

DOI: 10.7868/S0869813918070031

УЧАСТИЕ АГУТИПОДОБНОГО ПЕПТИДА В РЕГУЛЯЦИИ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

© А. Л. Михрина, М. В. Чернышев, Е. В. Михайлова, Л. О. Савельева,
И. В. Романова

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия
E-mail: irinaromanova@mail.ru

У крыс, разделенных по двигательной активности в тесте «открытое поле», с помощью иммуногистохимических методов исследован уровень агутиподобного пептида (AGRP — agouti-related protein / agouti gene related protein) и тирозингидроксилазы в гипоталамусе и среднем мозге. Показано, что более высокий уровень двигательной активности у «активных» крыс характеризуется увеличением уровня тирозингидроксилазы (и ее фосфорилирования) и уменьшением уровня AGRP по сравнению с «пассивными» крысами. Полученные данные демонстрируют роль AGRP в регуляции двигательной активности как модулятора дофаминергических нейронов мозга. Двойное иммуномечение и конфокальная микроскопия демонстрируют присутствие меланокортиновых рецепторов 3-го и 4-го типов в дофаминергических нейронах, а также и в ГАМК-нейронах аркуатного ядра гипоталамуса и вентральной тегментарной области. Обсуждается вопрос о механизмах влияния AGRP на дофаминергические нейроны.

Ключевые слова: агутиподобный пептид, дофамин, ГАМК, гипоталамус, средний мозг, меланокортиновые рецепторы 3/4, двигательная активность, стресс.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 7. С. 769—779. 2018

A. L. Mikhrina, M. V. Chernyshev, E. V. Mikhailova, L. O. Saveleva, I. V. Romanova.
PARTICIPATION OF AGRP IN REGULATION OF LOCOMOTION ACTIVITY. I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the RAS, St. Petersburg, Russia; e-mail: irinaromanova@mail.ru.

In rats, divided in the “open field” test by locomotion activity, the levels of AGRP (agouti-related protein / agouti gene related protein) and phosphorylated tyrosine hydroxylase in the hypothalamus and midbrain were investigated by immunohistochemistry. It has been shown that increased locomotion activity in the “active” rat corresponds to a low immunoreactivity of AGRP and higher level of tyrosine hydroxylase vs. the “passive” rats. The received data demonstrate the role of AGRP in the regulation of locomotion activity as a modulator of dopaminergic brain neurons. Double immunostaining and confocal microscopy demonstrate the presence of melanocortin receptors of types 3 and 4 in dopaminergic neurons as well as in the GABA-neurons of the arcuate hypothalamic nucleus and the ventral tegmental area of midbrain. The question of the mechanisms of AGRP influence on the dopaminergic brain neurons are discussed.

Дофаминергические нейроны среднего мозга вовлечены в регуляцию различных функций организма млекопитающих. Они играют важнейшую роль в контроле двигательной активности, реакций награды и подкрепления, эмоционального статуса и др. [9, 12, 13]. Исследование механизмов, регулирующих функциональную активность дофаминергических нейронов среднего мозга, является актуальной проблемой физиологии и медицины особенно в связи со значительным ростом нейродегенеративных заболеваний [8].

Агутиподобный пептид (AGRP — agouti gene related peptide или agouti related peptide) в мозге млекопитающих и человека экспрессируется нейронами аркуатного (инфундибулярного) ядра гипоталамуса [11, 15, 22]. Анализ распределения AGRP-иммунопозитивных отростков свидетельствует об их присутствии в различных структурах мозга, в частности в областях, где локализованы дофаминергические нейроны [4, 11, 15]. Ранее мы показали существование морфофункциональных взаимодействий между AGRP- и дофаминергическими нейронами [4, 7]. В частности, было выявлено уменьшение уровня тирозингидроксилазы — ключевого фермента синтеза катехоламинов в дофаминергических нейронах под влиянием активного фрагмента AGRP 83-132 и было высказано предположение о роли AGRP как модулятора функциональной активности дофаминергических нейронов. Однако вопрос о механизмах этих функциональных взаимодействий остается открытым.

Цель настоящего исследования — установить, существует ли взаимосвязь между уровнем функциональной активности дофаминергических нейронов и уровнем AGRP в мозге крыс в зависимости от характера их двигательной активности, а также обсудить возможные механизмы этих взаимодействий.

МЕТОДИКА

В экспериментах были использованы половозрелые самцы крыс линии Вистар массой 200—220 г. Опыты проводили с учетом этического кодекса по проведению медико-биологических исследований с использованием животных. В экспериментах 50 крыс были проанализированы с помощью теста «открытое поле» по показателям, характеризующим двигательную активность. Учитывались количество секторов, пройденных на периферии, число вертикальных стоек и выходов в центр арены, суммарное время пребывания на периферии и в центре арены [2]. С учетом указанных показателей крысы были разделены на 2 группы: «активные» и «пассивные», из каждой группы отобрано по 10 животных с максимальным отклонением показателей двигательной активности, которые были использованы в эксперименте с 30-минутной жесткой иммобилизацией на спине.

