  $p < 0,05$ , рис. 9). Полученные результаты впервые демонстрируют прямой тормозный эффект обоих фрагментов AGRP 83-132 и 25-51 на вазопрессинергические нейроны гипоталамуса.

### **Морфофункциональное состояние вазопрессинергических нейронов гипоталамуса при уменьшении функциональной активности AGRPергических нейронов**

Ранее было показано, что у мышей Agouti yellow (Ay/a) при ожирении наблюдается уменьшение мРНК AGRP в гипоталамусе (Makarova, et al., 2010), что сопровождалось уменьшением ОП иммунореактивного AGRP в ядрах гипоталамуса и, в частности, в ПВЯ (Романова, 2012). В данной работе иммуногистохимический анализ свидетельствует об увеличении у Ay/a мышей ОП фТГ(40) в различных дофаминергических структурах - в нейронах zona incerta (на 28 %,  $p < 0,05$ ), иннервирующих ПВЯ, и в отростках, выявляемых в самом ПВЯ, по сравнению с a/a мышами. У Ay/a мышей выявлено увеличение ОП ВП в ПВЯ (рис. 10 А) и увеличение в них уровня мРНК по сравнению с a/a мышами (рис. 10 Б).

Двойное иммуномечение демонстрирует увеличение количества Д1 рецепторов дофамина в ВПергических нейронах у Ay/a мышей по сравнению с a/a, что свидетельствует об активации дофаминергической системы при сниженном уровне AGRP у Ay/a мышей и, как следствие, увеличенном уровне ВП.

Таким образом, AGRP участвует в регуляции вазопрессинергических нейронов прямым воздействием и/или через регуляцию функциональной активности дофаминергических нейронов.



**Рис. 10.** Анализ уровня иммунореактивности ВП в нейронах паравентрикулярного (ПВЯ), супраоптического (СОЯ), супрахиазматического (СХЯ) ядер гипоталамуса (А) и уровень мРНК ВП в нейронах ПВЯ (Б) у a/a и Ay/a мышей. \* -  $p < 0,05$  Ay/a от a/a мышей, 3 ж – 3-й желудочек, масштаб – 50 мкм.

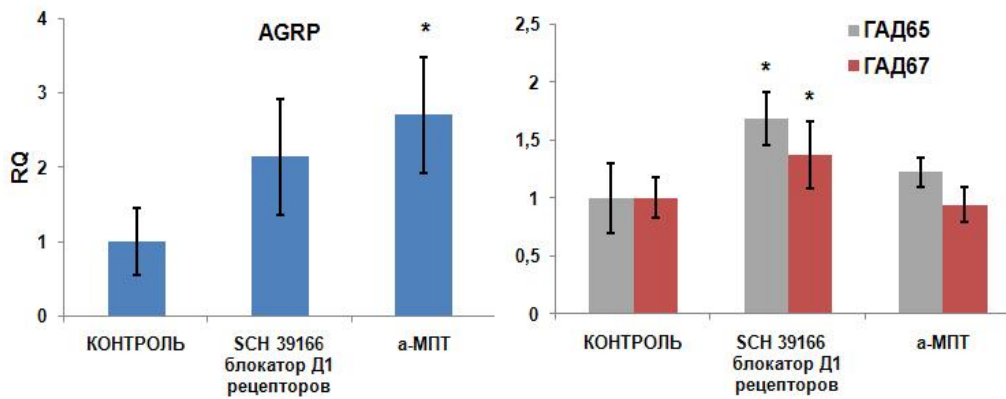
Таким образом, AGRP участвует в регуляции вазопрессинергических нейронов прямым воздействием и/или через контроль функциональной активности дофаминергических нейронов.

