

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ИЦиГ СО РАН)**

На правах рукописи

ИЗЬЮРОВ АРСЕНИЙ ЕВГЕНЬЕВИЧ

**Изучение связи меланокортиновой и серотониновой систем мозга в
механизмах регуляции общего метаболизма и поведения мышей**

1.5.5. – Физиология человека и животных

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

**Научный руководитель:
Д.б.н., Куликов А.В.**

Новосибирск, 2026

Оглавление

Список используемых сокращений	4
Введение.....	5
Глава 1. Обзор литературы.....	11
1.1. Меланокортиновая система.....	11
1.2. Мутация <i>lethal yellow</i> (A^Y) в гене <i>Agouti</i> мыши	21
1.3. Серотониновая система	25
1.4. Полиморфизм с.1473C>G в гене <i>Tph2</i> мыши	29
1.5. Взаимодействие меланокортиновой и 5-НТ систем мозга.....	33
Глава 2. Материалы и методы.....	38
2.1. Животные и эксперименты	38
2.2. Получение генотипов <i>B6-1473CC/aa</i> , <i>B6-1473CC/A^Ya</i> , <i>B6-1473GG/aa</i> и <i>B6-1473GG/A^Ya</i>	39
2.3. Измерение суточной динамики двигательной активности, потребления пищи и калориметрических показателей.....	40
2.4. «Открытое поле»	40
2.5. «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ).....	41
2.6. «Принудительное плавание» (ПП)	41
2.7. Подвешивание за хвост.....	41
2.8. Генотипирование полиморфизма с.1473C>G методом ПЦР	42
2.9. Подготовка проб.....	43
2.10. Определение уровня 5-НТ и 5-НИАА	43
2.11. Определение активности ТПГ2.....	44
2.12. Определение концентрации белка по методу Бредфорда	44
2.13. Экстракция общей РНК	44
2.14. Синтез кДНК.....	45
2.15. Полимеразная цепная реакция в реальном времени (real-time PCR)	45
2.16. Статистика	46
Глава 3. Результаты.....	47
3.1. Экспрессия генов меланокортиновой системы у самцов и самок мышей генотипов <i>C57BL/6</i> и <i>C57BL/6-A^Y</i>	47
3.2. Динамика двигательной активности, потребления пищи и общего метаболизма самцов мышей генотипов <i>C57BL/6</i> и <i>C57BL/6-A^Y</i>	50
3.3. Исследование поведения самцов мышей генотипов <i>B6-1473CC/aa</i> , <i>B6-1473CC/A^Ya</i> , <i>B6-1473GG/aa</i> и <i>B6-1473GG/A^Ya</i>	56
3.4. Исследование биохимии мозга и экспрессии генов МС и 5-НТ систем у самцов мышей генотипов <i>B6-1473CC/aa</i> , <i>B6-1473CC/A^Ya</i> , <i>B6-1473GG/aa</i> и <i>B6-1473GG/A^Ya</i>	61
Глава 4. Обсуждение.....	66
Заключение	73

Выводы	74
Список литературы	75
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	89
Приложение 1	89

Список используемых сокращений

5-НТ – серотонин

5-HIAA – 5-гидроксииндолуксусная кислота

AGRP – агути-подобный пептид

POMC – проопиомеланокортин

МС – меланокортин

A^Y – мутация *lethal yellow* в локусе *Raly-Agouti*

Введение

Меланокортиновая система мозга представлена нейронами, синтезирующими меланокортины (пептиды, выступающие в качестве агонистов для рецепторов данной системы) и имеющими рецепторы к данным пептидам. Из пяти известных [Ellacott, Cone, 2006] рецепторов к меланокортинам, в мозге экспрессируются только два – MC3R и MC4R [Mountjoy и др., 1994; Roselli-Reh fuss и др., 1993], локализованные преимущественно в гипоталамусе. Агонисты этой системы синтезируются из проопиомеланокортина (POMC) [Yamamoto и др., 2015], а её естественным антагонистом в нервной системе является агути-подобный белок (AGRP). Известно, что меланокортиновая система контролирует большое число физиологических параметров и функций, таких как вес тела, пищевое поведение [Poggioli, Vergoni, Bertolini, 1986], энергетический гомеостаз [Yeo и др., 2021], дофаминовое подкрепление [Pandit и др., 2016], артериальное давление [Kuo, Silva, Hall, 2003], стресс [Adan и др., 1999], тревожное поведение [Gonzalez, Vaziri, Wilson, 1996], метаболизм костной ткани [Cornish и др., 2003] и др. Есть сведения о возможном участии меланокортиновой системы в механизмах депрессивно-подобного поведения [Chaki, Okuyama, 2005; Copperi, Kim, Diano, 2022] и линейного роста организма [Lam и др., 2021]. Известно, что дефицит меланокортиновой системы может способствовать развитию или обострению сопутствующих ожирению заболеваний.

Мутация *lethal yellow* (A^Y) в локусе *Raly-Agouti*, расположенном на хромосоме 2 мыши, характеризуется полным доминированием. Считают, что эта мутация ставит ген *Agouti* под контроль промотора гена *Raly*. Гомозиготы по данной мутации летальны, а гетерозиготы (A^Y/a) страдают ожирением [Bazhan и др., 2013; Boston и др., 1997; Fan и др., 1997]. Недавно в нашей лаборатории было показано увеличение продолжительности депрессивно-подобного замирания в тесте принудительного плавания и нарушение моторики на вращающемся стержне у мышей A^Y/a [Khotskin и др., 2019].

Полагают, что причиной ожирения мышей A^Y/a является эктопическая экспрессия белка агути и блокада меланокортиновых рецепторов гипоталамуса, что приводит к увеличению потребления пищи и/или снижения расхода энергии [Boston и др., 1997; Fan и др., 1997]. Данная гипотеза основана исключительно на одной работе [Miller и др., 1993], в которой с помощью метода Нозерн-блот качественно была обнаружена мРНК гена *Agouti* в целом мозге мышей A^Y/a . Однако до настоящего времени экспрессия гена белка *Agouti* не была показана в гипоталамусе. Также не было проведено работ по сравнению суточной динамики: двигательной активности, потребления пищи и воды, а также таких калориметрических параметров как потребление кислорода, выделение углекислого газа, и расход энергии у мышей с мутацией A^Y/a и мышей без данной мутации.

Поскольку показано, что меланокортиновая система вовлечена в регуляцию энергообмена, а мутация A^Y является причиной нарушений поведения, то данная система вызывает большой интерес как потенциальная мишень для лечения ожирения, метаболических нарушений и связанных с ними заболеваний и расстройств поведения.

Серотониновая (5-НТ) система мозга вовлечена в механизмы регуляции различных форм поведения и служит мишенью для клинически эффективных антидепрессантов, анксиолитиков и антипсихотиков. Триптофангидроксилаза 2 (ТПГ2) является ключевым и лимитирующим ферментом синтеза 5-НТ в мозге млекопитающих [Walther и др., 2003]. Нокаут гена *Tph2* [Alenina и др., 2009; Savelieva и др., 2008] и ингибитор ТПГ2, п-хлорфенилаланин [Cervo и др., 2005; Kulikov и др., 2012] резко снижают уровень 5-НТ в мозге мышей. Полиморфизм с.1473C>G в гене *Tph2* мыши, приводящий к замене Р447R аминокислотной последовательности, снижает активность фермента ТПГ2 вдвое [Kulikov и др., 2005]. Ранее не было показано, что наследственный, вследствие мутации с.1473C>G в гене *Tph2*, дефицит фермента ТПГ2 вызывал нарушения поведения в стандартной батарее тестов [Koshimizu и др., 2019; Kulikova, Kulikov, 2019]. В то же время, в природных популяциях мыши эта мутация элиминируется естественным отбором [Osipova и др., 2010]. Поэтому было предположено, что негативный эффект данной мутации проявляется при неблагоприятных факторах внешней среды (стресс, инфекции) и/или наследственных нарушениях ключевых физиологических функций.

У грызунов 5-НТ регулирует POMC-нейроны (через 5-НТ_{2C} рецепторы) дугообразного ядра гипоталамуса и AGRP-нейроны, синтезирующие агути-подобный пептид (AGRP; через 5-НТ_{1B} рецепторы) [Marston, Garfield, Heisler, 2011]. Таким образом, 5-НТ теоретически может регулировать активность меланокортиновой системы. Не было обнаружено изменений в 5-НТ системе мозга у мышей с мутацией A^Y [Khotskin и др., 2019]. До настоящего времени не было изучено влияние мутации с.1473C>G в гене *Tph2* на экспрессию генов меланокортиновой системы и на выраженность нарушений поведения, вызванных мутацией A^Y , а также не было исследовано как мутация A^Y влияет на серотониновую систему и поведение мышей с мутацией с.1473C>G.

Цель работы: Исследовать влияние мутации A^Y и полиморфизма с.1473C>G на 5-НТ и меланокортиновую системы мозга и регулируемые этими системами формы поведения у мышей, а также исследовать экспрессию гена *Agouti* в структурах мозга и изменения в потреблении пищи, расходе энергии у мышей с мутацией A^Y .

Были поставлены следующие задачи:

- 1) Количественно оценить влияние мутации A^Y на экспрессию генов меланокортиновой системы и *Raly* в структурах мозга мышей, в том числе в гипоталамусе.

- 2) Исследовать влияние мутации A^Y на суточную динамику двигательной активности, потребление пищи и расход энергии у мышей.
- 3) Получить мышей генотипов $B6-1473CC/aa$, $B6-1473CC/A^Ya$, $B6-1473GG/aa$ и $B6-1473GG/A^Ya$, несущих полиморфизм с.1473C>G и мутацию A^Y , и сравнить у мышей данных генотипов выраженность поведенческих признаков и характеристики 5-НТ и меланокортиновой систем в мозге.

Научная новизна. Впервые была показана и количественно измерена экспрессия гена *Agouti* в гипоталамусе и высокая позитивная корреляция уровней экспрессии генов *Agouti* и *Raly* в мозге мышей гетерозиготных по мутации *lethal yellow*. Впервые было показано снижение потребления O_2 , выделения CO_2 и траты энергии у мышей с мутацией *lethal yellow*. Впервые было показано, что мутация *lethal yellow* усиливает дистонию задних конечностей у мышей с мутацией с.1473C>G, снижающей активность ТПГ2.

Теоретическая и научно-практическая ценность работы. Получены новые данные о роли меланокортиновой и 5-НТ систем в формировании нарушений поведения и метаболизма. Экспериментально были подтверждены гипотезы о том, что у мышей гетерозиготных по мутации *lethal yellow* (1) происходит эктопическая экспрессия гена *Agouti* в гипоталамусе, (2) в мозге экспрессия данного гена коррелирует с экспрессией гена *Raly* и (3) снижен расход энергии. Показано, что мутация *lethal yellow* усиливает дистонию задних конечностей, вызванную наследственным снижением активности ТПГ2.

Полученные результаты позволяют использовать мышей с мутацией *lethal yellow* как удобную модель для изучения механизмов экономного расходования энергии. Полученные мыши генотипа $B6-1473GG/A^Ya$ являются новой моделью нарушения поведения и могут быть использованы для скрининга психотропных препаратов. Результаты данного исследования используются в курсе лекций для магистрантов второго года ФЕН НГУ.

Положения, выносимые на защиту

1. Эктопическая сверхэкспрессия гена белка *Agouti* в гипоталамусе животных, возникающая в результате мутации *lethal yellow* в локусе *Raly-Agouti*, приводит к снижению интенсивности метаболического обмена (потребление кислорода, выделение углекислого газа), что может быть причиной ожирения у мышей.
2. Степень проявления дистонии задних конечностей, возникающей у ювенильных мышей вследствие наследственного нарушения активности фермента триптофангидроксилазы 2, усиливается на фоне эктопической сверхэкспрессии гена белка *Agouti*, что способствует возникновению данной патологии у половозрелых животных и указывает на связь меланокортиновой и серотониновой систем мозга.

Апробация результатов.

Все представленные в диссертации результаты опубликованы в 4 статьях в рецензируемых зарубежных журналах (Wos, Scopus) и доложены на 3 российских и 1 международной конференциях.

Материалы диссертации были представлены на следующих российских и международной научных конференциях в виде устных и стендовых докладов:

1. Khotskin N., **Izyurov A**, Kulikova E., Kulikov A. Quantification of ectopic overexpression of agouti gene in the brain of mice with lethal yellow mutation. // 34th European College of Neuropsychopharmacology (ECNP) Congress, Лиссабон, Португалия, 2021.
2. Комлева П.Д., **Изыюров А.Е.**, Хоцкин Н.В., Куликов А.В. Негативные влияния мутации C1473G в гене *Tph2* на поведение и физиологические функции молодых мышей. // X Юбилейный всероссийский форум молодых исследователей «ХимБиоSeasons 2024», Калининград, 2024.
3. **Изыюров А.Е.**, Комлева П.Д., Хоцкин Н.В., Куликов А.В. Влияние мутаций *c1473g* в гене *Tph2* и *Agouti yellow* в локусе *Agouti-Raly* на нервную систему и поведение мышей. X Юбилейный всероссийский форум молодых исследователей «ХимБиоSeasons 2024», Калининград, 2024.
4. **Изыюров А.Е.**, Комлева П.Д., Куликов А.В., Хоцкин Н.В. Снижение общего метаболизма у мышей с мутацией *lethal yellow* в локусе *Agouti-Raly*. XI Всероссийский форум молодых исследователей «ХимБиоSeasons 2025», Калининград, 2025.

Основные публикации

По материалам диссертации опубликовано 8 работ в рецензируемых изданиях, из них 4 статьи и 4 тезиса конференций.

Статьи в рецензируемых журналах:

1. **Izyurov AE**, Plyusnina AV, Kulikova EA, Kulikov AV, Khotskin NV. Lethal Yellow Mutation Causes Anxiety, Obsessive-compulsive Behavior and Affects the Brain Melanocortin System in Males and Females of Mice. *Curr Protein Pept Sci.* 2023;24(4):329-338. doi: 10.2174/1389203724666230320145556. PMID: 36941814. Индексируется в SCOPUS и WOS.
2. Komleva PD, Alhalabi G, **Izyurov AE**, Khotskin NV, Kulikov AV. Effects of the Combination of the C1473G Mutation in the *Tph2* Gene and Lethal Yellow Mutations in the *Raly-Agouti* Locus on Behavior, Brain 5-HT and Melanocortin Systems in Mice. *Biomolecules.* 2023 Jun 8;13(6):963. doi: 10.3390/biom13060963. PMID: 37371543; PMCID: PMC10295981. Индексируется в SCOPUS и WOS.

3. Khotskin NV, **Izyurov AE**, Kulikov AV. Lethal yellow mutation in the Raly-Agouti locus reduces the energy expenditure in male mice. *Neurosci Lett*. 2025 Oct 25;866:138374 doi: 10.1016/j.neulet.2025.138374. Epub 2025 Sep 3. PMID: 40912352. Индексируется в SCOPUS и WOS.
4. Khotskin NV, Komleva PD, Arefieva AB, Moskaliuk VS, Khotskina A, Alhalabi G, **Izyurov AE**, Sinyakova NA, Sherbakov D, Kulikova EA, Bazovkina DV, Kulikov AV. The C1473G Mutation in the Mouse Tph2 Gene: From Molecular Mechanism to Biological Consequences. *Biomolecules*. 2025; 15(4):461. doi: 10.3390/biom15040461. Индексируется в SCOPUS и WOS.

Тезисы конференций:

1. Khotskin N., **Izyurov A**, Kulikova E., Kulikov A. Quantification of ectopic overexpression of agouti gene in the brain of mice with lethal yellow mutation // *European Neuropsychopharmacology*. 2021. V. 53. P. S175-S176. Doi: 10.1016/j.euroneuro.2021.10.232.
2. Комлева П.Д., **Изыюров А.Е.**, Хоцкин Н.В., Куликов А.В. Негативные влияния мутации C1473G в гене *Tph2* на поведение и физиологические функции молодых мышей. Тезисы X Юбилейного всероссийского форума молодых исследователей «ХимБиоSeasons 2024» - Калининград, 2024. – С. 26 – ISBN 978-5-8353-3275-5.
3. **Изыюров А.Е.**, Комлева П.Д., Хоцкин Н.В., Куликов А.В. Влияние мутаций *c1473g* в гене *Tph2* и *Agouti yellow* в локусе *Agouti-Raly* на нервную систему и поведение мышей. Тезисы X Юбилейного всероссийского форума молодых исследователей «ХимБиоSeasons 2024» - Калининград, 2024. – С. 19 – ISBN 978-5-8353-3275-5.
4. **Изыюров А.Е.**, Комлева П.Д., Куликов А.В., Хоцкин Н.В. Снижение общего метаболизма у мышей с мутацией *lethal yellow* в локусе *Agouti-Raly*. Тезисы XI Всероссийского форума молодых исследователей «ХимБиоSeasons 2025» - Калининград, 2025. – С. 209 – ISBN 978-5-8353-3383-7.

Личный вклад автора. Автор принимал активное участие на всех этапах данной работы. Исследования метаболических параметров на установке PhenoMaster проводились совместно к.б.н. с.н.с. Хоцкиным Н.В. Создание конгенных линий, сочетающих полиморфизм *c.1473C>G* и мутацию *A^Y* и исследование поведения данных животных, а также хроматографическое определение уровней 5-НТ, 5-НИАА и активности ТПГ2 проводились совместно м.н.с. Комлевой П.Д. Определение экспрессии генов серотониновой и меланокортиновой систем в мозге мышей, а также статистическая обработка данных проводились соискателем самостоятельно.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю, д.б.н. Куликову А.В., а также сотрудникам сектора генетических коллекций нейрпатологий и нейрогеномики поведения, которые помогали в проведении экспериментов и

освоении методик: к.б.н. Хоцкину Н.В. за помощь в изучении поведения мышей, к.б.н. Куликовой Е. А. и к.б.н. Базовкиной Д.В. за помощь с освоением методик, м.н.с. Комлевой П.Д. за помощь при создании конгенных линий и проведении экспериментов.

Структура и объем работы. Текст диссертации содержит введение, обзор литературы, разделы, описывающие материалы и методы исследований, результаты, обсуждение результатов, выводы, заключение, список сокращений, список цитируемой литературы и приложение. Объем работы 94 страницы, среди них 22 рисунка (14 оригинальных), 12 таблиц и 6 страниц приложений к диссертации. Список цитируемой литературы включает 214 источников.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Меланокортиновая система

1.1.1. Общая характеристика

Меланокортиновая система представляет собой совокупность нейронов, способных синтезировать меланокортины, и клеток, экспрессирующих меланокортиновые рецепторы. Она играет ключевую роль в ряде эндокринных и гомеостатических процессов. Все меланокортиновые пептиды синтезируются из проопиомеланокортина (POMC), кодируемого геном *Pomc*, с помощью прицельного протеолиза прогормон-конвертазами (PC1 и PC2). При этом образуется ряд белковых продуктов, включая пептиды из семейств опиоидов и меланокортинов. Из POMC образуются следующие меланокортины: аденокортикотропный гормон (АКТГ) и α , β и γ -меланоцит-стимулирующие гормоны (МСГ), и все они содержат одинаковую сигнатурную аминокислотную последовательность - His-Phe-Arg-Trp, необходимую для связывания с 5 рецепторами меланокортина. Термин «меланокортин» связан с тем, что все эти белковые продукты проявляют меланотропную и/или аденокортикотропную активность. Помимо меланокортинов расщепление проопиомеланокортина также приводит к выработке β -липотропина, нерасщепленного продукта, содержащего β -МСГ и β -эндорфин, и кортикотрофиноподобного пептида промежуточной доли мозга у грызунов [Joseph, Pilcher, Bennett-Clarke, 1983]. Однако POMC также экспрессируется в коже, кишечнике, плаценте и поджелудочной железе [Smith, Funder, 1988]. Уникальность меланокортиновой системы, по сравнению с другими нейропептидными системами, заключается в том, что помимо меланокортинов, она также регулируется двумя эндогенными малыми белками антагонистами: агути [Bultman, Michaud, Woychik, 1992] и агути-подобным белком (AGRP) [Ollmann и др., 1997; Shutter и др., 1997]. Белок агути экспрессируется в клетках волосяных фолликулов, локализованных в эпителии, из которых он секретируется для регуляции экспрессии меланина соседними фолликулярными меланоцитами. AGRP экспрессируется в коре надпочечников и в нейронах, синтезирующих нейропептид Y (NPY), которые локализованы в дугообразных ядрах гипоталамуса [Ollmann и др., 1997; Shutter и др., 1997].

Различные физиологические роли меланокортиновых пептидов, кодируемых генами проопиомеланокортина (*Pomc*), агути (*Agouti*) и агути-подобного пептида (*Agrp*), являются результатом экспрессии различных подтипов меланокортиновых рецепторов в различных тканях. Исследования распределения рецепторов определили, что третий и четвёртый типы меланокортиновых рецепторов (MC3R и MC4R соответственно) экспрессируются в центральной нервной системе (ЦНС) [Butler, Cone, 2002; Cone, 2005]. Рецепторы второго типа (MC2R) экспрессируются исключительно в надпочечниках, где они являются эндогенными рецепторами аденокортикотропного гормона [Cone и др., 1993; Mountjoy и др., 1992]. Рецепторы первого

типа (MC1R) экспрессируется в основном в коже, где они регулируют пигментацию, тогда как рецепторы пятого типа (MC5R) экспрессируются в экзокринных железах [Chen и др., 1997; Labbé и др., 1994].

1.1.2. Меланокортиновые рецепторы

Существует пять известных меланокортиновых рецепторов (MC1R-MC5R), соответствующих хронологическому порядку их клонирования. Эти рецепторы экспрессируются в разных тканях и имеют различное сродство к меланокортиновым пептидам.

Таблица 1. Краткое описание основной функции, агониста и локализации наиболее выраженной экспрессии меланокортиновых рецепторов

Рецептор	Градация потенциала агонистов	Место наиболее выраженной экспрессии	Основная функция
MC1R	$\alpha\text{-МСГ} = \text{АКТГ} > \beta\text{-МСГ} > \gamma\text{-МСГ}$	Меланоциты	Обеспечение пигментации
MC2R	АКТГ	Надпочечники	Стероидогенез
MC3R	$\alpha\text{-МСГ} = \text{АКТГ} = \beta\text{-МСГ} = \gamma\text{-МСГ}$	Головной мозг	Энергетический гомеостаз
MC4R	$\alpha\text{-МСГ} = \text{АКТГ} > \beta\text{-МСГ} > \gamma\text{-МСГ}$	Головой мозг	Энергетический гомеостаз
MC5R	$\alpha\text{-МСГ} > \text{АКТГ} > \beta\text{-МСГ} > \gamma\text{-МСГ}$	Экзокринные железы	Секреция желёз

Все меланокортиновые рецепторы принадлежат к семейству рецепторов, сопряженных с Gs-белком, при стимулировании активирующих аденилатциклазу и стимулирующие синтез внутриклеточного цАМФ.

Меланокортиновые рецепторы первого типа (MC1R)

MC1R экспрессируются в основном в меланоцитах кожи и волосных фолликулах, где они участвуют в стимуляции синтеза черного пигмента эумеланина у множества живых организмов, в том числе и у человека [Rees, 2003]. Действие эндогенного агониста $\alpha\text{-МСГ}$ на MC1R увеличивает продукцию цАМФ, что вызывает увеличение соотношения эумеланина (черный/коричневый) к феомеланину (красный/желтый), способствуя более темной пигментации [Cone и др., 1996]. Естественным антагонистом этого типа рецепторов является белок агути,

который экспрессируется в волосяных фолликулах. Он снижает синтез эумеланина и увеличивает синтез феомеланина, что приводит к преобладанию красной/желтой пигментации в шерсти. Также было установлено, что *Mc1r* экспрессируется в мозге [Romanova, Mikhaylova, Mikhrina, 2020] и предположительно связан с защитными свойствами меланокортинов в воспалительных процессах при этом этот эффект зависит от пола. Так самки мышей, лишённые *Mc1r* показали повышенную толерантность к тепловому раздражителю и механическим стимулам; самки с мутацией гена *Mc1r* характеризовались сниженным болевым ответом на воспаление вызванное формалином [Delaney и др., 2010].

Меланокортиновые рецепторы второго типа (MC2R)

Основным агонистом этого типа рецепторов является АКТГ [Mountjoy и др., 1992]. MC2R экспрессируются в коре надпочечников и имеют важнейшее значение в регуляции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси. Основная роль АКТГ в этой оси – контролировать регуляцию синтеза и секреции кортикостероидов надпочечниками. Однако АКТГ также важен для развития непосредственно самой коры надпочечников.

Меланокортиновые рецепторы третьего типа (MC3R)

Данный тип рецепторов экспрессируется преимущественно в центральной нервной системе [Roselli-Reh fuss и др., 1993] и участвует в целом ряде физиологических процессов. В мозге грызунов мРНК *Mc3r* в значительной степени экспрессируется в гипоталамусе, но также обнаруживается в лимбических областях, хотя уровень мРНК *Mc3r* там существенно ниже [Roselli-Reh fuss и др., 1993]. Основными агонистами являются α - и γ -МСГ, и считается, что MC3R опосредуют натрийуретическое действие этих пептидов [Ni и др., 2003; Ni и др., 1998]. Так было показано, что мыши со специфической делецией гена *Mc3r* демонстрируют сложное фенотипическое ожирение [Butler и др., 2000; Chen и др., 2000], подтверждающее участие MC3R в регуляции энергетического гомеостаза. Грызуны с нокаутом гена *Mc3r* характеризуются увеличением жировой и уменьшением мышечной масс в отсутствие какого-либо значительного увеличения общей массы тела или же сколько-нибудь измеримого увеличения потребления пищи. Помимо мозга, MC3R также экспрессируется в ряде периферических органов и тканей, таких как: жировая ткань, сердце, скелетная мускулатура, почки [Chhajlani, 1996], желудок, двенадцатиперстная кишка, плацента и поджелудочная железа [Gantz и др., 1993]. Также было показано, что мыши с нокаутом гена *Mc3r* сильно подвержены гипертензии, вызванной в результате нарушений водно-солевого обмена [Ni и др., 2003].

В дугообразных ядрах гипоталамуса мРНК *Mc3r* экспрессируется в POMC-нейронах [Jégou, Boutelet, Vaudry, 2000], поэтому можно предположить, что данная мРНК *Mc3r* принимает

участие в регуляции этих нейронов. В частности, было показано, что специфический агонист MC3R рецепторов (D-Trp⁸-γ-МСГ), ингибирующий спайковую активность POMC-нейронов (Cowley et al., 2001), стимулирует потребление пищи при его (D-Trp⁸-γ-МСГ) непосредственном введении [Marks и др., 2006]. Таким образом, данный меланокортиновый рецептор выполняет множество функций, и его роль в энергетическом гомеостазе вероятнее всего является комплексной, а именно - действуя как ингибитор анорексигенных POMC-нейронов, он, по-видимому, также обладает и общим анорексигенным эффектом, поскольку делеция гена, кодирующего этот тип рецепторов, вызывает ожирение у мышей.

Меланокортиновые рецепторы четвертого типа (MC4R)

Как и рецепторы третьего типа рецепторы четвертого типа экспрессируются преимущественно в центральной нервной системе, однако имеют гораздо более обширную локализацию, нежели MC3R. Так исследования с использованием гибридизации *in situ* [Kishi и др., 2003; Mountjoy и др., 1994], а также трансгенных мышей, экспрессирующих зеленый флуоресцентный белок под контролем промотора гена *Mc4r* [Liu и др., 2003], выявили экспрессию MC4R в различных участках головного мозга грызунов: кора, мозжечок, стриатум, гиппокамп, гипоталамус, средний мозг, миндалина, таламус и ствол мозга. Таким образом было показано, что меланокортиновые рецепторы четвертого типа локализованы во всех областях мозга, про которые известно, что там наблюдается связывание α-МСГ [Tatro, 1990]. Обширная локализация меланокортиновых рецепторов четвертого типа позволила предположить, что данный тип рецепторов может опосредованно регулировать ряд нейроэндокринных и вегетативных процессов [Mountjoy и др., 1994]. Эта гипотеза была расширена при проведении исследований на мышах MC4R-GFP. Так, в заднем мозге MC4R-GFP мышей, GFP-иммунореактивность обнаруживалась в клетках, содержащих холинацетилтрансферазу, которая является маркером вегетативных преганглионарных нейронов [Liu и др., 2003]. Более того, на той же модели GFP-иммунореактивность в паравентрикулярном ядре гипоталамуса была обнаружена и в нейронах, связывающихся с тиреотропин-рилизинг гормоном и окситоцином [Liu и др., 2003]. Одной же из наиболее хорошо описанных функций MC4R является регуляция энергетического гомеостаза [Fan и др., 1997; Huszar и др., 1997]. Так было показано, что мыши с нокаутом по гену *Mc4r* демонстрируют ярко выраженное нарушение пищевого поведения (гиперфагию), гиперинсулинемию, страдают ожирением и характеризуются увеличенным общим линейным размером тела, и, таким образом, отражают фенотип ожирения, аналогичный тому, что наблюдается у агути-мышей. Неудивительно, что, учитывая их широкое распространение, рецепторы четвертого типа опосредуют и ряд других функций, к которым

можно отнести регуляцию сердечно-сосудистой системы [Li и др., 1996] и эректильную функцию [Wessells и др., 2003].

Меланокортиновые рецепторы пятого типа (MC5R)

Рецепторы данного типа экспрессируется преимущественно в экзокринных железах: слезные и слюнные, – а также в надпочечниках. Где они, по-видимому, регулируют синтез и секрецию широкого спектра продуктов этих желёз [Chen и др., 1997]. У мышей с нокаутом MC5R обнаружены дефекты в синтезировании ряда продуктов, секретируемых экзокринными железами, таких как: порфирин, слюнные липиды и феромоны [Chen и др., 1997]. В результате предполагаемых изменений в секреции феромонов у мышей с отсутствием меланокортиновых рецепторов пятого типа также наблюдаются изменения в агрессивном и защитном поведении [Caldwell, Lepri, 2002; Morgan, Thomas, Cone, 2004].

Интерес к роли меланокортиновой системы в метаболизме и энергетическом гомеостазе возник после создания мышей с нокаутом *Mc4r* и фармакологической манипуляцией с этим рецептором [Butler, Cone, 2002; Fan и др., 1997; Huszar и др., 1997; Ollmann и др., 1997]. Так, мыши с нокаутом *Mc4r* демонстрировали гиперфагию и характеризовались сильным ожирением, напоминая фенотип, наблюдаемый у мышей с дефицитом лептина (*ob/ob*) и лептинового рецептора (*db/db*), а также мышей с нокаутом *Pomc* [Friedman, 2014; Huszar и др., 1997; Mountjoy, 2015]. Данные генетические открытия позволили предположить, что существует конвергенция общего нейронального пути, критически важного для питания и поддержания энергетического гомеостаза. Позже было установлено, что гены, кодирующие MC4R, лептин, рецепторы лептина, POMC и AGRP, составляют центральный лептин-меланокортиновый путь ЦНС, который регулирует питание и массу тела [Cone, 2005; Cone, 2006]. Регуляторный путь лептин-меланокортин состоит из нейронов первого порядка, экспрессирующих проопиомеланокортины (POMC), и нейронов, экспрессирующих агути-подобный пептид (AGRP), которые продуцируют эндогенный агонист меланокортинового рецептора α -меланоцитстимулирующий гормон (α -MCH) и AGRP, соответственно [Andermann, Lowell, 2017; Cone, 2005; Mercer и др., 2013]. Помимо блокирования рецепторов, что предотвращает связывание с агонистом, AGRP также ингибирует конститутивную активность MC4R и, таким образом, обладает обратной агонистической активностью. Нейроны POMC и AGRP экспрессируют рецептор лептина и являются мишенями для гормона лептина, выделяемого из жировой ткани [Baver и др., 2014; Cheung, Clifton, Steiner, 1997; Cowley и др., 2001; Xu и др., 2018]. Таким образом, лептин напрямую и косвенно взаимодействует с POMC- и AGRP-нейронами, увеличивая активность POMC-нейронов и подавляя активность AGRP-нейронов [Cowley и др., 2001; Xu и др., 2018]. Эта информация в конечном итоге передается нижестоящим нейронам, экспрессирующим рецепторы

меланокортина, для опосредования адаптивных изменений в физиологии и поведении в ответ на изменения метаболических потребностей [Andermann, Lowell, 2017; Cone, 2005; Krashes, Lowell, Garfield, 2016]. Гомозиготные нулевые мутации в большинстве критических компонентов цепи лептин-меланокортин вызывают патологическое ожирение у грызунов и людей [Fan и др., 1997; Farooqi и др., 2000; Farooqi и др., 2003; Krude и др., 1998; Loos и др., 2008; Yeo и др., 1998; Zhang и др., 1994]. Таким образом, центральная меланокортиновая система является главным регулятором питания и массы тела.

РОМС-нейроны

Нейроны, секретирующие проопиомеланокортин (РОМС), расположены в дугообразном ядре гипоталамуса (ДЯГ) и ядре одиночного пути (ЯОП) [Cone, 2005]. Данный пептид (РОМС) посттрансляционно процессируется в пептидные продукты (α -МСГ, β -МСГ и три изоформы γ -МСГ [Mercer и др., 2013]), которые являются агонистами меланокортиновых рецепторов, в частности к MC3R и MC4R [Ericson и др., 2017; Yang, Tao, 2017]. Хотя и известно, что α -МСГ и β -МСГ играют ключевую роль в центральной меланокортиновой сигнализации у человека [Kirwan и др., 2018; Lee и др., 2006; Mountjoy и др., 2018], но относительная значимость различных эндогенных пептидов-агонистов меланокортина для физиологической регуляции питания и массы тела всё ещё остаётся изученной не до конца.

Ранее было показано, что делеция гена *Pomc* у мышей приводит к гиперфагическому ожирению, нарушению гомеостаза глюкозы и снижению расхода энергии [Mercer и др., 2013; Mountjoy, 2015]. Соответственно, у людей с мутациями гена *Pomc* также развивается тяжелое раннее ожирение, связанное как с гиперфагией, так и с пониженным расходом энергии. Также данное состояние сопровождается глюкокортикоидной недостаточностью и таким фенотипическим признаком как рыжий цвет волос из-за отсутствия адренокортикотропного гормона и пептидов меланоцитстимулирующего гормона на периферии [Krude и др., 1998]. Более того, мыши с делецией гена *Pomc*, экспрессируемого только в дугообразном ядре гипоталамуса страдают таким же патологическим ожирением и гиперфагией, которые наблюдаются у животных с глобальной делецией данного гена (*Pomc*) [Bumaschny и др., 2012]. Таким образом, основная роль РОМС в регуляции питания и массы тела, вероятно, определяется нейронами РОМС в ДЯГ и не связана с экспрессией РОМС в гипофизе. Функциональная специфика РОМС-нейронов, локализованных в ядре одиночного пути, ещё не установлена. Однако предполагается, что эти нейроны, также регулируют пищевое поведение [D'Agostino и др., 2018; Zhan и др., 2013], поскольку было показано, что стимуляция РОМС-нейронов ЯОП подавляет потребление пищи у мышей [Zhan и др., 2013].

РОМС-нейроны дугообразного ядра гипоталамуса проецируются в различные области мозга, включая многие регионы гипоталамуса, а также средний и задний мозг [Mercer и др., 2013; Wang и др., 2015] (Рис.1). Напротив, РОМС-нейроны ядра одиночного пути демонстрируют локализованный паттерн проекций, в первую очередь ограниченный регионами заднего мозга [Wang и др., 2015]. Большинство проекционных участков РОМС-нейронов соответствуют участкам с экспрессией третьего, четвертого или обоих рецепторов меланокортинов [Bagnol и др., 1999; Low, Simerly, Cone, 1994; Mountjoy и др., 1994; Mountjoy, 2010; Sweeney и др., 2023; Wang и др., 2015] (Рис.1). Критическая функция РОМС-нейронов в регуляции потребления пищи опосредована через плотные нейронные проекции в область паравентрикулярного гипоталамуса (ПВГ) [Cowley и др., 1999; Fenselau и др., 2017; Ghamari-Langroudi и др., 2015]. РОМС-нейроны ДЯГ проецируются непосредственно в ПВГ, где они (РОМС-нейроны) выделяют α -МСГ для стимуляции нейронов паравентрикулярного гипоталамуса, экспрессирующих MC4R, что снижает потребление пищи [Cone, 2005; Fenselau и др., 2017; Mercer и др., 2013]. Также РОМС-нейроны ДЯГ проецируются в области заднего мозга, такие как ядро одиночного пути и дорсальное двигательное ядро блуждающего нерва; и в спинной мозг для регуляции дополнительных метаболических параметров, таких как расход энергии, гомеостаз глюкозы и вегетативные функции [Cone, 2005; Wang и др., 2015]. Однако, несмотря на фармакологические эффекты введения меланокортина на задний мозг [Li и др., 2007; Skibicka, Grill, 2008; Skibicka, Grill, 2009; Williams, 2003], относительная важность α -МСГ, полученного из РОМС-нейронов ДЯГ и ЯОП, для сигналинга меланокортина в заднем мозге остается неизвестной.

