

МОРИНА ИРИНА ЮРЬЕВНА

**РОЛЬ МОНОАМИНОВ В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ
АКТИВНОСТИ ОРЕКСИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ
ГИПОТАЛАМУСА НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА**

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

03.03.01 – ФИЗИОЛОГИЯ

03.03.04 – КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ, ЦИТОЛОГИЯ, ГИСТОЛОГИЯ

**Санкт-Петербург
2019**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Институте эволюционной физиологии и биохимии
им. И.М. Сеченова Российской академии наук

Научные руководители:

Романова Ирина Владимировна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель группы интегративной нейроэндокринологии ИЭФБ РАН

Кузик Валерий Владимирович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории сравнительной сомнологии и нейроэндокринологии ИЭФБ РАН

Официальные оппоненты:

Ордян Наталья Эдуардовна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией нейроэндокринологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии им. И.П. Павлова РАН

Новикова Наталия Сергеевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунопатофизиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Институт экспериментальной медицины"

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «19» ноября 2019 года в 11 часов на заседании диссертационного совета (Д.002.127.01) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук по адресу:

194223, г. Санкт-Петербург, пр. Мориса Тореза, 44.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (194223, г. Санкт-Петербург, пр. Мориса Тореза, 44), а также на сайте ИЭФБ РАН: <http://www.iephb.ru/sovet.htm>

Автореферат разослан « » 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор биологических наук



/Р.Г. Парнова/

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Орексин-А (гипокретин-1) и орексин-В (гипокретин-2) – два пептида, которые образуются из общей молекулы-предшественника препрорексина (Sakurai, 1998; de Lecea, et al., 1998). Действие орексинов осуществляется через два типа G-протеин – связанных рецепторов: OX1R и OX2R (Ohnoa, Sakurai, 2008; Kukkonen, Leonard, 2014). В мозге экспрессия препро-орексина осуществляется преимущественно в нейронах латерального гипоталамуса. Их отростки и OX1R, OX2R выявлены в различных областях мозга (гипоталамусе, таламусе, гиппокампе, ядрах среднего мозга, префронтальной коре, ядре шва и др.), что свидетельствует об участии орексинов в регуляции различных функций организма (Sakurai, 2005; Li, Hu, de Lecea, 2014). Показано участие орексинов в регуляции пищевого поведения, энергетического баланса, бодрствования и пробуждения (Sakurai, 1998; de Lecea, et al., 1998; Lin, et al., 1999; Chemelli, et al., 1999), стрессорного (Giardino, de Lecea, 2014; Gafe, Bhatnagar, 2018) и иммунного ответа (Waleh, et al., 2001; Hara, Yanagisawa, Sakurai, 2005; Перекрест, Абрамова, Новикова, 2009; Fontana, et al., 2010; Tanaka, et al., 2016; Пугач, и др., 2016). В регуляции пищевого поведения и циркадных ритмов так же важную роль играютmonoамины: серотонин и дофамин. В то время как основным источником серотонинергической иннервации гипоталамуса является дорзальное и медиальное ядра шва (Steinbuch, Nieuwenhuys, 1981, 1983; Montage, Calas, 1988), источником дофамина в гипоталамусе является как сам гипоталамус, так и проекций из других регионов мозга (Björlund, Lindval, 1984; Moore, Lookingland, 2000). Эти данные предполагают наличие тесных взаимосвязей между этими системами, исследование которых позволит расширить представления об их функциональном значении. Известно, что проекции орексинергических нейронов, OX1R и OX2R выявлены в областях мозга, где локализованы дофаминергические и серотонинергические нейроны (de Lecea, et al., 1998; Peyron, et al., 1998; Marcus, et al., 2001; Sakurai, 2005; Ohnoa, Sakurai, 2008). Однако роль этих monoаминов в регуляции самих орексинергических нейронов гипоталамуса до сих пор мало изучена.

У крысы орексин-иммунопозитивные структуры выявляются в гипоталамусе на 10-12 день эмбриогенеза (E10-E12), а на E19 их проекции обнаружены уже в спинном мозге (van den Pol, et al., 2001; Steininger, et al., 2004; Amiot, et al., 2005; Ogawa, et al., 2017). В этот период формируются также дофамин- и серотонинергические структуры, что предполагает возможность функционального взаимодействия monoаминергических систем с орексинергической уже в ходе эмбриогенеза.

В литературе широко обсуждается вопрос о роли орексинов в эмбриогенезе как факторов морфогенеза (Ito et al., 2008; Bjornstrom, et al., 2014; Bakos, et al., 2016). Последствия стресса, перенесенного во время внутриутробного развития, могут проявляться в развитии целого ряда психических, когнитивных, двигательных расстройств (Журавин, Дубровская, Туманова, 2003; Отеллин, Хожай, Ордян, 2007). Исследование компенсаторных механизмов, развивающихся в ответ на пренатальные воздействия, а также поиск новых мишней для фармакологической коррекции нарушен-

Список сокращений: **1В** и **2С** – рецепторы серотонина 1B- и 2C-подтипа; **Д1** и **Д2** - рецепторы дофамина 1-го и 2-го типов; **5-ГИУК** – 5-гидроксинацетилуксусная кислота; **5-ГУИК/серотонин** – кatabолический коэффициент серотонина; **ПФО** – перифорникальная область гипоталамуса; **OX1R** и **OX2R** – рецепторы орексина 1-го и 2-го типа; **ДОФУК** – диоксифенилуксусная кислота, **ДОФУК/дофамин** – кatabолический коэффициент дофамина; **ПНС** – пренатальный стресс; **ТГ** – тирозингидроксилаза, **ФТГ-40** – фосфорилированная по серину-40 форма ТГ; **ТПГ** – триптофанидроксилаза; **GAD65/67** – glutamate decarboxylase 65/67; **GAPDH** - glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase.

ных функций организма является актуальной задачей современной физиологии и медицины. Исходя из этого, изучение роли гипоталамических нейропептидов, в частности орексинов, в функционировании организма после пренатального стресса представляет особый интерес. Исследование при этом функциональной активности дофамин- и серотонинергических систем в гипоталамусе позволит оценить взаимодействие орексин- иmonoаминергических систем в онтогенезе как в норме, так и после стрессорного воздействия.

Дисфункции monoаминергических систем мозга наблюдаются при различных неврологических и нейродегенеративных заболеваниях (эпилепсия, болезнь Паркинсона и др.; Угрюмов, 2010; Ohno, et al., 2013). В последние годы появились данные о применении антагонистов орексиновых рецепторов в качестве противосудорожных препаратов (Kortunay, et al., 2012; Xu, et al., 2013; Ng, 2017; Wang, et al., 2018), однако нейрохимические основы участия орексинов в патогенезе различных форм эпилепсии не изучены.

Функция орексинов как факторов активации пищевого поведения общепризнана (Yamanaka, et al., 1999; Tsuneki, Wada., Sasaoka, 2012), как и участие орексинов в регуляции метаболических процессов (Sakurai, et al., 1998, Diano, et al., 2003). Дофамин и серотонин мозга также вовлечены в регуляцию пищевого поведения (Volkow, Wise, Baler, 2017; Leite, Ribeiro, 2019). Показано, что при ожирении уровень их рецепторов (в частности D1 и D2, 2C и 1B) меняется в гипоталамусе (Volkow, Wang, Baler, 2011; Doslikova, et al., 2013; Yoon, Baik, 2015). Вопрос о том, как в ходе развития метаболических расстройств изменяется динамика активности орексинергической системы, а также какое влияние при этом оказывают monoамины на орексинергическую систему, требует уточнения. Решение этого вопроса позволит рассматривать орексинергическую систему как потенциальную терапевтическую мишень при коррекции заболеваний, связанных с метаболическими расстройствами.

Цель настоящей работы: исследование морфофункциональных взаимодействий между дофаминергическими и серотонинергическими нейронами с орексинергическими нейронами мозга на разных этапах онтогенеза.

Задачи:

1. Исследовать возможность экспрессии рецепторов дофамина и серотонина в орексинергических нейронах перифорникальной области гипоталамуса.
2. Проследить формирование морфофункциональных взаимосвязей орексинергических нейронов с дофаминергической и серотонинергической системами в онтогенезе.
3. Определить влияние пренатального стресса на функциональное состояние орексинергической, дофаминергической и серотонинергической систем мозга в ходе постнатального развития организма (P14 и P30).
4. Оценить функциональную активность орексинергических нейронов при моделировании дисфункций monoаминергических систем мозга.
5. Исследовать функциональную активность орексинергической системы гипоталамуса при дисфункции monoаминергических систем на фоне развития метаболических расстройств.

Научная новизна. Впервые продемонстрирована возможность прямого влияния дофамина на орексинергические нейроны перифорникальной области гипоталамуса через D1- и D2-рецептор (активирующие и тормозные) – зависимые пути. Выявлена взаимосвязь между уровнем дофамина и функциональным состоянием орексинергических нейронов гипоталамуса. Показана экспрессия серотониновых рецепторов 2C- и 1B-подтипов (активирующих и тормозных) непосредственно в орексинергических нейронах перифорникальной области, что расширяет представления

о путях участия серотонина в регуляции функциональной активности орексинергических нейронов и, соответственно, контролируемых ими функций. Впервые показано становление морфофункциональных взаимосвязей между орексинергическими нейронами с дофамин- и серотонинергическими системами в эмбриогенезе. Показано, что пренатальный стресс, перенесенный в критический период развития гипоталамуса крысы, приводит к преждевременной активации орексин- и дофаминергической системы гипоталамуса в раннем постнатальном периоде (Р14). Эта активация может быть проявлением компенсаторной реакции, направленной на восстановление нарушенных функций ЦНС, наличие которых подтверждается анализом двигательной активности крысят Р14. Впервые показано, что нарушение двигательной активности у крысят, подвергнутых пренатальному стрессу, сопровождается в стриатуме увеличением активности тирозингидроксилазы – скорость-лимитирующего фермента биосинтеза дофамина на 14-й день жизни. На фоне дисбалансаmonoаминов в гипоталамусе у крыс с генетическими формами эпилепсии (аудиогенная – линия Крушинского–Молодкиной или абсансная – линия WAG/Rij) наблюдается активация орексинергических нейронов гипоталамуса. Активность орексиновой системы на фоне дисбаланса monoаминов при метаболических расстройствах зависит от степени развития ожирения: ранние этапы развития ожирения сопровождаются активацией орексинергической системы, а на фоне более выраженных изменений метаболических показателей, напротив, наблюдается снижение ее активности.

Положения, выносимые на защиту:

- 1) Дофамин через D1 и D2 рецепторы, образующие в перифорникальной области гипоталамуса D1/D2 гетеродимерные комплексы, оказывает регуляторное влияние на орексинергические нейроны гипоталамуса.
- 2) Экспрессия 2C- и 1B-подтипов рецепторов серотонина в орексинергических нейронах гипоталамуса является молекулярной основой регуляторного действия серотонина на орексинергические нейроны гипоталамуса.
- 3) Молекулярные механизмы влияния дофамина и серотонина на орексинергические нейроны гипоталамуса формируются в ходе эмбрионального развития организма.
- 4) Дисфункции monoаминергических систем мозга сопровождаются изменением функциональной активности орексинергической системы гипоталамуса.

