



На правах рукописи

Изыюров Арсений Евгеньевич

**ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗИ МЕЛАНКОРТИНОВОЙ И
СЕРОТОНИНОВОЙ СИСТЕМ МОЗГА В МЕХАНИЗМАХ
РЕГУЛЯЦИИ ОБЩЕГО МЕТАБОЛИЗМА И ПОВЕДЕНИЯ
МЫШЕЙ**

1.5.5. Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2026

Работа выполнена в секторе генетических коллекций нейропатологий ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (г. Новосибирск)

Научный руководитель: Куликов Александр Викторович, доктор биологических наук, главный научный сотрудник сектора генетических коллекций нейропатологий ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (г. Новосибирск)

Официальные оппоненты: Маркова Евгения Валерьевна, доктор медицинских наук, доцент, заведующий лабораторией нейроиммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (г. Новосибирск)

Новиков Евгений Анатольевич, доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией структуры и динамики популяций животных ФГБУН «Научно-исследовательский институт систематики и экологии животных СО РАН» (г. Новосибирск)

Ведущая организация: Институт трансляционной биомедицины ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет» (г. Санкт-Петербург)

Защита диссертации состоится «___» _____ 2026 г. на утреннем заседании диссертационного совета 24.1.239.03, созданного на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» в конференц-зале Института по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект ак. Лаврентьева, 10, т. (383) 363-49-06.

E-mail: dissov@bionet.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института <https://www.icgbio.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2026 г

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Цыбко Антон Сергеевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Меланокортиновая система мозга представлена нейронами, синтезирующими меланокортины (специализированные 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 et al., 1994; Roselli-Reh fuss et al., 1993], локализованные преимущественно в гипоталамусе. Агонисты этой системы синтезируются из проопиомеланокортина (POMC) [Yamamoto et al., 2015], а её естественным антагонистом в нервной системе является агути-подобный белок (AGRP). Известно, что меланокортиновая система участвует в реализации широкого спектра физиологических функций, таких как вес тела, пищевое поведение [Poggioli, 1986; Baldini, Phelan, 2019; Micioni et al., 2020; Михайлова и др., 2022], энергетический гомеостаз [Yeo et al., 2021], дофаминовое подкрепление [Pandit et al., 2016], иммунный ответ [Zhou et al., 2017; Wang et al., 2019; Fan, Beckham, Rajagopalan, 2026], реакция на стресс [Adan et al., 1999], артериальное давление [Kuo, Silva, Hall, 2003], метаболизм костной ткани [Cornish et al., 2003], линейный рост организма [Lam et al., 2021] и др. Есть сведения о возможном участии меланокортиновой системы в реализации когнитивных функций [Zhou et al., 2017, 2021], механизмах депрессивно-подобного поведения [Chaki, Okuyama, 2005; Corperi, Kim, Diano, 2022] и тревожного поведения [Gonzalez, Vaziri, Wilson, 1996]. Известно также, что дефицит меланокортиновой системы может способствовать развитию или обострению сопутствующих ожирению заболеваний [Ильина, Стребкова, 2011; Тимашева, Балхиярова, Кочетова, 2021].

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 [Boston et al., 1997; Fan et al., 1997; Bazzan et al., 2013]. 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 et al., 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 et al., 1997; Fan et al., 1997]. Данная гипотеза основана исключительно на одной работе [Miller et al., 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 *Agouti* не была показана в гипоталамусе. Также не было 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 вызывает нарушения 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 et al., 2003]. Нокаут гена *Tph2* [Alenina et al., 2009; Savelieva et al., 2008] и ингибитор ТПГ2, п-хлорфенилаланин [Cervo et al., 2005; Kulikov et al., 2012] резко снижают уровень 5-НТ в мозге мышей. Полиморфизм с.1473С>G в гене *Tph2* мыши, приводящий к замене Р447R аминокислотной последовательности, снижает активность фермента ТПГ2 вдвое [Kulikov et al., 2005]. Ранее не было показано, что наследственный, вследствие мутации с.1473С>G в гене *Tph2*, дефицит фермента ТПГ2 вызывал нарушения поведения в стандартной батарее тестов [Koshimizu et al., 2019; Kulikova, Kulikov, 2019]. В то же время, в природных популяциях мышей эта мутация элиминируется естественным отбором [Osipova et al., 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-НТ2С рецепторы) дугообразного ядра гипоталамуса и AGRP-нейроны, синтезирующие агутти-подобный пептид (AGRP; через 5-НТ1В 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 et al., 2019]. До настоящего времени не было изучено влияние полиморфизма с.1473С>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 полиморфизмом с.1473С>G.

Цель исследования

Исследовать влияние мутации A^Y и полиморфизма с.1473С>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 .

Задачи исследования

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.1473С>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 количественно оценена экспрессия гена *Agouti* в гипоталамусе и показана 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 установлено, что мутация *lethal yellow* усиливает дистонию задних конечностей у мышей с мутацией *c.1473C>G*, снижающей активность ТПГ2.

Теоретическая и практическая значимость исследования

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^y* 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.

Основные 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.

Личный вклад соискателя

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-Н1АА 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.

Апробация работы

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

Объем и структура диссертации

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, 12 таблиц и 6 страниц приложений к диссертации. Список цитируемой литературы включает 214 источников.

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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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. Мышей содержали в индивидуально вентилируемых клетках (Optimise) 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.

Эксперименты проводили на линиях мышей: B6-1473C, B6-1473G, C57Bl/6 и C57Bl/6- A^Y , которые поддерживаются в виварии ИЦиГ СО РАН, а также мышах с генотипом B6-1473GG/ A^Ya , которые были специально получены для данного исследования. 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^Ya CG). Первое поколение мышей также включало в себя особей с генотипами B6-1473CC/aa (aaCC), B6-1473CG/aa (aaCG) и B6-1473CC/ A^Ya (A^Ya CC). На втором этапе самок aaGG скрещивали с самцами B6-1473CG/ A^Ya (A^Ya CG), полученными на первом этапе, для получения мышей с генотипами 1473GG/aa (aaGG) и 1473GG/ A^Ya (A^Ya GG). (Рис.1) 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. [Komleva и др., 2023].