Известно, что мутации в гене, кодирующем РОМС, что приводит к потере функциональной активности данного белка, приводят к гиперфагическому ожирению у людей [Krude и др., 1998]. Аналогичным образом, мутации в генах, кодирующих лептин и его рецептор, которые действуют частично путем стимуляции контура РОМС, также приводят к гиперфагическому ожирению и снижению расхода энергии [Friedman, 2014; Tartaglia и др., 1995; Zhang и др., 1994].

AGRP-нейроны

В отличие от РОМС-нейронов, AGRP-нейроны способствуют повышению потребления пищи и снижению расхода энергии за счет комбинированного высвобождения γ -аминомасляной кислоты (ГАМК), нейропептида Y (NPY) и агути-подобного пептида (AGRP) [Andermann, Lowell, 2017; Cone, 2005]. AGRP-нейроны необходимы для регуляции потребления пищи у мышей, поскольку специфическое разрушение этой небольшой популяции нейронов приводит к истощению и смерти [Luquet и др., 2005; Wu, Boyle, Palmiter, 2009]. Напротив, активация AGRP-нейронов повторяет многие поведенческие, физиологические, метаболические и вегетативные

эффекты, наблюдаемые при голодании, что приводит к чрезмерному потреблению пищи даже у ранее сытых мышей [Alhadeff и др., 2018; Alhadeff и др., 2020; Aponte, Atasoy, Sternson, 2011; Atasoy и др., 2012; Betley и др., 2013; Betley и др., 2015; Burnett и др., 2016; Burnett и др., 2019; Dietrich и др., 2017; Krashes и др., 2011; Padilla и др., 2016; Padilla и др., 2017; Wu, Clark, Palmiter, 2012]. AGRP-нейроны имеют много общих проекционных участков с POMC-нейронами, экспрессируемыми в дугообразном ядре гипоталамуса, при этом проекции AGRP-нейронов наблюдаются по всему гипоталамусу, переднему и заднему мозгу [Sweeney и др., 2023; Wang и др., 2015] (рис. 1). Стимуляция проекций AGRP-нейронов в паравентрикулярном гипоталамусе, ядре ложа терминальной полоски, латеральном гипоталамусе и паравентрикулярном ядре таламуса стимулирует обильное потребление пищи сытыми мышами [Atasoy и др., 2012; Betley и др., 2013; Garfield и др., 2015]. При этом, проекции AGRP-нейронов в других областях мозга способствуют снижению расхода энергии, конкурирующих мотивационных состояний и других поведенческих и вегетативных функций, связанных с голодом [Alhadeff и др., 2018; Alhadeff и др., 2020; Campos и др., 2016; Padilla и др., 2016; Padilla и др., 2017; Wu, Clark, Palmiter, 2012].

Подобно POMC-нейронам, проекционные участки AGRP-нейронов демонстрируют плотную экспрессию как MC3R, так и MC4R [Bagnol и др., 1999; Low, Simerly, Cone, 1994; Mountjoy и др., 1994; Roselli-Rehfuess и др., 1993; Sweeney и др., 2023; Wang и др., 2015] (рис. 1). Несмотря на плотную экспрессию меланокортиновых рецепторов в проекционных зонах AGRP-нейронов, острые орексигенные эффекты этих нейронов не зависят исключительно от взаимодействия с меланокортиновыми рецепторами, поскольку активация AGRP-нейронов продолжает регулировать потребление пищи при отсутствии функциональной активности меланокортиновой системы [Aponte, Atasoy, Sternson, 2011; Wu и др., 2008]. Следовательно, считается, что острый орексигенный эффект AGRP-нейронов опосредован комбинированным высвобождением NPY и ГАМК [Chen и др., 2019; Engström Ruud и др., 2020; Krashes и др., 2013], которые действуют на несколько нижестоящих участков экспрессии меланокортиновых рецепторов, чтобы способствовать повышению потребления пищи [Atasoy и др., 2012; Betley и др., 2013; Padilla и др., 2016] (Рис.1). Также считается, что высвобождение AGRP опосредует долгосрочные эффекты на питание и массу тела, поскольку центральное введение агутиподобного пептида увеличивает потребление пищи на срок до одной недели [Hagan и др., 2000; Pritchard, White, 2005]. Однако точный механизм пластичности и нейронного каскада реакций, принимающих участие в мощном, долгосрочном орексигенном эффекте, оказываемом AGRP на организм, остаются до конца не изученными. Более того, остаются в значительной степени неизвестными специфические функции сигналинга AGRP в нижестоящих участках, экспрессирующих MC3R и MC4R.

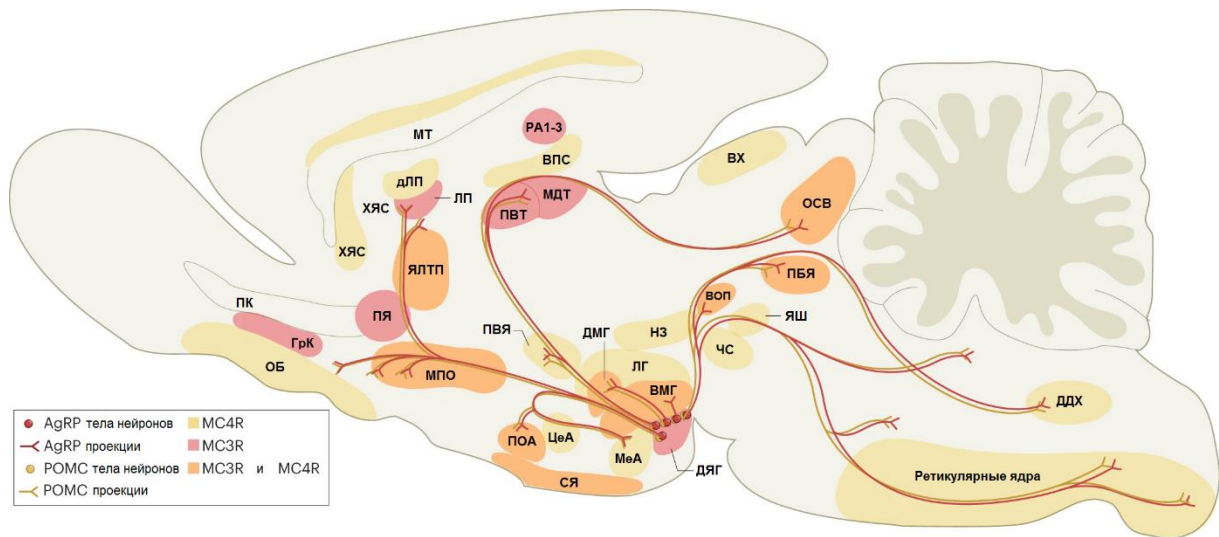


Рис. 1 (адаптировано из [Sweeney и др., 2023]) AGRP- и POMC-нейроны проецируются по всему мозгу к участкам, экспрессирующим как рецептор MC3R, так и рецептор MC4R. Хотя наблюдаются области перекрытия между экспрессией MC3R и MC4R, эти рецепторы также распределены в уникальных участках, что предполагает уникальные функции. ПОА, передняя область миндалевидного тела; ПК, передняя комиссура; ПЯ, прилежащее ядро; ДЯГ, дугообразное ядро; ЯЛТП, ядро ложа терминальной полоски; РА1-3, рог Амона 1–3; МТ, мозолистое тело; ЦеА, центральное ядро миндалевидного тела; ХЯС, хвостатое ядро–скорлупа; ДМГ, дорсомедиальный гипоталамус; ДДХ, дорсальное двигательное ядро блуждающего нерва; ЛГ, латеральный гипоталамус; ЛП — латеральная перегородка; дЛП — дорсальная латеральная перегородка; МеА — медиальное ядро миндалевидного тела; МДТ — медиодорсальный таламус; МПО — медиальная преоптическая область; ОБ — обонятельный бугорок; ОСВ — околосредоводное серое вещество; ПБЯ — парабрахияльное ядро; ГрК — грушевидная кора; ПВЯ — паравентрикулярное ядро гипоталамуса; ПВД — паравентрикулярный таламус; ЯШ — ядро шва; ВХ — верхние холмики; ЧС — черная субстанция; СЯ — супраоптическое ядро; ВМГ — вентральный медиальный гипоталамус; ВПС — вентральный подостный слой; ВОП — вентральная область покрышки; НЗ — неопределенная зона.

Хотя обширные исследования доказали необходимость и эффективность AGRP-нейронов в контроле питания у мышей, конкретная значимость данных нейронов у людей остается в значительной степени неизвестной. Так, например, показано, что делеция гена *Agrp* мало влияет на питание у мышей; аналогично показано, что никакие мутации в гене *Agrp*, затрагивающие нейроны дугообразного ядра гипоталамуса, не были связаны с изменением веса тела или питания и у людей [Cheng и др., 2018; Riveros-McKay и др., 2019]. Несмотря на отсутствие клинических ассоциаций между AGRP и метаболической функцией у людей, имеющиеся данные свидетельствуют о том, что эта система, вероятно, всё же имеет решающее значение. Например, совокупность цепей AGRP-нейронов присутствует у людей, и эти нейроны задействуют многие из тех же нейронных путей, что и у грызунов [Alkemade и др., 2012]. Более того, передача

сигналов от AGRP-нейронов увеличивает питание и вес тела у этологически различных видов, таких как мыши, рыбы и приматы [Ilnytska, Argypopoulos, 2008; Loos и др., 2008; Song, Cone, 2007]. Это открытие предполагает консервативную роль нейронных цепей, экспрессирующих AGRP, в регуляции энергетического гомеостаза.

Стресс факторы

Известно, что α -МСГ и АКТГ действуют как нейротрансмиттеры или нейромодуляторы в головном мозге [Blasquez и др., 1991], а также зафиксирована взаимосвязь между α -МСГ, АКТГ и стрессом. Введение α -МСГ и АКТГ вызывает у крыс чрезмерный груминг, который является поведенческой реакцией грызунов на стрессовые ситуации [Adan и др., 1999; Barioglio De, Lezcano, Celis, 1991], а антисыворотка к адренокортикотрофному гормону снижает груминг, вызванный новизной стимула [Dunn, Green, Isaacson, 1979]. Таким образом, груминг может указывать на активацию центральной меланокортиновой системы в условиях легкого стресса, а легкий эмоциональный стресс может, посредством стимуляции высвобождения меланокортина в головном мозге, стимулировать ось гипоталамус-гипофиз-надпочечники. Более того, агонисты MC4R вызывают у крыс груминг, а антагонист MC4R SHU9119 ослабляет это поведение, индуцированное агонистами MC4R, а также груминг, вызванный новизной [Adan и др., 1999]. Таким образом, считается, что такое, связанное со стрессом, поведение опосредуется MC4R. Также сообщалось [Vergoni и др., 1999], что селективный антагонист MC4R HS014 блокирует анорексию, вызванную иммобилизационным стрессом у крыс. Таким образом, предполагается, что меланокортины могут вызывать у грызунов поведение, связанное со стрессом, и что MC4R может быть одним из возможных типов рецепторов, опосредующих такое поведение животных.

Тревожность

Сообщалось [Corda, Orlandi, Fratta, 1990], что меланокортины вызывают анксиогенные эффекты. Показано, что α -МСГ и АКТГ подавляют реакцию на наказание у крыс в конфликтном тесте Фогеля. Также отмечено, что α -МСГ, а также меланотан II дозозависимо и значительно уменьшали количество периодов облизывания в тесте конфликта Фогеля на крысах, предполагая, что стимуляция MC4R вызывает анксиогенную активность у крыс [Chaki и др., 2003]. Микроинъекция α -МСГ в медиальную преоптическую область и вентромедиальное ядро сокращает время, проведенное в открытых рукавах в тесте приподнятого крестообразного лабиринта, что указывает на анксиогенный эффект [Gonzalez, Vaziri, Wilson, 1996]. Инъекция α -МСГ в вентромедиальное ядро значительно усиливает агрессивное поведение грызунов [Gonzalez, Vaziri, Wilson, 1996]. АКТГ увеличивает вызванную изоляцией вокализацию при стрессе у домашних цыплят [Panksepp, Normansell, 1990]. Исследователи [Rao и др., 2003]

сообщили, что анксиогенный эффект, вызванный внутривенной инъекцией α -МСГ в тесте приподнятый крестообразный лабиринт, ослаблялся диазепамом, а также муцимолем, что позволяет предположить участие ГАМКергической системы в аналогичном анксиогенному действию α -МСГ. Эта гипотеза подтверждается сообщением о том, что клоназепам ингибирует индуцированное высоким K^+ высвобождение α -МСГ из гипоталамуса крысы [Blasquez и др., 1991]. Более того, АКТГ подавляет социальный контакт в тесте социального взаимодействия на крысах, что свидетельствует об его анксиогенных свойствах [File, Clarke, 1980], а перегородка была идентифицирована как область мозга, важная для опосредования анксиогенных эффектов АКТГ [Clarke, File, 1983]. Более того, интрацеребровентрикулярное введение AGRP, эндогенного антагониста MC3R и MC4R, вызывало c-Fos-подобную иммунореактивность в боковой перегородке [Nagan и др., 2001], и подобное увеличение c-Fos-подобной иммунореактивности в боковой перегородке наблюдалось после желудочковой инъекции NDP- α -МСГ, являющегося химически-синтезированным агонистом рецепторов меланокортина [Brown, Gentry, Rowland, 1998]. Показано, что мРНК MC4R обильно экспрессируется в боковой перегородке [Mountjoy и др., 1994]. Следовательно, вполне вероятно, что MC4R в боковой перегородке играет важную роль в тревожном поведении в тесте социального взаимодействия, хотя другие области: миндалевидное тело, гиппокамп и гипоталамус, также следует принимать во внимание при рассмотрении процессов, регулируемых MC4R.

Также было показано, что антагонисты MC4R, например MCL0129 ((1 - [(S)-2-(4-фторфенил)-2-(4-изопропилпиперадин-1-ил)этил]-4-[4-(2-метоксинафталин-1-ил)бутил]пиперазин) оказывает антидепрессантный эффект, что проявляется в сокращении времени неподвижности в тесте принудительного плавания и уменьшении времени неподвижности у крыс с выученной беспомощностью, которое наблюдалось у животных при остром введении препарата. Более того, вполне возможно, что стимуляция MC4R (возможно, стрессом, таким как принудительное плавание или неизбегаемый шок) может вызвать депрессивное поведение [Chaki, Okuyama, 2005].

1.2. Мутация *lethal yellow* (A^Y) в гене *Agouti* мыши

У мышей ген *Agouti* локализован на второй хромосоме. Этот ген кодирует одноименный белок – агути, который в норме экспрессируется исключительно в клетках волосяных фолликул и переключает меланоциты с синтеза черного пигмента (эумеланина) на синтез желтого пигмента (феомеланина) [Perry и др., 1995]. Ген состоит из 100809 пар нуклеотидов и содержит 12 экзонов. Белок агути состоит из 131 аминокислотного остатка. Аналогом гена *Agouti* мыши у человека является ген *ASIP*, локализованный на 20 хромосоме человека, который кодирует сигнальный белок агути (Agouti signaling protein, ASP).

Мутация *lethal yellow* (A^Y) гена *Agouti* мыши является результатом делеции 170 тысяч пар нуклеотидов, при которой происходит удаление промотора гена *Agouti* и всех экзонов, кроме первого, другого гена, *Raly*, который находится в той же транскрипционной ориентации что и *Agouti* и является некодируемым и картируемом на 280 тысяч пар нуклеотидов, проксимальнее к 3'-концу гена *Agouti* (Рис. 2,3). Полагают, что эта делеция ставит ген *Agouti* под управление промотором гена *Raly*, что приводит к эктопической экспрессии гена *Agouti* в различных тканях, в том числе и в нервной системе [Fan и др., 1997; Miller и др., 1993]. Однако корреляция между экспрессией гена *Raly* и *Agouti*, которая могла бы экспериментально подтвердить это предположение, изучена не была. Гомозиготы по этой мутации летальны, тогда как гетерозиготы жизнеспособны и фертильны [Fan и др., 1997]. Гетерозиготы (A^Y/a) имеют желтый окрас шерсти, а также характеризуются ожирением и диабетом II типа [Bazhan и др., 2013; Boston и др., 1997; Fan и др., 1997] (Рис. 4). Причиной этого считается способность белка агути ингибировать MC4R, участвующие в регуляции общего энергообмена и пищевого поведения [Boston и др., 1997; Lu и др., 1994]. Мутация снижает функциональную активность MC4R во всех клетках организма, что, в свою очередь, приводит к повышению аппетита [Bazhan и др., 2013; Бажан и др., 2005; Макарова, 2002]. В возрасте трёх месяцев у мышей развиваются ожирение и диабет II типа, гипергликемия и гиперинсулинемия [Bazhan и др., 2013; Carroll, Voisey, Daal van, 2004; Бажан и др., 2005] (Рис. 4).

Недавно в нашей лаборатории было показано, что помимо увеличенной жировой массы (ожирения) мыши A^Y/a отличаются от однопометников дикого типа, снижением размеров передней коры головного мозга, усилением депрессивноподобного поведения в тестах принудительного плавания и подвешивания за хвост и снижением времени удержания на вращающемся стержне [Khotskin и др., 2019]. Это позволяет говорить о том, что мыши A^Y/a могут использоваться в качестве перспективной модели для изучения механизмов нарушений нервной системы и поведения, а также возможной связи ожирения и нарушений поведения [Khotskin и др., 2019].

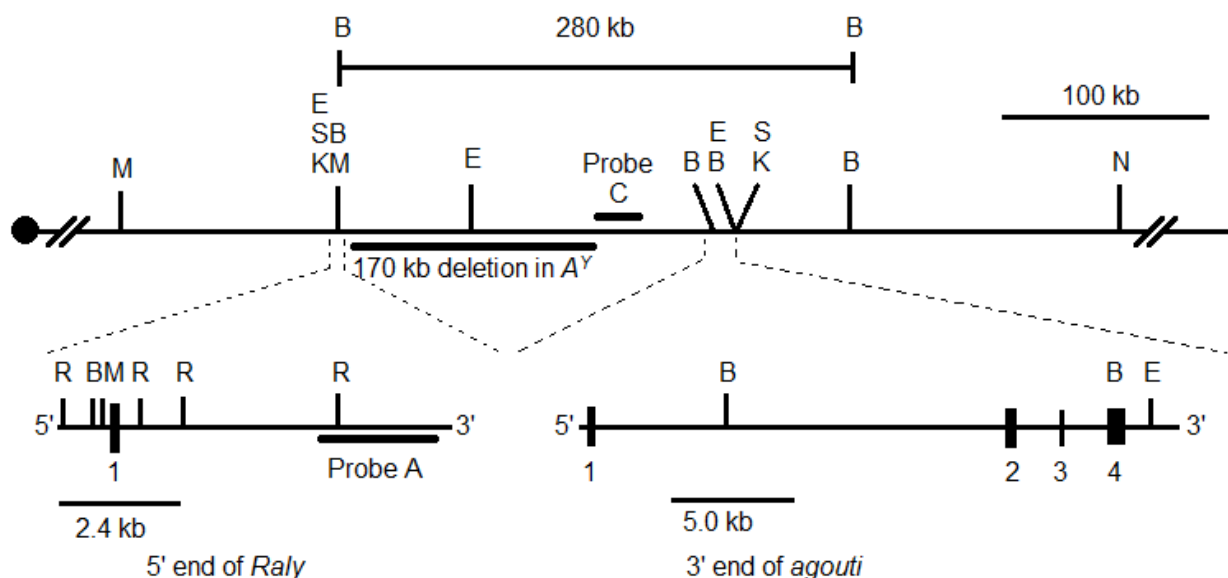


Рис. 2. Рестрикционная карта района *Raly-Agouti* в аллелях *A* и *A^Y*. Ниже карты рестрикции показаны увеличенные участки 5'-конца гена *Raly* (закрашенный блок обозначает некодирующий первый экзон) и 3'-конца гена агути (пронумерованные закрашенные прямоугольники соответствуют экзонам). Отдельные шкалы масштаба показаны для карты рестрикции и для каждой из увеличенных областей. Увеличенная область агути показана в масштабе, за исключением четырех экзонов, которые увеличены для ясности. Фрагмент *EcoRI* R размером 2,4 тысяч пар нуклеотидов, показанный на 5'-конце *Raly*, содержит остров CpG с одним или несколькими из каждого из следующих сайтов узнавания рестрикционных ферментов: *EagI* (E), *SmaI* (S), *KspI* (K), *BssHII* (B) и *MluI* (M). Все эти ферментные сайты указаны на рестрикционной карте, но в увеличенной области, из-за нехватки места, показаны только сайты *BssHII* и *MluI*. Также показаны зонды, используемые для обнаружения точек остановки делеции *A^Y* (probe A и C). Зонд C 111-пар нуклеотидов показан в укрупнённом, чем масштабе. Только сайты рестрикционных ферментов, которые вырезаются в геномной ДНК, включены в карту [Michaud и др., 1994].

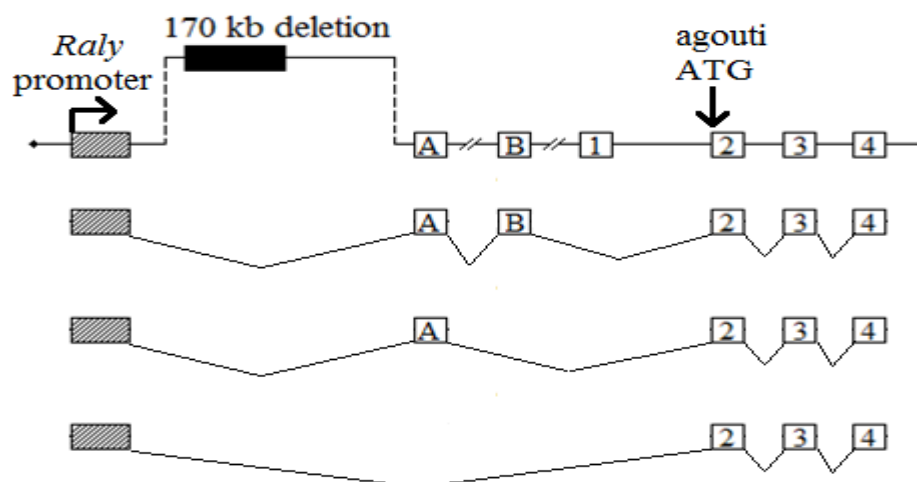


Рис. 3. Модель, демонстрирующая образование химерных транскриптов *Raly/Agouti* из аллеля *A^Y*. Из-за делеции в 170 тысяч пар нуклеотидов в аллеле *A^Y* предполагается, что инициация транскрипции у

промотора *Raly* приводит к транскрипции некодирующего первого экзона *Raly* (заштрихованный блок), межгенной последовательности и нижестоящего гена *Agouti*. Обработка этого нового первичного транскрипта может привести к присоединению донора сплайсинга первого экзона *Raly* к нижестоящим акцепторным сайтам агути. В результате будут получены транскрипты A^Y , состоящие из некодирующего первого экзона *Raly* и трёх кодирующих экзонов гена *Agouti* (экзоны 2-4) с альтернативным сплайсингом экзонов *Agouti* A и B [Michaud и др., 1993].



Рис. 4. Сравнение внешнего вида однопометников с мутацией A^Y (A^Y/a , слева) и дикого типа (a/a , справа) в возрасте трёх месяцев.

Следовало бы ожидать, что нарушения общего метаболизма, эндокринной функции (диабет типа II) и поведения, наблюдаемые у мышей с мутацией *lethal yellow*, вызваны блокадой MC4R в гипоталамусе посредством эктопически экспрессирующимся в этой структуре мозга белком агути. Однако, имеется только одна публикация, демонстрирующая уровень мРНК гена *Agouti* в мозге мышей с данной мутацией. В работе приведено лишь качественное измерение уровня мРНК в целом мозге, полученного методом Нозерн-блот, не отражающее количественно уровень интенсивности экспрессии данного гена [Miller и др., 1993]. Оставалось неизвестным экспрессируется ли ген *Agouti* в гипоталамусе или нет.

По настоящее время отсутствуют работы по исследованию влияния гена *Agouti* на общий метаболизм, а также нет исследований по количественной экспрессии данного гена в мозге мышей A^Y . Имеется только единственная публикация [Derkach и др., 2019], в которой количественно исследовали экспрессию генов *Mc3R*, *Mc4R*, *Pomc*, *LepR* в мозге мышей с мутацией *lethal yellow*, и где было показано увеличение экспрессии этих генов в гипоталамусе шестимесячных самок A^Y по сравнению с самками C57BL/6. Эти результаты выглядят странными в свете классических представлений о роли меланокортиновой системы гипоталамуса в регуляции веса, согласно которым животные с увеличенной экспрессией этих генов должны характеризоваться меньшей жировой массой.

Таким образом, для проверки противоречивых результатов наших коллег [Derkach и др., 2019] возникла необходимость количественного измерения влияния мутации *lethal yellow* на экспрессию генов *AGRP*, *Mc4R*, *Mc3R*, *Pomc* в различных структурах головного мозга мышей с мутацией *Agouti* в возрасте 6 мес. Возникла необходимость впервые наконец количественно измерить влияние мутации A^Y на экспрессию генов *Agouti* и *Raly*, а также оценить корреляции между уровнем мРНК генов *Agouti* и *Raly*.

1.3. Серотониновая система

Серотонин (5-гидрокситриптамиин, 5-НТ) – нейромедиатор, встречающийся у большинства филогенетических групп животных. 5-НТ выполняет множество разных физиологических функций в организме. Известно, что 5-НТ система модулирует когнитивные и поведенческие функции как у позвоночных, так и у беспозвоночных животных [Bacqué-Cazenave и др., 2020]. 5-НТ вовлечен в ответ организма на стресс [Bazhenova и др., 2017], иммунный ответ, регуляцию циркадных ритмов, полового и пищевого поведения, агрессии и регуляции настроения [Порова, Kulikov, 2010]. С нарушениями функционирования 5-НТ системы связаны такие психопатологии как депрессивные и тревожные расстройства, фобии и шизофрения [Kulikova, Kulikov, 2019].

Серотониновая (5-НТ) система мозга представляет собой совокупность нейронов, способных синтезировать и использовать 5-НТ в качестве основного медиатора. Основные 9 ядер В1 - В9 серотониновой системы лежат вдоль средней линии среднего и концевого мозга. Оттуда аксоны выходят по всему мозгу. От дорзальных ядер В5-В9 – в головной мозг, от вентральных В1-В4 – в спинной (Рис.5) [Hornung, 2010; Olivier, 2015]. Дорзальное ядро шва среднего мозга (В6-В7) является крупнейшим скоплением 5-НТ нейронов [Deneris, Gaspar, 2018]. Данное ядро иннервирует многие структуры мозга, например, черную субстанцию, стриатум, миндалину, пириформную кору, таламус, гиппокамп, мезо- и неокортекс [Deneris, Gaspar, 2018]. Нейроны медианного ядра шва среднего мозга (В5, В8, В9) иннервируют префронтальную и лимбическую кору, гиппокамп и гипоталамус. Ядра шва В1 – В4 в продолговатом мозге посылают аксоны в спинной мозг. 5-НТ система – наиболее широко представленная в головном мозге [Kulikova, Kulikov, 2019] (Рис. 5).

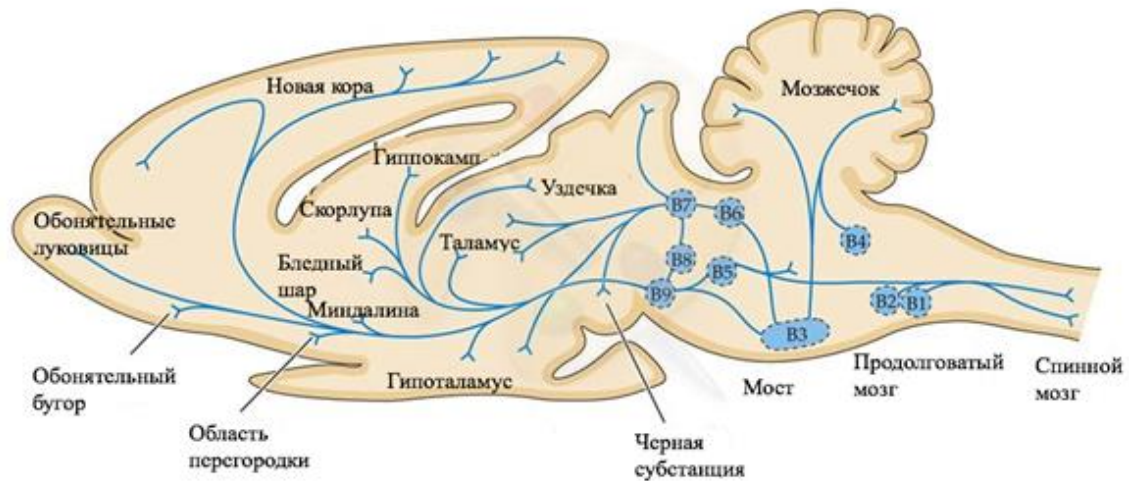


Рисунок 5. Анатомия серотониновой системы мозга (адаптировано из [Meyer, Quenzer, 2019]).

В организме 5-НТ синтезируется из незаменимой аминокислоты L-триптофана. Синтез 5-НТ проходит в две стадии: первая - гидроксирование L-триптофана до L-5-гидрокситриптофана (5-НТР) и вторая – декарбоксилирование 5-НТР до 5-НТ (Рис.6). Первая и она же ключевая стадия синтеза 5-НТ в мозге млекопитающих катализируется ферментом триптофангидроксилазой 2 (ТПГ2) [Walther и др., 2003]. Действительно, нокаут гена *Tph2* [Alenina и др., 2009; Gutknecht и др., 2008; Mosienko и др., 2015; Savelieva и др., 2008], а также блокада фермента п-хлорофенилаланином [Cervo и др., 2005; Guzzetti и др., 2008; Kulikov и др., 2012] катастрофически снижает уровень 5-НТ в мозге мышей.

Мутации в гене *TPH2* человека ассоциированы с рядом тяжелых психопатологий [Matthes и др., 2010; McKinney и др., 2009; Ottenhof и др., 2018; Popova, Kulikov, 2010; Zhang и др., 2005]. Наиболее изучена чрезвычайно редкая мутация *G1463A*, которая ассоциирована с тяжелой формой устойчивой к антидепрессантам униполярной депрессии [Zhang и др., 2005].

В настоящее время в разных лабораториях получены мыши с нокаутом гена *Tph2* [Mosienko и др., 2015]. Хотя все эти нокаутные мыши характеризуются отсутствием белка ТПГ2 и сниженным уровнем 5-НТ в мозге, данные о влиянии нокаута на физиологические функции и поведение мышей крайне противоречивы [Kulikova, Kulikov, 2019]. Некоторые исследователи отмечают снижение скорости развития у нокаутных мышей: масса тела новорожденных мышат с нокаутом гена *Tph2* значительно меньше, чем у мышат дикого типа. С возрастом разница в массе выравнивается [Alenina и др., 2009; Gutknecht и др., 2012; Kane и др., 2012; Migliarini и др., 2013]. Однако, другие исследователи не отмечают какого-либо снижения массы тела у нокаутных мышей [Liu и др., 2011; Yadav и др., 2009]. Отмечено также снижение массы тела у взрослых мышей с нокаутом гена *Tph2* [Savelieva и др., 2008]. Однако другие авторы это не подтверждают [Kulikova, Kulikov, 2019; Mosienko и др., 2015]. Некоторые авторы отмечают увеличение времени

сна, снижение кровяного давления, частоты дыхания и сердечных сокращений у нокаутных мышей [Alenina и др., 2009]. В то же время нокаут гена *Tph2*, по-видимому, не влияет на двигательную активность и тревожность в тесте открытое поле [Savelieva и др., 2008]. Данные о влиянии нокаута гена *Tph2* на депрессивно-подобную неподвижность в тесте принудительное плавание крайне противоречивы: одни авторы демонстрируют увеличение [Mosienko и др., 2012], другие авторы, наоборот, снижение [Savelieva и др., 2008] выраженности неподвижности у нокаутных мышей. Некоторые авторы отмечают у нокаутных мышей увеличение обсессивно-компульсивного поведения в тесте закапывания шариков [Alenina и др., 2009] и выраженности межсамцовой агрессии [Mosienko и др., 2012].

Были созданы также мыши с мутацией *G1449A*, которая является гомологом мутации *G1463A* в гене *TPH2* человека [Beaulieu и др., 2008]. Мыши гомозиготные по данной мутации характеризуются снижением уровня 5-НТ в их мозге до 20% от нормы, увеличением тревожности, депрессивно-подобной неподвижности в тесте подвешивания за хвост и межсамцовой агрессии [Beaulieu и др., 2008]. Однако эта мутация не влияет на двигательную активность в тесте открытое поле [Beaulieu и др., 2008].

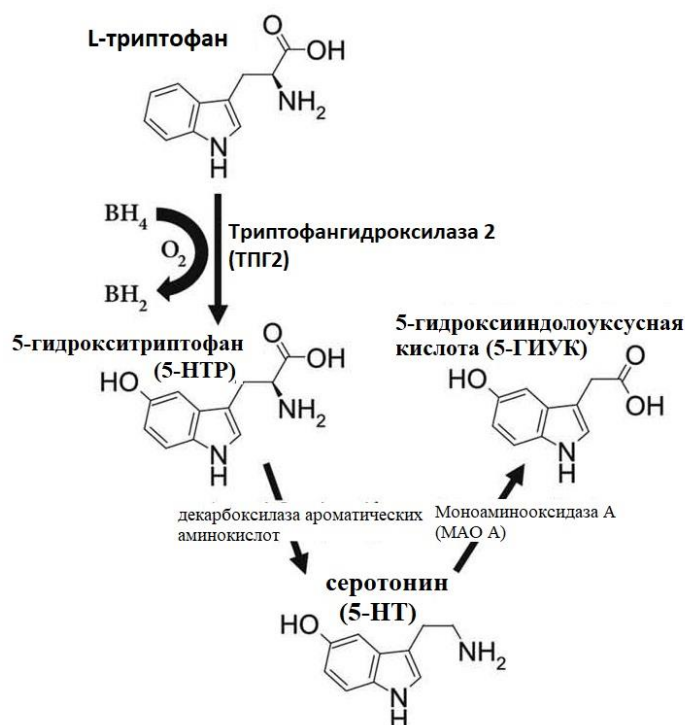


Рис. 6 Схема метаболизма серотонина (Kulikova & Kulikov, 2019)

Синтезированный 5-НТ депонируется в везикулы, которые транспортируются в окончания и высвобождаются в синаптическую щель Ca^{2+} зависимым экзоцитозом при деполяризации окончаний [Kulikova, Kulikov, 2019].

Действие 5-НТ опосредованно различными рецепторами. У млекопитающих известны 14 подтипов серотониновых рецепторов, которые организованы в 7 семейств. Эти рецепторы сопряжены с различными внутриклеточными механизмами сигнальной трансдукции (Табл. 2). 5-НТ_{1А} и 5-НТ_{2А} рецепторы – одни из наиболее изученных, сопряжены с G_i и G_q белками, соответственно. 5-НТ_{1А} рецепторы – самые распространенные и широко экспрессируемые серотониновые рецепторы в головном мозге [Albert, Vahid-Ansari, 2019]. 5-НТ_{1А} рецепторы подразделяются на два функциональных подтипа: пресинаптические ауторецепторы, расположенные на дендритах и телах 5-НТ нейронов в ядрах шва, и постсинаптические гетерорецепторы. 5-НТ_{1А} ауторецепторы регулируют активность серотонинэргической системы по принципу отрицательной обратной связи. Их агонист, буспирон, является клиническим анксиолитиком. 5-НТ_{1А} гетерорецепторы локализованы в таких отделах головного мозга как гиппокамп, миндалина и префронтальная кора, где они регулируют когнитивные функции и ответ организма на страх, стресс, тревогу и депрессию [Albert, Vahid-Ansari, 2019].

