

DOI: 10.1134/S0869813918120063

## ВЛИЯНИЕ АКТИВНЫХ ФРАГМЕНТОВ AgRP 83-132 И 25-51 НА БИОСИНТЕЗ ДОФАМИНА В МОЗГЕ

© А. Л. Михрина, Л. О. Савельева, О. С. Алексеева, И. В. Романова

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

В экспериментах на мышах линии C57BL/6J через 3 ч после введения в средний мозг фрагментов 83-132 и 25-51 агутиподобного пептида (agouti gene related protein — AgRP) выявлен их дозозависимый тормозный эффект на дофаминергические нейроны. На срезах среднего мозга с помощью иммуногистохимического метода с использованием специфических антител показано, что фрагмент AgRP 83-132 вызывает достоверное уменьшение в нейронах фосфорилированных по серину-40 и серину-31 форм тирозингидроксилазы. После введения фрагмента AgRP 25-51 выявлено достоверное уменьшение только фосфорилированной по серину-31 формы тирозингидроксилазы. Результаты высокоэффективной жидкостной хроматографии демонстрируют достоверное снижение уровня дофамина в стриатуме после введения обоих фрагментов. В статье обсуждаются механизмы, вызывающие изменение активности тирозингидроксилазы в структурах среднего мозга и действие AgRP 25-51 через G-белок — независимые пути, в частности роль ERK 1/2 модуля MAPK-киназного каскада.

*Ключевые слова:* агутиподобный пептид, дофамин, средний мозг, стриатум, фосфорилирование тирозингидроксилазы, ERK 1/2.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 12. С. 1456—1466. 2018

*A. L. Mikhrina, L. O. Saveleva, O. S. Alekseeva, I. V. Romanova. EFFECT OF ACTIVE FRAGMENTS OF AgRP 83-132 AND 25-51 ON DOPAMINE BIOSYNTHESIS IN THE BRAIN. I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the RAS, St. Petersburg, Russia, e-mail: irinaromanova@mail.ru.*

In experiments on C57BL/6J mice, 3 hours after the injection of the agouti gene related protein (AgRP) 83-132 and 25-51 fragments into the midbrain, their dose-dependent inhibitory effect on dopaminergic neurons was detected. On the midbrain sections by immunohistochemical method using specific antibodies, it has been shown that the AgRP 83-132 fragment causes a significant decrease in phosphorylated at serine-40 and serine-31 forms of tyrosine hydroxylase in neurons. After the injection of the AgRP 25-51 fragment a significant decrease in phosphorylated only at serine-31 form of tyrosine hydroxylase in neurons was revealed. The results of high performance liquid chromatography demonstrate a significant decrease in the level of dopamine in the striatum after the injection of both fragments. In the article the mechanisms that cause chan-

ges in tyrosine hydroxylase activity in the midbrain structures and the effect of AgRP 25-51 through G-protein — independent pathways, in particular via the ERK 1/2 module of the MAPK-kinase cascade, are discussed.

*Key words:* agouti gene related protein, dopamine, midbrain, striatum, phosphorylation of tyrosine hydroxylase, ERK 1/2.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 12. P. 1456—1466. 2018

Дофамин — один из важнейших нейромедиаторов, вовлечен в регуляцию многих функций мозга и соответственно разных форм поведения (двигательная активность, цикл бодрствование—сон, стресс, когнитивные процессы, пищевое поведение и др.) [1, 2]. Хорошо известно, что отростки дофаминергических нейронов среднего мозга поступают в стриатум и участвуют в регуляции двигательной активности [3]. Изменение баланса дофамина в nigro-стриатной системе является причиной различных заболеваний, в частности нейродегенеративных [4]. В связи с этим изучение механизмов регуляции биосинтеза дофамина остается актуальной проблемой физиологии и медицины.

Известно, что скоростью-лимитирующим ферментом биосинтеза дофамина является тирозингидроксилаза. Однако активность этого фермента зависит от уровня его фосфорилирования, которое осуществляется через остаток серина (8, 19, 31, 40), связывающиеся с различными внутриклеточными посредниками [5]. Основная активация тирозингидроксилазы происходит благодаря фосфорилированию по серину-40, которое зависит от G-белок — опосредованных механизмов внутриклеточной сигнализации, в частности от протеинкиназы А. Остальные пути фосфорилирования приводят к гораздо меньшей активации, при этом в фосфорилировании серина-31 участвует ERK 1/2 модуль MAPK-киназного каскада и Cdk5 киназа — G-белок-независимые механизмы [5].

