

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МОНОАМИНОВ НА ОРЕКСИНЕРГИЧЕСКИЕ НЕЙРОНЫ ГИПОТАЛАМУСА ЭМБРИОНОВ КРЫСЫ

© 2020 г. И. Ю. Морина¹, Е. В. Михайлова¹, И. В. Романова¹, *

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

*E-mail: irinaromanova@mail.ru

Поступила в редакцию 15.02.2020 г.

После доработки 06.03.2020 г.

Принята к публикации 03.04.2020 г.

Орексинергические нейроны гипоталамуса вовлечены в контроль различных функций организма, прежде всего энергетического баланса, пищевого поведения, бодрствования и пробуждения. Прямое влияние дофамина и серотонина мозга на орексинергические нейроны гипоталамуса осуществляется через различные подтипы соответствующих рецепторов, экспрессия которых ранее показана в телах орексинергических нейронах. Для выяснения возможности становления этих взаимосвязей в эмбриональном периоде развития было проведено исследование 18-дневных эмбрионов крысы. С помощью Вестерн-блоттинга в развивающемся гипоталамусе показана экспрессия белков рецепторов дофамина D1 и серотонина 2C. Двойное флуоресцентное иммуномечение и конфокальная микроскопия подтверждают экспрессию рецепторов дофамина D1 и серотонина 2C в телах развивающихся орексин-иммунопозитивных клеток у эмбрионов крысы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что развитие морфофункциональных взаимодействий моноаминергических систем с орексинергической происходит в эмбриональный период развития организма.

Ключевые слова: орексины, гипоталамус, дофамин, серотонин, рецепторы дофамина D1, рецепторы серотонина 2C, рецепторы орексина, эмбриогенез, E18

DOI: 10.31857/S0869813920060072

Нейроны перифорникальной/латеральной области гипоталамуса, вырабатывающие орексин-А (гипокретин-1) и орексин-В (гипокретин-2), вовлечены в регуляцию пищевого поведения, энергетического баланса, бодрствования и пробуждения [1–4] и других функций. Действие орексинов осуществляется через два типа G-протеин-связанных рецепторов: OX1R и OX2R, которые экспрессируются в различных отделах мозга [5, 6].

В регуляции пищевого поведения и циркадных ритмов также участвуют серотонин и дофамин мозга. Известно, что структуры гипоталамуса получают обильную дофамин- и серотонинергическую иннервацию [7]. Источником дофамина в гипоталамусе являются как нейроны самого гипоталамуса (перивентрикулярного и аркуатного ядер), так и проекции из других отделов мозга [7–9]. В области латерального гипоталамуса рядом с фортрисом проходит мощный пучок отростков нигро-стриатного тракта, которые являются аксонами дофаминергических нейронов среднего мозга. Основным источником серотонинергической иннервации гипоталамуса является дорзальное и медиальное ядра шва [7]. Тирозингидрок-

силаза и триптофангидроксилаза-2 – скорость лимитирующие ферменты биосинтеза дофамина и серотонина, являются общепризнанными маркерами дофаминергических и серотонинергических нейронов.

Проекции орексинергических нейронов OX1R и OX2R выявлены в областях мозга, где локализованы тела дофаминергических и серотонинергических нейронов [2, 5, 10–13]. В свою очередь рецепторы дофамина D1- и D2-подтипов [14], а также рецепторы серотонина 1A и 3A подтипов [15, 16], 2C- и 1B-подтипов [17, 18] экспрессируются в самих орексинергических нейронах. Эти данные подтверждают существование тесных морфофункциональных взаимосвязей между орексинергическими нейронами гипоталамуса с дофамин- и серотонинергическими системами и возможность прямого влияния дофамина и серотонина на функциональную активность орексинергических нейронов.

У крысы в гипоталамусе орексин-иммунопозитивные структуры выявляются на 10–12 день эмбриогенеза (E10–E12), а к E19 их проекции обнаружены уже за пределами гипоталамуса [19–22]. В период E12–E13 в мозге наблюдается развитие дофамин- и серотонинергических нейронов, проекции которых в гипоталамусе выявляются в период E16–E18 [7, 23]. Однако возможность формирования морфофункциональных взаимосвязей моноаминергических систем с орексинергическим нейронами уже в ходе эмбрионального развития организма не показано.

Цель настоящего исследования состояла в том, чтобы с помощью иммуногистохимических и биохимических методов показать возможность становления взаимосвязи орексин-иммунопозитивных нейронов гипоталамуса с дофамин- и серотонинергической системами уже в эмбриональном периоде развития крысы. Исследования проведены на 18-дневных эмбрионах крысы (E18). Этот период развития, как показано выше, соответствует появлению в гипоталамусе проекций дофамин- и серотонинергических нейронов среднего мозга на фоне развития орексин-иммунопозитивных нейронов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований. Все процедуры проводили в соответствии с правилами, разработанными Комитетом по биоэтике ИЭФБ РАН (15.02.2018 г.), правилами и требованиями, изложенными в документах “European Communities Council Directive 1986” (86/609/EEC) и “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”. На проведение экспериментов получено разрешение Комитета по биоэтике ИЭФБ РАН (Протокол 10/2 2018 от 15 октября 2018 г.).

В экспериментах были использованы 18-дневные эмбрионы (E18) крысы. Для эксперимента самок крысы Вистар ($n = 5$) отбирали по внешним признакам (чистые шерстяной покров и видимые слизистые), отсаживали в отдельные клетки и при помощи мазков из влагалища следили за эстральным циклом [24, 25]. В фазу проэструса подсаживали самцов, первым днем беременности считали день обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке. Самок содержали в стандартных условиях вивария при 12-часовом световом режиме (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 18-й день беременности самок декапитировали.