P1: ♀ *B6-1473CG/aa (aaCG)* × ♂ *B6-1473CC/A^Ya (A^YaCC)*

F1: *B6-1473CG/aa (aaCG)* : *B6-1473CC/aa (aaCC)* : *B6-1473CC/A^Ya (A^YaCC)* : *B6-1473CG/A^Ya (A^YaCG)*

P2: ♂ *B6-1473CG/A^Ya (A^YaCG)* × ♀ *B6-1473GG/aa (aaGG)*

F1: *B6-1473CG/aa (aaCG)* : *B6-1473CG/A^Ya (A^YaCG)* : *B6-1473GG/aa (aaGG)* : *B6-1473GG/A^Ya (A^YaGG)*

Животные используемые в работе

♂ *B6-1473CC/aa (aaCC)* : ♂ *B6-1473CC/A^Ya (A^YaCC)* : ♂ *B6-1473GG/aa (aaGG)* : ♂ *B6-1473GG/A^Ya (A^YaGG)*

Рис.1 Схема получения конгенных мышей.

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 месяцев. 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 et al., 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 et al., 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, потребление пищи и трату 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 с.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 месяцев. 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 CO₂, декапитировали, выделяли фронтальную кору, стриатум, гиппокамп, средний мозг и гипоталамус. Отделы мозга хранили при -80°C до определения уровней 5-НТ, 5-НИАА, 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.

Суточная динамика общей двигательной активности, потребление пищи, а также калориметрические параметры: потребление кислорода, выделение углекислого газа и расход энергии исследовались в установке PhenoMaster (TSE, Germany) в соответствии с руководством по эксплуатации оборудования. Поведение в тестах «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт» и «принудительное плавание» регистрировали и анализировали с помощью программы EthoStudio согласно опубликованным протоколам [Khotskin et al., 2019; Kulikov, Tikhonova, Kulikov, 2008; Osipova et al., 2010].

Тест «подвешивание за хвост» использовали для изучения дистонии задних конечностей [Sato et al., 2008]. Для этого мышь подвешивали за хвост и в течение 6 минут подсчитывали число и суммарную продолжительность скречивания задних конечностей [Komleva et al., 2023].

Уровни 5-НТ, 5-НИАА и активности ТПГ2 определяли с помощью ВЭЖХ с электрохимическим детектором и нормировали на мг белка по Бредфорду [Arefieva, Kulikov, 2023; Komleva et al., 2023]. Общую РНК выделяли с помощью extractRNA (Eurogen, Москва), согласно протоколу производителя, примеси геномной ДНК удаляли с помощью ДНКазы, кДНК синтезировали с помощью набора R01 (Биолабмикс, Россия), уровень мРНК генов *Htr1a*, *Htr2a*, *Slc6a4*, *Tph2*, *Maoa*, *Mc3r*, *Mc4r*, *Agrp*, *Pomc*, *Raly*, *Agouti* определяли количественной ПЦР реального времени с помощью специфических праймеров, набора R401 (Синтол, Россия), калибровали с помощью набора концентраций геномной ДНК (внешний стандарт) и выражали числом копий искомого гена на 100 копий гена домашнего хозяйства *Polr2a* (внутренний стандарт) [Komleva et al., 2023].

Все данные проверяли на соответствие нормальному распределению с помощью критерия Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллиефорса и критерию Шапиро-Уилка. Результаты измерения представляли, как среднее значение ± ошибка среднего. Влияние факторов и их взаимодействия анализировали с помощью одно- и двухфакторного ANOVA и ковариационного анализа (ANCOVA). При нахождении статистически значимого влияния факторов проводили *post hoc* сравнение по Фишеру. Статистически значимыми считались различия с $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Экспрессия генов *Agouti*, *Raly*, *Pomc*, *Agrp*, *Mc3r*, *Mc4r* в мозге 6-ти месячных самцов и самок мышей линий C57BL/6 и C57BL/6-A^Y.

Выявлено существенное влияние только фактора «Генотип» на мРНК гена *Agouti* в гипоталамусе ($F_{1,28}=53.39$, $p<0.001$), гиппокампе ($F_{1,27}=300.04$, $p<0.001$) и фронтальной коре ($F_{1,28}=121.82$, $p<0.001$). 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* (Табл.1).

На экспрессию гена *Raly* в гипоталамусе ($F_{1,28}=11.73$, $p<0.001$), гиппокампе ($F_{1,27}=51.07$, $p<0.001$) и фронтальной коре ($F_{1,28}=25.29$, $p<0.001$) также существенно влиял только фактор «Генотип». Экспрессия данного гена у самцов и самок мышей генотипа *C57BL/6* была вдвое выше в исследуемых структурах по сравнению с мышами генотипа *C57BL/6-A^Y* (Табл.1).