В регуляции активности дофаминергических нейронов участвуют различные пептиды, в том числе агутиподобный пептид (AgRP — agouti related peptide/agouti gene related peptide), который выявлен более 20 лет назад [6]. В мозге мРНК AgRP обнаружена в нейронах аркуатного ядра гипоталамуса [7]. Было показано, что из промоллекулы в ходе посттрансляционных изменений образуются три активных фрагмента AgRP: 25-51, 54-82 и 83-132 [8]. Последний фрагмент AgRP 83-132 является наиболее изученным. Различные литературные источники свидетельствуют о его участии в регуляции пищевого поведения как эндогенного антагониста G-белок-связанных меланокортиновых рецепторов 3-го и 4-го типов [9, 10], блокирование которых в гипоталамусе приводит к активации аппетита и изменению энергетического баланса организма [11, 12]. В литературе также обсуждается вопрос о том, что AgRP 83-132 может оказывать свои эффекты независимо от меланокортиновых пептидов, действуя, очевидно, как обратный агонист меланокортиновых рецепторов 3-го типа [13, 14]. Каково функциональное значение фрагментов AgRP 25-51 и 54-82 — неизвестно, хотя установлено, что эти фрагменты обладают биологической активностью [15, 16].

В настоящее время в литературе обсуждается вопрос о «непищевых» функциях AgRP [17, 18]. Ранее с помощью двойного иммуномечения и конфокальной микроскопии нами было показано присутствие AgRP-иммунопозитивных отростков непосредственно вокруг тел дофаминергических нейронов среднего мозга. В экспериментах *in vitro* было выявлено уменьшение тирозингидроксилазы после инкубации переживающих срезов среднего мозга с фрагментом AgRP 83-132, что демонстрирует тормозный эффект этого фрагмента на

системы биосинтеза дофамина и подтверждает наше предположение о роли AgRP как модулятора функциональной активности дофаминергических нейронов мозга [17].

Цель настоящей работы — исследовать влияние двух активных фрагментов AgRP (83-132 и 25-51) на системы биосинтеза дофамина после введения этих пептидов непосредственно в средний мозг, а также оценить, изменится ли при этом уровень дофамина в стриатуме, куда приходят основные проекции от дофаминергических нейронов среднего мозга.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на половозрелых самках мыши C57Bl/6J (20—22 г) одной фазы овариального цикла. Все эксперименты проводили в соответствии с требованиями этического комитета ИЭФБ РАН, European Communities Council Directive 1986 (2010/63/ЕЕС) и правилам, изложенным в «Guide for the care and use of laboratory animals».

Эксперименты проводили в утренние часы (10—13 ч). Животных наркотизировали внутривенно хлоралгидратом (400 мг/кг) и фиксировали в стереотаксисе для мелких животных (СЭЖ-5, Россия). Для введения пептидов были использованы стереотаксические координаты (AP = -3.6 мм, L = 0.5 мм, V = 4.2 мм от брегма) согласно атласу мозга мыши [19]. С помощью шприца Гамильтона билатерально были проведены инъекции 0.2 и 0.6 нмоль AgRP 83-132 (форма производителя AgRP 83-131, PhoenixPeptide Inc., США) или AgRP 25-51 (PhoenixPeptide Inc., США) в объеме 0.5 мкл. Время каждой инъекции составило 5 мин. Контрольным мышам вводили соответствующие объемы стерильного 0.9%-ного раствора NaCl, который также был использован для растворения пептидов. Через 3 ч после второго введения мышей декапитировали и извлекали мозг.

Ткань стриатума контрольных ( $n = 12$ ) и экспериментальных ( $n = 8$ ) мышей быстро замораживали на сухом льду и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ . В дальнейшем замороженную ткань заливали 4-кратным объемом холодной 0.1 М перхлорной кислоты, гомогенизировали и центрифугировали 10 мин (12 000 g при  $+4^{\circ}\text{C}$ ). Надосадок замораживали, хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  и в дальнейшем использовали для анализа дофамина и его метаболитов в соответствии с протоколом, описанным ранее [20]. Ткань среднего мозга: 1) замораживали на сухом льду и в дальнейшем из области ventral tegmental area (VTA) приготавливали пробы для определения уровня белков методом Вестерн-блоттинга ( $n = 5$  в каждой группе); 2) погружали на 72 ч при  $+4^{\circ}\text{C}$  в 4%-ный раствор параформальдегида (pH 7.4), приготовленный на фосфатном буфере с 0.9 % NaCl (PBS), для иммуногистохимических исследований ( $n = 5$  в каждой группе).

Концентрацию дофамина и его метаболита диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) определяли методом обращеннофазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с электрохимической детекцией на хроматографе Beckman Coulter (США) [21]. Хроматографическая система включала инжектор Rheodyne 7125 с петлей на 20 мкл для нанесения образцов, колонку Phenomenex (250.0×4.6 мм) с сорбентом Sphere Clone 5 и ODS(2) и амперометрический детектор LC-4C BAS. Определение концентраций исследуемых веществ проводили при потенциале  $+0.70\text{ В}$ . Подвижная фаза включала 5.5 мМ цитратно-фосфатный буфер с 0.7 мМ октансульфоновой кислотой, 0.5 мМ ЭДТА и 8 % ацетонитрила (pH 3.0). Скорость элюции подвижной фазы составляла 1 мл/мин, время анализа одной пробы около

20 мин. Результаты представлены в процентах относительно контрольного (100 %) уровня.