Теоретическая и практическая значимость. Проведенное исследование носит фундаментальный характер и направлено на изучение нейрохимических механизмов, обеспечивающих взаимосвязь орексинергических нейронов с дофаминергическими и серотонинергическими нейронами мозга. Полученные результаты расширяют представления о роли орексинергических нейронов гипоталамуса в регуляции функций, контролируемых дофаминергической и серотонинергической системами (стресс, пищевое поведение, двигательная активность и др.).

Полученные результаты демонстрируют функциональное взаимодействие орексин- и monoаминергических систем мозга как в норме, так и при патологиях. Данные исследований при моделировании таких заболеваний как эпилепсия, ожирение, двигательные расстройства могут быть использованы для разработки новых методов диагностики нарушения функционирования этих систем, а также определения фармацевтических стратегий их коррекции. Полученные данные могут быть использованы как теоретическая основа при разработке подходов, направленных на восстановление двигательной активности при патогенезе различной этиологии. Материалы диссертации могут быть использованы в курсах лекций и практических занятий для студентов биологических и медицинских факультетов университетов и медицинских институтов.

Апробация работы. Результаты исследования доложены и обсуждены на Всероссийских конференциях: Российской научной конференции «Фармакология регуляторных пептидов», Санкт–Петербург, Россия, 2017; Всероссийский симпозиум с международным участием «Стресс: физиологические эффекты, патологические последствия и способы их предотвращения», Санкт–Петербург, Россия, 2017; V Международный форум «Сон–2018», Москва, Россия, 2018; I Всероссийская Конференция и Школа с международным участием «Оптофармакология и Оптофармакология», Санкт–Петербург, Россия, 2018; VI Молодежная конференция по молекулярной и клеточной биологии, Санкт–Петербург, Россия, 2018; Всероссийский форум студентов и молодых ученых "Студенческая наука – 2018", Санкт–Петербург, Россия, 2018; XIV Конгресс Международной ассоциации морфологов, Астрахань, Россия, 2018; III Международной научной конференции «Современные проблемы нейробиологии», посвященной памяти заслуженного деятеля науки РФ профессора Шилкина Валентина Викторовича, Ярославль, Россия, 2018; Всероссийская молодежная конференция с международным участием «Современные аспекты интегративной физиологии», Санкт–Петербург, Россия, 2018; Конференция с международным участием «Физиология и биохимия сигнальных систем», посвященная 100–летию со дня рождения академика Т.М. Турпаева, Москва, Россия, 2018.

Финансовая поддержка работы. Исследование проведено с использованием оборудования ЦКП ИЭФБ РАН на средства государственного бюджета по госзаданию № АААА–А18–118012290427–7; субсидии Комитета по науке и высшей школе г. Санкт–Петербурга (распоряжение №182 от 26.11.2018; диплом ПСП № 18782), гранта РНФ № 16–15–10388.

Личный вклад автора. Результаты, представленные в работе, получены лично автором и при его непосредственном участии в проведении экспериментов и обработке данных. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

Публикации. По теме диссертации опубликовано: 7 работ в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, а также тезисы в других печатных изданиях.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 301 источник (в том числе 36 отечественных) и приложения. Работа изложена на 142 страницах, иллюстрирована 39 рисунками и 10 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные и экспериментальные модели

Эксперименты были выполнены согласно дизайну исследования, одобренному Этическим комитетом ИЭФБ РАН, European Communities Council Directive 1986 (2010/63/EEC), согласно правилам, изложенным в “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”. При планировании и проведении экспериментов на животных соблюдены «принципы **3R**»: **Replacement** (использование альтернативных методов), **Reduction** (минимизация количества животных в эксперименте), **Refinement** (минимизация факторов безосновательного стрессирования животных до, вовремя и после проведения эксперимента, таких как боль, дискомфорт, страх).

Для экспериментов были использованы:

1. Крысы неинбридной линии Вистар (18-дневные эмбрионы, 14-ти и 30-дневные крысята, половозрелые самцы разного возраста).
2. Самцы крысы линии Крушинского-Молодкиной (КМ, возраст 4.5 мес.), генетически предрасположенные к аудиогенной эпилепсии.
3. Самцы крысы линии Wistar Albino Glaxo rats (WAG/Rij, 6.5-7 мес.), генетически предрасположенные к абсанской эпилепсии.
4. Крысы линии DAT-KO – нокауты по мембранныму транспортеру дофамина (6.5-7 мес.).
5. Самки мыши C57Bl/6J двух генотипов: a/a и Ay/a (Agouti yellow) разного возраста.

Моделирование дефицита катехоламинов с помощью а-метил-паратирозина (аМПТ) – фармакологического блокатора синтеза тирозингидроксилазы, SCH 39166 и L-741,626 – селективных антагонистов D1 или D2 рецепторов дофамина, соответственно.

Задачей этих экспериментов было выяснение характера влияния катехоламинов на орексинергические нейроны. Были использованы половозрелые самцы (230–250 г.) крысы Вистар. В первой серии экспериментов внутрибрюшинно вводили 400 мкл физиологического раствора (контрольная группа, n=4) или SCH 39166 (TocrisBioscience), который разводили в физиологическом растворе (доза 0.3 мг/кг; n=4).

Во второй серии экспериментов крысы были предварительно отсажены для привыкания в 3 клетки на 2 дня. Далее животных делили на 4 группы (n=16). В первый день эксперимента крысам внутрибрюшинно вводили: 1-я группа – 400 мкл NaCl (контрольная группа); 2-я группа – тот же объем аМПТ (Sigma, 100 мг/кг); 3-я группа – SCH 39166 (0.3 мг/кг); 4-я группа – L-741,626 (TocrisBioscience, 0.3 мг/кг). На второй день крысы внутрибрюшинно получали по одной, а на третий день по три (интервал 1 ч) инъекции 400 мкл NaCl, или аМПТ (100 мг/кг), или SCH 39166 (0.3 мг/кг), или L-741,626 (0.3 мг/кг).

Исследование модельных животных с генетической предрасположенностью к эпилептической активности и дисфункциейmonoаминергических систем мозга

В нашей работе были использованы 4.5-месячные самцы дочерней линии **крысы КМ** (n=16) из популяции, выведенной и поддерживавшейся на кафедре ВНД СПбГУ Е.А. Рябинской, которая поддерживается в ИЭФБ РАН к.б.н. С.И. Ватаевым. Крысы предварительно были тестированы на судорожную активность, контролем для них были крысы Вистар того же возраста (n=15).

Самцы крысы WAG/Rij 6.5–7-месячного возраста для наших исследований были предоставлены сотрудниками ИВНД и НФ РАН и профессором Уфимского государственного университета З.Р. Хисматуллиной. Крысы WAG/Rij (n=14) предварительно были тестированы на наличие судорожной активности, контролем для них были крысы Вистар (n=12) того же возраста.

Самцы крысы линии DAT-KO 6.5–7-месячного возраста (n=4) разведены и генотипированы сотрудниками Башкирского государственного университета, фиксированный мозг этих животных был предоставлен нам для исследования З.Р. Хисматуллиной. Контролем для них были самцы крысы Вистар (n=6) того же возраста.

Мыши Agouti yellow (генотип Ay/a) генетически предрасположенные к развитию ожирения (**меланокортиновое ожирение**). Для эксперимента использованы 5-месячные самки мышей C57/6J двух генотипов: a/a (черный цвет шерсти, n=12) и Ay/a (Agouti yellow – рыжий цвет шерсти, n=12). Мыши двух генотипов одинакового возраста и веса (12–13 г) были привезены из вивария Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск) и адаптированы к условиям вивария ИЭФБ РАН. Генотип Ay/a характеризуется доминантной (спонтанной) мутацией гена *агутти* и развитием ожирения

после 10-ти недельного возраста. Мыши Ay/a быстрее набирают массу тела вследствие активации пищевого поведения и отличаются по весу от мышей того же возраста генотипа a/a. Для исследования были использованы 5-месячные мыши a/a (22–25 г) и Ay/a (36–40 г.), когда метаболические показатели достоверно и существенно отличались.

Депривация сна

Эксперимент проведен на самцах крысы Вистар (масса 220–250 г). Контрольных крыс (Контроль) декапитировали в период активного бодрствования (n=6). Экспериментальных животных в течение 6-ти часов лишали сна, посредством мягкого прикосновения к вибриссам, не давали дремать, застывать. После этого часть животных декапитировали (группа ДС, n=6), а другую группу животных декапитировали через 2 ч после прекращения ДС (постдепривационный период - ПДП, n=6). Протокол эксперимента был описан ранее (Романова, Михрина, 2013).

Иммобилизационный стресс

Эксперимент проведен на самцах крысы Вистар. Животные экспериментальной группы были подвергнуты жесткой 3-часовой иммобилизации на спине (Им, n=6), путем фиксации конечностей, контролем (Контроль, n=6) были интактные крысы.

Диета-индуцированное ожирение у крыс и мышей

Для эксперимента были взяты самцы крысы линии Вистар и самки мыши линии C57Bl/6J (a/a), которые на протяжении всего эксперимента находились в стандартных условиях вивария.

Крысы экспериментальной группы (n=12) с 26-дневного возраста получали кафетерий-диету, которая включала жировую смесь (52 % свиного сала) как добавку к стандартному сухому корму (19% белка, 5% жира, 4% волокон, 9% золы), а также 30%-ный раствор сахарозы вместо питьевой воды. Через 12 недель диеты у крыс развивалось диета-индуцированное ожирение (ДИО), которое констатировали по метаболическим показателям (Romanova, et al., 2018). Контрольные крысы (n=12) получали стандартный корм.

Мышей линии C57Bl/6J (a/a) экспериментальной группы с 4-месячного возраста содержали на высококалорийной диете, аналогичной диете крыс группы ДИО. Продолжительность диеты составляла 8 недель (ДИО8, n=12) и 16 недель (ДИО16, n=12). Контрольные мыши (n=22) соответствующего возраста потребляли стандартный сухой корм и воду.

Контроль сроков пренатального развития крысы

Для точного определения дня гестации виргинных самок крысы Вистар отсаживали в отдельные клетки и при помощи мазков из влагалища контролировали фазу эстрального цикла (Marcondes, Bianchi, Tanno, 2002). Первым днем беременности считали день обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке. На 18-й день беременности самок (n=5) декапитировали, извлекали эмбрионов и фиксировали их мозг.