5-НТ_{2А} рецепторы встречаются повсеместно в ЦНС, но наибольшая их плотность обнаруживается в кортикальных областях, частях лимбической системы (миндалине и гиппокампе), а также в базальных ганглиях [Wischhof, Koch, 2016]. Большинство 5-НТ_{2А} рецепторов располагаются постсинаптически. Агонисты 5-НТ_{2А} рецепторов, такие как 2,5-диметокси-4-йодамфетамин (DOI) и диэтиламид D-лизергиновой кислоты (LSD-25), вызывают бред и галлюцинации. Увеличение плотности 5-НТ_{2А} рецепторов в коре отмечено при посмертных исследованиях у лиц, страдавших депрессией и покончивших жизнь самоубийством [Nutt, 2015].

Таблица 2. Основные типы 5-НТ рецепторов [Pytliak и др., 2011].

Надсемейство	Тип	Сопряжение	Система трансдукции	Подтипы
Рецепторы, сопряжённые с G- белком	5-НТ ₁	G _i	↓ аденилатциклазы	5-НТ _{1А} , 5-НТ _{1В/1Dβ} , 5-НТ _{1Dα} , 5-НТ _{1Е} , 5-НТ _{1F}
	5-НТ ₅			5-НТ _{5А} , 5-НТ _{5В}
	5-НТ ₂	G _q	↑ фосфолипазы C	5-НТ _{2А} , 5-НТ _{2В} , 5-НТ _{2С}
	5-НТ ₄ , 5-НТ ₆ , 5-НТ ₇	G _s	↑ аденилатциклазы	
Лиганд-активируемые ионные каналы	5-НТ ₃	—	Na ⁺ каналы	

↓ – ингибирование; ↑ – активирование.

Медиатор удаляется из синаптической щели с помощью белка-транспортера (5-НТТ), который захватывает 5-НТ в синаптической щели и переносит против градиента концентрации внутрь 5-НТ нейрона. Захваченный медиатор вновь депонируется в везикулы или же разрушается с помощью окислительного дезаминирования до 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-НИАА), катализируемого ферментом моноаминоксидазой А (МАО-А) в присутствии кислорода. Многие из клинически эффективных антидепрессантов являются ингибиторами 5-НТТ (флуоксетин, пароксетин, циталопрам) и МАО-А (депренил) [Kulikova, Kulikov, 2019].

1.4. Полиморфизм с.1473C>G в гене *Tph2* мыши

Был выявлен полиморфизм по активности ТПГ в головном мозге среди лабораторных мышей разных линий. Все исследованные линии мышей по данному признаку были разделены на 2 группы с низкой и высокой активностью фермента в их мозге. Более того было показано, что это различие в активности ТПГ наследуется как моногенный признак с неполным доминированием [Куликов, Попова, 1983]. Позже, когда было показано, что в мозге экспрессируется ТПГ2 (Walther et al., 2003), было проведено секвенирование гена *Tph2* у мышей *C57BL/6* с высокой и *Balb/c* с низкой активностью ТПГ2 и был обнаружен полиморфизм с.1473C>G, приводящий к замене *P447R* в молекуле белка. Причем мыши *C57BL/6* (высокая активность) были гомозиготны по *C* аллели, тогда как мыши *Balb/c* (низкая активность) были гомозиготны по *G* аллели [Zhang и др., 2004]. Далее было показано, что этот полиморфизм является основным генетическим фактором, определяющим активность ТПГ2 в головном мозге лабораторных мышей [Kulikov и др., 2005; Куликов, Осипова, Попова, 2007]. Однако молекулярный механизм снижения активности ТПГ2, вызванной заменой *P447R* в молекуле фермента, не был ясен.

Было показано, что аллель *G*, снижающая активность фермента, отсутствует в природных популяциях мыши и был сделан вывод, что против этой аллели идет естественный отбор [Osipova и др., 2010]. Однако характер вызываемых аллелью *G* нарушения физиологических функций и поведения и приводящих к элиминации носителей данной аллели в природных популяциях оставался неясным. Была показана ассоциация *G* аллели со сниженной интенсивностью агрессивных атак у самцов мышей [Kulikov и др., 2005]. Аллель *G* была перенесена в геном линии *C57BL/6* и получены две конгенные линии мышей *B6-1473C* и *B6-1473G*, имеющие один и тот же генетический фон и различающиеся только аллелями *C* и *G*, соответственно [Koshimizu и др., 2019; Osipova, Kulikov, Popova, 2009; Siesser и др., 2010].

Было показано, что данные линии не различаются по уровню 5-НТ в мозге, но у мышей *B6-1473G* наблюдалось снижение уровня 5-НИАА в гиппокампе по сравнению с животными *B6-1473C* [Bazhenova и др., 2017; Bazhenova и др., 2019; Siesser и др., 2010]. В ранних исследованиях

было показано снижение интенсивности межсамцовой агрессии у самцов *B6-1473G* по сравнению с самцами *B6-1473C* [Osipova, Kulikov, Popova, 2009] однако это не было подтверждено в последующих работах [Bazhenova и др., 2017]. В ранней работе было показано снижение времени депрессивно-подобного замирания у мышей *B6-1473G* по сравнению с мышами *B6-1473C* [Osipova, Kulikov, Popova, 2009]. Однако в более поздней работе было показано наоборот увеличение время депрессивно-подобной неподвижности у мышей *B6-1473G* по сравнению с мышами *B6-1473C* [Bazhenova и др., 2019].

Японские исследователи провели сравнение мышей двух конгенных линий *B6-1473C* и *B6-1473G* по большому числу физиологических и поведенческих показателей и не выявили различий ни по одному из них [Koshimizu и др., 2019] (Табл. 3).

Таблица 3. Выраженность физиологических и поведенческих показателей у мышей конгенных линий *B6-1473C* и *B6-1473G* [Koshimizu и др., 2019].

			Эффект генотипа	
Тест	<i>1473G</i> (n=7)	<i>1473C</i> (n=7)	F-value	P-value
Физические характеристики				
Вес (г)	31.743 (±0.566)	31.786 (±0.635)	$F_{1,12} = 0.003$	0.9606
Температура тела (°C)	37.100 (±0.298)	37.299 (±0.252)	$F_{1,12} = 0.109$	0.7474
Неврологическое обследование и тест на нервно-мышечную силу				
Сила хвата (Н)	0.893 (±0.037)	0.929 (±0.054)	$F_{1,12} = 0.295$	0.5968
Продолжительность удержания на тросе (% падения в течение 60 секунд)	48.143 (±5.230)	52.000 (±6.904)	$F_{1,12} = 0.198$	0.664
Тест «Вращающийся стержень»				
Время удержания на стержне (с)	148.143 (±17.358)	179.452 (±11.009)	$F_{1,12} = 2.32$	0.1536
Тест «Горячая пластина»				
Продолжительность нахождения на горячей пластине	3.014 (±0.122)	3.457 (±0.473)	$F_{1,12} = 0.822$	0.3826
Анализ походки				
Ширина стойки				
Передние лапы	1.421 (±0.041)	1.357 (±0.048)	$F_{1,12} = 1.043$	0.3273
Задние лапы	2.029 (±0.036)	1.900 (±0.038)	$F_{1,12} = 6.075$	0.0298
Угол шага (°)				
Передние лапы	68.914 (±2.171)	59.900 (±3.393)	$F_{1,12} = 5.008$	0.045

Задние лапы	49.850 (±3.301)	60.343 (±5.215)	$F_{1,12} = 2.891$	0.1148
Тест «Подвешивание за хвост»				
Время неподвижности (%)	28.901 (±7.352)	14.549 (±2.925)	$F_{1,12} = 3.29$	0.0948
Тест «Принудительное плавание»				
Время неподвижности (%)				
День первый	57.28 (±3.447)	56.667 (±2.559)	$F_{1,12} = 0.02$	0.8889
День второй	62.839 (±5.179)	58.45 (±5.755)	$F_{1,12} = 0.321$	0.5813
Пройденный путь (см)				
День первый	83.629 (±3.431)	87.823 (±3.525)	$F_{1,12} = 0.727$	0.4106
День второй	68.351 (±4.33)	83.61 (±6.752)	$F_{1,12} = 3.619$	0.0814
Тест «Открытое поле»				
Пройденный путь (см)	571.798 (±83.344)	623.577 (±55.978)	$F_{1,12} = 0.266$	0.6154
Количество вертикальных стоек	61.905 (±7.868)	72.232 (±5.937)	$F_{1,12} = 1.098$	0.3154
Время, проведённое в центре (с)	52.904 (±10.598)	41.015 (±5.684)	$F_{1,12} = 0.977$	0.3424
Количество актов стереотипного поведения	653.768 (±48.016)	621.137 (±66.817)	$F_{1,12} = 0.157$	0.6986
Тест перехода между тёмной и светлой камерами				
Продолжительность пребывания в светлой камере (с)	193.929 (±18.927)	190.143 (±14.931)	$F_{1,12} = 0.025$	0.8778
Количество переходов	20.571 (±3.108)	21.429 (±1.837)	$F_{1,12} = 0.056$	0.8163
Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»				
Количество заходов в открытые рукава установки по сравнению с общим количеством заходов во все рукава (%)	30.292 (±3.696)	31.19 (±4.417)	$F_{1,12} = 0.024$	0.8787
Продолжительность пребывания в открытых рукавах (%)	13.667 (±3.321)	13.69 (±2.641)	$F_{1,12} < 0.0001$	0.9956
Тест социального взаимодействия				
Общая продолжительность контакта (с)	75.333 (±5.487)	69.333 (±8.098)	$F_{1,4} = 0.376$	0.5728
Количество контактов	55.667 (±8.511)	56.333 (±2.028)	$F_{1,4} = 0.006$	0.9429
Общая продолжительность активных контактов (с)	17.567 (±2.969)	17.567 (±0.696)	$F_{1,4} = 0$	1
Средняя продолжительность одного контакта (с)	1.433 (±0.145)	1.233 (±0.133)	$F_{1,4} = 1.029$	0.3679

Пройденный путь (см)	3847.5 (±268.099)	430.667 (±317.643)	$F_{1,4} = 1.968$	0.2333
Тест на общительность и предпочтение социальной новизны				
Тест на общительность				
Время, проведённое в пустом отсеке (с)	97.571 (±13.811)	95.0 (±10.207)	$F_{1,12} = 0.022$	0.8835
Время, проведённое в отсеке с интродером (с)	143.143 (±20.036)	123.286 (±13.852)	$F_{1,12} = 0.665$	0.4308
Тест на предпочтение социальной новизны				
Время, проведённое в знакомом отсеке камеры (с)	127.714 (±20.757)	121.429 (±20.903)	$F_{1,12} = 0.046$	0.8346
Время, проведённое в отсеке с интродером (с)	152.571 (±20.752)	135.143 (±17.07)	$F_{1,12} = 0.421$	0.5288
Тест испуга/предымпурсового ингибирования реакции испуга				
Громкость звукового сигнала, вызывающая реакцию испуга				
110 дБ	0.614 (±0.077)	0.844 (±0.203)	$F_{1,12} = 0.842$	0.377
120 дБ	1.219 (±0.215)	1.397 (±0.158)		
Предымпурсовое подавление (%) (громкость предымпурсового звука/громкость звука, вызывающая реакцию испуга)				
74/110 дБ	28.393 (±14.088)	28.81 (±11.223)	$F_{1,12} = 0.099$	0.7579
78/110 дБ	48.843 (±10.047)	35.283 (±28.902)		
74/120 дБ	21.15 (±8.938)	10.787 (±10.207)	$F_{1,12} = 0.805$	0.3873
78/120 дБ	47.225 (±9.853)	34.074 (±13.286)		
Тест на формирование условного рефлекса страха				
Продолжительность подвергания животного воздействию низких температур (%)				
Продолжительность формирования условного рефлекса	27.229 (±3.602)	26.452 (±4.429)	$F_{1,12} = 0.019$	0.894
Контекстуальное тестирование	26.514 (±8.652)	34.697 (±7.528)	$F_{1,12} = 0.509$	0.4892
Тестирование с подсказками в изменённых условиях	58.331 (±4.568)	54.807 (±3.57)	$F_{1,12} = 0.369$	0.5546

Таким образом, характер влияния аллели *G* на физиологические и поведенческие характеристики мышей оставался не выясненным.

1.5. Взаимодействие меланокортиновой и 5-НТ систем мозга.

Поскольку и серотониновая и меланокортиновая системы вовлечены в регуляцию пищевого поведения, имеются данные об их взаимосвязи в этой области. Так фармакологические препараты, усиливающие активность 5-НТ системы подавляют аппетит и способствуют потере массы тела [Berglund и др., 2013]. Также было показано, что мыши с избыточной экспрессией транспортера серотонина легче и ниже ростом, чем их дикие сородичи [Pringle и др., 2008], в то время как у мышей с нокаутом транспортера серотонина развивается ожирение с поздним началом без гиперфагии [Murphy, Lesch, 2008]. У мышей со сниженной активностью триптофангидроксилазы наблюдается задержка роста и физиологическая дисфункция [Alenina и др., 2009; Savelieva и др., 2008; Yadav и др., 2009], что демонстрирует важность адекватной серотонинергической сигнализации для нормального развития.

Существует ряд свидетельств, который указывает на то, что серотониновая система способна влиять на поддержание энергетического баланса организма, посредством регуляции активности меланокортиновой системы. Так серотонинергические терминалы образуют синаптические контакты с нейронами дугообразного ядра гипоталамуса, продуцирующими проопиомеланокортин и агути-подобный пептид [Heisler и др., 2006; Kiss, L  r  n  th, Halász, 1984], что указывает на анатомическое расположение серотониновой системы, позволяющее ей влиять на активность меланокортиновых нейронов (Рис. 7). Это может быть достигнуто посредством воздействия на 5-НТ2С-рецепторы, которые экспрессируются на нейронах, синтезирующих проопиомеланокортин, и на 5-НТ1В-рецепторы, которые экспрессируются на нейронах, продуцирующих агути-подобный пептид [Heisler и др., 2002; Heisler и др., 2006; Lam и др., 2008].

Различные исследования с использованием фармакологических методов как *in vivo*, так и *in vitro*, а также генетические данные подтверждают функциональную значимость в воздействии серотонина на энергетический баланс 5-НТ2С рецепторов, экспрессируемых совместно с РОМС-нейронами. Так было показано, что агонисты данных рецепторов влияют как на экспрессию гена проопиомеланокортина, так и на его активность. Например, недельная подкожная инфузия BVT.X (агониста рецептора 5-НТ2С) увеличивала экспрессию мРНК гена проопиомеланокортина в дугообразном ядре гипоталамуса дозозависимым образом [Lam и др., 2008]. Острое введение анорексических концентраций дексфенфлурамина или метаклорфенилпиперазина (mCPP) дозозависимо увеличивало иммунореактивность c-FOS, маркера нейрональной активации, в РОМС-нейронах проопиомеланокортина дугообразного ядра гипоталамуса [Heisler и др., 2002]. Функциональное значение проопиомеланокортиновых нейронов в воздействии серотонина на энергетический баланс было исследовано на мышах, лишенных 5-НТ2С-рецепторов. У этих животных фенотипическое проявление нарушенного энергетического баланса было нормализовано путем повторной экспрессии 5-НТ2С-рецепторов

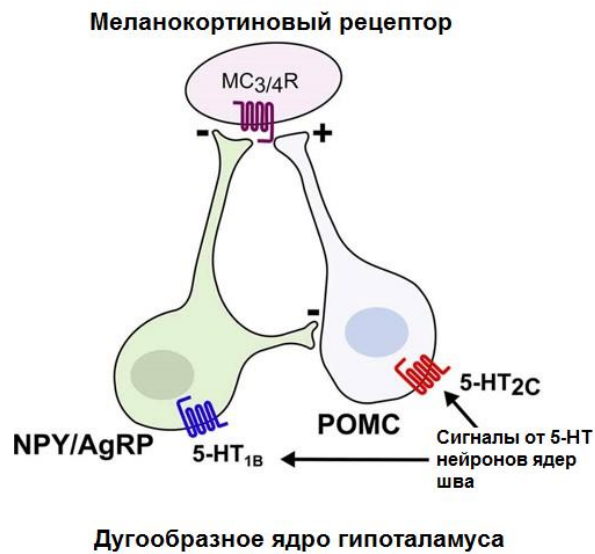
исключительно в POMC-нейронах [Ху и др., 2008]. В совокупности эти исследования показывают, что серотонинергические соединения влияют на активность нейронов, продуцирующих проопиомеланокортин, и что стимулирование данных нейронов, достаточно для того, чтобы серотонин, через Gq-связанные 5-HT_{2C} - рецепторы, влиял на энергетический баланс.

Нейроны, продуцирующие агути-подобный пептид, также получают синаптические сигналы от серотониновых нейронов (Рис.7) и совместно экспрессируют 5-HT_{1B} рецепторы [Heisler и др., 2006]. В соответствии с этой анатомической локализацией, серотонин и агонисты 5-HT_{1B} рецепторов влияют на активность нейронов, продуцирующих агути-подобный пептид. В частности, введение серотонина или агониста 5-HT_{1B} рецептора 5-пропокси-3-(1,2,3,6-тетрагидро-4-пиридинил)-1Н-пирроло[3,2-*b*]пиридин гидрохлорида (CP94253) гиперполяризует клетки, продуцирующие AGRP, эффект, который может быть заблокирован антагонистом 5-HT_{1B} рецептора. Интересно, что CP94253 и другой селективный агонист 5-HT_{1B} рецепторов, 1,4-дигидро-3-(1,2,3,6-тетрагидро-4-пиридинил)-5Н-пиррол[3,2-*b*]пиридин-5-он дигидрохлорид (CP93129), также уменьшают количество тормозных сигналов, получаемых проопиомеланокортиновыми нейронами дугообразного ядра гипоталамуса [Heisler и др., 2006]. В совокупности эти данные предполагают, что эндогенная активация 5-HT_{1B} рецепторов может усиливать активность меланокортиновой системы двумя способами. Во-первых, серотонин, воздействуя на постсинаптические 5-HT_{1B} рецепторы, расположенные на нейронах, продуцирующих агути-подобный пептид, может снижать вероятность высвобождения данного белка. Во-вторых, воздействуя на гетерорецепторы 5-HT_{1B}, расположенные на ГАМКергических терминалах, серотонин может уменьшить локальное ингибирующее воздействие на POMC-нейроны, исходящее от AGRP-нейронов (Рис.7). Предположительно, совокупный эффект этих действий заключается в увеличении высвобождения альфа-меланоцитстимулирующего гормона вместе со снижением высвобождения агути-подобного пептида, что уменьшает конкурентный антагонизм в клетках-мишенях, экспрессирующих рецепторы меланокортина 3 и 4.

Функциональная значимость меланокортинового пути в воздействии серотонина на энергетический баланс также оценивалась посредством фармакологической, а также генетической инактивации меланокортиновых рецепторов. В частности, анорексические эффекты дексфенфлурамина ослабляются у мышей и крыс агути, предварительно обработанных антагонистом меланокортиновых рецепторов 3/4 Ac-Nle-цикло(-Asp-His-D-2-Nal-Arg-Trp-Lys)-NH₂ (SHU9119) [Heisler и др., 2002; Heisler и др., 2006]. Этот эффект, по-видимому, опосредуется через рецептор меланокортина 4, поскольку вызванная дексфенфлурамином гипофагия у мышей с дефицитом рецептора меланокортина 3 была сопоставима с той, которая наблюдалась у мышей

дикого типа, тогда как дексфенфлурамин был неэффективен в снижении аппетита у мышей с нокаутом рецептора меланокортина 4 [Heisler и др., 2006]. Дальнейшие исследования показали, что в основе этих эффектов лежат рецепторы меланокортина 4, экспрессируемые на нейронах SIM1 [Xu и др., 2010]. В частности, у мышей с нокаутом рецептора меланокортина 4 селективная реэкспрессия этих рецепторов в нейронах SIM1 восстанавливает анорексическую эффективность дексфенфлурамина. Последовательные данные о том, что для снижения потребления пищи под действием дексфенфлурамина необходимы функциональные рецепторы меланокортина 4, указывают на то, что этот путь является критически важным медиатором анорексического действия серотонина и его негативного влияния на энергетический баланс.

А)



Б)

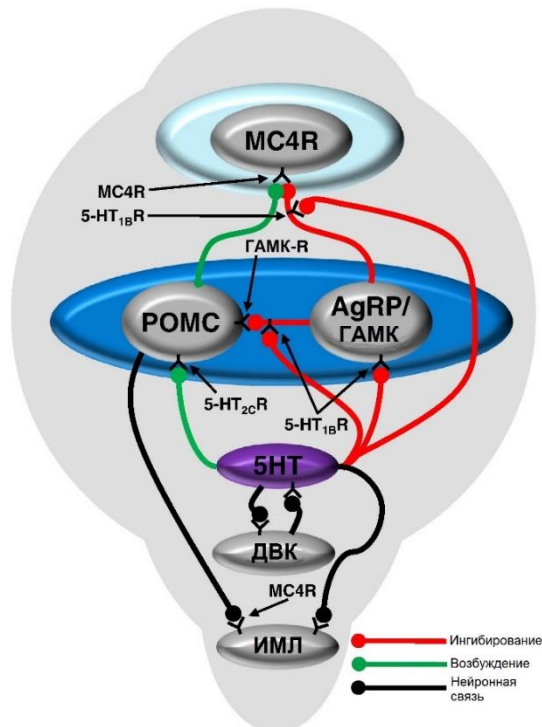


Рис. 7 Предполагаемые нейронные связи между серотониновой и меланокортиновой системами. (адаптировано из: А – [Wyler и др., 2017]; Б – [Marston, Garfield, Heisler, 2011]). ГАМК – гамма-

аминомасляная кислота, ДВК – дорзальное ядро блуждающего нерва (дорзальный вагальный комплекс), ИМЛ – интрамедиолатеральное ядро

Показано, что у грызунов данные эффекты осуществляются в гипоталамусе через меланокортиновую систему. Агонисты 5-HT₂ рецепторов активируют POMC-нейроны (через 5-HT_{2C} рецепторы) дугообразного ядра гипоталамуса и нейроны, синтезирующие агути-подобный пептид (через 5-HT_{1B}) [Marston, Heisler, 2009]. 5-HT_{2C} рецепторы экспрессируются на POMC-нейронах. Также, гипофагия, вызванная серотониновыми препаратами, ослабляется блокадой меланокортиновых рецепторов 3 и 4 типа [Heisler и др., 2003]. Таким образом 5-HT система регулирует активность меланокортиновой системы.

В дополнение к регуляции аппетита и потребления энергии, центральный серотонин также участвует в увеличении расхода энергии. Было показано [Morrison, Madden, Turone, 2014], что серотонин увеличивает расход энергии за счет усиления симпатической иннервации бурой жировой ткани (БурЖТ). Это увеличение расхода энергии серотонином может быть опосредовано активацией серотониновых рецепторов 1A и 7 в интермедиолатеральном ядре спинного мозга [Madden, Morrison, 2006; Madden, Morrison, 2010]. Важно отметить, что обеспечение более свободной центральной сигнализации серотонина в мозге приводит к утрате терморегуляции из-за снижения содержания разобщающего белка 1 (Ucp1) как в БурЖТ, так и в паховой белой жировой ткани (БелЖТ) [McGlashon и др., 2015]. Несмотря на описанные роли центрального серотонина в стимуляции расхода энергии, мыши, у которых отсутствует синтез центрального серотонина из-за снижения ТПГ2, характеризуются худобой и демонстрируют повышенный расход энергии [Gutknecht и др., 2012; Yadav и др., 2009]. Эти данные могут показаться удивительными, так как отсутствие центрального серотонина, как можно было бы ожидать, приводит к снижению расхода энергии, как если бы он был критическим для модуляции симпатического тонуса.

Ранее было показано, что мутация *lethal yellow* не влияет на уровень и метаболизм 5-HT в головном мозге мышей. Однако влияние данной мутации на активность ТПГ2 и экспрессию генов ферментов, транспортера и рецепторов 5-HT, а также влияние мутации *C1473G* на экспрессию генов *Agouti*, *Agrp*, *Pomc*, *Mc3r*, *Mc4r* в мозге исследовано не было.

Таким образом, к началу исследования было известно, что мутация *lethal yellow* вызывает ожирение, диабет 2 типа [Boston и др., 1997]. Было предположен следующий механизм ожирения: (1) мутация *lethal yellow* ставит ген *Agouti* под управление промотором гена *Raly*, (2) это вызывает эктопическую экспрессию гена *Agouti* и накопление белка агути в различных тканях, в том числе и гипоталамусе, (3) в гипоталамусе белок агути ингибирует MC3R и MC4R рецепторы и вызывает гиперфагию и снижает трату энергии, что, в свою очередь, приводит к накоплению жировой массы [Boston и др., 1997]. Первое предположение может быть проверено

демонстрацией корреляции между уровнем мРНК генов *Agouti* и *Raly*. Для проверки второго предположения необходимо прежде всего показать экспрессию гена *Agouti* и/или белка агуты в гипоталамусе. Наконец, для проверки третьего предположения необходимо сравнить потребление пищи и расход энергии у мышей *C57BL/6* и *C57BL/6-A^Y*. Однако данные эксперименты проведены не были.

Несмотря на то, что мыши с дефицитом ТПГ2 элиминируются в природных популяциях [Osipova и др., 2010], в настоящее время не имеется однозначных экспериментальных доказательств связи дефицита этого фермента с нарушениями поведения [Kulikova, Kulikov, 2019]. Следует отметить, что все исследования проводились в рамках стандартной батареи тестов, предназначенной для скрининга анксиолитиков и антидепрессантов, и которая не исчерпывает все формы поведения. Наконец, наличие мутаций, нарушающих меланокортиновую (A^Y) и 5-НТ (*c.1473C>G*) системы, создает уникальную возможность исследовать взаимодействие между этими системами в формировании патологических форм поведения. Для этого необходимо получить мышей, сочетающих эти две мутации.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Животные и эксперименты

Исследование проводили в ЦКП «SPF-виварий ИЦиГ СО РАН» на мышах свободных от патогенов на протяжении всего исследования, в строгом соответствии с рекомендациями директивы 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета от 22 сентября 2010 года о защите животных, используемых в научных целях. Исследование было одобрено комитетом по этике экспериментов на животных Российского национального центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН. Животных содержали в индивидуально вентилируемых клетках (Optimice) при фотопериоде 14 ч дня/10 ч ночи, температуре 23°C и влажности 60%. Полноценный стандартный корм и вода предоставлялись без ограничений. Все процедуры, выполненные с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям межинститутской биоэтической комиссией Института Цитологии и Генетики СО РАН, протокол 23.11.2021 №108.

Эксперимент 1. Сравнение уровня мРНК генов *Agouti*, *Raly*, *Pomc*, *Agrp*, *Mc3r*, *Mc4r* в структурах мозга мышей генотипов *C57BL/6-aa* и *C57BL/6-A^Ya*. Эксперимент проводился самцах (*C57BL/6-aa*, n=8; *C57BL/6-A^Ya*, n=8) и самках (*C57BL/6-aa*, n=8; *C57BL/6-A^Ya*, n=8) в возрасте 6 мес. Выбор этого возраста, а также самок, был обусловлен необходимостью сравнения с единственно имеющимися данными по экспрессии генов *Pomc*, *Agrp*, *Mc3r*, *Mc4r*, полученными на самках этого возраста [Derkach и др., 2019]. Животных усыпляли CO₂, декапитировали, выделяли фронтальную кору, гиппокамп и гипоталамус. Отделы мозга хранили при -80°C до выделения РНК. Результаты этого эксперимента позволяют экспериментально показать (1) связь экспрессии генов *Agouti* и *Raly*, (2) экспрессию гена *Agouti* в гипоталамусе и (3) проверить обнаруженное Derkach с соавторами [Derkach и др., 2019] увеличение экспрессии генов *Pomc*, *Mc3r*, *Mc4r* в мозге мышей с мутацией *A^Y*.

Эксперимент 2. Сравнение суточной динамики двигательной активности, потребления пищи, O₂, выделения CO₂ и траты энергии у мышей генотипов *C57BL/6-aa* и *C57BL/6-A^Ya*. Эксперименты проводились на 3 месячных самцах мышей генотипов *C57BL/6-aa* (n=12) и *C57BL/6-A^Ya* (n=12) с использованием калориметрического модуля PhenoMaster (TSE, Германия). Результаты этого эксперимента позволяют экспериментально оценить влияние мутации *A^Y* на суточную динамику двигательной активности, потребления пищи и траты энергии.

В экспериментах 1 и 2 использовались мыши, полученные скрещиванием *C57BL/6* на *C57BL/6-A^Y*, имеющие один и тот же генетический фон и различающиеся только отсутствием/наличием мутации.

Эксперимент 3. Влияние взаимодействия мутации A^Y и полиморфизма $c.1473C>G$ на меланокортиновую и 5-НТ системы мозга и поведение мышей. Для этого были получены конгенные мыши генотипов $B6-1473CC/aa$ ($n = 8$), $B6-1473CC/A^Ya$ ($n = 8$), $B6-1473GG/aa$ ($n=8$), $B6-1473GG/A^Ya$ ($n=8$), имеющие один и тот же генетический фон и различающиеся только комбинацией исследуемых аллелей. В эксперименте использовали самцов мышей этих генотипов в возрасте 3 мес. Поведение животных последовательно изучали в тестах «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт», «принудительное плавание» и «подвешивание за хвост». Через 48 ч после последнего теста животных усыпляли CO_2 , декапитировали, выделяли кору, стриатум, гиппокамп, средний мозг и гипоталамус. Отделы мозга хранили при $-80^\circ C$ до определения уровня 5-НТ, 5-Н1АА, активности ТПГ2 и экспрессии генов. Результаты этого эксперимента позволяют выявить взаимное влияние данных мутаций на 5-НТ, меланокортиновую системы мозга и на выраженность нарушений поведения, вызванных этими мутациями.

2.2 Получение генотипов $B6-1473CC/aa$, $B6-1473CC/A^Ya$, $B6-1473GG/aa$ и $B6-1473GG/A^Ya$

Получение необходимых генотипов проводилось в два этапа. На первом этапе самок $B6-1473CG/aa$ скрещивали с самцами $B6-1473CC/A^Ya$ с целью получения мышей с генотипом $B6-1473CG/A^Ya$ (A^YaCG). Первое поколение мышей также включало в себя особей с генотипами $B6-1473CC/aa$ ($aaCC$), $B6-1473CG/aa$ ($aaCG$) и $B6-1473CC/A^Ya$ (A^YaCC). На втором этапе самок $aaGG$ скрещивали с самцами $B6-1473CG/A^Ya$ (A^YaCG), полученными на первом этапе, для получения мышей с генотипами $B6-1473GG/aa$ ($aaGG$) и $B6-1473GG/A^Ya$ (A^YaGG). Мыши $B6-1473CC/aa$, $B6-1473CC/A^Ya$, $B6-1473GG/aa$ и $B6-1473GG/A^Ya$, использованные в этом эксперименте, имеют схожий генетический фон ($C57BL/6$) и отличаются только аллелями $1473C$, $1473G$, a и A^Y . Генотипы a/a и A^Y/a были фенотипированы по цвету их меха, который был желтым у мышей A^Y/a и чёрным у мышей a/a . Аллели $1473C$ и $1473G$ были генотипированы с помощью ПЦР с аллель-специфическими праймерами.

После отсадки детёнышей от матерей самцов одного генотипа содержали группами по четыре особи в клетке (Optimice, Animal Care Systems, Inc., Centennial, CO, USA) при температуре $24 \pm 2^\circ C$, влажности 45–50% и искусственном фотопериоде 14:10 (день/ночь) с рассветом и закатом в 01:00 и 15:00 соответственно. Мышей кормили стерильной пищей и водой *ad libitum*. Мышей тестировали в возрасте 2-3 месяца. За два дня до первого теста животных изолировали в клетках одного типа и размера, чтобы снизить групповой эффект. Мы использовали быструю батарею тестов с интервалами в 1 день между тестами.

2.3 Измерение суточной динамики двигательной активности, потребления пищи и калориметрических показателей.

Суточная динамика общей двигательной активности, потребление пищи, а также калориметрических параметров: потребление кислорода, выделение углекислого газа и расход энергии исследовались в калориметрическом модуле установки PhenoMaster (TSE, Germany) в соответствии с руководством по эксплуатации оборудования. Прибор содержал в себе 8 специализированных клеток для индивидуального содержания животных, оснащённых инфракрасными сенсорами для отслеживания передвижения мыши; весовыми сенсорами для отслеживания потребления пищи и воды из специализированных кормушек и поилок; и дополнительной 9-ой клеткой для индивидуального содержания животных, служащей в качестве референсной для снятия изменений в калориметрических показателях. Данные, получаемые от каждого сенсора записываются каждую минуту и обрабатываются специализированным программным пакетом от производителя оборудования.

За 2 дня до помещения животных в установку для тестирования, мышей рассаживали в клетки с целью обучить животных взаимодействию с поилками, используемыми в приборе. Затем грызунов помещали в установку. Измерение параметров с каждой группы животных происходило в течение 120 часов, первые 24 из которых считались акклиматизационными для мышей и данные полученные за эти сутки в дальнейшем не обрабатывались. Динамика потребления пищи и воды также представлена за 1 час.

Калориметрические показатели считывались с каждой клетки в течение 200 секунд каждые 30 минут. Они включали потребление O_2 (количество потреблённого в л кислорода за час на кг веса животного (л/ч/кг)), выделение CO_2 (количество потреблённого в мл кислорода за час на кг веса животного (л/ч/кг)) и расход энергии (количество израсходованных калорий за час на кг веса животного (ккал/ч/кг)).

2.4 «Открытое поле»

Тест открытого поля используется для оценки общей двигательной активности и исследовательского поведения у грызунов в условиях слабого стресса [Denenberg, 1969]. Тестирование проводилось на круглой арене диаметром 60 см и стенками высотой 30 см, изготовленной из белого пластика. Арена освещалась снизу двумя галогеновыми лампами, так что ее яркость составляла 300 люкс. Область с диаметром 30 см в центральной части арены рассматривалась как центр. Животное помещали у стенки арены и давали ему свободно исследовать пространство в течение 5 мин. Движения и перемещение животного автоматически фиксировали в течение 5 мин с помощью 3D сенсора Kinect 1, присоединенного к компьютеру через USB-3 порт. Пройденный путь (м) и время (%) нахождения животного в центральной части

арены (30 см в диаметре) оценивались автоматически компьютерной программой EthoStudio [Kulikov, Tikhonova, Kulikov, 2008]. После каждого теста арену очищали смоченной перекисью водорода (H_2O_2) и сухой салфетками.

2.5 «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ)

Тест приподнятого крестообразного лабиринта используют для изучения реакции тревожного поведения животного [Chopin, Briley, 1987]. Тестирование проводилось в установке, состоящей из четырех пересекающихся по центру под прямым углом рукавов длиной 30 см и шириной 6 см, находящихся на высоте 60 см над уровнем пола. Одна пара рукавов имеет стенки высотой 20 см (закрытые рукава, безопасные), другая пара не имеет стенок (открытые рукава, потенциально опасные). Установку освещали до 100 люкс. Животное помещали в центр, мордой по направлению к одному из закрытых рукавов и автоматически фиксировали перемещение в течение 5 мин с помощью 3D сенсора Kinect 1, присоединенного к компьютеру через USB-3 порт [Kulikov, Porova, 2015]. Kinect 1 позволял регистрировать движения животного как в открытых, так и в закрытых рукавах. Пройденный путь (м), время (%), проведенное в центре, в открытых и закрытых рукавах измеряли автоматически с помощью EthoStudio. После каждого теста установку очищали смоченной в перекиси водорода (H_2O_2) и сухой салфетками.

2.6 «Принудительное плавание» (ПП)

Тест принудительного плавания используют для изучения выраженности депрессивно-подобного замирания при помещении животного в воду [Porsolt, Bertin, Jalfre, 1977]. Тестирование проводилось в стеклянном цилиндре диаметром 18 см и высотой 30 см, наполненном водой с температурой 25°C на 20 см. Цилиндр помещали на полупрозрачную платформу и освещали снизу двумя лампами по 12 Вт каждая. Мышь помещали в воду на 6 мин и ее движения в течении последних 4 мин регистрировались с помощью 3D сенсора Kinect 1, присоединенного к компьютеру через USB-3 порт [Kulikov, Porova, 2015]. Время неподвижности (%) измеряли автоматически с помощью EthoStudio. Воду меняли после каждого животного.

2.7 Подвешивание за хвост

Данный тест служит для оценки выраженности нарушения моторики задних конечностей по типу дистонии [Sato и др., 2008]. Мышей при помощи клейкой ленты фиксировали за хвост к горизонтальной перекладине, размещенной на высоте 30 см от поверхности стола. Положение лапок записывалось в течение 6 минут с помощью 3D сенсора Kinect, присоединенного к компьютеру через USB-3 порт. Выраженность дистонии оценивали по частоте (количеству) и продолжительности сцепок (скрещиваний) задних лапок у мышей (Рис.8).