### **Исследование влияния катехоламинов на экспрессию AGRP в гипоталамусе**

Исследование, проведенное с помощью конфокального микроскопа, впервые демонстрирует присутствие D1 рецепторов дофамина в телах AGRPергических нейронов, что свидетельствует о возможности прямого влияния дофамина на AGRPергические нейроны и явилось предпосылкой исследования экспрессии AGRP при дисфункциях дофаминергической системы мозга. Данные, полученные на крысах КМ, выявили увеличение базального уровня дофамина в гипоталамусе (в 4 раза,  $p < 0,01$ ), мРНК AGRP (в 4 раза,  $p < 0,05$ ) и МКР4 (в 2,4 раза,  $p < 0,05$ ) по сравнению с крысами Вистар.

### **Влияние SCH 39166 - блокатора D1 рецепторов и $\alpha$ -МПТ - блокатора синтеза катехоламинов на экспрессию AGRP в гипоталамусе мышей**

Значительное увеличение уровня мРНК AGRP выявлено после воздействия  $\alpha$ -МПТ (рис. 11), что демонстрирует тормозный эффект катехоламинов на экспрессию AGRP. Анализ мРНК ферментов синтеза ГАМК в этом эксперименте выявил достоверные изменения ГАД65 (увеличение в 1,7 раз) и ГАД67 (в 1,4 раз) после введения SCH 39166 (рис. 11). Полученные данные демонстрируют возможность участия ГАМК как одного из факторов регуляции экспрессии AGRP.



**Рис. 11.** Анализ уровня мРНК AGRP, ГАД65 и ГАД67 (RQ - у. ед.) в гипоталамусе мышей после введения SCH 39166 и α-МПТ. \* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные в настоящей работе результаты демонстрируют морфофункциональную взаимосвязь нейронов аркуатного ядра гипоталамуса, экспрессирующих AGRP, с дофамин- и норадренергическими нейронами мозга, что расширяет представления о “непищевых” функциях этого пептида, его участии в регуляции не только пищевого поведения, но и других функций организма, контролируемых дофамином и норадреналином мозга. Полученные данные свидетельствуют о тесной функциональной взаимосвязи AGRPергической системы с мезолимбической дофаминергической системой, с нарушением работы которой связаны многочисленные патологии, в частности наркотическая и алкогольная зависимости, двигательные и эмоциональные расстройства. Показано, что морфологической основой влияния AGRP на дофамин- и норадренергические нейроны мозга является экспрессия в них МКР3 и МКР4. Факт экспрессии МКР в ГАМКергических нейронах расширяет представления о функциональных возможностях AGRP и свидетельствует о его роли и как модулятора функциональных взаимодействий ГАМК-дофамин и ГАМК-норадреналин.

Впервые нами показан дозозависимый тормозный эффект AGRP на биосинтез дофамина, которым обладают различные активные фрагменты этого пептида: 83-132, способный блокировать МКР, и 25-51, действие которого не связано с МКР. В экспериментах *in vivo* и *in vitro* показано, что под действием фрагментов AGRP происходит как уменьшение уровня тирозингидроксилазы, так и уровня ее фосфорилирования, которое осуществляется различными внутриклеточными сигнальными путями.

В работе выявлена взаимосвязь между балансом катехоламинов в мозге и экспрессией AGRP. Полученные результаты впервые демонстрируют участие дофамина в регуляции AGRPерических нейронов. Данные об увеличении экспрессии AGRP и МКР4 у крыс линии Крушинского-Молодкиной, предрасположенных к аудиогенным судорогам, могут послужить теоретической базой для разработки новых фармакологических подходов лечения эпилепсии.

Полученные результаты демонстрируют как прямые морфофункциональные взаимосвязи AGRP с вазопрессинергическими нейронами гипоталамуса, так и через регуляцию дофамин- и норадренергических нейронов мозга, что свидетельствует об участии AGRP в регуляции нейросекреторных процессов.