Таблица 1. - 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	Самцы		Самки	
	<i>C57BL/6</i>	<i>C57BL/6-A^Y</i>	<i>C57BL/6</i>	<i>C57BL/6-A^Y</i>
Гипоталамус				
<i>Mc4R</i>	12.8 ± 2.7	6.8 ± 1.3	10.0 ± 1.5	10.0 ± 1.5
<i>Mc3R</i>	11.6 ± 3.0	3.8 ± 0.7***	5.6 ± 0.9	4.3 ± 0.7
<i>Pomc</i>	20.5 ± 4.8	14.3 ± 2.2	20.5 ± 3.8	26.1 ± 3.2
<i>Agouti</i>	0.1 ± 0.0	60.4 ± 8.7***	0.1 ± 0.1	76.7 ± 16.6\$\$\$
<i>Raly</i>	29.0 ± 7.2	8.2 ± 2.3*	20.9 ± 4.3	11.0 ± 2.1\$\$
<i>Agrp</i>	17.8 ± 0.2	17.8 ± 0.2	18.0 ± 0.2	17.9 ± 0.2
Гиппокамп				
<i>Mc4R</i>	13.1 ± 0.8	12.2 ± 0.8	13.6 ± 2.2	13.5 ± 0.8
<i>Mc3R</i>	1.3 ± 0.2	1.5 ± 0.2	2.1 ± 0.4	1.9 ± 0.2
<i>Pomc</i>	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1
<i>Agouti</i>	0.1 ± 0.0	27.4 ± 2.2***	0.1 ± 0.0	29.8 ± 2.5\$\$\$
<i>Raly</i>	15.9 ± 1.0	9.8 ± 0.7***	16.1 ± 1.0	10.2 ± 0.5\$\$\$
<i>Agrp</i>	15.3 ± 0.4	17.4 ± 0.9	15.4 ± 1.1	15.7 ± 0.9
Фронтальная кора				
<i>Mc4R</i>	3.9 ± 0.6	2.5 ± 0.2**	2.1 ± 0.2***	2.2 ± 0.4
<i>Mc3R</i>	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0
<i>Pomc</i>	3.1 ± 0.2	2.5 ± 0.4	1.9 ± 0.3	3.3 ± 0.3\$\$
<i>Agouti</i>	0.4 ± 0.2	148.6 ± 14.6***	0.2 ± 0.1	159.0 ± 23.7\$\$\$
<i>Raly</i>	79.5 ± 9.8	30.5 ± 4.2***	67.3 ± 4.4	33.7 ± 6.2\$\$\$
<i>Agrp</i>	2.1 ± 0.4	3.4 ± 0.8	3.7 ± 0.6	4.3 ± 1.0

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

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

Была выявлена высокая позитивная корреляция между уровнями мРНК 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. 2).

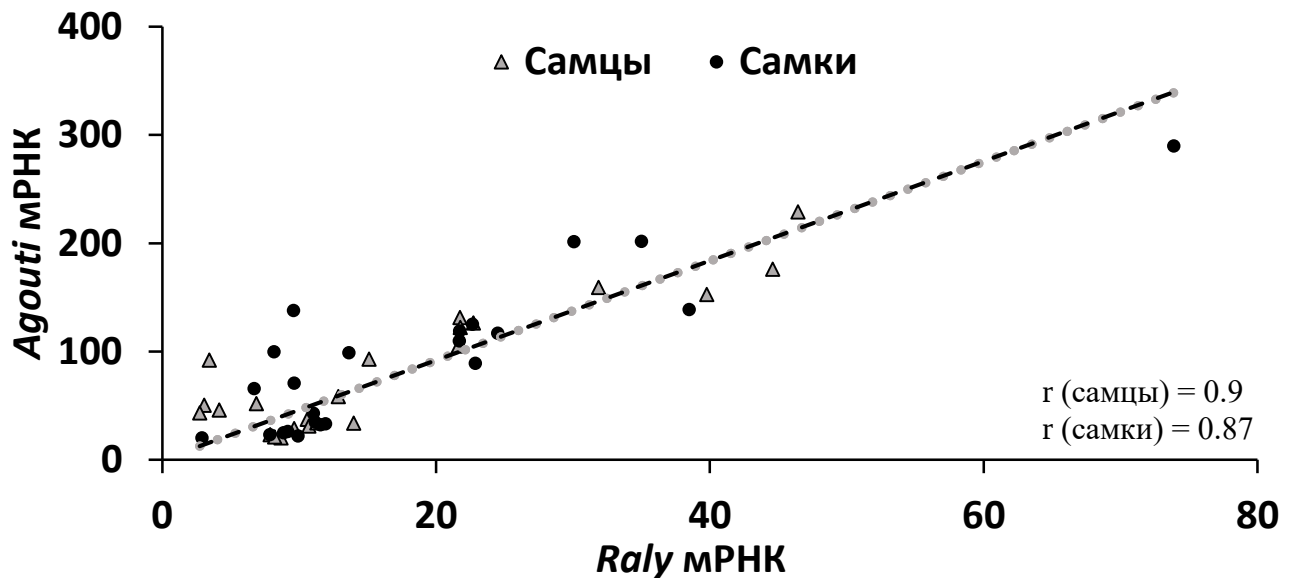


Рис. 2 Корреляционная связь между уровнями мРНК генов *Agouti* и *Raly* в гипоталамусе, гиппокампе и фронтальной коре у самцов и самок мышей линии C57BL/6- A^Y в возрасте 6 месяцев. N = 7-8 особей в группе.