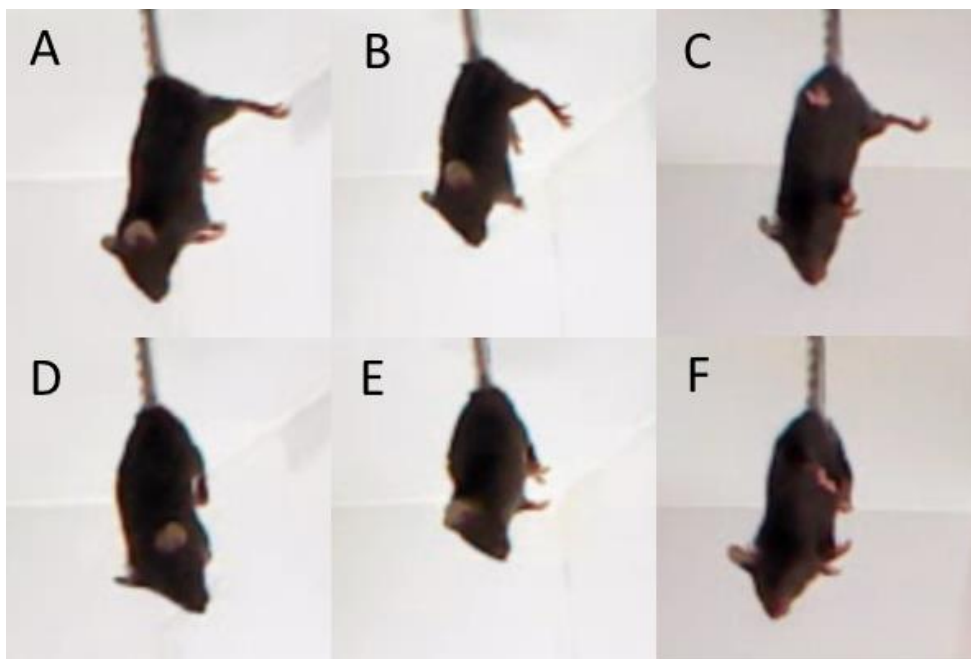


Рис.8. Нормальное (А-С) и скрещенное (D-F) положение задних лапок при подвешивании за хвост [Khotskin и др., 2025].

2.8 Генотипирование полиморфизма с.1473С>G методом ПЦР

ДНК мышей из ушных вырезок (< 0.5 см) для генотипирования было получено солевым методом. Ткань заливали 400 мкл лизирующего буфера: по 4 мл буфера В (10 мл 5М NaCl, 100 мл 0,5М ЭДТА, 25 мл 1М Трис-НCl pH 8,0 и 365 мл воды), 20 мкл 10% SDS, 30 мкл протеинкиназы К (20 мг/мл) на 10 проб, и инкубировали при температуре 52°C со встряхиванием 1000 об/мин в течение 1 - 1,5 ч. Далее пробы охлаждались при 4°C 10 мин, после чего к ним добавляли 120 мкл насыщенного раствора NaCl и встряхивали пробирки. Проводили центрифугирование 15 мин на 13000 об/мин при 15°C, содержимое декантировали в новую пробирку и снова центрифугировали 10 мин на 13000 об/мин при 15°C. Затем 100 мкл супернатанта отбирали в стерильную пробирку и добавляли к нему 200 мкл 96% этанола. Пробирки оставляли при -20°C на 20 мин, после чего встряхивали и центрифугировали 10 мин на 10000 об/мин при комнатной температуре. Супернатант аккуратно сливали, а осадок заливали 1 мл 75% этанола. Затем пробы вновь центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин, супернатант аккуратно сливали и сушили пробирки около 30 мин, после чего заливали 30 мкл воды, обработанной ДЭПК. В дальнейшем концентрацию ДНК в пробах измеряли и доводили до 50 нг/мкл и хранили при -20°C.

Образцы ДНК были генотипированы в соответствии с опубликованным протоколом с двумя положительными контрольными праймерами (5'- ttgacccaaagacgacctgcttgca и 5'- tgcattgcttactagccaaccatgagaca), обеспечивающими продукт ПЦР размером 523 п.н., и с праймерами,

специфичными для аллелей 1473C (5'-cagaatttcaatgcctgcgtgtggg) или 1473G (5'-cagaatttcaatgctxtgcgtgtggc), обеспечивающими продукт ПЦР размером 307 п.н.

ПЦР проводили на амплификаторе «БИС-М» М111 № 03-43 2009. В состав 10 мкл реакционной смеси входили 2.5 мМ MgCl₂, 0.25 мМ dNTP, 0.5 ед. SynTaq ДНК-полимеразы, по 10 пкмоль прямого и обратного праймеров, 1х ПЦР буфера и 50 нг ДНК. В продукт ПЦР добавляли 4 мкл красителя и наносили на 2% агарозный гель, окрашенный бромистым этидием.

2.9. Подготовка проб

Гипоталамус, фронтальную кору, гиппокамп, стриатум и средний мозг соответственно гомогенизировали в 250, 300, 300, 300 и 400 мкл холодного 50 мМ Трис HCl буфера, pH=7.6. Аликвоту 50 мкл гомогената смешивали с 150 мкл 0.6 М HClO₄ для экстракции 5-НТ и 5-НИАА. Другую аликвоту 100 мкл гомогената смешивали с 1 мл extractRNA (Eurogen, Москва) для экстракции общей РНК. Остаток гомогената центрифугировали 15 мин при 12700 об/мин (4°C), супернатант переносили в чистые пробирки и хранили при -80°C до определения активности ТПГ2.

2.10 Определение уровня 5-НТ и 5-НИАА

Смесь 50 мкл гомогената 150 мкл 0.6 М HClO₄ (см. 2.9) центрифугировали 15 мин при 12700 об/мин (4°C). Аликвоту 160 мкл супернатанта переносили в хроматографические виалы и разбавляли 160 мкл ультрачистой воды. Осадок растворяли в 1 мл 0.1 М NaOH для определения белка по Брэдфорду. Концентрацию 5-НТ и 5-НИАА определяли при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на колонке Luna C18 (размер частиц 5 мкм, L × ID75 × 4,6 мм, Phenomenex, США) с электрохимическим детектированием (750 мВ, электрохимический детектор DECADE II™; Antec, Нидерланды) и проточными ячейками из стеклоуглерода (ячейка VT-03, 3 мм GC sb; Antec, Нидерланды), системный контроллер CBM-20A, блок подачи растворителя LC-20AD, автосамплер SIL-20A и дегазатор DGU-20A5R (Shimadzu Corporation, США). Подвижная фаза (pH = 3,2) содержала 6,53 г KH₂PO₄, 100 мкл 0,5 М Na₂EDTA, 150 мг натриевой соли 1-октансульфоновой кислоты (Sigma, США) и метанол (13% объема; Vektor Ltd., Россия) [Bazhenova и др., 2017]. Стандартные смеси, содержащие 0.5, 1 и 2 нг каждая 5-НТ, 5-НИАА несколько раз анализировали в течение всей процедуры и использовали для построения калибровочных кривых для каждого вещества. Площади пиков были оценены с использованием программного обеспечения Lab Solution LG/GC версии 5.54 (Shimadzu Corporation, Япония) и откалиброваны по калибровочным кривым для соответствующих стандартов. Содержание 5-НТ и 5-НИАА было выражено в нг/мг белка.

2.11 Определение активности ТПГ2.

Аликвоту 15 мкл супернатанта (см. 2.9) инкубировали 15 мин при 37°C в присутствии L-триптофана (Sigma-Aldrich, Дармштадт, Германия) (0.4 мМ), кофактора 6-метил-5,6,7,8-тетрагидроптеридина (Sigma-Aldrich, Дармштадт, Германия) (0.3 мМ), ингибитора декарбоксилазы м-гидроксibenзилгидразина (Sigma-Aldrich, Дармштадт, Германия) (0.3 мМ), каталазы (Sigma-Aldrich, Дармштадт, Германия) (5 ед) и 1 мМ дитиотреитола в конечном объеме 25 мкл. Реакцию останавливали 75 мкл 0.6 М HClO₄ и центрифугировали в течение 15 мин при 12700 об/мин. Аликвоту 80 мкл супернатанта переносили в хроматографические вials и разбавляли 80 мкл ультрачистой воды. Количество синтезированного 5-НТР определяли с помощью ВЭЖХ см. 4.10). В качестве стандартов использовали 25, 50 и 100 пмоль 5-НТР (Sigma, США). Для определения белка по Брэдфорду другая аликвота 10 мкл супернатанта была смешана с 90 мкл 0.1 М NaOH. Активность ТПГ2 была выражена в пмоль 5-НТР, образованного в минуту на мг белка [Arefieva, Kulikov, 2023].

2.12 Определение концентрации белка по методу Брэдфорда

Определение проводилось в планшетах Corning 9018 (США) на планшетном спектрофотометре Multiscan GO (Thermo Fisher Scientific, США). Реактив Брэдфорда (Bio-Rad, США) разбавляли в 5 раз ультрачистой водой (1:4). В лунки планшета добавляли 5 мкл растворенного белка из пробы и по 5 мкл стандартов бычьего сывороточного альбумина, содержащие 50, 100, 200, 400, 600, 800 и 1000 мкг/мл. Добавляли по 150 мкл разбавленного реактива Брэдфорда. Далее инкубировали планшеты 15-20 мин при комнатной температуре. При 595 нм измерили оптическую плотность. По стандартам построили калибровочную кривую и с ее помощью определяли точную концентрацию белка в пробе.

2.13 Экстракция общей РНК

Выделение общей РНК проводили с помощью реактива extractRNA (Eurogene, Россия) согласно инструкции производителя. Смесь 100 мкл гомогената с 1 мл extractRNA (см.2.4) инкубировали 10 мин при к.т., затем добавляли 200 мкл хлороформа, встряхивали и инкубировали еще 3 мин. при к.т. Центрифугировали 15 мин при +4 °C и 12000 об/мин. Аликвоту 250 мкл водной фазы, содержащего РНК, переносили в стерильную пробирку, приливали равный объем изопропанола, встряхивали и инкубировали в течение 20 мин при к.т. Центрифугировали 15 мин при +4 °C и 12000 об/мин. Жидкую фазу сливали. К осадку приливали 1 мл 75 % этанола, центрифугировали 10 мин при +4 °C и 10000 об/мин. Жидкую фазу сливали, а осадок высушивали при комнатной температуре. (30 мин). Осадок растворяли в 25 мл стерильной воды, содержащей 1 ед.ДНКазы (Promega, США) и инкубировали 10 мин при 37°C для удаления остатков геномной ДНК. Затем фермент разрушали инкубацией в течение 10 мин при 65°C.

Измеряли оптическую плотность при 260/280 нм на приборе NanoDrop (Termo Fisher Scientific, США) и разбавляли до концентрации РНК 0.125 мкг/мкл и хранили при –80°C.

2.14 Синтез кДНК

Синтез кДНК проводили с помощью набора R001 (Биолабмикс, Россия) в присутствиии рандомного гексопраймера согласно инструкции производителя. В стерильной пробирке смешивали 8 мкл РНК (1 мкг), 1 мкл праймера и 3 мкл стерильной воды стерильной воды. Пробирки прогревали 2–3 мин при 70 °С и затем резко помещали в лёд. В пробирки добавляли из набора 4 мкл 5х буфера, 2 мкл 0.1 М ДТТ, 1 мкл смеси трифосфатов и 1 мкл фермента (100 ед.) обратной транскриптазы. Отжигали 10 мин при 25 °С и затем инкубировали 60 мин при 42 °С. Реакцию останавливали нагреванием 10 мин при 70 °С. Образцы кДНК хранили при –80°C.

2.15 Полимеразная цепная реакция в реальном времени (real-time PCR)

Праймеры, используемые для амплификации исследуемых генов (Табл.4), разработаны на основе последовательностей, опубликованных в базе данных EMBL Nucleotide database, и синтезированы в компании «Биосан» (Новосибирск). ПЦР проводили с помощью набора реактивов R401 (Синтол, Россия) согласно инструкции производителя, на амплификаторе реального времени LightCycler 480 System (Roche, Франция). Аликвоту 1 мкл кДНК смешивали с 2 мкл ПЦР буфера, содержащий интеркалирующий краситель SYBR green I, 2 мкл 2.5 mM dNTP, 2 мкл 25 mM MgCl₂, 2 мкл смеси прямого и обратного праймеров (Табл. 4), 0.16 мкл Taq ДНК–полимеразы и стерильной воды до конечного объема 20 мкл. Мы использовали следующий протокол амплификации: денатурация 3 мин 94 °С, 40 циклов (денатурация 10 сек при 94 °С, отжиг и элоегация 60 с при оптимальной температуре для выбранного праймера, измерение флуоресценции 2 с 80°C).

В качестве внешнего стандарта использовали серию разведений геномной ДНК мыши (C57BL/6) с концентрацией 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400, 12800 и 25600 копий/мкл, которые амплифицировали одновременно с пробами в отдельных пробирках. Калибровочная кривая в координатах Ct (значение порогового цикла) – log P (десятичный логарифм количества стандарта ДНК) была построена автоматически с использованием программного обеспечения LightCycler 480 System. В качестве внутреннего стандарта использовали ген *Polr2a*. Экспрессию генов выражали числом их копий на 100 копий кДНК *Polr2a*.

Таблица 4. Нуклеотидная последовательность праймеров, температура отжига и размер ампликона

Ген	Последовательность	Температура отжига, °C	Размер ампликона, п.н.
<i>Pol2a</i>	F: 5'– tgtgacaactccatacaatgc – 3' R: 5' – ctctcttactgaatttgcgtact – 3'	61	194
<i>Agouti</i>	F 5'– ggatgtcaccgcctact – 3' R 5' – gttactccgcagactcct – 3'	62	150
<i>Raly</i>	F: 5' – tagcaaaaagagaattggctg – 3' R: 5' – ttccaggtcatggatatgtcc – 3'	59	255
<i>Mc4r</i>	F 5'– gtcggaaccatcgtcattacc – 3' R 5'– gcaaatggatgcgagcaag – 3'	62	150
<i>Mc3r</i>	F 5' – tccgatgctgcctaacct – 3' R 5' – tgcaggttgccattcct – 3'	62	130
<i>Pomc</i>	F: 5' – aaggacaagcggttacgggtg – 3' R: 5' – agaggctagaggtcatcagc – 3'	62	101
<i>Maoa</i>	F 5' – aatgaggatgttaaatgggtagatgttggt – 3' R 5' – ctgacatattcaactagacgctc – 3'	62	138
<i>Tph2</i>	F 5' – cattcctcgcacaattccagtcg – 3' R 5' – agtctacatccatcccaactgctg – 3'	61	239
<i>Slc6a4</i>	F 5' – aagccccaccttgactcctcc – 3' R 5' – ctcttctctctcctcacatatcc – 3'	57	198
<i>Htr1a</i>	F 5' – gactgccaccctctgccctatcc – 3' R 5' – tcagcaaggcaacaattccag – 3'	62	200
<i>Htr2a</i>	F 5' – agaagccaccttggtgtga – 3' R 5' – ttgctcattgctgatggact – 3'	61	169
<i>Agrp</i>	F 5' – gtgctagatccacagaaccgc – 3' R 5' – ggactcgtgcagccttaca – 3'	64	171

2.16 Статистика

Все данные проверяли на соответствие нормальному распределению с помощью критерия Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллиефорса и критерию Шапиро-Уилка и представляли как средние ± ошибка среднего. Анализ проводили с помощью двухфакторного (эксперименты 1 и 3) ANOVA. В эксперименте 2 динамику изменений показателей двигательной активности, потребления пищи, O₂, выделения CO₂ и расхода энергии анализировали с помощью ANOVA для повторных измерений с межгрупповым фактором «Генотип» и внутригрупповым фактором «День». При нахождении достоверного влияния факторов проводили *post hoc* сравнения по критерию Фишера (LSD-test). Достоверными считались различия при $p < 0.05$.

Глава 3. Результаты

3.1 Экспрессия генов меланокортиновой системы у самцов и самок мышей генотипов *C57BL/6* и *C57BL/6-A^Y*

Выявлено различие между группами по экспрессии генов *Agouti* (гипоталамус – $F_{3,28} = 18.30$, $p < 0.001$, гиппокамп – $F_{3,27} = 101.19$, $p < 0.001$ и фронтальная кора – $F_{3,28} = 40.70$, $p < 0.001$) и *Raly* (гипоталамус – $F_{3,28} = 4.53$, $p < 0.05$, гиппокамп – $F_{3,27} = 17.07$, $p < 0.001$ и фронтальная кора – $F_{3,28} = 9.77$, $p < 0.001$) во всех исследованных структурах (Рис. 9).

На экспрессию гена *Agouti* во всех структурах мозга влиял только фактор генотипа (гипоталамус – $F_{1,28} = 53.39$, $p < 0.001$, гиппокамп – $F_{1,27} = 300.04$, $p < 0.001$ и фронтальная кора – $F_{1,28} = 121.82$, $p < 0.001$), но не фактор пола животных (гипоталамус – $F_{1,28} < 1$, гиппокамп – $F_{1,27} < 1$ и фронтальная кора – $F_{1,28} < 1$).

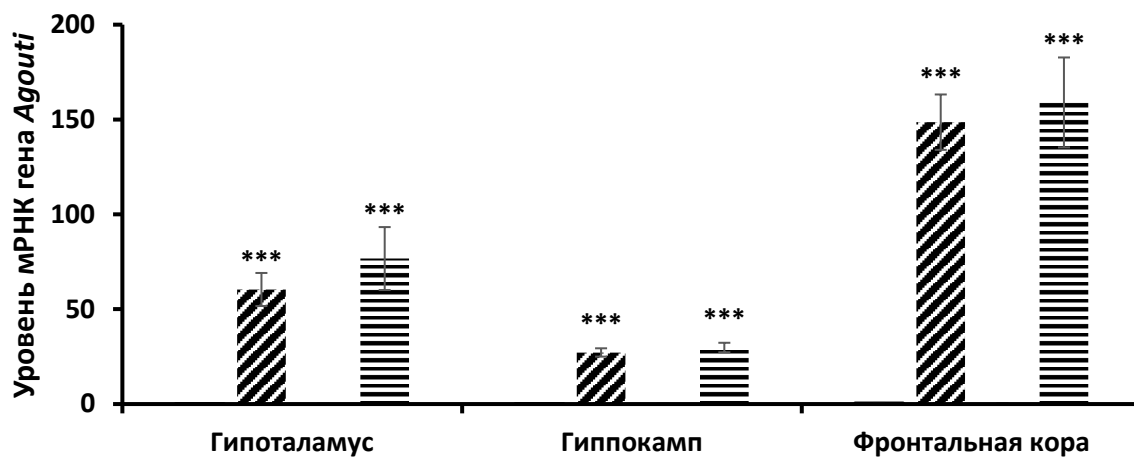
На экспрессию гена *Raly* во всех структурах мозга также влиял только фактор генотипа (гипоталамус – $F_{1,28} = 11.73$, $p < 0.001$, гиппокамп – $F_{1,27} = 51.07$, $p < 0.001$ и фронтальная кора – $F_{1,28} = 25.29$, $p < 0.001$), но не фактор пола животных (гипоталамус – $F_{1,28} < 1$, гиппокамп – $F_{1,27} < 1$ и фронтальная кора – $F_{1,28} = 1.55$, $p = 0.22$).

Не было обнаружено детектируемого количества кДНК гена *Agouti* у самцов и самок мышей генотипа *C57BL/6*. В то же время, самки и самцы генотипа *C57BL/6-A^Y* гетерозиготные по мутации *A^Y* демонстрировали высокий уровень экспрессии гена *Agouti* и примерно вдвое меньший уровень мРНК гена *Raly* во всех исследованных структурах по сравнению с мышами генотипа *C57BL/6* (Рис.9).

Была выявлена высокая позитивная корреляция между уровнями генов *Agouti* и *Raly* в мозге самцов ($r = 0.9$, $n = 24$, $p < 0.001$) и самок ($r = 0.87$, $n = 24$, $p < 0.001$) линии *C57BL/6-A^Y* (Рис.10).

Таким образом, впервые (1) была количественно измерена и показана высокая экспрессия гена *Agouti* в гипоталамусе, а также (2) высокая положительная корреляция между экспрессией генов *Agouti* и *Raly* в мозге самцов и самок мышей гетерозиготных по мутации *A^Y*.

А)



Б)

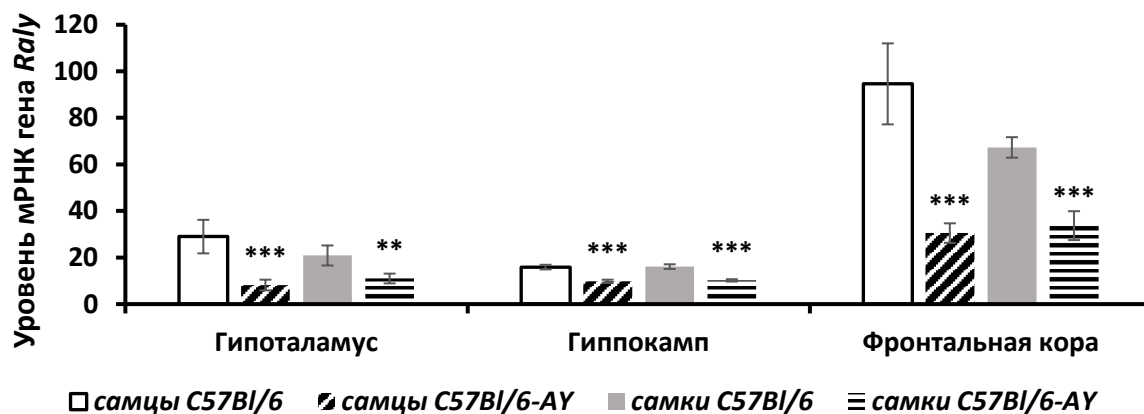


Рис. 9. Экспрессия генов *Agouti* (А) и *Raly* (Б) в структурах мозга у самцов и самок мышей линий *C57BL/6* и *C57BL/6-A^y* в возрасте 6 месяцев.

N = 7-8 особей в группе.

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по сравнению с *C57BL/6* того же пола

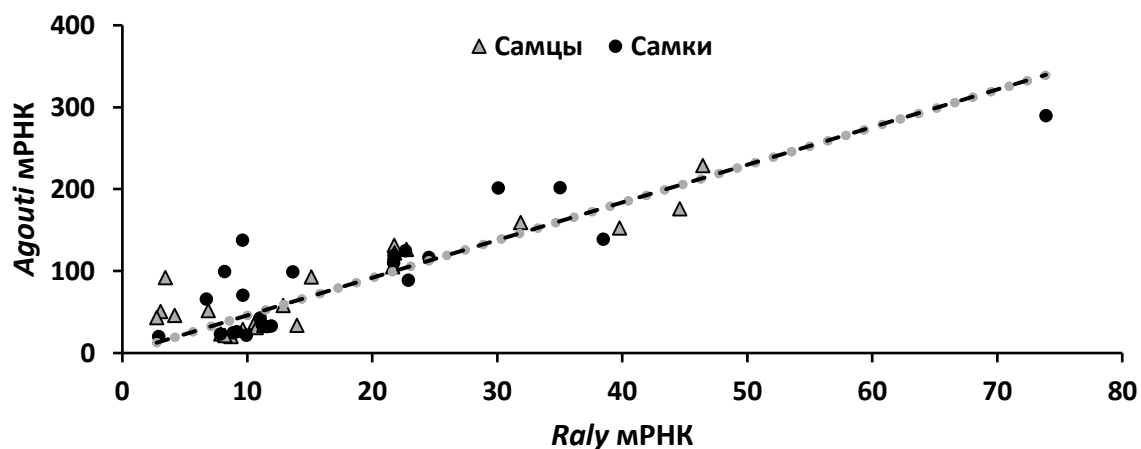


Рис. 10 Корреляция между уровнями мРНК генов *Agouti* и *Raly* в гипоталамусе, гиппокампе и фронтальной коре у самцов и самок мышей линий *C57BL/6* и *C57BL/6-A^y* в возрасте 6 месяцев.

N = 7-8 особей в группе.

С помощью однофакторного ANOVA были выявлены различия между экспериментальными группами по экспрессии гена *Mc3r* в гипоталамусе ($F_{3,28}=4.74$, $p<0.01$), *Mc4r* ($F_{3,28}=4.51$, $p<0.05$) и *Pomc* ($F_{3,28}=4.60$, $p<0.05$) во фронтальной коре. Двухфакторный ANOVA показал влияние фактора «Генотип» на уровень мРНК гена *Mc3r* в гипоталамусе (Табл.5). Экспрессия данного гена была снижена в этой структуре у самцов, но не у самок генотипа *C57BL/6* по сравнению с самцами генотипа *C57BL/6-A^Y* (Табл.6). Во фронтальной коре двухфакторный ANOVA выявил значимый статистический эффект фактора «Пол» для экспрессии гена *Mc4r* и взаимодействия факторов для экспрессии гена *Pomc* (Табл.5). Экспрессия гена *Mc4r* в этой структуре у самок была ниже, чем у самцов. Кроме того, экспрессия данного гена у самцов генотипа *C57BL/6-A^Y* была ниже, чем у самцов генотипа *C57BL/6* (Табл.6). Экспрессия гена *Pomc* во фронтальной коре была выше у самок *C57BL/6-A^Y* по сравнению с самками *C57BL/6* (Табл.6).

Таблица 5. Результаты дисперсионного анализа влияния факторов «Генотип», «Пол» и взаимодействия этих факторов на уровень мРНК генов *Mc4R*, *Mc3R*, *LepR*, *Pomc*, *Agouti*, *Raly*, *Agrp* в гипоталамусе, гиппокампе и фронтальной коре у самцов и самок мышей генотипов *C57BL/6* и *C57BL/6-A^Y* в возрасте 6 месяцев. N = 7-8 особей в группе.

Ген	Генотип	Пол	Генотип x пол
Гипоталамус			
<i>Mc4R</i>	$F_{1,28}=2.71$, $p=0.11$	$F_{1,28}<1$	$F_{1,28}=2.74$, $p=0.11$
<i>Mc3R</i>	$F_{1,28}=7.45$, $p<0.05$	$F_{1,28}=2.82$, $p=0.10$	$F_{1,28}=3.96$, $p=0.07$
<i>Pomc</i>	$F_{1,25}<1$	$F_{1,25}=2.66$, $p=0.12$	$F_{1,25}=2.66$, $p=0.12$
<i>Agrp</i>	$F_{1,26}<1$	$F_{1,26}<1$	$F_{1,26}<1$
Гиппокамп			
<i>Mc4R</i>	$F_{1,27}<1$	$F_{1,27}<1$	$F_{1,27}<1$
<i>Mc3R</i>	$F_{1,28}<1$	$F_{1,28}=3.9$, $p=0.07$	$F_{1,28}<1$
<i>Pomc</i>	$F_{1,28}=2.49$, $p=0.13$	$F_{1,28}<1$	$F_{1,28}<1$
<i>Agrp</i>	$F_{1,27}=1.87$, $p=0.18$	$F_{1,27}<1$	$F_{1,27}=1.05$, $p=0.32$
Фронтальная кора			
<i>Mc4R</i>	$F_{1,28}=2.83$, $p=0.10$	$F_{1,28}=7.15$, $p<0.05$	$F_{1,28}=3.55$, $p=0.07$
<i>Mc3R</i>	$F_{1,28}<1$	$F_{1,28}<1$	$F_{1,28}=1.82$, $p=0.19$
<i>Pomc</i>	$F_{1,28}=1.46$, $p=0.24$	$F_{1,28}<1$	$F_{1,28}=11.86$, $p<0.001$
<i>Agrp</i>	$F_{1,28}=1.51$, $p=0.23$	$F_{1,28}=3.11$, $p=0.09$	$F_{1,28}<1$

Таблица 6. Уровень мРНК генов *Mc4R*, *Mc3R*, *Pomc*, *Agouti*, *Raly*, *Agrp* в гипоталамусе, гиппокампе и фронтальной коре у самцов и самок мышей генотипов *C57BL/6* и *C57BL/6-A^Y* в возрасте 6 месяцев. N = 7-8 особей в группе.

Ген	<i>a/a</i> самцы	<i>A^Y/a</i> самцы	<i>a/a</i> самки	<i>A^Y/a</i> самки	P
Гипоталамус					
<i>Mc4R</i>	12.8 ± 2.7	6.8 ± 1.3	10.0 ± 1.5	10.0 ± 1.5	F _{3,28} =1.82, p=0.17
<i>Mc3R</i>	11.6 ± 3.0	3.8 ± 0.7***	5.6 ± 0.9	4.3 ± 0.7	F _{3,28} =4.74, p<0.01
<i>Pomc</i>	20.5 ± 4.8	14.3 ± 2.2	20.5 ± 3.8	26.1 ± 3.2	F _{3,25} =1.83, p=0.17
<i>Agrp</i>	17.8 ± 0.2	17.8 ± 0.2	18.0 ± 0.2	17.9 ± 0.2	F _{3,26} <1
Гиппокамп					
<i>Mc4R</i>	13.1 ± 0.8	12.2 ± 0.8	13.6 ± 2.2	13.5 ± 0.8	F _{3,27} <1
<i>Mc3R</i>	1.3 ± 0.2	1.5 ± 0.2	2.1 ± 0.4	1.9 ± 0.2	F _{3,28} =1.78, p=0.17
<i>Pomc</i>	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	F _{3,28} =1.17, p=0.34
<i>Agrp</i>	15.3 ± 0.4	17.4 ± 0.9	15.4 ± 1.1	15.7 ± 0.9	F _{3,27} =1.33, p=0.29
Фронтальная кора					
<i>Mc4R</i>	3.9 ± 0.6	2.5 ± 0.2**	2.1 ± 0.2***	2.2 ± 0.4	F _{3,28} =4.51, p<0.05
<i>Mc3R</i>	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0	F _{3,28} <1
<i>Pomc</i>	3.1 ± 0.2	2.5 ± 0.4	1.9 ± 0.3	3.3 ± 0.3 ^{\$\$}	F _{3,28} =4.60, p<0.05
<i>Agrp</i>	2.1 ± 0.4	3.4 ± 0.8	3.7 ± 0.6	4.3 ± 1.0	F _{3,28} =1.62, p=0.21

* p<0.05, ***p<0.001 по сравнению с самцами *C57BL/6*

^{\$\$}p<0.01 по сравнению с самками *C57BL/6*

Таким образом, впервые было показано снижение экспрессии гена *Mc3r* в гипоталамусе у самцов генотипа *C57BL/6-A^Y* по сравнению с самцами генотипа *C57BL/6-A^Y*. Важно отметить, что в данной структуре ни у самцов, ни у самок генотипа *C57BL/6-A^Y* не обнаружено увеличения экспрессии генов *Mc4r* и *Pomc*.

3.2. Динамика двигательной активности, потребления пищи и общего метаболизма самцов мышей генотипов *C57BL/6* и *C57BL/6-A^Y*.

Динамику двигательной активности, потребления пищи и общего (энергетического) метаболизма у самцов генотипов *C57BL/6* и *C57BL/6-A^Y* измеряли в течении 4 суток. Полученные данные анализировали в два этапа.

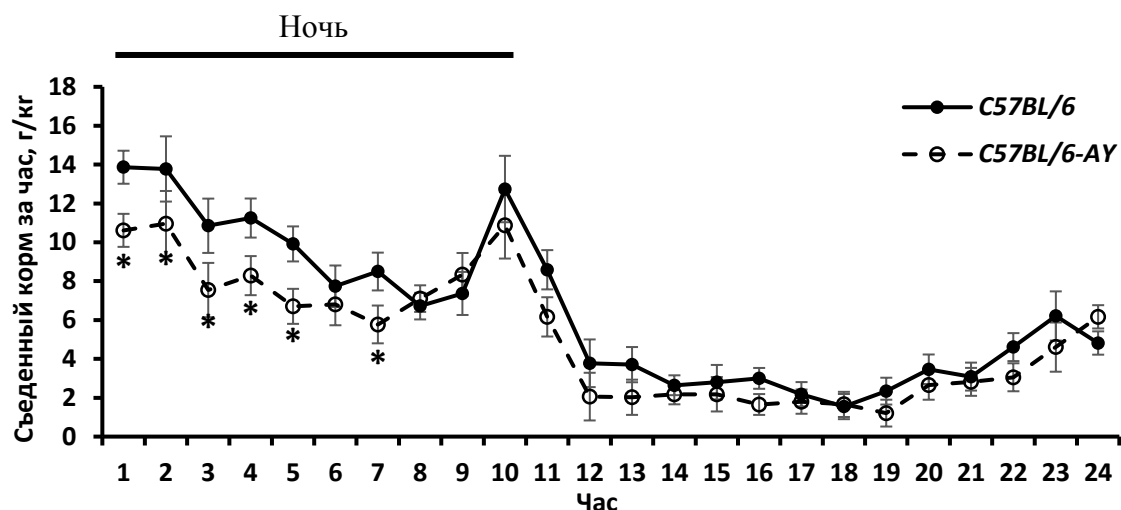
На первом этапе анализировали суточную динамику этих показателей. Для этого для каждого часа использовали средние значения для данного часа за все 4 дня наблюдений. ANOVA для повторных данных выявил существенное влияние факторов «Генотип», «Час» и взаимодействия этих факторов на потребление пищи, O₂, выделение CO₂ и расход энергии (Табл.7). Средние значения этих показателей были снижены у мышей генотипа *C57BL/6-A^Y* по сравнению с животными генотипа *C57BL/6* (Рис.11). В то же время не выявлено влияние фактора «Генотип» и взаимодействия на двигательную активность (Табл.7). Животные обоих генотипов в среднем двигались одинаково (Рис.11). Как и ожидалось все исследуемые показатели у

животных обоих генотипов были выше в тёмное время суток по сравнению со светлым временем (Рис.11).

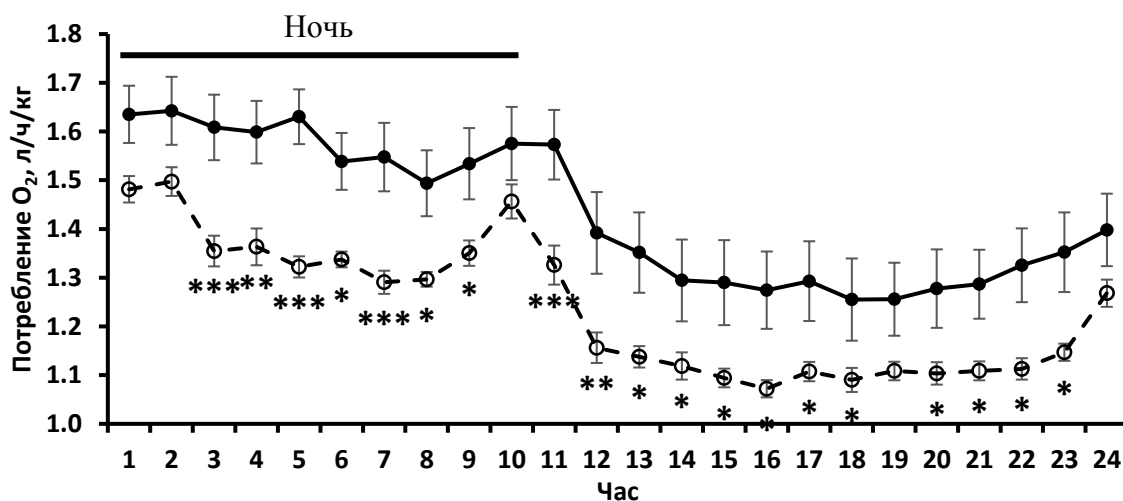
Таблица 7. Результаты дисперсионного анализа влияния факторов «Генотип», «Час» и взаимодействия этих факторов на суточную динамику потребления пищи и O_2 , выделения CO_2 , расхода энергии и двигательной активности мышей генотипов *C57BL/6* и *C57BL/6-A^Y*.

