

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова  
Российской Академии Наук

Научный доклад об основных результатах подготовленной  
научно-квалификационной работы (диссертации)

**«Влияние пренатального стресса на формирование орексин- и  
дофаминергической систем мозга»**

Морина Ирина Юрьевна

06.06.01 - Биологические науки

03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология

Научные руководители:

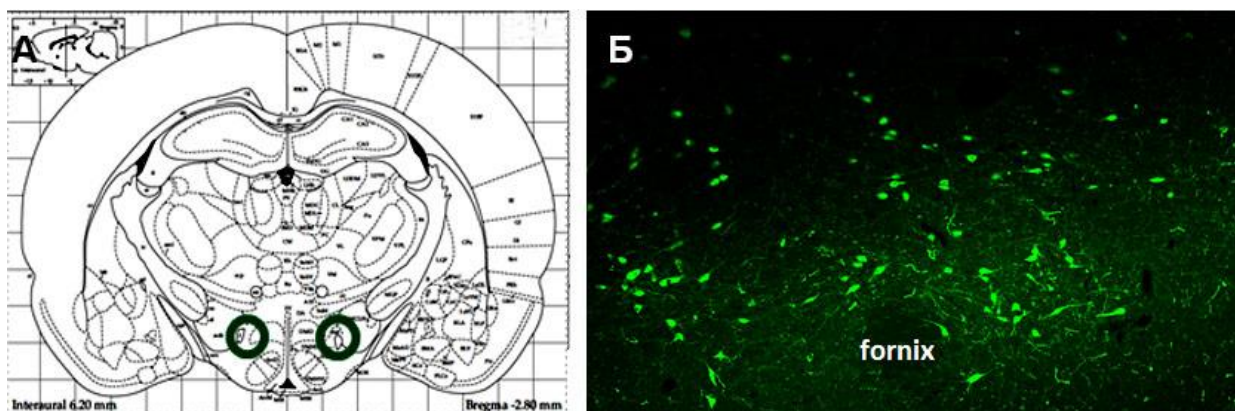
д.б.н. Романова Ирина Владимировна,  
к.б.н. Кузик Валерий Владимирович

ИЭФБ РАН  
Санкт-Петербург  
2018

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ АКТУАЛЬНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гипоталамус – центральное звено гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы – играет ключевую роль в адапционно-приспособительных реакциях организма. При этом сам является структурой чувствительной к действию пренатального стресса [1]. Повышение уровня кортикостероидных гормонов в крови беременной самки, которые, способны проникать через плаценту и действовать на плод [50, 48], оказывает активирующее влияние на гипоталамические нейромедиаторные системы. В связи с этим, изучение влияния пренатального стресса на формирование и взаимодействие медиторных/модуляторных систем гипоталамуса является важным для понимания компенсаторных механизмов и поиска новых путей и способов фармакологической коррекции нарушений в развитии.

Семейство нейропептидов – орексины образуются нейронами перифорникальной области гипоталамуса (рис. 1). К этому семейству относятся орексин-А/гипокретин-1 и орексин-Б/гипокретин-2. Первый состоит из 33 аминокислотных остатков, связанных двумя парами дисульфидных мостиков, второй – линейный пептид из 28 аминокислотных остатков. Их общий прекурсор препро-орексин состоит из 130 аминокислотных остатков [20, 40]. Действие орексинов осуществляется через два типа G-протеин-связанных рецепторов: 1-го и 2-го типа [20, 40], экспрессия которых выявлена в различных областях мозга, что свидетельствует об участии орексинов в регуляции многих функций мозга, в частности в регуляции пищевого поведения, бодрствования и пробуждения и др. [18, 20, 29, 40], а также вовлечены в регуляцию стрессорного ответа [21, 22]. Недавние исследования продемонстрировали, что в онтогенезе орексины гипоталамуса выполняют роль морфогенетического фактора [14,



**Рис. 1.** Локализация орексин-иммунопозитивных нейронов в перифорникальной области гипоталамуса крысы (отмечено зеленым) согласно атласу мозга [34] (А) и иммуногистохимическая реакция к орексину-А (Б).

16, 23]. Эти данные дают основание для предположения, что орексинергические нейроны гипоталамуса могут быть рассмотрены в качестве потенциальной мишени для коррекции последствий пренатального стресса на развивающийся организм. Однако влияние пренатального стресса на формирование самих орексинергических нейронов не изучено. Важно учитывать, что последствия пренатального стресса сильно зависят от характера и срока воздействия. В онтогенезе выделяют критические периоды, когда повышается чувствительность развивающегося организма к действию неблагоприятных факторов и снижается возможность к репарации повреждений [6, 10]. У крысы в ходе пренатального онтогенеза выделяют несколько критических периодов развития ЦНС: 13-14-й день (E13-14) – период для развития подкорковых, ряда стволовых структур и гипоталамуса, E18-19 – для развития таламических ядер, E19-20 – для процессов дифференцировки клеток коры больших полушарий [2, 6, 19]. Эти сроки совпадают с основными этапами развития орексинергических нейронов в эмбриогенезе. Известно, что они выявляются с E13, а с E19 их отростки идентифицируются за пределами гипоталамуса [13, 33, 41].

Отростки орексинергических нейронов выявлены, в частности, в среднем мозге между дофаминергическими нейронами, которые экспрессируют орексиновые рецепторы. Показано, что орексины оказывают активирующее влияние на них, участвуют в контроле двигательной активности, эмоционального возбуждения и мотивационного поведения [26, 31, 39], что свидетельствует о наличии морфофункциональной взаимосвязи между орексин- и дофаминергическими системами. В тоже время исследования влияния дофамина на орексинергические нейроны не дают четких результатов [17, 49]. Однако эти взаимодействия могут оказаться чрезвычайно важными в эмбриональном периоде для нормального формирования как орексин-, так и дофаминергических систем мозга, и вопрос о взаимодействии этих систем в онтогенезе в норме и после пренатального воздействия не изучен.

## **ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**ЦЕЛЬ:** оценить влияние пренатального стресса на формирование орексин- и дофаминергических систем в онтогенезе.

### **ЗАДАЧИ:**

1) Исследовать возможность экспрессии рецепторов дофамина в орексинергических нейронах перифорникальной области гипоталамуса.

- 2) Оценить функциональную активность орексинергических нейронов при моделировании дисфункций дофаминергической системы мозга.
- 3) Оценить функциональное состояние орексин- и дофаминергической систем мозга после пренатального стресса в различные периоды постнатального развития организма (P14 и P30).

### **ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ:**

- 1) Дофамин через D1- и D2-зависимые пути оказывает прямое и опосредованное (через регуляцию ГАМК-нейронов) влияние на орексинергические нейроны гипоталамуса.
- 2) Изменения баланса дофамина в мозге приводит к изменению функциональной активности орексинергических нейронов гипоталамуса.
- 3) Пренатальный стресс вызывает преждевременную активацию орексин- и дофаминергической систем мозга.
- 4) Активация орексинергических нейронов в раннем постнатальном периоде на фоне нарушения двигательной активности после пренатального стресса может носить компенсаторный характер.

### **НАУЧНАЯ НОВИЗНА РАБОТЫ**

Впервые продемонстрирована возможность прямого и опосредованного (через ГАМК-нейроны) путей влияния дофамина на орексинергические нейроны перифорникальной области гипоталамуса. Выявлена взаимосвязь между уровнем дофамина и функциональным состоянием орексинергических нейронов мозга. В ходе постнатального онтогенеза крысы (14-й и 30-й день жизни) выявлены однонаправленные изменения активности орексин- и дофаминергической систем. Впервые продемонстрирована преждевременная активация орексин- и дофаминергической систем мозга в гипоталамусе в раннем постнатальном периоде после пренатального стресса, перенесенного в критические периоды развития мозга крысы. Показано, что нарушение двигательной активности у крысят, подвергнутых пренатальному стрессу, сопровождается уменьшением в стриатуме уровня тирозингидроксилазы – скорость-лимитирующего фермента биосинтеза дофамина, но увеличением ее активности. Активация орексинергических нейронов может свидетельствовать о компенсаторной реакции гипоталамуса, направленной на активацию систем, стимулирующих поддержание уровня дофамина в мозге, необходимого для нормального развития организма.

## **ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ**

Исследование носит фундаментальный характер и направлено на понимание нейрохимических механизмов взаимосвязи орексинергической системы с дофаминергическими нейронами мозга. Также расширяет понимание роли орексинергических нейронов гипоталамуса как регуляторов функций, которые контролируются дофаминергической системой (двигательная активность, стресс и др.).

Полученные результаты демонстрируют функциональное взаимодействие орексин- и дофаминергических систем мозга в норме и при патологии и 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 препаратов, направленных на восстановление двигательной активности при патогенезе различной этиологии. Полученные данные могут быть использованы в курсах лекций и практических занятий для студентов биологических и медицинских факультетов университетов и медицинских институтов.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **Экспериментальные животные и экспериментальные модели**

В работе представлены результаты исследований, проведенных на крысах линии Вистар в соответствии с требованиями Этического комитета ИЭФБ РАН, European Communities Council Directive 1986 (2010/63/ЕЕС) и правилам, изложенным в “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”.

**Моделирование дисфункции дофаминергической системы** проведено для выяснения характера влияния дофамина на орексинергические нейроны у половозрелых крыс (самцы 230-250 г). В первой серии эксперимента животным внутрибрюшинно вводили 400 мкл физиологического раствора (контрольная группа, n=4) или селективного антагониста D1 рецепторов дофамина (SCH 39166, Tocris, США), разведенного в физиологическом растворе (доза 0.3 мг/кг, n=4). Через один час после инъекции животных наркотизировали хлорал гидратом (400 мг/кг) и подвергали транскардиальной перфузии 0.1 М фосфатным буфером и 4% раствором параформальдегида.

Во второй серии экспериментов половозрелые самцы (230-250 г) крыс линии Вистар были предварительно отсажены для привыкания на 2 дня. Далее животных делили на 4 группы (n=16). В первый день эксперимента крысам внутрибрюшинно

вводили: 400 мкл NaCl (контрольная группа), или 400 мкл раствора блокатора активности тирозингидроксилазы  $\alpha$ -метил-паратирозина (аМППТ, Sigma, США; 100 мг/кг), или SCH 39166 (0.3 мг/кг), или L-741.626 – селективный антагонист D<sub>2</sub> рецепторов дофамина (Tocris, США; 0.3 мг/кг). Во второй день крысам внутривенно вводили 400 мкл NaCl, или аМППТ (100 мг/кг), или SCH 39166 (0.3 мг/кг), или L-741.626 (0.3 мг/кг). В третий день эксперимента животным вводили те же количества препаратов, что и во второй день, но инъекции повторяли 3 раза с интервалом 1 ч. Через час после последней инъекции животных наркотизировали хлоралгидратом (400 мг/кг), мозг фиксировали погружением в 4% раствор параформальдегида.