Пренатальный стресс (метод «малых площадок»)

Метод «малых площадок», разработанный Мишелем Жуве для депривации быстроволнового сна (Vogel, 1975), сочетает комплекс стрессорных воздействий: депривация быстрого сна, ограничение подвижности, эмоциональный стресс, вызванный страхом падения в воду. У животных, подверженных такому воздействию в течение 6 часов на протяжении 8 дней, наблюдаются увеличение веса тимуса и надпочечников (Ковальzon, Цибульский, 1978). Этот метод был использован для моделирования пренатального стресса. Беременных самок крысы линии Вистар (n=6) с 13 по 19 день

гестации подвергали депривации сна по 6 ч в день при комнатной температуре: помещали на платформу диаметром 6.5 см, возвышающуюся на 0.5 см над бассейном с водой. Во время эпизодов быстрого сна, когда мышцы расслаблялись, крыса падала с платформы в бассейн, после чего сразу возвращалось на платформу. С 20-го дня беременности самок содержали в стандартных условиях вивария, где происходило донашивание, роды и выхаживание потомства. Крысята, перенесшие пренатальный стресс, были исследованы на 14-й (ПНС14) и 30-й (ПНС30) день жизни. Контролем являлись крысята соответствующего возраста (К14 и К30), рожденные от самок (n=6), которые весь период беременности находились в стандартных условиях вивария и не подвергались стрессу. На протяжении всего постнатального периода потомство находилось с матерью, имея неограниченный доступ к воде и пище. Крысята были использованы для 1) для морфологических (n=24) и биохимических (n=24) исследований; 2) для исследования поведения в teste «открытое поле» (К14, n=22; ПНС14, n=27; К30, n=22; ПНС30, n=22).

Поведение крысят 14-ти и 30-дневного возраста оценивали в teste «открытое поле» (Макаров, 2013; Морина, Станкова, Романова, 2019).

Обработка материала

Взятие материала проводили после внутрибрюшинного наркоза хлорал гидратом (400 мг/кг). **Для морфологических исследований фиксацию мозга** проводили либо посредством транскардиальной перфузии (0.1М фосфатным буфером – РВ, затем 4% параформальдегидом, разведенном на 0.2М РВ, pH 7.4), либо погружением в раствор 4% параформальдегида. У эмбрионов мозг фиксировали вместе с черепом 6 ч. Затем мозг промывали в нескольких порциях холодного 0.02М РВ с 0.9% NaCl (PBS) и помещали в 30% раствор сахарозы, растворенный на PBS, и оставляли при +4° С до погружения на дно посуды. Мозг замораживали в изопентане (Sigma), охлажденном до – 42° С и хранили при – 86° С.

С помощью криостата (Leica, Германия) были изготовлены чередующиеся серии фронтальных срезов мозга, которые монтировали на стекла super frost/plus. Свободноплавающие срезы (20 мкм) накапливали в холодном РВ.

Приготовления проб для определения моноаминов в ткани проводили по протоколу, описанному ранее (Lambertsen, et al., 2012). Замороженную ткань стриатума и гипоталамуса погружали в 4-х кратный объем водного раствора холодной перхлорной кислоты (0.1 М). После гомогенизации и центрифугирования 10 мин при +4° С (12000g) надосадок замораживали и хранили при – 80° С.

Экстрагирование общей РНК проводили по протоколу фирмы-производителя реактивов (TRI Reagent–Protocols). Замороженную ткань гипоталамуса погружали в TRI Reagent (Mol.ResearchCen.Inc., 1 мл реагента на 50–100 мг ткани). После осаждения в изопропаноле и промывки в 2-х порциях 75° этанола осадок растворяли в DEPC–воде. Определения концентрации общей мРНК использовали спектрофотометр «Implen NanoPhotometer P330» (Implen). Измерения проводили в интервале поглощения нуклеиновыми кислотами света длиной волны 260/ 280нм, чистоты РНК считалась чистой при соотношении D260/D280, ≥ 1,6.

Пробы для Вестерн–блоттинга. Замороженную ткань гипоталамуса и стриатума размораживали и гомогенизировали в десятикратном растворе лизирующего буфера (0.02M TRIS (hydroxymethylamino-methane), 0.15M NaCl, 0.001M EDTA, 1% Triton X–100, pH 7.5), в который добавляли коктейль ингибиторов протеаз (Sigma) и ингибиторов фосфотаз (PhosStop) согласно инструкции производителя (RocheDiagnostic). После 15 мин центрифугирования (12000g) собирали надосадок. В ряде случаев проводили выравнивание белка в лизате методом Бредфорд. Два объема лизата разводили одним объемом 3-х кратного SDS–буфера (6% SDS – sodium dodecyl sulfate, 0.2M TRIS–HCl,

15% глицерин, 3% бромфеноловый синий, 10% β -меркаптоэтанол, pH 6.7) и в течение 5 минут нагревали на водяной бане при 95° С. Готовые пробы хранили при – 25° С.

Биотин–стрептавидиновая методика иммуногистохимии была использована для анализа уровня белков в структурах мозга и проведена по стандартному протоколу. После предварительной обработки стекла со срезами инкубировали в растворе первичных антител. Для иммуногистохимических реакций были использованы первичные антитела *кролика* к орексину-А (Sigma, 1:1000), к орексину-В (Sigma, 1:1000), к дофамин- β -гидроксилазе (Abcam, 1:500), к ТПГ2 (Millipore, 1:2000), первичные антитела *мыши* к орексину-А (R&Dsystems, 1:1000) или ТГ (Abcam, 1:1000). Также были использованы соответствующие вторичные антитела козы, коньюгированные с биотином (Vector. Labs.): против кролика (1:300) или против мыши (1:400). После промывки в PBS срезы на 1 ч при комнатной температуре помещали в раствор стрептавидин–пероксидазы (BioLegend), разведенной на PBS 1:700. Во всех случаях для визуализации пероксидазы использовали 0.05% раствор диаминобензидина с 0.03 % перекисью водорода на PBS. После тщательной промывки стекла подвергали стандартной гистологической обработке. Специфичность окраски проверяли с помощью негативного контроля (без первых или вторичных антител). Позитивным контролем считали выявление белков в структурах, ранее описанных в литературе.

Двойное флуоресцентное иммуномечение было использовано для исследования распределения одновременно в двух веществ в структурах мозга. Был использован общепринятый метод «коктейля» (Хериет, Гаттер, 1999). Свободноплавающие срезы или стекла с монтированными срезами после тщательной промывки в PBS и PBST 30 мин обрабатывали 100 мМ раствором глицина на PBS, 1 ч инкубировали в 5% блокирующем растворе (смесь сывороток: 2% козы и 3% быка, растворенные на PBST) и инкубировали в смеси двух первичных антител, которые разводили в 2% блокирующем растворе. Инкубацию проводили при + 4° С 48–72 ч. Для двойного иммуномечения была использована смесь следующих комбинаций первичных антител: кролика к орексин-А (Sigma, 1:1000) и мыши к ТГ (Sigma, 1:1000), кролика к ТГ (Abcam, 1:2000) и мыши к орексину-А (R&Dsystems, 1:1000), кролика к Д2 (L/S) (Millipore, 1:200) и мыши к GAD65 (Abcam, 1:1000) и GAD67 (Millipore, 1:1000), кролика к Д2 (L/S) (Millipore, 1:200) и мыши к Д1 (Millipore, 1:100), *мыши* к орексину-А (R&Dsystems, 1:1000) и кролика к Д1 (Abcam, 1:200), или кролика к Д2 (L/S) (Millipore, 1:200), или кролика к 1В (USBiologics, 1:200), или кролика к 2С (Elabscience Biotechnology Ltd., 1:200), или кролика к ТПГ2 (Millipore, 1:2000), или кролика к дофамин- β -гидроксилазе (Abcam, 1:300), или кролика к орексину В (Sigma, 1:500), или овцы к сFos (Abcam, 1:100); кролика к орексину-А (Sigma, 1:1000) и овцы к ТПГ1 (Millipore, 1:500). После тщательной промывки в PBS в течение 1 ч. при комнатной температуре проводили инкубацию в смеси соответствующих вторичных антител, коньюгированных с флуоресцентными метками (Invitrogen, 1:1000): цыпленка против кролика (с Alexa-488) и осла против мыши (с Alexa-568) или козы против овцы (с Alexa-543). После тщательной промывки в PBS свободноплавающие срезы натягивали на стекла и подсушивали. Стекла со срезами заключали с помощью среды mowiol под покровное стекло и хранили при + 4° С. В ряде случаев перед заключением на срезы дополнительно наносили ядерный краситель DAPI (Sigma, США, 1:2000). Специфичность проверяли реакциями без первых или вторичных антител.

Вестерн–блоттинг. Белки в пробах разделяли с помощью электрофореза в 10%–12% бис-АА акриламидном геле по Лэммли (SDS–PAGE, Laemmli, 1970), использовали оборудование для Вестерн–блоттинга (Bio–Rad Laboratories, США). Для электрофореза использовали 10 мкг белка из пробы. Для определения уровня белка-интереса

использовали окрашенный маркер молекулярного веса (Fermentas). Гель с белковыми фракциями переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham) в течение 1 ч. Для инкубации использовали полоски мембран, соответствующие молекулярному весу белков. После блокировки 30 мин. в 4% блокирующем растворе (сухое молоко, разведенное на TRIS – buffer saline с 0.1 % Tween-20 – TBST, pH 7.6) мембранны инкубировали в течение ночи при + 4°C в первичных **антителах мыши** к DAD65 (Abcam, 1:2000), к GAD67 (Millipore, 1:1000), ТГ (Sigma, 1:3000), Д1 рецепторам (Millipore, 1:500), первичные **антитела кролика** к фТГ-40 (Invitrogen, 1:4000), ТПГ2 (Millipore, 1:2000). Для определения уровня контрольного белка использованы первичные антитела **мыши** к GAPDH (Abcam, 1:2000). Далее после промывки в нескольких порциях TBST проводили инкубацию в соответствующих вторичных антителах (при комнатной температуре 1 ч), конъюгированных с пероксидазой хрина, разведенных на 4% блокирующем растворе. Были использованы вторичные антитела козы (Sigma): против мыши (1:10000) или против кролика (1:2000). Визуализацию сигнала проводили с помощью хемилюминисцентной системы ECL-Prime и рентгеновской пленки (Amersham), которую проявляли стандартным фотонабором (Реактив-фото). Для каждого белка подбирали несколько экспозиций, реакции повторяли 2-3 раза.

Метод обратной транскрипции (ОТ) и ПЦР в реальном времени использовали для анализа уровня экспрессии генов. ОТ проведена по протоколу фирмы-производителя реагентов (Evrogen). В качестве праймера-затравки использовали random (dT). В пробах объемом 25 мкл содержалось 1 μ g тотальной РНК. Для ПЦР были использованы праймеры, подобранные с помощью программы Primer Blas и литературных источников. Синтез прямого (F-forward) и обратного (R-reverse) праймеров проведен фирмой Evrogen, характеристики которых приведены в **таблице 1**. В качестве контрольных генов для мыши были использованы *hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase1* (*Hprt1*) и ген, кодирующий 18S рибосомальную РНК, а для крысы ген *Gapdh*. Температура плавления праймеров составляла 55–57 °С. Реакции проводили в планшетах для ПЦР, каждую пробу повторяли 3 раза. Амплификация проводилась в объеме 25 мкл, содержащем 40 нг ОТ-продукта, 0.4 мкМ прямого и обратного праймера и реагент qPCRmix-HS SYBR LowROX с интеркалирующим красителем SYBR Green в соответствии с протоколом производителя (Evrogen). Каждый цикл реакции (всего 40 циклов) состоял из четырех этапов: предварительная денатурация 5 мин при 95° С, денатурация 40 секунд при 95° С, отжиг с праймерами 30 сек при 57° С (для Д2 при 56° С), стадия наращивания продукта 35 сек при 75° С. На последнем этапе цикла делали кривую плавления конечного продукта реакции 40 минут при 95° С и 57° С (56° С для Д2). В качестве негативного контроля для ОТ служили пробы с мРНК, но без фермента обратной транскриптазы, а для контроля самой ПЦР - пробы с праймером, но без ОТ-продукта. Амплификационный сигнал был детектирован прибором 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies ABI). Результаты обрабатывали с помощью программ 7500 Software v.2.0.6 и Expression Suite Software v.1.0.3. Для сравнения графиков, полученных в результате ПЦР в «реальном времени», использовали пороговый метод $\Delta\Delta Ct$, с помощью которого определяли количество конечного продукта, выраженное в относительных единицах (RQ – relative quantity – количество мРНК гена интереса относительно референсного гена).

