

ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОГО СТРЕССА НА ФОРМИРОВАНИЕ ОРЕКСИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ГИПОТАЛАМУСА КРЫСЫ

© 2019 г. И. Ю. Морина¹, Е. П. Станкова¹, И. В. Романова^{1, *}

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: irinaromanova@mail.ru

Поступила в редакцию 25.02.2019 г.

После доработки 13.03.2019 г.

Принята к публикации 13.03.2019 г.

Исследовано влияние пренатального стресса (ПНС) на формирование орексинергической и дофаминергической систем мозга у 14- и 30-дневных крысят, рожденных самками, которых с 13 по 19 день беременности подвергали депривации сна (по 6 ч в день) методом “малых площадок”. У 14-дневных ПНС крысят с помощью теста “открытое поле” выявлены нарушения двигательного развития. В гипоталамусе с помощью иммуногистохимического метода на срезах мозга выявлено значительное увеличение содержания орексина А в нейронах перифорникальной области, а высокоэффективная жидкостная хроматография продемонстрировала увеличение уровня дофамина и скорости его метаболизма по сравнению с контрольными крысятами, рожденными от интактных самок. Результаты Вестерн-блоттинга свидетельствовали об уменьшении в стриатуме уровня фермента синтеза ГАМК (GAD65) и увеличении уровня фосфорилированной по серину-40 формы тирозингидроксилазы – фермента синтеза дофамина по сравнению с контролем. К 30-му дню жизни показатели двигательной активности у ПНС крысят не отличались от контрольных, однако ПНС крысята характеризовались более высоким уровнем тревожности и меньшей исследовательской активностью. Результаты морфологических и биохимических исследований также свидетельствовали об отсутствии различий исследованных показателей в гипоталамусе и в стриатуме у 30-дневных ПНС крысят по сравнению с контрольными, что подтверждалось результатами электрофизиологического исследования, которое демонстрирует отсутствие различий в организации цикла бодрствование–сон у 30-дневных ПНС и контрольных крысят. В статье обсуждаются морфофункциональные взаимодействия орексинергической и дофаминергических систем мозга в раннем постнатальном периоде развития организма и роль орексинов в компенсаторных механизмах мозга.

Ключевые слова: мозг, гипоталамус, стриатум, онтогенез, пренатальный стресс, орексин, дофамин, двигательная активность, цикл бодрствование–сон

DOI: 10.1134/S0869813919050054

Исследования влияния пренатального стресса (ПНС) на индивидуальное развитие организма не теряют своей актуальности на протяжении многих лет. Это связано, с одной стороны, с увеличением количества неблагоприятных факторов, действующих на организм беременной женщины, а с другой стороны, с увеличением рождаемости детей с нарушениями психомоторной, эмоциональной и когнитивной сфер.

Известно, что стресс вызывает повышение уровня кортикостероидных гормонов, которые, проникая через плаценту, действуют на плод [1, 2] и активируют его гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальную систему. Центральное звено этой системы – гипоталамус – является структурой высоко чувствительной к ПНС [3]. Показано, что гипоталамус, кроме регуляции стрессорного ответа, играет решающую роль в формировании циркадных ритмов организма, которые также контролируются орексинами.

Орексины – семейство нейропептидов, образующихся нейронами перифорникальной области гипоталамуса из общего предкурсора препро-орексина, состоящего из 130 аминокислотных остатков [4–8]. К этому семейству относятся орексин А/гипокретин 1 – полипептид из 33-х аминокислотных остатков, связанных двумя парами дисульфидных мостиков и орексин В/гипокретин 2 – линейный пептид из 28 аминокислотных остатков. Свое действие орексины оказывают через два типа G-белок-связанных рецепторов [4, 5]. Орексины являются фундаментальным звеном регуляции бодрствования и пробуждения [6, 9–11]. Известно, что в постнатальном периоде (P) становление цикла бодрствование–сон (ЦБС) совпадает с периодом созревания орексинергической системы. Показано, что основные фазы сна формируются к P30 [12]. Орексинергические нейроны начинают активно функционировать после P15, а после P21 их функциональная активность соответствует зрелым нейронам [5, 13–16].

В настоящее время показано, что орексины также играют важную роль в формировании стрессорного ответа организма [17, 18], а в эмбриогенезе выполняют роль морфогенетических факторов и вовлечены, в частности, в нейрогенез гиппокампа и коры больших полушарий [19–21]. Эти данные дают основание полагать, что орексинергические нейроны гипоталамуса могут быть рассмотрены как потенциальная мишень для коррекции последствий ПНС на развивающийся организм. Однако не известно, какое влияние ПНС оказывает на развитие самих орексинергических нейронов и как это может повлиять на функционирование корковых и подкорковых структур у растущего организма.

Орексинергическая система мозга структурно и функционально связана с дофаминергической системой [22, 23]. Становление этих взаимодействий в эмбриогенезе может оказаться чрезвычайно важным для нормального формирования обеих нейрхимических систем мозга. Так как дофаминергическая система вовлечена в регуляцию двигательной активности организма [24, 25], то ее взаимосвязь с орексинергической системой опосредует участие орексинов в регуляции движений через активацию nigro-стриатной системы [26]. Поэтому мы полагаем, что нарушение формирования орексинергической системы в эмбриогенезе или нарушение ее взаимосвязи с дофаминергической системой может отразиться на развитии двигательной активности. Вопрос о взаимодействии орексин- и дофаминергической систем мозга в ходе пренатального периода развития организма до сих пор детально не изучен. Эта задача в настоящий момент может быть решена только в модельных экспериментах на лабораторных животных.

Последствия ПНС 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 [27, 28]. У крыс в ходе пренатального онтогенеза выделяют несколько критических периодов развития ЦНС: 13–14-й день (E13–14) – срок важный для развития подкорковых, ряда стволовых структур и гипоталамуса, E18–19 – для развития таламических ядер, E19–20 – для процессов дифференцировки клеток коры больших полушарий [28–30]. Эти периоды совпадают с основными этапами развития в эмбриогенезе орексинергических нейронов, которые выявляются в ги-

поталамусе с E13, а начиная с E19 их отростки идентифицируются за пределами гипоталамуса [13, 14, 31].

Целью настоящего исследования было оценить морфофункциональное состояние орексинергической системы у крысят после ПНС, перенесенного именно в критические периоды эмбрионального развития гипоталамуса (E13–E19). Задачи исследования состояли в том, чтобы охарактеризовать орексинергическую систему у крысят P14 – период, предшествующий в норме резкой активации орексинергической системы, а также P30 – период, когда в норме орексинергическая система достигает зрелого состояния. Также была поставлена задача оценить активность дофаминергической системы мозга и исследовать поведенческие корреляты функциональной активности обеих нейрхимических систем с учетом того, что к P30 заканчивается формирование цикла бодрствование–сон (ЦБС).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты были выполнены на крысах линии Вистар согласно дизайну исследования, одобренному Этическим комитетом ИЭФБ РАН, European Communities Council Directive 1986 (2010/63/ЕЕС) и согласно правилам, изложенным в “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”.

Самок крыс в виварии ИЭФБ РАН отбирали по внешним признакам (чистые шерстяной покров и видимые слизистые) и поведению (животные не имели отличительных особенностей в поведении), отсаживали в отдельные клетки и содержали в стандартных условиях вивария (12-часовой световой режим: 12 ч свет/12 ч ночь, световой день начинался в 9.00, температура $23 \pm 2^\circ\text{C}$) без ограничения доступа к воде и пище. На протяжении нескольких дней в одно и то же время брали мазки из влагалища для отслеживания фаз эстрального цикла [32, 33]. При наступлении фазы проэструса к каждой самке подсаживали самца до наступления беременности (1-м днем беременности считался день обнаружения сперматозоидов в мазке из влагалища).