### **ВЫВОДЫ:**

1. Выявлены морфологические взаимосвязи между AGRP- и норадренергическими нейронами мозга, что является структурной основой их функциональных взаимодействий. Показан тормозный эффект AGRP 83-132 на функциональную активность норадренергических нейронов мозга.
2. AGRP 83-132 и AGRP 25-51 оказывают тормозный эффект на биосинтез дофамина в мозге, который является дозозависимым и осуществляется через различные пути регуляции тирозингидроксилазы. Влияние на дофаминергические нейроны фрагмента AGRP 25-51 снижает фосфорилирование тирозингидроксилазы по серину-31, AGRP 83-132 уменьшает как содержание общей формы тирозингидроксилазы, так и ее фосфорилированной по серину-40 и серину-31 форм.
3. Присутствие МКР3 и МКР4 в дофаминергических нейронах и МКР3 в норадренергических нейронах мозга является молекулярной основой прямого взаимодействия этих нейронов с AGRP 83-132. Экспрессия МКР3 и МКР4 и в ГАМКергических нейронах свидетельствует в пользу опосредованного влияния AGRP на дофамин- и норадренергические нейроны через модуляцию их взаимодействий с ГАМКергическими нейронами.
4. Выявлено прямое тормозное влияние AGRP на функциональное состояние вазопрессинергических нейронов гипоталамуса. При меланокортиновом ожирении у мышей Agouti yellow увеличение экспрессии вазопрессина в гипоталамусе показано на фоне активации дофаминергической системы.
5. Экспрессия Д1 дофаминовых рецепторов в AGRPерических нейронах, увеличение экспрессии AGRP при моделировании недостатка дофамина с помощью  $\alpha$ -метил-

паратирозина, увеличение экспрессии AGRP у крыс линии Крушинского-Молодкиной с высоким базальным уровнем дофамина свидетельствует о существовании функциональных взаимодействий между дофаминергической и AGRPергической системами мозга.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### - в журналах из списка ВАК

- 1) Михрина А.Л., Романова И.В.. Роль AGRP в регуляции дофаминергических нейронов мозга // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. - 2013.- Т.99, №9. - С.1036-1044.
- 2) Романова И.В., Михрина А.Л. Участие агутти-подобного белка в механизмах регуляции цикла бодрствование-сон // Физиология человека. - 2013. - Т. 39, №6. - С. 24-30.
- 3) Оганесян Г.А., Романова И.В., Михрина А.Л., Паскаренко Н.М., Кузик В.В. Взаимодействие дофаминергической и вазопрессинергической систем при депривации сна у крыс // Росс. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. - 2012. - Т. 98, №. 11. - С. – 1307-1313.
- 4) Романова И.В., Михрина А.Л., Чернышева М.П. Анализ становления морфофункциональных взаимосвязей CART и AGRP с дофаминергическими нейронами в онтогенезе млекопитающих // Ж. эвол. биохим. и физиол. - 2014. - Т.50, №5. - С. 392-398.

### - публикации в других печатных изданиях:

1. Romanova IV, Mikhrina AL, Belova VA, Artamokhina IV Investigation of AGRP/CART balance in hypothalamus of obese Agouti yellow mice // Abst. BSA annual meeting, Edinburg, UK, 28-30-th June. - 2009. - P.45.
2. Михрина А.Л. Роль AGRP в модуляции функциональной активности нейронов гипоталамуса // Тез. Докл. 12-й Всеросс. медико-биологической конференции молодых исследователей, Санкт-Петербург, 18 апреля. – 2009. - С. 253-254.
3. Михрина А.Л. Влияние AGRP гипоталамуса на функциональную активность дофаминергических нейронов у мышей Agouti yellow // Тез. докладов Конференции молодых ученых «Механизмы адаптации физиологических систем организма к факторам среды», посвященной 85-летию со дня основания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Санкт-Петербург, 21–22 декабря. - 2010. - С. 76.
4. Михрина А.Л., Романова И.В. Роль CART и AGRP гипоталамуса в регуляции функциональной активности дофаминергических нейронов у мышей Agouti yellow // Тезисы докладов VIII Всероссийской конференции Нейроэндокринология-2010“. Санкт-Петербург, 20-22 апреля. - 2010 - С. 101.
5. Михрина А.Л. Иммуногистохимическое исследование гипоталамуса мышей Agouti yellow на фоне развития ожирения и диабета II-типа // "Вестник РГМУ". - 2010. - № 2. - С. 520.
6. Romanova IV, Mikhrina AL. A role of CART and AGRP as a modulators of functional activity of the brain dopamine neurons // Endocrine regulation. V.45 (2). Ab. 10-th Symposium on catecholamines and other neurotransmitters in stress. Smolenice Castle, Slovakia. – 2011. - P. A34.