Анализ изображения

Изображения структур были получены с помощью микроскопа Carl Zeiss (Германия) в проходящем свете со встроенной видеокамерой Imager A 4.1, программного обеспечения для захвата изображения AxioVision – 4.7.2. (в jpg или .tiff форматах). На снимках проводили оценку оптической плотности иммунопозитивного вещества в

программе Image J (NIH, США) или Photo-M (Черниговский, http://t_lambda.chat.ru) в нейронах. У каждого животного анализировали 8–12 снимков в структуре (35–50 нейронов). Результаты представлены как ОП в условных единицах (у.е.).

Анализ флуоресцентного изображения проводили с помощью микроскопа DMI6000 и лазерной сканирующей конфокальной установки Leica TCS SP5-II («Leica Microsystems», Германия) или мультифотонной установки. Для последовательного сканирования использовали иммерсионный объектив $\times 63$ и лазеры с длиной волны возбуждения 488, 568 или 543 нм (а также 355 нм для DAPI). Количественный анализ флуоресцентного изображения (Füzesi, et al., 2007) проводили с помощью пакета программ Leica LAS AF Lite. На снимках (10–12), полученных при одинаковых оптических установках в наиболее интенсивной области свечения по Z-позиции, обводили тела имmunопозитивных нейронов и копировали Excel-файлы с характеристиками gray values для каждого исследованного канала, значения которых делили на уровень соответствующего фона и вычисляли среднее для каждого среза. Подготовку микрофотографий к демонстрации проводили с помощью программы Photoshop CS3.

Таблица 1. Праймеры, использованные для ПЦР в «реальном времени».

Ген	Положение	Последовательность	Длина продукта, нн	NCBI номер
<i>Для крысы</i>				
<i>Drd1</i>	For 5'-3'	ACATCTGGTAGCCTTGACATC	76	NM_012546.3
	Rev 5'-3'	TACCTGTCCACGCTGATCACG		
<i>Drd2(L)</i>	For 5'-3'	GCAGCAGTCGAGCTTCAGA	124	NM_012547.1
	Rev 5'-3'	CGCCTGTTCACTGGGAAACT		
<i>pOX</i>	For 5'-3'	GTTCCCTGCCGTCTACGA	72	NM_013179.2
	Rev 5'-3'	GCTTTCCCAGAGTGAGGATG		
<i>Ox1r</i>	For 5'-3'	TGCGGCCAACCTATCATCTA	137	NM_013064.1
	Rev 5'-3'	ACCGGCTCTGCAAGGACAA		
<i>Ox2r</i>	For 5'-3'	ACTGTCTACGCCCTGGTTCAC	183	NM_013074.1
	Rev 5'-3'	CTCTGTACTTGTGCGTCCCC		
<i>Gapdh</i>	For 5'-3'	GTGTTCCCTACCCCCAATGTATCC	74	NM_017008.4
	Rev 5'-3'	GATGTCATCATACTTGGCAGGTTT		
<i>Для мыши</i>				
<i>pOx</i>	For 5'-3'	CGCAGAGCTAGAGCCACATC	70	NM_010410
	Rev 5'-3'	GGGTGCTAAAGCGGTGGTAG		
<i>Ox1r</i>	For 5'-3'	CCGTCTACGCCCTGCTTCAC	62	NM_198959
	Rev 5'-3'	AGGGTTGGCGGCAGTGT		
<i>OX2</i>	For 5'-3'	GACAAGCTTGCAGCACTGA	95	NM_198962
	Rev 5'-3'	AAGCAGATGACCAGTTGCGA		
<i>Hprt1</i>	For 5'-3'	AGCCGACCGGTTCTGTCA	72	NM_013556.2
	Rev 5'-3'	GGTCATAAACCTGGTTCATCAC		
<i>18S</i>	For 5'-3'	GGGAGCCTGAGAACGGC	68	NR_003278
	Rev 5'-3'	GGGTCGGAGTGGTAATT		

Метод обращеннофазной высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией на хроматографе Beckman Coulter (США) (Krasnova, et al., 2000) использован для определения концентрации дофамина, серотонина, метаболита дофамина ДОФУК, метаболита серотонина – 5-ГИУК, основного продукта метаболизмаmonoаминов – гомованилиновой кислоты. Хроматографическая система включала инжектор Rheodyne 7125 с петлей на 20 мкл для нанесения образцов, колонку Phenomenex (250.0 x 4.6 мм) с сорбентом Sphere Clone 5 и ODS(2) и амперометрический

детектор LC-4C BAS. Определение концентраций исследуемых веществ проводили при потенциале +0,70 В. Подвижная фаза включала 5,5 мМ цитратно-фосфатный буфер с 0,7 мМ октансульфоновой кислотой, 0,5 мМ ЭДТА и 8% ацетонитрила (рН 3,0). Скорость элюции подвижной фазы составляла 1 мл/мин, время анализа одной пробы – около 20 минут. Конечная концентрация была выражена в нг/мкл гомогената или в процентах относительно контрольного уровня.

Статистический анализ проводили с помощью методов параметрической (Н-критерий Крускала–Уоллиса, U-критерий Манна–Уитни, для множественных сравнений применяли поправку Холма–Бонферрони) или непараметрической статистики (одно- или двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA), апостериорный анализ межгрупповых различий по критерию Тьюки; t-критерия Стьюдента). Данные представлены как медиана (M) 50% данных с интерквартильными размахами или как среднее ± стандартная ошибка, при уровне значимости $p < 0,05$.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование молекулярных мишеней действия дофамина и серотонина на орексинергические нейроны перифорникальной области гипоталамуса

Хорошо известно, что в структурах гипоталамуса осуществляется экспрессия рецепторов дофамина (D1 и D2) и серотонина (2C и 1B). Результаты двойного иммуномечения демонстрируют присутствие D1 (рис. 1) и D2 рецепторов дофамина в перифорникальной области гипоталамуса (ПФО) у крысы и у мыши и, в частности, в орексинергических нейронах. При этом в ПФО выявлена большая степень колокализации D1 и D2 (рис. 2), что свидетельствует о возможности формирования гетеродимерных D1/D2-комплексов, которые, очевидно, определяют характер влияния дофамина на орексинергические нейроны. При этом следует отметить, что в ПФО D1 и D2 выявлены и в ГАМК-нейронах.

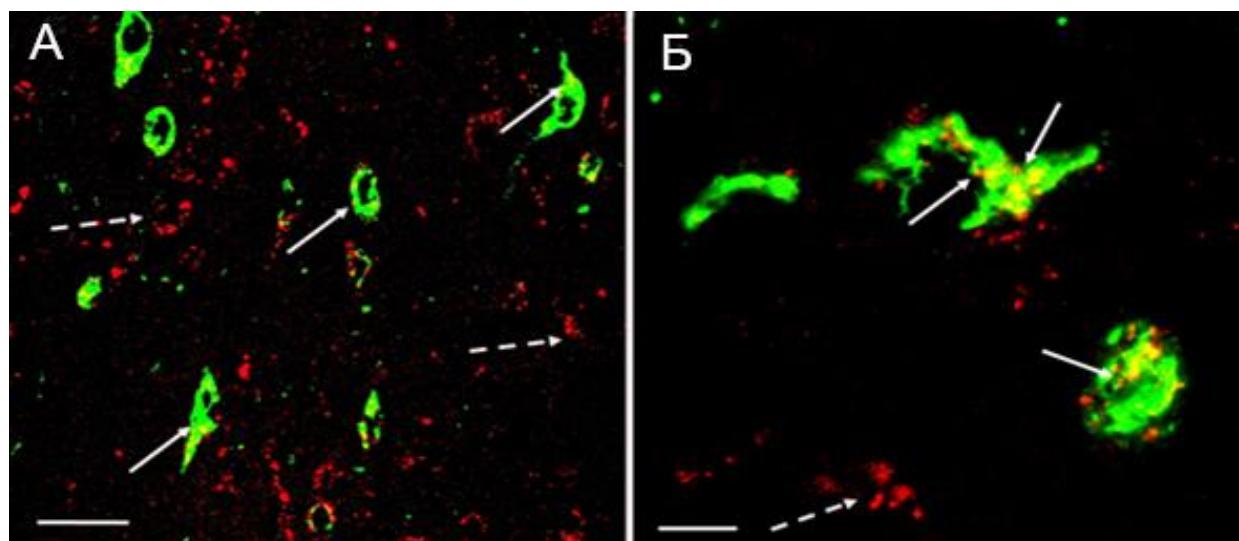


Рис. 1. Двойная иммуногистохимическая реакция к орексину-А (зеленое) и D1 рецепторам дофамина (красное) в перифорникальной области гипоталамуса крысы. Сплошные стрелки – D1 в телях орексин-иммунопозитивных нейронов (желтое), прерывистые стрелки – D1 в структурах другой эргичности. Масштаб: 25 мкм (А), 7,5 мкм (Б).

Двойное иммуномечение демонстрирует широкое распространение 1В и 2С рецепторов серотонина в ПФО у мыши и у крысы, в том числе их присутствие в орексин-иммунопозитивных нейронах ПФО (рис. 3).

Представленные данные демонстрируют возможность прямого регуляторного влияния дофамина и серотонина на функциональную активность орексинергических нейронов ПФО через D1- и D2-, а также 2С- и 1В-опосредованные механизмы.