Беременных самок ($n = 6$) с 13-го по 19-й день гестации подвергали стрессу с помощью широко известного метода “малых площадок”, разработанного Мишелем Жуве для депривации быстрого сна [34]. Ежедневно самку на 6 ч помещали на платформу диаметром 6.5 см, возвышающуюся на 0.5 см над бассейном с водой глубиной около 10 см. Во время эпизодов быстрого сна, когда мышцы животного расслаблялись, крыса падала с платформы в бассейн с водой и сразу возвращалась на платформу. Методика сочетает комплекс стрессорных воздействий: депривация быстрого сна, ограничение подвижности, эмоциональный стресс, вызванный страхом падения в воду. Эти воздействия приводят к “мягкому стрессу” [35], поэтому беременных самок высаживали на малые площадки ежедневно на протяжении периода, который соответствует формированию орексинергических нейронов гипоталамуса (E13–E19). После 20-го дня беременности самок содержали в стандартных условиях вивария, где происходило донашивание, роды и выхаживание их потомства. Контролем стали крысята, рожденные от самок ($n = 6$), которые не подвергались стрессорным воздействиям и весь период беременности находились в стандартных условиях вивария. На протяжении всего эксперимента потомство находилось с матерью, имея неограниченный доступ к воде и пище. В ходе первого месяца жизни крысят взвешивали на 2-й, 4-й, 7-й, 10-й, 14-й, 21-й и 30-й дни жизни. Контрольные (К) и перенесшие пренатальный стресс (ПНС) крысята 14-ти (К14, ПНС14) и 30-дневного (К30, ПНС30) возраста были исследованы: 1) с помощью поведенческих тестов; 2) с помощью морфологических и биохимических методов ($n = 6$ в каждой группе). У крысят на 30-е сутки также была проведена регистрация ЦБС.

Поведение крысят К14 ($n = 22$) и ПНС14 ($n = 27$), К30 ($n = 22$) и ПНС30 ($n = 22$) изучали с помощью теста “открытое поле” с 15:00 до 16:00 ч [36]. Использовали квад-

ратную установку “открытое поле” размером $40 \times 40 \text{ см}^2$, разделенную на 16 квадратов с отверстиями – “норками” – диаметром 1 см в центре каждого квадрата. Освещенность составляла 200 лк. У 14-дневных крысят регистрировали поведенческую активность в течение 3 мин во избежание переохлаждения, у 30-дневных – в течение 5 мин. Все опыты фиксировали на видео. Оценивали: 1) горизонтальную двигательную активность: количество пересеченных квадратов, время локомоторной активности, время движения на месте (в пределах 1 клетки открытого поля) и неподвижности; 2) вертикальную двигательную активность: количество вертикальных стоек и стоек с упором; 3) количество норковых реакций у 30-дневных животных; 4) показатели тревожности: продолжительность грумингов, количество болюсов и уринаций; у 30-дневных животных также анализировали количество квадратов, пересеченных в центре открытого поля и время, проведенное в центре открытого поля. У 14-дневных крысят последние два показателя, а также количество норковых реакций не оценивали, т.к. у животных на момент обследования были закрыты глаза.

Для того чтобы исключить суточные колебания медиаторов, забор материала проводили в определенные часы с 9:00 до 10:00. После наркоза хлоралгидратом (внутрибрюшинно 400 мг/кг) крысят декапитировали, извлекали мозг, во фронтальной плоскости вырезали область с гипоталамусом и делили ее вдоль на две половины: одну погружали в 4%-ный раствор параформальдегида, разведенного на 0.2 М фосфатном буфере (PB, pH 7.4), для иммуногистохимических исследований, вторую – быстро замораживали в сухом льду, и из ткани гипоталамуса приготавливали пробы для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) по описанному ранее протоколу [37].

Для иммуногистохимических исследований мозг фиксировали 4 суток (4°C), промывали в 0.02 М фосфатном буфере с 0.9%-ным раствором NaCl (PBS, pH 7.4) и после криопротекции в 30%-ном растворе сахарозы, растворенной в PBS, замораживали при -42°C с помощью изопентана. Чередующиеся серии фронтальных срезов (20 мкм) изготавливали с помощью криостата (Leika, Германия). Каждый десятый срез монтировали на стекла SuperFrost/plus (Menzel, Германия). Для иммуногистохимических исследований отбирали срезы, содержащие перифорникальную область [38], где, как известно, локализованы орексинергические нейроны. Стекла кипятили 5 мин в цитратном буфере (pH 6.0) для демаскировки антигена, промывали в PBS, в течение 30 мин обрабатывали 0.3%-ным раствором перекиси водорода, разведенной в PBS. После промывки в PBS, содержащим 0.1% Triton X-100 (PBST), срезы инкубировали 1 ч при комнатной температуре в блокирующем растворе (2% сыворотки быка и 2% сыворотки козы в PBST) для предотвращения неспецифического связывания. Затем срезы инкубировали 48 ч при 4°C с первичными антителами кролика к орексину А (Sigma, США) в разведении 1 : 1000. После тщательной промывки срезы инкубировали 1 ч при комнатной температуре со вторичными антителами козы против кролика, конъюгированными с биотином (“VectorLabs”, Великобритания), разведенные 1 : 300 в PBST. Стекла тщательно промывали и наносили комплекс стрептовидин-пероксидаза (Sigma, США) в разведении 1 : 1000 в PBS. Визуализацию проводили с помощью 0.05%-ного раствора диаминобензидина (Sigma, США) и 0.015%-ного раствора перекиси водорода. Реакцию останавливали дистиллированной водой и после тщательной промывки и стандартной гистологической обработки срезы заключали под покровное стекло и высушивали. Изображения получали с помощью микроскопа “Carl Zeiss” Axio A1 (Германия) со встроенной телевизионной камерой и программы Axio-Vision 4.8. С помощью программы Image J на каждом из снимков (7–10 для каждого животного) определяли в нейронах оптическую плотность (ОП) орексина А в условных единицах (у. е.).

Уровень дофамина (ДА) и его метаболита диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) определяли методом обращеннофазной ВЭЖХ с электрохимической детекцией на хроматографе Beckman Coulter (США) [39]. Хроматографическая система включала инжектор Rheodyne 7125 с петлей на 20 мкл для нанесения образцов, колонку Phenomenex (250.0 × 4.6 мм) с сорбентом Sphere Clone 5u 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-фосфатного буфера с 0.7 мМ октансульфоновой кислоты, 0.5 мМ ЭДТА и 8% ацетонитрила (рН 3.0). Скорость элюции подвижной фазы составляла 1 мл/мин, время анализа одной пробы – около 20 мин. Конечная концентрация ДА и ДОФУК выражена в процентах относительно К14 (100%).