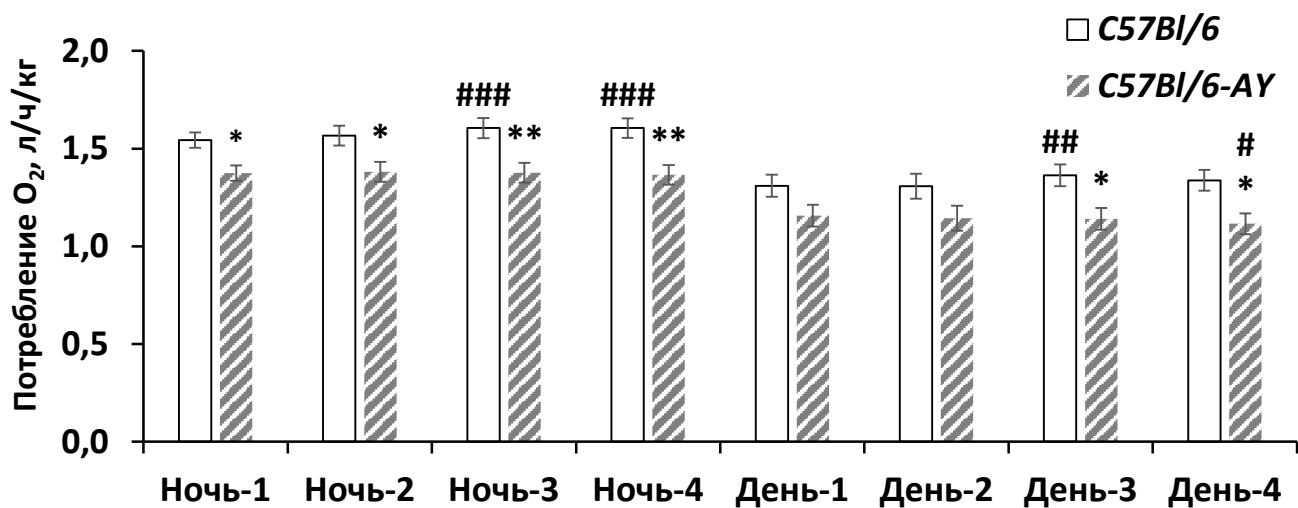
Таким образом, впервые (1) была количественно охарактеризована высокая экспрессия гена *Agouti* в гипоталамусе, (2) была показана высокая положительная корреляционная связь между экспрессией генов *Agouti* и *Raly* во всех исследованных структурах мозга у мышей C57BL/6- A^Y . Полученные результаты являются экспериментальным подтверждением существующей гипотезы, что в гипоталамусе мышей генотипа C57BL/6- A^Y имеет место эктопическая сверхэкспрессия гена *Agouti*, которая находится под управлением промотора гена *Raly*.

В то же время, не было выявлено обнаруженного другими исследователями [Derkach и др., 2019] увеличения экспрессии генов *Pomc*, *Mc3r* и *Mc4r* в гипоталамусе мышей генотипа C57BL/6- A^Y по сравнению с животными генотипа C57BL/6 (Табл.1) [Izyurov et al., 2023; Komleva et al., 2023].

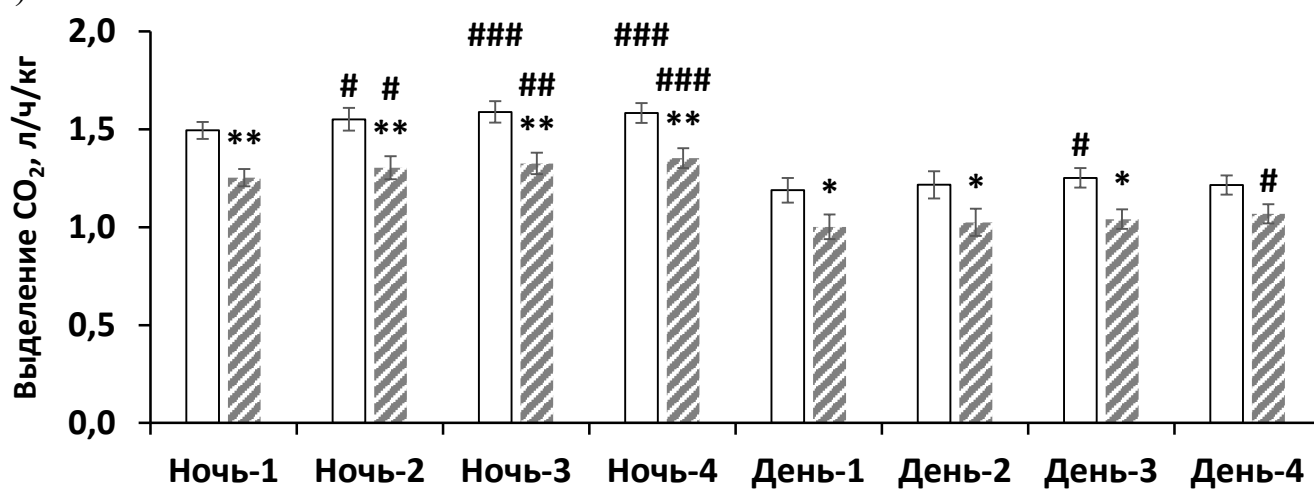
2. Сравнение суточной динамики двигательной активности, потребления пищи, O_2 , выделения CO_2 и расхода энергии у 3-х месячных самцов C57BL/6 и C57BL/6- A^Y .

Не выявлено влияния мутации A^Y на двигательную активность ночью ($F_{1,22}=1.66$, $p=0.21$) и днём ($F_{1,22}<1$) [Khotskin, Izyurov, Kulikov, 2025], что хорошо согласуется с результатами предыдущего исследования [Khotskin et al., 2019]. В то же время, в тёмное время суток мыши генотипа C57BL/6- A^Y потребляли меньше кислорода ($F_{1,22}=9.59$, $p=0.005$), выделяли меньше углекислого газа ($F_{1,22}=12.2$, $p=0.002$), тратили меньше энергии ($F_{1,22}=10.2$, $p=0.004$) и меньше потребляли пищи ($F_{1,22}=6.7$, $p=0.017$) по сравнению с мышами генотипа C57BL/6 (Рис.3).