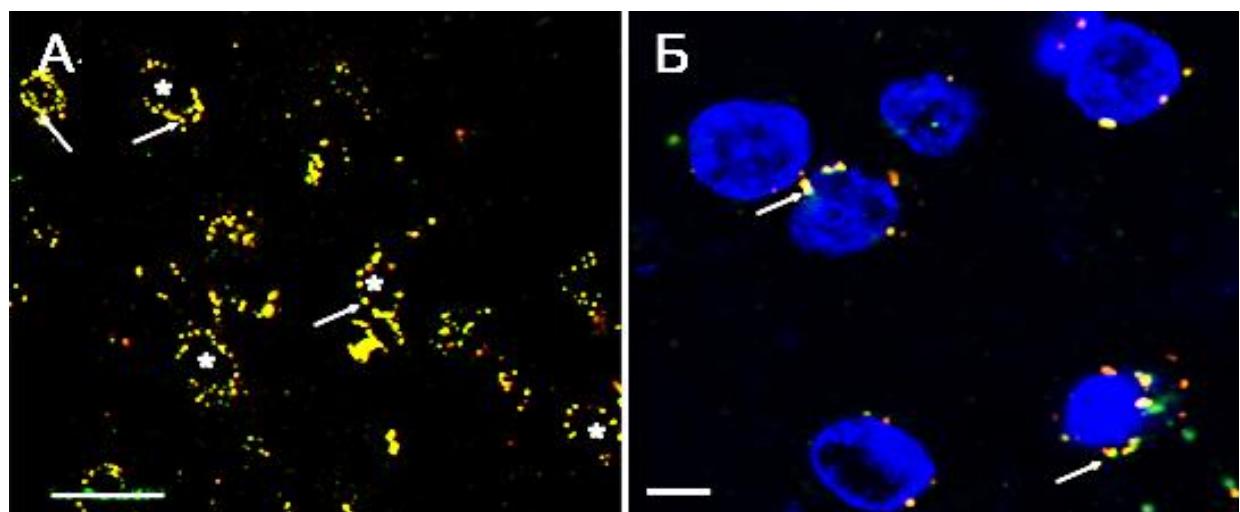


Рис. 2. Двойная иммуногистохимическая реакция к D1 и D2 в перифорникальной области гипоталамуса крысы. Сплошные стрелки – колокализация D1 и D2 (желтое). Звездочка - место локализации ядра (А), которое окрашено синим (DAPI, Б). Масштаб: 20 мкм (А), 5 мкм (Б).

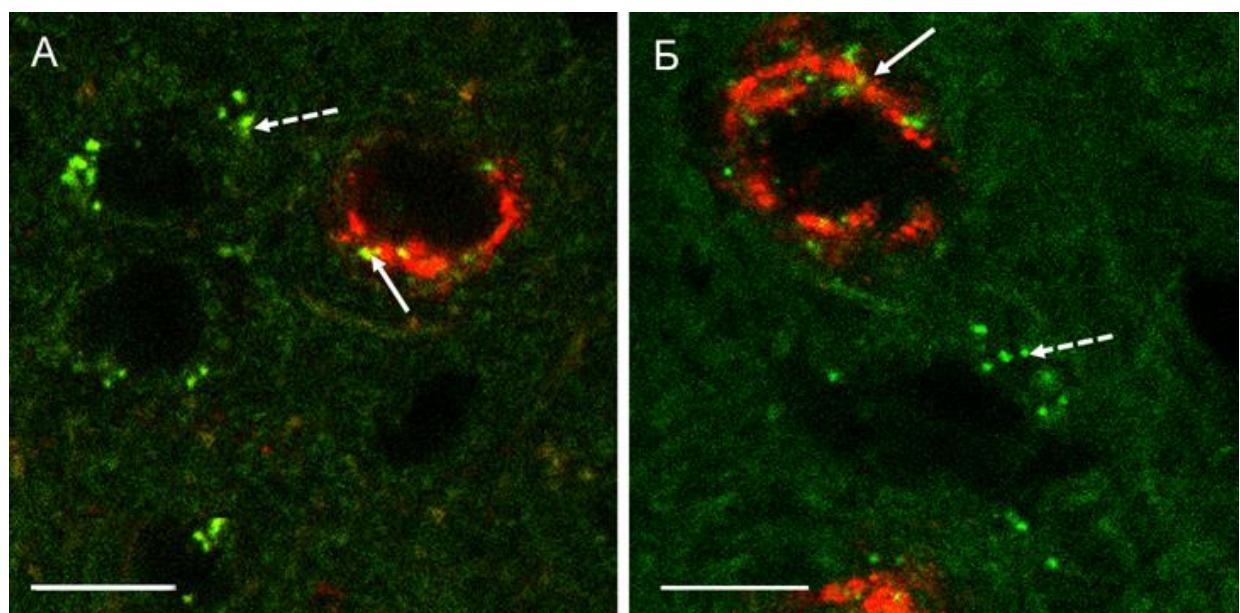


Рис. 3. Двойная иммуногистохимическая реакция к 2С (А) и 1В (Б) подтипам рецепторов серотонина в орексин-иммунопозитивных нейронах ПФО мыши. Сплошные стрелки – колокализация рецепторов (желтое) в телах нейронов (красное), прерывистые стрелки – локализация рецепторов в структурах другой эргичности. Масштаб: 10 мкм.

После введения фармакологических блокаторов D1 или D2 рецепторов, а также блокатора активности ТГ было выявлено уменьшение оптической плотности орексина-А в нейронах ПФО (рис. 4): на 13% после введения антагониста D1 рецепторов ($M=0.84, 0.82; 0.85, p<0.05$), на 20% после введения антагониста D2 рецепторов ($M=0.78, 0.73; 0.85, p<0.05$) и на 40% после введения аМПТ ($M=0.52, 0.51; 0.55, p<0.05$) по сравнению с уровнем у контрольных крыс ($M=0.97, 0.94; 0.98$). Двойное иммуномечение демонстрирует экспрессию cFos белка в ПФО как в орексинергических, так и в нейронах другой эргичности. Через 1 ч после введения антагониста D1 выявлено увеличение интенсивности свечения белка cFos в орексинергических нейронах на 240% ($p<0.05$), а также в нейронах другой эргичности на 248% ($p<0.05$). Полученные данные подтверждают возможность прямого влияния дофамина на орексинергические нейроны через D1- и D2-зависимые пути, также, очевидно, и опосредованного, через регуляцию ГАМК-нейронов, расположенных в ПФО.

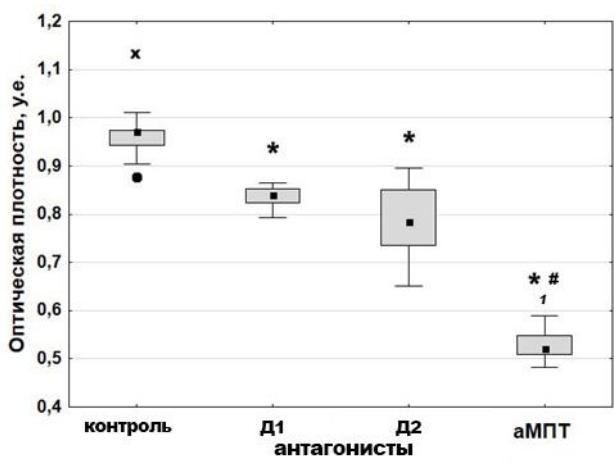


Рис. 4. Уровень орексина-А в нейронах ПФО крысы после введения селективного антагониста D1, D2 или аМПТ. По оси ординат: оптическая плотность в условных единицах (у.е.). Данные представлены в виде бокс-плотов, соответствующих 50% данных. Обозначения: черная точка внутри бокса – медиана, линии предела – интерквартильный размах, x – выскакивающие значения. Достоверность отличий (при $p<0.05$): * – по сравнению с контролем, # – по сравнению с введением антагонистов D1 или D2 рецепторов.

Депривация сна у взрослых крыс (в постнатальном периоде)

Ранее было показано, что после 6-часовой депривации сна (ДС) в гипоталамусе, в среднем мозге и стриатуме происходит уменьшение уровня ТГ, а во время 2-х часов ПДП – восстановление (Оганесян, и др., 2007, 2008). При этом в стриатуме после ДС выявлено снижение уровня дофамина, во время ПДП – тенденция к его восстановлению (Михрина, 2015). Следует отметить, что степень изменений ТГ в этом эксперименте была более выражена в гипоталамусе. С помощью ВЭЖХ в дорзальном стриатуме выявлено уменьшение уровня серотонина на 45% ($p<0.05$) после ДС и его восстановление до уровня в контроле во время ПДП. Результаты иммуногистохимического анализа свидетельствуют об увеличении в гипоталамусе оптической плотности орексина-А после ДС на 32% ($M=0.93, 0.86; 0.95, p<0.05$) по сравнению с контролем ($M=0.70, 0.66; 0.80$, рис. 19А). После 2-х ч ПДП отмечено еще большее увеличение уровня орексина на 11% ($M=1.04, 1.01; 1.09, p<0.05$) по сравнению с ДС, а также на 48% ($p<0.05$, рис. 19А) по сравнению уровнем в контроле (рис. 5).

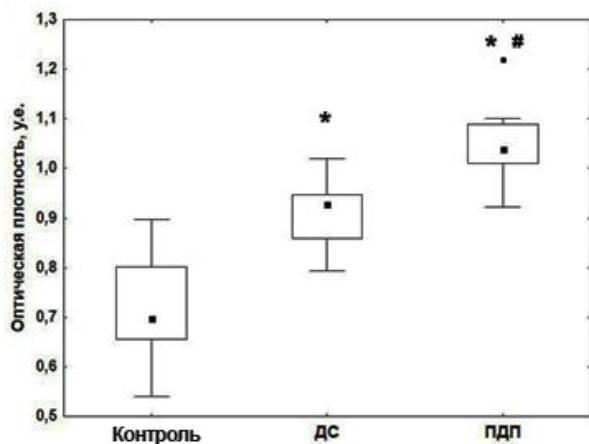


Рис. 5. Уровень орексина-А в нейронах гипоталамуса у крыс линии Вистар на фоне депривации сна (ДС) и 2-х часового постдепривационного периода (ПДП). По оси ординат: оптическая плотность в условных единицах (у.е.). Представлено 50% данных в виде бокс-плотов. Обозначения: черная точка внутри бокса – медиана, линии предела – интерквартильный размах. Достоверность отличий ($p<0.05$): * – по сравнению с контролем, # – по сравнению с ДС.

Полученные данные демонстрируют активацию орексинергической системы гипоталамуса как на фоне снижения уровняmonoаминов, так и на фоне их восстановления. Полученные данные демонстрируют функциональную взаимосвязь между дофамин- и серотонинергической системами с орексинергической.

Функциональное состояние орексинергической системы гипоталамуса у крыс, генетически предрасположенных к эпилептической активности

У Крыс КМ в гипоталамусе с помощью ВЭЖХ было показано значительное увеличение уровня дофамина (Михрина, 2015). У этих животных в гипоталамусе также выявлено увеличение уровня серотонина (на 36%, $p<0.05$) по сравнению с крысами

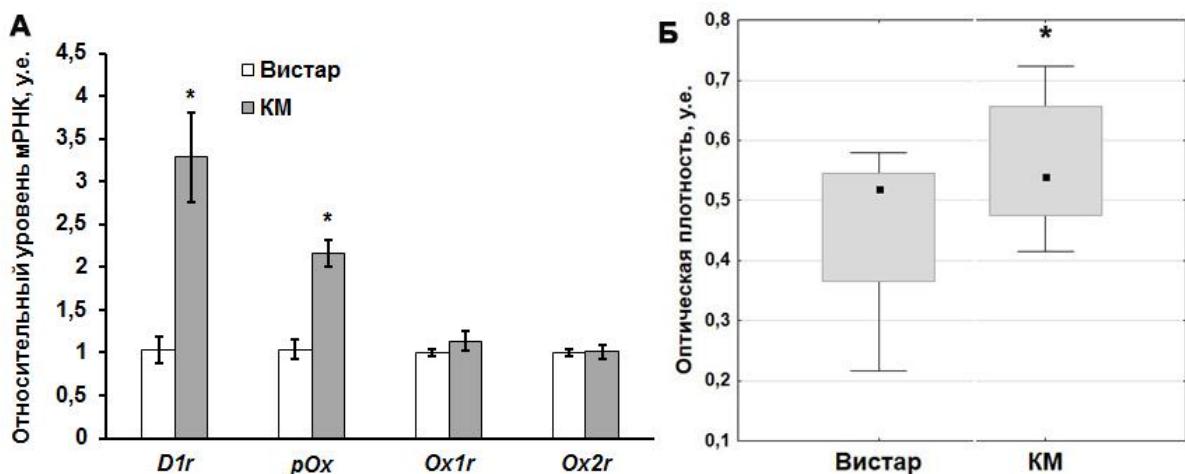


Рис. 6. Анализ экспрессии генов (А) и иммуногистохимический анализ орексина-А в нейронах (Б) в гипоталамусе крысы Вистар и КМ. Обозначения: гены, кодирующие D1рецептор дофамина (*D1r*), препро-орексин (*pOx*), орексиновый рецептор 1 и 2 (*Ox1r* и *Ox2r*); бокс-плоты (Б) соответствуют 50% данных (от 25 до 75%), черная точка внутри бокса – медиана, линии предела – интерквартильный размах. Результаты представлены в условных единицах (у.е.), * – достоверность отличий ($p<0.05$) между группами.