Определение уровня белков в стриатуме проводили методом Вестерн-блоттинга. Ткань стриатума гомогенизировали в десятикратном объеме лизирующего буфера (0.02 М TRIS, 0.15 М NaCl, 0.001 М EDTA, 1% Triton X-100, рН 7.5), в который добавляли коктейль ингибиторов протеаз (Sigma, США) и ингибиторов фосфатаз (RocheDiagnostic, Канада) согласно инструкции производителя. Белки в пробах разделяли с помощью электрофореза в 10%-ном бис-АА акриламидном геле по Лэммли (SDS-PAGE) на оборудовании Bio-Rad Laboratories (США) с использованием маркера молекулярной массы (Invitrogen, США). Белковые фракции из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham, Великобритания) в течение 1 ч. Полоски мембраны, соответствующие молекулярной массе белка интереса, после 30 мин блокировки в 4%-ном блокирующем растворе (сухое молоко, разведенное на TRIS с 0.1% Tween-20 – TBST, рН 7.6) инкубировали в течение ночи при 4°C в растворе первичных антител, разведенных в блокирующем растворе: мыши против тирозингидроксилазы (ТГ, Sigma, 1 : 3000) – скорость лимитирующего фермента биосинтеза ДА, мыши против глутаматдекарбоксилазы 65 (GAD65, Abcam, 1 : 2000) – скорость лимитирующего фермента биосинтеза ГАМК, кролика против фосфорилированной по серину-40 ТГ (фТГ-40, Invitrogen, США, 1 : 2000) – основной фосфорилированной формы ТГ в стриатуме. Антитела мыши против glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, Abcam, Великобритания, 1 : 20000) использовали для выявления контрольного белка в пробах. После тщательной промывки мембраны инкубировали 1 ч в соответствующих вторичных антителах, конъюгированных с пероксидазой хрена, разведенных на 4%-ном 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 CanoScan 8800F и анализировали с помощью программы Image J. Определяли произведение оптической плотности и площади каждого сигнала, которые делили на соответствующее значение GAPDH.

Регистрацию локальной электрической активности мозга в цикле бодрствование-сон изучали у крысят К30 ($n = 8$) и ПНС30 ($n = 8$). После наркоза хлоралгидратом (внутрибрюшинно 400 мг/кг) по координатам стереотаксического атласа мозга крысы [38] вживляли электроды в следующие области мозга: гиппокамп (AP = -4; L = 2; DP = 3.5 мм от брегма, левое полушарие), соматосенсорная кора (AP = -1; L = 3; DP = 2 мм от брегма, правое полушарие), зрительная кора (AP = -7; L = 4; DP = 2 мм от брегма, правое полушарие). В носовую кость устанавливали еще два электрода: заземляющий и референтный. Масса одного электрода не превышала 0.08 г.

После операции и восстановительного периода (7 дней) животных в течение 2–3 сут адаптировали к условиям эксперимента, ежедневно помещая в экспериментальную камеру и подключая к легкому отводящему кабелю. По окончании подготови-

тельного периода проводили опыты с шестичасовой регистрацией электрической активности мозга, все записи выполнены с 10:30 до 16:30. В течение всех опытов животные имели свободный доступ к еде и воде. Регистрацию электрограммы осуществляли с помощью компьютерного электроэнцефалографа “Нейрон-спектр 4” (Нейрософт, Россия) при визуальном контроле за поведением животных. Применяли монополярный относительно референтного электрода способ отведения электрограммы с вводом сигнала в компьютер при частоте опроса 500 раз в секунду в полосе пропускания от 0.5 до 35 Гц. Сопротивление электродов не превышало 25 кОм.

На основании анализа записи электрической активности мозга и поведения животного на исходных электрограммах в соответствии с общепринятыми критериями [39] выделяли следующие стадии ЦБС: бодрствование (Б), быстроволновый сон (БС), медленноволновый сон (МС), переходная стадия (ПЕР). Оценивали суммарную продолжительность каждой из фаз цикла ЦБС за 6 ч записи.

Сравнение результатов иммуногистохимических и биохимических исследований проводилось с помощью двухфакторного (факторы “стресс” и “возраст”) дисперсионного анализа (ANOVA) и последующего апостериорного анализа межгрупповых различий по критерию Тьюки в пакете программ STATISTICA.10 при уровне значимости $p < 0.05$. Результаты поведенческих и электрофизиологических исследований оценивали с помощью однофакторного (фактор “стресс”) дисперсионного анализа (ANOVA) и апостериорного анализа межгрупповых различий по критерию Тьюки. Оценка влияния фактора “возраст” при анализе результатов поведения была невозможна из-за разной продолжительности теста “открытое поле” на 14-й и 30-й день жизни. Результаты Вестерн-блоттинга анализировали с помощью t -критерия Стьюдента ($p < 0.05$). Результаты представлены как медиана (Me) 50% данных с интерквартильным размахом или как среднее \pm стандартная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты исследования демонстрируют отсутствие различий по массе тела между контрольными и ПНС крысами как 14-, так и 30-дневного возраста. В группе К14 масса варьировала от 15 до 22 г (Me = 18.5), а в группе ПНС14 – от 17 до 20 г (Me = 19.5). На 30-й день жизни масса крысят К30 варьировала от 41 до 47 г (Me = 44), а ПНС30 – от 44 до 48 г (Me = 46). Следует отметить, что темпы набора массы у животных также не различались. Крысята по внешним признакам были ухоженными (шерстяной покров и видимые слизистые были чистыми), всегда находились с матерью, что может являться показателем адекватного материнского поведения и ухода за крысятами.

Статистический анализ позволил выявить влияние фактора “стресс” на поведение 14-дневных крысят в тесте “открытое поле” (табл. 1, $F(6.42) = 6.99$, $p < 0.05$). Крысята ПНС14 двигались в пределах одной клетки больше, чем контрольные, совершая винтообразные движения, ползая на животе и используя при этом в основном передние конечности. Такой способ движения, по-видимому, оказывался недостаточно эффективным для передвижения животного в пространстве от одной клетки открытого поля к другой. Поэтому количество пересеченных квадратов за 3 мин наблюдений у крысят К14, которые передвигались, используя уже все четыре конечности, было больше, чем у ПНС14 (табл. 1). Время локомоторной активности у крысят К14 было также увеличено по сравнению с ПНС14, а время движения на месте уменьшалось. У крысят К14 зарегистрированы акты вертикальной активности такие, как стойки с упором, в то же время у крысят ПНС14 вертикальная активность практически отсутствовала. У 14-дневных крысят отмечены акты груминга, однако достоверных отличий по их продолжительности между К14 и ПНС14 не выявлено.

Таблица 1. Показатели теста “открытое поле” у крысят контрольных (К14, К30) и после пренатального стресса (ПНС14, ПНС30) групп

ГРУППЫ			
К14 (3 мин)	ПНС14 (3 мин)	К30 (5 мин)	ПНС30 (5 мин)
Количество пересеченных квадратов			
13 (7–28)	9* (5–14)	48 (25–75)	49 (34–64)
Время локомоторной активности (с)			
38 (17–59)	25* (15–37)	71 (54–18)	51** (37–69)
Время движений на месте (с)			
55 (40–73)	62* (46–106)	30.27 (20–42)	28 (25–41)
Время неподвижности (с)			
64 (44–87)	61 (29–90)	139 (88 –181)	172 (160–191)
Количество стоек с упором			
2 (2–3)	0* (0–1)	7 (5–12)	5 (4–9)
Количество вертикальных стоек			
0 (0)	0 (0)	3 (0–5)	2 (1–3)
Суммарное количество актов вертикальной активности			
2 (2–3)	0* (0–1)	9 (6–17)	8 (5.5–11)
Продолжительность грумингов			
8 (6–11)	13 (8–25)	9 (0–16)	20 (7–41)
Количество заглядываний в норку			
Не оценивалось	Не оценивалось	5 (3–9)	1** (0–1)
Время, проведенное в центре поля (с)			
Не оценивалось	Не оценивалось	4 (1–7)	2** (1–3)
Количество центральных посещений			
Не оценивалось	Не оценивалось	4 (1–6)	1 (1–6)
Суммарное количество болюсов и уринаций			
0 (0–0)	0 (0–0)	1 (0–3)	1 (0–3)

Данные представлены в виде медианы, в скобках – интерквартильный размах.