	Генотип	Час	Взаимодействие
Потребление пищи	$F_{1,22}=6.54, p=0.018$	$F_{23,506}=32.8, p<0.001$	$F_{23,506}=1.18, p=0.26$
Потребление O_2	$F_{1,22}=7.19, p=0.014$	$F_{23,506}=96.1, p<0.001$	$F_{23,506}=2.3, p<0.001$
Выделение CO_2	$F_{1,22}=8.08, p=0.009$	$F_{23,506}=110.1, p<0.001$	$F_{23,506}=3.32, p<0.001$
Расход энергии	$F_{1,22}=7.43, p=0.012$	$F_{23,506}=95.8, p<0.001$	$F_{23,506}=2.69, p<0.001$
Двигательная активность	$F_{1,22}=1.59, p=0.228$	$F_{23,506}=35.1, p<0.001$	$F_{23,506}=1.37, p=0.12$

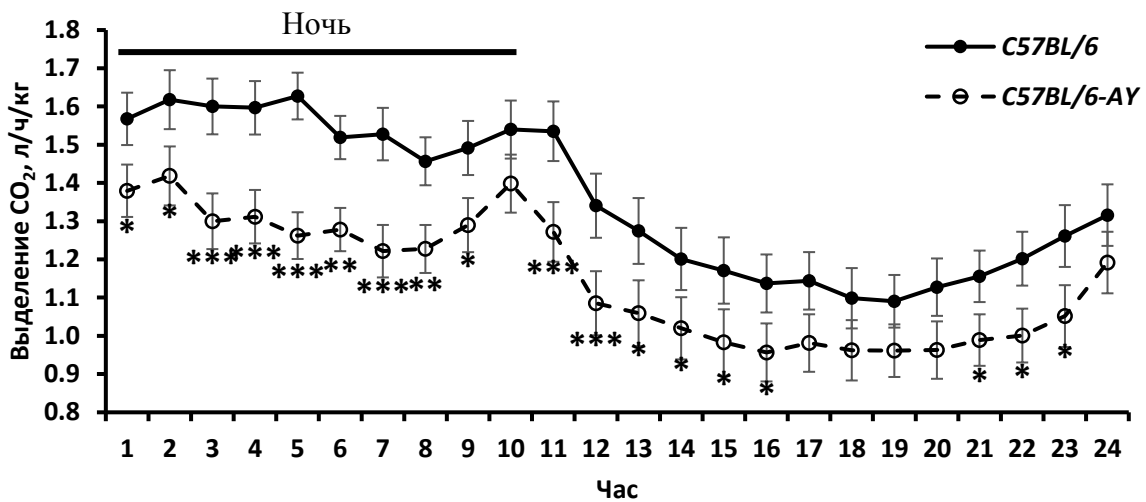
А)



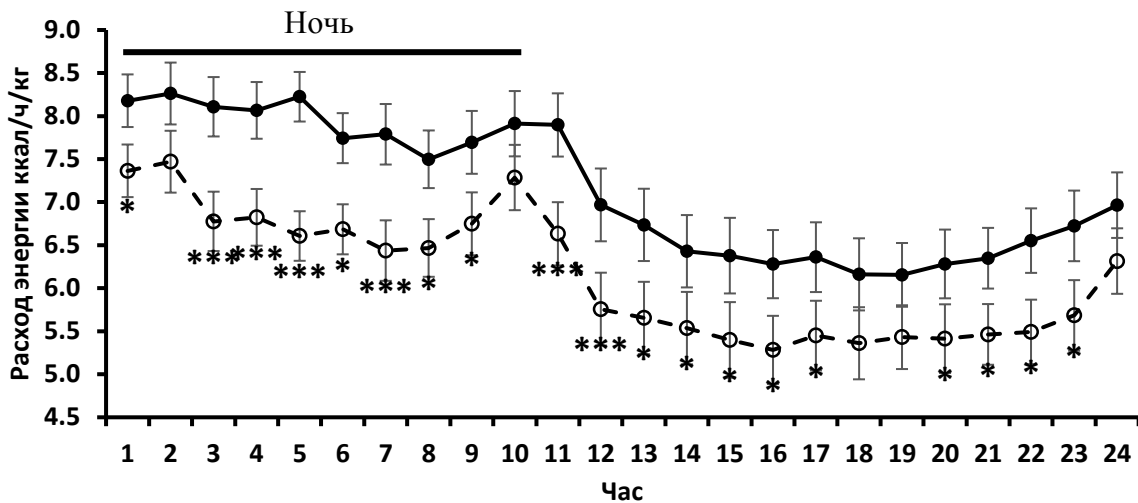
Б)



В)



Г)



Д)

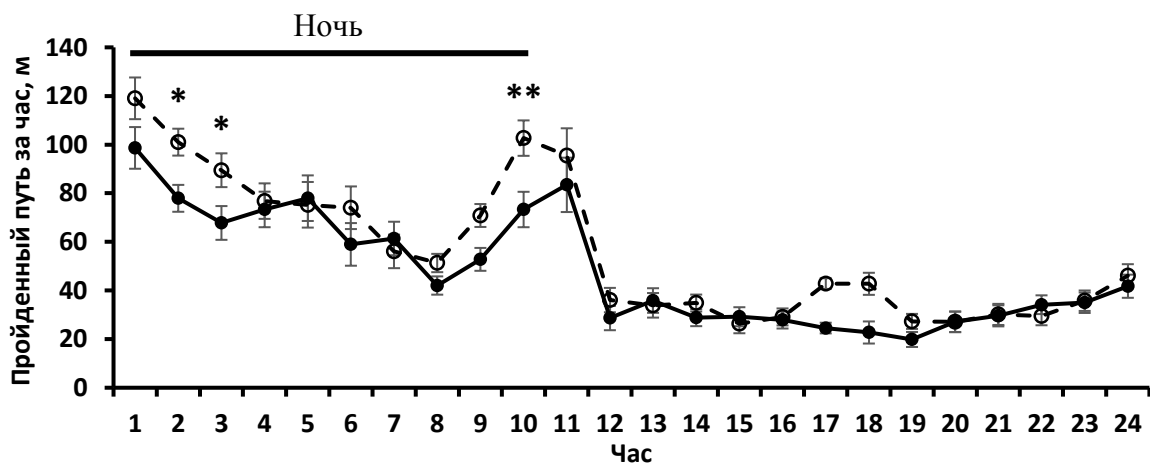


Рис. 11. Суточная динамика потребления пищи (А) и O_2 (Б), выделения CO_2 (В), расхода энергии (Г) и пройденного пути (Д) 3-х месячными самцами мышей линий *C57BL/6* и *C57BL/6-AY*. Каждое значение является средним по данному часу за 4 дня наблюдений. N = 12 особей в группе.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по сравнению с *C57BL/6*

На втором этапе анализировали изменения средних значений данных показателей в тёмное и светлое время на протяжении 4 дней наблюдений. Для этого для каждого дня для каждого показателя вычисляли средние значения отдельно за тёмное (10 час) и светлое (14 час) время суток.

Был выявлен существенный вклад фактора «Генотип» в выраженность изменений потребления пищи, O_2 , выделения CO_2 и расхода энергии в тёмное время суток и в выраженность изменений потребления O_2 , выделения CO_2 и расхода энергии в светлое время суток (Табл.8). В среднем мыши генотипа *C57BL/6-A^Y* меньше потребляют O_2 , выделяют CO_2 , расходуют энергию как в тёмное, так и в светлое время суток по сравнению с животными генотипа *C57BL/6* (Рис.12). Также мыши генотипа *C57BL/6-A^Y* меньше едят в тёмное время суток по сравнению с животными генотипа *C57BL/6*. В светлое время суток это различие исчезает (Рис.12).

Был отмечен существенный вклад фактора «День» или взаимодействия «Генотип» х «День» в изменчивость потребления пищи, O_2 , выделения CO_2 и расхода энергии в тёмное время суток (Табл.8). Значения этих показателей увеличиваются в течении наблюдений, но только у мышей генотипа *C57BL/6* (Рис.12).

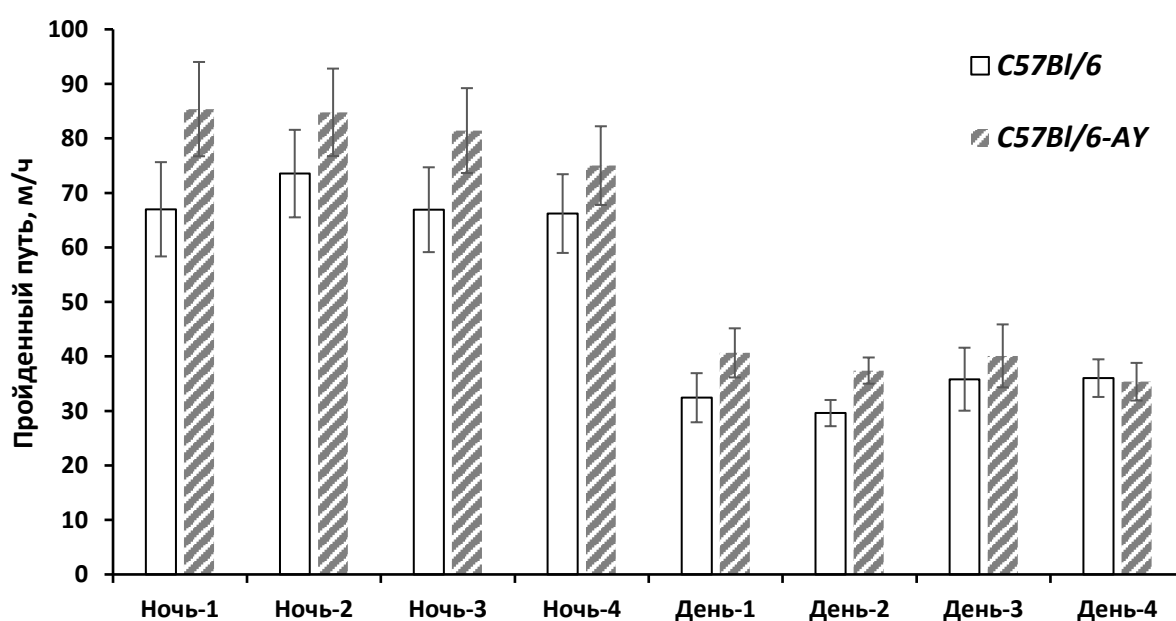
Не выявлено влияния факторов «Генотип», «День» и их взаимодействия на изменения в двигательной активности как в тёмное, так и в светлое время суток (Табл.8). Двигательная активность мышей обоих генотипов была примерно одинакова в тёмное и светлое время суток на протяжении 4 дней наблюдения.

Таблица 8. Результаты дисперсионного анализа влияния факторов «Генотип», «День» и взаимодействия этих факторов на изменения потребления пищи, O_2 , выделения CO_2 , расхода энергии и двигательной активности мышей генотипов *C57BL/6* и *C57BL/6-A^Y* в тёмное и светлое время на протяжении 4 дней тестирования.

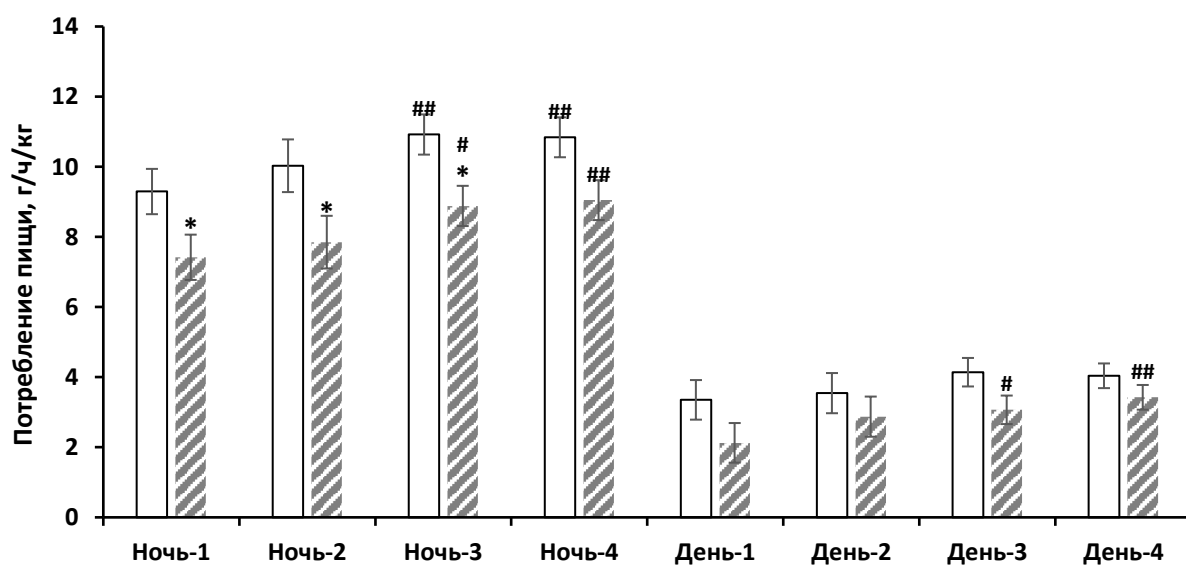
	Генотип	День	Взаимодействие
В тёмное время суток			
Потребление пищи	$F_{1,22}=6.70, p=0.017$	$F_{3,66}=7.56, p<0.001$	$F_{3,66}<1$
Потребление O_2	$F_{1,22}=9.59, p=0.005$	$F_{3,66}=2.53, p=0.06$	$F_{3,66}=3.71, p=0.016$
Выделение CO_2	$F_{1,22}=12.2, p=0.002$	$F_{3,66}=11.5, p<0.001$	$F_{3,66}<1$
Расход энергии	$F_{1,22}=10.2, p=0.004$	$F_{3,66}=4.69, p=0.005$	$F_{3,66}=2.11, p=0.11$
Двигательная активность	$F_{1,22}=1.66, p=0.21$	$F_{3,66}=1.91, p=0.14$	$F_{3,66}<1$

В светлое время суток			
Потребление пищи	$F_{1,22}=2.47, p=0.13$	$F_{3,66}=4.2, p=0.009$	$F_{3,66}<1$
Потребление O_2	$F_{1,22}=5.68, p=0.026$	$F_{3,66}=2.34, p=0.08$	$F_{3,66}=5.37, p=0.002$
Выделение CO_2	$F_{1,22}=5.44, p=0.029$	$F_{3,66}=2.69, p=0.053$	$F_{3,66}<1$
Расход энергии	$F_{1,22}=5.65, p=0.027$	$F_{3,66}=1.92, p<0.14$	$F_{3,66}=2.48, p=0.07$
Двигательная активность	$F_{1,22}<1$	$F_{3,66}=1.03, p=0.39$	$F_{3,66}=1.25, p=0.30$

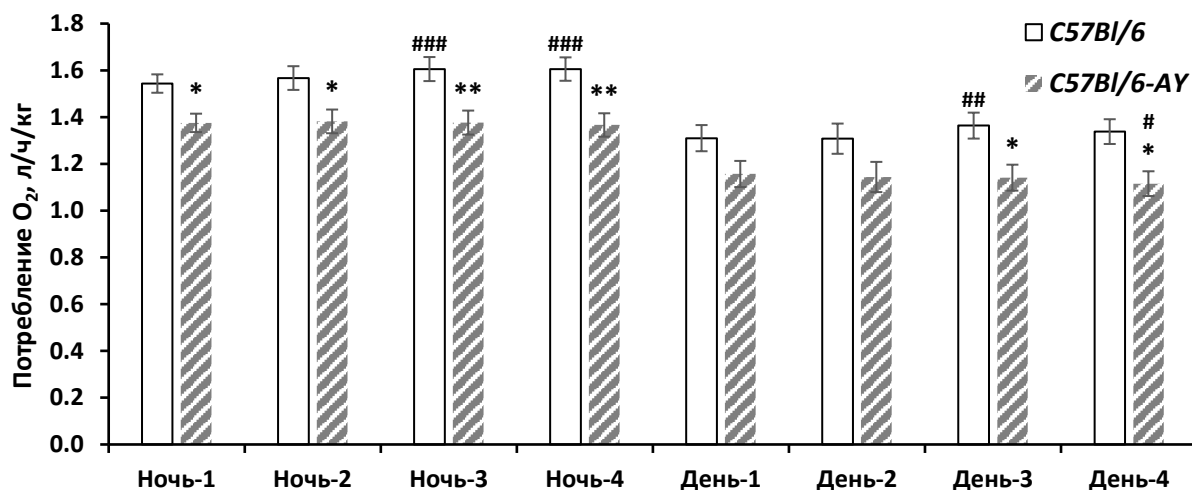
А)



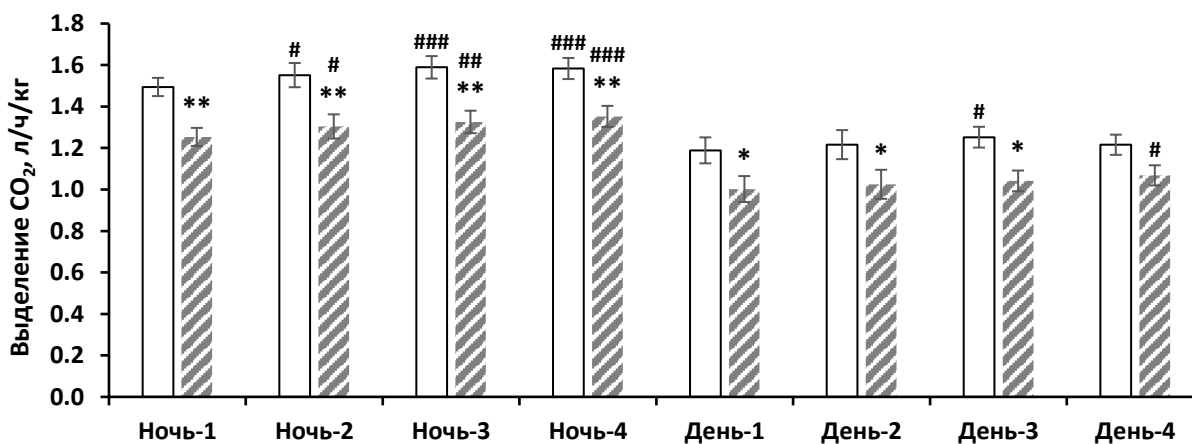
Б)



В)



Г)



Д)

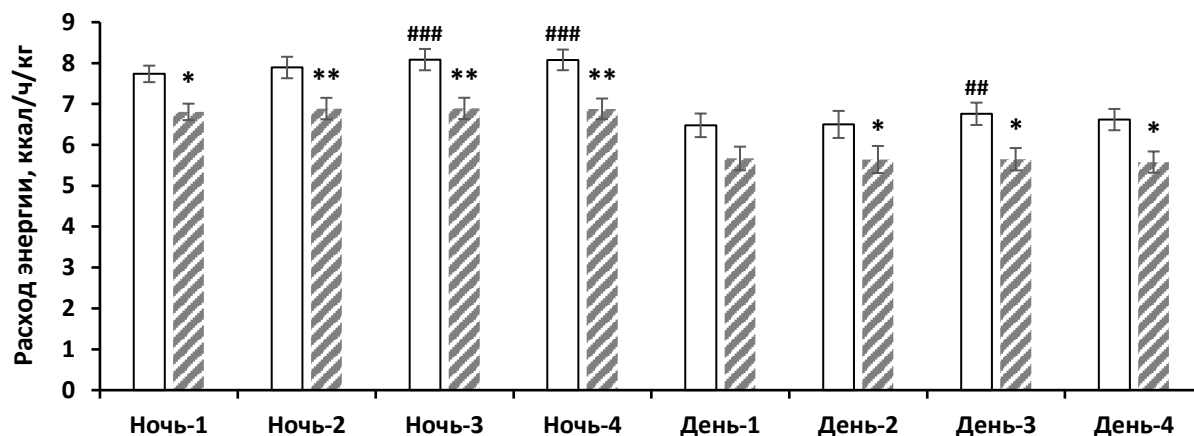


Рис. 12. Пройденное расстояние (А), потребление пищи (Б), потребление O₂ (В) и выделение CO₂ (Г) у 3-х месячных самцов мышей C57BL/6 и C57BL/6-AY в тёмное и светлое время суток в течение 4 последовательных дней наблюдения. Каждый столбик представляет собой среднее ± ошибку среднего значение за 4 дня для 12 животных. N = 12 особей в группе.

*p<0.05, **p<0.01 по сравнению с C57BL/6

#p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 по сравнению с первыми сутками измерения

Как и ожидалось, мыши обоих генотипов двигаются и едят больше, потребляют больше O_2 , выделяют больше CO_2 и расходуют больше энергии в темное время суток. При этом суточная динамика двигательной активности не различается у мышей обоих генотипов. Впервые показано, что потребление пищи, O_2 , выделение CO_2 и расход энергии как в темное, так и в светлое время суток снижен у мышей генотипа *C57BL/6-A^Y* по сравнению с животными генотипа *C57BL/6*. Впервые показано увеличение потребления пищи, O_2 , выделения CO_2 и расхода энергии у мышей генотипа *C57BL/6*, но не генотипа *C57BL/6-A^Y* в процессе адаптации к калориметрическим клеткам с 1 по 4 день.

Конечно, нельзя исключить, что наблюдаемое снижение потребления пищи, O_2 , выделения CO_2 и расхода энергии у мышей *C57BL/6-A^Y* по сравнению с животными *C57BL/6* возникает в результате того, что масса мышей *C57BL/6-A^Y* больше, чем мышей *C57BL/6*. Для коррекции возможного влияния различия в массе тела на данные показатели был проведен ковариационный анализ ANCOVA, в котором «масса тела» бралась как коварианса. Не было выявлено ни влияния ковариансы «масса тела» ($F_{1,21} < 1$), ни фактора «Генотип» ($F_{1,21} = 2.93$, $p = 0.1$) на потребление пищи [Khotskin, Izyurov, Kulikov, 2025]. Этот результат свидетельствует о том, что мыши *C57BL/6-A^Y* не потребляют больше пищи по сравнению с мышами *C57BL/6*. Был выявлен значимый эффект ковариансы «масса тела» ($F_{1,21} = 7.51$, $p = 0.012$) и тенденция влияния фактора «Генотип» ($F_{1,21} = 3.80$, $p = 0.065$) на потребление O_2 . Были также выявлены значительные эффекты ковариансы «масса тела» ($F_{1,21} = 5.22$, $p = 0.033$) и фактора «Генотип» ($F_{1,21} = 4.40$, $p = 0.048$) на выделение CO_2 . Эти результаты подтверждают, что независимо от различий в их массах мыши *C57BL/6-A^Y* потребляют меньше O_2 , выделяют меньше CO_2 и, следовательно, расходуют меньше энергии по сравнению с животными *C57BL/6* [Khotskin, Izyurov, Kulikov, 2025].

3.3. Исследование поведения самцов мышей генотипов *B6-1473CC/aa*, *B6-1473CC/A^Ya*, *B6-1473GG/aa* и *B6-1473GG/A^Ya*

3.3.1. Масса тела

Самцы четырех генотипов различались по массе тела ($F_{3,28} = 9.56$, $p < 0.001$). Двухфакторный дисперсионный анализ выявил влияние факторов «*c.1473C > G*» ($F_{1,28} = 8.9$, $p = 0.006$) и «*A^Y*» ($F_{1,28} = 19.69$, $p < 0.001$), но не их взаимодействия ($F_{1,28} < 1$). Аллель *A^Y* увеличивает массу тела у мышей *B6-1473CC/A^Ya* и *B6-1473GG/A^Ya* по сравнению с мышами *B6-1473CC/aa* и *B6-1473GG/aa*, тогда как аллель *G* уменьшает массу тела у мышей *B6-1473GG/aa* по сравнению с мышами *B6-1473CC/aa* ($p = 0.023$) (Рис.13).

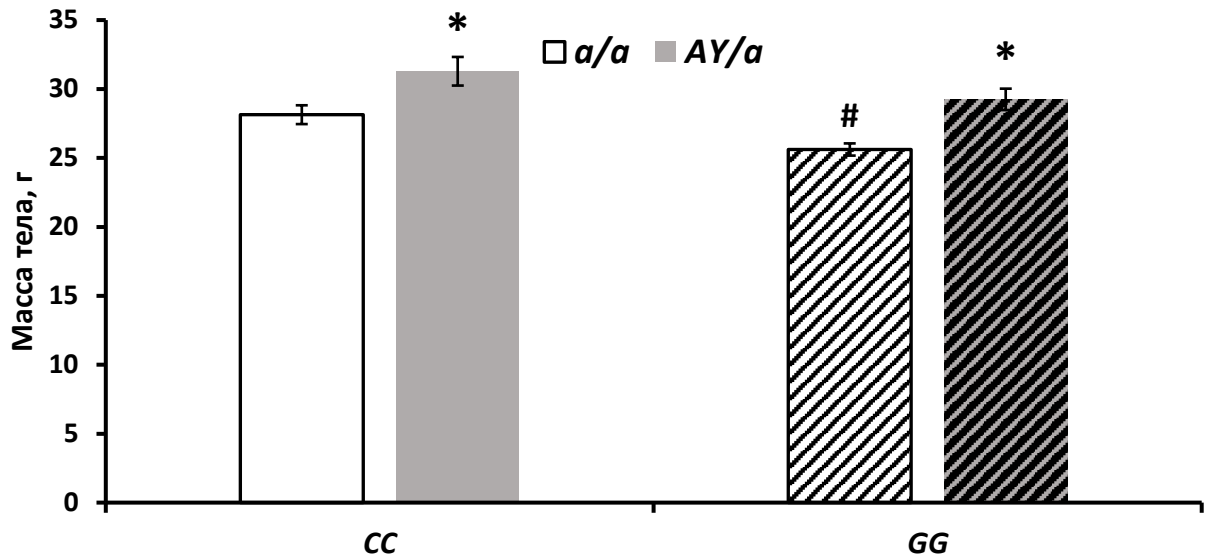


Рис.13. Масса тела (г) самцов мышей *B6-1473CC/aa*, *B6-1473CC/A^Ya*, *B6-1473GG/aa* и *B6-1473GG/A^Ya* в возрасте 3 месяца.

N = 8 особей в группе.

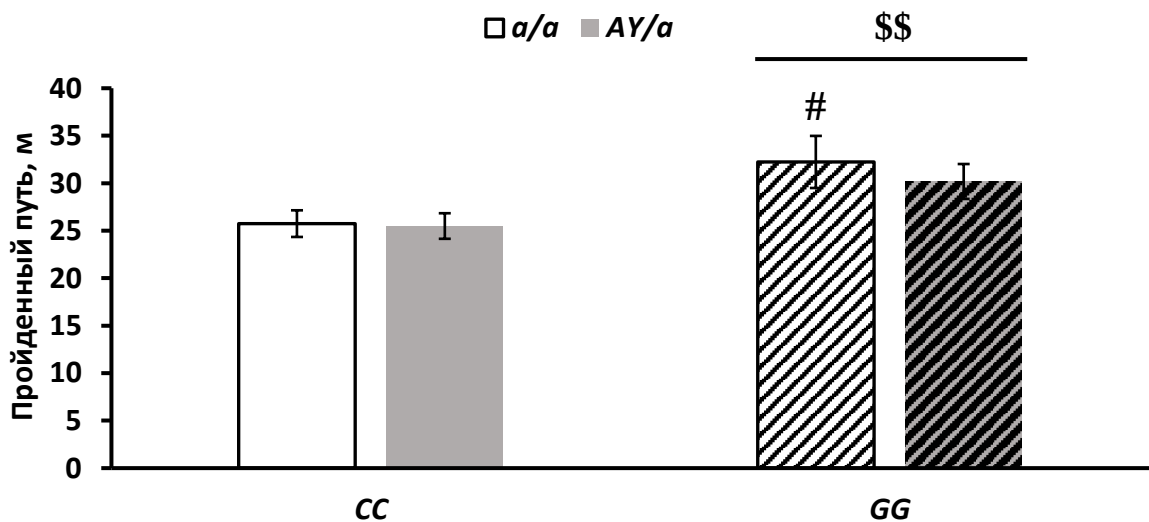
* $p < 0.05$ по сравнению с соответствующим генотипом a/a

$p < 0.05$ по сравнению с мышами *B6-1473CC/aa*

3.3.2. Поведение в тесте «открытое поле»

Самцы четырех генотипов различались по пройденному расстоянию ($F_{3,28}=3.04$, $p=0.045$), но не по времени, проведенному в центре ($F_{3,28}<1$) (Рис. 14 Б). При этом двухфакторный ANOVA выявил только влияние фактора «с.1473C>G» на пройденный путь ($F_{1,28}=8.52$, $p=0.007$), тогда как влияние фактора «A^Y» и взаимодействия факторов на данный признак не было выявлено ($F_{1,28}<1$). Аллель G увеличивала пройденный путь как с у животных с мутацией *lethal yellow*, так и у животных без этой патологии (Рис.14 А).

А)



Б)

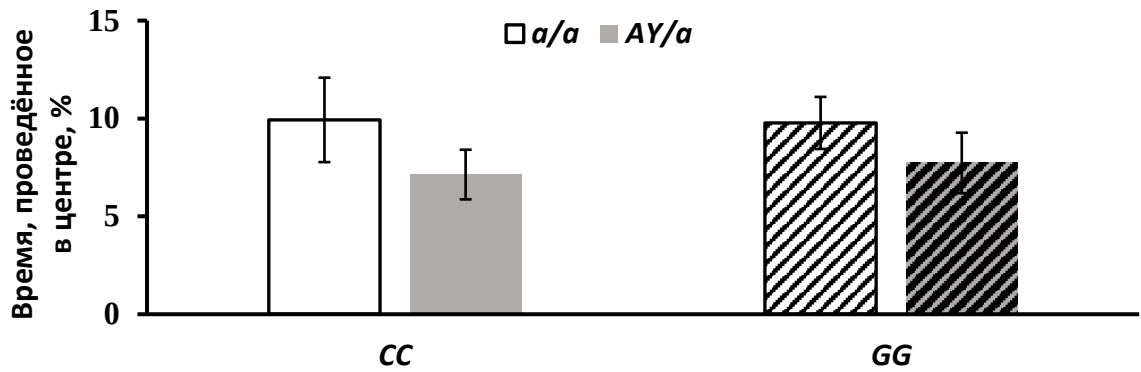


Рис.14. Пройденный путь (м) (А) и время в центре (%) (Б) в тесте «открытое поле» у самцов мышей *B6-1473CC/aa*, *B6-1473CC/A^Ya*, *B6-1473GG/aa* и *B6-1473GG/A^Ya* в возрасте 3 месяца.

N = 8 особей в группе.

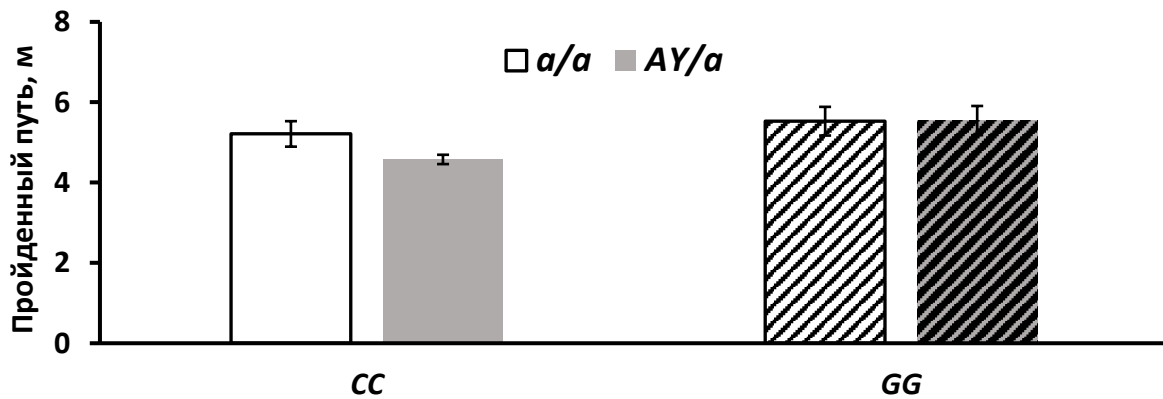
^{\$\$}p<0.01 по сравнению с мышами *1473CC*;

[#]p<0.05 по сравнению с мышами *B6-1473CC/aa*

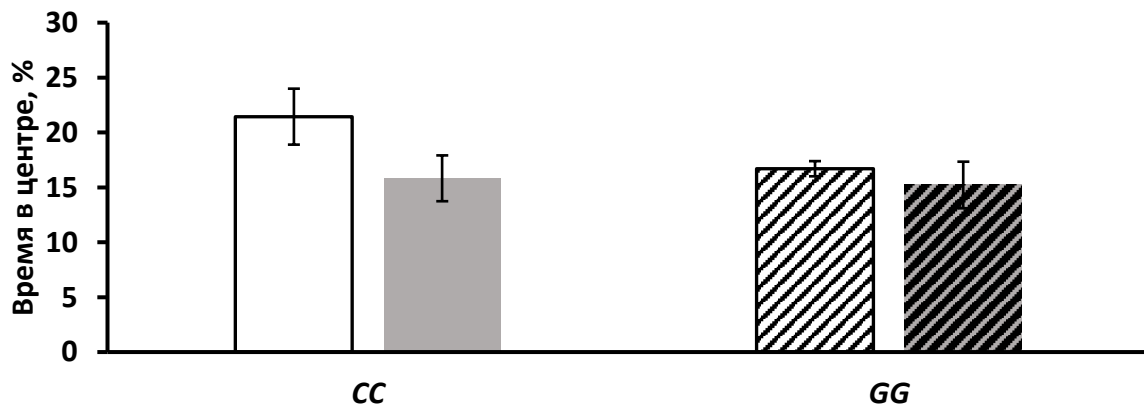
3.3.3. Поведение в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт»

В данном тесте мыши 4 генотипов не различались по величине пройденного пути ($F_{3,28}=2.2$, $p=0.11$), времени, проведённому в центре ($F_{3,28}=2.02$, $p=0.13$), открытых ($F_{3,28}<1$) и закрытых ($F_{3,28}<1$) рукавах (Рис.15).

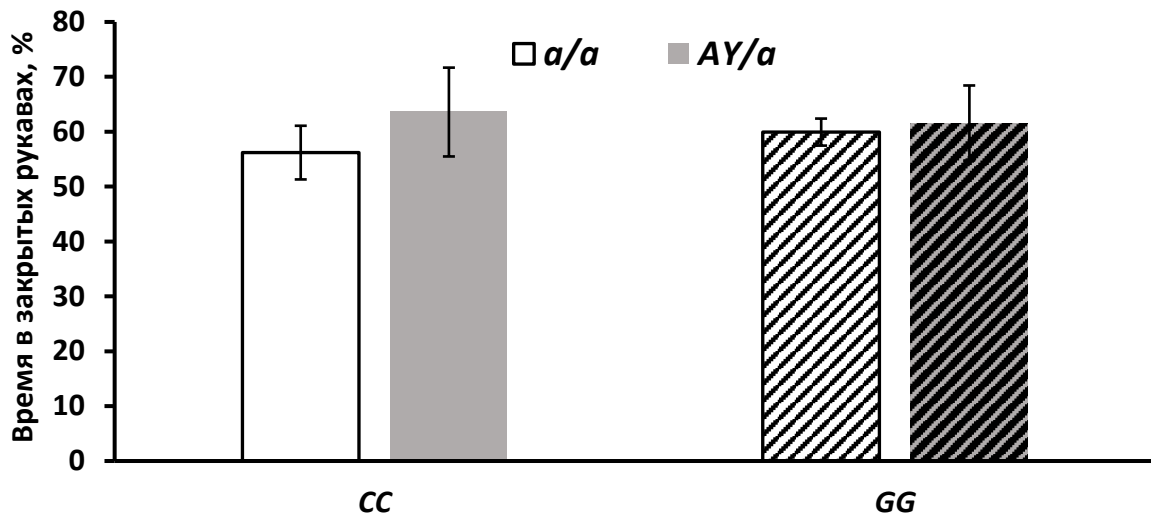
А)



Б)



В)



Г)

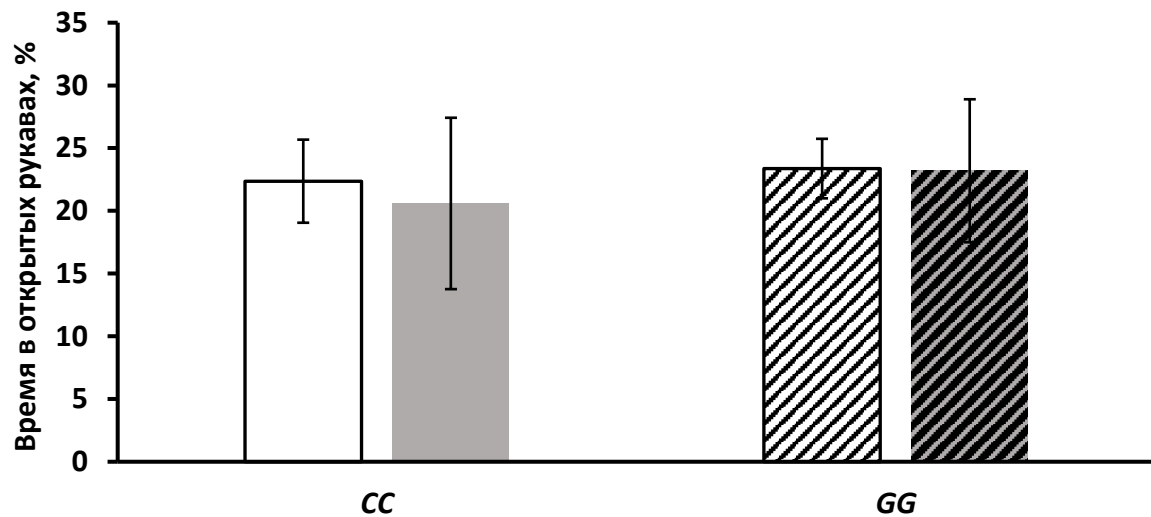


Рис. 15. Пройденный путь (м), (А) время в центре (%) (Б), закрытых (%) (В) и открытых рукавах (Г) (%) в тесте ПКЛ у самцов мышей $B6-1473CC/aa$, $B6-1473CC/A^Y a$, $B6-1473GG/aa$ и $B6-1473GG/A^Y a$ в возрасте 3 месяца.