**Моделирование пренатального стресса методом «малых площадок».** Беременных самок (n=6) крысы с 13 по 19 день гестации подвергали стрессу с помощью метода «малых площадок» [46]. Для этого самку на 6 ч помещали на платформу диаметром 6.5 см, возвышающуюся над бассейном с водой. Во время эпизодов быстрого сна, когда мышцы животного расслаблялись, оно падало с платформы в бассейн. С 20-го дня беременности самок содержали в стандартных условиях вивария, где происходило донашивание, роды и выхаживание их потомства. Контролем являлись крысята, рожденные от самок (n=6), которые не подвергались стрессорным воздействиям. На протяжении периода наблюдений потомство находилось с матерью, имея неограниченный доступ к воде и пище.

Контрольные (К) и после пренатального стресса (ПНС) крысята 14-ти (К14, ПНС14) и 30-дневного (К30, ПНС30) возраста были исследованы: 1) с помощью морфологических и биохимических методов; 2) с помощью поведенческих тестов.

Для морфологических и биохимических исследований крысят после наркоза хлорал гидратом (400 мг/кг) декапитировали, ткань гипоталамуса (от -0,3 до -3,6 от bregma) [34] делили на две половины: одну погружали в 4% раствор параформальдегида (рН 7.4) для иммуногистохимических исследований, вторую замораживали в сухом льду для анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

**Тест «открытое поле».** Поведение крысят К14 (n=22) и ПНС14 (n=27), К30 (n=22) и ПНС30 (n=22) изучали с помощью теста «открытое поле» [4]. У 14-дневных крысят оценивали количество пересеченных квадратов, вертикальную активность, количество грумингов, а также количество болюсов и уринаций; у 30-дневных анализировали количество пересеченных квадратов на периферии и в центре открытого поля; вертикальную активность, которая складывалась из свободных стоек, приподниманий

головы и передних лап, а также пристеночных стоек; количество заглядываний в отверстия, т.н. «норки»; количество грумингов; вегетативные реакции (болюсы и уринации); время, проведенное в центре открытого поля.

### **ОБРАБОТКА МАТЕРИАЛА**

**Фиксация мозга** для морфологических исследований проводилась либо транскардиальной перфузией 0.1М фосфатным буфером (PB) и 4% раствором параформальдегида на 0.2М PB, либо погружением в раствор фиксатора на 6 дней. После криопротекции в 30%-м растворе сахарозы на PB с 0.9% NaCl (PBS) при +4° С мозг замораживали в изопентане (Sigma, США) при - 42° С и хранили при - 80° С.

**Приготовление проб для ВЭЖХ** проводили по протоколу, описанному ранее [28]. Замороженную ткань гипоталамуса или стриатума погружали в 4-х кратный объем водного раствора холодной перхлорной кислоты (0.1 М), гомогенизировали, центрифугирования 10 мин при +4° С (12000 g), надосадов замораживали и хранили при - 80 ° С до анализа.

**Приготовление проб для Вестерн-блоттинга.** Из замороженной ткани мозга вырезали необходимые для анализа области, гомогенизировали в десятикратном объеме лизирующего буфера (0.02М TRIS (hydroxymethylami-nomethane), 0.15М NaCl, 0.001М EDTA, 1% Triton X-100, pH 7.5), в который добавляли коктейль ингибиторов протеаз (Sigma, США) и ингибиторов фосфатаз (RocheDiagnostic, Канада) согласно инструкции производителя.

**Иммуногистохимические методы.** Исследования проведены на 20 мкм свободноплавающих или монтированных на стекла Superfrost/plus (Menzel, Германия) сериях чередующихся фронтальных срезов из перифорникальной области гипоталамуса, полученных с помощью криостата (Leica, Германия).

#### **Непрямое иммуномечение (ДАБ-метод)**

Реакцию проводили на срезах, монтированных на стекла, по общепринятой АВС-методике [12] с амплификацией сигнала благодаря использованию вторичных антител, конъюгированных с биотином. Предварительно была проведена демаскировка антигена кипячением 2-3 мин в растворе цитрата аммония (pH 6.0). Протокол реакции подробно ранее нами был описан [5]. В течение 48 часов при + 4 ° С были проведены инкубации с первичными антителами кролика против орексина-А (Sigma, США, 1:1000). Также были использованы вторичные биотинилированные антитела козы против кролика (VectorLabs., Великобритания, 1:300) и раствор комплекса стрептовидин-пероксидаза (Sigma, США) 1:700 на PBS. Для визуализации пероксидазы использовали 0.05% раствор диаминобензидина (Sigma, США) с 0.03 % перекисью водорода на PBS.

Реакцию останавливали в дистиллированной воде, проводили стандартную гистологическую обработку. Специфичность реакции проверяли с помощью негативного контроля (без первых антител). Позитивным контролем считали выявление белков в структурах, ранее описанных в литературе.

Изображения изучаемых структур были получены с помощью микроскопа Carl Zeiss (Германия) со встроенной видеокамерой Imager 4.1, программного обеспечения для захвата изображения AxioVision- 4.7.2. Снимки анализировали в программе Photo-M (Черниговский, [http://t\\_lambda.chat.ru](http://t_lambda.chat.ru)). Определяли оптическую плотность (ОП) иммунопозитивного вещества в нейронах в условных единицах (у.е.) и их площадь ( $\text{мкм}^2$ ).

#### Двойное флуоресцентное иммуномечение, конфокальная микроскопия

Протокол реакции подробно нами был ранее описан [5]. Свободноплавающие срезы или стекла с монтированными срезами после промывки в PBST и блокировки в 5% блокирующем растворе инкубировали в смеси первичных антител [12]: мыши к тирозингидроксилазе (Sigma, 1:1000) и кролика к орексину-А (Sigma, 1:1000); кролика к орексину-А и мыши к D1 рецепторам дофамина (Millipore, 1:100); мыши к D1 рецепторам дофамина и кролика к D2 рецепторам дофамина (Millipore, 1:200); смесь антител мыши к GAD65 (Abcam, 1:1000) и GAD67 (Millipore, 1:1000) и кролика к D1 рецепторам дофамина (Abcam, 1:200); мыши к GAD65 и GAD67 и кролика к D2 рецепторам дофамина; кролика к орексину-А и овцы к cFos (Abcam, 1:100). Инкубацию проводили при + 4° С 48 ч. После тщательной промывки в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре проводили инкубацию в смеси соответствующих вторичных антител, конъюгированных с флуоресцентными метками (Invitrogen, США, 1:1000): цыпленка против кролика с Alexa-488 и осла против мыши с Alexa-568, цыпленка против кролика с Alexa-488 и козы против овцы с Alexa-543. Свободноплавающие срезы натягивали на стекла и как и монтированные срезы заключали с помощью среды towiol под покровное стекло и хранили при + 4° С. В ряде случаев перед заключением на срезы дополнительно наносили ядерный краситель DAPI (Sigma, США, 1:2000). В качестве контроля использовали реакции без первых антител. Анализ срезов проводили с помощью конфокального микроскопа DMI6000 и лазерной установки SP5 II (Leica Microsystems, Германия) или мультифотонной установки. Последовательное сканирование проводили при иммерсионном объективе x63 и лазеров с длиной волны возбуждения 488, 568 нм, а также 355 нм для DAPI. Изображения анализировали с помощью пакета программ Leica LAS AF, подготовку к демонстрации проводили с помощью программы Photoshop CS3.



## Вестерн-блоттинг

Белки в пробах разделяли с помощью электрофореза в 10% бис-АА акриламидном геле по Лэммли (SDS-PAGE) на оборудовании Bio-Rad Laboratories (США). Гель с белковыми фракциями переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham, Великобритания) в течение 1 ч. Из мембраны вырезали полоски, соответствующие молекулярному весу (Invitrogen, США) белка интереса. После блокировки 30 мин. в 4% блокирующем растворе (сухое молоко, разведенное на TRIS - buffer saline с 0.1 % Tween-20 – TBST, pH 7.6) мембраны инкубировали в течение ночи при + 4 ° С в растворе первичных антител: мыши против ТГ (1:3000, M=60 кД), мыши против GAD65 (1:2000, M=65 кД), кролика против фосфорилированной по серину-40 ТГ (фТГ40, Invitrogen, США, 1:4000, M=60). Антитела мыши против GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) были использованы для выявления контрольного белка в пробах (Abcam, Великобритания, 1:20000, M=37 кД). После тщательной промывки мембраны инкубировали 1 час во вторичных антителах, конъюгированных с пероксидазой, разведенных на 4% блокирующем растворе: козы против мыши (Sigma, США, 1:10000) или козы против кролика (Sigma, США, 1: 5000). Визуализацию сигнала проводили с помощью хемилюминисцентной системы ECL-Prime и рентгеновской пленки (Amersham, Великобритания), которую проявляли стандартным фотонабором (Реактив-фото, Россия). Пленки сканировали с помощью фотосканера Cannon и анализировали с помощью программы Image J. Определяли произведение (ОП) и площади каждого сигнала, которые делили на соответствующее значение GAPDH.

**Определение катехоламинов и их метаболитов в ткани.** Концентрации дофамина и его метаболита диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) определяли методом обращеннофазной ВЭЖХ с электрохимической детекцией на хроматографе Beckman Coulter (США) [27, 28]. Конечная концентрация была выражена в нг/мкл.

