

**МЕЛАНКОРТИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ 1-ГО ТИПА В ГИПОТАЛАМУСЕ
МЫШЕЙ В НОРМЕ И ПРИ ДИЕТА-ИНДУЦИРОВАННОМ ОЖИРЕНИИ**

© 2022 г. Е. В. Михайлова¹, К. В. Деркач¹, А. О. Шпаков¹, И. В. Романова¹, *

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

*E-mail: irinaromanova@mail.ru

Поступила в редакцию 26.05.2022 г.

После доработки 17.06.2022 г.

Принята к публикации 20.06.2022 г.

Меланокортиновая система в гипоталамусе играет ключевую роль в регуляции пищевого поведения и периферического метаболизма, и в условиях метаболических расстройств ее активность существенно меняется. Однако возможная роль в этом меланокортиновых рецепторов 1-го типа (MC1R) остается не выясненной, тем более что данные об экспрессии и локализации этого рецептора в гипоталамусе позвоночных животных фрагментарны. Цель исследования состояла в изучении экспрессии и распределения MC1R в гипоталамусе контрольных мышей и животных с диета-индуцированным ожирением (ДИО) и в их сопоставлении с экспрессией других компонентов меланокортиновой системы и гипоталамической локализацией маркера микроглиоза IBA1. ДИО вызывали 16-недельной диетой, обогащенной легкими углеводами и насыщенными жирами, у самок мышей C57Bl/6J, что также приводило к нарушенной толерантности к глюкозе, гиперлептинемии и гиперинсулинемии. С помощью двойного флуоресцентного иммуноочечения было показано, что в аркуатном ядре гипоталамуса мышей MC1R локализованы на проопиомеланокортин (ПОМС)-иммунопозитивных нейронах. В условиях ДИО количество MC1R и ПОМС в гипоталамических нейронах значительно возросло. Наряду с этим в гипоталамусе ДИО-мышей повышались уровни мРНК для MC1R, MC3R и ПОМС, что указывает на повышение экспрессии основных компонентов меланокортиновой системы при ДИО. В аркуатных ядрах гипоталамуса ДИО мышей повышалось оцениваемое иммуногистохимическими методами содержание маркера микроглиального воспаления IBA1, что может свидетельствовать о взаимосвязи между MC1R-сигнальными каскадами и активностью воспалительных процессов в гипоталамусе в условиях ДИО. Таким образом, нами впервые показана экспрессия MC1R и его локализация на ПОМС-иммунопозитивных нейронах в аркуатных ядрах гипоталамуса, их увеличение при ДИО и возможную взаимосвязь с гипоталамической экспрессией ПОМС и маркера воспаления IBA1, что может свидетельствовать о роли MC1R, как потенциального регулятора периферического метаболизма и нейровоспаления в норме и при метаболических расстройствах.

Ключевые слова: меланокортиновый рецептор 1 типа, про-опиомеланокортин, диета-индуцированное ожирение, гипоталамус, нейровоспаление

DOI: 10.31857/S0869813922080052

Гипоталамическая меланокортиновая система играет исключительно важную роль в контроле пищевого поведения, периферического метаболизма, функций

нервной и нейроэндокринной систем, в основе чего лежит обеспечение интеграции в единую функциональную сеть множества сигнальных систем мозга [1–4]. Компонентами меланокортиновой системы являются сопряженные с гетеротримерными G-белками меланокортиновые рецепторы (MCR) и их эндогенные лиганды – наделенные агонистической активностью меланокортиновые пептиды и выполняющий функцию антагониста агутиподобный пептид (AgRP). Прекурсором меланокортиновых пептидов является про-опиомеланокортин (POMC), который широко экспрессируется на периферии и в различных отделах мозга, в том числе в гипоталамических нейронах [1, 5, 6]. В ходе сайт-специфичного протеолиза из POMC генерируются α -, β - и γ -меланоцитстимулирующие гормоны (MSH) и аденокортикотропный гормон. В мозге наиболее значительные популяции синтезирующих POMC нейронов локализованы в аркуатных ядрах гипоталамуса (arcuate nucleus – ARC) [1].

Мишенями MSH являются пять типов MCR – MC1R–MC5R, которые в активированном гормонами состоянии стимулируют G_s -белки и через них фермент аденилатциклазу, катализирующую синтез универсального вторичного посредника цАМФ [6, 7]. Повышение уровня цАМФ приводит к активации протеинкиназы A и других цАМФ-зависимых эффекторных белков, обеспечивая реализацию основных физиологических эффектов меланокортиновых пептидов в ЦНС и на периферии [7, 8]. В настоящее время принято считать, что в мозге в основном экспрессируются MC3R и MC4R, которые стимулируются α -MSH и, в меньшей степени, другими пептидами меланокортинового семейства [3, 7, 9]. Эти же рецепторы ингибируются нейропептидом AgRP, который продуцируется AgRP/нейропептид Y-экспрессирующими нейронами, причем AgRP не только снижает индуцированную α -MSH стимуляцию MC3R и MC4R, но и ослабляет конститутивную активность этих рецепторов [4, 10]. В последние годы появились данные о том, что в регуляции функций ЦНС может быть вовлечен и MC1R, который до этого рассматривали как преимущественно “периферический” MCR [11]. С помощью иммуногистохимии у мышей MC1R выявлены в нейронах черной субстанции [12], а методом ПЦР экспрессия гена *Mc1r* выявлена в разных областях мозга крысы [13] и в гипоталамусе костистой рыбы (*Epinephelus coioides*) [14]. При этом локализация MC1R в структурах мозга и его функции не были изучены.

Ожирение и сахарный диабет 2-го типа приводят к значительным изменениям функционирования гипоталамической меланокортиновой системы мозга, что показано у пациентов с метаболическими расстройствами [3, 4, 15, 16] и у грызунов с экспериментальными моделями этих заболеваний [3, 4, 17–19]. При этом в гипоталамусе отмечается как нарушение баланса факторов пищевого поведения, регулирующих меланокортиновую систему (POMC, AgRP), так и изменение экспрессии MC3R и MC4R. В то же время данные об экспрессии гена *Mc1r*, кодирующего MC1R, и распределения этого белка в гипоталамических нейронах в условиях метаболических расстройств отсутствуют. Не выяснена возможная взаимосвязь между изменением экспрессии MC1R и других MCR, а также с интенсивностью нейровоспалительных процессов, которые играют важную роль в развитии нейродегенеративных изменений в гипоталамусе и являются индукторами нарушений функционирования гипоталамических сигнальных систем и зависимых от них физиологических процессов. В этом отношении наибольший интерес представляет исследование взаимосвязи между уровнями MC1R и связывающей ионизированный кальций адаптерной молекулы-1 (IBA-1), специфичного маркера микроглии, экспрессия которой в ЦНС условиях нейровоспаления, в том числе индуцированного несбалансированной диетой, возрастает [20–22].