Для Вестерн-блоттинга из замороженной головы эмбрионов ($n = 6$) извлекали ткань развивающегося гипоталамуса, гомогенизировали в пятикратном растворе лизирующего буфера (0.02 M TRIS (hydroxymethylaminomethane), 0.15 M NaCl, 0.001 M EDTA, 1% Triton X-100, pH 7.5), в который добавляли коктейль ингибиторов протеаз (Sigma, США) и ингибиторов фосфатаз (PhosStop; RocheDiagnostic, Канада) согласно инструкции производителя. Протокол приготовления проб,

гель-электрофореза и иммуноблоттинга был ранее подробно описан [26]. Для реакции были использованы первичные поликлональные антитела кролика: к D1 рецептору дофамина (Abscam, Великобритания; 1 : 1000), к 2C-подтипу рецептора серотонина (Elabscience Biotechnology Ltd., США; 1 : 500), к триптофангидроксилазе-2 (ТПГ2; Millipore, США; 1 : 2000). Анализ контрольного белка не проводили, так как нас интересовал не количественный результат, а сам факт экспрессии исследуемых белков в гипоталамусе. Также были использованы вторичные антитела козы против IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США), 1 : 5000–10000. Визуализацию сигнала проводили с помощью хемилюминисцентной системы Novex ECL (Invitrogen, Life Technologies, США), рентгеновской пленки (GE Healthcare, Amersham Biosciences AB, Великобритания), которую проявляли стандартным фотонабором (Реактив-фото, Россия).

Для оценки в гипоталамусе экспрессии генов, кодирующих орексиновые рецепторы OX1R и OX2R, использовали ПЦР в реальном времени ($n = 6$). Протокол реакции и реактивы ранее были подробно описаны [27]. Для реакции использовали праймеры, синтезированные фирмой Eurogen (Москва, Россия):

TGCGGCCAACCCATCATCTA (For.) и ACCGGCTCTGCAAGGACAA (Rev.) – для *Ox1r* (NM_013064.1), ACTGTCTACGCCTGGTTCAC (For.) и CTCTGTACTTGTGCGTCCCC (Rev.) – для *Ox2r* (NM_013074.1). В качестве референсного гена использовали *Gapdh* (NM_017008.4), кодирующего glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase: GTGTTCCCTACCCCAATGTATCC (For.) и GATGTCATCATACTTGGCAGGTTT (Rev.). Амплификационный сигнал был детектирован прибором 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies ABI). Анализ относительного уровня мРНК проводили с помощью метода $\Delta\text{-}\Delta$ Ct.

Для морфологических исследований мозг эмбрионов с черепом ($n = 8$) после промывки в холодном натрий-фосфатном буфере (PBS, pH 7.4) фиксировали в течение 5–6 ч (4°C) погружением в холодный раствор 4%-ного *para*-формальдегида, который растворяли в 0.02 М PBS. Далее промывали в холодном PBS и после криопротекции в 30%-ном растворе сахарозы, разведенной в 0.02 М PBS, замораживали с помощью среды Tissue-Tek (Sakura, Япония) в сухом льду. С помощью криостата (Leica Biosystems, Германия) из области головы с мозгом изготавливали чередующуюся серию фронтальных срезов (10 или 25 мкм), каждый 6-й срез монтировали на стекле Superfrost/plus, высушивали при комнатной температуре и хранили при –20°C. Для идентификации отделов мозга эмбрионов использованы схемы, описанные ранее [28].

Протокол одиночного иммуномечения с помощью биотин-стрептавидинового метода ранее подробно описан [29]. Для реакций были использованы первичные антитела мыши к орексину-A (R&Dsystems, США; 1 : 1000) или кролика к орексину-B (Sigma, США; 1 : 1000), или кролика к триптофангидроксилазе-2 (Millipore, США; 1 : 500); соответствующие вторичные антитела козы, конъюгированные с биотином (Vector Labs., Великобритания): против IgG кролика (1 : 400) или против IgG мыши (1 : 500), комплекса стрептавидина с пероксидазой хрена (Sigma, США). Визуализацию реакции проводили с помощью 0.05%-ного раствора 3,3'-диаминобензидина. Реакцию останавливали дистиллированной водой. После тщательной промывки и стандартной гистологической обработки срезы заключали под покровное стекло и высушивали.

Для двойного флуоресцентного иммуномечения был использован протокол, который ранее нами был подробно описан [30]. Перед блокировкой неспецифического связывания срезы 40 мин инкубировали в растворе 100 мМ глицина на PBS. Для исследования использовали смесь первичных антител мыши к орексину-A (R&Dsystems, США; 1 : 1000) с антителами кролика к тирозингидроксилазе (ТГ; Abscam, Великобритания; 1 : 500), или к D1-рецептору дофамина (Abscam, Велико-

британия; 1 : 200), или к 2С-подтипу рецептора серотонина (Elabscience Biotechnology Ltd., США; 1 : 200), или к ТПГ-2 (Millipore, США; 1 : 500). Также была использована смесь вторичных антител, конъюгированных с различными флуоресцентными метками: антитела цыпленка против IgG кролика с Alexa-488 и антитела ослика к IgG мыши с Alexa-568 (Invitrogen, США) в разведении 1 : 1000. После промывки в PBS срезы инкубировали в течение 2 мин с ядерным красителем DAPI (Sigma, США; 1 : 2000), промывали, заключали под покровное стекло с помощью среды Mowiol (Sigma, США) и хранили при 4°C до ее полимеризации. Специфичность иммуногистохимической реакции проверяли с помощью негативного контроля (реакции без первичных или вторичных антител).