**Статистический анализ результатов** проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA (уровень значимости  $p \leq 0.05$ ) и с помощью *t*-критерия Стьюдента ( $p < 0.05$ ). Результаты представлены как медиана 50% данных с интерквартильными размахами или как среднее  $\pm$  стандартная ошибка в условных единицах (у.е.) и в процентах относительно контроля.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Исследование механизмов влияния дофамина на орексинергические нейроны перифорникальной области гипоталамуса

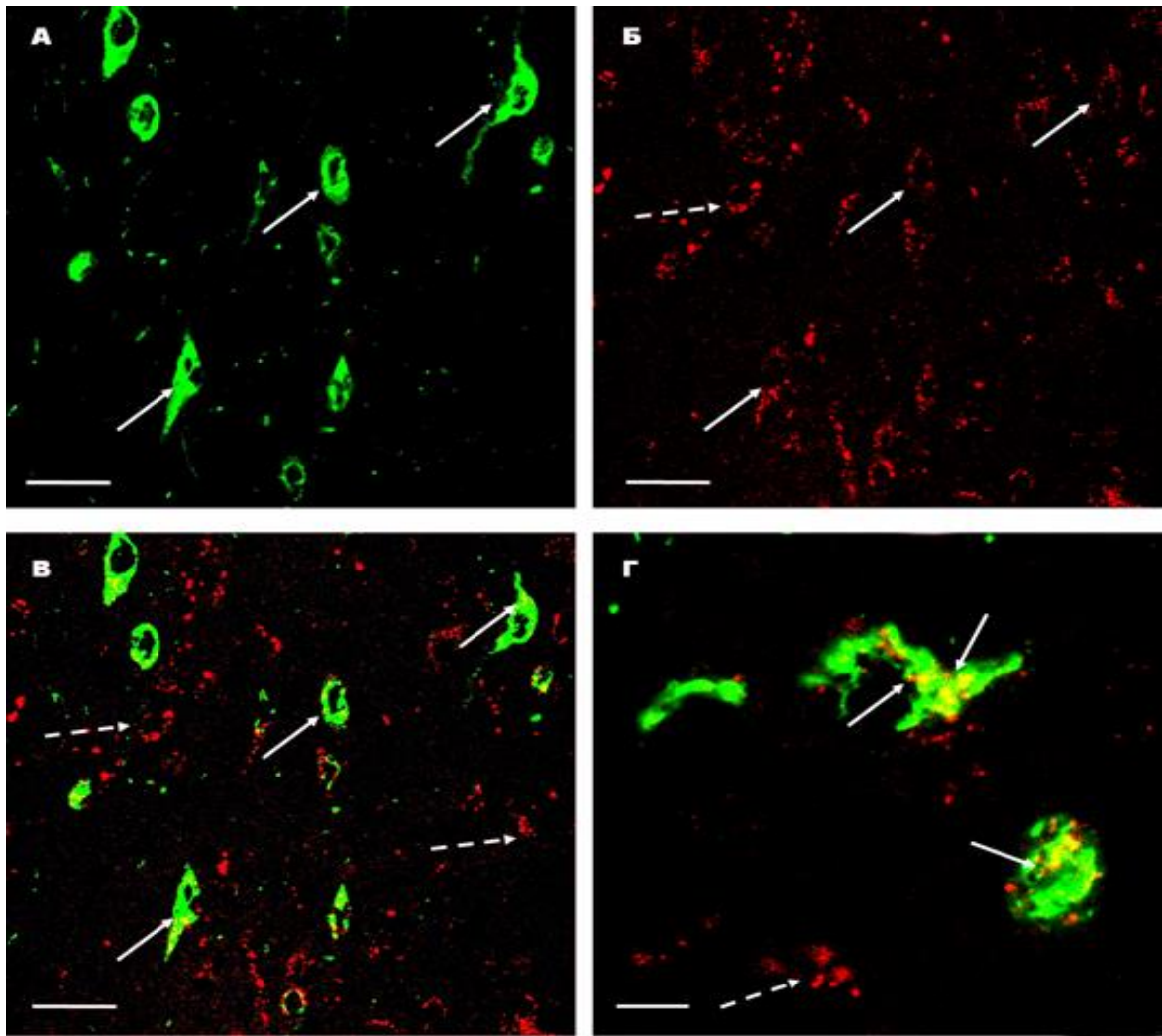
Тирозингидроксилаза (ТГ) – первый фермент биосинтеза катехоламинов широко используется как маркер катехоламинергических нейронов. Анализ двойного иммуномечения свидетельствует о присутствии в перифорникальной области гипоталамуса большого числа ТГ-иммунопозитивных отростков, которые, в частности, расположены вокруг тел орексинергических нейронов.

Ранее в перифорникальной области гипоталамуса были выявлены ТГ-иммунопозитивные отростки, которые могут принадлежать как дофаминергическим, так и норадренергическим или адренергическим нейронам. Значение этих отростков связывали с возбуждением  $\alpha 2$ -адренорецепторов и, соответственно, с возможностью влияния прежде всего норадреналина, но не с дофамином [49].

Известно, что ТГ-иммунопозитивные отростки nigro-стриатного тракта принадлежат дофаминергическим нейронам, которые расположены в черной субстанции и вентральной тегментарной области. ТГ-иммунопозитивные нейроны неопределенной зоны и аркуатного ядра гипоталамуса также являются дофаминергическими нейронами [11]. Присутствие здесь орексинергических структур, по-видимому, свидетельствует о тесных структурно-функциональных взаимоотношениях орексинергических и дофаминергических нейронов мозга.

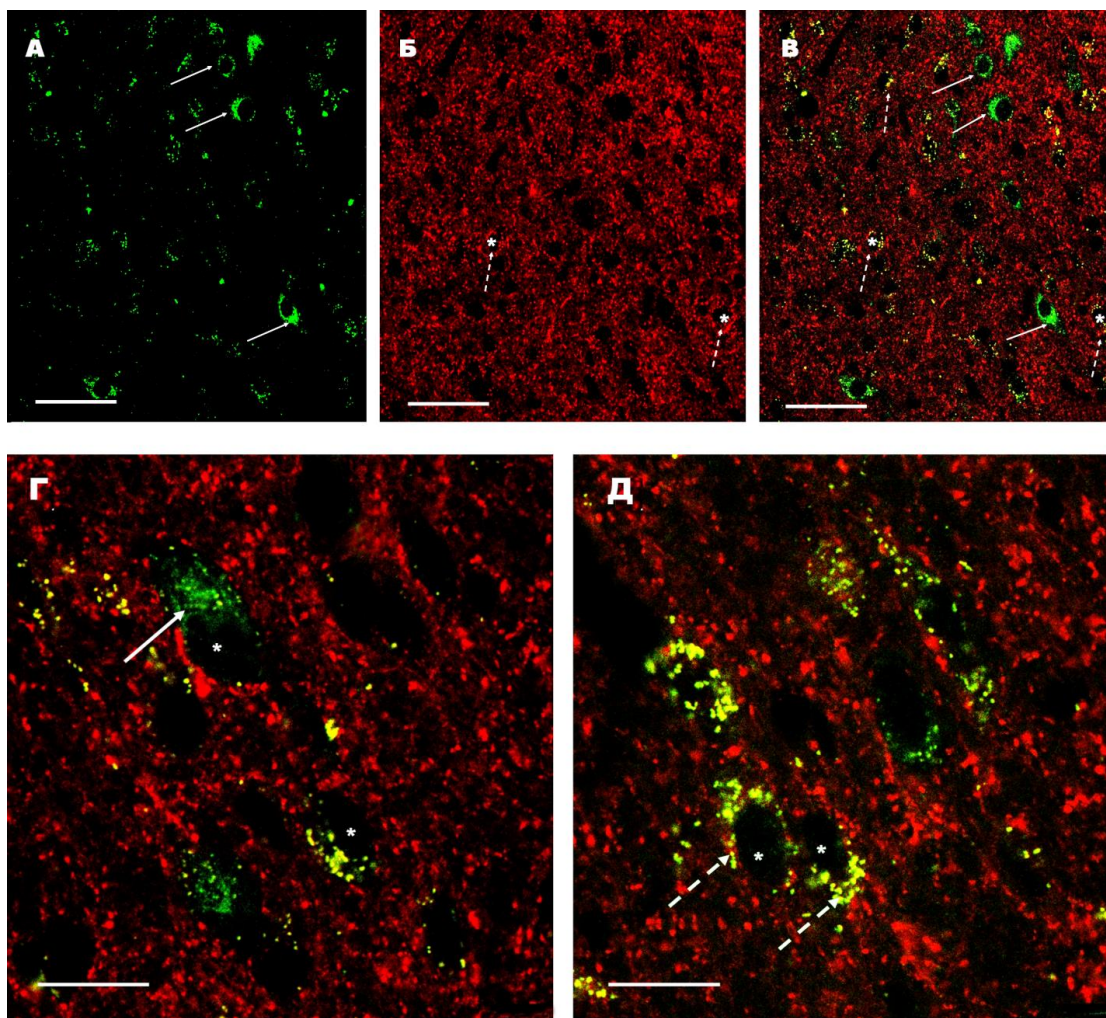
В перифорникальной области гипоталамуса широко представлены структуры, иммунопозитивные к D1 рецепторам дофамина, которые выявляются как непосредственно в телах орексинергических нейронов, так и в телах нейронов другой эргичности (рис. 2. Б, В, Г), в частности иммунопозитивных к ферменту биосинтеза ГАМК - GAD, который является общепризнанным маркером ГАМК-нейронов.

Анализ иммуногистохимической реакции в области наибольшей локализации орексинергических нейронов, проведенный на последовательных срезах мозга, свидетельствует об присутствии здесь большого числа тел нейронов, которые дают положительную реакцию к D2 рецепторам дофамина. По форме, размеру и количеству тел нейронов эти D2 –иммунопозитивные нейроны похожи на орексинергические (рис. 3 А, В, Г), однако отсутствие адекватных комбинаций антител (мы располагали только кроличьими первичными антителами к орексину и к D2 не позволяет выявить их непосредственно в орексинергических нейронах. Только небольшое число D2-иммунопозитивных нейронов дают положительную реакцию и к GAD (рис. 3 В, Г, Д).



**Рис. 2.** Перифорникальная область гипоталамуса крысы. Двойная иммуногистохимическая реакция к орексину-А (зеленое свечение) и D1 рецепторам дофамина (красное свечение). *Обозначения:* сплошные стрелки указывают на тела орексин-А-иммунопозитивных нейронов (А), в которых выявляются D1 рецепторы дофамина (Б) и места их колокализации (В, Г), прерывистые стрелки – D1 рецепторы дофамина на нейронах, негативных к орексину-А. Масштаб: А, Б, В - 25 мкм, Г – 7,5 мкм.

