

КАТЕХОЛАМИНЕРГИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ СУБФОРНИКАЛЬНОГО ОРГАНА КРЫСЫ

© 2022 г. В. А. Разенкова¹, *, Д. Э. Коржевский¹

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376 Россия

*E-mail: valeriya.raz@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.03.2022 г.

После доработки 20.04.2022 г.

Принята к публикации 20.04.2022 г.

В связи с высокой актуальностью изучения субфорникального органа, его тканевых компонентов и медиаторных систем, целью настоящей работы являлось исследование морфологических особенностей катехоламинергической иннервации данной области. С применением методов иммуногистохимии и конфокальной микроскопии были изучены препараты субфорникального органа крыс на сроках: 14-е, 30-е сут постнатального развития и в возрасте 4–6 мес. Определено главное направление врастания катехоламинергических волокон в субфорникальный орган на ранних сроках. Установлено, что отростки катехоламинергических клеток контактируют с клетками, покрывающими субфорникальный орган, и могут проходить сквозь эпендимный пласт, что позволяет им напрямую контактировать с цереброспинальной жидкостью, и, предположительно, влиять на ее состав. Выявлено, что часть волокон идет параллельно базальным отросткам специализированных эпендимных клеток – таницитов, что позволяет предположить их возможное функционирование в роли скэффолда для развивающейся в процессе онтогенеза катехоламинергической иннервации. В работе впервые получено свидетельство существования в субфорникальном органе собственных катехоламинергических нейронов.

Ключевые слова: тирозингидроксилаза, головной мозг, субфорникальный орган, развитие, иммуногистохимия

DOI: 10.31857/S004137712204006X

Субфорникальный орган (СФО) представляет собой небольшой, полушаровидной или овальной формы бугорок, вдающийся в просвет третьего желудочка на уровне Монроева (или межжелудочкового) отверстия (Dellmann, Simpson, 1979). В первую очередь эта область мозга примечательна тем, что относится к циркумвентрикулярным органам нервной системы. Такие органы не отделены от периферического кровообращения гематоэнцефалическим барьером (ГЭБ) из-за наличия в их сосудистой сети фенестрированных капилляров и, таким образом, составляющие их ткани и клетки оказываются чувствительны к изменениям состава крови (McKinley et al., 2003). Путем обработки поступающих гуморальных сигналов клетки СФО обеспечивают регуляцию энергетического и водно-солевого баланса организма (Pulman et al., 2006; Zimmerman et al., 2016, 2019). В основном, исследования СФО сосредоточены на изучении обеспечения физиологических функций органа, связанных с водно-солевым балансом, и, наряду с этим, исследованию влияния гуморальных

факторов крови на клеточные популяции СФО (Hicks et al., 2021). Таким образом, организация отдельных популяций нейронов СФО, их взаимодействие друг с другом, а также с глиальными и васкулярными элементами остаются малоизученными.

Катехоламинергическая система головного мозга представлена дофаминергическими, адренергическими и норадренергическими нейронами и их терминалями, определенным образом пространственно организованными в нервной системе. Традиционно считается, что катехоламинергическая иннервация СФО обеспечивается с помощью отростков дофамин- и норадреналинергических нейронов ядер гипоталамуса (группы A11–A14) (Tanaka, Seto, 1988; Rosas-Arellano et al., 1996), и ядра одиночного пути продолговатого мозга (группа A2) (Tanaka et al., 1997), однако, в связи с недостаточной изученностью как общего строения СФО, так и его структурных единиц, их пространственных и биохимических взаимоотношений, нельзя с уверенностью утверждать, что эта медиаторная система в данной области охарактеризована во всей своей полноте. Как предполагают, основная функция катехоламинов в СФО заключается в поддержании водно-солевого баланса и контроле пищевого поведения: так, вы-

Принятые сокращения: ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; СФО – субфорникальный орган; ТГ – тирозингидроксилаза; ЦСЖ – цереброспинальная жидкость.

брос норадреналина происходит в ответ на ангиотензин-зависимую активацию нейронов (Tsukashima et al., 1996; Takahashi, Tanaka, 2017), а дофамин, через постсинаптический D4 рецептор, ингибирует активность нейронов в чувствительных к ангиотензину II (Miyahara et al., 2012), что является причиной подавления ангиотензин-зависимого потребления воды. К сожалению, несмотря на то, что присутствие катехоламинов в СФО не подвергают сомнению, значение и пространственная организация этих структур остаются неясными.