Вистар, но не выявлено достоверных изменений уровня его метаболита и кatabолического коэффициента. На фоне активации серотонин- и дофаминергической систем у крыс КМ выявлено увеличение уровня мРНК препро-орексина (в 2 раза, $p<0.05$) по сравнению с крысами Вистар (рис. 6 А), при этом не выявлено изменения

уровня мРНК OX1R и OX2R. У крыс КМ в ПФО отмечена более интенсивная иммуногистохимическая реакция к орексину-А в нейронах ($M=0.56, 0.47; 0.66, p<0.05$, **рис. 6 Б**) и их отростках по сравнению с крысами Вистар ($M=0.52, 0.37; 0.54$).

Результаты ВЭЖХ демонстрируют в гипоталамусе у крыс WAG/Rij снижение уровней дофамина (на 13%, $p<0.05$) и серотонина (на 15%, $p<0.05$) по сравнению с крысами Вистар. Отсутствие различий в уровнях ДОФУК, катаболических коэффициентов, а также снижение 5-ГУИК (на 20%, $p<0.05$) можно рассматривать как реакцию системы, направленную на сохранение уровня метаболизмаmonoаминов. Результаты ПЦР (**рис. 7 А**) демонстрируют в гипоталамусе у крыс WAG/Rij увеличение уровня мРНК препро-орексина (в 1.5 раза, $p<0.05$), OX1R (на 45%, $p>0.05$) и OX2R (в 2.7 раз, $p<0.05$) по сравнению с крысами Вистар. При этом у крыс WAG/Rij отмечено повышение оптической плотности орексина-А в нейронах на 50% ($M=0.60, 0.55; 0.69, p<0.05$), по сравнению с крысами Вистар ($M=0.43, 0.41; 0.44$, **рис. 7 Б**).

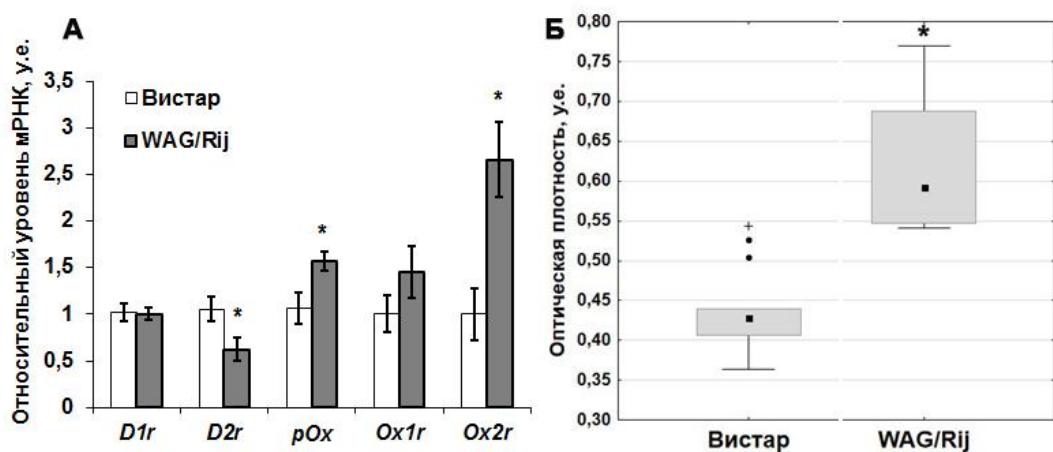


Рис. 7. Анализ экспрессии генов (А) и иммуногистохимический анализ орексина-А в нейронах (Б) в гипоталамусе крысы Вистар и WAG/Rij. Обозначения: гены, кодирующие D1 (*D1r*) и D2 (*D2r*) рецепторы дофамина, препро-орексин (*pOx*), орексиновый рецептор 1 и 2 (*Ox1r* и *Ox2r*); бокс-плоты (Б) соответствуют 50% данных (от 25 до 75%), черная точка внутри бокса – медиана, + – выскакивающие значения, линии предела – интерквартильный размах. Результаты представлены в условных единицах (у.е.), * – достоверность отличий ($p<0.05$) между группами.

Таким образом, у крыс КМ и WAG/Rij, генетически предрасположенных к эпилептической активности различного генезиса, наблюдается активация орексинергической системы. Это происходит, несмотря на то, что дисбаланс monoаминов в гипоталамусе носит разнонаправленный характер: повышенный уровень монаминов у крыс КМ и сниженный уровень монаминов у крыс WAG/Rij, что, очевидно, свидетельствует о существовании различных механизмов взаимодействия монаминов с орексинергическими нейронами.

У крыс DAT-KO отсутствие дофаминового транспортера приводит к увеличению концентрации дофамина в синаптической щели, и, как следствие, усиление влияния дофамина на нейроны-мишени. Полученные нами данные свидетельствуют об увеличении у крыс DAT-KO оптической плотности орексина-А в нейронах ПФО на 50% ($M=0.66, 0.62; 0.72, p<0.05$) по сравнению с крысами Вистар ($M=0.43, 0.41; 0.44$), что может быть следствием активирующего влияния дофамина (его увеличение в VTA было показано ранее, Salvatore, et al., 2016).

Формирование моррофункциональных взаимосвязей орексин-иммунопозитивных нейронов с дофамин- и серотонинергической системами мозга в ходе эмбрионального развития крысы

Показано, что в развивающемся мозге крысы орексин-иммунопозитивные структуры выявляются в гипоталамусе на E10-E12, а к E19 распределение проекций этих нейронов соответствует таковым во взрослом организме (van den Pol, et al., 2001; Steininger, et al., 2004; Amiot, et al., 2005; Ogawa, et al., 2017). Таким образом, дифференцировка орексинергических нейронов гипоталамуса происходит во время критического периода развития гипоталамуса (Cogeshell, 1964) и совпадает со сроками дифференцировки различные популяций дофаминергических и серотонинергических нейронов. В гипоталамусе с помощью гибридизации *in situ* мРНК D1 рецепторов выявлялась на E18 (Schambra, et al., 1994). Результаты ПЦР свидетельствуют об экспрессии в гипоталамусе 2С уже в период E9–E12 (Wu, et al., 1999). Проведенное нами двойное иммуномечение демонстрирует в орексин-иммунопозитивных нейронах на E18 экспрессию D1 и 2С рецепторов.

Полученные нами данные впервые демонстрируют, что дофамин- и серотонинергическая системы мозга устанавливают моррофункциональные взаимосвязи с орексинергическими нейронами гипоталамуса в ходе пренатального развития в период, когда гипоталамус является особенно чувствительным к различного рода воздействиям. Экспрессия в орексинергических нейронах эмбрионов D1 и 2С рецепторов свидетельствует о возможности регуляторного влияния дофамина и серотонина на них.

Орексины выявлены в клетках обонятельной выстилки у взрослой крысы (Caillol, et al., 2003). Полученные нами данные демонстрируют присутствие большого количества ориентированных биполярных клеток, иммунопозитивных к ТГ и орексинам (A и B), в эпителии носовой полости и пазух у 18-дневных эмбрионов крысы. При этом двойное иммуномечение выявило колокализацию орексинов в большинстве ТГ-иммунопозитивных клетках, что свидетельствует о возможности структурно-функционального взаимодействия орексинов и дофамина на ранних этапах развития организма. Таким образом ольфакторная орексинергическая система на E18 выглядит уже вполне сформированной, по сравнению с гипоталамической.

Влияние пренатального стресса на функциональное состояние орексинергической иmonoаминергических систем мозга крысы

Показано, что крысята ПНС14 отстают по уровню двигательной активности от К14 ($F(6.42) = 6.99, p<0.05$): с помощью теста «открытое поле» у них отмечено меньшее время локомоторной активности и больше движений на месте, а также меньший уровень как вертикальной, так и горизонтальной двигательной активности. У крысят ПНС30 не выявлено отличий в показателях горизонтальной и вертикальной двигательной активности по сравнению с К30, однако у них отмечен повышенный уровень тревожности ($F (11.32) = 3.77, p<0.05$): крысята ПНС30 меньше времени проводили в центре «открытого поля», меньше обследовали норки и больше времени проводили в неподвижности по сравнению с К30.

Статистический анализ результатов ВЭЖХ и иммуногистохимии выявил значимое влияние фактора «стресс», $F(3.30)=19.80$ ($p<0.05$), фактора «возраст» $F(3.30)=12.69$ ($p<0.05$) и взаимодействия факторов «стресс» и «возраст» $F(3.30)=11.85$ ($p<0.05$) на показатели функциональной активности дофаминергической системы гипоталамуса; а также влияние фактора «стресс», $F(1.35)=37.10$ ($p<0.05$), взаимодействие факторов «стресс» и «возраст» $F(1.35)=36.62$ ($p<0.05$) на уровень орексина в нейронах ПФО. В гипоталамусе крысят ПНС14 по сравнению с К14 с помощью ВЭЖХ выявлено увеличение уровня дофамина в 2.7 раз ($p<0.05$, **рис. 8 Б**), при этом уровень его

катаоболического коэффициента был на 80% ниже по сравнению с K14 ($p<0.05$). В группе ПНС30 уровень дофамина и его катаоболический коэффициент достоверно не отличались от K30. С помощью ВЭЖХ не выявлено различий

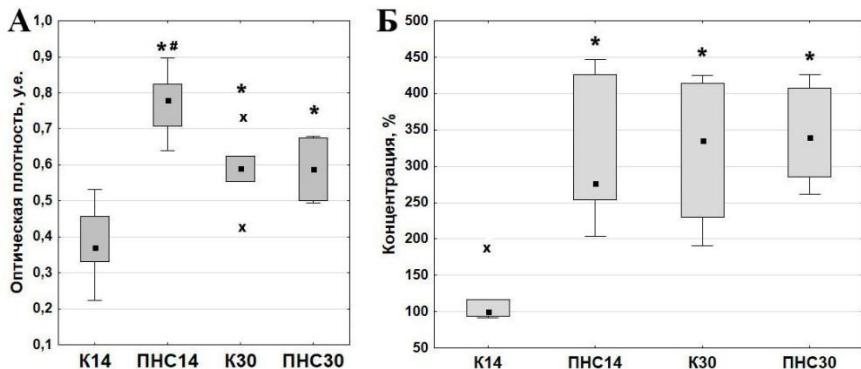


Рис. 8. Уровень орексина-А (А) и дофамина в (Б) в гипоталамусе у 14-ти и 30-дневных крысят в контроле (K14 и K30) и после пренатального стресса (ПНС14 и ПНС30). По оси ординат: А – оптическая плотность в условных единицах (у.е.), Б – концентрация дофамина, выраженная в процентах. Результаты (50% данных) представлены в виде бокс-плотов.