Таким образом, целью работы было изучить экспрессию и распределение MC1R в гипоталамусе контрольных мышей и животных с диета-индуцированным ожире-

нием (ДИО) и сопоставить их с экспрессией других компонентов меланокортиновой системы и локализацией маркера микроглиоза IBA1.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Статья не содержит результатов исследований с участием людей в качестве объектов исследований. Все эксперименты были проведены в полном соответствии с правилами, разработанными Комитетом по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (редакция 15.02.2018 г.), правилами и требованиями, изложенными в документах “European Communities Council Directive” (2010/63/ЕЕС) и “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”. На проведение экспериментов было получено разрешение Комитета по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (протокол 01/09 от 8 сентября 2020 г.).

Для исследований были взяты четырехмесячные самки мышей C57Bl/6J (*a/a*), которых получали из питомника Рапполово (Россия). После двухнедельного периода адаптации животные были разделены на 2 группы – контрольные мыши, которых содержали на стандартном сухом корме (“Контроль”, $n = 14$), и мыши с ДИО, которое вызывали с помощью длительной (три месяца) высококалорийной диеты, состоящей из животного жира (свиное сало) и 30%-ного раствора сахарозы, заменившего животным питьевую воду (“ДИО”, $n = 14$). Для мониторинга развития ожирения животных взвешивали с периодичностью 1 раз в неделю, а также оценивали количество потребляемого ими корма. Уже через два месяца высококалорийной диеты у мышей наблюдалось достоверное повышение массы тела (соответственно 23.3 ± 0.8 г в группе “ДИО” и 19.5 ± 0.6 г в контроле, $n = 14$) и уровня глюкозы натощак (5.64 ± 0.23 мМ в группе “ДИО” и 4.83 ± 0.15 мМ в контроле, $n = 14$). Из группы “ДИО” были исключены 3 животных с плохо развившимся ожирением (2) или с аномально высокой массой тела (1), и соответственно три животных были исключены из группы “Контроль”, в результате чего в дальнейших экспериментах изучали две группы “Контроль” и “ДИО” по 11 мышей в каждой.

Концентрацию глюкозы в крови мышей измеряли с помощью глюкометра “Life Scan Johnson & Johnson” (Дания) и тест-полосок “One Touch Ultra” (США), для чего забирали кровь из хвостовой вены. Оценивали уровни глюкозы натощак и через 120 мин после нагрузки глюкозой (2 г/кг, в/б). Для определения базовых уровней инсулина, лептина и гликированного гемоглобина образцы крови забирали в конце эксперимента из сердца после анестезии животных хлоральгидратом (400 мг/кг, в/б). Концентрацию инсулина и лептина определяли с помощью ИФА-наборов “Mouse Insulin ELISA” (Merckodia AB, Швеция) и “ELISA Kit for Leptin” (Cloud-Clone Corp., США) соответственно. Для определения содержания гликированного гемоглобина (HbA1c) в крови мышей использовали наборы “Multi Test HbA1c System kit” (Polymer Technology Systems, Inc., США). Также определяли массу висцерального жира (г) и определяли его долю относительно массы тела (%).

Уровень мРНК в гипоталамусе мышей оценивали с помощью ПЦР в реальном времени, для чего из образцов ткани гипоталамуса выделяли тотальную РНК с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Россия). Обратную транскрипцию осуществляли с помощью набора MMLV RT Kit (Евроген, Россия), количественную оценку экспрессии проводили с помощью амплификатора 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Последовательности используемых праймеров представлены в табл. 1. Для исследования использовали референсные гены – ген гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (*Hprt*) и 18S-субъединицу рибосомальной РНК (*18S-rRNA*). Результаты анализировали с помощью метода $\Delta\Delta C_t$ и программ 7500 Software v2.0.6 и Expression Suite Software v1.0.3. Значения RQ

Таблица 1. Структуры прямых (For) и обратных (Rev) праймеров, используемых для амплификации транскриптов целевых генов

Ген	Локализация	Праймер	Размер, bp	NCBI Reference Sequence
<i>Mc1r</i>	For 5'–3' Rev 5'–3'	CTCCACAGACCGCTTCCTAC ACATACAGGCACCAAGGCTC	141	NM_008559.2
<i>Mc3r</i>	For 5'–3' Rev 5'–3'	CAAGGAGATTCTCTGCGGCT TCCCGTCTGAGCGTTGTTTT	101	NM_008561.3
<i>Mc4r</i>	For 5'–3' Rev 5'–3'	GGGTCGGAAACCATCGTCAT TGCAAATGGATGCGAGCAAG	124	NM_016977.4
<i>Pomc</i>	For 5'–3' Rev 5'–3'	CAGTGCCAGGACCTCACC CAGCGAGAGGTCGAGTTTG	72	NM_008895.4
<i>Agrp</i>	For 5'–3' Rev 5'–3'	ACAACCTGCAGACCGAGCAGAA CGACGCGGAGAACGAGACT	98	NM_001271806.1
<i>Hprt*</i>	For 5'–3' Rev 5'–3'	AGCCGACCGGTTCTGTTCAT GGTCATAACCTGGTTCATCATCAC	72	NM_013556.2
<i>18S-rRNA*</i>	For 5'–3' Rev 5'–3'	GGGAGCCTGAGAAACGGC GGGTCGGGAGTGGGTAATTT	68	NR_003278.3

Примечание. * – праймеры референсных генов – гипоксантингуанинфосфорибозил-трансферазы и 18S-субъединица рибосомальной РНК.

в группе “ДИО” нормировали по их значениям в группе “Контроль”, данные представлены в условных единицах (у. ед.). Для оценки экспрессии из каждой группы мышей случайным образом было отобрано по шесть животных.