Для анализа уровня белка ткань гомогенизировали в десятикратном растворе лизирующего буфера (0.02M TRIS, 0.15M NaCl, 0.001M EDTA, 1 % Triton X-100, pH 7.5), в который добавляли коктейль ингибиторов протеаз (Sigma, США) и ингибиторов фосфатаз (PhosStop, RocheDiagnostic, Канада) согласно инструкции производителя. Протокол приготовления проб и гель-электрофореза был описан ранее [17, 22]. Нитроцеллюлозные мембраны (Amersham, Великобритания) инкубировали в течение ночи при +4 °С в первичных моноклональных антителах мыши к тирозингидроксилазе (ТГ, Sigma, США), разведенные 1 : 3000 на блокирующем растворе (4%-ное обезжиренное сухое молоко, разведенное на TRIS-буфере с 0.1 % Tween-20, pH 7.4). Для контроля равномерности нанесения белков в геле были использованы антитела мыши к глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (GAPDH, Abcam, Великобритания, 1 : 3000). Также для инкубации использовали вторичные антитела козы против мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США, 1 : 40 000). Для идентификации сигнала были использованы хемифлуоресцентный реагент ECL-Plus и чувствительная фотопленка (Amersham, Великобритания). Пленки сканировали с помощью фотосканера Canon при разрешении 1200 dpi и анализировали с помощью программы Image J. Было проведено умножение значений оптической плотности и площади каждого бенда ТГ, которые нормализовали к соответствующему значению GAPDH.

Для иммуногистохимических исследований фиксированную ткань промывали в PBS (pH 7.4) и после криопротекции при +4 °С в 30%-ном растворе сахарозы, разведенной на PBS, замораживали с помощью изопентана при -42 °С и хранили при -80 °С. С помощью криостата (Leica, Германия) из области среднего мозга были изготовлены чередующиеся серии фронтальных срезов толщиной 16 мкм, которые монтировали на стекла SuperFrost/plus (Menzel, Германия). Стекла высушивали и использовали для иммуногистохимических реакций, протокол которых ранее подробно описан [2, 22]. Срезы инкубировали 48 ч (при +4 °С) с первичными моноклональными антителами мыши к ТГ (Sigma, США) в разведении 1 : 2000 или кролика к AgRP 83-132 (PhoenixPeptide Inc., США) в разведении 1 : 500, или кролика к фосфорилированной ТГ по серину-40 (фТГ40, Millipore, США) в разведении 1 : 2000, или кролика к фосфорилированной ТГ по серину-31 (фТГ31, Millipore, США) в разведении 1 : 500. После тщательной промывки срезы инкубировали 1 ч при комнатной температуре со вторичными антителами козы против кролика, конъюгированными с биотином в разведении 1 : 300 (VectorLabs., Великобритания). Стекла промывали и наносили на них раствор комплекса стрептавидин-пероксидаза (Sigma, США), разведенный 1 : 1000 в PBS. Визуализацию проводили с помощью 0.05%-ного диаминобензидина (Sigma, США) с 0.015 % перекиси водорода. Реакцию останавливали дистиллированной водой. Срезы с реакцией к AgRP 83-132 докрашивали гематоксилином для визуализации ядер клеток. После тщательной промывки и стандартной гистологической обработки срезы заключали под покровные стекла с помощью прозрачной среды Bio-Mount (Bio-Optica, Италия) и высушивали. Изображения структур на препаратах мозга получали с помощью микроскопа «Carl Zeiss» Axio A1 (Германия) со встроенной телевизионной камерой и программы Axio-Vision 4.8. Из области VTA для каждой иммуногистохимической реакции было сделано 10—12 снимков. С помощью программы Image J на каждом из снимков в нейронах была определена ОП фТГ40 или фТГ31 в условных единицах (усл. ед.).

Статистический анализ результатов ВЭЖХ проведен с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), иммуногистохимических исследований — с помощью парного двухвыборочного *t*-критерия для независимых выборок при уровне значимости  $p < 0.05$  в пакете программ Statistica 10. Результаты представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка и в процентах по сравнению с контрольным уровнем.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты ВЭЖХ демонстрируют (рис. 1), что через 3 ч после введения в средний мозг 0.2 нмоль AgRP 83-132 уровень дофамина в стриатуме не изменился, но при этом выявлено увеличение уровня ДОФУК (на 24 %), которое, однако, не было статистически достоверным по сравнению с контрольным уровнем. Через 3 ч после введения в средний мозг 0.2 нмоль AgRP 25-51 в стриатуме не выявлено изменений уровня дофамина и ДОФУК.