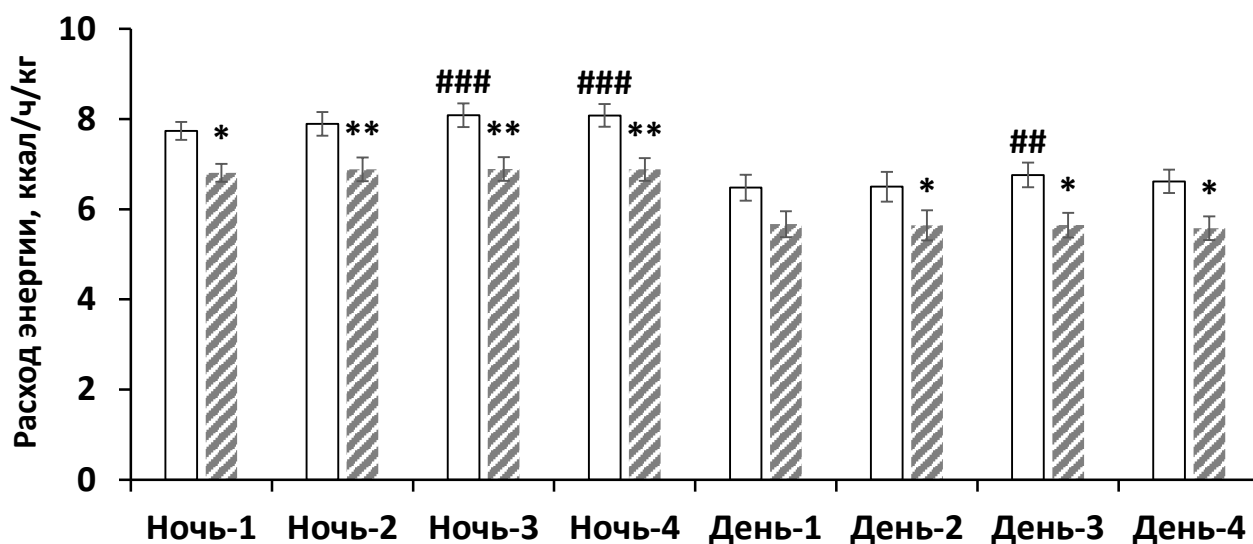
A)



Б)



В)



Г)

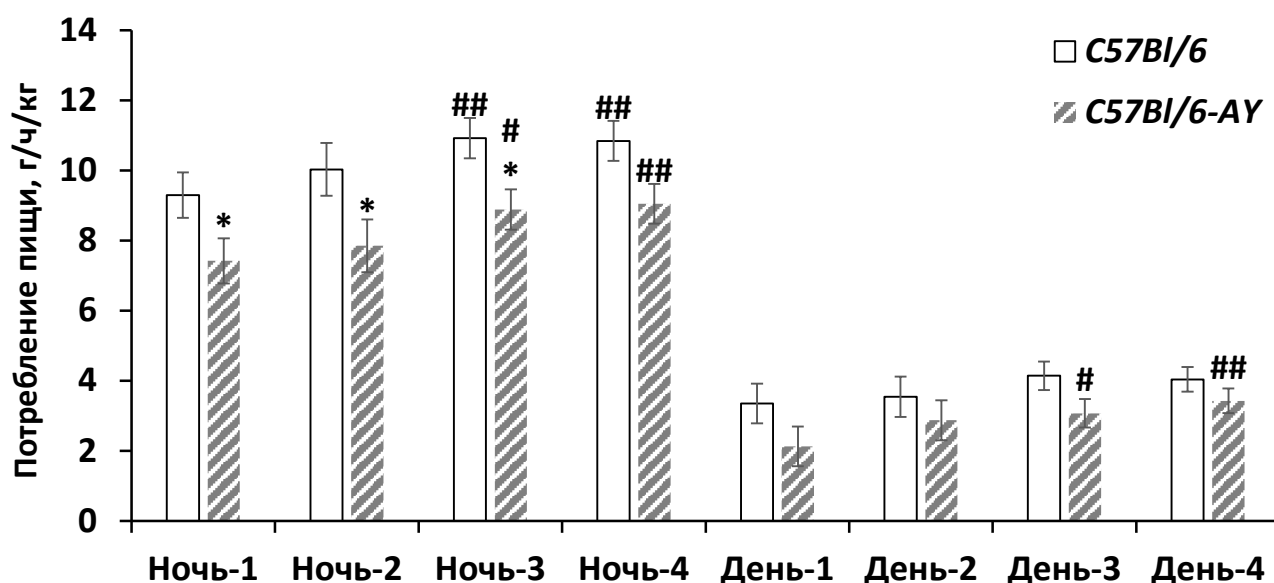


Рис. 3 Потребление кислорода (А), выделение углекислого газа (Б), расход энергии (В) и потребление пищи (Г) самцами мышей *C57BL/6* и *C57BL/6-A^Y* в возрасте 3 месяцев за периоды тёмного и светлого времени суток в течение 4 последовательных дней наблюдения в калориметрическом модуле установки PhenoMaster. Каждая точка представляет собой среднее значение для 12 животных в тёмное или светлое время суток. N = 12 особей в группе.

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

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

Для исключения влияния массы животного на данные признаки был дополнительно проведён ковариационный анализ ANCOVA, в котором показатель «масса тела» учитывали, как ковариансу. Данный анализ не показал влияния фактора «Генотип» ($F_{1,21}=2.93$, $p=0.1$) на потребление пищи при полном отсутствии влияния ковариансы «масса тела» ($F_{1,21}<1$), однако показал тенденцию 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]. Таким образом, значительное снижение выделения углекислого газа и тенденция к снижению потребления кислорода у мышей *C57BL/6-A^Y* сохранились даже 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*.

Таким образом, наиболее вероятной причиной ожирения у мышей *C57BL/6-A^Y* является более экономная трата получаемой из пищи энергии, избыток которой у них запасается в виде жира [Khotskin, Izyurov, Kulikov, 2025].

3. Сравнение поведения самцов мышей генотипов B6-1473CC-aa, B6-1473CC-A^Ya, B6-1473GG-aa и B6-1473GG-A^Ya.

В тесте «открытое поле» было обнаружено влияние полиморфизма с.1473C>G ($F_{1,28}=8.52$, $p=0.007$), но не влияние A^Y ($F_{1,28}<1$) и их взаимодействия ($F_{1,28}<1$) на двигательную активность самцов мышей B6-1473CC/aa, B6-1473CC/A^Ya, B6-1473GG/aa и B6-1473GG/A^Ya в возрасте 3 месяцев. Мыши гомозиготные по аллели G гена *Tph2* проходили больший путь по сравнению с животными гомозиготными по аллели C гена *Tph2* (Рис. 4).