Контрольные ($n = 10$) и после стресса ($n = 10$) крысы были подвергнуты легкому эфирному наркозу и декапитации. Из мозга вырезали гипоталамус и средний мозг. Гипоталамус фиксировали погружением в 4%-ный параформальдегид, разведенный на 0.1 М фосфатном буфере (4 °С, 5 суток), промывали в фосфатном буфере с 0.9%-ным NaCl (pH 7.4), опускали в 30%-ный раствор сахарозы, растворенной на том же буфере, до погружения на дно посуды при 4 °С, замораживали с помощью изопентана при –42 °С и хранили

при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. В среднем мозге располагаются отростки AGRPергических нейронов. Поэтому ткань среднего мозга немедленно была заморожена на сухом льду, после чего из нее вырезали вентральную область для приготовления проб по методу Лэмли для Вестерн-блоттинга, ранее нами описанному [4].

Для двойного иммуногистохимического исследования интактные крысы после внутрибрюшинного наркоза хлоралгидратом (400 мг/кг) были перфузированы транскардиально сначала 0.1 М фосфатным буфером (pH 7.4), затем 4%-ным параформальдегидом, разведенном на том же буфере. Мозг был дофиксирован в течение ночи при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в том же фиксаторе и после криопротекции в 30%-ном растворе сахарозы был заморожен, как описано выше.

Исследования гипоталамуса проводили на фронтальных свободно плавающих срезах мозга толщиной 20 мкм, приготовленных с помощью криостата (Leica, Германия). Каждый десятый срез монтировали на стекла SuperFrost/plus (Menzel, Германия) и окрашивали толуидиновым синим для морфологического контроля уровня структуры согласно атласу мозга крысы [24].

Для выявления AGRP и тирозингидроксилазы (первого фермента синтеза катехоламинов, который широко используется как маркер дофаминергических нейронов) был использован каждый четвертый срез мозга с аркуатным ядром гипоталамуса. Реакции проводили с помощью биотин-стрептавидинового метода, протокол подробно описан нами ранее [4, 5]. Срезы инкубировали 48 ч при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ с антителами кролика к фрагменту AGRP 83-132 (PhoenixPeptide Inc., CA, США) в разведении 1:1000 или антителами мыши против тирозингидроксилазы (Sigma, США) в разведении 1:2000. Также были использованы соответствующие вторичные антитела козы, конъюгированные с биотином (VectorLabs., Великобритания; 1:500): против кролика или против мыши и комплекс стрептавидин-пероксидаза (Sigma, США; 1:1000). Визуализацию реакции проводили 0.05%-ным диаминобензидином с 0.015%-ной перекисью водорода. Срезы натягивали на стекла, покрытые 0.1%-ным желатином, высушивали при комнатной температуре и после стандартной гистологической обработки заключали под покровное стекло с помощью среды Bio-mount (Bio-Optica, Италия). Специфичность реакции проверяли с помощью негативного контроля (реакции без первых или без вторых антител).

Для двойной иммуногистохимической реакции были отобраны срезы перфузированного мозга из области аркуатного ядра гипоталамуса и вентральной тегментарной области. Протокол реакции ранее был описан [4, 5]. Срезы инкубировали 48 ч при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в смеси первичных антител: мыши к тирозингидроксилазе (Sigma, США; 1:1000) и кролика к МКР3 (Sigma, США; 1:300) или кролика к МКР4 (PhoenixPeptid Inc., CA, США; 1:100); смеси антител мыши к глутаматдекарбоксилазе 65 и 67 (Millipore, США; 1:1000) — антителами кролика к МКР3 или кролика к МКР4. Для реакции были использованы вторичные антитела, конъюгированные с различными флуоресцентными метками: козы против кролика с Alexa-488 (Invitrogen, США; 1:1000) и осла против мыши с Alexa-568 (Invitrogen, США; 1:1000). Срезы натягивали на предметные стекла, обработанные желатином, заключали под покровное стекло с помощью среды мовиол (Sigma, США) и хранили при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ до ее полимеризации.

Для гель-электрофореза был использован 12 или 10%-ный бис-АА акриламидный гель, который переносили на нитроцеллюлозную мембрану (диаметр пор 0.2 мкм, Amersham, Великобритания). Область белка на мембране определяли с помощью маркера молекулярной массы белков (Fermentas, США). Мембраны инкубировали в течение ночи при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в тех же первичных антителах к AGRP ($M_r = 12\text{ кД}$, 1:500), тирозингидроксилазе