N = 8 особей в группе.

3.3.4. Поведение в тесте «принудительное плавание»

В этом тесте самцы четырех генотипов различались по времени неподвижности ($F_{3,28}=4.6$, $p=0.01$). Было выявлено выраженное влияние факторов « $c.1473C>G$ » ($F_{1,28}=4.68$, $p=0.04$) и « A^Y » ($F_{1,28}=8.19$, $p=0.008$), но не их взаимодействия ($F_{1,28}<1$), на этот признак. Аллель G уменьшает время неподвижности, тогда как мутация A^Y увеличивает время неподвижности (Рис.16).

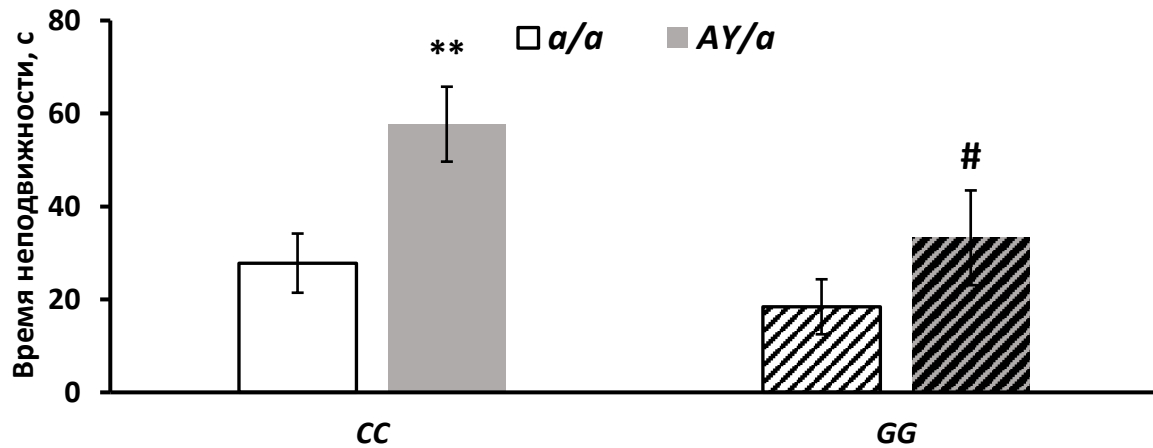


Рис.16. Общее время неподвижности (сек) в тесте принудительного плавания у самцов мышей *B6-1473CC/aa*, *B6-1473CC/A^Ya*, *B6-1473GG/aa* и *B6-1473GG/A^Ya* в возрасте 3 месяца.

N = 8 особей в группе.

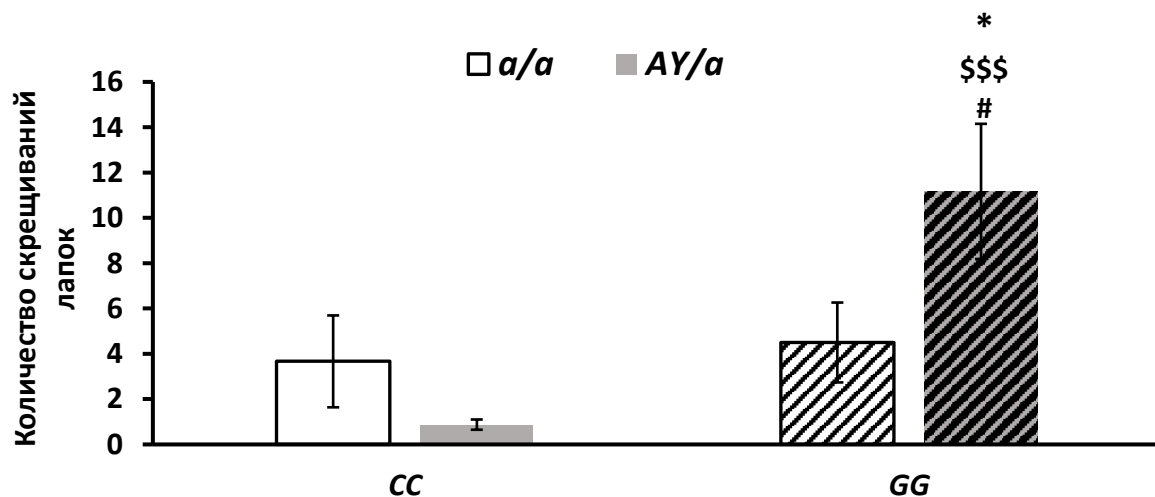
** $p < 0.01$ по сравнению с соответствующим генотипом *B6-1473CC/aa*

$p < 0.05$ по сравнению с мышами *B6-1473CC/A^Ya*

3.3.5. Поведение в тесте «подвешивание за хвост»

Самцы четырех генотипов различались по количеству ($F_{3,28}=5.29$, $p=0.005$) и суммарному времени ($F_{3,28}=4.09$, $p=0.015$) скрещивания задних конечностей. Двухфакторный дисперсионный анализ выявил выраженные эффекты фактора «с.1473C>G» (количество, $F_{1,28}=8.98$, $p=0.0023$; время, $F_{1,28}=8.32$, $p=0.0031$) и взаимодействия факторов «с.1473C>G x A^Y» (количество, $F_{1,28}=6.49$, $p=0.008$; время, $F_{1,28}=3.15$, $p=0.048$) на эти признаки. Сочетание мутаций A^Y и с.1473C>G значительно увеличивает как количество, так и суммарное время скрещивания задних конечностей у мышей *B6-1473GG/A^Ya* (Рис.17).

А)



Б)

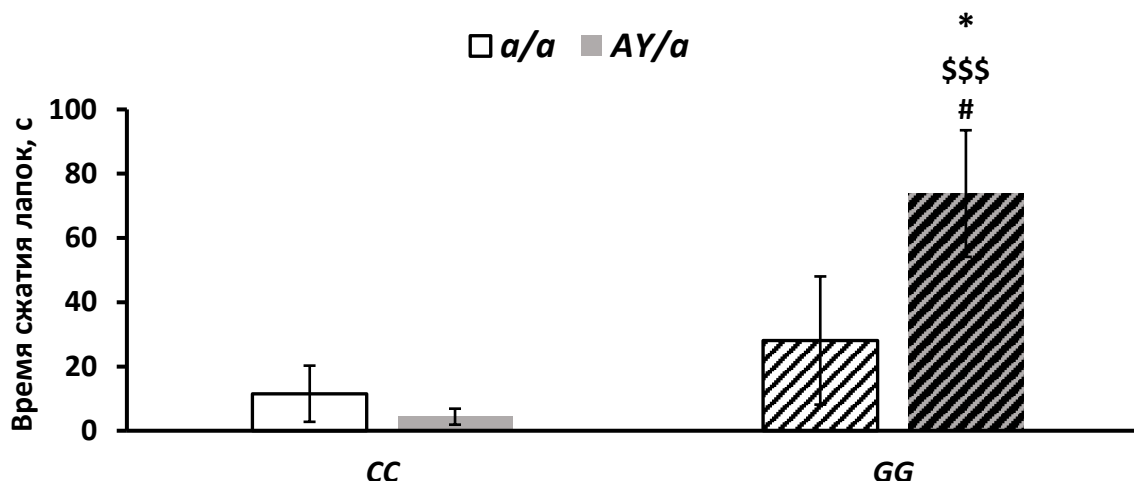


Рис.17. Количество (А) и суммарное время (Б) скрещивания задних конечностей в тесте «подвешивание за хвост» у самцов мышей B6-1473CC/aa, B6-1473CC/A^Ya, B6-1473GG/aa и B6-1473GG/A^Ya в возрасте 3 месяца.

N = 8 особей в группе.

*p<0.05 по сравнению с мышами B6-1473CC/aa;

\$\$\$p<0.001 по сравнению с мышами B6-1473CC/A^Ya;

#p<0.05 по сравнению с мышами B6-1473GG/aa

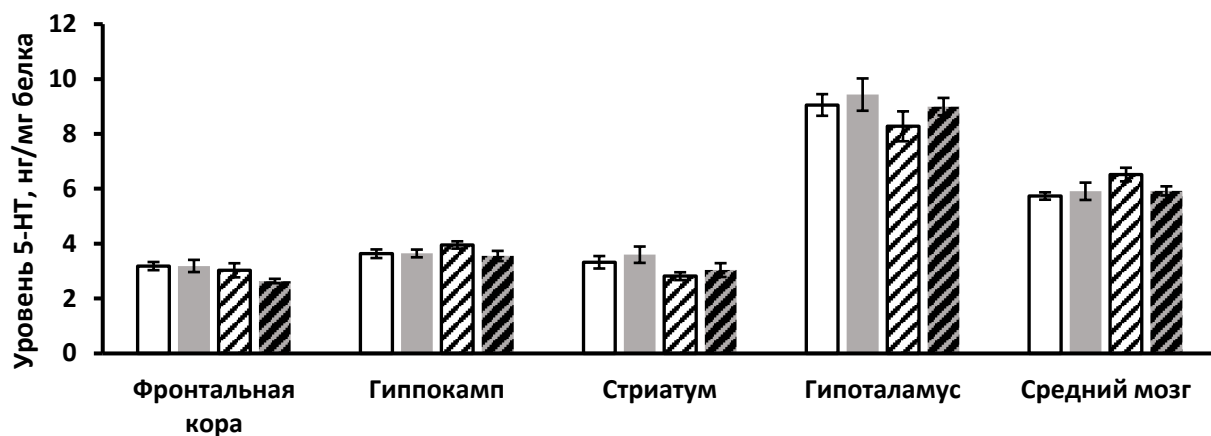
Таким образом, мутации *c.1473C>G* и *lethal yellow* оказывают противоположный эффект на массу тела и на двигательную активность в тесте «открытое поле»: первая снижает, тогда вторая увеличивает эти показатели. Впервые показано, что мутация *lethal yellow* усиливает выраженность дистонии задних конечностей (скрещивание задних лапок), вызванной, появившейся в результате полиморфизма *c.1473C>G*, аллелью G гена *Tph2*. Что приводит к проявлению данной патологии и у взрослых мышей генотипа B6-1473GG/A^Ya.

3.4. Исследование биохимии мозга и экспрессии генов MC и 5-НТ систем у самцов мышей генотипов B6-1473CC/aa, B6-1473CC/A^Ya, B6-1473GG/aa и B6-1473GG/A^Ya

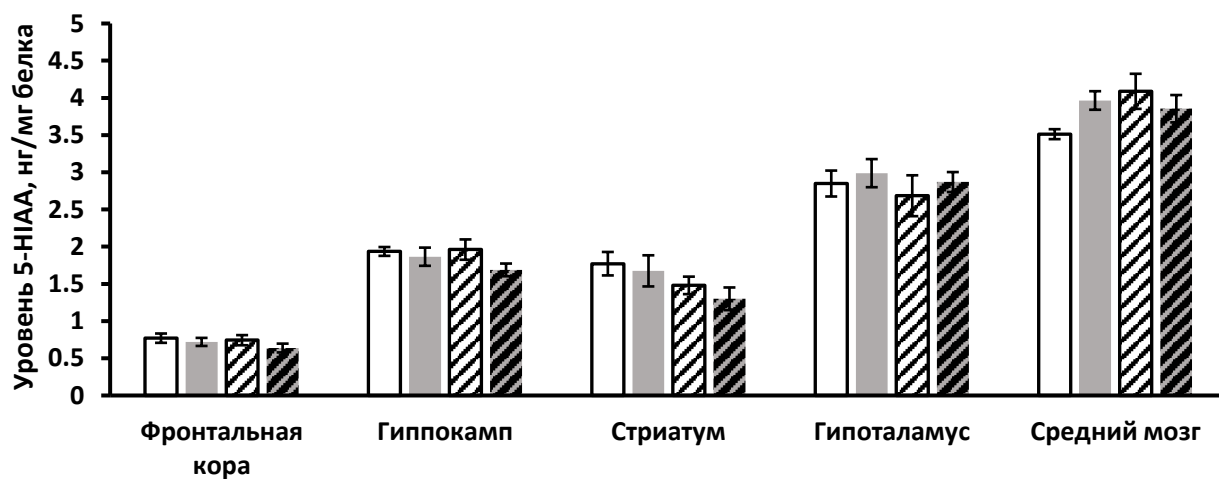
3.4.1. Уровни 5-НТ, 5-НИАА и метаболический индекс 5-НИАА/5-НТ

Самцы четырех генотипов не различались по уровням 5-НТ, 5-НИАА и индексу метаболизма 5-НИАА/5-НТ во фронтальной коре (5-НТ, $F_{3,28}=1.86$, $p=0.16$; 5-НИАА, $F_{3,28}<1$; 5-НИАА/5-НТ, $F_{3,28}<1$), гиппокампе (5-НТ, $F_{3,28}=1.28$, $p=0.30$; 5-НИАА, $F_{3,28}=1.37$, $p=0.27$; 5-НИАА/5-НТ, $F_{3,28}<1$), стриатуме (5-НТ, $F_{3,28}=2.07$, $p=0.13$; 5-НИАА, $F_{3,28}=1.67$, $p=0.20$; 5-НИАА/5-НТ, $F_{3,28}=1.84$, $p=0.16$), гипоталамусе (5-НТ, $F_{3,28}=1.04$, $p=0.39$; 5-НИАА, $F_{3,28}<1$; 5-НИАА/5-НТ, $F_{3,28}<1$) и среднем мозге (5-НТ, $F_{3,28}=2.26$, $p=0.10$; 5-НИАА, $F_{3,28}=2.24$, $p=0.11$; 5-НИАА/5-НТ, $F_{3,28}<1$) (Рис.18).

А)



Б)



В)

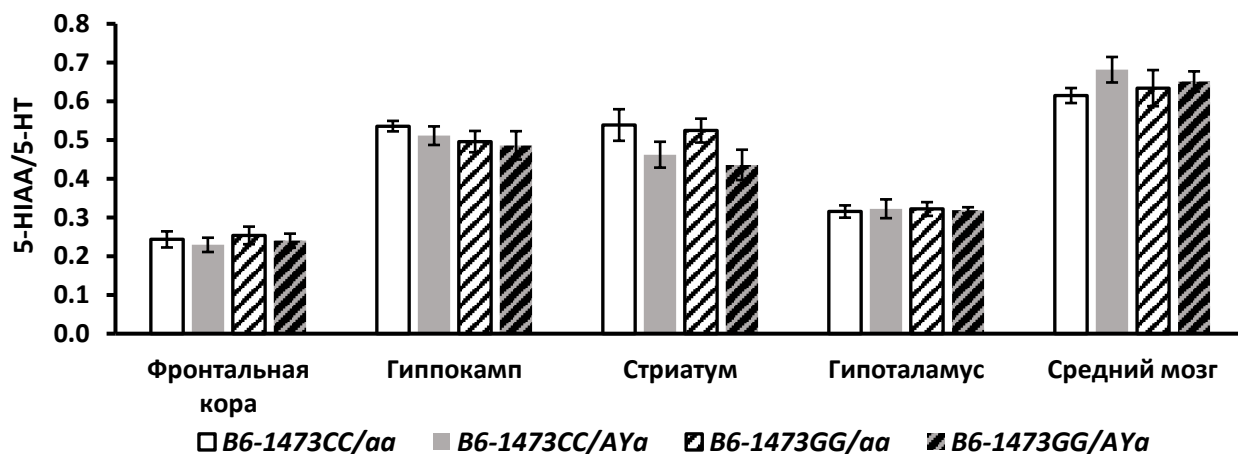


Рис. 18. Уровень биогенных аминов 5-НТ (А) и 5-НІАА (Б) и индекс метаболизма 5-НІАА/5-НТ (В) в структурах мозга у самцов мышей *B6-1473CC/aa*, *B6-1473CC/A^Ya*, *B6-1473GG/aa* и *B6-1473GG/A^Ya* в возрасте 3 месяца.

N = 8 особей в группе.

3.4.2. Активность ТПГ2

Самцы четырех генотипов различались по активности фермента ТПГ2 во фронтальной коре ($F_{3,28}=23.28$, $p<0.001$), гиппокампе ($F_{3,28}=18.37$, $p<0.001$), стриатуме ($F_{3,28}=33.81$, $p<0.001$), гипоталамусе ($F_{3,28}=11.44$, $p<0.001$) и среднем мозге ($F_{3,28}=11.3$, $p<0.001$). Двухфакторный дисперсионный анализ выявил выраженное влияние фактора «с.1473C>G» на активность фермента во фронтальной коре ($F_{1,28}=69.22$, $p<0.001$), гиппокампе ($F_{1,28}=54.2$, $p<0.001$), стриатуме ($F_{1,28}=100.29$, $p<0.001$), гипоталамусе ($F_{1,28}=32.94$, $p<0.001$) и среднем мозге ($F_{1,28}=32.16$, $p<0.001$). Активность ТПГ2 в этих структурах у мышей с генотипом 1473CC была выше по сравнению с мышами с генотипом 1473GG (Рис.19). При этом не было выявлено влияния фактора «A^Y» ($F_{1,28}<1$) или взаимодействия факторов ($F_{1,28}<1$).

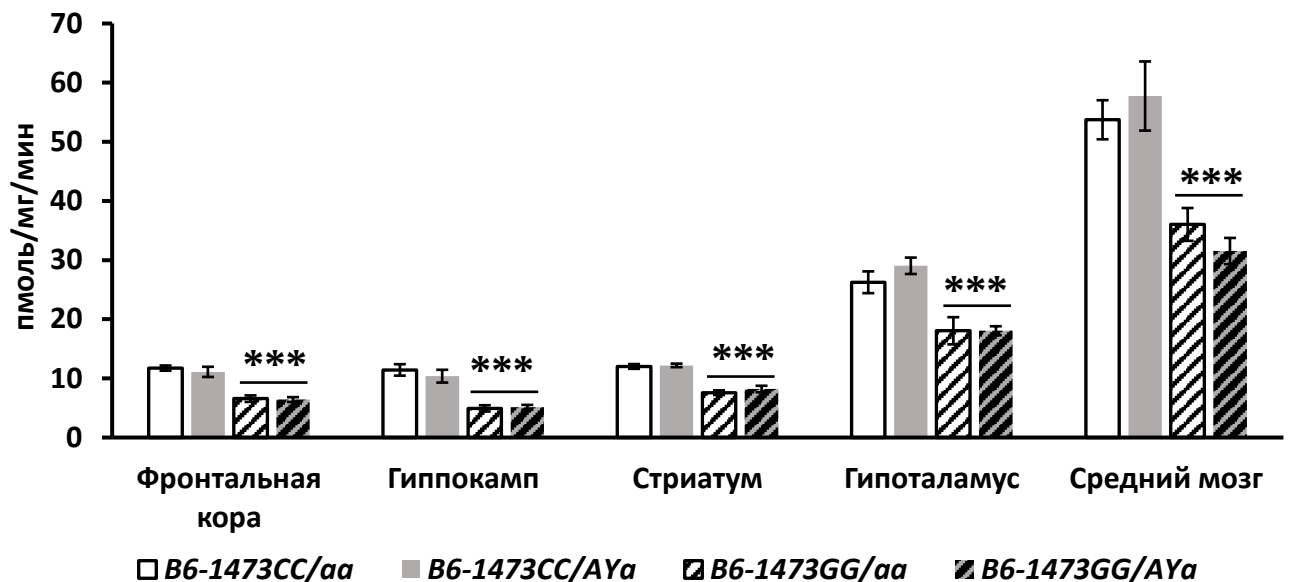


Рис. 19 Активность ТПГ2 во фронтальной коре, гиппокампе, стриатуме, гипоталамусе и среднем мозге у 3-х месячных самцов мышей B6-1473CC/aa, B6-1473CC/A^Ya, B6-1473GG/aa и B6-1473GG/A^Ya.

N = 8 особей в группе.

*** $p<0.001$ по сравнению с мышами генотипа 1473CC

3.4.3. Уровень мРНК генов серотониновой и меланокортиновой систем

У самцов четырех генотипов не наблюдалось различий в уровнях мРНК генов *Tph2*, *Maoad*, *Slc6a4*, *Htr1a*, *Htr2a*, *Mc3r* и *Mc4r* во фронтальной коре головного мозга, гиппокампе, стриатуме, гипоталамусе и среднем мозге (Табл.9). В то же время, были показаны существенные межгрупповые различия в уровнях мРНК гена *Agouti* в этих структурах (Табл.9). Двухфакторный дисперсионный анализ выявил значительное влияние фактора «A^Y» на экспрессию гена *Agouti* во фронтальной коре ($F_{1,28}=20.54$, $p<0.001$), гиппокампе ($F_{1,28}=121.84$, $p<0.001$), стриатуме

($F_{1,28}=92.79$, $p<0.001$), гипоталамусе ($F_{1,28}=72.11$, $p<0.001$) и среднем мозге ($F_{1,28}=242.62$, $p<0.001$). Как и ожидалось экспрессия этого гена в этих структурах у мышей с генотипом $A^Y a$ была выше по сравнению с мышами с генотипом aa (Табл.9). При этом не было выявлено влияния фактора «с.1473C>G» ($F_{1,28}<1$) или взаимодействия факторов ($F_{1,28}<1$) на экспрессию гена *Agouti* в этих структурах.

Таблица 9. Уровень мРНК генов *Tph2*, *Maoa*, *Slc6a4*, *Htr1a*, *Htr2a*, *Agouti*, *Mc3r* и *Mc4r* во фронтальной коре, гиппокампе, стриатуме, гипоталамусе и среднем мозге у самцов мышей *B6-1473CC/aa*, *B6-1473CC/A^Ya*, *B6-1473GG/aa* и *B6-1473GG/A^Ya* в возрасте 2-3 месяца.

N = 8 особей в группе.

Ген	<i>B6-1473CC/aa</i>	<i>B6-1473CC/A^Ya</i>	<i>B6-1473GG/aa</i>	<i>B6-1473GG/A^Ya</i>	F(3,28)
Фронтальная кора					
<i>Maoa</i>	650.3 ± 128.3	556.2 ± 50.1	632.2 ± 82.8	602.0 ± 52.4	F<1
<i>Htr1a</i>	34.0 ± 6.6	33.5 ± 4.6	37.0 ± 3.7	57.0 ± 19.2	F=1.2, p=0.3
<i>Htr2a</i>	126.0 ± 16.1	119.6 ± 11.0	140.5 ± 23.5	138.5 ± 11.4	F<1
<i>Agouti</i>	0.56 ± 0.42	36.3 ± 11.5 ***	0.07 ± 0.03	24.1 ± 6.4 **	F=7.4, p<0.001
<i>Mc3r</i>	0.72 ± 0.32	0.46 ± 0.09	0.52 ± 0.09	1.14 ± 0.47	F=1.1, p=0.4
<i>Mc4r</i>	12.20 ± 2.57	8.81 ± 1.37	11.25 ± 2.29	9.09 ± 1.54	F<1
Гиппокамп					
<i>Maoa</i>	200.0 ± 20.6	185.4 ± 17.0	185.6 ± 18.0	187.0 ± 23.6	F<1
<i>Htr1a</i>	53.5 ± 7.0	45.2 ± 4.6	40.1 ± 6.4	59.9 ± 7.2	F<1
<i>Htr2a</i>	10.5 ± 0.86	10.3 ± 1.30	10.3 ± 2.17	11.5 ± 1.59	F<1
<i>Agouti</i>	1.25 ± 0.56	30.8 ± 3.3 ***	2.23 ± 1.95	31.3 ± 3.7 ***	F=40.6, p<0.001
<i>Mc3r</i>	3.58 ± 1.33	1.68 ± 1.09	1.10 ± 0.54	3.31 ± 1.87	F<1
<i>Mc4r</i>	17.29 ± 2.58	14.84 ± 2.27	18.83 ± 7.06	16.39 ± 2.61	F<1
Стриатум					
<i>Maoa</i>	106.1 ± 9.9	114.5 ± 8.8	120.4 ± 13.9	127.2 ± 13.8	F<1
<i>Htr1a</i>	2.61 ± 0.57	3.79 ± 0.53	3.82 ± 0.54	3.51 ± 0.45	F=1.2, p=0.3
<i>Htr2a</i>	28.7 ± 2.54	30.5 ± 5.62	25.2 ± 3.35	32.5 ± 3.61	F<1
<i>Agouti</i>	0.14 ± 0.12	42.1 ± 7.6 ***	0.03 ± 0.01	61.1 ± 7.5 ***	F=33.0, p<0.001
<i>Mc3r</i>	0.50 ± 0.14	1.46 ± 0.49	0.66 ± 0.10	1.06 ± 0.29	F=2.1, p=0.1
<i>Mc4r</i>	6.90 ± 1.15	6.61 ± 1.07	6.91 ± 1.12	7.36 ± 1.05	F<1
Гипоталамус					
<i>Maoa</i>	242.7 ± 21.3	228.7 ± 18.9	249.9 ± 16.8	294.3 ± 46.4	F<1
<i>Htr1a</i>	22.8 ± 1.6	20.9 ± 2.2	20.4 ± 2.3	24.8 ± 4.7	F<1
<i>Htr2a</i>	16.81 ± 1.08	18.74 ± 2.43	18.94 ± 1.86	21.88 ± 4.36	F<1

<i>Agouti</i>	0.21 ± 0.19	40.5 ± 4.2 ***	0.02 ± 0.01	45.6 ± 9.2 ***	F=24.2, p=0.001
<i>Mc3r</i>	12.41 ± 1.18	17.67 ± 7.48	13.54 ± 2.31	13.91 ± 3.94	F<1
<i>Mc4r</i>	10.55 ± 0.62	9.91 ± 1.72	10.29 ± 1.09	11.63 ± 2.48	F<1
Средний мозг					
<i>Tph2</i>	337.2 ± 59.1	261.2 ± 51.3	375.1 ± 19.2	283.6 ± 35.8	F<1
<i>Maoa</i>	811.73.1	809.9 ± 70.6	847.9 ± 86.0	787.8 ± 50.0	F<1
<i>Slc6a4</i>	78.4 ± 9.9	57.8 ± 4.7	64.3 ± 6.9	81.0 ± 19.2	F<1
<i>Htr1a</i>	40.7 ± 3.6	34.2 ± 2.5	30.8 ± 2.8	34.4 ± 2.7	F=1.8, p=0.2
<i>Htr2a</i>	36.0 ± 3.84	30.8 ± 2.32	29.3 ± 2.45	40.9 ± 9.73	F<1
<i>Agouti</i>	5.54 ± 1.24	46.4 ± 2.4 ***	3.45 ± 0.83	48.2 ± 4.7 ***	F=81.0, p=0.001
<i>Mc3r</i>	10.21 ± 1.61	3.93 ± 1.43	6.42 ± 1.65	6.49 ± 3.06	F=2.0, p=0.1
<i>Mc4r</i>	20.13 ± 4.97	16.38 ± 2.51	15.36 ± 2.33	15.60 ± 3.19	F<1

p<0.01, *p<0.001 по сравнению с соответствующим генотипом *aa*.

Таким образом, ни в одной из исследованных структур не выявлено влияние мутации *lethal yellow* на уровень и метаболизм 5-НТ, активность ТПГ2, экспрессию генов 5-НТ системы. Также не было выявлено влияние мутации *c.1473C>G* на экспрессию гена *Agouti* и генов меланокортиновых рецепторов.

Глава 4. Обсуждение

Целью данного исследования было выяснение нарушений меланокортиновой системы, вызванных доминантной мутацией *lethal yellow* (A^Y) а также влияния этой мутации на 5-НТ систему мозга и контролируемые ею формы патологического поведения.

У лабораторных мышей данная мутация характеризуется следующими характерными фенотипическими изменениями: желтая окраска шерсти, ожирение и диабет второго типа [Boston и др., 1997]. Было высказано предположение, что эти изменения вызваны эктопической сверхэкспрессией гена *Agouti*, кодирующего одноименный белок агути, который в норме экспрессируется исключительно в волосяных фолликулах и запускает синтез желтого пигмента феомеланина [Cone и др., 1996].

Основная гипотеза развития ожирения у мышей гетерозиготных по мутации A^Y постулировала следующую цепочку молекулярных событий: (1) мутация вызывает эктопическую экспрессию белка агути в гипоталамусе, (2) белок агути ингибирует MC3R, MC4R рецепторы гипоталамуса [Lu и др., 1994], участвующие в регуляции общего энергообмена и пищевого поведения [Boston и др., 1997], (3) мыши начинают больше есть и меньше тратить энергии (меньше двигаться), что приводит к ожирению. В то же время, на момент начала данного исследования было мало экспериментальной информации подтверждающей эту гипотезу.

(1) Было показано, что в результате мутации A^Y были удалены промотор гена *Agouti* и все экзоны, кроме первого, гена *Raly*, который находится в той же транскрипционной ориентации что и *Agouti*. При этом полагали, что эта делеция ставит ген *Agouti* под управление промотором гена *Raly*, что приводит к эктопической экспрессии гена *Agouti* в различных тканях, в том числе и в нервной системе [Fan и др., 1997; Miller и др., 1993]. Однако корреляция между экспрессией гена *Raly* и *Agouti*, которая могла бы экспериментально подтвердить это предположение, показана не была.

(2) Имелись только 2 работы по влиянию мутации A^Y на меланокортиновую систему мозга. В одной работе с помощью метода Нозерн-блот было показано наличие мРНК гена *Agouti* в целом мозге у мышей с мутацией A^Y [Miller и др., 1993]. Однако не было известно экспрессируется данный ген в гипоталамусе или нет. В другой работе было показано парадоксальное увеличение экспрессии генов *Pomc*, *Mc3r*, *Mc4r* в гипоталамусе у самок мышей *C57BL/6-A^Y* в возрасте 6 мес по сравнению с самками *C57BL/6* того же возраста [Derkach и др., 2019]. Очевидно, что данный результат противоречит существующей гипотезе о связи гипофункции данных рецепторов с ожирением [Boston и др., 1997].

(3) Одна группа авторов показала увеличение потребления корма у мышей с мутацией *C57BL/6-A^Y* по сравнению с *C57BL/6* после трехчасовой депривации пищи и воды [Bazhan и др.,

2013; Бажан и др., 2005; Макарова, 2002]. Однако ничего не было известно о влиянии мутации на динамику питания при свободном доступе к корму.

Как видно имеющиеся на момент начала исследования экспериментальные данные не могут служить подтверждением существующей гипотезе о связи мутации A^Y с ожирением. Поэтому, первой задачей настоящего исследования было количественно оценить экспрессию гена *Agouti* в гипоталамусе и связь между экспрессиями генов *Agouti* и *Raly*, а также сравнить экспрессии генов *Mc3r*, *Mc4r* и *Pomc* в мозге мышей *C57BL/6-A^Y* и *C57BL/6*. Для максимального соответствия условий (пол и возраст) в данном эксперименте с условиями в эксперименте Derkach с соавторами [Derkach и др., 2019], это исследование проводили на самцах и самках в возрасте 6 мес.

Впервые были разработаны селективные праймеры для количественной ПЦР генов *Agouti* и *Raly* и впервые была количественно измерена экспрессия этих генов в коре, гиппокампе и гипоталамусе. Как и ожидалось не было обнаружено детектабельных количеств мРНК гена *Agouti* ни в одной из исследованных структур мозга ни у самцов, ни у самок *C57BL/6*. Этот результат хорошо согласуется с общепринятым представлением, что в нормальных условиях этот ген не экспрессируется в мозге. В то же время, была обнаружена высокая экспрессия гена *Agouti* в гипоталамусе самцов и самок *C57BL/6-A^Y* [Izyurov и др., 2023]. Этот результат затем был повторен на мышах генотипов *B6-1473CC/A^Ya* и *B6-1473GG/A^Ya* в возрасте 3 мес [Komleva и др., 2023]. Таким образом впервые была количественно измерена экспрессия гена *Agouti* в гипоталамусе мышей с мутацией A^Y и было получено первое экспериментальное подтверждение существующей гипотезы.

Как и ожидалось, экспрессия гена *Raly* в исследуемых структурах мозга самцов и самок *C57BL/6-A^Y* была снижена вдвое по сравнению с мышами *C57BL/6* [Izyurov и др., 2023]. Действительно в геноме мышей *C57BL/6-A^Y* содержится одна копия, тогда как в геноме мышей *C57BL/6* содержатся две копии этого гена. Более того, впервые была выявлена высокая положительная корреляция между уровнями мРНК генов *Agouti* и *Raly* в мозге [Izyurov и др., 2023]. Эта корреляция служит экспреиметальным доказательством, что у мышей *C57BL/6-A^Y* ген *Agouti* действительно находится под управлением промотора гена *Raly*. Полученный результат служит вторым экспериментальным доказательством существующей гипотезы.

В отличие от наших коллег [Derkach и др., 2019] мы не обнаружили увеличение мРНК генов *Mc3r*, *Mc4r* и *Pomc* в гипоталамусе самок *C57BL/6-A^Y* по сравнению с самками *C57BL/6* в возрасте 6 мес. Более того, мы не обнаружили увеличения экспрессии этих генов в данной структуре у самцов *C57BL/6-A^Y* в возрасте 6 мес [Izyurov и др., 2023] и 3 мес [Komleva и др., 2023] по сравнению с самцами *C57BL/6* того же возраста. Иными словами, мутация A^Y не влияет на экспрессию основных генов меланокортиновой системы мозга. Наиболее правдоподобным

объяснением противоречия между нашими результатами и результатами наших коллег является то, что последние в отличие от нас работали на мышах *C57BL/6-A^Y* и *C57BL/6* из разных стоков [Derkach и др., 2019], в которых накопились мутации, влияющие на экспрессию данных генов.

Таким образом, в результате этой части исследования были получены следующие экспериментальные результаты, подтверждающие существующую гипотезу: (1) у мышей *C57BL/6-A^Y* экспрессия гена *Agouti* находится под управлением промотора гена *Raly*, (2) это приводит к эктопической экспрессии гена *Agouti* и, возможно, белка агути в гипоталамусе, (3) мутация *A^Y* не влияет на экспрессию генов *Mc3r*, *Mc4r*, *Pomc*, *Agrp* в данной структуре. Вероятнее всего эктопическая экспрессия белка агути в гипоталамусе подавляет функцию рецепторов MC3R и MC4R в этой структуре, что, в свою очередь, может вызвать увеличение аппетита и/или снижение расхода энергии, что и может служить причиной ожирения у мышей *C57BL/6-A^Y*.

Следующим этапом исследования было выяснение физиологического механизма, связывающего эктопическую гиперэкспрессию гена *Agouti* в гипоталамусе с ожирением. Были экспериментально проверены три возможных механизма: (1) снижение двигательной активности, (2) увеличение потребления пищи и (3) снижение траты энергии. Для этого в течении 4 суток проводили суточный мониторинг двигательной активности, потребления пищи и O₂, а также экскреции CO₂. Последние два показателя использовали для непрямой калориметрии и на их основании рассчитывалась трата энергии [Ferrannini, 1988]. Полученные результаты анализировались в два этапа. На первом этапе для каждого животного по 4 кривым суточного изменений исследуемых показателей строилась одна усредненная суточная кривая. Анализ усредненных суточных кривых выявил следующие закономерности. Во-первых, животные обоих генотипов двигались больше, потребляли больше пищи, O₂, выделяли больше CO₂ и тратили больше энергии в темное время суток. Этот результат предсказуем, т.к. мыши сумеречные и ночные животные и они более активны в темное время суток [Кроукрофт, 1970]. Во-вторых, мыши генотипов *C57BL/6-A^Y* и *C57BL/6* не различались по двигательной активности (пройденный путь) [Khotskin, Izyurov, Kulikov, 2025]. Это результат хорошо согласуется с тем, что мыши этих двух генотипов не различаются по пройденному пути в домашней клетке, а так же в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт» [Izyurov и др., 2023; Khotskin и др., 2019; Komleva и др., 2023]. В-третьих, мыши *C57BL/6-A^Y* потребляли меньше пищи, чем мыши *C57BL/6*. В-четвертых, результаты непрямой калориметрии по измерению потребления O₂ и выделения CO₂ показали, что мыши *C57BL/6-A^Y* в среднем тратят меньше энергии по сравнению с животными *C57BL/6*.