в уровне серотонина и его катаоболического коэффициента между K14 и ПНС14, а также ПНС30 и K30 группами.

У крысят ПНС14 по сравнению с K14 в гипоталамусе на фоне увеличения уровня дофамина выявлено увеличение (в 2 раза, $p<0.05$) оптической плотности орексина-А в нейронах, что оказалось на 30% больше, чем у крысят K30 ($p<0.05$, **рис. 8 А**). У крысят ПНС30 на фоне нормализации уровня дофамина уровень оптической плотности орексина-А в нейронах также достоверно не отличался от такового у K30 и был ниже, чем у ПНС14 ($p<0.05$).

Результаты Вестерн-блоттинга (**рис. 9**) демонстрируют в стриатуме у крысят ПНС14 уменьшение уровня ТГ на 25% ($p<0.05$) и увеличение фТГ-40 на 64% ($p<0.05$) по сравнению с K14, что свидетельствует о более интенсивном переходе ТГ в активную форму: соотношение фТГ40/ТГ в группе K14 составляло 1.2, а в группе ПНС14 – 2.4. У крысят ПНС14 выявлено уменьшение уровня GAD65 и GAD67 – ферментов биосинтеза ГАМК соответственно на 68% ($p<0.05$) и 37% ($p<0.05$) по сравнению с K14. У крысят ПНС30 не выявлено достоверных отличий уровня ТГ и фТГ-40 (соотношение фТГ40/ТГ составило 3.3), а также уровня GAD65 и GAT67 от соответствующего уровня у K30, что свидетельствует о компенсации нейрохимических нарушений, отмеченных в группе ПНС14.

Полученные данные демонстрируют односторонние изменения орексин-, дофамин- и серотонинергической систем мозга уже на ранних этапах онтогенеза крысы. Пренатальный стресс вызывает активацию орексин- и дофаминергической систем (Р14). Так как в литературе активно обсуждается роль орексинов как морфогенетических факторов (Bjornstrom, et al., 2014; Bakos, et al., 2016 и др.), то полученные нами данные могут свидетельствовать об участии орексинов в компенсаторных механизмах мозга, результатом которых является нормализация нейрохимических и, как следствие, поведенческих показателей, наблюдавшихся у крысят ПНС30.

*Обозначения: черная точка внутри бокса – медиана, линии предела – интерквартильный размах, x – выскакивающие значения. Достоверность отличий ($p<0.05$): * – по сравнению с K14, # – с ПНС14.*

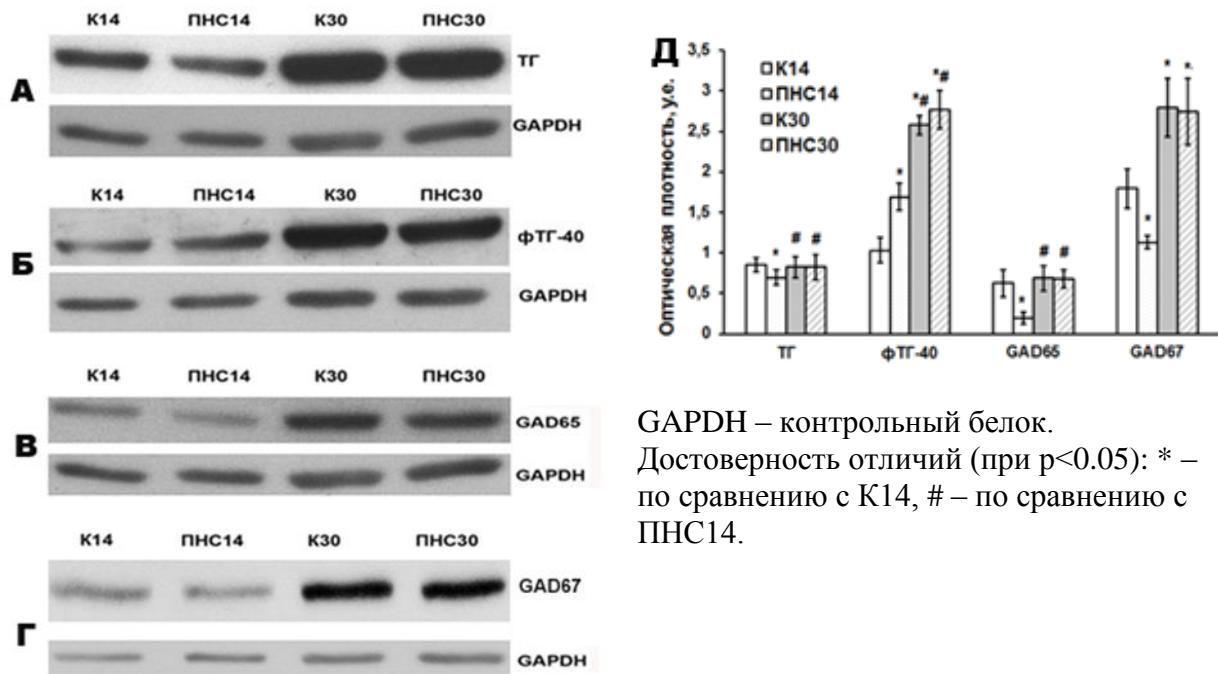


Рис. 9. Результаты Вестерн-блоттинга, демонстрирующие: А – изменение уровня тирозингидроксилазы (ТГ), Б – фосфорилированной по серину-40 ТГ (фТГ-40), В – glutamate decarboxylase 65 (GAD65), Д - glutamate decarboxylase 67 (GAD67) и Д - статистический анализ результатов у 14-ти и 30-дневных крысят контрольных (К14 и К30) и после пренатального стресса (ПНС14 и ПНС30).

Морфофункциональные взаимодействия дофамин- и серотонинергической систем с орексинергическими нейронами гипоталамуса при ожирении

При ожирении, которое развивается при увеличении потребления высококалорийной пищи, наблюдаются дисфункцииmonoаминергических систем в разных отделах мозга. Нами впервые проведен анализ уровня рецепторов дофамина и серотонина в орексинергических нейронах (рис. 10 А, 11 А), которые, как известно, вовлечены в регуляцию пищевого поведения. У грызунов, находившихся на кафетерий-

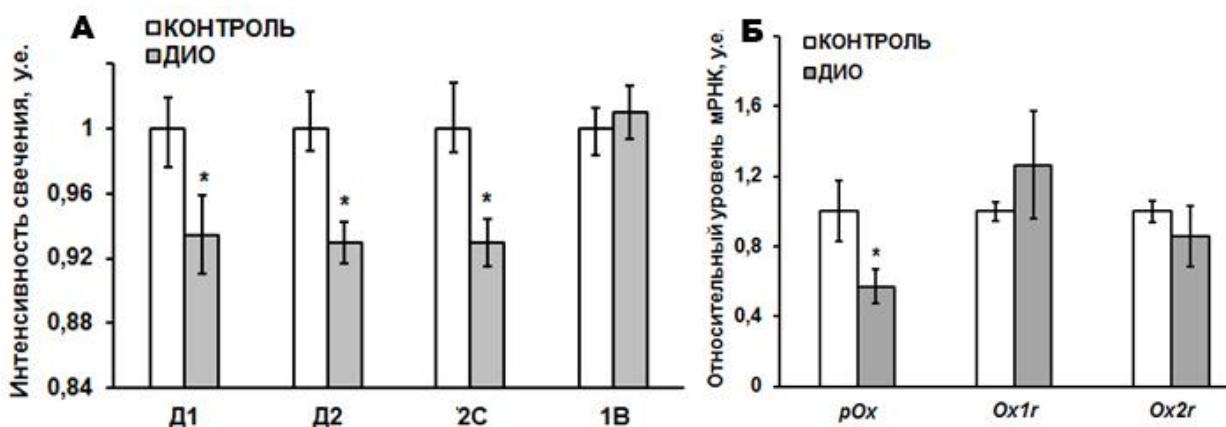


Рис. 10. Интенсивность свечения рецепторов в телах орексинергических нейронов (А) и экспрессия генов (Б) в гипоталамусе крысы при диета-индуцированном ожирении (ДИО). Обозначения: гены, кодирующие препро-орексин (pOx), орексиновый рецептор 1 и 2 (Ox1r и Ox2r); по оси ординат показатели представлены в условных единицах (у.е.), * – достоверность отличий ($p<0.05$) от соответствующего контроля.

диете в нашем эксперименте, отмечены признаки метаболического синдрома: у них наблюдалось достоверное повышение массы тела и жировой ткани, повышение уровней инсулина и лептина в крови, что свидетельствует о развитии гиперинсулинемии и гиперлептинемии, а также повышался как базальный, так и стимулированный глюкозной нагрузкой уровень глюкозы (Romanova, et al., 2018).

У крысы анализ экспрессии генов в гипоталамусе (рис. 10 Б) демонстрирует уменьшение уровня мРНК препро-орексина на 54% ($p<0.05$), однако не выявлено достоверных изменений мРНК OX1 и OX2R рецепторов. **У крыс при ДИО оптическая плотность орексина-А была снижена на 35% ($M=0.4, 0.37;0.42, p<0.05$) по сравнению с контролем ($M=0.62, 0.58;065$).**

У мышей суточное потребление калорий в группе ДИО8 было достоверно выше, чем в контроле, в группе ДИО16 оно снижалось до уровня в контроле (Морина, и др., 2019). У мышей анализ экспрессии генов в гипоталамусе (рис. 11 Б) выявил уменьшение уровня мРНК препро-орексина при ДИО16 на 36% ($p<0.05$) по сравнению с контролем и на 50% ($p<0.05$) по сравнению с ДИО8. Уровень мРНК OX1R при ДИО8 возрастал по сравнению с контролем на 165% ($p<0.05$), а при ДИО16 не отличался от контрольного. **У мышей оптическая плотность орексина-А в нейронах ПФО в группе ДИО8 возрастала на 40% ($M=0.87, 0.83;0.88, p<0.05$) по сравнению с контрольной ($M=0.61, 0.58;0.65$), в группе ДИО16 ($M=0.66, 0.62;0.73$) была снижена по сравнению с ДИО8 ($p<0.05$) и не отличалась от контрольной.**

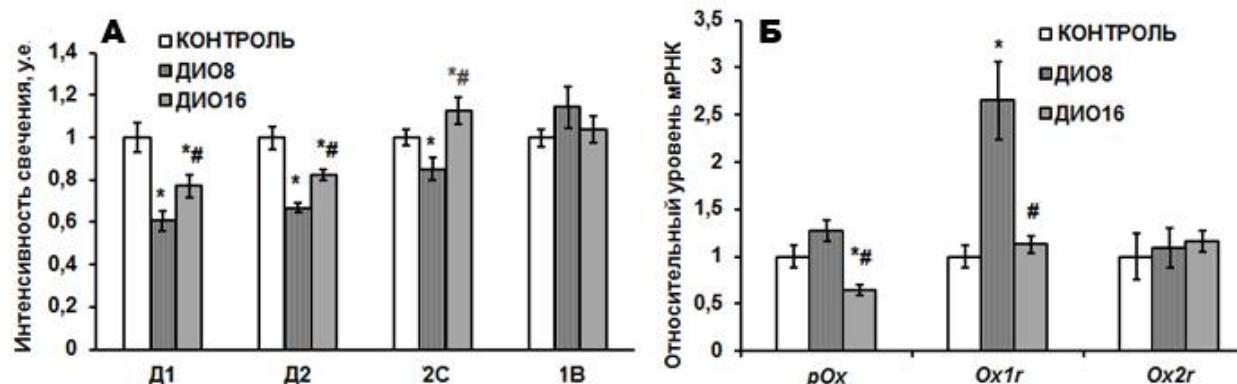


Рис. 11. Интенсивность свечения рецепторов в телах орексинергических нейронов (А) и экспрессия генов (Б) в гипоталамусе мыши при диета-индуцированном ожирении 8 и 16 недель (ДИО8 и ДИО16). *Обозначения:* гены, кодирующие препро-орексин (*pOx*), орексиновый рецептор 1 и 2 (*Ox1r* и *Ox2r*); по оси ординат - показатели в условных единицах (у.е.), * – достоверность отличий ($p<0.05$) от соответствующего контроля, # - по сравнению с ДИО8.