Для подготовки образцов мозга с целью проведения иммуногистохимического анализа животных ($n = 5$ в каждой группе) анестезировали хлоральгидратом (400 мг/кг, в/б), транкардиально перфузировали с помощью 0.1 М натрий-фосфатного буфера (ФБ, pH 7.4) и 4%-ного раствора пара-формальдегида в 0.2 М ФБ. Затем мозг извлекали, дофиксировали в течение ночи в 4%-ном растворе пара-формальдегида в 0.2 М ФБ (4°C), промывали 0.02 М ФБ с 0.9% NaCl (ФБ-NaCl) и после криопротекции в 30%-ном растворе сахарозы в 0.02 М ФБ-NaCl замораживали в изопентане (при –42°C). Для подготовки срезов мозга из каждой группы мышей случайным образом было отобрано по пять животных.

Для иммуногистохимического анализа были использованы фронтальные срезы мозга (толщиной 16 мкм), которые монтировали на стеклах, как описано нами ранее [23]. От каждого животного из области гипоталамуса получали 10–12 срезов, которые монтировали на стекле Superfrost/plus, высушивали при комнатной температуре и хранили при –20°C. Для исследования отбирали стекла со срезами, содержащими аркуатное ядро гипоталамуса согласно атласу мозга мыши [24]. Флуоресцентное иммуномечение проводили в соответствии с ранее описанным протоколом [17, 23]. После демаскировки антигена кипячением в натрий-цитратном буфере (pH 6.0), срезы промывали в 0.02 М ФБ-NaCl и блокировали в смеси сывороток цыпленка (3%), козы (3%) и быка (1%), растворенных в ФБ-NaCl, содержащем 0.01% Triton X-100. Затем срезы инкубировали в течение 48 ч (4°C) с первичными антителами. Для двойного иммуномечения использовали смесь первичных антител кролика против MC1R (Elabscience, США) в разведении 1 : 200 с антителами мыши против POMC (Abcam, Великобритания) в разведении 1 : 1000. Для одиночного иммуномечения использовали первичные антитела кролика против IBA1 (NovusBio, США) в разведении 1 : 500. После тщательной промывки срезы инкуби-

Таблица 2. Масса тела и жировой ткани, уровни глюкозы, инсулина и лептина в крови и индекс инсулиновой резистентности у контрольных и с диета индуцированным ожирением мышей

	Контроль, <i>n</i> = 11	ДИО, <i>n</i> = 11
Масса тела, г	20.9 ± 0.6	25.6 ± 0.5*
Масса жировой ткани, г	0.29 ± 0.02	0.64 ± 0.04*
Доля жира, %	1.39 ± 0.05	2.48 ± 0.11*
Глюкоза (тощ.), мМ	5.07 ± 0.11	6.68 ± 0.31*
Глюкоза (стим.), мМ	5.20 ± 0.17	7.82 ± 0.39*
Инсулин, нг/мл	0.39 ± 0.04	0.66 ± 0.06*
Лептин, нг/мл	0.90 ± 0.10	2.01 ± 0.15*
ИР, у. ед.	2.02 ± 0.24	4.59 ± 0.58*
HbA1c, %	4.01 ± 0.19	4.76 ± 0.32

* – различия между группами “Контроль” и “ДИО” статистически значимы при $p < 0.05$. Все значения представлены как $M \pm SEM$.

ровали в течение 1 ч в смеси вторичных антител, конъюгированных с различными флуоресцентными метками: Ig цыпленка против кролика с Alexa-488 и Ig осла против мыши с Alexa-568 (Invitrogen, США) в разведении 1 : 1000. Для выявления IBA1 инкубацию проводили в растворе, содержащем Ig цыпленка против кролика с Alexa-488. После промывки в ФБ срезы заключали под покровное стекло с помощью среды Мовиол (Sigma-Aldrich, США) и хранили при 4°C до полимеризации. Для верификации локализации IBA1 перед заключением под покровное стекло на срезы наносили раствор ядерного красителя DAPI (Sigma, США), разведенного в ФБ-NaCl 1 : 2000 и промывали в ФБ-NaCl. Специфичность иммуногистохимических реакций проверяли негативным контролем (реакции без первичных или вторичных антител). Изображения получали на конфокальном микроскопе DM16000 с лазерной сканирующей конфокальной установкой “Leica TCS SP5” (Leica Microsystems, Германия), или с мультифотонной установкой. Использовали иммерсионный объектив $\times 63$, лазеры с длиной волны возбуждения 355, 488 и 568 нм. Полученные изображения анализировали посредством пакета программ Leica LAS AF. Значения интенсивности свечения нормировали по их значениям в контроле (у. ед.), в аркуатных ядрах гипоталамуса подсчитывали количество IBA1-иммунопозитивных клеток, результаты представлены в процентах относительно уровня контрольных мышей, принятого за 100%.

Статистический анализ проводили в программе “GraphPad Prism 7” (GraphPad Software, США). Нормальность распределения данных оценивали тестом D’Agostino–Pearson, различия между группами оценивали непарным *t*-тестом и рассматривали как статистически значимые при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SEM$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Мыши, которые в течение трех месяцев находились на высококалорийной диете, имели повышенные массу тела и жировой ткани, увеличенную удельную долю жира, повышенные уровни глюкозы, как натощак, так и через 120 мин после глюкозной нагрузки, а также повышенные уровни инсулина и лептина в крови (табл. 2), что свидетельствует о развитии у них ожирения, нарушенной толерантности к глюкозе, гиперинсулинемии и гиперлептинемии. В группе “ДИО” индекс инсулино-резистентности (ИР), рассчитанный, как произведение концентраций инсулина и глю-

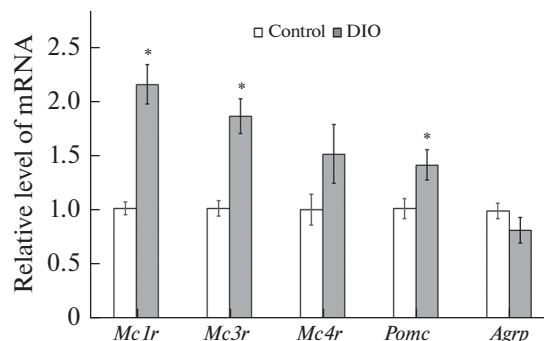


Рис. 1. Экспрессия генов, кодирующих меланокортиновые рецепторы и нейропептиды, контролирующие пищевое поведение, в гипоталамусе мышей контрольных и с диета-индуцированным ожирением. * – различия между группами контроль (“Control”) и ДИО (“DIO”) статистически значимы при $p < 0.05$, значения представлены в условных единицах.