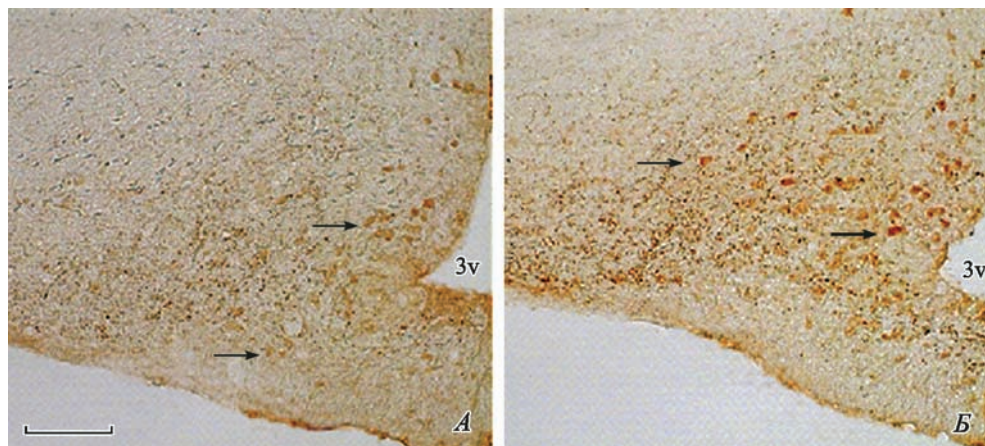


Рис. 1. Иммуногистохимическая реакция к AGRP в аркуатном ядре гипоталамуса у крыс, проявляющих активную (А) и пассивную (Б) стратегию поведения в тесте «открытое поле». 3v — третий желудочек мозга; *стрелки* указывают на тела иммунопозитивных нейронов. Масштаб 100 мкм.

(Mr = 60 кД, 1:3000) и в антителах кролика к фосфорилированной (по серину 31) тирозингидроксилазе (Invitrogen, США; Mr = 60 кД, 1:1000), разведенных на 4%-ном обезжиренном молоке, растворенном в TRIS-буфере с 0.1% Tween-20 (pH 7.6). Для контроля равномерности нанесения белков в геле были использованы антитела мыши к глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (GAPDH, 1:10000; Abscam, Великобритания, Mr = 37 кД). Для реакции также использовали соответствующие вторичные антитела козы, конъюгированные с пероксидазой (Sigma, США): против кролика (1:10 000) или против мыши (1:60 000). Идентификацию сигнала проводили с помощью хемифлуоресцентного реагента ECL-Prime и фотопленки (Amersham, Великобритания).

Изображения структур на препаратах мозга были получены с помощью микроскопа Zeiss (Imager A1, Германия) со встроенной телевизионной камерой и программы Axio-Vision 4.8. Из области аркуатного ядра было сделано 12—15 снимков в формате jpg для каждой реакции. С помощью программы Image J (NIH, США) на каждом из снимков в нейронах определена оптическая плотность иммунопозитивного вещества AGRP или тирозингидроксилазы.

Пленки с сигналами, полученными с помощью Вестерн-блоттинга, сканировали и анализировали с помощью программы Image J (NIH). Была определена оптическая плотность анализируемых белков, которая нормализовалась по GAPDH.

Статистический анализ проведен с помощью парного t-критерия Стьюдента при уровне значимости $p < 0.05$. Результаты представлены как среднее арифметическое оптической плотности в условных единицах (усл. ед.) \pm стандартная ошибка, а также в процентах по сравнению с уровнем контроля.

Флуоресцентные изображения получены с помощью конфокального микроскопа DMI6000 и лазерной установки SP5 II (Leica Microsystems, Германия). Использовали иммерсионный объектив $\times 63$ и лазеры с длиной волны возбуждения 488, 568 нм. Изображения анализировали с помощью пакета программ Leica LAS AF, подготовку к демонстрации проводили с помощью программы Photoshop CS3.

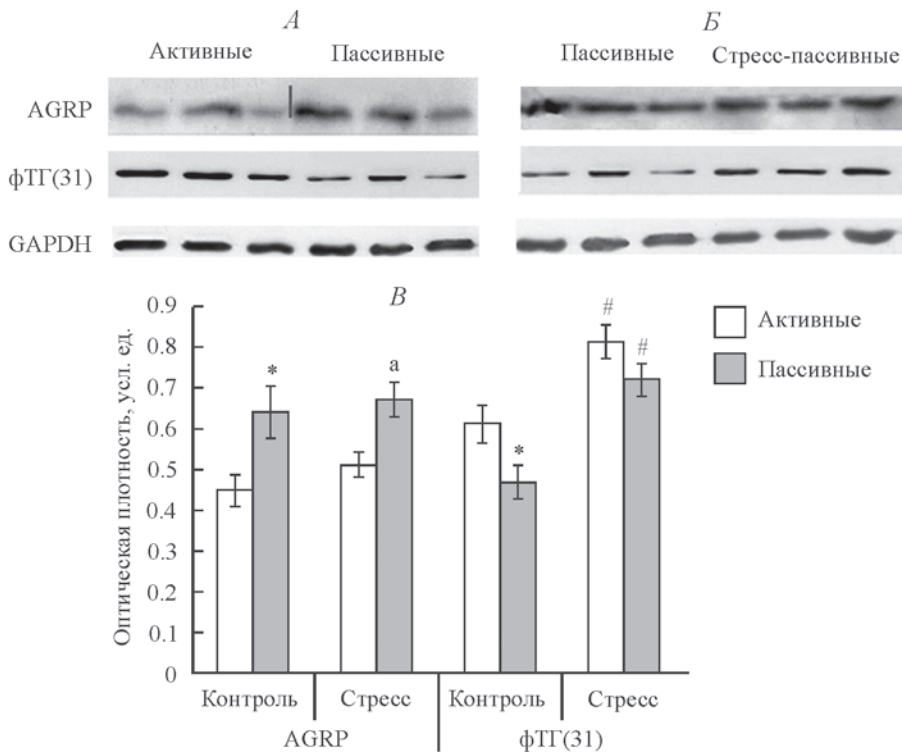


Рис. 2. Вестерн-блоттинг AGRP и тирозингидроксилазы, фосфорилированной по серину 31 — фТГ(31) в вентральной тегментарной области мозга крыс, демонстрирующих активную и пассивную стратегии поведения в тесте «открытое поле» (А), через 30 мин иммобилизации стресса (Б) и их количественный анализ (В).