Полученные данные свидетельствует о том, что большинство D2-иммунопозитивных нейронов может являться орексинергическими, причем соотношение D1R/D2R сдвинуто в сторону последних. Анализ двойного иммуномечения в области наибольшей локализации орексинергических нейронов свидетельствует о высокой степени колокализации D1 и D2 (рис. 4), что подтверждает наше предположение о присутствии обоих типов рецепторов в одном нейроне, в частности орексинергических. Эти результаты противоречат полученным ранее данным об отсутствии в перифорникальной области D1 и низком уровне D2, что, возможно, объясняется тем, что был использован менее чувствительный способ [19].

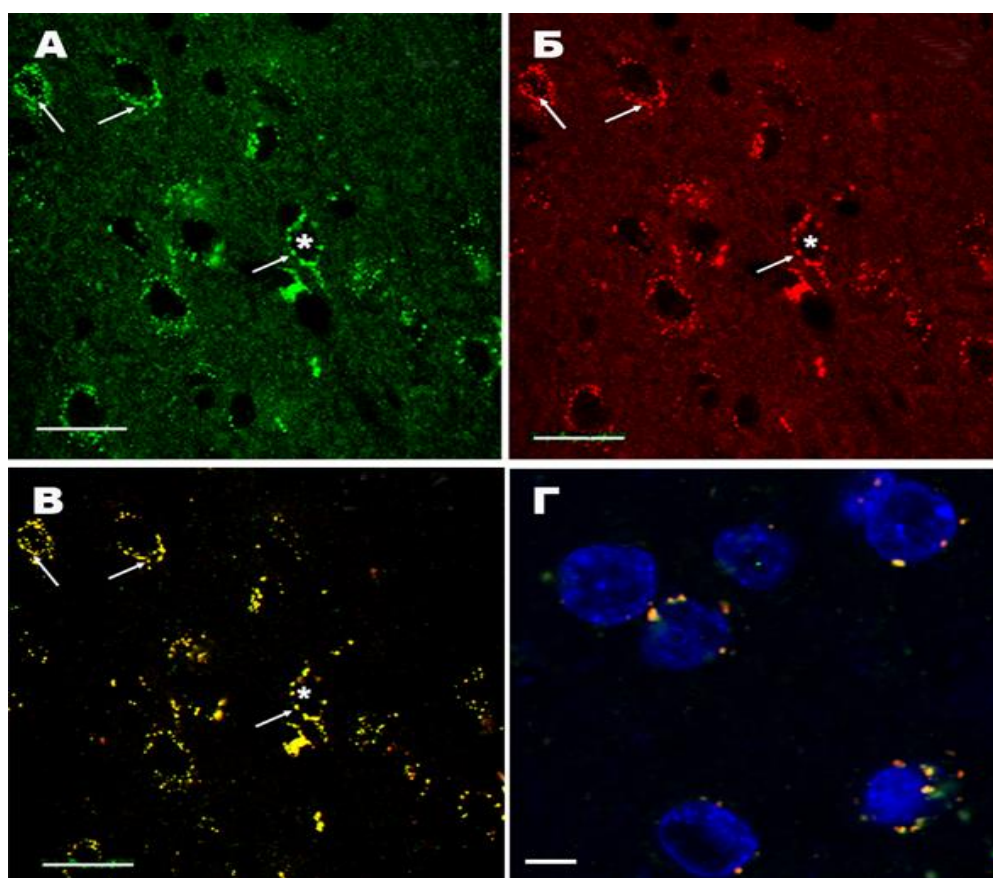


**Рис. 3.** Перифорникальная область гипоталамуса крысы. Двойная иммуногистохимическая реакция к D2 рецепторам дофамина (Alexa-488) и глутаматдекарбоксилазе 65 и 67 (Alexa-568) – маркерам ГАМК-нейронов. *Обозначения:* сплошные стрелки указывают на тела D2 рецептор-иммунопозитивных нейронов (А, В, Г), которые не колокализуются с глутаматдекарбоксилазой, прерывистые стрелки - тела ГАМК-нейронов, в которых выявляются D2 рецепторы дофамина (Б, В, Д). Звездочкой обозначено место ядра ГАМК-нейронов. Масштаб: 50 мкм (А, Б, В), 20 мкм (Г, Д).

Анализ двойного иммуномечения у контрольных крыс свидетельствует о присутствии сFos белка как в орексинергических нейронах, так и в нейронах другой эргичности (рис. 5 А, Б, В). Количественный анализ показал, что интенсивность свечения сFos в орексинергических нейронах составляет  $2.12 \pm 0.25$  у. е. и не отличается от таковой в нейронах другой эргичности ( $2.15 \pm 0.35$  у. е.). После введения антагониста D1 выявлено увеличение интенсивности свечения сFos белка на 240% в орексинергических нейронах ( $5.18 \pm 0.45$  у. е.,  $p < 0.05$ ), на 248% в нейронах другой эргичности ( $5.34 \pm 0.55$  у. е.,  $p < 0.05$ ; рис. 5 Г, Д, Е). В литературе есть данные том, что через 30 мин после введения SCH 23390 (антагониста D1 рецепторов) в дозе 0.75 мг/кг в орексинергических нейронах не наблюдалось изменения уровня сFos белка [17]. Это, по-видимому, связано с тем, что



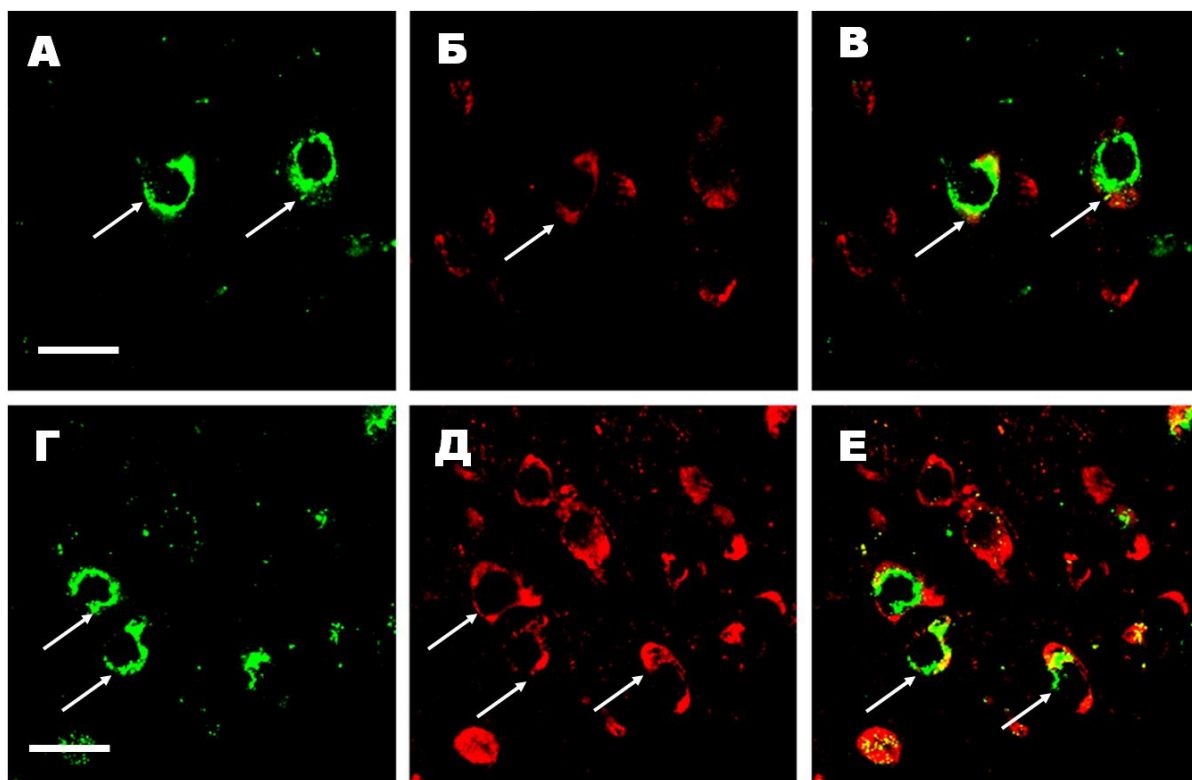
SCH 23390 обладает более широким спектром действия и 30 мин было недостаточно, для изменения уровня cFos.



**Рис. 4.** Перифорникальная область гипоталамуса крысы. Двойная иммуногистохимическая реакция к D2 (Alexa-488, А) и D1 рецепторам дофамина (Alexa-568, Б), и их совмещение (В, Г). *Обозначения:* сплошные стрелки указывают на тела нейронов, иммунопозитивных к D2 рецепторам (А), D1 рецепторам (Б), их колокализацию (В, Г). Звездочками обозначено место локализации ядра, которое окрашено синим цветом (DAPI, Г). Масштаб: 20 мкм (А, Б, В), 5 мкм (Г).

Полученные нами результаты демонстрируют экспрессию D1 в орексинергических нейронах, что является первым доказательством возможности прямого влияния дофамина на эти нейроны через D1-сопряженные сигнальные пути, которые, как известно, связаны с активацией цАМФ [15].

Общепризнано, что ГАМК является главным тормозным нейротрансмиттером мозга. Биосинтез ГАМК зависит от работы двух ферментов GAD 65 и 67, которые кодируются различными генами [24]. Первый фермент преимущественно локализован в телах нейронов, второй – в отростках. Поэтому в работе мы использовали смесь антител к обоим ферментам, чтобы маркировать тело и отростки ГАМК-нейронов. Локализация ГАМК-нейронов в перифорникальной области и наблюдаемое нами, большое число их отростков вокруг тел орексинергических нейронов, также свидетель-



**Рис. 5.** Перифорникальная область гипоталамуса крысы. Двойная иммуногистохимическая реакция к орексину-А (А, Г; Alexa-488), cFos (Б, Д; Alexa-543) и их совмещение (В, Е) в нейронах в контроле (А, Б, В) и через 1 час после интраперитонеального введения селективного антагониста D1 рецепторов дофамина (SCH 39166). *Обозначения:* стрелки указывают на тела орексин-А-иммунопозитивных нейронов, которые также являются cFos-иммунопозитивными. Масштаб: 20 мкм.

существует о тесных структурных и функциональных взаимодействиях, которые, по-видимому, проявляются в тормозном эффекте ГАМК на орексинергические нейроны. Экспрессия же D1 в ГАМК-нейронах в исследованной области свидетельствует о существовании и опосредованного влияния дофамина на орексинергические нейроны через модулирование их взаимодействий с ГАМК-нейронами. Также экспрессия D1 в ГАМК-нейронах показана и в других областях мозга (ретикулярная часть черной субстанции, стриатум и др.). В данном случае можно предположить, что активация через D1-зависимые сигнальные пути орексинергических нейронов и одновременная активация синтеза ГАМК, в результате чего будет усиливаться тормозный эффект, необходимый для поддержания определенной функциональной стабильности.