После введения 0.6 нмоль AgRP 83-132 выявлено уменьшение уровня дофамина на 24 % ( $p < 0.05$ ), при этом отмечено увеличение ДОФУК на 55 % ( $p < 0.05$ ) и соответственно коэффициента ДОФУК/дофамин на 78 %

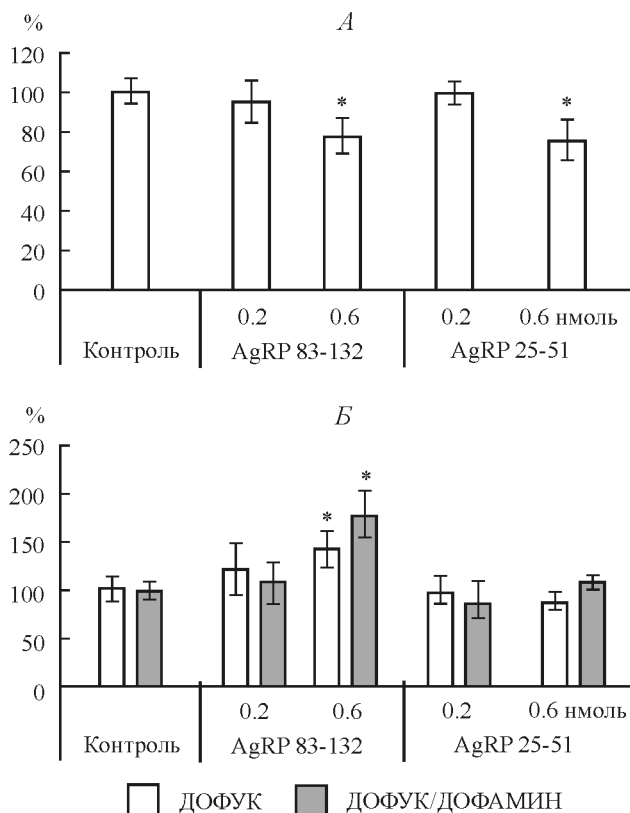


Рис. 1. Анализ уровня дофамина (А), его метаболита диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и катаболического коэффициента ДОФУК/дофамин (Б) в стриатуме мыши после введения 0.2 и 0.6 нмоль AgRP 83-132 или AgRP 25-51 в средний мозг.

\* Достоверность отличий от соответствующего контроля ( $p < 0.05$ ).

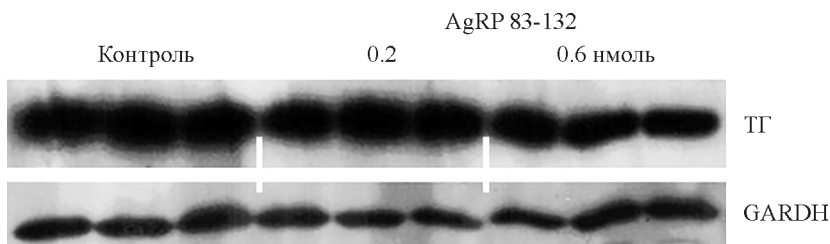


Рис. 2. Изменение уровня тирозингидроксилазы (ТГ) в ventral tegmental area мыши после введения 0.2 и 0.6 нмоль AgRP 83-132 (Вестерн-блоттинг). GAPDH — контрольный белок.

( $p < 0.05$ ). После введения 0.6 нмоль AgRP 25-51 выявлено уменьшение уровня дофамина на 23 % ( $p < 0.05$ ), однако достоверного изменения ДОФУК не наблюдалось, что соответственно не повлияло на изменение коэффициента ДОФУК/дофамин.

Результаты Вестерн-блоттинга свидетельствуют об отсутствии достоверных изменений уровня ТГ в VTA после введения 0.2 нмоль пептидов (рис. 2). После введения 0.6 нмоль AgRP 83-132 выявлено уменьшение оптической плотности ТГ на 24 % (до  $1.27 \pm 0.15$  усл. ед.,  $p < 0.05$ ) по сравнению с контрольным уровнем ( $1.69 \pm 0.09$  усл. ед., рис. 2). После введения 0.6 нмоль AgRP 25-51 было выявлено уменьшение оптической плотности ТГ на 22 % (до  $1.32 \pm 0.15$  усл. ед.,  $p < 0.05$ ), поэтому иммуногистохимические исследования были проведены на срезах среднего мозга мышей, которым вводили 0.6 нмоль пептидов.

Морфологический анализ срезов, на которых была проведена иммуногистохимическая реакция с антителами к ТГ, свидетельствует о локализации места инъекции непосредственно над дофаминергическими нейронами VTA или в области перехода VTA в черную субстанцию. На срезах, расположенных рядом с теми, где был выявлен трек от инъекции (эксперимент с введением в мозг фрагмента AgRP 83-132), была проведена иммуногистохимическая реакция с первичными антителами к AgRP 83-132, что позволило оценить область распространения экзогенного пептида. Анализ AgRP-иммунопозитивного материала рядом с областью трека свидетельствует о более интенсивной реакции у мышей, которым вводили AgRP 83-132, по сравнению с контрольными, а также свидетельствует о локализации AgRP-иммунопозитивных капель в межклеточном пространстве непосредственно вокруг тел нейронов (рис. 3). Капли экзогенного белка были выявлены в ростральном и каудальном направлении от места укола на 0.6—0.8 мм, поэтому соседние стекла были использованы для иммуногистохимических реакций к двум фосфорилированным формам ТГ — фТГ40 и фТГ31. На каждом стекле была отдельно проведена микрофотосъемка участков VTA, располагающихся непосредственно рядом с треком от инъекции (*область 2*), или на некотором расстоянии от места укола (*область 1*).