Полученные данные демонстрируют, что при диета-индуцированном ожирении дисфункцииmonoаминергических систем в гипоталамусе сопровождаются, в частности, изменением экспрессии рецепторов дофамина и серотонина в орексинергических нейронах. При развитии метаболических расстройств функциональная активность орексинергической системы меняется: сначала возрастает (при активации потребления пищи), а при выраженному ожирению уменьшается, что можно рассматривать как механизм, направленный на снижение потребления калорий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

История исследования орексинов и их функциональных мишеней насчитывает более двадцати лет. За этот период получено много данных, демонстрирующих роль этих пептидов в регуляции различных функций мозга, прежде всего в контроле пищевого поведения, энергетического баланса, цикла бодрствование-сон и др. Дофамин и серотонин – важнейшие нейромедиаторы, вовлеченные в регуляцию многих функций мозга, в том числе и тех функций, за которые отвечают орексины, из чего, закономерно, возникает вопрос о возможности совместного функционального действия орексинов иmonoаминов. Известна роль орексинов в контроле дофамин- и серотонинергических нейронов мозга. Нами впервые показано участие monoаминов в контроле функциональной активности самих орексинергических нейронов. Представленные нами результаты, впервые демонстрируют возможность регуляторного влияния дофамина и серотонина на орексинергические нейроны через соответствующие рецепторы (Д1 и Д2, 2С и 1В), что подтверждается результатами фармакологических исследований, в частности блокады Д1 и Д2 рецепторов дофамина. Впервые показано, что возможность регуляторного влияния дофамина и серотонина на орексинергические нейроны формируется в ходе эмбрионального периода, а пренатальные воздействия, в частности стресс, могут существенно повлиять на становление орексинергической и monoаминергических систем и, соответственно, контролируемых ими функций мозга. При этом значительно увеличенный уровень орексинов в гипоталамусе у крысят, перенесших стресс в пренатальном периоде развития, не сопровождался отличиями в массе тела по сравнению с контрольными крысятами на 14-й день жизни. В то же время, роль орексинов в развитии ожирения очевидна, и активность орексиновой системы определяется степенью развития ожирения.

В литературе общепризнано мнение о роли орексинов, как факторах, ответственных исключительно за бодрствование. Несмотря на то, что после 6-часовой депривации сна, сопровождающейся уменьшением уровня дофамина и серотонина в структурах мозга, отмечается увеличение уровня орексина в нейронах гипоталамуса, в периоде “отдачи” сна (rebound-effect), наступающем после прекращения депривации, на фоне восстановления уровня дофамина и серотонина в различных структурах мозга мы показали, что уровень орексина возрастает еще в большей степени.

Нами получены данные, демонстрирующие у эмбрионов обильную экспрессию орексинов в обонятельном эпителии, в то время как в гипоталамусе орексиновые нейроны еще находятся в стадии миграции и дифференцировки.

При патологиях, сопровождающихся дисфункцией дофамина и серотонина в мозге, в частности при генетически обусловленной эпилептической активности различного генезиса, мы показали активацию орексинергической системы гипоталамуса. При этом у животных не отмечено каких-либо нарушений, которые обычно связывают с орексинергической системой (в частности у крыс КМ не выявлено изменения структуры цикла бодрствование-сон).

Таким образом, полученные в ходе выполнения настоящей работы результаты, свидетельствуют о том, что орексины могут выполнять и другие, пока не изученные функции, исследование которых значительно расширит представления о функциональной роли орексинов и их взаимосвязях с другими нейрохимическими системами мозга.

ВЫВОДЫ:

1. Экспрессия в орексинергических нейронах гипоталамуса Д1 и Д2 рецепторов дофамина, а также 2С и 1В рецепторов серотонина свидетельствует о возможности

регуляторного влияния дофамина и серотонина на функциональную активность этих нейронов мозга.

2. Колокализация D1 и D2 рецепторов в перифорникальной области гипоталамуса демонстрирует возможность образования D1/D2 гетеродимерных комплексов, что определяет характер регуляторного воздействия дофамина на функциональную активность орексинергических нейронов.
3. Установлено, что D1 рецепторы дофамина и 2C рецепторы серотонина экспрессируются в орексинергических нейронах гипоталамуса крысы уже в эмбриональном периоде развития.
4. Пренатальный стресс усиливает активацию орексинергической и дофаминергической систем гипоталамуса крысы в раннем постнатальном периоде развития (Р14), что может рассматриваться как компенсаторный механизм, направленный на восстановление нарушенных функций ЦНС.
5. В гипоталамусе крыс, генетически предрасположенных к различным формам эпилептической активности, активация орексинергической системы наблюдается как на фоне повышения уровня дофамина и серотонина (при аудиогенной эпилепсии у крыс Крушинского–Молодкиной), так и при пониженном уровне этих моноаминов (абсансная эпилепсия у крыс WAG/Rij), что свидетельствует о существовании различных механизмов взаимодействия моноаминергических систем мозга с орексинергической системой.
6. При диета-индуцированном ожирении дисбаланс моноаминергических систем сопровождается изменением функциональной активности орексинергической системы гипоталамуса, которая меняется в зависимости от степени метаболических нарушений: увеличивается на ранних этапах ожирения и снижается на более поздних этапах. Снижение функциональной активности орексинергической системы гипоталамуса при сильно выраженному ожирению может рассматриваться как компенсаторный механизм, направленный на снижение потребления калорий.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- в журналах из списка ВАК

1. Морина И.Ю., Станкова Е.П., Романова И.В. Влияние пренатального стресса на формирование орексинергической системы гипоталамуса крысы // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. - Т.105 (5). - С.591-607. - 2019.
2. Морина И. Ю., Михайлова Е. В., Романова И. В., Деркач К. В., Шпаков А. О. Орексин-А и его рецепторы в гипоталамусе мышей с диета-индуцированным и меланокортиновым ожирением // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. - Т. 105(4). - С.481-491. - 2019
3. Морина И. Ю., Михрина А. Л., Романова И. В. Иммуногистохимическое исследование путей влияния дофамина на орексинергические нейроны перифорникальной области гипоталамуса крысы // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. - Т.104 (6). - С. 692-700. - 2018.
4. Романова И. В., Морина И. Ю., Деркач К. В., Михрина А. Л., Сухов И. Б., Кузнецова Л. А., Шпаков А.О. Изменение орексигенных и анорексигенных факторов в гипоталамусе крыс с ожирением, вызванным кафетерий-диетой // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. - Т.104 (6). - С.724-730. - 2018.
5. Морина И.Ю., Романова И.В. Идентификация дофаминовых рецепторов в нейронах перифорникальной области гипоталамуса крысы, экспрессирующих орексины (гипокритины) // Морфология. - Т. 153 (3). - С.187-188. - 2018.

6. Morina I.Yu., Romanova I.V. Morphofunctional condition of orexinergic brain system with various genesis of epilepsy // Neurochemical Journal. - V. 12 (4). - S65. P.66. - 2018.
7. Морина И. Ю., Аристакесян Е. А., Кузик В. В., Оганесян Г. А., Алексеева О. С. О влиянии внутриутробной гипоксии на формирование орексинергической системы и цикла бодрствование-сон и в раннем постнатальном онтогенезе крыс // Журн. эволюц. биохим. физиол. Т.52 (3). - С. 214-220. - 2016.

публикации в других печатных изданиях, среди которых:

1. Морина И. Ю., Михрина А. Л., Романова И. В. Роль дофамина в регуляции орексинергических нейронов гипоталамуса у крыс с аудиогенной эпилепсией // Российская научная конференция «Фармакология регуляторных пептидов». Санкт-Петербург, Россия. - С.53-54. - 2017.
2. Морина И. Ю., Станкова Е. П. Развитие орексинергической системы гипоталамуса крыс на фоне пренатального стресса // Всероссийский симпозиум с международным участием «Стресс: физиологические эффекты, патологические последствия и способы их предотвращения». Санкт-Петербург, Россия. - С.156-157. - 2017.
3. Станкова Е. П., Морина И. Ю. Влияние пренатального стресса на формирование поведения в раннем постнатальном периоде развития крысы // Всероссийский симпозиум с международным участием «Стресс: физиологические эффекты, патологические последствия и способы их предотвращения». Санкт-Петербург, Россия. - С.197-198. - 2017.
4. Морина И. В., Романова И. В. Иммуногистохимическое исследование влияния дофамина на орексинергические нейроны перифорникальной области гипоталамуса крысы // I Всероссийская Конференция и Школа с международным участием «Оптогенетика и Оптофармакология». Санкт-Петербург, Россия. - С.96. - 2018.
5. Романова И. В., Морина И. Ю., Деркач К. В., Михрина А. Л., Сухов И. Б., Кузнецова Л. А., Шпаков А. О. Изменение соотношения орексигенных и анорексигенных факторов в гипоталамусе крыс с ожирением, вызванным кафетерий-диетой // I Всероссийская Конференция и Школа с международным участием «Оптогенетика и Оптофармакология». Санкт-Петербург, Россия. - С.106. - 2018.
6. Морина И. Ю. Экспрессия D1- и D2-рецепторов дофамина в орексинергических нейронах гипоталамуса // VI Молодежная конференция по молекулярной и клеточной биологии. Санкт-Петербург, Россия. - С.73-74. - 2018.
7. Морина И. Ю. Влияние пренатального введения антагониста рецептора дофамина на формирование орексинергической системы гипоталамуса в постнатальном онтогенезе // Всероссийский форум студентов и молодых ученых "Студенческая наука - 2018". Санкт-Петербург, Россия. - С.433-434. - 2018.