козы натошак, был значимо выше, чем в группе “Контроль” (табл. 2), что указывает на снижение чувствительности тканей к инсулину и развитие ИР у ДИО-мышей.

Все выявленные метаболические и гормональные изменения указывают на развитие у мышей отчетливо выраженных признаков метаболического синдрома. Ранее нами и другими авторами было показано, что у мышей, получавших различные по длительности диеты, обогащенные насыщенными жирами и легкоусвояемыми углеводами, также имеются ожирение, изменения углеводного и липидного обмена, нарушенная толерантность к глюкозе, ИР и гиперлептинемия [17, 25–27].

Изучение экспрессии генов в гипоталамусе ДИО-мышей показало повышение по сравнению с контролем уровня *Mc1r* (до 2.15 ± 0.18 у. ед., $p < 0.05$) и *Mc3r* (до 1.86 у. ед., $p < 0.05$), при этом экспрессия гена *Mc4r* у ДИО-мышей возросла в 1.5 раза, но статистически не отличалась от контроля (рис. 1).

Экспрессия гена *Pomc*, кодирующего POMC, прекурсор анорексигенных меланокортиновых пептидов, возросла (в 1.4 раза, $p < 0.05$), в то время как экспрессия гена *Agrp*, кодирующего орексигенный нейропептид AgRP, менялась слабо (рис. 1). При этом соотношение экспрессии генов *Pomc* и *Agrp* в группе “ДИО” было в 1.7 раза выше, чем в контроле. В различной степени выраженное повышение экспрессии генов MCR, а также увеличение соотношения *Pomc/Agrp* может указывать на более выраженную стимуляцию анорексигенных каскадов в гипоталамусе мышей с ДИО. Эти изменения можно рассматривать как компенсаторную реакцию, направленную на снижение потребления животными высококалорийной пищи и, как следствие, на предотвращение развития у них тяжелой формы метаболического синдрома. Необходимо отметить, что данные литературы в отношении экспрессии генов *Mc3r*, *Mc4r*, *Pomc* и *Agrp* в гипоталамусе мышей с ДИО весьма противоречивы. Они демонстрируют, что изменение экспрессии этих генов во многом определяется составом и длительностью высококалорийной диеты, выраженностью и длительностью метаболических нарушений у животных, а также областью гипоталамуса, выбранной для изучения генной экспрессии [28–31]. Так, в гипоталамусе мышей через 8 недель ДИО, индуцированной потреблением насыщенных жиров, экспрессия генов, кодирующих POMC и AgRP, была снижена, в то время как экспрессия гена *Mc4R* не менялась, а через 16 недель ДИО экспрессия гена *Mc4R* повышалась, а экспрессия генов *Pomc* и *Agrp* нормализовалась [28]. Согласно другим авторам, длительная, 21-недельная, высокожировая диета приводила к существенному

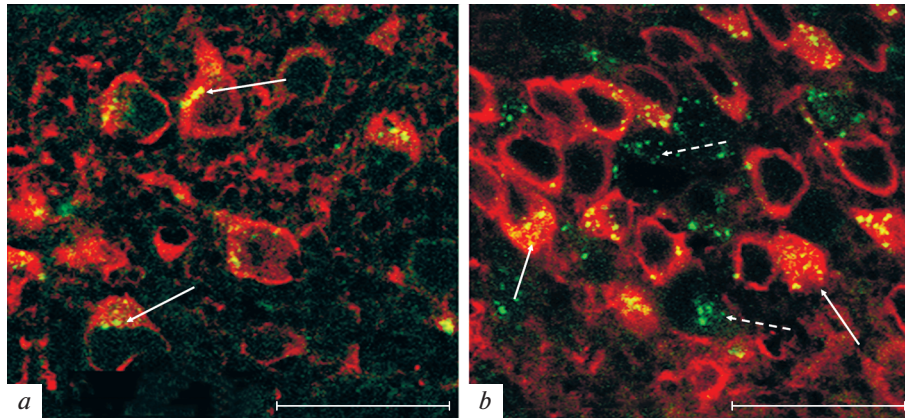


Рис. 2. Двойное флуоресцентное иммуномечение меланокортинового рецептора 1-го типа (MC1R) и про-опиомеланокортина (ПОМС) в аркуатном ядре гипоталамуса мышей контрольных (*a*) и с диет-индуцированным ожирением (*b*).

Микрофотографии демонстрируют иммуногистохимические реакции к MC1R (зеленый), ПОМС (красный) и их совмещение (желтый). Сплошные стрелки указывают на MC1R, локализованных в телах ПОМС-иммунопозитивных нейронов, прерывистые стрелки – вне ПОМС-нейронов. Масштаб 25 мкм.

повышению в гипоталамусе мышей с повышенной экспрессией лептинового рецептора как экспрессии гена *Pomc*, так и к повышению на 60% соотношения генов *Pomc* и *Agrp* [31].

При этом данные в отношении влияния ДИО на экспрессию MC1R в гипоталамусе и других отделах мозга отсутствуют. Это обусловлено как тем, что информация об экспрессии и локализации этого типа MCR в ЦНС фрагментарна [13, 14], так и отсутствием информации о возможной роли MC1R в гипоталамусе и других отделах мозга [14]. Так, у крыс экспрессия гена *Mc1r* в различных отделах мозга была показана только в 2021 г., причем в гипоталамусе уровень этой экспрессии был сравнительно низким и существенно уступал таковому в среднем мозге, мозжечке и гиппокампе и был сопоставимым с таковым во фронтальной коре [13]. Кроме того, мРНК для гена *Mc1r* была обнаружена в гипоталамусе морского окуня (*Epinephelus coioides*) [14]. При этом роль MC1R в ЦНС до сих пор не установлена, в отличие от хорошо изученной роли этого рецептора на периферии. Так, MC1R широко представлены во многих периферических органах и тканях, в коже и клетках крови [11, 32, 33], контролируют многие физиологические процессы, включая меланогенез [11] и липидный обмен [33, 34].