Ген, кодирующий cFos-белок, относится к генам раннего реагирования. Его активация в нейронах связана с адекватной реакцией нейронов на предлагаемое воздействие. Мы предполагаем, что в нашем эксперименте после введения селективного антагониста D1 блокада последних должна вызвать реакцию в нейронах, функционирование которых зависит от D1-связанных сигнальных каскадов. Ранее было

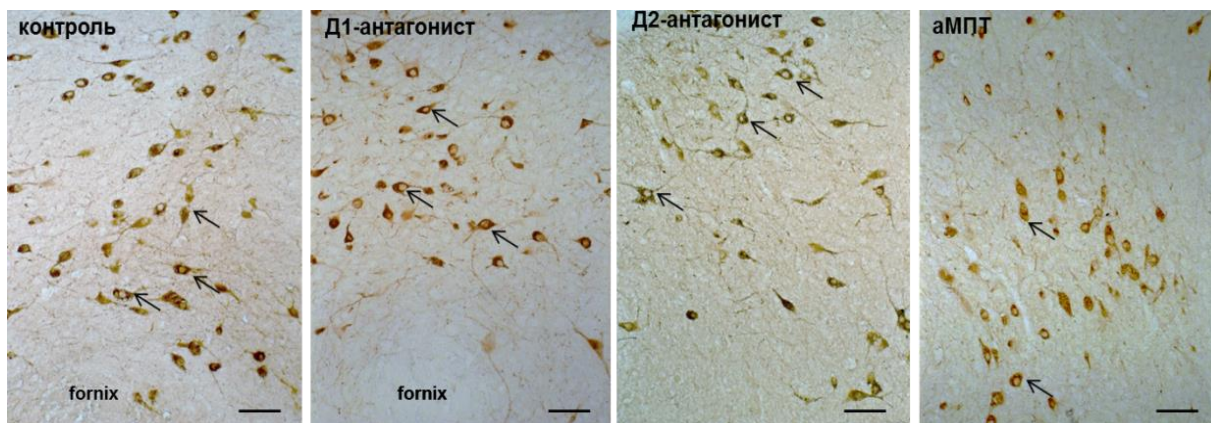
показана эффективность использованной дозы SCH 39166 [44]. Поэтому увеличение уровня cFos-белка в орксинергических нейронах свидетельствует о функциональном значении для них D1-связанных сигнальных путей.

Рецепторы дофамина D2, как известно, являются тормозными и опосредуют инактивацию цАМФ [15]. В дофаминергических нейронах D2R выполняют функцию ауторецепторов и регулируют выведение дофамина из терминалей. Полученные нами данные с одной стороны только косвенно свидетельствуют о присутствии D2R в орксинергических нейронах, а с другой стороны, их значительная колокализация с D1, которые выявлены в орксинергических нейронах, свидетельствует об образовании гетеродимерных комплексов и присутствии обоих типов рецепторов в орксинергических нейронах. Аналогичная картина наблюдалась нами для нейронов, образующих проопиомеланокартин и нейропептид Y [8, 9] в аркуатных ядрах гипоталамуса крысы.

Таким образом, полученные нами данные являются морфологическим подтверждением возможности прямого влияния дофамина на орксинергические нейроны гипоталамуса через D1- и D2-зависимые сигнальные пути, так и опосредованного, через ГАМК-нейроны, расположенные в перифорникальной области.

#### **Влияние селективных антагонистов D1- и D2-рецепторов дофамина и αМППТ на уровень оксина-А в нейронах гипоталамуса**

Результаты наших экспериментов (рис. 6) демонстрируют снижение в нейронах ОП оксина-А как после введения антагониста D1R ( $0.97 \pm 0.02$  и  $0.91 \pm 0.02$ ,  $p=0.05$ ), так и после введения αМППТ на 29% ( $p<0.05$ ), по сравнению с контрольными животными ( $0.97 \pm 0.02$  и  $0.53 \pm 0.01$ ). Эти результаты подтверждают возможность активирующего влияния дофамина на орксинергические нейроны. αМППТ – блокатор активности ТГ, который, как было показано ранее, приводит к значительному уменьшению уровня дофамина в мозге [47], что, как мы предполагаем, и привело к уменьшению уровня оксина. Наши данные демонстрируют также уменьшение уровня оксина-А и после введения антагониста D2R ( $0.97 \pm 0.02$  и  $0.79 \pm 0.03$ ,  $p<0.05$ ) на 28%, по сравнению с контролем. Поскольку данные двойного иммуномечения демонстрируют наличие ГАМК-нейронов в перифорникальной области гипоталамуса, а также экспрессию D2 этими нейронами, то мы можем предположить, что снижение ОП оксина-А в результате блокады D2, может быть связано с увеличением действия дофамина на ГАМК-нейроны и с усилением тормозного действия ГАМК на орксинергические нейроны.



**Рис. 6.** Перифорникальная область гипоталамуса крысы после введения антагонистов D1-, D2-рецепторов дофамина и  $\alpha$ -МПП. Иммуногистохимическая реакция к орексину-А. *Обозначения:* стрелки указывают на тела орексинергических нейронов. Масштаб: 50мкм.

Кроме того, соотношение D1R/D2R на орексинергических и ГАМК-нейронах тоже свидетельствует в пользу значительного усиления тормозного действия ГАМК. Нами показано, что ГАМК-нейроны в меньшей степени экспрессируют D2R, чем D1, следовательно, блокада D2 приводит к еще большему преобладанию активирующего влияния дофамина на ГАМК-нейроны. Это еще больше усугубляется тем, что орексинергические нейроны в большем количестве экспрессируют D2, то есть возможность активирующего влияния дофамина на орексинергические нейроны итак значительно ниже. Таким образом, при блокаде D2 усиление тормозного действия ГАМК на орексинергические нейроны определяется и соотношением D1/D2 в этих нейронах.

### **Морфофункциональное состояние орексин- и дофаминергической систем у интактных крысят 14-ти и 30-дневного возраста**

Метод «малых площадок» разработан Мишелем Жуве для депривации быстроволнового сна [46] и сочетает комплекс стрессорных воздействий: депривация быстрого сна, ограничение подвижности, эмоциональный стресс, вызванный страхом падения в воду. У животных, подверженных такому воздействию в течении 6 ч на протяжении 8 дней, наблюдаются увеличение веса тимуса и надпочечников [3], что свидетельствует об их активации.

Данные наших исследований демонстрируют, что у крысят P14 уровень орексина в нейронах перифорникальной области на 60% выше, чем у P30 (0.60 и 0.37 у.е.,  $p < 0.05$ ), но площадь орексинергических нейронов у P30 на 30% больше (147.47 и 204.54 мкм<sup>2</sup>,  $p < 0.05$ ).



**Таблица 1.** Показатели функциональной активности дофаминергической системы и орексинергических нейронов в гипоталамусе у крысят 14- и 30-дневного возраста.

	<b>К14</b>	<b>К30</b>
	<b>Me</b>	<b>Me</b>
ОП орексина А, у.е.	<b>0.37</b> (0.33-0.46)	<b>0.60*</b> (0.55-0.62)
Площадь нейронов, мкм <sup>2</sup>	<b>147.47</b> (108.84-214.14)	<b>204.54*</b> (129.04-298.22)
ДА, нг/мкл	<b>0.46</b> (0.44 – 0.55)	<b>1.58*</b> (1.08 – 1.97)
ДОФУК, нг/мкл	<b>1.28</b> (1.15 – 1.33)	<b>0.77*</b> (0.74 – 0.95)
ДОФУК/ДА	<b>2.33</b> (1.82 - 2.88)	<b>0.49*</b> (0.39 – 0.90)

Обозначения: ДА – дофамин, ДОФУК – диоксифенилуксусная кислота, Me – медиана, в скобках указан интерквартильный размах;

\* – достоверность отличий между группами ( $p < 0.05$ ).

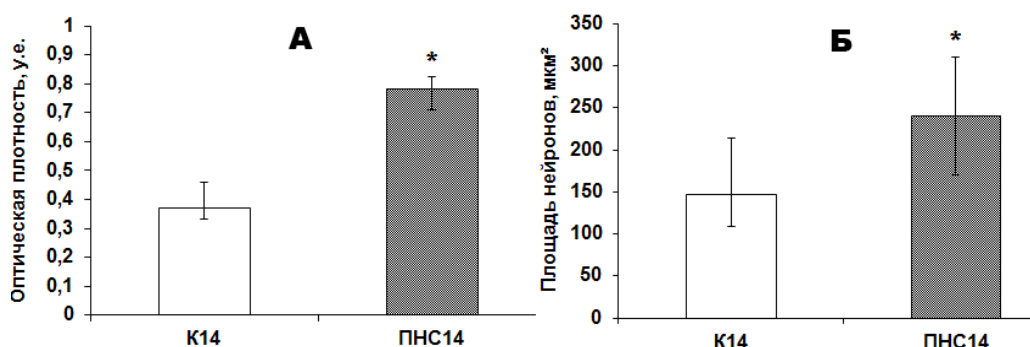
Эти результаты согласуются с данными других авторов, что резкое возрастание экспрессии орексинов отмечается после P15, а к P21 размер и функциональное состояние нейронов соответствует зрелым нейронам [13, 20, 33, 41, 45]. Увеличение активности орексинергической системы к P30 происходит на фоне увеличения в 3 раза уровня дофамина в гипоталамусе по сравнению с крысятами P14 (K14 – 0.46, K30 – 1.58 нг/мг,  $p < 0.05$ ), и на фоне повышения метаболизма дофамина, что выражается в снижении на 40% уровня ДОФУК (K14 – 1.28, K30 – 0.77 нг/мг,  $p < 0.05$ ) и на 80% показателя катаболического коэффициента - ДОФУК/ДА – отражающего скорость метаболизма дофамина (K14 – 2.33, K30 – 0.49,  $p < 0.05$ ).

Таким образом, в раннем постнатальном периоде выявлены однонаправленные изменение функциональной активности орексин- и дофаминергической систем, что проявляется в их резкой активации после P14.