Анализ оптической плотности фТГ40 (рис. 4) в контрольной группе не выявил отличий между нейронами VTA, расположенными в *области 1* и *2* (*1* —  $0.49 \pm 0.01$ , *2* —  $0.50 \pm 0.01$  усл. ед.).

После введения 0.6 нмоль AgRP 83-132 в нейронах VTA (рис. 4, 5) среднее значение оптической плотности ф40ТГ составило в *области 1* —  $0.48 \pm 0.01$  усл. ед., в *области 2* —  $0.28 \pm 0.03$  усл. ед. (уменьшение на 43 % по сравнению с *областью 1*,  $p < 0.05$  и уменьшение на 45 % по сравнению с *областью 2* в контроле,  $p < 0.05$ ).

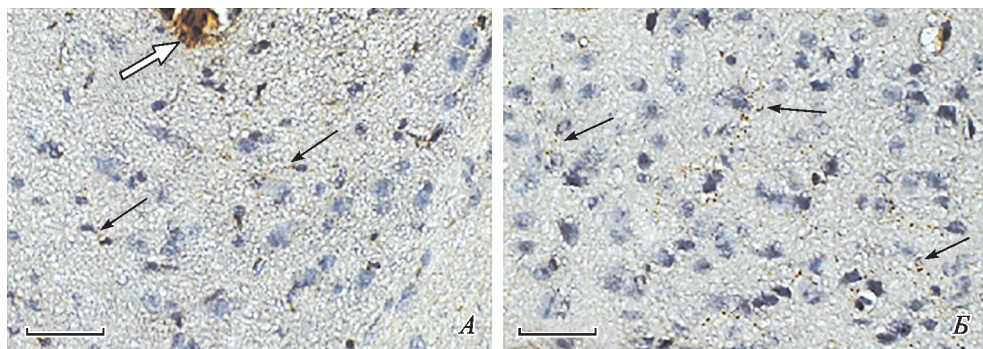


Рис. 3. Иммуногистохимическая реакция к AgRP 83-132 в ventral tegmental area мыши C57Bl/6J в контроле (А) и после введения 0.6 нмоль AgRP 83-132 (Б) с окраской гематоксилином.

Сплошные стрелки указывают на капли иммунопозитивного материала, большая стрелка — трек от инъекции. Масштаб: 50 мкм.

После введения 0.6 нмоль AgRP 25-51 в нейронах VTA (рис. 4, 6) среднее значение оптической плотности фТГ40 составило: в области 1 —  $0.48 \pm 0.02$  усл. ед., в области 2 —  $0.45 \pm 0.03$  усл. ед. (меньше на 7 % чем в области 1,  $p > 0.05$  и меньше на 10 % по сравнению с областью 2 в контроле,  $p > 0.05$ ). Полученные данные демонстрируют достоверное уменьшение уровня ф40ТГ после введения 0.6 нмоль AgRP 83-132, которое наблюдалось локально в дофаминергических нейронах VTA.

Анализ оптической плотности фТГ31 в нейронах VTA (рис. 4) контрольной группы не выявил отличий между нейронами, расположенными в области 1 или 2 (1 —  $0.30 \pm 0.02$  и 2 —  $0.29 \pm 0.02$  усл. ед.).

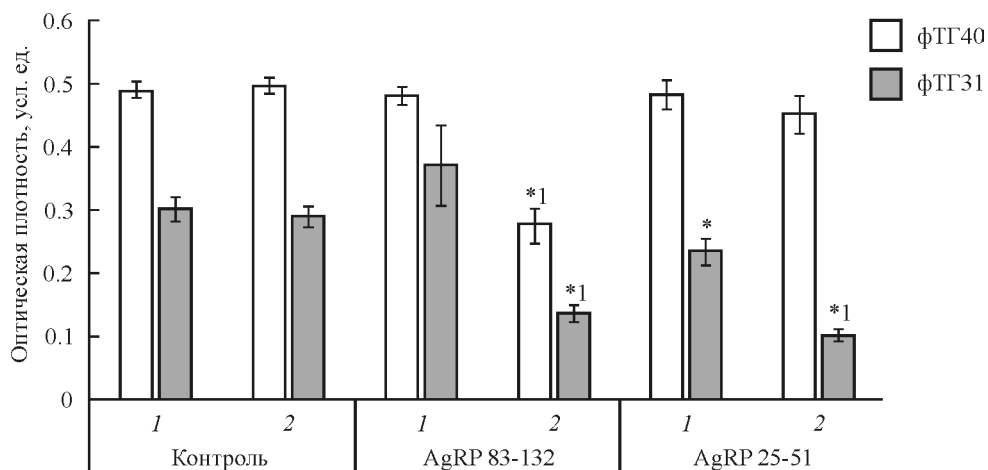


Рис. 4. Анализ оптической плотности фосфорилированных по серину-40 и серину-31 форм тирозингидроксилазы (фТГ40 и фТГ31) в нейронах ventral tegmental area мыши после введения 0.6 нмоль AgRP 83-132 или AGRP 25-51.