GAPDH — контрольный белок. * Достоверность отличий ($p < 0.05$) между «активными» и «пассивными» в группе контроль (*), # — по сравнению с соответствующим контролем после стресса. По оси абсцисс — оптическая плотность, выраженная в условных единицах (усл. ед.).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ поведения позволил разделить крыс по показателям, которые у «активных» и «пассивных» соответственно составляли: число пересеченных секторов (61.7 ± 4.0 и 38.2 ± 5.9 , $p < 0.05$), число вертикальных стоек (20.8 ± 2.5 и 5.8 ± 1.9 , $p < 0.05$), число выходов в центр арены (8.8 ± 2.3 и 5.3 ± 1.0 , $p < 0.05$), суммарное время (в секундах) пребывания на периферии арены (244.3 ± 2.2 и 274.5 ± 3.3 , $p < 0.05$), суммарное время (в секундах) пребывания в центре арены (55.7 ± 2.19 и 25.5 ± 3.3 , $p < 0.05$).

В гипоталамусе анализ AGRP в нейронах аркуатного ядра свидетельствует о более высоком (на 27%, $p < 0.05$) уровне его оптической плотности у «пассивных» крыс по сравнению с «активными» (0.52 ± 0.02 и 0.41 ± 0.02 усл. ед., $p < 0.05$; рис. 1). После 30 мин иммобилизации не выявлено достоверных изменений: оптическая плотность AGRP в нейронах аркуатного ядра у «пассивных» крыс составляла 0.50 ± 0.02 , а у «активных» — 0.41 ± 0.01 усл. ед. Анализ нейронов аркуатного ядра свидетельствует о более высоком уровне оптической плотности тирозингидроксилазы (на 24%, $p < 0.05$) у «активных» крыс по сравнению с «пассивными» (0.53 ± 0.01 и 0.43 ± 0.01 усл. ед.).

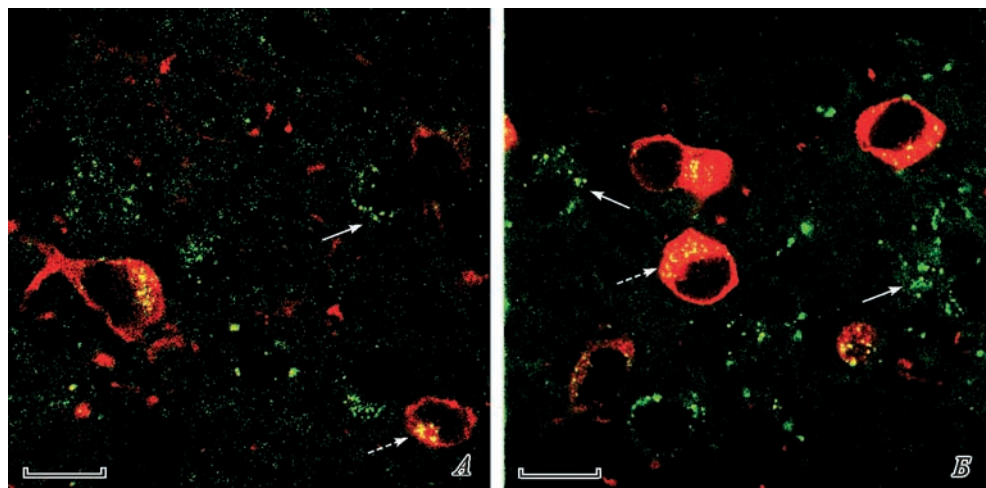


Рис. 3. Аркуатное ядро гипоталамуса крысы. Двойная иммуногистохимическая реакция к тирозингидроксилазе с меланокортиновыми рецепторами 3-го (А) или 4-го (Б) типов.

Пунктирные стрелки указывают на локализацию рецепторов в дофаминергических нейронах, сплошные стрелки — на рецепторы, локализованные в нейронах другой эргичности. Масштаб 20 мкм.

После иммобилизации выявлено увеличение оптической плотности тирозингидроксилазы в обеих группах: на 40% у «активных» (до 0.75 ± 0.01 усл. ед., $p < 0.05$) и на 45% у «пассивных» (до 0.63 ± 0.01 усл. ед., $p < 0.05$) крыс по сравнению с соответствующим уровнем контрольных животных. При этом достоверных отличий в реакции на стресс между «активными» и «пассивными» животными не обнаружено. Полученные данные демонстрируют, что в аркуат-