Изображения структур на препаратах мозга с одиночным иммуномечением получали с помощью микроскопа Carl Zeiss Imager A1 (Carl Zeiss, Германия) со встроенной телевизионной камерой и программы Axio-Vision 4.8.

Анализ флуоресцентного изображения проводили с помощью микроскопа DMI6000 и лазерной сканирующей конфокальной установки TCS SP5-II (Leica Microsystems, Германия). Последовательное сканирование проводили с помощью иммерсионного объектива $\times 63$, лазеров с длиной волны возбуждения 488 и 568 нм. Флуоресценцию с DAPI анализировали с помощью микроскопа Carl Zeiss Axio Imager A1 с флуоресцентной установкой (NB-100), это было необходимо для того, чтобы оценить локализацию рецепторов в нейронах.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В мозге эмбрионов крысы структуры, иммунопозитивные к орексину-А и орексину-В, выявлены в зонах развивающихся обонятельных луковиц, орбито-фронтальной коры больших полушарий, гипоталамуса, гиппокампа. В гипоталамусе орексин-иммунопозитивные клетки и отростки выявлены в области дна и стенки 3-го желудочка, в латеральной от 3-го желудочка области (рис. 1А), соответствующей зоне латерального гипоталамуса (ЛГ) в развивающемся мозге [28]. Интересно отметить тот факт, что интенсивность реакции в нейронах развивающегося гипоталамуса была меньше, чем в орексин-иммунопозитивных клетках, которые выявляются в развивающемся гиппокампе. На препаратах, исследованных с помощью светового или конфокального микроскопа в области развивающегося ЛГ выявляются орексин-иммунопозитивные клетки диаметром 9–10 мкм с узким ореолом иммунопозитивного вещества, которое распределено по периферии перикариона; отчетливо выявляются отходящие от тела клетки отростки (рис. 1В, 2А, В).

Результаты ПЦР в реальном времени демонстрируют стабильную детекцию продукта мРНК OX2R в развивающемся гипоталамусе, в отличие от OX1R, продукт которых либо определялся на очень низком уровне, либо вообще не детектировался.

Результаты Вестерн-блоттинга подтверждают экспрессию белка D1-рецепторов дофамина в развивающемся гипоталамусе эмбрионов крысы (рис. 3А). Результаты двойного флуоресцентного иммуномечения демонстрируют локализацию ТГ-иммунопозитивных отростков вокруг тел орексин-иммунопозитивных клеток (рис. 2), а также иммуноэкспрессию D1-рецепторов дофамина непосредственно в телах орексин-иммунопозитивных клеток развивающегося гипоталамуса (рис. 4).

С помощью Вестерн-блоттинга мы подтвердили присутствие в гипоталамусе эмбрионов крысы белка ТПГ-2 (рис. 3В). Однако с помощью иммуногистохимических реакций в области, где выявлены тела орексин-иммунопозитивных клеток, нам не удалось отчетливо выявить иммунопозитивные к ТПГ-2 отростки несмотря на то, что реакции повторяли на срезах толщиной 25 мкм.

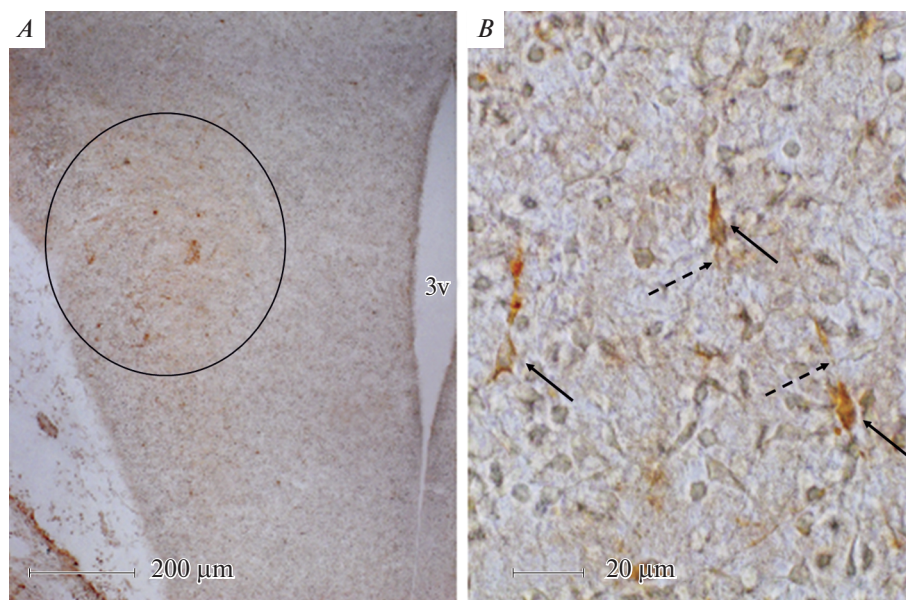


Рис. 1. Микрофотографии, демонстрирующие иммунопозитивные к орексину-А структуры на фронтальном срезе развивающегося (E18) мозга эмбриона крысы: при малом (A) и большом (B) увеличении. Круг (A) – область локализации иммунопозитивных клеток, которые представлены с помощью иммерсионного объектива $\times 100$ (B). Обозначения: 3v – третий желудочек мозга, сплошные стрелки – тела иммунопозитивных клеток, пунктирные стрелки – их отростки; масштаб 200 мкм (A) и 20 мкм (B).

Fig. 1. Microphotographs showing orexin-A immunopositive structures on the frontal section of the developing (E18) brain of the rat embryo: at small (A) and large (B) magnification. Circle (A) is the area of localization of immunopositive cells, which are represented using an immersion objective $\times 100$ (B). Designations: 3v – the third brain ventricle, solid arrows – the bodies of immunopositive cells, discontinuous arrows – their processes; scale of 200 μm (A) and 20 μm (B).