Обозначения: * – достоверность отличий по сравнению с К14, ** – по сравнению с К30 ($p < 0.05$).

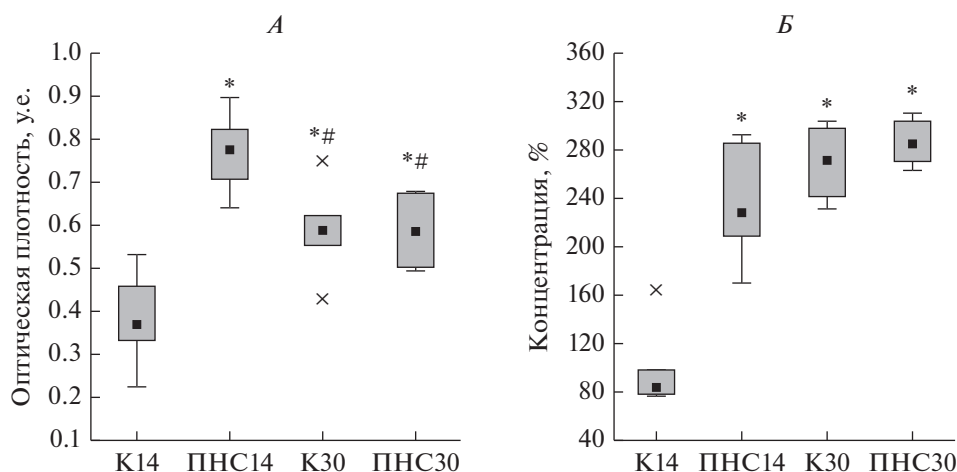


Рис. 1. Уровень орексина А в нейронах перифорникальной области гипоталамуса (А) и уровень дофамина в гипоталамусе (Б) у 14-ти и 30-дневных крысят в контроле (К14 и К30) и после пренатального стресса (ПНС14 и ПНС30).

По оси ординат: А – оптическая плотность в условных единицах (у. е.), Б – концентрация дофамина, выраженная в процентах. Данные представлены в виде бокс-плотов, соответствующих 50% данных (от 25 до 75%). Обозначения: черная точка внутри бокса – медиана, линии предела – интерквартильный размах, х – выскакивающие значения. Достоверность отличий ($p < 0.05$): * – по сравнению с К14, # – по сравнению с ПНС14.

На 30-й день жизни различий в количестве пройденных квадратов между крысятами К30 и ПНС30 групп не выявлено. Время локомоторной активности у К30 было больше по сравнению с ПНС30, которые быстрее обследовали “открытое поле”, а затем больше времени проводили в неподвижности. На 30-й день жизни различий в показателях вертикальной двигательной активности и продолжительности груминга не выявлено. Таким образом, результаты теста “открытое поле” свидетельствуют о наличии нарушений вертикальной и горизонтальной двигательной активности у крысят группы ПНС14 и об их отсутствии у крысят ПНС30.

На 15–16 день жизни у крысят контрольной и ПНС групп открывались глаза, поэтому на 30-й день жизни были оценены такие поведенческие показатели, как количество актов обследования отверстий (т.е. норковые реакции), а также количество пересеченных квадратов в центре открытого поля и время пребывания в центре открытого поля. Статистический анализ показал влияние фактора “стресс” на перечисленные показатели поведения у 30-дневных крысят (табл. 1, $F(11.32) = 3.77, p < 0.05$).

Крысята К30 по сравнению с ПНС30 демонстрировали большее количество норковых реакций (табл. 1). Кроме того, за 5 мин опыта у К30 отмечено большее время пребывания в центре открытого поля по сравнению с ПНС30 (табл. 1).

Таким образом, у 30-дневных крысят, несмотря на отсутствие значимых различий по показателям двигательной активности, выявлены значимые отличия таких показателей, как тревожность и исследовательская активность.

Иммуногистохимический анализ свидетельствует о присутствии в перифорникальной области гипоталамуса 14-дневных крысят большого количества тел и отростков орексин-иммунопозитивных нейронов. Анализ оптической плотности иммунопозитивного вещества в телах нейронов выявил ее увеличение у К30 на 60% (рис. 1А) по сравнению с К14.

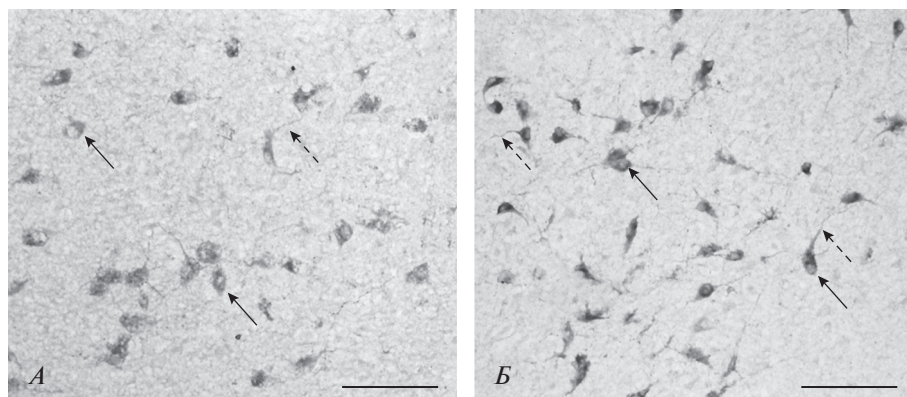


Рис. 2. Иммуногистохимическая реакция к орексину А в нейронах перифорникальной области гипоталамуса у 14-дневных крысят в контроле (А) и после пренатального стресса (Б).
Обозначения: сплошные стрелки указывают на тела иммунопозитивных нейронов, прерывистые – на их отростки, масштаб 50 мкм.

У крысят ПНС14 оптическая плотность орексина в телах нейронов была в 2 раза выше, чем у К14 (рис. 1А), что оказалось на 30% больше, чем у крысят К30 (рис. 1А). При этом у крысят ПНС14 в перифорникальной области выявлялось большее количество длинных иммунопозитивных отростков, чем у К14 (рис. 2).

У крысят ПНС30 уровень оптической плотности орексина в нейронах достоверно не отличался от такового у К30, однако был ниже, чем у ПНС14 ($p < 0.05$).

Таким образом, статистический анализ выявил значимое влияние фактора “стресс”, $F(1.35) = 37.10$ ($p < 0.05$), а также – взаимодействия факторов “стресс” и “возраст” $F(1.35) = 36.62$ ($p < 0.05$) на уровень орексина в нейронах перифорникальной области гипоталамуса. Значимого влияния фактора “возраст” не выявлено $F(1.35) = 0.092$ ($p = 0.76$) из-за разной возрастной динамики уровня орексина в контрольной и экспериментальной группах.

Результаты ВЭЖХ демонстрируют, что у контрольных крысят с 14-го по 30-й день жизни уровень ДА в гипоталамусе увеличивался в 3 раза (от 100 до 336%, рис. 1Б). Возрастание уровня ДА происходило на фоне повышения его метаболизма, что выражалось, во-первых, в снижении уровня ДОФУК почти в два раза (со 100 до 58%, табл. 2), а во-вторых, в снижении показателя катаболического коэффициента ДОФУК/ДА, отражающего скорость метаболизма ДА (на 80%, табл. 2).