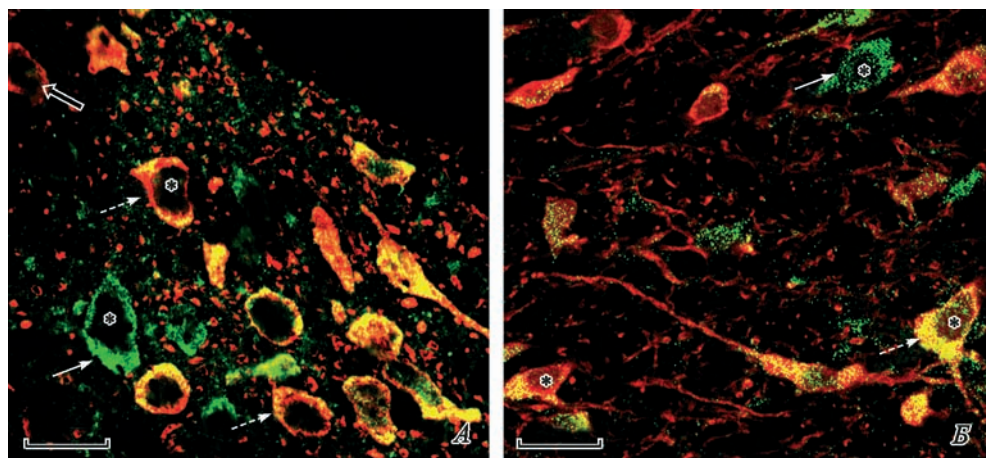


Рис. 4. Вентральная тегментарная область среднего мозга крысы. Двойная иммуногистохимическая реакция к тирозингидроксилазе с меланокортиновыми рецепторами 3-го (А) или 4-го (Б) типов.

Пунктирные стрелки указывают на локализацию рецепторов в дофаминергических нейронах, сплошные стрелки — на рецепторы, локализованные в нейронах другой эргичности, контурные — на тирозингидроксилаза-иммунопозитивные нейроны без рецепторов, звездочки — место локализации ядра нейронов. Масштаб 20 мкм.

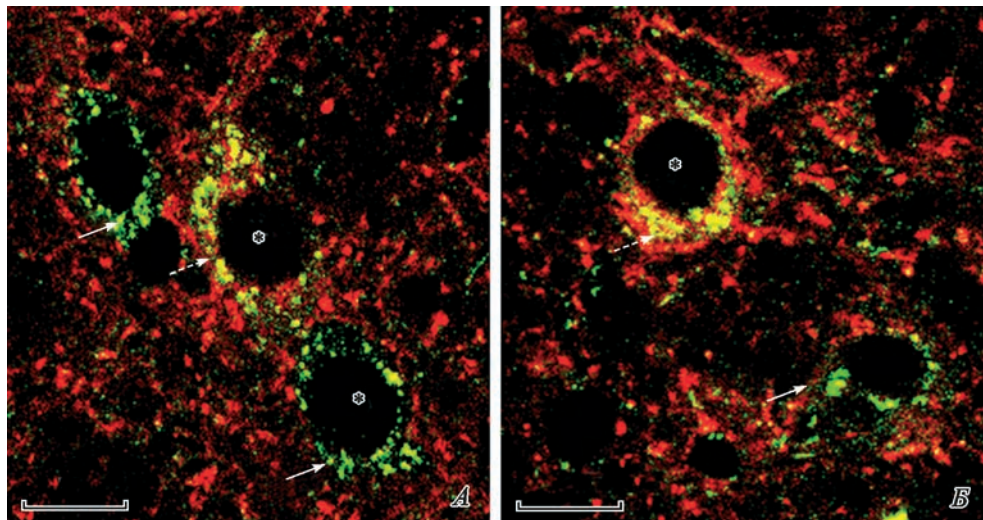


Рис. 5. Вентральная тегментарная область среднего мозга крысы. Двойная иммуногистохимическая реакция к глутаматдекарбоксилазе с меланокортиновыми рецепторами 3-го (А) или 4-го (Б) типов.

Пунктирные стрелки указывают на локализацию рецепторов в ГАМК-нейронах, сплошные стрелки — на рецепторы, локализованные в нейронах другой эргичности, звездочки — место локализации ядра нейронов. Масштаб 10 мкм.

ном ядре гипоталамуса более высокому уровню оптической плотности AGRP соответствует более низкий уровень оптической плотности тирозингидроксилазы. Однако это не повлияло на характер стрессорной реакции, наблюдаемой после иммобилизации.

В вентральной тегментарной области среднего мозга оптическая плотность AGRP у «пассивных» крыс составила 0.64 ± 0.01 усл. ед., что на 42% ($p < 0.05$) больше, чем у «активных» (0.45 ± 0.04 усл. ед.). После иммобилизации оптическая плотность AGRP составляла 0.67 ± 0.04 усл. ед. у «пассивных» и 0.51 ± 0.03 усл. ед. у «активных» крыс, что также свидетельствует об отсутствии изменения уровня AGRP по сравнению с соответствующим контрольным уровнем (рис. 2). Анализ тирозингидроксилазы демонстрирует более высокий уровень белка (на 32%, $p < 0.05$) у «активных» крыс (0.62 ± 0.11 усл. ед.) по сравнению с «пассивными» (0.47 ± 0.12 усл. ед.). После иммобилизации выявлено увеличение уровня тирозингидроксилазы у активных до 0.88 ± 0.07 усл. ед. и у пассивных до 0.78 ± 0.09 усл. ед. (соответственно на 42%, $p < 0.05$ и на 66%, $p < 0.05$ по сравнению с соответствующими контрольными группами). Анализ фосфорилированной формы тирозингидроксилазы выявил более высокий уровень оптической плотности в вентральной тегментарной области у «активных» крыс по сравнению с «пассивными» (0.61 ± 0.5 и 0.47 ± 0.04 усл. ед., на 30%, $p < 0.05$). После иммобилизации отмечено ее увеличение у «активных» (до 0.81 ± 0.04 усл. ед., на 33%, $p < 0.05$) и у «пассивных» (до 0.72 ± 0.03 усл. ед., на 53%, $p < 0.05$) по сравнению с уровнем в соответствующей контрольной группе (рис. 2).