1 — область структуры, расположенная на расстоянии от места инъекции, 2 — область структуры, расположенная вокруг места инъекции; достоверность отличий: \* От соответствующей контрольной области, 1 — от соответствующей области 1 ( $p < 0.05$ ).

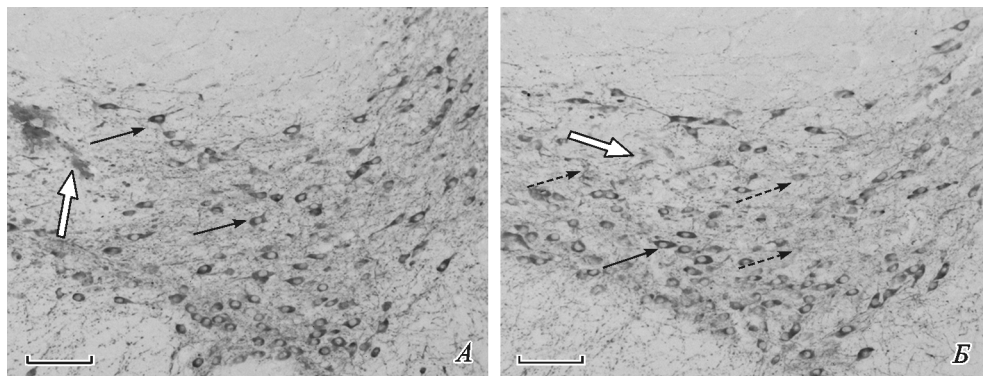


Рис. 5. Иммуногистохимическая реакция к фосфорилированной по серину-40 форме тирозингидроксилазы в ventral tegmental area мыши C57Bl/6J в контроле (А) и после введения 0.6 нмоль AgRP 83-132 (Б), черно-белое изображение.

Сплошные стрелки указывают на тела иммунопозитивных нейронов, пунктирные — на тела нейронов со слабовыраженной реакцией, большая стрелка — трек от инъекции. Масштаб: 50 мкм.

После введения 0.6 нмоль AgRP 83-132 (рис. 4) среднее значение оптической плотности ф31ТГ составило в области 1 —  $0.37 \pm 0.06$  усл. ед. (на 23 % выше контрольного уровня,  $p > 0.05$ ), а в области 2 —  $0.14 \pm 0.01$  усл. ед. (уменьшение на 63 % по сравнению с областью 1,  $p < 0.05$  и уменьшение на 53 % по сравнению с областью 2 в контроле,  $p < 0.05$ ).

После введения 0.6 нмоль AgRP 25-51 (рис. 4) значение оптической плотности ф31ТГ составило в области 1 —  $0.23 \pm 0.02$  усл. ед. (уменьшение на 24 % по сравнению с областью 1 контроля,  $p < 0.05$ ), а в области 2 —  $0.10 \pm 0.01$  усл. ед. (на 53 % меньше по сравнению с областью 1,  $p < 0.05$ , и на 65 % меньше чем в области 2 контроля,  $p < 0.05$ ).

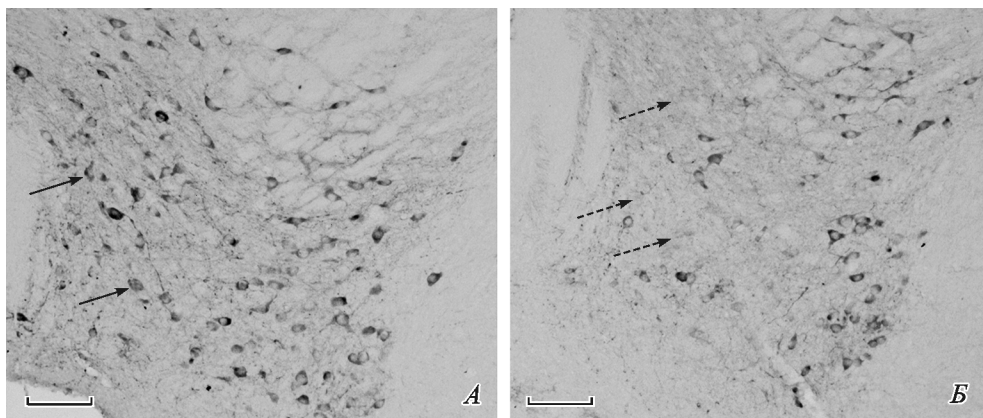


Рис. 6. Иммуногистохимическая реакция к фосфорилированной по серину-31 форме тирозингидроксилазы в ventral tegmental area мыши C57Bl/6J в контроле (А) и после введения 0.6 нмоль AgRP 83-132 (Б).