У крысят ПНС14 выявлено увеличение уровня ДА в гипоталамусе в 2.7 раз по сравнению с К14 (100 и 276% соответственно, рис. 1Б). При этом уровень ДОФУК у крысят ПНС14 был на 50% ниже, чем в контроле (100 и 52% соответственно, табл. 2), а катаболический коэффициент ДОФУК/ДА – ниже на 80% по сравнению с К14 (0.09 и 0.18, табл. 2). Таким образом, статистический анализ выявил значимое влияние фактора “стресс”, $F(3.30) = 19.80$ ($p < 0.05$), фактора “возраст” $F(3.30) = 12.69$ ($p < 0.05$), а также взаимодействия факторов “стресс” и “возраст” $F(3.30) = 11.85$ ($p < 0.05$) на показатели функциональной активности дофаминергической системы гипоталамуса.

Результаты Вестерн-блоттинга демонстрируют в стриатуме у крысят ПНС14 уменьшение уровня ключевого фермента синтеза дофамина ТГ на 25% (рис. 3А) и увеличение фТГ-40 на 64% (рис. 3Б) по сравнению с К14, что свидетельствует о более интенсивном переходе ТГ в активную фосфорилированную форму: соотноше-

Таблица 2. Показатели функциональной активности дофаминергической системы гипоталамуса 14-ти и 30-дневных крысят в контроле (К14, К30) и после пренатального стресса (ПНС14, ПНС30)

Показатель	К14	ПНС14	К30	ПНС30
ДА (%)	100 (94–117)	276* (254–425)	336* (230–415)	340* (285–407)
ДОФУК (%)	100 (96–103)	52* (34–53)	58* (57–73)	39* (34–73)
ДОФУК/ДА	0.90 (0.66–1.04)	0.18* (0.14–0.33)	0.18* (0.13–0.19)	0.13* (0.08–0.23)

Данные представлены в виде медианы, в скобках – интерквартильный размах.

Обозначения: ДА – дофамин, ДОФУК – диоксифенилуксусная кислота, ДОФУК/ДА – катаболический коэффициент, * – достоверность отличий ($p < 0.05$) по сравнению с К14.

ние фТГ40/ТГ в группе К14 составляло 1.2, а в группе ПНС14 – 2.4. У крысят ПНС14 выявлено уменьшение уровня GAD65 – фермента биосинтеза ГАМК на 68% (рис. 2В) по сравнению с К14.

У крысят К30 в стриатуме не выявлено достоверных отличий относительного уровня ТГ и GAD65 по сравнению с К14, при этом у К30 отмечено значительное увеличение уровня фТГ-40 ($p < 0.05$), соотношение фТГ40/ТГ составляло 3.1, что свидетельствует о более высоком уровне активности этого фермента.

У крысят ПНС30 не выявлено достоверных отличий уровня ТГ и фТГ-40 (соотношение фТГ40/ТГ составило 3.3), а также уровня GAD65 от соответствующего уровня у К30, что свидетельствует о компенсации нейрохимических нарушений, отмеченных в группе ПНС14.

Результаты электрофизиологического исследования организации ЦБС у 30-дневных крысят в нашем эксперименте (рис. 4) показали отсутствие достоверных отличий продолжительности фаз Б, МС, ПЕР и БС между К30 и ПНС30 группами, что свидетельствует о созревании нейрохимических систем, вовлеченных в регуляцию ЦБС, в частности, орексинергической системы мозга, в обеих исследованных группах крыс.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время хорошо известно, что различные факторы, действующие на организм беременной самки, оказывают влияние на характер индивидуального развития ее потомства. Нарушение сна у беременных женщин – одно из наиболее часто встречающихся нарушений. В нашем исследовании было изучено влияние стресса, вызванного депривацией сна беременной крысы, на динамику формирования поведения у ее потомства, а также на развитие одной из важнейших сон-регулирующих систем мозга – орексинергической системы. Также было проведено сопоставление уровня активности орексинергической и дофаминергической систем мозга в ходе раннего постнатального развития крысят.

Метод “малых площадок” [34] – общепризнанный и широко используемый в сомнологических исследованиях способ депривации сна. Ранее было показано, что после 4-х дней пребывания крысы на малых площадках у нее наблюдаются типичные признаки стресса: увеличение массы надпочечников, снижение массы тимуса и кровоизлияние в желудке [40]. В крови беременной самки, подвергавшейся такому воздействию, ожидается увеличение уровня кортикостероидов, которые могут оказывать влияние на морфогенез плода либо напрямую, проникая через плаценту и вызывая изменения концентрации гормонов в крови плода [1, 2], либо опосредованно,

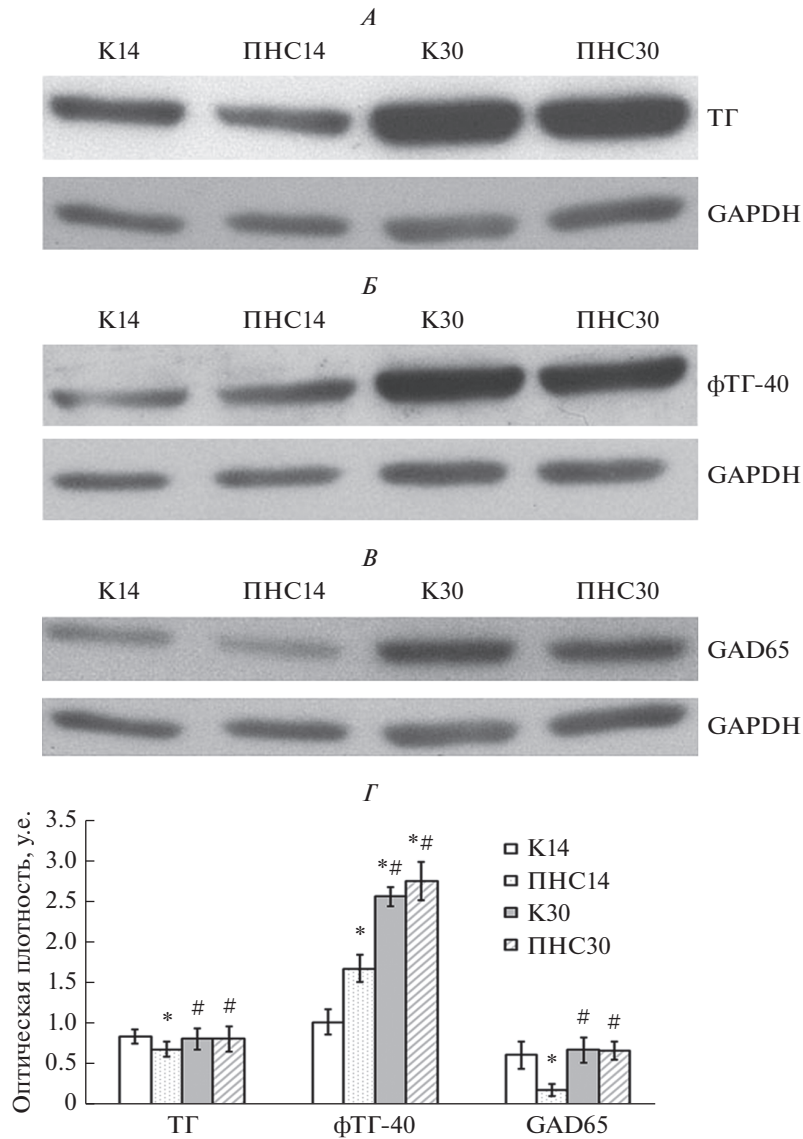


Рис. 3. Результаты *Вестерн-блоттинга*, демонстрирующие изменение уровня тирозингидроксилазы (ТГ) – А; фосфорилированной по серину-40 формы тирозингидроксилазы (фТГ-40) – Б; глутаматдекарбоксилазы 65 (GAD65) – В и их статистический анализ – Г у 14-ти и 30-дневных крысят контрольных (К14 и К30) и после пренатального стресса (ПНС14 и ПНС30) групп.