С помощью Вестерн-блоттинга в развивающемся гипоталамусе 18-дневных эмбрионов крысы было показано наличие белка 2С-подтипа рецепторов серотонина, однако положительный результат был получен только при загрузке в гель большого количества белка (рис. 3С). Анализ двойного флуоресцентного иммуномечения демонстрирует иммуноэкспрессию 2С подтипа рецепторов серотонина непосредственно в телах орексин-иммунопозитивных нейронов в развивающемся гипоталамусе (рис. 5).

Таким образом, полученные нами данные демонстрируют присутствие в развивающемся гипоталамусе крысы ферментов биосинтеза дофамина и серотонина, а также и их рецепторов Д1 и 2С, что свидетельствуют о возможности влияния дофаминовой и серотониновой систем на орексинергические нейроны уже в эмбриональном периоде развития крысы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В мозге эмбрионов крысы мРНК препро-орексина – предшественника орексина-А и -В выявляется с 12-го дня развития [20]. При этом орексин-иммунопозитивные клетки в мозге также выявляются с 12-го дня эмбриогенеза, а к 19-му дню распределение тел нейронов и их проекций соответствует таковым у взрослых

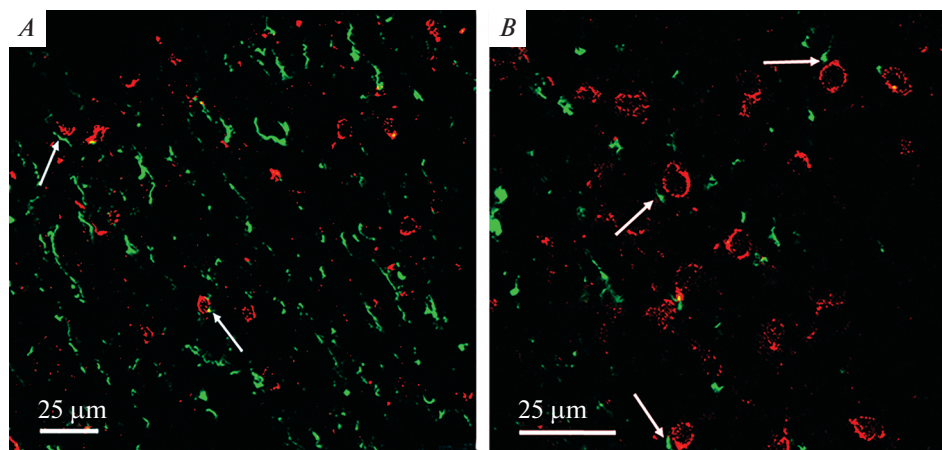


Рис. 2. Двойная иммуногистохимическая реакция к тирозингидроксилазе (зеленый) и орексину-А (красный) в развивающейся зоне латерального гипоталамуса 18-дневного эмбриона крысы, конфокальный микроскоп. Стрелки указывают на тирозингидроксилаза-иммунопозитивные отростки, локализованные вблизи тел орексин-иммунопозитивных клеток при малом (А) и большем (В) увеличении, масштаб 25 мкм.

Fig. 2. Double immunohistochemical reaction to tyrosine hydroxylase (green) and orexin-A (red) in the developing zone of the lateral hypothalamus of the 18-day-old rat embryo, confocal microscope. Arrows indicate tyrosine hydroxylase-immunopositive processes located near the bodies of orexin-immunopositive cells with a small (A) and a larger (B) magnification, scale bars 25 µm.

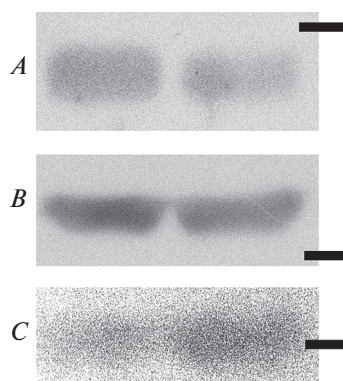


Рис. 3. Результаты Вестерн-блоттинга демонстрируют экспрессию белка D1-рецептора дофамина (А), триптофангидроксилазы-2 (В) и серотонинового рецептора 2С-подтипа (С) в гипоталамусе 18-ти дневных эмбрионов крысы. Полоса справа – уровень локализации белкового маркера 52 кД.

Fig. 3. The results of Western-blotting demonstrate the expression of dopamine receptor protein D1 (A), tryptophan hydroxylase-2 (B) and serotonin subtype 2C receptor (C) in the hypothalamus of 18-day-old rat embryos. The bar on the right – the level of localization of the protein marker 52 kD.