Сплошные стрелки указывают на тела иммунопозитивных нейронов, пунктирные — на тела нейронов со слабовыраженной реакцией. Масштаб: 50 мкм.



## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные нами данные демонстрируют дозозависимый тормозный эффект обоих активных фрагментов AgRP на дофаминергические нейроны среднего мозга, что повлияло на системы биосинтеза дофамина и привело к уменьшению уровня дофамина в стриатуме. Влияние фрагмента AgRP 83-132 связывают с блокадой меланокортиновых рецепторов 3/4 [6, 7, 15], что, очевидно, препятствует стимулирующему влиянию меланокортинов через их метаболитные рецепторы, активирующие цАМФ, и приводит к снижению функциональной активности нейронов.

Наши данные об уменьшении фТГ40 и фТГ31 в дофаминергических нейронах после введения AgRP 83-132 подтверждают роль этого пептида не только как антагониста меланокортиновых рецепторов, но и как обратного агониста. Эффекты AgRP 25-51 непосредственно не связаны с G-белок-зависимыми механизмами [15, 16]. Существует предположение, что этот фрагмент взаимодействует с трансмембранным гликопротеином синдицином-3, который в основном выявлен в ткани мозга [23]. Однако в литературе мы не обнаружили данных об образовании синдикана-3 в дофаминергических нейронах. Следует отметить, что после введения как фрагмента AgRP 25-51, так и фрагмента AgRP 83-132 было выявлено уменьшение фосфорилирования ТГ по серину-31, которое осуществляется без участия G-белков и сопряжено с влияниями, опосредуемыми ERK 1/2 модулем MAPK-киназного каскада [5]. Наши результаты, с одной стороны, свидетельствуют о том, что оба фрагмента участвуют в реализации этого пути, а с другой — что влияние AgRP 83-132 также может реализовываться и через G-белок-независимые механизмы. В этом случае AgRP 83-132, выполняя роль обратного агониста, может влиять не только на экспрессию ТГ через G-белок-зависимые пути, но и на активность ТГ, блокируя ее фосфорилирование через ERK 1/2 модуль [5, 24]. Однако в литературе высказывалась версия о возможности влияния AgRP 83-132 не только через меланокортиновые, но и через другие рецепторы [16].

Полученные нами данные демонстрируют уменьшение фТГ31 в дофаминергических нейронах, расположенных непосредственно рядом с местом укола, и, напротив, ее увеличение в нейронах, расположенных на расстоянии от области введения AgRP 83-132. В первом случае мы наблюдали уменьшение количества иммунопозитивных нейронов и уменьшение уровня фТГ31 в 1.5—2 раза по сравнению с контрольным уровнем. В нейронах, расположенных на расстоянии от области инъекции, на которые, по-видимому, экзогенный белок непосредственно не повлиял, напротив, наблюдалось увеличение иммунореактивности фТГ31 на 30—100 %. Этот факт может свидетельствовать о существовании интегративных взаимоотношений между дофаминергическими нейронами внутри структуры, нарушение которых приводит к увеличению активности фТГ31, что, по-видимому, носит компенсаторный характер, в котором участвуют посредники, связанные с ERK 1/2 модулем (например,  $\beta$ -аррестины).

Ранее в экспериментах *in vitro* мы показали уменьшение уровня ТГ после инкубации с AgRP 83-132 [17]. Данные об экспрессии в VTA меланокортиновых рецепторов-3 и 4 как непосредственно в дофаминергических нейронах, так и в нейронах другой эргичности, в частности в ГАМК-нейронах [18, 22], свидетельствуют о возможности как прямого влияния AgRP 83-132 на дофаминергические нейроны, так и опосредованного через регуляцию их взаимодействия с ГАМК-нейронами. В связи с этим можно предположить и возмож-

ность влияния AgRP 25-51 не только на дофаминергические, но и на нейроны другой эргичности.

Экспрессия AgRP в организме зависит от многих факторов. В частности, показано, что при стрессе кортикостероиды коры надпочечников оказывают активирующее действие на экспрессию AgGRP [25], а при ожирении уровень AgRP в мозге снижается [26]. Если учитывать тот факт, что различные фрагменты этого пептида пропорционально образуются в одном нейроне из общего предшественника, то необходимо учитывать возможность их совместного влияния на нейроны-мишени через различные сигнальные механизмы.

Исследование проведено с использованием оборудования ЦКП ИЭФБ РАН на средства государственного бюджета по госзаданию № АААА-А18-118012290372-0.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[1] *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.

[2] *Oganesyan G. A., Romanova I. V., Aristakesyan E. A., Kuzik V. V., Makina D. M., Morina I. Yu., Khramenkova A. E., Artamokhina I. V., Belova V. A.* The dopaminergic system of the telencephalo-diencephalic areas of the vertebrate brain in the organization of the sleep-waking cycle. *Neurosci. Behav. Physiol.* 39 (8): 805—817. 2008.