Нами с помощью молекулярно-биологических и иммуногистохимических методов MC1R не только идентифицированы в гипоталамусе, но и показано изменение уровня экспрессии кодирующего их гена, а также плотности этих рецепторов в нейронах аркуатного ядра гипоталамуса (рис. 2*a*). С помощью двойного флуоресцентного иммуномечения локализация MC1R выявлена в ПОМС-нейронах, а также показано увеличение уровня MC1R в них у ДИО-мышей (рис. 2*b*), что может указывать на тесную взаимосвязь между MC1R-опосредуемыми каскадами и продукцией ПОМС нейронами в аркуатных ядрах гипоталамуса. Это может быть обусловлено тем, что в гипоталамусе мышей с ДИО экспрессия генов *Mc1r* и *Pomc* повышается примерно в одинаковой степени. Взаимоотношения между MC1R и другими компонентами меланокортинового сигналинга в норме и при различных формах метаболических расстройств требуют дальнейших исследований.

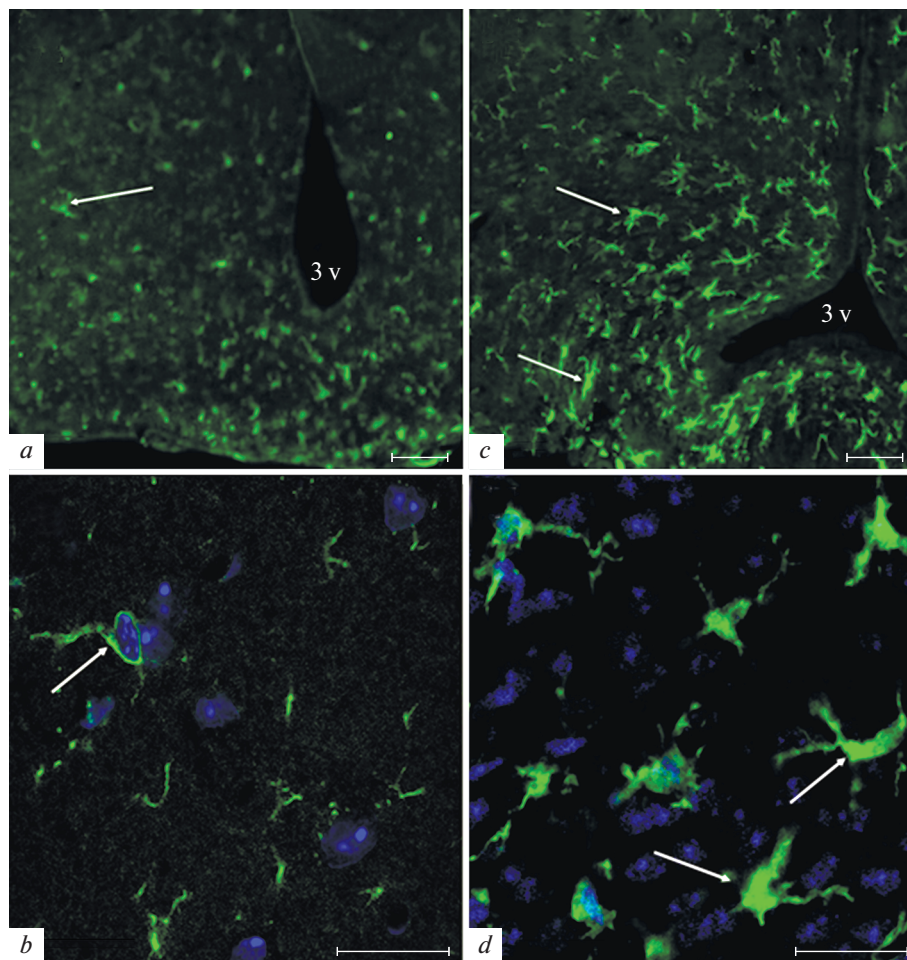


Рис. 3. Флуоресцентное иммуномечение IBA1, маркера микроглии, в аркуатном ядре гипоталамуса мышей контрольных (*a, b*) и с диета-индуцированным ожирением (*c, d*).

Микрофотографии демонстрируют иммуногистохимические реакции к IBA1 (зеленый) и ядерному красителю DAPI (синий). Стрелки указывают на тела IBA1-иммунопозитивных клеток, 3v – полость 3-го желудочка мозга. Масштаб 50 мкм (*a, c*) или 20 мкм (*b, d*).

Как на периферии, так и в ЦНС меланокортиновые пептиды и их рецепторы, включая MC1R, вовлечены в регуляцию воспалительных процессов [35–38]. Так, имеются сведения о том, что MC1R могут контролировать воспалительные процессы в клетках эндотелия сосудов мозга, глиальных клетках и нейронах и их выживаемость, что может свидетельствовать о тесной взаимосвязи между MC1R-опосредуемыми сигнальными каскадами и активностью провоспалительных и апоптотических путей в этих клетках [37, 39–41]. Показано, что противовоспалительные эффекты α -MSH, реализуемые в микроглии и нейронах через MC1R, направлены на ингибирование активности АМФ-активируемой киназы и зависимого от нее провоспалительного ядерного фактора- κ B [39], на ослабление вовлеченного в регуляцию митохондриальной динамики и апоптоза сигнального пути, включающего

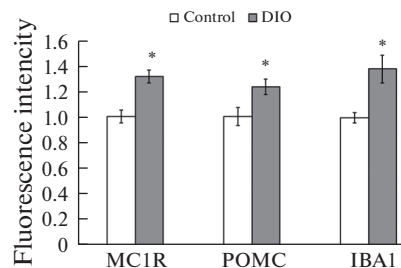


Рис. 4. Анализ интенсивности свечения меланокортиновых рецепторов 1-го типа (MC1R), про-опиомеланокортина (POMC) и связывающей ионизированный кальций адаптерной молекулы-1 (IBA1) в телах клеток, локализованных в аркуатных ядрах гипоталамуса у мышей контрольных (Control) и с диета-индуцированным ожирением (DIO); * – различия между группами “Control” и “DIO” статистически значимы при $p < 0.05$.

АМФ-активируемую протеинкиназу, сиртуин-1 и коактиватор-1 α , активируемого пероксисомными активаторами рецептора- γ (PGC-1 α) [40], а также на стимуляцию активности MC1R-зависимого цАМФ-зависимого каскада и зависимой от него экспрессии подавляющего воспаление ядерного рецептора Nurr1 [41].