GAPDH – контрольный белок. Достоверность отличий ($p < 0.05$): * – по сравнению с К14, # – по сравнению с ПНС14.

через изменение в крови концентрации глюкозы, липидов, аминокислот и других веществ, необходимых для нормального питания развивающегося организма [41, 42].

Мы показали, что на 14-й день жизни крысята, матери которых в период беременности подвергались депривации сна, отстают по уровню двигательной актив-

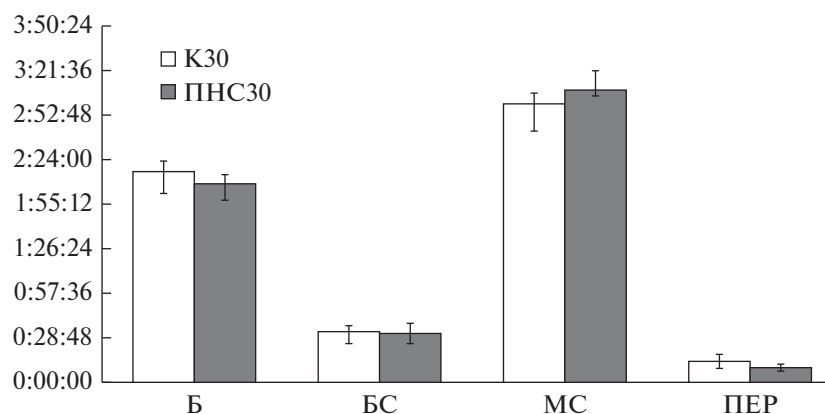


Рис. 4. Продолжительность фаз ЦБС у 30-дневных контрольных (К30) и после пренатального стресса (ПНС30) крысят. По оси ординат: суммарная продолжительность фаз ЦБС в формате чч:мм:сс за 6 ч опыта.

Обозначения: Б – бодрствование, BC – быстроволновый сон, MC – медленноволновый сон, ПЕР – переходная стадия; столбцы показывают медианное значение параметра, отрезками отмечены 1-й и 3-й квартили.

ности от контрольных. С помощью теста “открытое поле” у них отмечено меньшее время локомоторной активности и больше движений на месте, меньший уровень как вертикальной, так и горизонтальной двигательной активности (табл. 1).

Стриатум – важная структура, вовлеченная в регуляцию двигательной активности, которая получает дофаминергическую иннервацию от нейронов среднего мозга [43, 44]. Фосфорилирование ТГ по серину-40 – основной путь регуляции активности этого фермента в стриатуме [45], который обусловлен влиянием внешних воздействий на различные внутриклеточные посредники (прежде всего протеинкиназы) в дофаминергических нейронах через G-белок-зависимые пути [46]. Учитывая то, что двигательная активность крысят ПНС14 была снижена, мы ожидали, что у них также будет понижен уровень ТГ и соответственно функциональной активности дофаминергической системы, так как уменьшение уровня ДА в nigrostriatной системе – основная причина двигательных расстройств, в частности, болезни Паркинсона у человека [47]. Однако результаты Вестерн-блоттинга демонстрируют у крысят ПНС14 противоположный результат: выявлено значительное увеличение активности фермента биосинтеза ДА в стриатуме (в 2 раза) по сравнению с К14, что косвенно свидетельствует об увеличении уровня ДА. Можно предположить, что у крысят ПНС14 на фоне отмеченных двигательных нарушений увеличение фосфорилирования ТГ может являться компенсаторной реакцией, которая направлена на реализацию потребности их организма в увеличении ДА.

Полученные результаты демонстрируют в стриатуме крысят ПНС14 по сравнению с К14 снижение уровня GAD65 – фермента биосинтеза ГАМК – главного тормозного нейромедиатора мозга. Эти результаты согласуются с данными литературы, демонстрирующими, что стресс, перенесенный в пренатальный период во время развития ГАМК-нейронов (E13), вызывает задержку их развития в первый месяц жизни, что проявляется в повышении тревожности у крыс [48, 49]. С другой стороны, меньший уровень двигательной активности на фоне недостатка ГАМК может быть связан с нарушением рецепторных систем, в частности, баланса D1/D2 рецепторов дофамина, а также и рецепторов ГАМК [50].

Причиной такой задержки двигательного развития могут быть возникающие морфологические нарушения в мозге, в частности, в структурах коры [28, 50, 25], а также нарушения других нейромедиаторных систем.

На фоне описанных нами нейрохимических изменений в стриатуме в гипоталамусе крысят ПНС14 наблюдалось значительное увеличение уровня иммунопозитивного орексина (уровень которого был даже выше, чем у К30) в нейронах и их отростках, а также значительное повышение концентрации ДА по сравнению с крысятами К14. Такую активацию орексинергических нейронов можно считать преждевременной, поскольку в норме у крысы увеличение уровня орексина отмечено только после 15-го дня жизни [4, 5]. Кроме того, полученные нами данные иммуногистохимических и биохимических исследований свидетельствуют об односторонних изменениях как орексин-, так и дофаминергической систем гипоталамуса у крысят ПНС14.

Известно, что орексины вовлечены в регуляцию двигательной активности через модуляцию дофаминергических нейронов nigro-стриатной системы: увеличение уровня орексина в мозге сопровождалось усилением двигательной активности [26]. У взрослой крысы орексин-иммунопозитивные отростки и орексиновые рецепторы выявлены в стриатуме [26]. В свою очередь в орексинергических нейронах показана экспрессия D1 и D2 рецепторов ДА, что свидетельствует не только о влиянии орексина на биосинтез ДА, но и о возможности прямого влияния ДА на орексинергические нейроны [22]. Таким образом, увеличение уровня ДА в гипоталамусе могло быть причиной активации орексинергических нейронов, которые, в свою очередь, участвуют в регуляции активности nigro-стриатной системы.

Гипоталамус – структура мозга, участвующая в адаптационных реакциях организма. В настоящее время в литературе широко обсуждаются данные о морфогенетической роли пептидов гипоталамуса и, в том числе, орексинов, которые вовлечены в процессы нейрогенеза, в частности, нейронов коры и гиппокампа [19, 20]. Поэтому активация орексинергических нейронов в нашем эксперименте может носить компенсаторный характер.

У 30-дневных крысят, подвергавшихся стрессу в пренатальный период развития, мы не выявили отличий в показателях горизонтальной и вертикальной двигательной активности по сравнению с контрольными, однако у них отмечен повышенный уровень тревожности. Показано, что они меньше времени проводили в центре открытого поля, меньше его обследовали, меньше обследовали норки и больше времени проводили в неподвижности, чем контрольные крысята. Также у них наблюдалась тенденция к увеличению продолжительности грумингов.

У 30-дневных крысят в нашем эксперименте на фоне отсутствия отличий в двигательной активности в стриатуме (рис. 3Г) не выявлено различий относительного уровня ТГ или GAD65, которые также не отличались от показателей у К14. При этом у крысят К30 отмечено значительное увеличение уровня фТГ-40 (и соответственно фТГ-40/ТГ) по сравнению с К14, но уровень фТГ-40 не отличался между К30 и ПНС30 группами. Таким образом, у крысят ПНС30, несмотря на нормализацию уровня GAD65, активность ТГ возрастала и не отличалась от уровня К30, это свидетельствует о том, что ГАМК не является ведущим фактором регуляции активности ТГ.

В гипоталамусе ПНС30 крысят также не обнаружено отличий уровней иммунопозитивного орексина в нейронах и ДА в ткани по сравнению с К30.