[3] *Gerfen Ch. R.* Basal ganglia. In: *The rat nervous system.* (3-d ed.). USA. Elsevier. 455—508. 2004.

[4] *Угрюмов М. В.* Традиционные представления о нейродегенеративных заболеваниях. Нейродегенеративные заболевания: фундаментальные и прикладные аспекты. М. Наука. 8—35. 2010. [*Ugrumov M. V.* Traditional concepts of neurodegenerative diseases. *Neurodegenerative diseases: fundamental and applied aspects.* Moscow. Nauka. 8—35. 2010. (In Russ.)].

[5] *Daubner S. C., Le T., Wang S.* Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 508(1): 1—12. 2011.

[6] *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.

[7] *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.

[8] *Creemers J. W., Pritchard L. E., Gyte A., Le Rouzic P., Meulemans S., Wardlaw S. L., Zhu X., Steiner D. F., Davies N., Armstrong D., Luckman S. M., Schmitz C. A., Rick A. D., Brennan J. C., White A., Lawrence C. B.* Agouti-related protein is posttranslationally cleaved by proprotein convertase 1 to generate agouti-related protein (AGRP) 83-132 : interaction between AGRP83-132 and melanocortin receptors cannot be influenced by syndecan-3. *Endocrinology.* 147(4): 1621—1631. 2006.

[9] *Schwartz M. W., Morton G. J.* Obesity: keeping hunger at bay. *Nature.* 418 : 595—597. 2002.

[10] *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.

[11] *Cone R. D.* Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat. Neurosci.* 8 (5): 571—578. 2005.

[12] *Lee M., Wardlaw S. L.* The central melanocortin system and the regulation of energy balance. *Front Biosci.* 12 : 3994—4010. 2007.

[13] *Marsh D. J., Miura G. I., Yagaloff K. A., Schwartz M. W., Barsh G. S., Palmiter R. D.* Effects of neuropeptide Y deficiency on hypothalamic agouti-related protein expression and responsiveness to melanocortin analogues. *Brain Res.* 848 (1): 66—77. 1999.

- [14] Tolle V., Low M. J. In vivo evidence for inverse agonism of Agouti-related peptide in the central nervous system of proopiomelanocortin-deficient mice. *Diabetes*. 57 (1): 86—94. 2008.
- [15] Goto K., Inui A., Takimoto Y., Yuzuriha H., Asakawa A., Kawamura Y., Tsuji H., Takahara Y., Takeyama C., Katsuura G., Kasuga M. Acute intracerebroventricular administration of carboxyl-terminal fragments of agouti-related peptide produces a long-term decrease in energy expenditure in rats. *Int. J. Mol. Med*. 12: 379—383. 2003.
- [16] Pritchard L. E., White A. Agouti-related protein: more than a melanocortin-4 receptor antagonist? *Peptides*. 26 (10): 1759—1770. 2005.
- [17] Mikhrina A. L., Romanova I. V. The role of AGRP in regulating dopaminergic neurons in the brain. *Neurosci. Behav. Physiol*. 45 (5): 536—541. 2015.
- [18] 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.
- [19] Paxinos G., Franklin K. B. J. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Acad. Press. 2001. Int. Standard Book Number: 0-12-547636-1. — CD-ROM. [Http://www.academicpress.com](http://www.academicpress.com).
- [20] Lambertsen K. L., Gramsbergen J. B., Sivasaravanaparan M., Ditzel N., Sevelsted-Moller L. M., n-Viguera A. O., Rabjerg M., Wulff H., Kohler R. Genetic KCa3.1-Deficiency produces locomotor hyperactivity and alterations in cerebral monoamine levels. *PLOS ONE*. 7 (10): 1—15. 2012.
- [21] Krasnova I. N., Bychkov E. R., Lioudyno V. I., Zubareva O. E., Dambinova S. A. Intracerebroventricular administration of substance P increases dopamine content in the brain of 6-hydrodopamine lesioned rats. *Neuroscience*. 95(1): 113—117. 2000.
- [22] Михрина А. Л., Чернышев М. В., Михайлова Е. В., Савельева Л. О., Романова И. В. Участие агутиподобного пептида в регуляции двигательной активности. *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова*. 104 (7): 769—779. 2018. [Mikhrina A. L., Chernyshev M. V., Mikhailova E. V., Saveleva L. O., Romanova I. V. Participation of AGRP in regulation of locomotion activity. *Russ. J. Physiol*. 104 (7): 769—779. 2018. (In Russ.)].
- [23] Rapraeger A. C. Syndecan-regulated receptor signaling. *J. Cell Biol*. 149 (5): 995—998. 2000.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] Romanova I. V., Derkach K. V., Mikhrina A. L., Sukhov I. B., Mikhailova E. V., Shpakov A. O. The leptin, dopamine and serotonin receptors in hypothalamic POMC-neurons of normal and obese rodents. *Neurochem Res*. 43(4): 821—837. 2018.

Поступила в редакцию 15.11.2018  
После доработки 19.11.2018  
Принята к публикации 05.12.2018