7. Михрина А.Л., Романова И.В. Участия AGRP в регуляции функциональной активности дофаминергических нейронов вентральной тегментальной области // Тез. докл. VIII Всерос. конф. с международным участием «Механизмы функционирования висцеральных систем», посвященной 220-летию со дня рождения акад. К.М.Бэра. Санкт-Петербург, 25-28 сентября. - 2012. - С. 157-158.
8. Романова И.В., Михрина А.Л., Чернышов М.В. AGRP как модулятор стрессорного ответа // Тез. докл. VIII Всерос. конф. с международным участием «Механизмы функционирования висцеральных систем», посвященной 220-летию со дня рождения акад. К.М.Бэра. Санкт-Петербург, Россия, 25-28 сентября. - 2012. - С. 196-197.
9. Mikhrina A., Romanova I. Investigation of morphofunctional interaction of agouti-related protein (AGRP) and dopaminergic brain neurons // Abs. and programme book of 10-th world Congress of Neurohypophyseal neurohormones. Bristol, England, 15-19 July. - 2013. - P. 129.
10. Romanova I., Mikhrina A. Investigation of agouti-related protein (AGRP) in stress reactions // Abs. and programme book of 10-th world Congress of Neurohypophyseal neurohormones. Bristol, England, 15-19 July. - 2013. - P. 147.
11. Михрина А.Л., Романова И.В. Взаимодействие AGRP с дофаминергическими нейронами мозга // Тез. Докл. XXII. съезда физиологов России. 16-20 сентября, Волгоград. - 2013. - С. 358.
12. Михрина А.Л. Исследование механизмов влияния AGRP на функциональную активность дофаминергических нейронов // Сб-к тез. докладов Всероссийской конференции молодых ученых «Нейробиология интегративных функций мозга», Санкт-Петербург, 12-14 ноября. - 2013. - С. 51-52.
13. Михрина А.Л., Паскаренко Н.М., Романова И.В. Морфофункциональное взаимодействие нейронов, экспрессирующих агути-подобный белок, с дофамин- и норадренергическими нейронами мозга // Тез. X Междисциплинарного Конгресса “Нейронауки для медицины и психиатрии”, Судак, Крым, Россия, June 2-12. - 2014. - P.237-238.
14. Михрина А.Л., Паскаренко Н.М. Влияние различных фрагментов агути-подобного белка на вазопрессинергические нейроны гипоталамуса // Тез. научно-практической конференции молодых ученых «Перспективы развития медицинской науки и практики». Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, 22 мая. - 2014. - С. 40.
15. Михрина А.Л. Исследование влияния различных фрагментов AGRP на дофамин- и норадренергические нейроны мозга // Всеросс. конференция с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга». Санкт-Петербург, 24–26 июня. - 2014. - С. 98.
16. Михрина А.Л., Савельева Л.О. Исследование механизмов регуляции биосинтеза дофамина у мышей Agouti yellow, генетически предрасположенных к развитию ожирения // Материалы 4-й международной междисциплинарной конференции “Современные проблемы системной регуляции физиологических функций“. Москва, 17-18 сентября. - 2015. - С. 479-482.