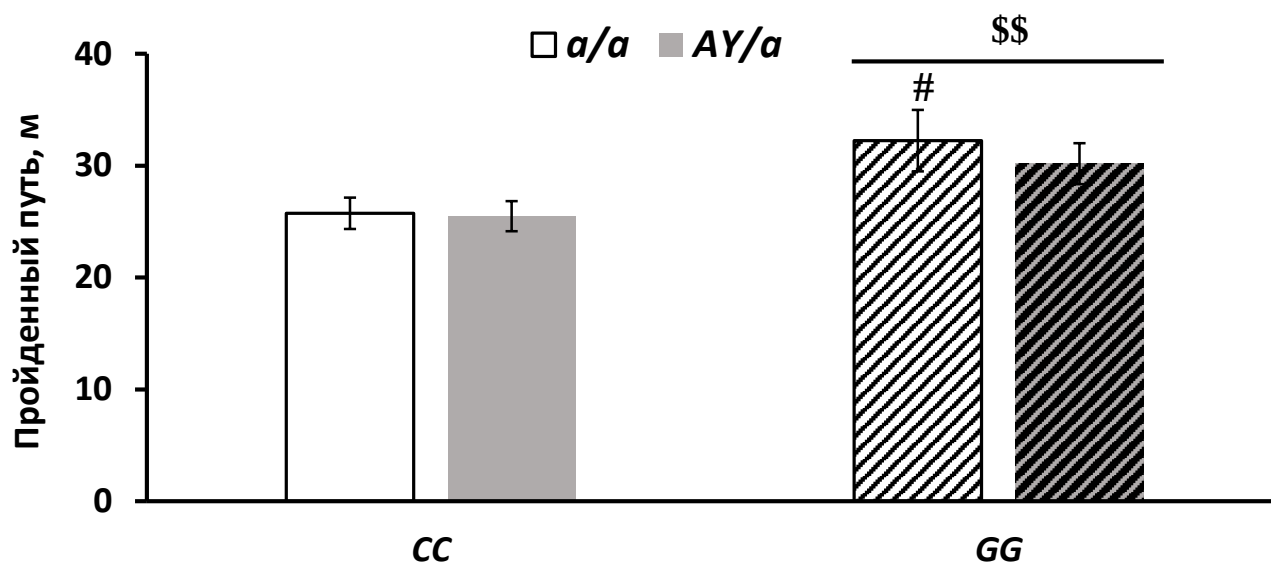


Рис. 4. Пройденный путь (м) в тесте открытого поля у 3-х месячных самцов мышей B6-1473CC/aa, B6-1473CC/A^Ya, B6-1473GG/aa и B6-1473GG/A^Ya. N=8 особей в группе. \$\$ $p<0.01$ по сравнению с мышами 1473CC; # $p<0.05$ по сравнению с мышами B6-1473CC/aa

Исследование тревожного поведения 3-х месячных самцов мышей B6-1473CC/aa, B6-1473CC/A^Ya, B6-1473GG/aa и B6-1473GG/A^Ya не показало влияния ни мутации A^Y, ни полиморфизма с.1473C>G, ни их взаимодействия ни на один исследованный признак в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» (время в открытых рукавах – $F_{1,28}<1$, время в закрытых рукавах – $F_{1,28}<1$).

Было зафиксировано влияние полиморфизма с.1473C>G ($F_{1,28}=4.68$, $p=0.04$) и мутации A^Y ($F_{1,28}=8.19$, $p=0.008$), но не их взаимодействия ($F_{1,28}<1$) на время неподвижности в тесте «принудительное плавание» самцов мышей B6-1473CC/aa, B6-1473CC/A^Ya, B6-1473GG/aa и B6-1473GG/A^Ya. Мутация A^Y приводила к увеличению выраженности данного признака (Рис. 5), тогда как аллель G ассоциирована с ее снижением.

В тесте «подвешивание за хвост» впервые был выявлен существенный вклад взаимодействия полиморфизма с.1473C>G и мутации A^Y на частоту ($F_{1,28}=6.49$, $p=0.008$) и длительность ($F_{1,28}=3.15$, $p=0.048$) дистонии задних конечностей, определяемой по числу и продолжительности скрещивания лапок. Данный признак проявлялся только у мышей генотипа B6-1473GG/A^Ya, но не у животных генотипов B6-1473CC/aa, B6-1473CC/A^Ya, B6-1473GG/aa (Рис. 6) В отдельном исследовании было показано проявление дистонии задних конечностей только у ювенильных мышей генотипа B6-1473GG/aa [Komleva et al., 2023]. Эта патология исчезала у

взрослых мышей данного генотипа и никогда не наблюдалась у животных генотипа *B6-1473CC/aa* [Khotskin и др., 2025].

Таким образом, можно заключить, что мутация A^Y приводила к усилению дистонии задних конечностей, вызванной полиморфизмом с.1473C>G в гене *Tph2*, что является примером патологии, вызванной нарушением 5-НТ системы [Sato и др., 2008, Komleva и др., 2023], которую усилило нарушение меланокортиновой системы.