Таким образом, полученные данные демонстрируют, что в вентральной тегментарной области и в аркуатном ядре, т. е. в областях, где локализованы тела дофаминергических нейронов, более высокому уровню AGRP соответствовал более низкий уровень тирозингидроксилазы и ее фосфорилированной

формы. При отсутствии изменения уровня AGRP после 30 мин иммобилизационного стресса наблюдалось увеличение оптической плотности как тирозингидроксилазы, так и ее фосфорилированной (по серину-31) формы.

Двойное флуоресцентное иммуномечение свидетельствует о присутствии МКР3 и МКР4 в дофаминергических нейронах аркуатного ядра гипоталамуса (рис. 3, А, Б), а также в черной субстанции и в вентральной тегментарной области (рис. 4, А, Б). Однако следует отметить и тот факт, что МКР3 и МКР4 в этих областях выявляются не во всех нейронах, иммунопозитивных к тирозингидроксилазе, они выявляются и в нейронах другой эргичности (рис. 3, 4), в частности в ГАМКергических (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Функциональное значение AGRP в литературе в основном обсуждается в связи с регуляцией пищевого поведения как фактора активации аппетита и эндогенного антагониста МКЗР и МК4Р [11, 20, 23, 27]. Наши данные о морфофункциональных взаимосвязях AGRP с дофаминергическими нейронами свидетельствуют о его участии в регуляции тех функций, которые контролируются дофаминергической системой [4, 7].

Тест «открытое поле» — широко распространенный метод оценки поведения животных. Активный тип поведения характерен для животных, которые активно избегают стресса, обладают повышенной двигательной активностью, агрессией, любопытством. Пассивный тип поведения при стрессе проявляется как реакция затаивания, у таких животных повышен уровень тревожности, снижена двигательная и исследовательская активность. Активная стратегия поведения направлена на активное преодоление неблагоприятных условий. Пассивное поведение у крыс связано с возможностью затаиться, остаться незамеченным либо неповрежденным, чтобы сэкономить силы, переждать неблагоприятные изменения внешней среды [3, 22]. Хорошо известно, что дофаминергические нейроны среднего мозга посылают аксоны в стриатум и, таким образом, вовлечены в регуляцию двигательной активности [13]. В настоящем исследовании мы показали взаимосвязь между уровнем AGRP и тирозингидроксилазы в аркуатном ядре гипоталамуса и в вентральной тегментарной области в зависимости от характера двигательной активности, исследованной с помощью теста «открытое поле». Полученные результаты демонстрируют, что более высокому уровню AGRP (у пассивных крыс) соответствует более низкий уровень тирозингидроксилазы в отличие от активных крыс, у которых выявлен более низкий уровень AGRP и более высокий уровень тирозингидроксилазы. Следует отметить и тот факт, что выявлены разнонаправленные изменения уровня AGRP и фосфорилированной (по серину 31) формы тирозингидроксилазы, что указывает на влияние AGRP на фосфорилирование этого фермента, т. е. переход в активную форму [16]. Полученные данные подтверждают результаты наших предыдущих исследований о тормозном характере влияния AGRP на дофаминергические нейроны [4, 7] и демонстрируют роль AGRP в регуляции двигательной активности.

Кортикостероиды коры надпочечников являются важным фактором, определяющим стратегию поведения в «открытом поле» [3, 21]: у «пассивных» крыс выявлен более высокий уровень кортикостерона по сравнению с «активными» [3]. У мышей линии Agouti yellow на фоне развития ожирения и уменьшения экспрессии AGRP выявлено снижение уровня кортизола в плазме крови, од-

нако при хроническом стрессе повышение уровня кортизола в крови сопровождалось увеличением экспрессии AGRP в гипоталамусе [1]. Адреналэктомия приводила к снижению экспрессии AGRP, а заместительная гормонотерапия восстанавливала содержание пептида [26]. Если учесть тот факт, что AGRP-ергические нейроны получают сигнал от периферических эндокринных желез (например, от коры надпочечников) через соответствующие рецепторы [18], то эти нейроны выступают в качестве функциональных посредников между периферическими тканями и нейронами-мишенями, которыми, в частности, являются дофаминергические нейроны.

После 30 мин иммобилизации как у «пассивных», так и у «активных» крыс не выявлено изменения оптической плотности AGRP в аркуатном ядре гипоталамуса и в вентральной тегментарной области. Уровень тирозингидроксилазы (как общей, так и фосфорилированной формы) достоверно увеличился и у «пассивных» и у «активных» крыс. При этом степень увеличения оптической плотности обеих форм тирозингидроксилазы при стрессе в большей степени была выражена у «пассивных» крыс: в вентральной тегментарной области (на 66 и 53%) по сравнению с «активными» (42 и 33%), в аркуатном ядре — на 45 и 40%. Полученные данные свидетельствуют, что уровень AGRP может влиять на характер стрессорного ответа. Мы предполагаем, что на увеличение уровня тирозингидроксилазы в отсутствие тормозного влияния AGRP повлияли факторы стресса (как кортикостероиды, так и другие факторы). Ранее нами было показано, что при более длительном стрессорном воздействии (6 ч депривации сна) наблюдалось увеличение оптической плотности AGRP, что сопровождалось уменьшением уровня тирозингидроксилазы как в самом аркуатном ядре, так и в нигростриатной системе [6, 7].