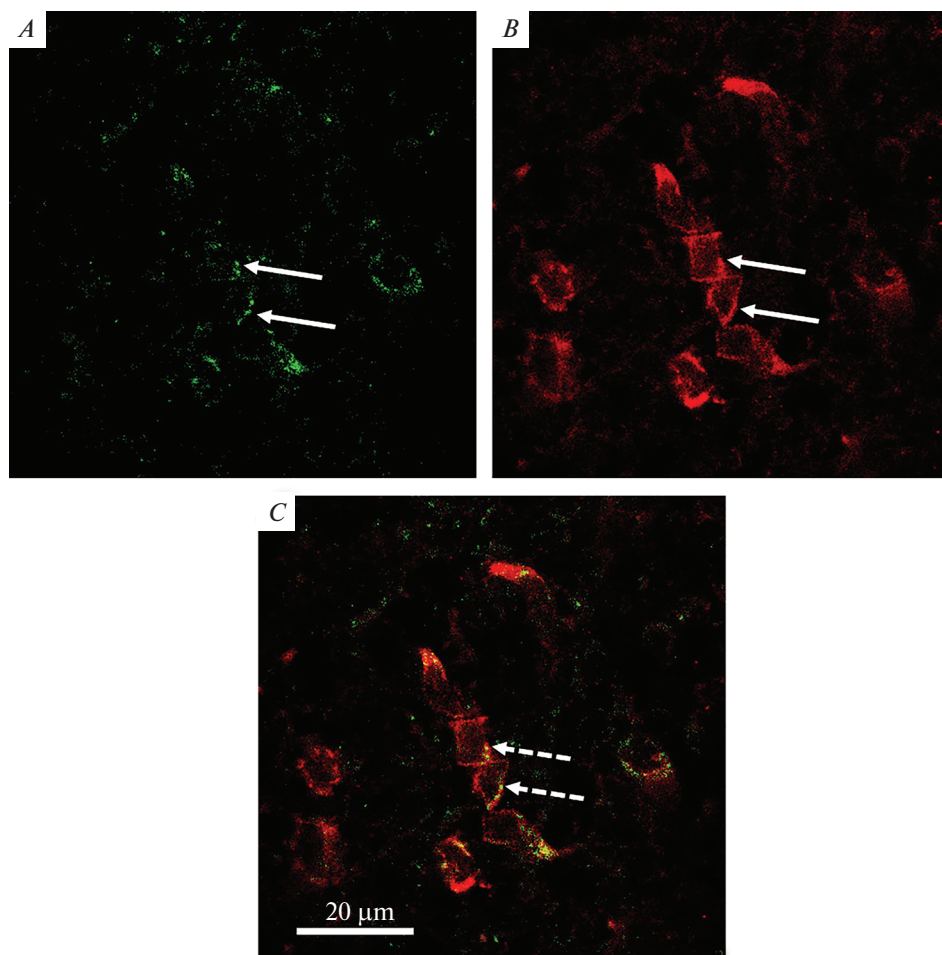


Рис. 4. Флуоресцентное иммуномечение Д1-рецепторов дофамина (*A*, *зеленый*), орексина-А (*B*, *красный*) и их наложение (*C*) в развивающейся зоне латерального гипоталамуса 18-дневного эмбриона крысы, конфокальный микроскоп. Сплошные стрелки – Д1- и орексин-иммунопозитивные структуры (*A*, *B*), прерывистые стрелки – Д1-рецепторы, локализованные в телах орексин-иммунопозитивных нейронов, масштаб 20 мкм.

Fig. 4. Fluorescence immunolabeling of dopamine D- receptors (*A*, *green*), orexin-A (*B*, *red*) and their merge (*C*) in the d-eveloping zone of the lateral hypothalamus of the 18-day-old rat embryo, confocal microscope. Solid arrows – D1- and orexin-immunopositive structures (*A*, *B*), discontinuous arrows – D1 receptors localized in the bodies of orexin-immunopositive neurons, scale bars 20 μm .

организмов [19–22]. Наши результаты подтверждают полученные ранее данные [20] о присутствии орексин-иммунопозитивных клеток в развивающемся гипоталамусе на стадии E18, которые, судя по их морфологии (небольшой размер, малое количество иммунопозитивного материала, небольшое количество иммунопозитивного материала в отростках), еще не являются зрелыми, интенсивно функционирующими нейронами. Однако экспрессия генов орексиновых рецепторов в эмбриональном периоде свидетельствует о возможности функциональной активности орексинов,