В связи с высокой актуальностью изучения СФО и исследования взаимодействий его тканевых компонентов, целью настоящей работы стало исследование катехоламинергической иннервации СФО с применением методов иммуногистохимии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В качестве материала для исследования использовали фронтальные срезы, проходящие через область локализации СФО, головного мозга крыс-самцов породы Вистар, полученные на разных сроках постнатального онтогенеза: 14-е (P14), 30-е (P30) постнатальные сутки и половозрелые (4–6 мес.) животные ($n = 4$ для каждого срока). При содержании и умерщвлении животных соблюдали основные принципы Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986 г.) и “Правила надлежащей лабораторной практики” (приказ № 199н от 01.04.2016 г. Минздрава России). Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ ИЭМ (заключение № 1/22 от 18.02.2022). Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде (Korzhevskii et al., 2015) и заливали в парафин по общепринятой методике. Срезы толщиной 5 мкм наклеивали на предметные стекла с адгезивным покрытием “Superfrost Ultra Plus” (Menzel Gläser, Германия). После депарафинирования и регидратации препаратов проводили ингибирование эндогенной пероксидазы путем обработки срезов 3%-ным водным раствором перекиси водорода в течение 10 мин. Для выявления катехоламинергических структур использовали кроличьи поликлональные антитела к тирозингидроксилазе (ab112, Abcam, Великобритания) в разведении 1 : 1000. В качестве вторичных реагентов использовали козы антитела против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена из набора Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Kit (ab236466, Abcam, Великобритания). Для визуализации продукта реакции использовали хромоген 3’3-диаминобензидин из набора DAB+ (Agilent, США). Часть срезов подкрашивали квасцовым гематоксилином. Полученные препараты анализировали с использованием микроскопа Leica DM750 (Германия) и фотографировали с помощью фотокамеры ICC50 (Leica, Германия).

Для постановки двойной иммунофлуоресцентной реакции использовали кроличьи поликлональные антитела к тирозингидроксилазе (ab112, Abcam, Великобритания) в разведении 1 : 500 и мышинные моноклональные антитела к виментину (клон V9, M0725, Agilent, США) в разведении 1 : 100. В качестве вторичных реагентов применяли меченный биотином-SP Fab-фрагмент иммуноглобулина осла против иммуноглобулинов мыши (715-067-003, Jackson ImmunoResearch, США) и козы антитела против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена из набора Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Kit (ab236466, Abcam, Великобритания). После инкубации во вторичных антителах срезы обрабатывали конъюгатом стрептавидина с флуорохромом Cy5 (Jackson ImmunoResearch, США; разведение 1 : 100), а также раствором козьих антител против пероксидазы хрена, конъюгированных с флуорохромом Cy3 (Jackson ImmunoResearch, США; разведение 1 : 100). Подкраску ядер осуществляли с использованием ДНК-связывающего красителя SYTOX Green в разведении 1 : 100 (Invitrogen, США). Полученные препараты исследовали при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа Zeiss LSM 800 (Zeiss, Германия). Использовали объективы Plan-Apochromat 20×/0.8 M27 и Plan-Apochromat 63×/1.40 Oil DICM27 (масляная иммерсия). Для возбуждения флуоресценции SYTOX Green применяли лазер с длиной волны 488 нм, для Cy3 – 561 нм, Cy5 – 640 нм. Анализ полученных изображений проводили при помощи компьютерной программы Zen-2012 (Zeiss, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Чтобы проследить становление катехоламинергической иннервации СФО, было предпринято сравнительно-морфологическое исследование срезов головного мозга крыс на разных сроках постнатального онтогенеза. На 14-е постнатальные сутки ТГ-позитивные волокна наблюдали в основном в латеральных зонах органа. Такие горизонтально расположенные волокна с варикозными утолщениями формируют пучки на краях субфорникального органа и выходят за его пределы в контакте с выстилкой эпендимного слоя (рис. 1а). Отдельные отростки катехоламинергических клеток контактируют и с клетками, покрывающими субфорникальный орган. Немногочисленные тонкие редковетвящиеся волокна располагаются в центральной зоне. Реакцию на ТГ отмечали также вблизи эндотелия капилляров и септалных вен. Также отростки катехоламинергических нейронов присутствуют в ближайшем сосудистом сплетении (рис. 2в).