### **Влияние пренатального стресса на формирование орексин- и дофаминергических систем у крысят первого месяца жизни**

Результаты иммуногистохимических исследований демонстрируют присутствие в перифорникальной области гипоталамуса тел орексин-А- иммунопозитивных нейронов и их отростков у крысят как группы K14, так и ПНС14. Однако, у крысят ПНС14 ОП орексина-А в телах нейронов была в 2 раза больше по сравнению с группой K14 (0.37 и 0.78,  $p < 0.05$ ; рис. 7А). При этом в группе ПНС14 в перифорникальной области выявляется большее количество длинных иммунопозитивных отростков. Площадь

орексинергических нейронов в группе ПНС14 на 45% больше, чем в группе К14 (147.47 и 240.15,  $p < 0.05$ ; рис.7 Б). Поскольку в норме у крыс увеличение экспрессии орексинов

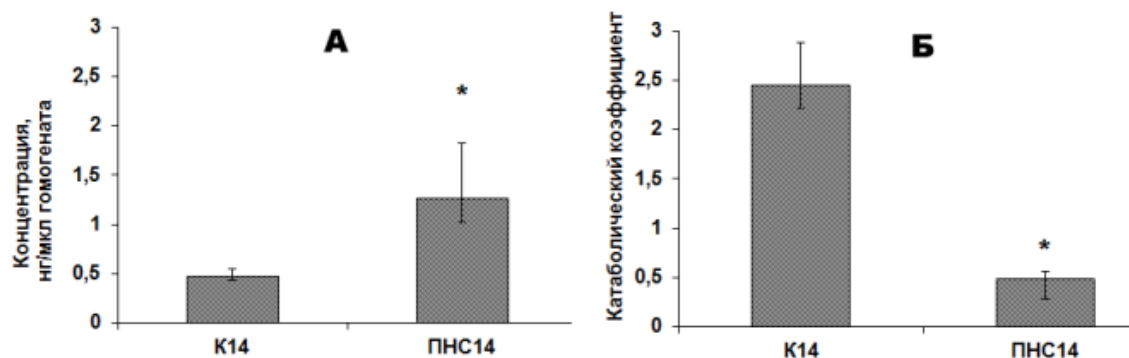


**Рис 7.** Уровень орексина-А в нейронах перифорникальной области гипоталамуса (А) и их площадь (Б) 14-дневных крысят контрольной (К14) и перенесших пренатальный стресс (ПНС14) групп. *Обозначения:* \* – достоверность отличий между группами ( $p < 0.05$ ), по оси ординат: А – оптическая плотность орексина А в условных единицах (у.е.), Б – площадь иммунопозитивных нейронов (в  $\mu\text{км}^2$ ).

происходит только после 15-го дня жизни [20, 45], можно предположить, что пренатальный стресс вызывает преждевременную активацию орексинергической системы у крысят. В связи с тем, что орексины оказывают активирующее влияние на дофаминергические и ГАМК-нейроны вентрально-теgmentарной области (VTA) [26], а так же играют роль морфогенетического фактора, участвуя в нейритогенезе кортикальных клеток [16, 23], повышение уровня орексинов может носить компенсаторный характер, направленный или на восстановление уровня дофамина в стриатуме, или на восстановление корковых структур, поврежденных пренатальным воздействием.

Кроме того, уровень дофамина в гипоталамусе крысят ПНС14 в 1.5 раза выше по сравнению с К14 (0.47 и 1.26,  $p < 0.05$ , рис. 8А). При этом катаболический коэффициент ДОФУК/ДА был снижен на 70% у крысят ПНС14 по сравнению с контролем (2.45 и 0.49,  $p < 0.05$ , рис. 8Б), что отражает повышение скорости его метаболизма. Эти результаты свидетельствуют о преждевременной активации и дофаминергической системы гипоталамуса, которая может быть связана с недостатком дофамина в нигростриатной системе мозга и носить компенсаторный характер, направленный на восстановление баланса дофамина в мозге. Данные этого эксперимента демонстрируют наличие взаимосвязи между орексин- и дофаминергической систем мозга в раннем постнатальном периоде, что проявляется в активации этих систем и согласуются с результатами, полученными нами ранее на взрослых крысах, свидетельствующие о том, что увеличение уровня дофамина влечет за собой увеличение уровня орексина и

наоборот. Таким образом, пренатальный стресс, приводит к однонаправленным изменениям орексин- и дофаминергической систем гипоталамуса в раннем постнатальном онтогенезе, которые мы можем назвать преждевременными, с учетом того, что повышение активности этих систем в норме происходит после 14 дня жизни. Это повышение функциональной активности может носить компенсаторный характер,



**Рис. 8.** Уровень дофамина (А) и катаболический коэффициент ДОФУК/ДА (Б) в гипоталамусе 14-дневных крысят в контроле (К14) и после пренатального стресса (ПНС14). *Обозначения:* \* – достоверность отличий между группами ( $p < 0.05$ ); ДА – дофамин, ДОФУК – диоксифенилуксусная кислота, по оси ординат – концентрация в нг/мкл..

направленный на восстановление систем, поврежденных воздействием пренатального стресса. У крысят 30-дневного возраста, перенесших пренатальное стрессорное воздействие, не наблюдается достоверных отличий как оптической плотности, так и площади орексин-А-иммунопозитивных нейронов перифорникальной области гипоталамуса по сравнению с животными К30. Уровень дофамина и его катаболический коэффициент у крысят ПНС30 также соответствуют уровню К30 (таблица 2).

**Таблица 2.** Показатели функциональной активности орексин- и моноаминергических систем мозга у 30-дневных крысят в контроле (К-30) и после пренатального стресса (ПНС-30).

Показатель	К30	ПНС30
	Me	Me
ОП орексина, у.е.	0.59 (0.55 – 0.62)	0.59 (0.50 – 0.68)
Площадь нейронов, мкм <sup>2</sup>	204.54 (129.04 – 298.22)	206.0 (173– 273.5)
ДА, нг/мкл	1.58 (1.08 – 1.97)	1.60 (1.34 – 1.91)
ДОФУК/ДА	0.49 (0.39 – 0.90)	0.24 (0.21 – 0.52)

*Обозначения:* ДА – дофамин, ДОФУК – диоксифенилуксусная кислота, Me – медиана, в скобках указан интерквартильный размах; \* – достоверность отличий между группами ( $p < 0.05$ ).

Таким образом, состояние орексин- и дофаминергических систем гипоталамуса у крысят, перенесших пренатальный стресс, восстанавливается к 30-му дню жизни.

### **Характер двигательной активности у крысят первого месяца жизни, перенесших пренатальное воздействие**

На 14-е сутки жизни крысята К14 и ПНС14 не различались по весу (таблица 3). Однако крысята ПНС14 демонстрировали достоверно меньший уровень вертикальной и горизонтальной двигательной активности в тесте «открытое поле» (таблица 3). Медианное значение количества пересеченных квадратов за 3 минуты опыта в группе ПНС14 составило 8.5, в то время как в контрольной группе 13. Характер двигательной активности у животных ПНС14 также заметно отличался от контрольных: движения передних и задних конечностей не были до конца скоординированными, животные часто совершали винтообразные движения, ползая на животе и используя при этом в основном передние конечности. У крысят К14 характер двигательной активности

**Таблица 3.** Показатели двигательной активности 14-дневных крысят в контроле (К14) и после пренатального стресса (ПНС14).

Показатель	<b>К14</b>	<b>ПНС14</b>
	<b>Me</b>	<b>Me</b>
Вес крысенка, г	19.5 (17.25 – 20)	18.5 (15 – 22)
Количество пересеченных квадратов	<b>13.0</b> (7 – 28)	<b>8.5*</b> (5.0 – 13.5)
Количество актов вертикальной активности	<b>2.0</b> (1 – 4)	<b>0*</b> (0 – 2)
Количество грумингов	1 (1 – 2)	1 (0 – 2)

Обозначения: Me – медиана, в скобках указан интерквартильный размах;

\* – достоверность отличий между группами ( $p < 0.05$ )

напоминал движения взрослых животных. У крысят К14 были зарегистрированы акты вертикальной активности, такие как приподнимания головы и передних лап, а также пристеночные стойки, в то время как у крысят группы ПНС14 вертикальная активность практически отсутствовала. При этом акты груминга присутствуют у животных обеих групп и достоверных отличий по их количеству не выявлено. С одной стороны, причиной задержки двигательного развития крысят, перенесших пренатальный стресс, могут быть возникающие на этом фоне морфологические нарушения в мозге, описанные многими авторами [6, 37, 45]. С другой стороны, нейромедиаторное обеспечение мозга также играет критически важную роль в развитии двигательной

активности. Известно, что nigro-стриатная дофаминовая система играет прямую роль в регуляции двигательного поведения, особенно движений конечностей [35, 36]. Снижение уровня дофамина в этой системе сопровождается развитием двигательных нарушений, в том числе болезни Паркинсона [25]. Ранее было показано, что у взрослых крыс, у которых системы организма уже сформированы, 6-часовая депривация сна приводит к значительному снижению тирозингидроксилазы - ключевого фермента биосинтеза катехоламинов – во всех дофаминергических формациях мозга. Однако через 2 ч в нейронах гипоталамуса и прилегающей к нему неопределенной зоны наблюдалось восстановление ее уровня, в то время как в нейронах среднего мозга и их проекциях в стриатуме степень увеличения уровня тирозингидроксилазы была ниже [6, 32]. Можно предположить, что в нашем эксперименте повышение уровня дофамина в гипоталамусе может быть компенсаторной реакцией на его недостаток в nigroстриатной системе, что и привело к снижению двигательной активности. С другой стороны, увеличение уровня дофамина в гипоталамусе могло быть причиной активации орксинергических нейронов, что также может быть реакцией, направленной на активацию функциональной активности nigroстриатной системы. Снижение двигательной активности может быть связано с повреждением корковых структур в следствии пренатального стресса, а увеличение уровня орексина (как морфогенетического фактора) может быть направлено на восстановление клеток коры и установление связей между ними [16, 23].