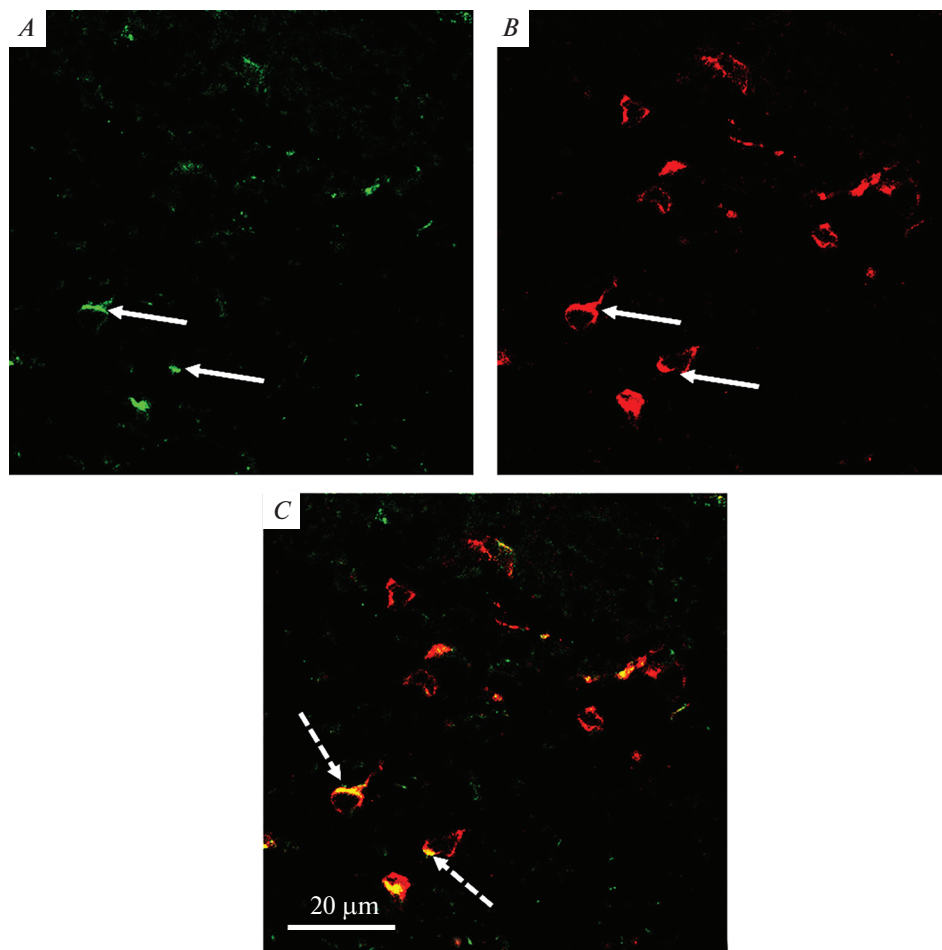


Рис. 5. Флуоресцентное иммуномечение 2С-подтипа рецептора серотонина (*A*, *зеленый*) и орексина-А (*B*, *красный*) и их совмещение (*C*) в области развивающегося латерального гипоталамуса 18-дневного эмбриона крысы, конфокальный микроскоп. Сплошные стрелки – 2С- и орексин-иммунопозитивные структуры (*A*, *B*), прерывистые стрелки – локализация 2С-рецепторов в телах орексин-иммунопозитивных нейронов, масштаб 20 мкм.

Fig. 5. Fluorescence immunolabeling of the 2C-subtype of the serotonin receptor (*A*, *green*) and orexin-A (*B*, *red*) and their merge (*C*) in the region of the developing lateral hypothalamus of the 18-day-old rat embryo, confocal microscope. Solid arrows – 2C and orexin-immunopositive structures (*A*, *B*), intermittent arrows – localization of 2C receptors in the bodies of orexin-immunopositive neurons, scale bars 20 μm .

по-видимому, через OX2R, который не является специфичным для орексина-А или -В: максимальное количество мРНК OX2R в эмбриогенезе выявлено в развивающемся гипоталамусе и коре больших полушарий на 18-й день эмбриогенеза, а стабильный уровень мРНК OX1R выявляется в гипоталамусе и мозжечке после рождения (P0–1) [19], что также подтверждается и полученными нами результатами.

В ходе эмбрионального развития крысы дифференцировка дофаминергических нейронов в гипоталамусе происходит в период E12–E16 [7], а в среднем мозге –

начиная с E13 [31]. Полученные нами данные демонстрируют наличие большого числа ТГ-иммунопозитивных отростков в гипоталамусе эмбрионов E18, а также их локализацию вокруг развивающихся орексин-иммунопозитивных нейронов. Экспрессия же белка активирующих D1-рецепторов дофамина в гипоталамусе и непосредственно в орексин-иммунопозитивных клетках свидетельствует о возможности прямого влияния дофамина на орексинергические клетки гипоталамуса уже в эмбриональном периоде развития организма.

Экспрессия генов дофаминовых рецепторов (D1 и D2) в развивающемся мозге крысы ранее показана с помощью ПЦР в реальном времени и гибридизации *in situ* уже у 14-дневных в медиальной префронтальной коре и в стриатуме [32]. В более раннем исследовании с помощью гибридизации *in situ*, проведенной с помощью автордиографии, мРНК D1- и D2-рецепторов выявлена в гипоталамусе 18-дневных эмбрионов, ее уровень возрастал к 21-му дню и в раннем постнатальном периоде [33]. Полученные ранее данные демонстрируют в гипоталамусе 20-дневных эмбрионов крысы достаточно высокий уровень белка D1-рецепторов дофамина [26].

Серотонинергическая иннервация гипоталамуса обеспечивается отростками нейронов ядер шва, которые у мыши и крысы начинают дифференцироваться с E12 [7] и к E16–18 отдельные отростки выявляются в гипоталамусе [23]. Полученные нами данные подтверждают присутствие белка ТПГ-2 в гипоталамусе эмбрионов E18, однако выявить отростки с этим ферментом в области локализации орексин-иммунопозитивных клеток нам не удалось, по-видимому, в связи с тем, что отростки очень тонкие и их количество в гипоталамусе еще очень мало. Наши данные подтверждают присутствие в ткани гипоталамуса очень малого количества белка активирующих рецепторов серотонина 2C подтипа и иммуноэкспрессию этого белка непосредственно в орексин-иммунопозитивных клетках, что свидетельствует о возможности прямого влияния серотонина на орексин-иммунопозитивные клетки уже в эмбриональном периоде развития.

В мозге эмбрионов крысы с помощью ОТ-ПЦР экспрессия генов различных подтипов рецепторов серотонина выявляется довольно рано, в частности, 2A – в период E11, 2B – с E9 [34]. Экспрессия гена рецептора серотонина 2C-подтипа, функциональное значение которых связывают прежде всего с регуляцией энергетического баланса [35], выявляется в период E9–E13, но к E17 уровень ее мРНК значительно снижался [34].

Важно отметить, что в эмбриональном мозге дофамин и серотонин функционируют как гормоны и могут осуществлять свое действие не только после развития иннервации, а непосредственно через ликвор желудочков мозга, а также через кровь, поступая от периферических тканей в условиях отсутствия гемато-энцефалического барьера [36], воздействуя на соответствующие рецепторы, что свидетельствует о полифункциональных свойствах этих моноаминов в развивающемся мозге.

Полученные нами данные впервые демонстрируют, что становление морфофункциональных взаимодействий дофамин- и серотонинергических систем мозга с орексинергическими нейронами гипоталамуса происходит уже в ходе пренатального развития в период, когда гипоталамус является особенно чувствительным к различного рода воздействиям [37]. Экспрессия в гипоталамусе эмбрионов и непосредственно в орексинергических нейронах D1- и 2C-подтипов рецепторов свидетельствует о возможности активирующего влияния дофамина и серотонина на них, что может оказывать существенное влияние на развитие орексинергических нейронов гипоталамуса при различного рода воздействиях, в частности, при пренатальном стрессе [29].