С целью проверки возможных взаимосвязей между уровнем MC1R и интенсивностью воспалительных процессов в гипоталамусе мышей при ДИО, мы исследовали уровень экспрессии белка IBA1 – маркера микроглиального воспаления (рис. 3). Этот белок обладает специфическим кальций-связывающим и актин-связывающим действием, участвует в изменении формы плазматической мембраны, в процессах фагоцитоза и активации микроглии и периферических макрофагов [42].

Полученные нами данные демонстрируют в гипоталамусе ДИО-мышей, в частности в области аркуатных ядер, увеличение количества IBA1-иммунопозитивных клеток на 60% ($p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой; рис. 3a, c), увеличение размера их тела и утолщение отростков (рис. 3b, d), а также увеличение уровня IBA1 (на 38%, $p < 0.05$), о чем свидетельствует увеличение интенсивности свечения иммунопозитивного материала в них (рис. 4). При этом анализ POMC-иммунопозитивных нейронов аркуатных ядер демонстрирует у ДИО-мышей увеличение как уровня POMC (на 24%, $p < 0.05$), так и уровня MC1R (на 32%, $p < 0.05$) в них по сравнению с контрольными животными (рис. 4).

Повышение уровня IBA1 служит маркером активации микроглиальных клеток при патологических процессах в мозге, в том числе при активации процессов воспаления и апоптоза при ДИО [43], причем уровень IBA1 повышается даже при однодневной высокожировой диете [44]. Нами показано, что повышение экспрессии белка IBA1 в гипоталамусе ДИО мышей ассоциировано с повышением экспрессии MC1R. Это может свидетельствовать о том, что активация MC1R-сигнальных путей при метаболических расстройствах является одним из механизмов ослабления процессов воспаления, маркером которого является повышение экспрессии белка IBA1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами с помощью двойного флуоресцентного иммуномечения было показано, что в аркуатном ядре гипоталамуса мышей MC1R локализованы на POMC-иммунопозитивных нейронах, причем в условиях ДИО количество MC1R и POMC значительно возрастало. В гипоталамусе ДИО-мышей также повышались уровни мРНК для MC1R, MC3R и POMC, что указывает на активацию меланокортиновой

системы, вовлеченной в снижение аппетита при ДИО. В аркуатных ядрах гипоталамуса у ДИО мышей повышалось содержание маркера микроглиального воспаления – белка IBA1, что может свидетельствовать о взаимосвязи между MC1R-сигнальными каскадами и активностью воспалительных процессов в гипоталамусе в условиях ДИО. Таким образом, мы впервые показали, что MC1R экспрессируются в гипоталамусе и локализованы в POMC-иммунопозитивных нейронах в аркуатных ядрах гипоталамуса, их количество в гипоталамусе ДИО мышей увеличивается, и это может свидетельствовать об участии MC1R, подобно MC3R и MC4R, в регуляции периферического метаболизма. Кроме того, наши данные указывают на возможную взаимосвязь повышения экспрессии MC1R с усилением нейровоспаления при ДИО, о чем свидетельствует выявленное нами синхронное повышение содержания в гипоталамусе MC1R и маркера воспаления IBA1.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено с использованием оборудования центра коллективного пользования Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН в рамках государственного задания № 075-0152-22-00.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея исследования и дизайн эксперимента (И.В.Р., А.О.Ш.), проведение экспериментов и сбор материала для исследования (Е.В.М., И.В.Р.), проведение исследований (Е.В.М., К.В.Д., И.В.Р.), обработка результатов (Е.В.М., К.В.Д., И.В.Р.), написание и редактирование текста (А.О.Ш., И.В.Р.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Cone RD* (2006) Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocr Rev* 7: 736–749.
<https://doi.org/10.1210/er.2006-0034>
2. *Shpakov AO, Derkach KV, Berstein LM* (2015) Brain signaling systems in the Type 2 diabetes and metabolic syndrome: promising target to treat and prevent these diseases. *Future Sci OA* 1(3): FSO25.
<https://doi.org/10.4155/fso.15.23>
3. *Baldini G, Phelan KD* (2019) The melanocortin pathway and control of appetite-progress and therapeutic implications. *J Endocrinol* 241(1): R1–R33.
<https://doi.org/10.1530/JOE-18-0596>
4. *Micioni Di Bonaventura E, Botticelli L, Tomassoni D, Tayebati SK, Micioni Di, Bonaventura MV, Cifani C* (2020) The Melanocortin System behind the Dysfunctional Eating Behaviors. *Nutrients* 12(11): 3502.
<https://doi.org/10.3390/nu12113502>
5. *Zhou Y, Cai M* (2017) Novel approaches to the design of bioavailable melanotropins. *Expert Opin Drug Discov* 12(10): 1023–1030.
<https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1351940>
6. *Lindberg I, Fricker LD* (2021) Obesity, POMC, and POMC-processing Enzymes: Surprising Results From Animal Models. *Endocrinology* 162(12): bqab155.
<https://doi.org/10.1210/endocr/bqab155>
7. *Rodrigues AR, Almeida H, Gouveia AM* (2015) Intracellular signaling mechanisms of the melanocortin receptors: current state of the art. *Cell Mol Life Sci* 72(7): 1331–1345.
<https://doi.org/10.1007/s00018-014-1800-3>
8. *Li YQ, Shrestha Y, Pandey M, Chen M, Kablan A, Gavrilova O, Offermanns S, Weinstein LS* (2016) G(q/11) α and G(s) α mediate distinct physiological responses to central melanocortins. *J Clin Invest* 126(1): 40–49.
<https://doi.org/10.1172/JCI76348>