Можно предполагать, что помещение в калориметрические клетки является стрессующим фактором, который может повлиять на двигательную активность, пищевое поведение и трату энергии. Поэтому на втором этапе анализировались изменения значений

данных параметров, усредненных за светлое и тёмное время суток в зависимости от дня наблюдения. У мышей обоих генотипов средняя двигательная активность ни в темное ни в светлое время суток не менялась от дня регистрации. Более того, средняя двигательная активность у мышей обоих генотипов не различалась ни в тёмное, ни в светлое время суток [Khotskin, Izyurov, Kulikov, 2025].

У мышей обоих генотипов потребление пищи и выделение CO_2 по крайней мере в темное время суток увеличивалось на 3 и 4 день регистрации по сравнению с первым днем. Кроме того, у мышей *C57BL/6* потребление O_2 и расход энергии в тёмное время суток так же увеличивались на 3 и 4 день регистрации по сравнению с первым днем. Возможное объяснение этого явления заключается в том, что мыши испытывают стресс в первые дни в метаболических клетках, но со временем они адаптируются и чувствуют себя нормально. На втором этапе обчёта также было показано снижение потребления пищи, O_2 , выделения CO_2 и расхода энергии у мышей *C57BL/6-A^Y* по сравнению с животными *C57BL/6*.

Два способа анализа динамики потребления пищи, O_2 , выделения CO_2 и расхода энергии дали сходные результаты, а именно снижение этих показателей у мышей *C57BL/6-A^Y* по сравнению с животными *C57BL/6*. Парадоксально, но мыши *C57BL/6-A^Y* потребляют меньше пищи на кг своей массы тела по сравнению с мышами *C57BL/6*, но эта разница исчезла после внесения поправки на массу тела. Этот результат противоречит результатам других авторов, которые обнаружили гиперфагию у мутантных мышей [Bazhan и др., 2013; Бажан и др., 2005]. Существует две возможные причины этого расхождения между данными этих авторов и данными, полученными в настоящем исследовании: (1) эти авторы измеряли потребление пищи в течение 3 часов, тогда как в настоящем эксперименте эти показатели измерялись в течение 96 часов, (2) в настоящем эксперименте использовался более точный инструмент для измерения потребления пищи.

Потребление O_2 и выделение CO_2 являются показателями непрямой калориметрии расхода энергии [Ferrannini, 1988]. В настоящем исследовании было показано значительное снижение этих показателей у мышей *C57BL/6-A^Y* по сравнению с мышами *C57BL/6*. Значительное снижение выделения углекислого газа у мышей *C57BL/6-A^Y* не исчезло даже после внесения поправки на увеличенную массу тела у этих мышей. Более того, тенденция к снижению потребления кислорода у мышей *C57BL/6-A^Y* сохранилась после внесения поправки на увеличенную массу тела ($p=0.065$). Поскольку мы проверили одностороннюю гипотезу о том, что мутация снижает общий метаболизм, это значение p можно считать значимым (статистический порог для односторонней гипотезы составляет $p<0.1$ [Pillemer, 1991]). Следовательно, мыши *C57BL/6-A^Y* расходуют меньше энергии по сравнению с мышами *C57BL/6*.

Результаты данного этапа исследования позволяют по-иному взглянуть на мышей с мутацией A^Y как на новую и перспективную модель экономного расхода энергии. Ранее было показано, что мыши с мутацией (A^Y , $C57BL/6-A^Y$) представляют собой относительно малозначимую модель метаболического синдрома [Kennedy и др., 2010; Tschöp, Heiman, 2001; Wolff, Roberts, Mountjoy, 1999]. Авторы, обсуждающие эту модель в своих обзорах, предполагают, что эти мыши гипоактивны и гиперфагичны [Kennedy и др., 2010; Tschöp, Heiman, 2001; Wolff, Roberts, Mountjoy, 1999]. Однако это предположение основано только на двух фактах. Во-первых, гипоталамические рецепторы MC4R регулируют потребление пищи: их агонисты и антагонисты соответственно уменьшают и увеличивают потребление пищи [Yang, Xu, 2020]. Во-вторых, мутация A^Y приводит к эктопической экспрессии гена *Agouti* (и, возможно, белка агути) в гипоталамусе, где белок агути ингибирует рецепторы MC4R [Boston и др., 1997].

Настоящее исследование впервые выявило всю цепочку молекулярных событий, запускающихся мутацией A^Y , и выявило одну из возможных причин ожирения у мутантных мышей $C57BL/6-A^Y$: мутация A^Y ставит ген *Agouti* под управление гена *Raly*, что приводит к эктопической сверхэкспрессии гена *Agouti* и, по-видимому, белка агути в гипоталамусе, где он подавляет MC3R рецепторы и вызывает снижение расхода энергии. Единственным источником энергии является потребляемая пища. Как мыши линии $C57BL/6-A^Y$, так и мыши линии $C57BL/6$ потребляли одинаковое количество пищи и, следовательно, получали одинаковое количество энергии. У мышей энергия расходуется на физиологические процессы, терморегуляцию и движение. Поскольку как мутантные, так и нормальные мыши демонстрировали схожую двигательную активность, мыши линии $C57BL/6-A^Y$, по-видимому, расходуют меньше энергии на терморегуляцию, физиологические функции и рассеивают меньше энергии по сравнению с мышами линии $C57BL/6$, и, следовательно, они преобразуют избыток энергии, полученной с пищей, в жир. Мутация A^Y , по-видимому, делает общий метаболизм более экономичным, и мутантным мышам требуется меньше пищи для нормальной жизни, в то время как питание *ad libitum* приводит к развитию метаболического синдрома у этих мышей. В этом они напоминают коренных некоторых обитателей Северной Америки, у которых в условиях постоянной нехватки пищи и даже голодания сформировался механизм экономного расходования энергии. В современных условиях Америки при избытке пищи этот механизм, адаптивный в условиях её дефицита, вызывает ожирение [Welty, 1991].

Имеются многочисленные доказательства участия 5-НТ системы в регуляции энергетического метаболизма [Voronova, 2021; Воронова, 2026]. 5-НТ нейроны иннервируют AGRP- и POMC-нейроны гипоталамуса, напрямую регулирующие потребление пищи и расход энергии [Heisler и др., 2002; Heisler и др., 2003; Heisler и др., 2006; Lam и др., 2008; Marston, Heisler, 2009]. Поэтому можно было бы предположить взаимодействие 5-НТ и меланокортиновой

систем в регуляции потребления пищи и траты энергии. Однако, проведенный нами эксперимент, результаты которого не приводятся в диссертации, не подтверждает это предположение. Было показано, что трехкратное введение 300 мг/кг ингибитора ТПГ2, п-хлорфенилаланина, приводящее к драматическому снижению уровня 5-НТ во всех структурах мозга, в том числе и в гипоталамусе, не влияло на суточную динамику потребления пищи, O_2 , выделение CO_2 и расход энергии у мышей *C57BL/5* (см. Приложение 1). Поэтому мы исключили исследование взаимодействия этих систем на уровне регуляции метаболизма из материала данной диссертации и сосредоточили все усилия на выявлении взаимодействия между этими системами на уровне поведения.

До начала данного исследования было показано, что мутация A^Y увеличивает время депрессивно подобной неподвижности в тестах «принудительное плавание» и «подвешивание за хвост» [Khotskin и др., 2019]. В ходе настоящего исследования эти результаты были подтверждены [Izyurov и др., 2023; Komleva и др., 2023]. Поскольку ингибиторы обратного захвата 5-НТ снижают время неподвижности в этих тестах, считается, что 5-НТ система участвует в регуляции данного признака [Redrobe и др., 2005]. В то же время, данная мутация по-видимому не влияет непосредственно на 5-НТ систему мозга, поскольку не было выявлено различий в уровне 5-НТ и его метаболита 5-НІАА в структурах головного мозга между мышами генотипов *C57BL/6- A^Y* и *C57BL/6* [Khotskin и др., 2019].

Задача выявления взаимодействия между 5-НТ и меланокортиновой системами на уровне мозга и поведения облегчается наличием у мышей мутации *C1473G* в гене *Tph2*, которая вдвое снижает активность ТПГ2 – ключевого фермента синтеза 5-НТ в мозге мышей [Kulikov и др., 2005; Zhang и др., 2004]. В то же время, это снижение активности ТПГ2 не сопровождается детектабельными нарушениями уровня 5-НТ в мозге [Bazhenova и др., 2017; Siesser и др., 2010]. Более того, эта мутация не влияет на выраженность большого количества форм поведения и физиологических характеристик [Koshimizu и др., 2019; Kulikova, Kulikov, 2019]. Недавно нами впервые было показано, что данная мутация увеличивает частоту и длительность дистонии задних конечностей в условиях стресса (подвешивание за хвост) у ювенильных (3 недели) мышей генотипа *B6-1473G* гомозиготных по аллели *G* [Khotskin и др., 2025]. В то же время, эта дистония исчезает у половозрелых мышей генотипа *B6-1473G* и никогда не наблюдается ни у ювенильных, ни у половозрелых мышей генотипа *B6-1473C* с ферментом дикого типа [Khotskin и др., 2025].

Для изучения влияния взаимодействия мутаций A^Y и *c.1473C>G* на меланокортиновую и 5-НТ системы мозга и на поведения нами впервые были созданы конгенные мыши генотипов *B6-1473C*, *B6-1473C- A^Y* , *B6-1473G* и *B6-1473G- A^Y* . Последний из которых сочетал обе мутации [Komleva и др., 2023]. Было показано, что в их мозге мутация A^Y не влияла на уровень 5-НТ, 5-

Н1АА, активность ТПГ2, экспрессию генов *Tph2*, *Maoa*, *Scl6a4*, *Htria*, *Htr2a*, тогда как мутация *C1473G* не влияла на экспрессию генов *Agouti*, *Agrp*, *Pomc*, *Mc3r*, *Mc4r* [Komleva и др., 2023].

В то же время, было показано, что эти мутации оказывают противоположный эффект на массу тела: мутация A^Y увеличивает, тогда как аллель *G* полиморфизма *c.1473C>G* в гене *Tph2* уменьшает этот признак [Komleva и др., 2023]. Это хорошо согласуется с тем, что нокауты гена *Tph2*, который резко снижает уровень 5-НТ в мозге, снижает массу тела у мышей *Tph2Ko* по сравнению с мышами дикого типа [Alenina и др., 2009; Gutknecht и др., 2012; Mosienko и др., 2015; Savelieva и др., 2008]. Кроме того, было показано, что эти две мутации оказывают противоположные эффект на время депрессивно-подобного замирания в тесте «принудительное плавание»: мутация A^Y увеличивает, тогда как *G* аллель уменьшает этот признак [Komleva и др., 2023].

Наиболее интересный и впечатляющий результат данного исследования является демонстрация взаимодействия данных мутаций на уровне проявления такой тяжелой патологии как дистония задних конечностей. Обычно дистония является симптомом дефицита тирозингидроксилазы [Sato и др., 2008]. Нами было показано, что на развитие данной патологии также влияет сниженная активность ТПГ2 у ювенильных, но не у взрослых мышей [Khotskin и др., 2025]. Несмотря на то, что аллели *G* и A^Y по отдельности не вызывают дистонию задних конечностей у половозрелых мышей, их сочетание приводило к высокому уровню выраженности этой патологии у взрослых мышей *B6-1473GG/A^Ya* [Komleva и др., 2023]. Следовательно, мутация A^Y может усугубить негативный эффект (дистонию), вызванный аллелью *G* полиморфизма *c.1473C>G* в гене *Tph2*. Этот результат является первой экспериментальной демонстрацией взаимодействия нарушений меланокортиновой и 5-НТ систем мозга на уровне развития патологического поведения. Ранее было показано, что мутация A^Y приводит к нарушению моторики у половозрелых мышей, что проявлялось в сниженном времени удержания на стрелке в тесте «вращающийся стержень» [Khotskin, Izyurov, Kulikov, 2025]. Поэтому принимая во внимание тот факт, что обе мутации ухудшают моторику (A^Y у взрослых животных, а *G* аллель у ювенильных мышей), можно предположить, что проявление дистонии связано с аддитивным действием данных патологий.

Заключение

Таким образом, у мышей с мутацией A^Y нами впервые была количественно измерена эктопическая сверхэкспрессия гена белка *Agouti* в гипоталамусе, а также показана корреляция экспрессии генов *Agouti* и *Raly* в головном мозге.

Впервые было показано, что данная мутация снижает расход энергии, что является наиболее вероятной причиной ожирения мышей генотипа *C57BL/6-A^Y*.

Впервые было обнаружено, что мутация A^Y усиливает выраженность дистонии задних конечностей, вызванной наследственным снижением активности ТПГ2, что приводит к проявлению данной патологии у мышей генотипа *B6-1473GG/A^Ya* в половозрелом возрасте.

Выводы

1. Мутация A^Y вызывает эктопическую сверхэкспрессию гена *Agouti* в гипоталамусе мышей *C57Bl/6-A^Y*.
2. Показана высокая положительная корреляция между уровнями мРНК генов *Agouti* и *Raly* в головном мозге мышей *C57Bl/6-A^Y*.
3. Мутация A^Y не увеличивает потребление пищи, но снижает потребление O_2 , выделение CO_2 и трату энергии у мышей *C57Bl/6-A^Y*.
4. Сочетание мутаций *c.1473C>G* в гене *Tph2* и A^Y вызывает проявление дистонии задних конечностей у половозрелых мышей генотипа *B6-1473GG/A^Ya*.

Список литературы

1. Бажан Н. М. и др. Изменение углеводно-жирового обмена в ходе развития меланокортинового ожирения у мышей с мутацией Agouti yellow // Российский физиологический журнал им. ИМ Сеченова. 2005. Т. 91. № 12. С. 1445–1453.
2. Воронова И. П. СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА МОЗГА КАК ЭФФЕКТОР СИСТЕМЫ ТЕМПЕРАТУРНОГО ГОМЕОСТАЗА ОРГАНИЗМА // НЕЙРОХИМИЯ. 2026. Т. 43. № 1. С. 3–41.
3. Кроуcroft П. Артур, Билл и другие:(Все о мышах). : Мир, 1970. 130 с.
4. Куликов А. В., Осипова Д. В., Попова Н. К. ПОЛИМОРФИЗМ C1473G В ГЕНЕ TRH2 □ ОСНОВНОЙ ФАКТОР, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЙ ГЕНЕТИЧЕСКУЮ ИЗМЕНЧИВОСТЬ АКТИВНОСТИ ТРИПТОФАНГИДРОКСИЛАЗЫ-2 В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ МЫШЕЙ // Генетика. 2007. Т. 43. № 12. С. 1676–1681.
5. Куликов А. В., Попова Н. К. Активность триптофангидроксилазы в головном мозгу мышей // Нейрохимия. 1983. Т. 2. № 4. С. 421–425.
6. Макарова Е. Н. Белки агути—новые регуляторы действия меланокортиновых рецепторов // Успехи современной биологии. 2002. Т. 122. № 4. С. 365–375.
7. Adan R. A. и др. Characterization of melanocortin receptor ligands on cloned brain melanocortin receptors and on grooming behavior in the rat. // Eur. J. Pharmacol. 1999. Т. 378. № 3. С. 249–258.
8. Albert P. R., Vahid-Ansari F. The 5-HT1A receptor: Signaling to behavior. // Biochimie. 2019. Т. 161. С. 34–45.
9. Alenina N. и др. Growth retardation and altered autonomic control in mice lacking brain serotonin. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2009. Т. 106. № 25. С. 10332–10337.
10. Alhadeff A. L. и др. A Neural Circuit for the Suppression of Pain by a Competing Need State. // Cell. 2018. Т. 173. № 1. С. 140- 152.e15.
11. Alhadeff A. L. и др. Inhibition of Itch by Hunger and AgRP Neuron Activity. // Neuroscience. 2020. Т. 450. С. 126–134.
12. Alkemade A. и др. AgRP and NPY expression in the human hypothalamic infundibular nucleus correlate with body mass index, whereas changes in α MSH are related to type 2 diabetes. // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2012. Т. 97. № 6. С. E925-33.
13. Andermann M. L., Lowell B. B. Toward a Wiring Diagram Understanding of Appetite Control. // Neuron. 2017. Т. 95. № 4. С. 757–778.
14. Aponte Y., Atasoy D., Sternson S. M. AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. // Nat. Neurosci. 2011. Т. 14. № 3. С. 351–355.
15. Arefieva A. B., Kulikov A. V. Comparison of Fluorometric and Chromatographic Methods of In Vitro Assay of Tryptophan Hydroxylase 2, the Key Enzyme of Serotonin Synthesis in the Brain. // Bull.

Exp. Biol. Med. 2023. T. 174. № 4. C. 509–513.

16. Atasoy D. и др. Deconstruction of a neural circuit for hunger. // *Nature*. 2012. T. 488. № 7410. C. 172–177.
17. Bacqué-Cazenave J. и др. Serotonin in Animal Cognition and Behavior. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. T. 21. № 5.
18. Bagnol D. и др. Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between Agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. // *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 1999. T. 19. № 18. C. RC26.
19. Barioglio S. R. De, Lezcano N., Celis M. E. Alpha MSH-induced excessive grooming behavior involves a GABAergic mechanism. // *Peptides*. 1991. T. 12. № 1. C. 203–205.
20. Baver S. B. и др. Leptin modulates the intrinsic excitability of AgRP/NPY neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus. // *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 2014. T. 34. № 16. C. 5486–5496.
21. Bazhan N. M. и др. Exaggerated anorexigenic response to restraint stress in A(y) mice is associated with elevated CRFR2 mRNA expression in the hypothalamus. // *Physiol. Behav.* 2013. T. 120. C. 19–25.
22. Bazhenova E. Y. и др. C1473G polymorphism in mouse tryptophan hydroxylase-2 gene in the regulation of the reaction to emotional stress. // *Neurosci. Lett.* 2017. T. 640. C. 105–110.
23. Bazhenova E. Y. и др. Effect of photoperiodic alterations on depression-like behavior and the brain serotonin system in mice genetically different in tryptophan hydroxylase 2 activity. // *Neurosci. Lett.* 2019. T. 699. C. 91–96.
24. Beaulieu J.-M. и др. Role of GSK3 beta in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. T. 105. № 4. C. 1333–1338.
25. Berglund E. D. и др. Serotonin 2C receptors in pro-opiomelanocortin neurons regulate energy and glucose homeostasis. // *J. Clin. Invest.* 2013. T. 123. № 12. C. 5061–5070.
26. Betley J. N. и др. Parallel, redundant circuit organization for homeostatic control of feeding behavior. // *Cell*. 2013. T. 155. № 6. C. 1337–1350.
27. Betley J. N. и др. Neurons for hunger and thirst transmit a negative-valence teaching signal. // *Nature*. 2015. T. 521. № 7551. C. 180–185.
28. Blasquez C. и др. Central-type benzodiazepines inhibit release of alpha-melanocyte-stimulating hormone from the rat hypothalamus. // *Neuroscience*. 1991. T. 42. № 2. C. 509–516.
29. Boston B. A. и др. Independent and additive effects of central POMC and leptin pathways on murine obesity. // *Science*. 1997. T. 278. № 5343. C. 1641–1644.
30. Brown K. S., Gentry R. M., Rowland N. E. Central injection in rats of alpha-melanocyte-stimulating hormone analog: effects on food intake and brain Fos. // *Regul. Pept.* 1998. T. 78. № 1–3. C. 89–94.

31. Bultman S. J., Michaud E. J., Woychik R. P. Molecular characterization of the mouse agouti locus. // *Cell*. 1992. Т. 71. № 7. С. 1195–1204.
32. Bumaschny V. F. и др. Obesity-programmed mice are rescued by early genetic intervention. // *J. Clin. Invest.* 2012. Т. 122. № 11. С. 4203–4212.
33. Burnett C. J. и др. Hunger-Driven Motivational State Competition. // *Neuron*. 2016. Т. 92. № 1. С. 187–201.
34. Burnett C. J. и др. Need-based prioritization of behavior. // *Elife*. 2019. Т. 8.
35. Butler A. A. и др. A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse. // *Endocrinology*. 2000. Т. 141. № 9. С. 3518–3521.
36. Butler A. A., Cone R. D. The melanocortin receptors: lessons from knockout models. // *Neuropeptides*. 2002. Т. 36. № 2–3. С. 77–84.
37. Caldwell H. K., Lepri J. J. Disruption of the fifth melanocortin receptor alters the urinary excretion of aggression-modifying pheromones in male house mice. // *Chem. Senses*. 2002. Т. 27. № 1. С. 91–94.
38. Campos C. A. и др. Parabrachial CGRP Neurons Control Meal Termination. // *Cell Metab.* 2016. Т. 23. № 5. С. 811–820.
39. Carroll L., Voisey J., Daal A. van. Mouse models of obesity. // *Clin. Dermatol.* 2004. Т. 22. № 4. С. 345–349.
40. Cervo L. и др. Genotype-dependent activity of tryptophan hydroxylase-2 determines the response to citalopram in a mouse model of depression. // *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 2005. Т. 25. № 36. С. 8165–8172.
41. Chaki S. и др. Involvement of the melanocortin MC4 receptor in stress-related behavior in rodents. // *Eur. J. Pharmacol.* 2003. Т. 474. № 1. С. 95–101.
42. Chaki S., Okuyama S. Involvement of melanocortin-4 receptor in anxiety and depression. // *Peptides*. 2005. Т. 26. № 10. С. 1952–1964.
43. Chen A. S. и др. Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. // *Nat. Genet.* 2000. Т. 26. № 1. С. 97–102.
44. Chen W. и др. Exocrine gland dysfunction in MC5-R-deficient mice: evidence for coordinated regulation of exocrine gland function by melanocortin peptides. // *Cell*. 1997. Т. 91. № 6. С. 789–798.
45. Chen Y. и др. Sustained NPY signaling enables AgRP neurons to drive feeding. // *Elife*. 2019. Т. 8.
46. Cheng M. и др. Computational analyses of obesity associated loci generated by genome-wide association studies. // *PLoS One*. 2018. Т. 13. № 7. С. e0199987.
47. Cheung C. C., Clifton D. K., Steiner R. A. Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. // *Endocrinology*. 1997. Т. 138. № 10. С. 4489–4492.

48. Chhajlani V. Distribution of cDNA for melanocortin receptor subtypes in human tissues. // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1996. T. 38. № 1. C. 73–80.
49. Chopin P., Briley M. Animal models of anxiety: the effect of compounds that modify 5-HT neurotransmission // *Trends Pharmacol. Sci.* 1987. T. 8. № 10. C. 383–388.
50. Clarke A., File S. E. Social and exploratory behaviour in the rat after septal administration of ORG 2766 and ACTH4-10. // *Psychoneuroendocrinology.* 1983. T. 8. № 3. C. 343–350.
51. Cone R. D. и др. Cloning and functional characterization of a family of receptors for the melanotropic peptides. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1993. T. 680. C. 342–363.
52. Cone R. D. и др. The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. // *Recent Prog. Horm. Res.* 1996. T. 51. C. 287–317; discussion 318.
53. Cone R. D. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. // *Nat. Neurosci.* 2005. T. 8. № 5. C. 571–578.
54. Cone R. D. Studies on the physiological functions of the melanocortin system. // *Endocr. Rev.* 2006. T. 27. № 7. C. 736–749.
55. Copperi F., Kim J. D., Diano S. Melanocortin Signaling Connecting Systemic Metabolism With Mood Disorders. // *Biol. Psychiatry.* 2022. T. 91. № 10. C. 879–887.
56. Corda M. G., Orlandi M., Fratta W. Proconflict effect of ACTH1-24: interaction with benzodiazepines. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1990. T. 36. № 3. C. 631–634.
57. Cornish J. и др. alpha -melanocyte-stimulating hormone is a novel regulator of bone. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003. T. 284. № 6. C. E1181-90.
58. Cowley M. A. и др. Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. // *Neuron.* 1999. T. 24. № 1. C. 155–163.
59. Cowley M. A. и др. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. // *Nature.* 2001. T. 411. № 6836. C. 480–484.
60. D’Agostino G. и др. Nucleus of the Solitary Tract Serotonin 5-HT(2C) Receptors Modulate Food Intake. // *Cell Metab.* 2018. T. 28. № 4. C. 619- 630.e5.
61. Delaney A. и др. Involvement of the melanocortin-1 receptor in acute pain and pain of inflammatory but not neuropathic origin. // *PLoS One.* 2010. T. 5. № 9. C. e12498.
62. Denenberg V. H. OPEN-FIELD BEHAVIOR IN THE RAT: WHAT DOES IT MEAN?* // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1969. T. 159. № 3. C. 852–859.
63. Deneris E., Gaspar P. Serotonin neuron development: shaping molecular and structural identities. // *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2018. T. 7. № 1.
64. Derkach K. и др. The evidence of metabolic-improving effect of metformin in Ay/a mice with genetically-induced melanocortin obesity and the contribution of hypothalamic mechanisms to this

effect. // PLoS One. 2019. T. 14. № 3. C. e0213779.

65. Dietrich M. O. и др. Hypothalamic AgRP Neurons Drive Stereotypic Behaviors beyond Feeding. // Cell. 2017. T. 169. № 3. C. 559.

66. Dunn A. J., Green E. J., Isaacson R. L. Intracerebral adrenocorticotrophic hormone mediates novelty-induced grooming in the rat. // Science. 1979. T. 203. № 4377. C. 281–283.

67. Ellacott K. L. J., Cone R. D. The role of the central melanocortin system in the regulation of food intake and energy homeostasis: lessons from mouse models. // Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci. 2006. T. 361. № 1471. C. 1265–1274.

68. Engström Ruud L. и др. NPY mediates the rapid feeding and glucose metabolism regulatory functions of AgRP neurons. // Nat. Commun. 2020. T. 11. № 1. C. 442.

69. Ericson M. D. и др. Bench-top to clinical therapies: A review of melanocortin ligands from 1954 to 2016. // Biochim. Biophys. acta. Mol. basis Dis. 2017. T. 1863. № 10 Pt A. C. 2414–2435.

70. Fan W. и др. Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. // Nature. 1997. T. 385. № 6612. C. 165–168.

71. Farooqi I. S. и др. Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. // J. Clin. Invest. 2000. T. 106. № 2. C. 271–279.

72. Farooqi I. S. и др. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. // N. Engl. J. Med. 2003. T. 348. № 12. C. 1085–1095.

73. Fenselau H. и др. A rapidly acting glutamatergic ARC→PVH satiety circuit postsynaptically regulated by α -MSH. // Nat. Neurosci. 2017. T. 20. № 1. C. 42–51.

74. Ferrannini E. The theoretical bases of indirect calorimetry: a review. // Metabolism. 1988. T. 37. № 3. C. 287–301.

75. File S. E., Clarke A. Intraventricular ACTH reduces social interaction in male rats. // Pharmacol. Biochem. Behav. 1980. T. 12. № 5. C. 711–715.

76. Friedman J. 20 years of leptin: leptin at 20: an overview. // J. Endocrinol. 2014. T. 223. № 1. C. T1–8.

77. Gantz I. и др. Molecular cloning of a novel melanocortin receptor. // J. Biol. Chem. 1993. T. 268. № 11. C. 8246–8250.

78. Garfield A. S. и др. A neural basis for melanocortin-4 receptor-regulated appetite. // Nat. Neurosci. 2015. T. 18. № 6. C. 863–871.

79. Ghamari-Langroudi M. и др. G-protein-independent coupling of MC4R to Kir7.1 in hypothalamic neurons. // Nature. 2015. T. 520. № 7545. C. 94–98.

80. Gonzalez M. I., Vaziri S., Wilson C. A. Behavioral effects of α -MSH and MCH after central administration in the female rat. // Peptides. 1996. T. 17. № 1. C. 171–177.

81. Gutknecht L. и др. Deficiency of brain 5-HT synthesis but serotonergic neuron formation in

Tph2 knockout mice. // J. Neural Transm. 2008. T. 115. № 8. C. 1127–1132.

82. Gutknecht L. и др. Impacts of brain serotonin deficiency following Tph2 inactivation on development and raphe neuron serotonergic specification. // PLoS One. 2012. T. 7. № 8. C. e43157.

83. Guzzetti S. и др. Strain differences in paroxetine-induced reduction of immobility time in the forced swimming test in mice: role of serotonin. // Eur. J. Pharmacol. 2008. T. 594. № 1–3. C. 117–124.

84. Hagan M. M. и др. Long-term orexigenic effects of AgRP-(83---132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade. // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2000. T. 279. № 1. C. R47-52.

85. Hagan M. M. и др. Immediate and prolonged patterns of Agouti-related peptide-(83--132)-induced c-Fos activation in hypothalamic and extrahypothalamic sites. // Endocrinology. 2001. T. 142. № 3. C. 1050–1056.

86. Heisler L. K. и др. Activation of central melanocortin pathways by fenfluramine. // Science. 2002. T. 297. № 5581. C. 609–611.

87. Heisler L. K. и др. Central serotonin and melanocortin pathways regulating energy homeostasis. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2003. T. 994. C. 169–174.

88. Heisler L. K. и др. Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake. // Neuron. 2006. T. 51. № 2. C. 239–249.

89. Hornung J.-P. The Neuronatomy of the Serotonergic System // Handbook of Behavioral Neuroscience. , 2010. C. 51–64.

90. Huszar D. и др. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. // Cell. 1997. T. 88. № 1. C. 131–141.

91. Ilnytska O., Argyropoulos G. The role of the Agouti-Related Protein in energy balance regulation. // Cell. Mol. Life Sci. 2008. T. 65. № 17. C. 2721–2731.

92. Izyurov A. E. и др. Lethal Yellow Mutation Causes Anxiety, Obsessive-compulsive Behavior and Affects the Brain Melanocortin System in Males and Females of Mice. // Curr. Protein Pept. Sci. 2023. T. 24. № 4. C. 329–338.

93. Jégou S., Boutelet I., Vaudry H. Melanocortin-3 receptor mRNA expression in pro-opiomelanocortin neurones of the rat arcuate nucleus. // J. Neuroendocrinol. 2000. T. 12. № 6. C. 501–505.

94. Joseph S. A., Pilcher W. H., Bennett-Clarke C. Immunocytochemical localization of ACTH perikarya in nucleus tractus solitarius: evidence for a second opiocortin neuronal system. // Neurosci. Lett. 1983. T. 38. № 3. C. 221–225.

95. Kane M. J. и др. Mice genetically depleted of brain serotonin display social impairments, communication deficits and repetitive behaviors: possible relevance to autism. // PLoS One. 2012. T. 7. № 11. C. e48975.

96. Kennedy A. J. и др. Mouse models of the metabolic syndrome. // *Dis. Model. Mech.* 2010. Т. 3. № 3–4. С. 156–166.
97. Khotskin N. V и др. On association of the lethal yellow (A(Y)) mutation in the agouti gene with the alterations in mouse brain and behavior. // *Behav. Brain Res.* 2019. Т. 359. С. 446–456.
98. Khotskin N. V и др. The C1473G Mutation in the Mouse Tph2 Gene: From Molecular Mechanism to Biological Consequences. // *Biomolecules.* 2025. Т. 15. № 4.
99. Khotskin N. V, Izyurov A. E., Kulikov A. V. Lethal yellow mutation in the Raly-Agouti locus reduces the energy expenditure in male mice. // *Neurosci. Lett.* 2025. Т. 866. С. 138374.
100. Kirwan P. и др. Quantitative mass spectrometry for human melanocortin peptides in vitro and in vivo suggests prominent roles for β -MSH and desacetyl α -MSH in energy homeostasis. // *Mol. Metab.* 2018. Т. 17. С. 82–97.
101. Kishi T. и др. Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. // *J. Comp. Neurol.* 2003. Т. 457. № 3. С. 213–235.
102. Kiss J., Léránth C., Halász B. Serotonergic endings on VIP-neurons in the suprachiasmatic nucleus and on ACTH-neurons in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. A combination of high resolution autoradiography and electron microscopic immunocytochemistry. // *Neurosci. Lett.* 1984. Т. 44. № 2. С. 119–124.
103. Komleva P. D. и др. Effects of the Combination of the C1473G Mutation in the Tph2 Gene and Lethal Yellow Mutations in the Raly-Agouti Locus on Behavior, Brain 5-HT and Melanocortin Systems in Mice. // *Biomolecules.* 2023. Т. 13. № 6.
104. Koshimizu H. и др. Comprehensive behavioral analysis and quantification of brain free amino acids of C57BL/6J congenic mice carrying the 1473G allele in tryptophan hydroxylase-2. // *Neuropsychopharmacol. reports.* 2019. Т. 39. № 1. С. 56–60.
105. Krashes M. J. и др. Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. // *J. Clin. Invest.* 2011. Т. 121. № 4. С. 1424–1428.
106. Krashes M. J. и др. Rapid versus delayed stimulation of feeding by the endogenously released AgRP neuron mediators GABA, NPY, and AgRP. // *Cell Metab.* 2013. Т. 18. № 4. С. 588–595.
107. Krashes M. J., Lowell B. B., Garfield A. S. Melanocortin-4 receptor-regulated energy homeostasis. // *Nat. Neurosci.* 2016. Т. 19. № 2. С. 206–219.
108. Krude H. и др. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. // *Nat. Genet.* 1998. Т. 19. № 2. С. 155–157.
109. Kulikov A. V и др. Association between Tph2 gene polymorphism, brain tryptophan hydroxylase activity and aggressiveness in mouse strains. // *Genes. Brain. Behav.* 2005. Т. 4. № 8. С. 482–485.
110. Kulikov A. V и др. A pharmacological evidence of positive association between mouse intermale

- aggression and brain serotonin metabolism. // *Behav. Brain Res.* 2012. T. 233. № 1. C. 113–119.
111. Kulikov A. V, Popova N. K. Tryptophan hydroxylase 2 in seasonal affective disorder: underestimated perspectives? // *Rev. Neurosci.* 2015. T. 26. № 6. C. 679–690.
 112. Kulikov A. V, Tikhonova M. A., Kulikov V. A. Automated measurement of spatial preference in the open field test with transmitted lighting. // *J. Neurosci. Methods.* 2008. T. 170. № 2. C. 345–351.
 113. Kulikova E. A., Kulikov A. V. Tryptophan hydroxylase 2 as a therapeutic target for psychiatric disorders: focus on animal models. // *Expert Opin. Ther. Targets.* 2019. T. 23. № 8. C. 655–667.
 114. Kuo J. J., Silva A. A., Hall J. E. Hypothalamic melanocortin receptors and chronic regulation of arterial pressure and renal function. // *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979).* 2003. T. 41. № 3 Pt 2. C. 768–774.
 115. Labbé O. и др. Molecular cloning of a mouse melanocortin 5 receptor gene widely expressed in peripheral tissues. // *Biochemistry.* 1994. T. 33. № 15. C. 4543–4549.
 116. Lam B. Y. H. и др. MC3R links nutritional state to childhood growth and the timing of puberty. // *Nature.* 2021. T. 599. № 7885. C. 436–441.
 117. Lam D. D. и др. Serotonin 5-HT_{2C} receptor agonist promotes hypophagia via downstream activation of melanocortin 4 receptors. // *Endocrinology.* 2008. T. 149. № 3. C. 1323–1328.
 118. Lee Y. S. и др. A POMC variant implicates beta-melanocyte-stimulating hormone in the control of human energy balance. // *Cell Metab.* 2006. T. 3. № 2. C. 135–140.
 119. Li G. и др. Melanocortin activation of nucleus of the solitary tract avoids anorectic tachyphylaxis and induces prolonged weight loss. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2007. T. 293. № 1. C. E252–8.
 120. Li S. J. и др. Melanocortin antagonists define two distinct pathways of cardiovascular control by alpha- and gamma-melanocyte-stimulating hormones. // *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 1996. T. 16. № 16. C. 5182–5188.
 121. Liu H. и др. Transgenic mice expressing green fluorescent protein under the control of the melanocortin-4 receptor promoter. // *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 2003. T. 23. № 18. C. 7143–7154.
 122. Liu Y. и др. Molecular regulation of sexual preference revealed by genetic studies of 5-HT in the brains of male mice. // *Nature.* 2011. T. 472. № 7341. C. 95–99.
 123. Loos R. J. F. и др. Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. // *Nat. Genet.* 2008. T. 40. № 6. C. 768–775.
 124. Low M. J., Simerly R. B., Cone R. D. Receptors for the melanocortin peptides in the central nervous system // *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes.* 1994. T. 1. № 1. C. 79–88.
 125. Lu D. и др. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. // *Nature.* 1994. T. 371. № 6500. C. 799–802.