Исследование проведено с использованием оборудования ЦКП ИЭФБ РАН.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sakurai T., Amemiya A., Ishii M., Matsuzaki I., Chemelli R.M., Tanaka H., Williams S.C., Richardson J.A., Kozlowski G.P., Wilson S., Arch J.R., Buckingham R.E., Haynes A.C., Carr S.A., Annan R.S., McNulty D.E., Liu W.S., Terrett J.A., Elshourbagy N.A., Bergsma D.J., Yanagisawa M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*. 92(4): 573–585. 1998.
2. 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., 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.
3. Lin L., Faraco J., Li R., Kadoyani H., Rogers W., Lin X., Qiu X., de Jong P.J., Nishino S., Mignot E.S. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell*. 98(3): 365–376. 1999.
4. Chemelli R.M., Willie J.T., Sinton C.M., Elmquist J.K., Scammell T., Lee C., Richardson J.A., Williams S.C., Xiong Y., Kisanuki Y., Fitch T.E., Nakazato M., Hammer R.E., Saper C.B., Yanagisawa M. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell*. 98(4): 437–451. 1999.
5. Ohno K., Sakurai T. Orexin neuronal circuitry: Role in the regulation of sleep and wakefulness. *Front. Neuroendocrinol.* 29(1): 70–87. 2008.
6. Kukkonen J.P., Leonard C.S. Orexin/hypocretin receptor signalling cascades. *British J. Pharmacol.* 171: 314–331. 2014.
7. Угрюмов М.В. Механизмы нейроэндокринной регуляции. М. Наука. 82–122. 1999. [Ugrymov M.V. Mechanisms of neuroendocrine regulation M. Nauka. 82–122. 1999. (In Russ)].
8. Björklund A., Lindvall O. Dopamine-containing systems in the CNS. Handbook of chemical neuroanatomy: Classical neurotransmitters in the CNS. Amsterdam. Elsevier. Pt. 1. 2: 55–122. 1984.
9. Moore K.E., Lookingland K.J. Dopaminergic neuronal systems in the hypothalamus. In: Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress. 2000. www.acnp.org.
10. Steinbusch H.W.M., Nieuwenhuys R. Localization of serotonin-like immunoreactivity in the central nervous system and pituitary of the rat with special reference to the innervations of the hypothalamus. Serotonin: Current aspects of neurochemistry and function. 7–35. 1981.
11. Peyron C., Faraco J., Rogers W., Ripley B., Overeem S., Charnay Y., Nevsimalova S., Aldrich M., Reynolds D., Albin R., Li R., Hungs M., Pedrazzoli M., Padigaru M., Kucherlapati M., Fan J., Maki R., Lammers G.J., Bouras C., Kucherlapati R., Nishino S., Mignot E. A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nature Med.* 6(9): 991–997. 2000.
12. Marcus J.N., Aschkenasi C.J., Lee C.E., Chemelli R.M., Saper C.B., Yanagisawa M., Elmquist J.K. Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 435(1): 6–25. 2001.
13. Sakurai T. Roles of orexin/hypocretin in regulation of sleep/wakefulness and energy homeostasis. *Sleep Med. Rev.* 9: 231–241. 2005.
14. Morina I.Yu., Mikhrina A.L., Romanova I.V. An Immunohistochemical study of the pathways of the influence of dopamine on orexinergic neurons in the perifornical area of the hypothalamus. *Neurosci. Behav. Physiol.* 49 (9): 1100–1111. 2019.
15. Li Y., Gao X.-B., Sakurai T., van den Pol A.N. Hypocretin/orexin excites hypocretin neurons via a local glutamate neuron — a potential mechanism for orchestrating the hypothalamic arousal system neuron. *Neuron*. 36(6): 1169–1181. 2002.
16. Muraki Y., Yamanaka A., Tsujino N., Kilduff T.S., Goto K., Sakurai T. Serotonergic Regulation of the Orexin/Hypocretin Neurons through the 5-HT1A Receptor. *Neuroscience*. 24 (32): 7159–7166. 2004.
17. Jalewa J., Joshi A., McGinnity T.M., Prasad G., Wong-Lin K., Hölscher C. Neural circuit interactions between the dorsal raphe nucleus and the lateral hypothalamus: an experimental and computational study. *PLoS One*. 9(2): e88003. 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088003>
18. Романова И.В., Морина И.Ю., Шпаков А.О. Локализация 5-НТ2С- и 5-НТ1В-серотониновых рецепторов в орексинергических нейронах перифорникальной области гипоталамуса грызунов. *Журн. эвол. биохим. физиол.* 56 (2): 63–69. 2020. [Romanova I.V., Morina I.Yu., Shpakov A.O. Lokalizaciya 5-HT2C- i 5-HT1B-serotoninovyh receptorov v orek-