9. *Mountjoy KG* (2010) Distribution and function of melanocortin receptors within the brain. *Adv Exp Med Biol* 681: 29–48.
https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6354-3_3
10. *Zhang J, Li X, Zhou Y, Cui L, Li J, Wu C, Wan Y, Li J, Wang Y* (2017) The interaction of MC3R and MC4R with MRAP2, ACTH, α -MSH and AgRP in chickens. *J Endocrinol* 234(2): 155–174.
<https://doi.org/10.1530/JOE-17-0131>
11. *Rosenkranz AA, Slastnikova TA, Durymanov MO, Sobolev AS* (2013) Malignant melanoma and melanocortin 1 receptor. *Biochemistry (Mosc)* 78(11): 1228–1237.
<https://doi.org/10.1134/S0006297913110035>
12. *Chen X, Chen H, Cai W, Maguire M, Ya B, Zuo F, Logan R, Li H, Robinson K, Vanderburg CR, Yu Y, Wang Y, Fisher DE, Schwarzschild MA* (2017) The melanoma-linked “redhead” MC1R influences dopaminergic neuron survival. *Ann Neurol* 81(3): 395–406.
<https://doi.org/10.1002/ana.24852>
13. *Zhou Y, Chawla MK, Rios-Monterrosa JL, Wang L, Zempare MA, Hruby VJ, Barnes CA, Cai M* (2021) Aged Brains Express Less Melanocortin Receptors, Which Correlates with Age-Related Decline of Cognitive Functions. *Molecules* 26(20): 6266.
<https://doi.org/10.3390/molecules26206266>
14. *Ji LQ, Rao YZ, Zhang Y, Chen R, Tao YX* (2020) Regulation of melanocortin-1 receptor pharmacology by melanocortin receptor accessory protein 2 in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Gen Comp Endocrinol* 285: 113291.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.113291>
15. *Ayers KL, Glicksberg BS, Garfield AS, Longerich S, White JA, Yang P, Du L, Chittenden TW, Gulcher JR, Roy S, Fiedorek F, Gottesdiener K, Cohen S, North KE, Schadt EE, Li SD, Chen R, Van der Ploeg LHT* (2018) Melanocortin 4 Receptor Pathway Dysfunction in Obesity: Patient Stratification Aimed at MC4R Agonist Treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 103(7): 2601–2612.
<https://doi.org/10.1210/jc.2018-00258>
16. *Yeo GSH, Chao DHM, Siegart AM, Koerperich ZM, Ericson MD, Simonds SE, Larson CM, Luquet S, Clarke I, Sharma S, Clément K, Cowley MA, Haskell-Luevano C, Van Der Ploeg L, Adan RAH* (2021) The melanocortin pathway and energy homeostasis: From discovery to obesity therapy. *Mol Metab* 48: 101206.
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101206>
17. *Romanova IV, Derkach KV, Mikhrina AL, Sukhov IB, Mikhailova EV, Shpakov AO* (2018) The Leptin, Dopamine and Serotonin Receptors in Hypothalamic POMC-Neurons of Normal and Obese Rodents. *Neurochem Res* 43(4): 821–837.
<https://doi.org/10.1007/s11064-018-2485-z>
18. *Derkach KV, Bondareva VM, Chistyakova OV, Berstein LM, Shpakov AO* (2015) 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: 245459.
<https://doi.org/10.1155/2015/245459>
19. *Derkach K, Zakharova I, Zorina I, Bakhtyukov A, Romanova I, Bayunova L, Shpakov A* (2019) The evidence of metabolic-improving effect of metformin in Ay/a mice with genetically-induced melanocortin obesity and the contribution of hypothalamic mechanisms to this effect. *PLoS One* 14(3): e0213779.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213779>
20. *Ohsawa K, Imai Y, Kanazawa H, Sasaki Y, Kohsaka S* (2000) Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J Cell Sci* 113 (Pt 17): 3073–3084.
<https://doi.org/10.1242/jcs.113.17.3073>
21. *Gao Y, Ottaway N, Schriever SC, Legutko B, García-Cáceres C, de la Fuente E, Mergen C, Bour S, Thaler JP, Seeley RJ, Filosa J, Stern JE, Perez-Tilve D, Schwartz MW, Tschöp MH, Yi CX* (2014) Hormones and diet, but not body weight, control hypothalamic microglial activity. *Glia* 62(1): 17–25.
<https://doi.org/10.1002/glia.22580>
22. *Calcia MA, Bonsall DR, Bloomfield PS, Selvaraj S, Barichello T, Howes OD* (2016) Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. *Psychopharmacology (Berl)* 233(9): 1637–1650.
<https://doi.org/10.1007/s00213-016-4218-9>
23. *Romanova IV, Mikhailova EV, Shpakov AO* (2019) Immunohistochemical Identification of Melanocortin and Leptin Receptors on Serotonergic Neurons in the Rat Midbrain. *Neurosci Behav Physiol* 49 (7): 832–837.
<https://doi.org/10.1007/s11055-019-00809-w>
24. *Paxinos G, Franklin KBJ* (2019) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th ed. Hardcover.
25. *Maioli TU, Gonçalves JL, Miranda MC, Martins VD, Horta LS, Moreira TG, Godard AL, Santiago AF, Faria AM* (2016) High sugar and butter (HSB) diet induces obesity and metabolic syndrome with decrease in regulatory T cells in adipose tissue of mice. *Inflamm Res* 65(2): 169–178.
<https://doi.org/10.1007/s00011-015-0902-1>