Известно, что при стрессе наблюдается увеличение концентрации адренокортикотропного гормона в крови, что приводит к активации продукции кортикостероидов, которые оказывают активирующее влияние на AGRP-ергические нейроны [10, 26]. В связи с этим можно предположить, что такой стрессор, как депривация сна, в отличие от 30 мин иммобилизации является длительным стрессорным воздействием, при котором наблюдается увеличение уровня AGRP, что приводит к подавлению и/или истощению активности в дофаминергических системах. На основании этого можно предположить дозозависимый характер влияния AGRP, который нарабатывается на более поздних стадиях стрессорного ответа: уровень AGRP не меняется на первых этапах стрессорного воздействия (например, при 30-минутной иммобилизации), в то время как по мере развития стрессорного ответа и увеличения уровня кортикостероидов в крови возрастает уровень AGRP, что вызывает подавление экспрессии и активности ферментов синтеза дофамина. В этом может проявляться позитивное и защитное действие кортикостероидов, которые, активируя тормозные механизмы мозга, могут препятствовать гиперактивности активирующих систем, в частности ПОМК, через блокирование его рецепторов и соответственно его эффектов, а также и дофаминергической системы, о чем свидетельствуют полученные данные.

В литературе имеются данные о присутствии МКР3 и МКР4 в аркуатном ядре гипоталамуса [11, 17]. В частности, сообщается об экспрессии этих рецепторов в ПОМК и в AGRP-ергических нейронах, а также возможности экспрессии обоих типов рецепторов в одном нейроне [11]. Полученные нами данные впервые демонстрируют МКР3 и МКР4 непосредственно в дофаминергических нейронах, расположенных в аркуатном ядре, а также в перивентрикулярной области.

С помощью гибридизации *in situ* экспрессия МКР3 также выявлена и в вентральной тегментарной области [25]. Результаты, полученные нами с помощью двойного иммуномечения, демонстрируют МКР3 и МКР4 в этой области мозга в нейронах, иммунопозитивных к тирозингидроксилазе, что ранее было показано и другими авторами [19]. Представленные данные свидетельствуют о возможности влияния AGRP на дофаминергические нейроны через МКР3 и МКР4.

В вентральной тегментарной области МКР3 или МКР4 выявляются не во всех нейронах, иммунопозитивных к тирозингидроксилазе (рис. 4), они также выявлены в нейронах, иммунопозитивных к глутаматдекарбоксилазе (рис. 5).

В аркуатном ядре гипоталамуса МКР3 или МКР4 выявлены не только в дофаминергических, но также и в глутаматдекарбоксилаза-иммунопозитивных нейронах. Ранее показано, что в аркуатном ядре ГАМК может быть локализована в одних нейронах с AGRP [21]. Поэтому присутствие, в частности, МКР3 на AGRP-ергических нейронах подтверждает функциональное значение этого рецептора как ауторецептора. Таким образом, полученные данные демонстрируют возможность как прямого (непосредственно через МКР3 и МКР4), так и опосредованного (через ГАМК-нейроны) влияния AGRP на дофаминергические нейроны гипоталамуса и среднего мозга, что подтверждает роль AGRP как модулятора дофаминергических нейронов мозга и показывает его участие в регуляции двигательной активности.

Наши данные о разнонаправленных изменениях уровня AGRP и фосфорилированной (по серину 31) формы тирозингидроксилазы указывают на возможность участия AGRP в фосфорилировании этого фермента через сигнальные пути, в которые вовлечены ERK 1/2 модули MAPK-киназного каскада [14, 16], не связанные с G-белками и соответственно с метаболитными рецепторами. Изучение этих механизмов будет предметом наших дальнейших исследований.

Исследование проведено с использованием оборудования ЦКП ИЭФБ РАН на средства государственного бюджета по госзаданию № АААА-А18-118012290372-0, раздел по поведенческим тестам — по госзаданию № АААА-А18-118012290427-7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Бажан Н. М., Макарова Е. Н., Шевченко А. Ю., Яковлева Т. В. Повторяющийся эмоциональный стресс препятствует развитию меланокортинового ожирения и диабета 2-го типа у мышей с мутацией *Agouti yellow*. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 93(11) : 560—566. 2007.
- [2] Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д. П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М. Высшая школа. 1991.
- [3] Жуков Д. А. Психогенетика стресса. Поведенческие и эндокринные корреляты генетических детерминант стресс-реактивности при неконтролируемой ситуации. СПб. 1997.
- [4] Михрина А. Л., Романова И. В. Роль AGRP в регуляции дофаминергических нейронов мозга. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 99(9) : 1036—1044. 2013.
- [5] Романова И. В. Морфофункциональное взаимодействие CART-пептида и дофаминергических нейронов мозга. Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 49(1) : 78—84. 2013.
- [6] Оганесян Г. А., Аристакесян Е. А., Белова В. А., Артамохина И. В., Романова И. В. Дофаминергическая нигростриатная система в условиях депривации сна у крыс. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 93(12) : 1344—1354. 2007.
- [7] Романова И. В., Михрина А. Л. Участие агутиподобного белка в механизмах регуляции цикла бодрствование—сон. Физиология человека. 39(6) : 24—30. 2013.