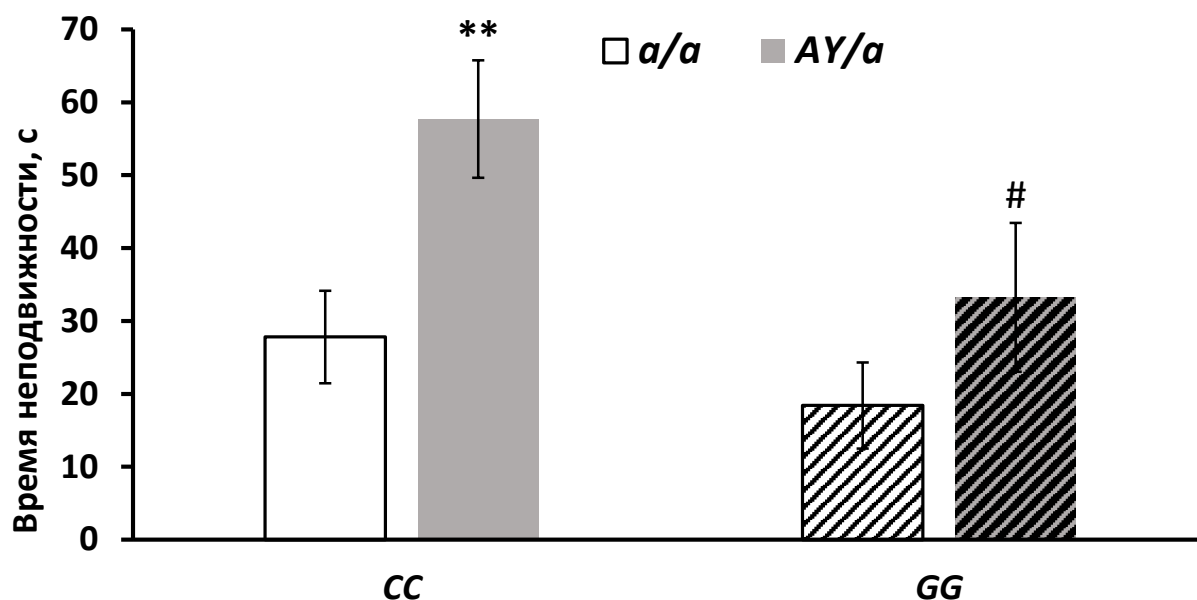
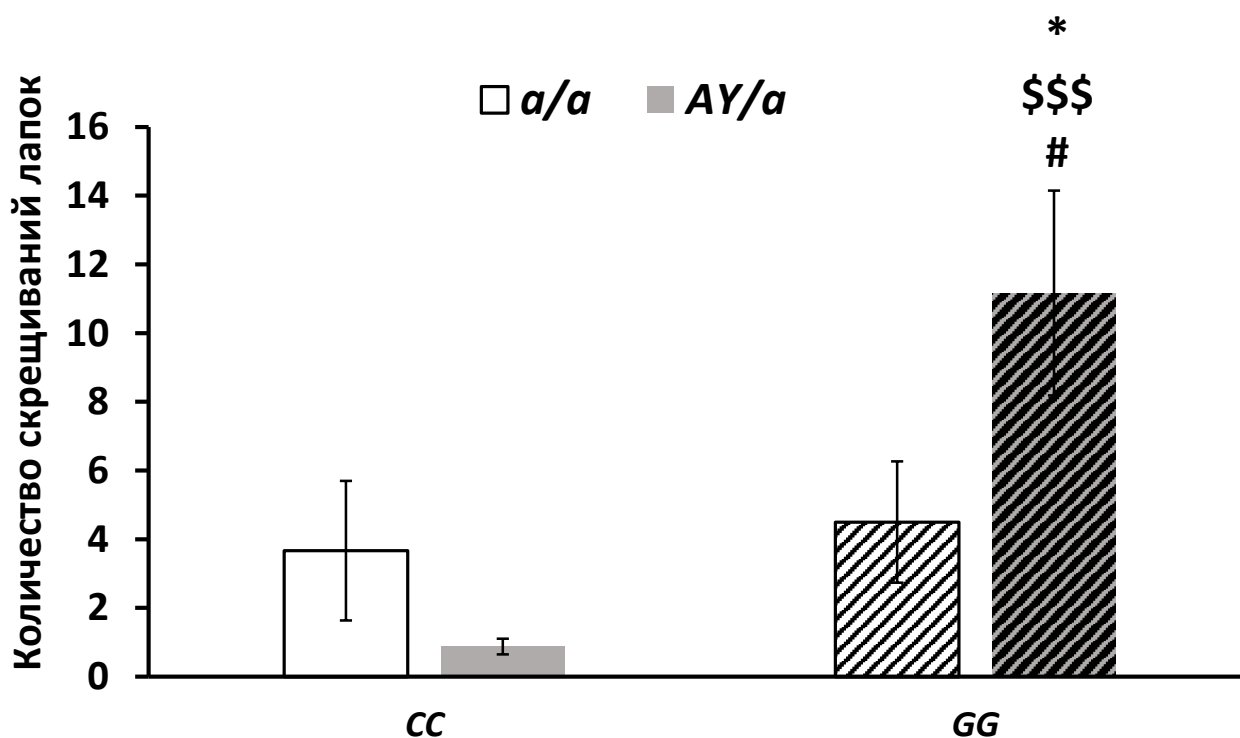


Рис. 5 Общее время неподвижности (сек) в тесте принудительного плавания у самцов мышей *B6-1473CC/aa*, *B6-1473CC/A^Ya*, *B6-1473GG/aa* и *B6-1473GG/A^Ya* в возрасте 3 месяца. N=8 особей в группе. ** $p < 0.01$ по сравнению с соответствующим генотипом *aa*; # $p < 0.05$ по сравнению с мышами *B6-1473CC/A^Ya*

А)



Б)