Анализ поведения, что на 30 сутки постнатального развития демонстрирует, что у крысят опытной и контрольной групп отсутствуют различия в уровне как вертикальной, так и горизонтальной двигательной активности. Однако крысята, перенесшие пренатальный стресс, в целом демонстрировали более тревожное поведение: за 5 минут опыта у них отмечено снижение времени пребывания в центре открытого поля до 1.5 секунд по сравнению с 4 секундами у контрольных крысят ( $p < 0.05$ ). У животных экспериментальной группы также достоверно увеличивалось количество грумингов. Исследовательская активность у опытных животных заметно отличалась от контрольных: медианное значение количества заглядываний в норки у крысят, перенесших пренатальный стресс, за 5 минут опыта было 0.5 по сравнению с 5 у контрольных ( $p < 0.05$ ). Таким образом, что крысы, матери которых с 13 по 19 день гестации находились на «малых площадках», меньше времени проводят в центре открытого поля и у них наблюдается большее количество грумингов. Следовательно, мы также можем сделать вывод о повышении уровня тревожности у животных опытной группы. Кроме того, в проведенном исследовании продемонстрировано, что в

тесте «открытое поле» крысята, подвергшиеся пренатальному стрессу, достоверно меньше обследовали норки, чем контрольные животные. С одной стороны, «норки» являются индикатором исследовательской активности. С другой стороны, учитывая, что количество стоек у животных экспериментальной группы не изменилось, можно предположить, что снижение количества заглядываний в отверстия вызвано более высоким уровнем тревожности у пренатально стрессированных крыс. Таким образом, анализ поведения животных в тесте открытое поле показал, к 30 дню жизни крысята, перенесшие пренатальный стресс, по уровню двигательной активности уже не отличаются от интактных животных, однако они демонстрируют более тревожное поведение.

### Анализ тирозингидроксилазы и глутаматдекарбоксилазы в стриатуме после пренатального стресса

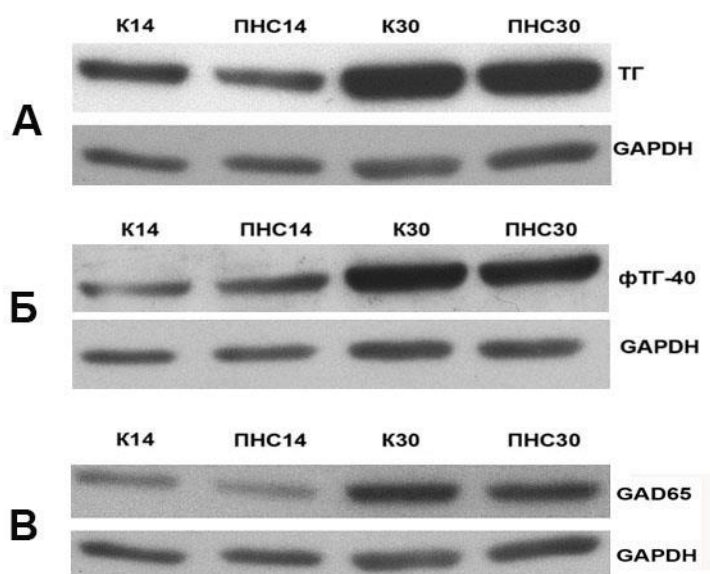


Рис. 9. Вестерн блоттинг: А - тирозингидроксилазы (ТГ), Б - ее фосфорилированной по серину-40 формы (фТГ-40) и В - GAD65 в эксперименте у 14-ти и 30-дневных крысят.

Результаты Вестерн блоттинга демонстрируют, что в стриатуме у крысят ПНС14 по сравнению с К14 оптическая плотность ТГ до 30% ниже ( $p < 0.05$ , рис. 9 А), но уровень фТГ-40, напротив, на 63% выше ( $p < 0.05$ , рис. 9 Б), что свидетельствует о более активном переходе ТГ в фосфорилированную форму. Возможно, что эти данные являются нейрохимическим проявлением компенсаторной реакции, которая развивается на фоне снижения двигательной активности (и, возможно, недостатка

дофамина) у крысят ПНС14. В то же время, у крысят ПНС14 выявлено уменьшение ОП GAD65 на 68% ( $p < 0.05$ , рис. 9 В) по сравнению с К14. С одной стороны, наши данные согласуются с данными литературы о том, пренатальный стресс, перенесенный в период, когда развиваются ГАМК-нейроны (E13), вызывает задержку их развития в первый месяц жизни, что проявляется в повышении тревожности у крыс [43, 30]. С другой стороны, снижение двигательной активности на фоне недостатка ГАМК может быть связано и с нарушением баланса D1/D2, а также и рецепторов ГАМК. Известно, что в мезолимбической системе пренатально-стрессированных крысят при недостатке ГАМК снижение уровня дофамина может происходить благодаря повышению экспрессии D2 [38]. Кроме того, в стриатуме ГАМК может быть колокализован с дофамином в одних терминалях [42]. Такое усиление самоторможения дофаминергических нейронов носит компенсаторный характер.

У крысят ПНС30 в стриатуме не выявлено достоверных отличий ТГ, фТГ-40 и GAD65 по сравнению с К30, что свидетельствует о компенсации тех нарушений, которые были выявлены у крысят ПНС14.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Орексины и дофамин вовлечены в регуляцию многих функций и, соответственно, форм поведения (двигательная активность, цикл бодрствование-сон, стрессорный ответ, пищевое поведение, и др.). Изменение баланса дофамина в мозге является причиной возникновения различных заболеваний, в частности нейродегенеративных (нарколепсия, болезнь Паркинсона, эпилепсия и др.), и приводит к изменению интегративных взаимодействий между различными нейротрансмиссивными системами мозга, что, соответственно, отражается и на изменении поведения. Представленные в настоящей работе результаты демонстрируют морфофункциональную взаимосвязь орексинергических нейронов гипоталамуса с дофаминергическими нейронами мозга. Показано, что морфологической основой прямого влияния дофамина на орексинергические нейроны мозга является экспрессия в них D1- и D2-рецепторов дофамина. Экспрессии этих рецепторов и в ГАМКергических нейронах расширяет представления о функциональных возможностях дофамина и свидетельствует о его роли и как модулятора взаимодействий ГАМК-орексин, что, возможно, направлено на стабилизацию функционального состояния этих нейронов. Взаимосвязь между балансом катехоламинов и орексинов в мозге наблюдается уже на ранних сроках онтогенеза. Пренатальный стресс вызывает преждевременную активацию орексинергической системы, что, по-видимому, демонстрирует ее участие в

компенсаторных механизмах мозга, которые, на фоне снижения двигательной активности, направлены на поддержание баланса дофамина, необходимого для нормального развития организма. Нормализация поведенческих и нейрохимических показателей на 30-й день жизни у крыс, подвергнутых пренатальному стрессу, отмечается на фоне нормализации уровня дофамина и орексина.

### **ВЫВОДЫ:**

- 1) Экспрессия D1- и D2-рецепторов дофамина в орексинергических нейронах является морфологической основой для прямого влияния дофамина на эти нейроны через D1- и D2-опосредованные механизмы.
- 2) Уменьшение уровня орексина-А в нейронах гипоталамуса на фоне блокады D1, D2 рецепторов дофамина или блокады активности тирозингидроксилазы свидетельствует об участии дофамина в регуляции орексинергических нейронов.
- 3) Функциональные взаимодействия орексин- и дофаминергической систем проявляются в раннем постнатальном периоде, изменение их функционального состояния происходит однонаправленно и проявляется в заметной активации после P14.
- 4) Пренатальный стресс вызывает преждевременную активацию орексин- и дофаминергической систем гипоталамуса на P14, что может являться компенсаторной реакцией, направленной на нормализацию пострадавших функций организма.

### **СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ:**

#### Статьи:

1. 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. И физиол. – 2016. – Т.52, №3. – С. 214-220.
2. Морина И. Ю., Михрина А. Л. Участие катехоламинов в регуляции орексинергических нейронов мозга млекопитающих // Медицинский академический журнал. – 2017 (Спецвыпуск).
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. – 2018. - Т.104, №6. – С. 692-700.
4. 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 // Росс. Физиол. журн им. И.М. Сеченова. – 2018. - Т.104, №6. – С.724-730.

#### Публикации в других печатных изданиях

- 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. - 2017. – С.53-54.
- 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. - 2017. – С.156-157.

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. - 2017. – С.197-198.

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. - 2017. – С.96.

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. - 2017. – С.106.

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. - 2017. – С.73-74.

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. - 2017. – С.433-434.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Вьюшина А.В., Притворова А.В., Флеров М.А., Окислительная модификация белков в структурах мозга крыс линии Спрейг–Доули и некоторые показатели поведения после пренатального стресса // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. – 2012. – Т.98, №8. – С.962–969.
2. Кассиль В.Г., Отеллин В.А., Хожай Л.И., Косткин В.Б. Критические периоды развития головного мозга // Рос. Физиол. журн им.И.М.Сеченова. – 2000. – Т.86, №11. – С.1418–1425.
3. Ковальзон В. М., Цибульский В. Л. Депривация «быстрого» сна раздражением ретикулярной формации у крыс // Физиол. ж. СССР. – 1978. – Т.LXIV, №8. С.1082–1088.
4. Макаров В. Г., Макарова М. Н. Справочник Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. СПб.: Изд-во «ЛЕМА». 2013.
5. Морина И. Ю., Михрина А. Л., Романова И. В. Иммуногистохимическое исследование путей влияния дофамина на орексинергические нейроны перифорникальной области гипоталамуса крысы // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2018. – Т.104, №6. – С.692–700.
6. Оганесян Г.А., Аристакесян Е.А., Белова В.А., Артамохина И.В., Романова И.В. Дофаминергическая нигростриатная система в условиях депривации сна у крыс // Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. – 2007. – V. 93, №12. – P.1344—1354.
7. Отеллин В. А., Хожай Л. И., Ордян Н. Э. Пренатальные стрессорные воздействия и развивающийся головной мозг. Адаптивные механизмы, непосредственные и отсроченные эффекты. СПб. Изд-во «Десятка». – 2007.
8. Романова И.В., Михрина А.Л., Шпаков А.О. Иммуногистохимические доказательства локализации дофаминовых рецепторов на экспрессирующих нейропептид Y нейронах в аркуатных ядрах крыс // Ж. эвол. биохим. и физиол. – 2018. – Т.54, № 3. – С. 220–222.
9. Романова И.В., Михрина А.Л., Шпаков А.О. Локализация дофаминовых рецепторов 1–го и 2–го типов на телах ПОМК–экспрессирующих нейронов аркуатного ядра гипоталамуса мышей и крыс // Докл. АН. – 2017. – Т.472, № 5. – С.608–611.
10. Светлов П. Г. Теория критических периодов развития и ее значение для понимания принципов действия среды на онтогенез // В книге вопросы цитологии. М.–Л. Изд-во АН СССР. – 1966.
11. Угрюмов М.В. Механизмы нейроэндокринной регуляции // М.В. Угрюмов. – М.: Наука. – 1999.
12. Хернет Э.Р., Гаттер К.С. Иммуноцитохимия: световая микроскопия // В кн.: Молекулярная клиническая диагностика. Методы. М.: Мир. – 1999. – С.20–65.