Таким образом, полученные нами данные демонстрируют, что у крысят, подвергнутых стрессу в пренатальный период развития, к 30-му дню жизни происходит компенсация нарушений, отмеченных на 14-й день жизни.

Учитывая данные о том, что у крыс к 30-му дню жизни формируется ЦБС [12], в регуляцию которого вовлечена орексинергическая и дофаминергическая системы

мозга, мы оценили продолжительность фаз ЦБС у 30-дневных крысят. Результаты проведенного нами электрофизиологического исследования свидетельствуют об отсутствии отличий в организации ЦБС у крысят ПНС30 по сравнению с К30, что подтверждает приведенные выше результаты иммуногистохимических и биохимических исследований и также свидетельствует о компенсации нарушений, отмеченных у крысят в 14-дневном возрасте, и нормальном функционировании у ПНС крысят систем, регулирующих ЦБС.

В литературе приводятся данные о том, что тяжесть последствий пренатального стресса зависит от половой принадлежности животного: поведение самок нарушается в большей степени, чем у самцов [52, 53]. Однако в этих исследованиях изучали последствия пренатального стресса у взрослых животных. В наших экспериментах исследованы крысята 30-дневного возраста, еще не достигшие половой зрелости, поэтому мы считаем возможным объединить крысят первого месяца жизни в одну выборку, однако в качестве перспективы развития данного исследования необходимо разделение животных по половому признаку.

Полученные нами данные демонстрируют однонаправленные изменения орексинергической и дофаминергической систем мозга уже на ранних этапах онтогенеза крысы. Пренатальный стресс вызывает преждевременную активацию обеих систем. Мы полагаем, что представленные результаты свидетельствуют об участии орексинов в компенсаторных механизмах мозга, которые активируются на фоне снижения двигательной активности и повышенной потребности организма в ДА и направлены на поддержание его баланса, необходимого для нормального развития организма. Это в конечном счете приводит к отсутствию различий в нейрохимических и поведенческих показателях между К30 и ПНС30 группами, а также нормализации в гипоталамусе уровня орексина и ДА и к формированию нормальной структуры ЦБС, что свидетельствует об устранении функциональных нарушений.

Исследование проведено с использованием оборудования ЦКП ИЭФБ РАН

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено на средства государственного бюджета по госзаданию № АААА-А18-118012290427-7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zarrow M.X., Philpott J.E., Denenberg V.H. Passage of 14C-4-corticosterone from the rat mother to the foetus and neonate. *Nature*. 226(5250): 1058–1069. 1970.
2. Weinstock M. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Prog. Neurobiol.* 65(5): 427–451. 2001.
3. Vyushina A.V., Pritvorova A.V., Flerov M.A. Oxidative modification of proteins in brain structures in Sprague-Dawley rats and some behavioral parameters after prenatal stress. *Neurosci. Behav. Physiol.* 44(4): 395–400. 2014.
4. Sakurai T. Orexins and Orexin Receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*. 92(4): 573–585. 1998.
5. 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*. 95(1): 322–327. 1998.
6. 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*. 98(3): 365–376. 1999.
7. 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*. 98(4): 437–451. 1999.
8. Sakurai T., Moriguchi T., Furuya K., Kajiwara N., Nakamura T., Yanagisawa M., Goto K. Structure and function of human prepro-orexin gene. *J. Biol. Chem.* 274(25): 17771–17776. 1999.
9. Sakurai T. Roles of orexin/hypocretin in regulation of sleep/wakefulness and energy homeostasis. *Sleep Med. Rev.* 9: 231–241. 2005.

10. Kovalzon V.M. Central mechanisms of the sleep-wakefulness cycle control. *Hum. Physiol.* 37(4): 500–508. 2011.
11. Kovalzon V.M. Ascending reticular activating system of the brain. *Translat. Neurosci. Clinics.* 2(4): 275–285. 2016.
12. Aristakesian E.A. Comparative neurophysiological analysis of the waking-sleeping cycle during the early postnatal ontogeny in rats and guinea pigs. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 33(6): 545–550. 1997.
13. 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. *J. Chem. Neuroanatomy.* 27(3): 165–181. 2004.
14. Ogawa Y., Kanda T., Vogt K., Yanagisawa M. Anatomical and electrophysiological development of the hypothalamic orexin neurons from embryos to neonates. *J. Comp. Neurol.* 525(18): 3809–3820. 2017.
15. Yamamoto Y., Ueta Y., Hara Y., Serino R., Nomura M., Shibuya I., Shirahata A., Yamashita H. Postnatal development of orexin/hypocretin in rats. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 78(1–2): 108–119. 2000.
16. van Den Pol A.N., Patrylo P.R., Ghosh P.K., Gao X.B. Lateral hypothalamus: Early developmental expression and response to hypocretin (orexin). *J. Compar. Neurol.* 433(3): 349–363. 2001.
17. Grafe L.A., Bhatnagar S. Orexins and stress. *Front. Neuroendocrinol.* 51: 132–145. 2018.
18. Giardino W.J., de Lecea L. Hypocretin (orexin) neuromodulation of stress and reward pathways. *Curr. Opin. Neurobiol.* 29: 103–108. 2014.
19. 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.* 157(4): 720–732. 2008.
20. Bjornstrom K., Turina D., Strid T., Sundqvist T., Eintrei C. Orexin A inhibits propofol-induced neurite retraction by a phospholipase D/protein kinase C?-dependent mechanism in neurons. *PLoS ONE.* 9(5): 1–7. 2014.
21. Bakos J., Zatkova M., Vacova Z., Ostatnikova D. The Role of Hypothalamic Neuropeptides in Neurogenesis and Neuritogenesis. *Neural. Plasticity.* 2016: 1–10. 2016.
22. Морина И.Ю., Мухрина А.Л., Романова И.В. Иммуногистохимическое исследование путей влияния дофамина на орексинергические нейроны перифорникальной области гипоталамуса крысы. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 104(6): 692–700. 2018. [Morina I.Yu., Mikhrina A.L., Romanova I.V. Immunohistochemical investigation of the ways of dopamine influence on orexinergic neurons of the perifornical hypothalamic area of rats. *Russ. J. Physiol.* 104 (6): 692–700. 2018. (In Russ.)].
23. 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.* 23(1): 7–11. 2003.
24. 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.* 237: 157–263. 2013.
25. 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. USA.* 115(1): 198–203. 2018.
26. 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 Res.* 873(1): 181–187. 2000.
27. Светлов П.Г. Теория критических периодов развития и ее значение для понимания принципов действия среды на онтогенез. В кн.: *Вопросы цитологии.* М.—Л. Изд-во АН СССР. 1966. [Svetlov P.G. Teoriya kriticheskikh periodov razvitiya i ee znachenie dlya ponimaniya principov dejstviya sredy na ontogenez [The theory of critical periods of development and its importance for understanding the principles of the environment on ontogenesis]. In: *Cytology questions.* Moscow—Leningrad. AN USSR. 1966].
28. 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. [Otellin V.A., Khozhaj L.I., Ordyan N. E.N. Prenatalnye stressornye vozdeystviya i razvivayushchijysya golovnoj mozg: adaptivnye mekhanizmy, neposredstvennyye i otsrochennyye efekty [Prenatal stressors and the developing brain: adaptive mechanisms, immediate and delayed effects]. SPb. “Desyatka”. 2007].
29. Coggeshall R.E. A Study of diencephalic development in the albino rat. *J. Comp. Neurol.* 122(2): 241–299. 1964.
30. Кассиль В.Г., Отеллин В.А., Хожай Л.И., Косткин В.Б. Критические периоды развития головного мозга. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 86(11): 1418–1425. 2000. [Kassil’ V.G., Otellin V.A., Khozhaj L.I., Kostkin V.B. Critical phases of the brain development. *Russ. J. Physiol.* 86 (11): 1418–1425. 2000. (In Russ.)].