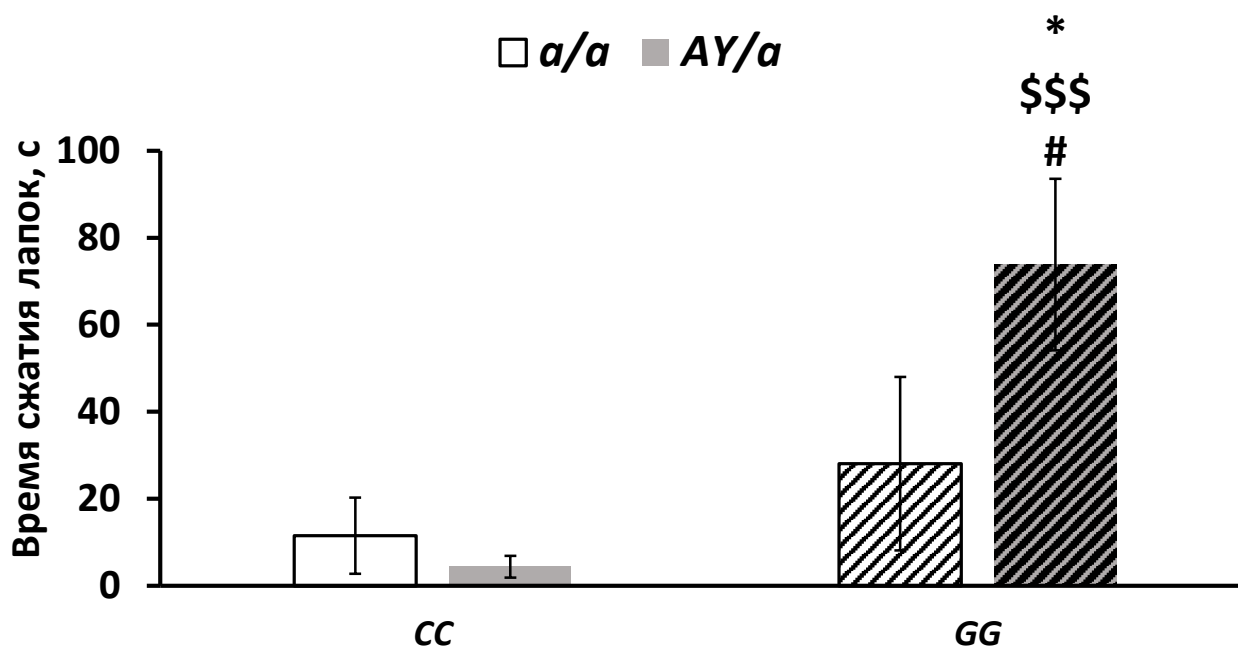


Рис. 6. Количество скрещиваний (А) и время сжатия (Б) задних конечностей в тесте подвешивания за хвост у самцов мышей *B6-1473CC/aa*, *B6-1473CC/A^Ya*, *B6-1473GG/aa* и *B6-1473GG/A^Ya* в возрасте 3 месяца. N=8 особей в группе.

* $p < 0.05$ 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*

4. Сравнение функционального состояния серотониновой и меланокортиновой систем мозга у самцов мышей генотипов *B6-1473CC/aa*, *B6-1473CC/A^Ya*, *B6-1473GG/aa* и *B6-1473GG/A^Ya*.

Было установлено, что 3-х месячные самцы мышей *B6-1473CC/aa*, *B6-1473CC/A^Ya*, *B6-1473GG/aa* и *B6-1473GG/A^Ya* не различались по уровням серотонина, 5-гидроксииндолуксусной кислоты и величине метаболического индекса серотонина 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, $F_{3,28}<1$).

Активность фермента ТПГ2 (как и ожидалось, в соответствии с ранее показанными данными [Kulikov и др., 2005]) была снижена у мышей гомозиготных по аллели *G* во всех исследованных структурах (фронтальная кора ($F_{1,28}=69.22$, $p<0.001$), гиппокамп ($F_{1,28}=54.2$, $p<0.001$), стриатум ($F_{1,28}=100.29$, $p<0.001$), гипоталамус ($F_{1,28}=32.94$, $p<0.001$) и средний мозг ($F_{1,28}=32.16$, $p<0.001$)). Влияния *A^Y* ($F_{1,28}<1$) и взаимодействия мутации и полиморфизма ($F_{1,28}<1$) обнаружено не было.

У самцов четырех генотипов не наблюдалось различий в уровнях мРНК генов *Tph2*, *Maoa*, *Slc6a4*, *Htr1a*, *Htr2a*, *Mc3r* и *Mc4r* во фронтальной коре, гиппокампе, стриатуме, гипоталамусе и среднем мозге. В то же время, как и ожидалось

двухфакторный дисперсионный анализ показал значительное влияние мутации A^Y на экспрессию гена *Agouti* в 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 ($F_{1,28}=242.62$, $p<0.001$). Экспрессия этого гена в указанных структурах была выявлена только у животных с мутацией A^Y , что подтвердило полученные в эксперименте 1 результаты. При этом не было установлено влияния полиморфизма $c.1473C>G$ ($F_{1,28}<1$) или взаимодействия полиморфизма и мутации ($F_{1,28}<1$) на экспрессию гена *Agouti* в этих структурах.

Таким образом, показано влияние мутации A^Y на экспрессию гена *Agouti* во фронтальной коре, гиппокампе, гипоталамусе и стриатуме; при этом, ни в одной из исследованных структур мозга не было показано влияния мутации A^Y на уровень и метаболизм 5-НТ, активность ТПГ2, экспрессию генов 5-НТ системы. Также не было установлено влияния полиморфизма $c.1473C>G$ на экспрессию гена *Agouti* и генов меланокортиновой системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, у мышей с мутацией A^Y впервые количественно охарактеризована эктопическая сверхэкспрессия гена белка *Agouti* в гипоталамусе, а также показана корреляционная связь между экспрессией генов *Agouti* и *Raly* в головном мозге.

Впервые установлено, что данная мутация снижает расход энергии, что является наиболее вероятной причиной ожирения мышей генотипа *C57Bl/6-A^Y*.

Впервые 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*.

ПУБЛИКАЦИИ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

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. Индексируется в SCOPUS и WOS.
2. Komleva PD, Alhalabi G, **Izyurov AE**, Khotskin NV, Kulikov AV. Effects of the Combination of the C.1473C>G 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. Индексируется в SCOPUS и WOS.
3. 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 C.1473C>G 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.
4. 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. 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.euro-neuro.2021.10.232.
2. Комлева П.Д., **Изыюров А.Е.**, Хоцкин Н.В., Куликов А.В. Негативные влияния мутации *C.1473C>G* 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 *c.1473C>G* 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.