- [8] Угрюмов М. В. Традиционные представления о нейродегенеративных заболеваниях. В кн.: Нейродегенеративные заболевания: фундаментальные и прикладные аспекты. М. Наука. 8—35. 2010.
- [9] Шабанов П. Д., Лебедев А. А., Мещеров Ш. К. Дофамин и подкрепляющие системы мозга. СПб. Лань. 25—43. 2002.
- [10] Aguilera G., Subburaju S., Young S., Chen J. The parvocellular vasopressinergic system and responsiveness of the hypothalamic pituitary adrenal axis during chronic stress. *Progress Brain Res.* 170 : 29—39. 2008.
- [11] Bagnol D., Lu X. Y., Kaelin C. B., Day H. E., Ollmann M., Gantz I., Akil H., Barsh G. S., Watson S. J. Anatomy of an endogenous antagonist: Relationship between agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. *J. Neurosci.* 19 : 1—7. 1999.
- [12] Fields H. L., Hjelmstad G. O., Margolis E. B., Nicola S. M. Ventral tegmental area neurons in learned appetitive behavior and positive reinforcement. *Annu. Rev. Neurosci.* 30 : 289—316. 2007.
- [13] Gerfen Ch. R. Basal ganglia. In: *The rat nervous system.* (3d ed.). USA. Elsevier. 455—508. 2004.
- [14] Grattan D. R., Kokay I. C. Prolactin: A pleiotropic neuroendocrine hormone. *J. Neuroendocrinol.* 20 : 752—763. 2008.
- [15] Haskell-Luevano C., Chen P., Li C., Chang K., Smith M. S., Cameron J. L., Cone R. D. Characterization of the neuroanatomical distribution of agouti-related protein immunoreactivity in the rhesus monkey and the rat. *Endocrinology.* 130(3) : 1408—1415. 1999.
- [16] Haycock J. W., Ahn N. G., Cobb M. H., Krebs E. G. ERK1 and ERK2, two microtubule-associated protein kinases, mediate the phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine 31 *in situ*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89 : 2365—2369. 1992.
- [17] Kishi T., Aschkenasi C. J., Lee C. E., Mountjoy K. G., Saper C. B., Elmquist J. K. Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.* 457(3) : 213—235. 2003.
- [18] Lee B., Kim S. G., Kim J., Choi K. Y., Lee S., Lee S. K., Lee J. W. Brain-specific homeobox factor as a target selector for glucocorticoid receptor in energy balance. *Mol. Cell Biol.* 33(14) : 2650—2658.
- [19] Lippert R. N., Ellacott K. L. J., Cone R. D. Gender-specific roles for the melanocortin-3 receptor in the regulation of the mesolimbic dopamine system in mice. *Endocrinology.* 155(5) : 1718—1727. 2014.
- [20] Luquet S., Perez F. A., Hnasko T. S., Palmiter R. D. NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science.* 310 : 683—685. 2005.
- [21] Ma S., Morilak D. A. Induction of fos expression by acute immobilization stress is reduced in locus coeruleus and medial amygdala of Wistar-kyoto rats compared to Sprague-dawley rats. *J. Neuroscience.* 124 : 963—972. 2004.
- [22] Menyhe'rt J., Wittmann G., Lechan R. M., Keller E., Liposits Z., Fekete C. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) is colocalized with the orexigenic neuropeptide Y and agouti-related protein and absent from the anorexigenic α -melanocyte-stimulating hormone neurons in the infundibular nucleus of the human hypothalamus. *Endocrinology.* 148(9) : 4276—4281. 2007.
- [23] Ollmann M. M., Wilson B. D., Yang Y. K., Kerns J. A., Chen Y., Gantz I., Barsh G. S. Antagonism of central melanocortin receptors *in vitro* and *in vivo* by agouti-related protein. *Science.* 278 : 135—138. 1997.
- [24] Paxinos G., Watson Ch. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Fourth Edition. International standard book number: 0-12-547617-5. Acad. Press. San Diego, California. USA. 1998.
- [25] Roselli-Rehfuess L., Mountjoy K. G., Robbins L. S., Mortrud M. T., Low M. J. T., Tatro J. B., Entwistle T. M. L., Simerly R. B., Cone R. D. T. Identification of a receptor for γ -melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90(1) : 8856—8861. 1993.
- [26] Savontaus E., Conwell I. M., Wardlaw S. L. Effects of adrenalectomy on AGRP, POMC, NPY and CART gene expression in the basal hypothalamus of fed and fasted rats. *Brain Res.* 958(1) : 130—138. 2002.
- [27] Yang Y. K., Ollmann M., Wilson B., Dickinson C., Yamada T., Barsh G., Gantz I. Effects of recombinant agouti-signaling protein on melanocortin action. *Mol. Endocrinol.* 11 : 274—280. 1997.