26. Murtaza M, Khan G, Aftab MF, Afridi SK, Ghaffar S, Ahmed A, Hafizur RM, Waraich RS (2017) Cucurbitacin E reduces obesity and related metabolic dysfunction in mice by targeting JAK-STAT5 signaling pathway. *PLoS One* 12(6): e0178910.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178910>
27. Pretz D, Le Foll C, Rizwan MZ, Lutz TA, Tups A (2021) Hyperleptinemia as a contributing factor for the impairment of glucose intolerance in obesity. *FASEB J* 35(2): e21216.
<https://doi.org/10.1096/fj.202001147R>
28. Huang XF, Han M, South T, Storlien L (2003) Altered levels of POMC, AgRP and MC4R mRNA expression in the hypothalamus and other parts of the limbic system of mice prone or resistant to chronic high-energy diet-induced obesity. *Brain Res* 992(1): 9–19.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.08.019>
29. Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, Jobst EE, Tonelli-Lemos L, Billes SK, Glavas MM, Grayson BE, Perello M, Nillni EA, Grove KL, Cowley MA (2007) Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. *Cell Metab* 5(3): 181–194.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.02.004>
30. Gout J, Sarafian D, Tirard J, Blondet A, Vigier M, Rajas F, Mithieux G, Begeot M, Naville D (2008) Leptin infusion and obesity in mouse cause alterations in the hypothalamic melanocortin system. *Obesity (Silver Spring)* 16(8): 1763–1769.
<https://doi.org/10.1038/oby.2008.303>
31. Gamber KM, Huo L, Ha S, Hairston JE, Greeley S, Bjørbæk C (2012) Over-expression of leptin receptors in hypothalamic POMC neurons increases susceptibility to diet-induced obesity. *PLoS One* 2012;7(1): e30485.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030485>
32. Salazar-Onfray F, López M, Lundqvist A, Aguirre A, Escobar A, Serrano A, Korenblit C, Petersson M, Chhajlani V, Larsson O, Kiessling R (2002) Tissue distribution and differential expression of melanocortin 1 receptor, a malignant melanoma marker. *Br J Cancer* 87(4): 414–422.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600441>
33. Rinne P, Rami M, Nuutinen S, Santovito D, van der Vorst EPC, Guillamat-Prats R, Lyytikäinen LP, Raitoharju E, Oksala N, Ring L, Cai M, Hruby VJ, Lehtimäki T, Weber C, Steffens S (2017) Melanocortin 1 Receptor Signaling Regulates Cholesterol Transport in Macrophages. *Circulation* 136(1): 83–97.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025889>
34. Kadiri JJ, Tadayon S, Thapa K, Suominen A, Hollmén M, Rinne P (2021) Melanocortin 1 Receptor Deficiency in Hematopoietic Cells Promotes the Expansion of Inflammatory Leukocytes in Atherosclerotic Mice. *Front Immunol* 12: 774013.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.774013>
35. Mioni C, Giuliani D, Cainazzo MM, Leone S, Bazzani C, Grieco P, Novellino E, Tomasi A, Bertolini A, Guarini S (2003) Further evidence that melanocortins prevent myocardial reperfusion injury by activating melanocortin MC3 receptors. *Eur J Pharmacol* 477(3): 227–234.
[https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)02184-8](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)02184-8)
36. Catania A, Lonati C, Sordi A, Carlin A, Leonardi P, Gatti S (2010) The melanocortin system in control of inflammation. *Scient World J* 14 (10): 1840–1853. PMID: PMC5763663
<https://doi.org/10.1100/tsw.2010.17320852827>
37. Wang W, Guo DY, Lin YJ, Tao YX (2019) Melanocortin Regulation of Inflammation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10: 683.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00683>
38. Fu C, Chen J, Lu J, Yi L, Tong X, Kang L, Pei S, Ouyang Y, Jiang L, Ding Y, Zhao X, Li S, Yang Y, Huang J, Zeng Q (2020) Roles of inflammation factors in melanogenesis (Review). *Mol Med Rep* 21(3): 1421–1430.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2020.10950>
39. Xu W, Mo J, Ocak U, Travis ZD, Enkhjargal B, Zhang T, Wu P, Peng J, Li T, Zuo Y, Shao A, Tang J, Zhang J, Zhang JH (2020) 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- κ B Pathway in Rats. *Neurotherapeutics* 17(1): 294–308.
<https://doi.org/10.1007/s13311-019-00772-x>
40. Xu W, Yan J, Ocak U, Lenahan C, Shao A, Tang J, Zhang J, Zhang JH (2021) Melanocortin 1 receptor attenuates early brain injury following subarachnoid hemorrhage by controlling mitochondrial metabolism via AMPK/SIRT1/PGC-1 α pathway in rats. *Theranostics* 11(2): 522–539.
<https://doi.org/10.7150/thno.49426>
41. Yu S, Doycheva DM, Gamdzyk M, Gao Y, Guo Y, Travis ZD, Tang J, Chen WX, Zhang JH (2022) BMS-470539 Attenuates Oxidative Stress and Neuronal Apoptosis via MC1R/cAMP/PKA/Nurr1 Signaling Pathway in a Neonatal Hypoxic-Ischemic Rat Model. *Oxid Med Cell Longev* 2022: 4054938.
<https://doi.org/10.1155/2022/4054938>

42. Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S (2004) Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem* 88(4): 844–856. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02213.x>
43. Leyh J, Winter K, Reinicke M, Ceglarek U, Bechmann I, Landmann J (2021) Long-term diet-induced obesity does not lead to learning and memory impairment in adult mice. *PLoS One* 16(9): e0257921. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257921>
44. Waise TMZ, Toshinai K, Naznin F, NamKoong C, Md Moin AS, Sakoda H, Nakazato M (2015) One-day high-fat diet induces inflammation in the nodose ganglion and hypothalamus of mice. *Biochem Biophys Res Commun* 464(4): 1157–1162. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.097>

Melanocortin 1 Receptors in the Hypothalamus of Mice within the Norm and in Diet-Induced Obesity

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

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

*e-mail: irinaromanova@mail.ru

The hypothalamic melanocortin system plays a key role in the regulation of eating behavior and peripheral metabolism, and its activity changes significantly in metabolic disorders. However, the possible role of the melanocortin 1 receptor (MC1R) in these processes remains unclear, while the data on the expression and localization of the MC1R in the hypothalamus of vertebrates are quite fragmentary. The aim of this work was to study the expression and distribution of MC1Rs in the hypothalamus of control mice and those with diet-induced obesity (DIO) as compared to the expression of other components of the melanocortin system and the hypothalamic localization of the microglial inflammatory (microgliosis) marker protein IBA1. DIO was induced in female C57Bl/6J mice by a 16-week diet enriched in light carbohydrates and saturated fats, which also led to impaired glucose tolerance, hyperleptinemia and hyperinsulinemia. Double fluorescent immunolabeling localized MC1Rs to pro-opiomelanocortin (POMC)-immunopositive neurons of the hypothalamic arcuate nucleus. In DIO, the amount of MC1Rs and POMC in hypothalamic neurons increased significantly. In addition, mRNA levels of MC1R, MC3R and POMC increased in the hypothalamus of DIO mice, indicative of an increase in the expression of the main melanocortin system's components in DIO. In the hypothalamic arcuate nuclei of DIO mice, the IBA1 level, as estimated by the intensity of immunohistochemical labeling, was also elevated, suggesting a relationship between MC1R signaling cascades and the activity of inflammatory processes in the hypothalamus under DIO conditions. Thus, we have shown for the first time the expression of MC1Rs and their localization on POMC-immunopositive neurons of the hypothalamic arcuate nuclei, as well as their increase in DIO and a possible relationship with the hypothalamic expression of POMC and IBA1. These findings may indicate the role of the MC1R as a potential regulator of peripheral metabolism and neuroinflammation under normal conditions and in metabolic disorders.

Keywords: melanocortin type 1 receptor, pro-opiomelanocortin, diet-induced obesity, hypothalamus, neuroinflammation