126. Luquet S. и др. NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. // *Science*. 2005. Т. 310. № 5748. С. 683–685.
127. Madden C. J., Morrison S. F. Serotonin potentiates sympathetic responses evoked by spinal NMDA. // *J. Physiol*. 2006. Т. 577. № Pt 2. С. 525–537.
128. Madden C. J., Morrison S. F. Endogenous activation of spinal 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors contributes to the thermoregulatory activation of brown adipose tissue. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 2010. Т. 298. № 3. С. R776-83.
129. Marks D. L. и др. The regulation of food intake by selective stimulation of the type 3 melanocortin receptor (MC3R). // *Peptides*. 2006. Т. 27. № 2. С. 259–264.
130. Marston O. J., Garfield A. S., Heisler L. K. Role of central serotonin and melanocortin systems in the control of energy balance. // *Eur. J. Pharmacol*. 2011. Т. 660. № 1. С. 70–79.
131. Marston O. J., Heisler L. K. Targeting the serotonin 2C receptor for the treatment of obesity and type 2 diabetes. // *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol*. 2009. Т. 34. № 1. С. 252–253.
132. Matthes S. и др. Tryptophan hydroxylase as novel target for the treatment of depressive disorders. // *Pharmacology*. 2010. Т. 85. № 2. С. 95–109.
133. McGlashon J. M. и др. Central serotonergic neurons activate and recruit thermogenic brown and beige fat and regulate glucose and lipid homeostasis. // *Cell Metab*. 2015. Т. 21. № 5. С. 692–705.
134. McKinney J. A. и др. Functional properties of missense variants of human tryptophan hydroxylase 2. // *Hum. Mutat*. 2009. Т. 30. № 5. С. 787–794.
135. Mercer A. J. и др. Unraveling the central proopiomelanocortin neural circuits. // *Front. Neurosci*. 2013. Т. 7. С. 19.
136. Meyer J. S., Quenzer L. F. *Psychopharmacology: Drugs, the Brain, and Behavior* / под ред. J. S. Meyer, L. F. Quenzer. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2019. Вып. 3. 192–196 с.
137. Michaud E. J. и др. The embryonic lethality of homozygous lethal yellow mice (Ay/Ay) is associated with the disruption of a novel RNA-binding protein. // *Genes Dev*. 1993. Т. 7. № 7A. С. 1203–1213.
138. Michaud E. J. и др. A molecular model for the genetic and phenotypic characteristics of the mouse lethal yellow (Ay) mutation. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 1994. Т. 91. № 7. С. 2562–2566.
139. Migliarini S. и др. Lack of brain serotonin affects postnatal development and serotonergic neuronal circuitry formation. // *Mol. Psychiatry*. 2013. Т. 18. № 10. С. 1106–1118.
140. Miller M. W. и др. Cloning of the mouse agouti gene predicts a secreted protein ubiquitously expressed in mice carrying the lethal yellow mutation. // *Genes Dev*. 1993. Т. 7. № 3. С. 454–467.
141. Morgan C., Thomas R. E., Cone R. D. Melanocortin-5 receptor deficiency promotes defensive behavior in male mice. // *Horm. Behav*. 2004. Т. 45. № 1. С. 58–63.

142. Morrison S. F., Madden C. J., Tupone D. Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure. // *Cell Metab.* 2014. T. 19. № 5. С. 741–756.
143. Mosienko V. и др. Exaggerated aggression and decreased anxiety in mice deficient in brain serotonin. // *Transl. Psychiatry.* 2012. T. 2. № 5. С. e122.
144. Mosienko V. и др. Life without brain serotonin: reevaluation of serotonin function with mice deficient in brain serotonin synthesis. // *Behav. Brain Res.* 2015. T. 277. С. 78–88.
145. Mountjoy K. G. и др. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. // *Science.* 1992. T. 257. № 5074. С. 1248–1251.
146. Mountjoy K. G. и др. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. // *Mol. Endocrinol.* 1994. T. 8. № 10. С. 1298–1308.
147. Mountjoy K. G. Distribution and function of melanocortin receptors within the brain. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010. T. 681. С. 29–48.
148. Mountjoy K. G. Pro-Opiomelanocortin (POMC) Neurones, POMC-Derived Peptides, Melanocortin Receptors and Obesity: How Understanding of this System has Changed Over the Last Decade. // *J. Neuroendocrinol.* 2015. T. 27. № 6. С. 406–418.
149. Mountjoy K. G. и др. Desacetyl- α -melanocyte stimulating hormone and α -melanocyte stimulating hormone are required to regulate energy balance. // *Mol. Metab.* 2018. T. 9. С. 207–216.
150. Murphy D. L., Lesch K.-P. Targeting the murine serotonin transporter: insights into human neurobiology. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2008. T. 9. № 2. С. 85–96.
151. Ni X.-P. и др. Genetic disruption of gamma-melanocyte-stimulating hormone signaling leads to salt-sensitive hypertension in the mouse. // *J. Clin. Invest.* 2003. T. 111. № 8. С. 1251–1258.
152. Ni X. P. и др. Prevention of reflex natriuresis after acute unilateral nephrectomy by melanocortin receptor antagonists. // *Am. J. Physiol.* 1998. T. 274. № 4. С. R931-8.
153. Nutt D. 5HT_{2a} Receptors—a New Target for Depression? // *Eur. Psychiatry.* 2015. T. 30. № S1. С. 1–1.
154. Olivier B. Serotonin: a never-ending story. // *Eur. J. Pharmacol.* 2015. T. 753. С. 2–18.
155. Ollmann M. M. и др. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. // *Science.* 1997. T. 278. № 5335. С. 135–138.
156. Osipova D. V и др. Distribution of the C1473G polymorphism in tryptophan hydroxylase 2 gene in laboratory and wild mice. // *Genes. Brain. Behav.* 2010. T. 9. № 5. С. 537–543.
157. Osipova D. V, Kulikov A. V, Popova N. K. C1473G polymorphism in mouse tph2 gene is linked to tryptophan hydroxylase-2 activity in the brain, intermale aggression, and depressive-like behavior in the forced swim test. // *J. Neurosci. Res.* 2009. T. 87. № 5. С. 1168–1174.
158. Ottenhof K. W. и др. TPH2 polymorphisms across the spectrum of psychiatric morbidity: A systematic review and meta-analysis. // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2018. T. 92. С. 29–42.

159. Padilla S. L. и др. Agouti-related peptide neural circuits mediate adaptive behaviors in the starved state. // *Nat. Neurosci.* 2016. Т. 19. № 5. С. 734–741.
160. Padilla S. L. и др. AgRP to Kiss1 neuron signaling links nutritional state and fertility. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2017. Т. 114. № 9. С. 2413–2418.
161. Pandit R. и др. Melanocortin 3 Receptor Signaling in Midbrain Dopamine Neurons Increases the Motivation for Food Reward. // *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 2016. Т. 41. № 9. С. 2241–2251.
162. Panksepp J., Normansell L. Effects of ACTH(1-24) and ACTH/MSH(4-10) on isolation-induced distress vocalization in domestic chicks. // *Peptides.* 1990. Т. 11. № 5. С. 915–919.
163. Perry W. L. и др. A transgenic mouse assay for agouti protein activity. // *Genetics.* 1995. Т. 140. № 1. С. 267–274.
164. Pillemer D. B. One- Versus Two-Tailed Hypothesis Tests in Contemporary Educational Research // *Educ. Res.* 1991. Т. 20. № 9. С. 13–17.
165. Poggioli R., Vergoni A. V, Bertolini A. ACTH-(1-24) and alpha-MSH antagonize feeding behavior stimulated by kappa opiate agonists. // *Peptides.* 1986. Т. 7. № 5. С. 843–848.
166. Popova N. K., Kulikov A. V. Targeting tryptophan hydroxylase 2 in affective disorder. // *Expert Opin. Ther. Targets.* 2010. Т. 14. № 11. С. 1259–1271.
167. Porsolt R. D., Bertin A., Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. // *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 1977. Т. 229. № 2. С. 327–336.
168. Pringle A. и др. Mice overexpressing the 5-hydroxytryptamine transporter show no alterations in feeding behaviour and increased non-feeding responses to fenfluramine. // *Psychopharmacology (Berl).* 2008. Т. 200. № 2. С. 291–300.
169. Pritchard L. E., White A. Agouti-related protein: more than a melanocortin-4 receptor antagonist? // *Peptides.* 2005. Т. 26. № 10. С. 1759–1770.
170. Pytliak M. и др. Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications. // *Physiol. Res.* 2011. Т. 60. № 1. С. 15–25.
171. Rao T. L. и др. GABAergic agents prevent alpha-melanocyte stimulating hormone induced anxiety and anorexia in rats. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2003. Т. 76. № 3–4. С. 417–423.
172. Redrobe J. P. и др. Role of serotonin (5-HT) in the antidepressant-like properties of neuropeptide Y (NPY) in the mouse forced swim test. // *Peptides.* 2005. Т. 26. № 8. С. 1394–1400.
173. Rees J. L. Genetics of hair and skin color. // *Annu. Rev. Genet.* 2003. Т. 37. С. 67–90.
174. Riveros-McKay F. и др. Genetic architecture of human thinness compared to severe obesity. // *PLoS Genet.* 2019. Т. 15. № 1. С. e1007603.
175. Romanova I. V., Mikhaylova E. V., Mikhrina A. L. Melanocortine system of vertebrate brain: physiological mechanisms and protective properties // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2020. Т. 56. № 7. С.

791.

176. Roselli-Reh fuss L. и др. Identification of a receptor for gamma melanotropin and other proopi melanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993. T. 90. № 19. C. 8856–8860.

177. Sato K. и др. Differential involvement of striosome and matrix dopamine systems in a transgenic model of dopa-responsive dystonia. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. T. 105. № 34. C. 12551–12556.

178. Savelieva K. V и др. Genetic disruption of both tryptophan hydroxylase genes dramatically reduces serotonin and affects behavior in models sensitive to antidepressants. // *PLoS One*. 2008. T. 3. № 10. C. e3301.

179. Shutter J. R. и др. Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice. // *Genes Dev.* 1997. T. 11. № 5. C. 593–602.

180. Siesser W. B. и др. Tryptophan hydroxylase 2 genotype determines brain serotonin synthesis but not tissue content in C57Bl/6 and BALB/c congenic mice. // *Neurosci. Lett.* 2010. T. 481. № 1. C. 6–11.

181. Skibicka K. P., Grill H. J. Energetic responses are triggered by caudal brainstem melanocortin receptor stimulation and mediated by local sympathetic effector circuits. // *Endocrinology*. 2008. T. 149. № 7. C. 3605–3616.

182. Skibicka K. P., Grill H. J. Hypothalamic and hindbrain melanocortin receptors contribute to the feeding, thermogenic, and cardiovascular action of melanocortins. // *Endocrinology*. 2009. T. 150. № 12. C. 5351–5361.

183. Smith A. I., Funder J. W. Proopi melanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. // *Endocr. Rev.* 1988. T. 9. № 1. C. 159–179.

184. Song Y., Cone R. D. Creation of a genetic model of obesity in a teleost. // *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2007. T. 21. № 9. C. 2042–2049.

185. Sweeney P. и др. Targeting the central melanocortin system for the treatment of metabolic disorders. // *Nat. Rev. Endocrinol.* 2023. T. 19. № 9. C. 507–519.

186. Tartaglia L. A. и др. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. // *Cell*. 1995. T. 83. № 7. C. 1263–1271.

187. Tatro J. B. Melanotropin receptors in the brain are differentially distributed and recognize both corticotropin and alpha-melanocyte stimulating hormone. // *Brain Res.* 1990. T. 536. № 1–2. C. 124–132.

188. Tschöp M., Heiman M. L. Rodent obesity models: an overview. // *Exp. Clin. Endocrinol. diabetes Off. journal, Ger. Soc. Endocrinol. [and] Ger. Diabetes Assoc.* 2001. T. 109. № 6. C. 307–319.

189. Vergoni A. V и др. Selective melanocortin MC4 receptor blockage reduces immobilization

stress-induced anorexia in rats. // *Eur. J. Pharmacol.* 1999. T. 369. № 1. C. 11–15.

190. Voronova I. P. 5-HT Receptors and Temperature Homeostasis. // *Biomolecules*. 2021. T. 11. № 12.

191. Walther D. J. и др. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. // *Science*. 2003. T. 299. № 5603. C. 76.

192. Wang D. и др. Whole-brain mapping of the direct inputs and axonal projections of POMC and AgRP neurons. // *Front. Neuroanat.* 2015. T. 9. C. 40.

193. Welty T. K. Health implications of obesity in American Indians and Alaska Natives. // *Am. J. Clin. Nutr.* 1991. T. 53. № 6 Suppl. C. 1616S-1620S.

194. Wessells H. и др. Ac-Nle-c[Asp-His-DPhe-Arg-Trp-Lys]-NH₂ induces penile erection via brain and spinal melanocortin receptors. // *Neuroscience*. 2003. T. 118. № 3. C. 755–762.

195. Williams D. L. Brainstem melanocortin receptor contributions to energy balance // 2003.

196. Wischhof L., Koch M. 5-HT_{2A} and mGlu_{2/3} receptor interactions: on their relevance to cognitive function and psychosis. // *Behav. Pharmacol.* 2016. T. 27. № 1. C. 1–11.

197. Wolff G. L., Roberts D. W., Mountjoy K. G. Physiological consequences of ectopic agouti gene expression: the yellow obese mouse syndrome. // *Physiol. Genomics*. 1999. T. 1. № 3. C. 151–163.

198. Wu Q. и др. Starvation after AgRP neuron ablation is independent of melanocortin signaling. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. T. 105. № 7. C. 2687–2692.

199. Wu Q., Boyle M. P., Palmiter R. D. Loss of GABAergic signaling by AgRP neurons to the parabrachial nucleus leads to starvation. // *Cell*. 2009. T. 137. № 7. C. 1225–1234.

200. Wu Q., Clark M. S., Palmiter R. D. Deciphering a neuronal circuit that mediates appetite. // *Nature*. 2012. T. 483. № 7391. C. 594–597.

201. Wyler S. C. и др. Serotonergic Control of Metabolic Homeostasis. // *Front. Cell. Neurosci.* 2017. T. 11. C. 277.

202. Xu J. и др. Genetic identification of leptin neural circuits in energy and glucose homeostases. // *Nature*. 2018. T. 556. № 7702. C. 505–509.

203. Xu Y. и др. 5-HT₂CRs expressed by pro-opiomelanocortin neurons regulate energy homeostasis. // *Neuron*. 2008. T. 60. № 4. C. 582–589.

204. Xu Y. и др. A serotonin and melanocortin circuit mediates D-fenfluramine anorexia. // *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 2010. T. 30. № 44. C. 14630–14634.

205. Yadav V. K. и др. A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure. // *Cell*. 2009. T. 138. № 5. C. 976–989.

206. Yamamoto H. и др. Melanin production through novel processing of proopiomelanocortin in the extracellular compartment of the auricular skin of C57BL/6 mice after UV-irradiation. // *Sci. Rep.* 2015. T. 5. C. 14579.

207. Yang L.-K., Tao Y.-X. Biased signaling at neural melanocortin receptors in regulation of energy homeostasis. // *Biochim. Biophys. acta. Mol. basis Dis.* 2017. T. 1863. № 10 Pt A. C. 2486–2495.
208. Yang Y., Xu Y. The central melanocortin system and human obesity. // *J. Mol. Cell Biol.* 2020. T. 12. № 10. C. 785–797.
209. Yeo G. S. и др. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. // *Nat. Genet.* 1998. T. 20. № 2. C. 111–112.
210. Yeo G. S. H. и др. The melanocortin pathway and energy homeostasis: From discovery to obesity therapy. // *Mol. Metab.* 2021. T. 48. C. 101206.
211. Zhan C. и др. Acute and long-term suppression of feeding behavior by POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively. // *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 2013. T. 33. № 8. C. 3624–3632.
212. Zhang X. и др. Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. // *Science.* 2004. T. 305. № 5681. C. 217.
213. Zhang X. и др. Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. // *Neuron.* 2005. T. 45. № 1. C. 11–16.
214. Zhang Y. и др. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. // *Nature.* 1994. T. 372. № 6505. C. 425–432.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Исследование влияния сниженной активности фермента ТПГ2 на калориметрические показатели, метаболизм серотонина и экспрессию генов МС-системы.

Описание методики эксперимента 4. Влияние серотониновой системы на общий метаболизм животных. Эксперимент проводился на самцах мышей линии *C57BL/6* в возрасте 3 месяца. Животных разделили на 2 группы: первой группе ($n=8$) в течение 3-х дней в/б вводили физ. раствор; второй группе ($n=8$) в течение 3-х дней в/б вводили п-хлорфенилаланин (PCPA, дозировка 300 мкг/кг веса), – после чего измеряли калориметрические параметры и двигательную активность мышей в течение 24 часов. Измерение потребления кислорода, выделения углекислого газа, расход энергии и динамики двигательной активности производили с помощью калориметрического модуля установки Phenomaster (TSE, Германия). По истечении суток животных усыпляли CO_2 , декапитировали, выделяли средний мозг и гипоталамус. Отделы мозга хранили при -80°C до определения уровня 5-НТ, 5-Н1АА и экспрессии генов. Результаты этого эксперимента позволяют установить влияние блокады синтеза серотонина на общий метаболизм животных.

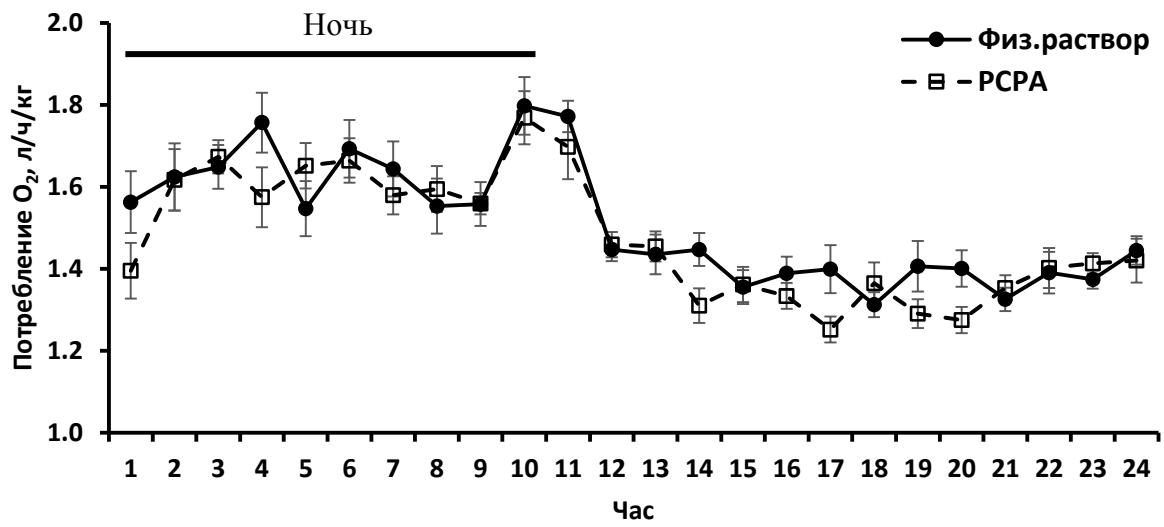
4.1. Динамика двигательной активности и общего метаболизма самцов мышей линии *C57BL/6*.

Измерение суточной динамики калориметрических показателей и двигательной активности показало, что введение п-хлорфенилаланина не оказывало статистически значимого влияния ни на один из исследуемых параметров (Таблица 10). Самцы со сниженной активностью серотониновой системы не отличались от сородичей с нормальной активностью серотониновой системы по потреблению кислорода, выделению углекислого газа, расходу энергии и двигательной активности (Рис.20).

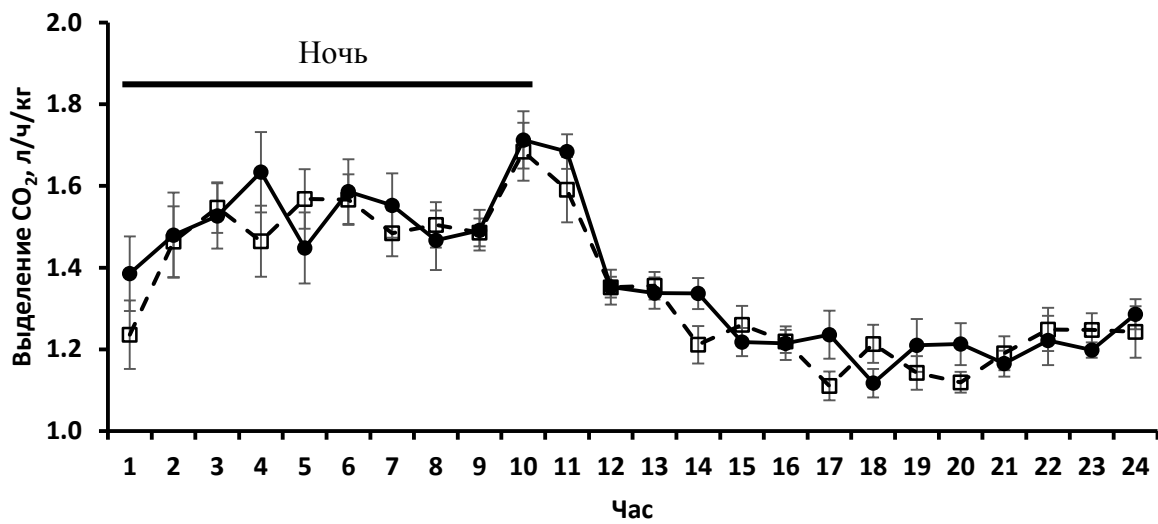
Таблица 10. Результаты дисперсионного анализа влияния факторов «PCPA», «Час» и взаимодействия этих факторов на суточную динамику потребления O_2 , выделения CO_2 , расхода энергии и двигательной активности 3-х месячными самцами мышей линии *C57BL/6*.

	PCPA	Час	Взаимодействие
Потребление O_2	$F_{1,14}=0.784, p=0.39$	$F_{23,322}=20.23, p<0.001$	$F_{23,322}=1.434, p=0.09$
Выделение CO_2	$F_{1,14}=0.259, p=0.62$	$F_{23,322}=21.96, p<0.001$	$F_{23,322}=1.079, p=0.37$
Расход энергии	$F_{1,14}=0.635, p=0.44$	$F_{23,322}=21.06, p<0.001$	$F_{23,322}=1.360, p=0.13$
Двигательная активность	$F_{1,14}=1.657, p=0.22$	$F_{23,322}=7.305, p<0.001$	$F_{23,322}=1.051, p=0.40$

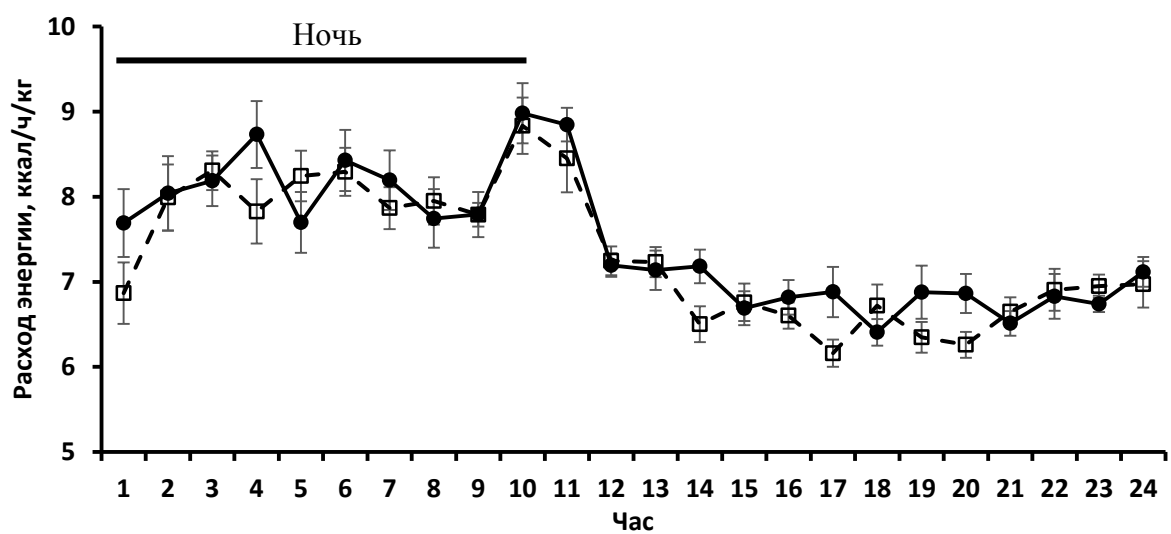
А)



Б)



В)



Г)

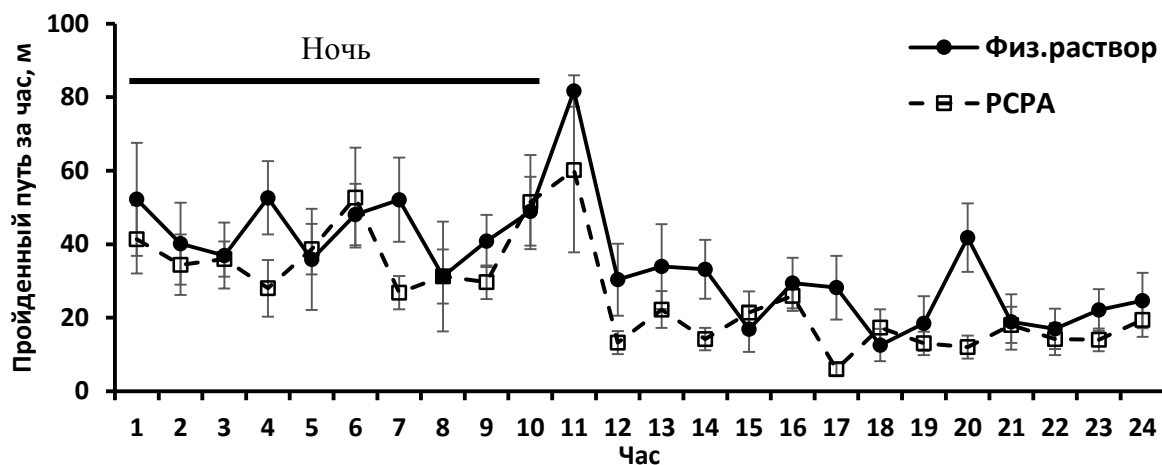


Рис. 20. Суточная динамика потребления O_2 (А), выделения CO_2 (Б), расхода энергии (В) и пройденного пути (Г) 3-х месячными самцами мышей линии *C57BL/6*, которым вводили физ. раствор и п-хлорфенилаланин.

N = 8 особей в группе.

4.2. Исследование метаболизма серотонина в мозге.

Как и ожидалось введение п-хлорфенилаланина приводило к снижению уровней серотонина и его метаболита в гипоталамусе и среднем мозге мышей (Табл. 11). Введение п-хлорфенилаланина приводило к снижению метаболического индекса серотонина в среднем мозге, но не в гипоталамусе (Рис.21).

Таблица 11. Результаты независимого анализа влияния фактора «PCPA», на уровни 5-НТ, 5-НИАА и 5-НИАА/5-НТ в гипоталамусе и среднем мозге самцов мышей линии *C57BL/6*.

	Гипоталамус	Средний мозг
Уровень 5-НТ	$t=5.13, df=14, p<0.001$	$t=2.57, df=14, p=0.02$
Уровень 5-НИАА	$t=6.16, df=14, p<0.001$	$t=5.78, df=14, p<0.001$
Метаболический индекс 5-НИАА/5-НТ	$t=0.974, df=14, p=0.35$	$t=4.52, df=14, p<0.001$

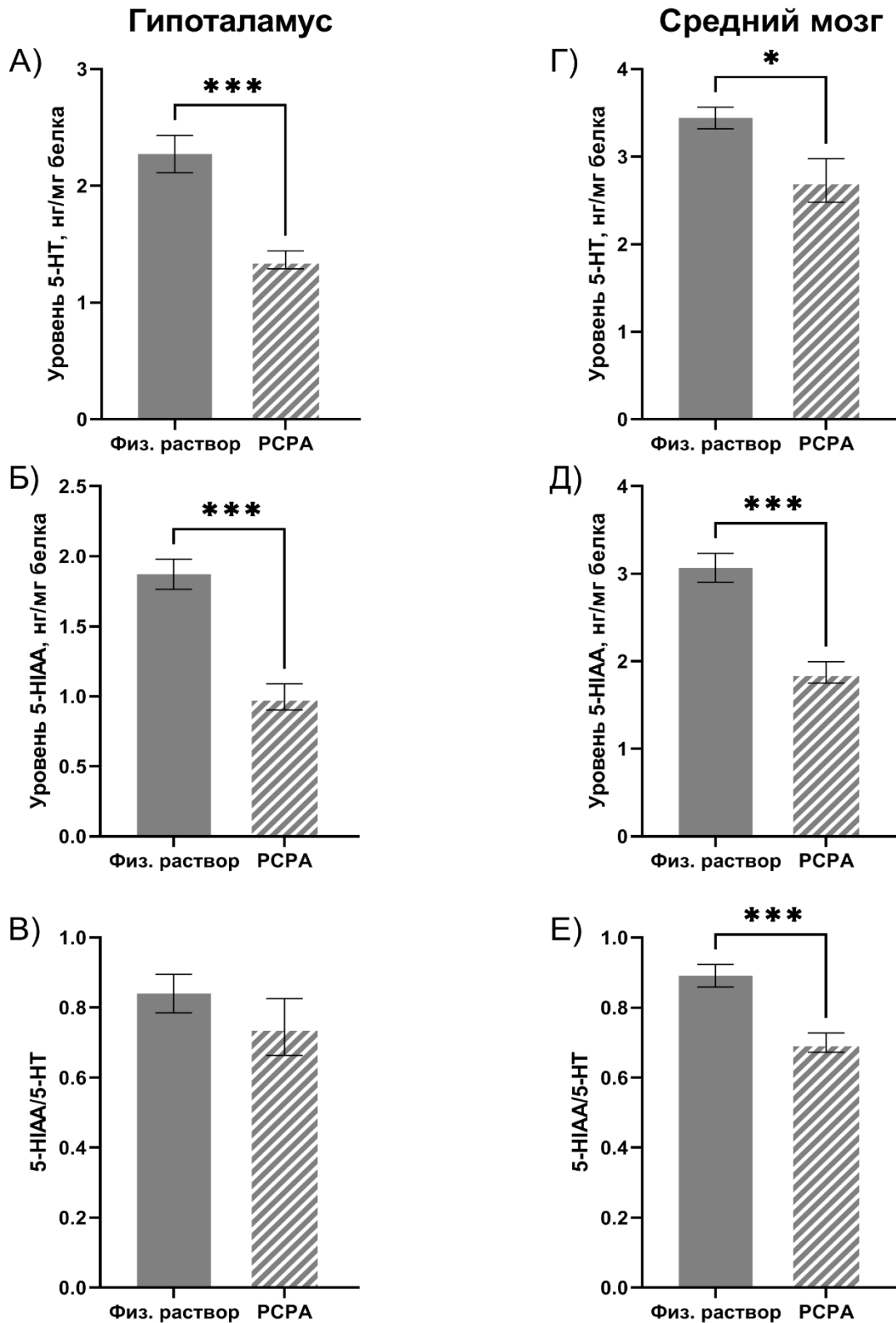


Рис. 21. Уровни 5-НТ (А, Г), 5-НІАА (Б, Д) и 5-НІАА/5-НТ (В, Е) в гипоталамусе и среднем мозге 3-х месячных самцов мышей линии *C57BL/6*, которым вводили физ. раствор и п-хлорфенилаланин.

N = 8 особей в группе.

*** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ по сравнению с животными, получавшими физ.раствор

4.3. Исследование экспрессии генов МС-системы.

Введение п-хлорфенилаланина приводило к статистически значимому снижению экспрессии гена *Pomc* в гипоталамусе, но не в среднем мозге, что согласуется с данными о локализации 5-HT_{2C} рецепторов на POMC-нейронах, при этом статистически значимого влияния п-хлорфенилаланина на экспрессию гена *Agrp* в исследованных структурах не было выявлено (Таблица 12, Рис. 22).

Таблица 12. Результаты независимого анализа влияния фактора «PCPA», на экспрессию генов *Pomc* и *Agrp* в гипоталамусе и среднем мозге 3-х месячных самцов мышей линии *C57BL/6*.

	Гипоталамус	Средний мозг
<i>Agrp</i>	t=1.47, df=13, p=0.17	t=0,565, df=10, p=0.58
<i>Pomc</i>	t=3.26, df=13 p=0.006	t=1,99, df=11, p=0.07

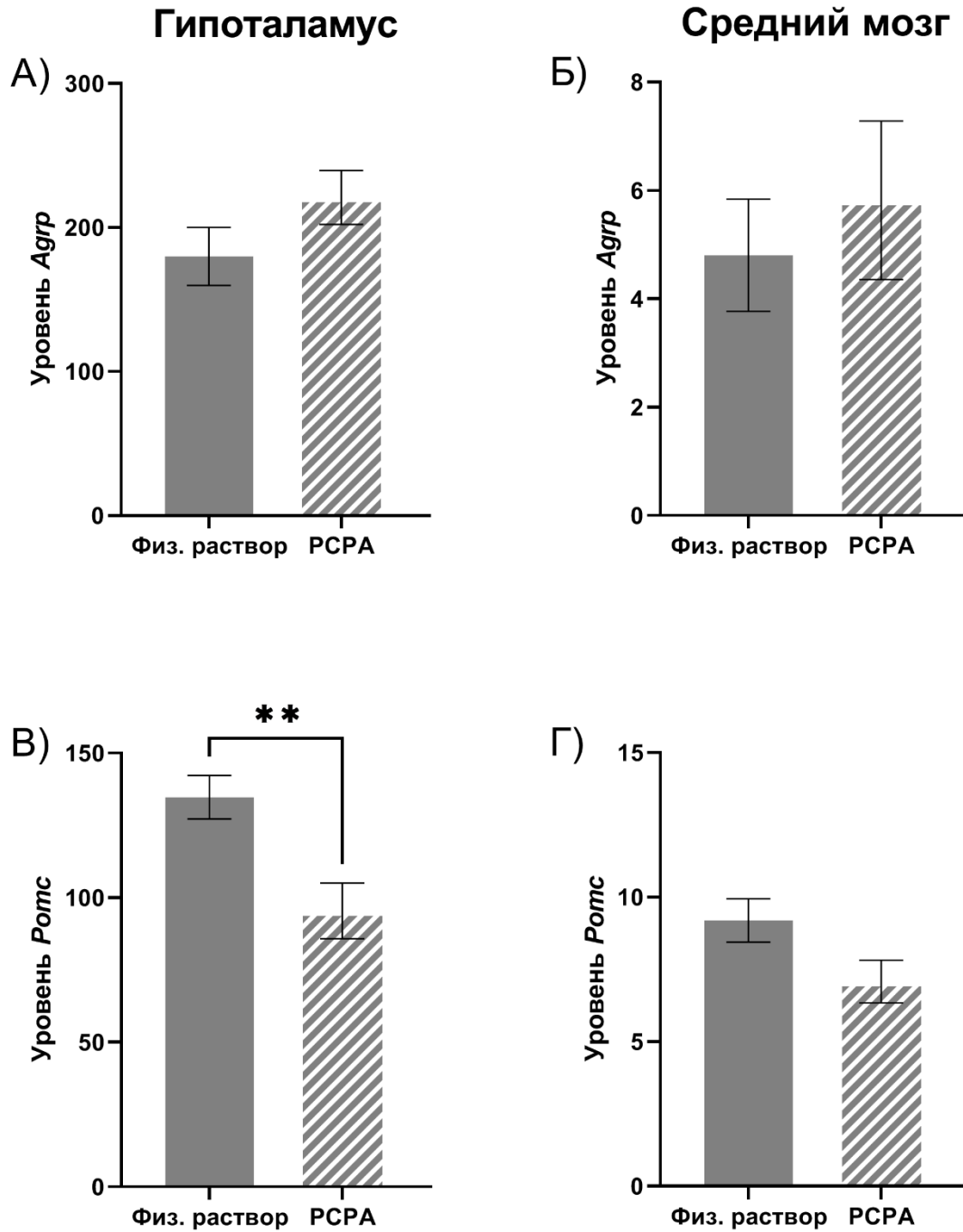


Рис. 22. Уровни мРНК генов: *AgRP* (А, Б) и *Pomc* (В, Г) в гипоталамусе и среднем мозге 3-х месячных самцов мышей линии *C57BL/6*, которым вводили физ. раствор и п-хлорфенилаланин. N = 6-8 особей в группе.

** $p < 0.01$, по сравнению с животными, получавшими физ.раствор