31. *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. *Eur. J. Neurosci.* 22(2): 531–534. 2005.
32. *Mandl A.M.* The phases of the estrous cycle in the adult white rat. *J. Exp. Biol.* 28: 576–584. 1951.
33. *Marcondes F.K., Bianchi F.J., Tanno A.P.* Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. *Braz. J. Biology.* 62(4): 609–614. 2002.
34. *Vogel G.W.* A review of REM sleep deprivation. *Arch. Gen. Psychiatr.* 32(6): 749–761. 1975.
35. *Coenen A.M.L., van Luijckelaar E.L.J.M.* Stress induced by three procedures of deprivation of paradoxical sleep. *Physiology & Behavior.* 35(4): 501–504. 1985.
36. *Макаров В.Г., Макарова М.Н.* Справочник. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. СПб. Изд-во “ЛЕМА”. 2013. [Makarov V.G., Makarova M.N. Spravochnik. Fiziologicheskie, biohimicheskie i biometricheskie pokazateli normy ehksperimental’nyh zhivotnyh [Directory. Physiological, biochemical and biometric indicators of the norm of experimental animals]. Sankt-Petersburg. “LEMA”. 2013].
37. *Lambertsen K.L., Gramsbergen J.B., Sivasaravanaparan M., Ditzel N., Sevelsted-Møller L.M., Oliven-Viguera A., Rabjerg M., Wulff H., Kohler R.* Genetic KCa3.1-deficiency produces locomotor hyperactivity and alterations in cerebral monoamine levels. *PLoS One.* 7(10): 1–15. 2012.
38. *Paxinos G., Watson Ch.* The rat brain in stereotaxic coordinates. Fourth Edition. San Diego. California. Acad. Press. 1998.
39. *Krasnova I.N., Bychkov E.R., Lioudyno V.I., Zubareva O.E., Dambinova S.A.* Intracerebroventricular administration of substance P increases dopamine content in the brain of 6-hydrodopamine lesioned rats. *Neuroscience.* 95(1): 113–117. 2000.
40. *Ковальзон В.М., Цибульский В.Л.* Депривация “быстрого” сна раздражением ретикулярной формации у крыс. *Физиол. журн. СССР им. И.М. Сеченова.* 64(8): 1082–1088. 1978. [Kovalzon V.M., Tsibulsky V.L. REM deprivation caused by electrical stimulation of the mid-brain reticular formation in rats. *Russ. J. Physiol.* 64(8): 1082–1088. 1978. (In Russ.)].
41. *Рыжавский Б.Я.* Развитие головного мозга в ранние периоды онтогенеза. *Соросовский образовательный журн.* 6(1): 37–43. 2000. [Ryzhavskij B.Ya. Development of the brain in the early periods of ontogenesis. *Sorosovskij obrazovatelnyj zhurnal.* 6(1): 37–43. 2000. (In Russ.)].
42. *Harris A., Seckl J.* Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. *Hormones and Behavior.* 59(3): 279–289. 2011.
43. *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.* 237: 157–263. 2013.
44. *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. Compar. Neurol.* 507(1): 1141–1150. 2008.
45. *Haycock J.W.* Phosphorylation of tyrosine hydroxylase in situ at serine 8, 19, 31 and 40. *J. Biol. Chem.* 265: 11682–11691. 1990.
46. *Dunkley P.R., Bobrovskaya L., Graham M.E., von Nagy-Felsobuki E.I., Dickson P.W.* Tyrosine hydroxylase phosphorylation: Regulation and consequences. *J. Neurochem.* 91: 1025–1043. 2004.
47. *Kordower J.H., Olanow C.W., Dodiya H.B., Chu Y., Beach T.G., Adler C.H., Halliday G.M., Bartus R.T.* Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson’s disease. *Brain.* 136(8): 2419–2431. 2013.
48. *Lussier S.J., Stevens H.E.* Delays in GABAergic interneuron development and behavioral inhibition after prenatal stress. *Dev. Neurobiol.* 76(10): 1078–1091. 2016.
49. *Stevens H.E., Su T., Yanagawa Y., Vaccarino F.M.* Prenatal stress delays inhibitory neuron progenitor migration in the developing neocortex. *Psychoneuroendocrinology.* 38: 509–521. 2013.
50. *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.* 17(12): 1295–1305. 2012.
51. *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.* 137(1): 145–155. 2006.
52. *Sickmann H.M., Arentzen T.S., Dyrby T.B., Plath N., Kristensen M.P.* Prenatal stress produces sex-specific changes in depression-like behavior in rats: Implications for increased vulnerability in females. *J. Dev. Orig. Health Dis.* 6(5): 462–474. 2015.
53. *Brocardo P.S., Boehme F., Patten A., Cox A., Gil-Mohapel J., Christie B. R.* Anxiety- and depression-like behaviors are accompanied by an increase in oxidative stress in a rat model of fetal alcohol spectrum disorders: Protective effects of voluntary physical exercise. *Neuropharmacology.* 62(4): 1607–1618. 2012.

The Influence of Prenatal Stress on the Development of Rat Hypothalamic Orexinergic System

I. Yu. Morina^a, E. P. Stankova^a, I. V. Romanova^{a, *}

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

**e-mail: irinaromanova@mail.ru*

Abstract—The influence of prenatal stress (PNS) on the development of the orexinergic and dopaminergic systems of the brain in 14 and 30-day-old Wistar rats were investigated. Pups were born by females, which were subjected to sleep deprivation (6 h a day) by “small platforms” method on E13-E19. In P14, the violations of postnatal locomotion development were revealed with the Open field test in PNS pups. In the hypothalamus, a significant increase in orexin A in the neurons of the perifornical area was detected by immunohistochemical method. High-performance liquid chromatography showed the increase of dopamine level and a rate of its metabolism in the PNS group as compared with the control pups. The results of Western blot demonstrate the decrease in the level of GAD65 in the striatum and an increase in the level of phosphorylated tyrosine hydroxylase (serine-40) – an enzyme of dopamine synthesis as compared with control. In P30, the locomotion activity of PNS rats does not differ from the control. However, PNS rats were characterized by a higher level of anxiety and a lower level of exploratory behavior. We found no morphological or biochemical differences in the hypothalamus and striatum in P30 PNS rats as compared with the control. These results are in agreement with our electrophysiological data, which demonstrate no difference in the organization of the wakefulness-sleep cycle between the P30 PNS and control rats. The morphofunctional interactions between the orexinergic and dopaminergic systems of the brain in the early postnatal period and the role of orexins in the compensatory mechanisms of the brain are discussed.

Keywords: brain, hypothalamus, striatum, ontogenesis, prenatal stress, orexin, dopamine, locomotion activity, wakefulness-sleep cycle

ЦИТИРОВАТЬ:

Морина И.Ю., Станкова Е.П., Романова И.В. Влияние пренатального стресса на формирование орексинергической системы гипоталамуса крысы. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 105(5): 591–607.

DOI: 10.1134/S0869813919050054

TO CITE THIS ARTICLE:

Morina I.Yu., Stankova E.P., Romanova I.V. The Influence of Prenatal Stress on the Development of Rat Hypothalamic Orexinergic System. Russian Journal of Physiology. 105(5): 591–607.

DOI: 10.1134/S0869813919050054