13. Amiot C., Brischoux F., Colard C., La Roche A., Fellmann D. & Risold P. Y. Hypocretin/orexin-containing neurons are produced in one sharp peak in the developing ventral diencephalon // *European Journal of Neurosci.* – 2005 – Vol.22, №2. – P.531–534.
14. Bakos J., Zatkova M., Bacova Z. & Ostatnikova D. The Role of Hypothalamic Neuropeptides in Neurogenesis and Neuritogenesis // *Neural Plasticity.* – 2016. – P.1—10.
15. Beaulieu J.M., Gainetdinov R.R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors // *Pharmacol Rev.* – 2011. – Vol.63, №1. – P.182–217.
16. Bjornstrom K., Turina D., Strid T., Sundqvist T., Eintrei C. Orexin A inhibits propofol-induced neurite retraction by a phospholipase D/protein kinase C $\epsilon$ -dependent mechanism in neurons // *PLoS ONE.* – 2014. – Vol.9, №5. – P. 1—7.
17. Bubser M., Fadel J. R., Jackson L. L., Meador-Woodruff J. H., Jing D., Deutch A. Y. Dopaminergic regulation of orexin neurons // *European J. Neuroscience.* – 2005. – Vol. 21. – P.2993–3001.
18. Chemelli R., Willie J., Sinton C., Elmquist J., Scammell T., Lee C., Richardson J., Williams S., Xiong Y., Kisanuki .Y, Fitch T., Nakazato M., Hammer R., Saper C., Yanagisawa M. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation // *Cell.* – 1999. – Vol.98, №4. P.437—451.
19. Coggeshall R.E. A Study of diencephalic development in the albino rat// *J.Comp. Neurol.* – 1964. – Vol.122. – P.241–299.
20. De Lecea L., Kilduff T. S, Peyron C., Gao X.–B., Foye P. E., Danielson P. E., Fukuhara C., Battenberg E. L. F., Gautvik V. T., Bartlett F. S., Frankel W. N., Van Den Pol A. N., Bloom F. E., Gautvik K. M., Sutcliffe J. G. The hypocretins: Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – Vol.95, №1. – 322—327.
21. Giardino W. J., de Lecea L. Hypocretin (orexin) neuromodulation of stress and reward pathways // – 2014. – Vol.29. – P.103–1088.
22. Grafe L.A. , Bhatnagar S. Orexins and stress // *Front Neuroendocrinol.* 2018. [In Press]
23. Ito N., Yabe T., Gamo Y., Nagai T., Oikawa T., Yamada H., Hanawa T. I.c.v. administration of orexin-A induces an antidepressive-like effect through hippocampal cell proliferation // *Neuroscience.* – 2008.– Vol. 157, №4. – P.720—732.
24. Kaufman D.L., Houser C.R., Tobin A.J. Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions // *J. Neurochem.* – 1991. – Vol.56. – P.720–723.
25. Kordower J. H., Olanow C. W., Dodiya H. B. Chu Y, Beach T.MG., Adler C. H., Halliday G. M., Bartus R. T. Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease // *Brain.* – 2013. – Vol.136, №8. P.2419—31.
26. Korotkova T.M., Sergeeva O.A., Eriksson K.S., Haas H.L., Brown R.E. Excitation of ventral tegmental area dopaminergic and nondopaminergic neurons by orexins/hypocretins // *J Neurosci.* – 2003. – Vol. 23. – P.7–11.
27. Krasnova I. N., Bychkov E. R., Lioudyno V. I. Zubareva O. E., Dambinova S. A. Intracerebroventricular administration of substance P increases dopamine content in the brain of 6-hydrodopamine lesioned rats // *Neuroscience.* – 2000. – Vol. 95, №1. – P. 113–117.
28. Lambertsen K. L., Gramsbergen J. B., Sivasaravanaparan M., Ditzel N., Sevelsted-Møller L. M., n-Viguera A. O., Rabjerg M., Wulff H., Kohler R. Genetic KCa3.1-Deficiency Produces Locomotor Hyperactivity and Alterations in Cerebral Monoamine Levels // *PLOS ONE.* – 2012. – Vol.7, № 10. – P 1–15.
29. Lin L., Faraco J., Li R., Kadotani H., Rogers W., Lin X., Qiu X., de Jong P. J., Nishino S., Mignot E. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene // *Cell.* – 1999. – Vol.98, №3. P.365—376.
30. Lussier S. J., Stevens H. E. Delays in GABAergic interneuron development and behavioral inhibition after prenatal stress // *Dev Neurobiol.* – 2016. – Vol.76, №10. P.1078–1091.
31. Nakamura T., Uramura K., Nambu T., Yada T., Goto K., Yanagisawa M., Sakurai T. Orexin-induced hyperlocomotion and stereotypy are mediated by the dopaminergic system // *Brain Research.* – 2000. – Vol. 873, №1. P.181—187.
32. Oganesyanyan G.A., Romanova I.V., Aristakesyan E.A., Kuzik V.V., Makina D.M., Morina I.Y., Khramenkova A.E., Artamokhina I.V., Belova V.A. Diencephalo-Telencephalic Changes Of Tyrosine

- Hydroxylase In Rats And Grass Frogs After Sleep Deprivation // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. – 2008. – Vol.44., №3. P.294 —303.
33. Ogawa Y., Kanda T., Vogt K., Yanagisawa M. Anatomical and electrophysiological development of the hypothalamic orexin neurons from embryos to neonates // *J Comp Neurol*. – 2017. – Vol.525, №18. P.3809—3820.
  34. Paxinos, G.T., Watson, Ch. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. (Fourth Edition). – Academic Press, San Diego, California, USA, 1998. Int. Standard Book Number: 0–12–547617–5.– CD–ROM. <http://www.apnet.com>
  35. Plowman E. K., Maling N., Rivera B. J. Larson K., Thomas N. J. , Fowler S. C., Manfredsson F. P., Shrivastav R., Kleim J. A. Differential sensitivity of cranial and limb motor function to nigrostriatal dopamine depletion // *Behav Brain Res*. – 2013. – Vol.237. – P.157—263.
  36. Radl D., Chiacchiaretta M., Lewis R. G. Brami–Cherrier K., Arcuri L., Borrelli E. Differential regulation of striatal motor behavior and related cellular responses by dopamine D2L and D2S isoforms // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2018. – Vol.115, №1. P.198—203.
  37. Radley J. J., Rocher A. B., Rodriguez A., Ehlenberger D. B., Dammann M., Mcewen B. S., Morrison J. H., Wearne S. L., Hof P. R. Repeated stress alters dendritic spine morphology in the rat medial prefrontal cortex // *J. Comparative neurology*. – 2008. – Vol.1. – P. 1141—1150.
  38. Rodrigues A. J, Leão P., Pêgo J. M., Cardona D., Carvalho M. M., Oliveira M., Costa B. M., Carvalho A. F., Morgado P., Araújo D., Palha J. A., Almeida O. F., Sousa N. Mechanisms of initiation and reversal of drug–seeking behavior induced by prenatal exposure to glucocorticoids // *Mol Psychiatry*. – 2012. –Vol.17, №12. P.1295–1305.
  39. Sakurai T. Roles of orexin/hypocretin in regulation of sleep/wakefulness and energy homeostasis // *Sleep Med rev*. – 2005. – V.9, №4. – P.231–241.
  40. Sakurai T. Orexins and Orexin Receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G protein–coupled receptors that regulate feeding behavior // *Cell*. – 1998. – Vol.92, №4. – P.573—585.
  41. Steininger T. L., Kilduff T. S., Behan M., Benca, R. M., & Landry C. F. Comparison of hypocretin/orexin and melanin–concentrating hormone neurons and axonal projections in the embryonic and postnatal rat brain // *Journal of Chemical Neuroanatomy*. – 2004. – Vol. 27, №3. P.165—181.
  42. Stensrud M. J., Puchades M., Gundersen V. GABA is localized in dopaminergic synaptic vesicles in the rodent striatum // *Brain Struct Funct*. – 2014. – Vol. 219, №6. P.1901–12.
  43. Stevens H. E., Su T., Yanagawa Y., Vaccarino F. M. Prenatal stress delays inhibitory neuron progenitor migration in the developing neocortex // *Psychoneuroendocrinology*. – 2013. – Vol.38. – P.509–521.
  44. Terry P., Katz J. L. A comparison of the effects of the D1 receptor antagonists SCH 23390 and SCH 39166 on suppression of feeding behavior by the D1 agonist SKF38393 // *Psychopharmacology*. – 1994. – Vol. 113, № 3–4. – P. 328—333.
  45. Van den Hove D. L. A., Steinbusch H. W. M., Scheepens A., Van de Berg W. D., Kooiman L. A., Boosten B. J., Prickaerts J., Blanco C. E. Prenatal stress and neonatal rat brain development // *Neuroscience*. – 2006. – Vol.137, №1. P.145—155.
  46. Vogel G.W. A review of REM sleep deprivation // *Arch. Gen. Psychiatr*. – 1975. – Vol.32, №6. P.749—761.
  47. Watanabe S., Fusa K., Takada K., Aono Y., Saigusa T., Koshikawa N., Cools A. Effects of alpha–methyl–p–tyrosine on extracellular dopamine levels in the nucleus accumbens and the dorsal striatum of freely moving rats // *J.Oral Science*. – 2005. – Vol. 47, №4. – P. 185–190.
  48. Weinstock M. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring // *Prog Neurobiol*. – 2001. – Vol.65, №5. – P.427—51.
  49. Yamanaka A., Muraki Y., Ichiki K., Tsujino N., Kilduff T.S., Goto K., Sakurai T. Orexin neurons are directly and indirectly regulated by catecholamines in a complex manner // *J Neurophysiol*. – 2006. – Vol. 96. –P.284–298.
  50. Zarrow M. X., Philpott J. E., Denenberg V. H. Passage of 14C–4–corticosterone from the rat mother to the foetus and neonate // *Nature*. – 1970. – Vol.226, №5250. – P.1058—1069.