- sinergicheskikh neyronah perifornikal'noj oblasti gipotalamusa gryzunov. Zhurn. Evol. Biohim. Fiziol. 56 (2): 63–69. 2020. (In Russ)].
19. *van den Pol A.N., Patrylo P.R., Ghosh P.K., Gao X.-B.* Lateral hypothalamus: Early developmental expression and response to hypocretin (orexin). *Compar. Neurol.* 433(3): 349–363. 2001.
 20. *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. Neuroana.* 27(3): 165–181. 2004.
 21. *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. *J. Neurosci.* 22(2): 531–534. 2005.
 22. *Ogawa Y., Kanda T., Vogt K., Yanagisawa M.* Anatomical and electrophysiological development of the hypothalamic orexin neurons from embryos to neonates. *Comp. Neurol.* 525: 3809–3820. 2017.
 23. *Deneris E., Gaspar P.* Serotonin neuron development: shaping molecular and structural identities. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 7(1): <https://doi.org/10.1002/wdev.301>. 2018
 24. *Mandl A.M.* The phases of the estrous cycle in the adult white rat. *J. Exp. Biol.* 28: 576–584. 1951.
 25. *Marcondes F. K., Bianchi F.J., Tanno A.P.* Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biology.* 62(4A): 609–614. 2002.
 26. *Romanova I.V., Mikhrina A.L., Chernysheva M.P.* Analysis of development of morphofunctional interconnections between CART- and AGRPergic neurons with dopaminergic structures in ontogenesis of mammals. *Evol. Biochem. Physiol.* 50(5): 448–455. 2014.
 27. *Морина И.Ю., Михайлова Е.В., Романова И.В., Деркач К.В., Шпаков А.О.* Орексин-А и его рецепторы в гипоталамусе мышей с диета-индуцированным и меланокортиновым ожирением. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 105 (4): 481–491. 2019. [*Morina I. Yu., Mikhailova E.V., Romanova I.V., Derkach K.V., Shpakov A.O.* Orexin-A and their receptors in the hypothalamus of mice with the diet-induced and melanocortin obesity. *Russ. J. Physiol.* 105 (4): 481–491. 2019. (In Russ)].
 28. *Coggeshall R.E. A.* Study of diencephalic development in the albino rat. *J. Comp. Neurol.* 122(2): 241–299. 1964.
 29. *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. 2019. [*Morina I. Yu., Stankova E.P., Romanova I.V.* The influence of prenatal stress on the development of rat hypothalamic orexinergic system. *Russ. J. Physiol.* 105(5): 591–607. 2019. (In Russ)].
 30. *Romanova I.V., Derkach K.V., Mikhrina A.L., Sukhov I.B., Mikhailova E.V., Shpakov A.O.* The leptin, dopamine and serotonin receptors in hypothalamic POMC-neurons in normal and obese rodents. *Neurochem. Res.* 43(4): 821–837. 2018.
 31. *Brischoux F., Griffond B., Fellmann D., Risold P.Y.* Early and transient ontogenetic expression of the cocaine- and amphetamine- regulated transcript peptide in the rat mesencephalon: correlation with tyrosine hydroxylase expression. *Neurobiology.* 52(3): 221–229. 2002.
 32. *Sullivan S.E., Konradi C.* Expression and function of dopamine receptors in the developing medial frontal cortex and striatum of the rat. *Neuroscience.* 199: 501–514. 2011.
 33. *Schambra G.E., Duncan G.R., Breese M.G., Fornaretto M.G., Caron R.T., Fremeau Jr.* Ontogeny of D1a and D2 dopamine receptor subtypes in rat brain using in situ hybridization and receptor binding. *Neuroscience.* 62(1): 65–85. 1994.
 34. *Wu C., Dias P., Kumar S., Lauder J.M., Singh S.* Differential expression of serotonin 5-HT2 receptors during rat embryogenesis. *Dev. Neurosci.* 21(1): 22–28. 1999.
 35. *Martin-Gronert M.S., Stocker C.J., Wargent E.T., Cripps R.L., Garfield A.S., Jovanovic Z., D'Agostino G., Yeo G.S., Cawthorne M.A., Arch J.R., Heisler L.K., Ozanne S.E.* 5-HT2A and 5-HT2C receptors as hypothalamic targets of developmental programming in male rats. *Disease Models & Mechanisms.* 9(4): 401–412. 2016.
 36. *Ugrumov M.V.* Endocrine functions of brain in adult and developing mammals. *Russ. J. Development. Biol.* 40 (1): 14–22. 2009. <https://doi.org/10.1134/S1062360409010020>
 37. *Отеллин В.А., Хожжай 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., Hozhaj L.I., Ordyan N.E.* Prenatal stress and the developing brain. Adaptive mechanisms, immediate and delayed effects. SPb. Izdatel'stvo Desyatka. 2007. (In Russ)].

Investigation of Monoamines Influence on Orexinergic Hypothalamic Neurons of Rat Embryons**I. Yu. Morina^a, E. V. Mikhailova^a, and I. V. Romanova^{a, *}**^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia***e-mail: irinaromanova@mail.ru*

Hypothalamic orexinergic neurons are involved in control of various body functions, especially energy balance, feeding behavior, wakefulness and awakening. The direct dopamine and brain serotonin effect on hypothalamic orexinergic neurons is carried out through various subtypes of the corresponding receptors, the expression of which was previously shown in the orexinergic neurons bodies. To clarify the possibility of these relationships existence in the embryonic developmental period, a study of the 18-day-old rat embryos (E18) hypothalamus was made. Expression of dopamine D1 and serotonin 2C receptor proteins was shown in hypothalamus with Western blotting. Double fluorescence immunolabeling and confocal microscopy confirm the expression of dopamine D1 and serotonin 2C receptors in developing orexin-immunopositive cell bodies in rat embryos. Obtained results suggest that the development of monoaminergic systems morphofunctional interactions with orexinergic occurs in the embryonic period of body development.

Keywords: orexins, hypothalamus, dopamine, serotonin, dopamine D1 receptors, serotonin 2C receptors, orexin receptors, embryogenesis, E18

ЦИТИРОВАТЬ:

Морина И.Ю., Михайлова Е.В., Романова И.В. Исследование влияния моноаминов на орексинергические нейроны гипоталамуса эмбрионов крысы. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(6): 728—739.

DOI: 10.31857/S0869813920060072

TO CITE THIS ARTICLE:

Morina I.Yu., Mikhailova E.V., Romanova I.V. Investigation of Monoamines Influence on Orexinergic Hypothalamic Neurons of Rat Embryons. Russian Journal of Physiology. 106(6): 728—739.

DOI: 10.31857/S0869813920060072