Интенсивную реакцию на ТГ в латеральных зонах субфорникального органа в связи с расположением в этой области плотного скопления отростков катехоламинергических нейронов в настоящем исследовании отмечали и к концу 1-го мес. постна-

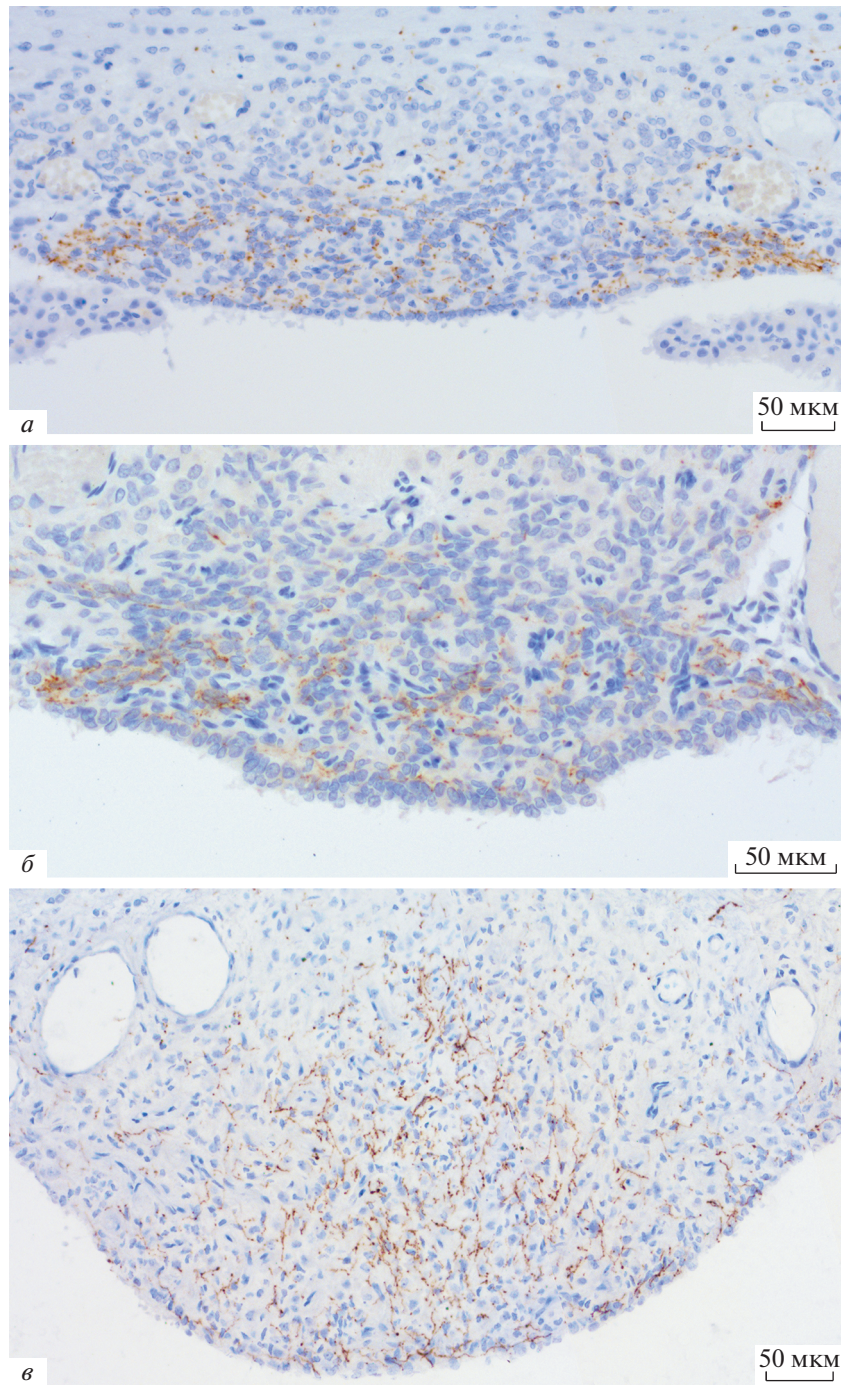


Рис. 1. Распределение катехоламинергических волокон в СФО на разных этапах постнатального развития. *a* – 14-е постнатальные сутки, *б* – 30-е постнатальные сутки, *в* – взрослое животное. Иммуногистохимическая реакция на ТГ с подкраской квасцовым гематоксилином. Объектив Plan-Apochromat 20×/0.45. Масштабные отрезки – 50 мкм.

тального развития. Однако на этом сроке различия в распределении катехоламинергических структур между центральной и латеральной зонами выражены не так ярко, как на 14-е постнатальные сутки (рис. 1*б*). На исследуемом сроке в центральной зоне наблюдали интенсивно ветвящиеся яркоокрашенные волокна с многочисленными четкообразными

утолщениями. Заметно, что часть волокон находится в субэпидимной зоне (рис. 2*а*). В каудальной же части органа отростки сконцентрированы вблизи выстилки желудка. Отдельно следует отметить ТГ-иммунопозитивные волокна, которые проходят сквозь выстилку желудка и напрямую контактируют с цереброспинальной жидкостью (ЦСЖ).

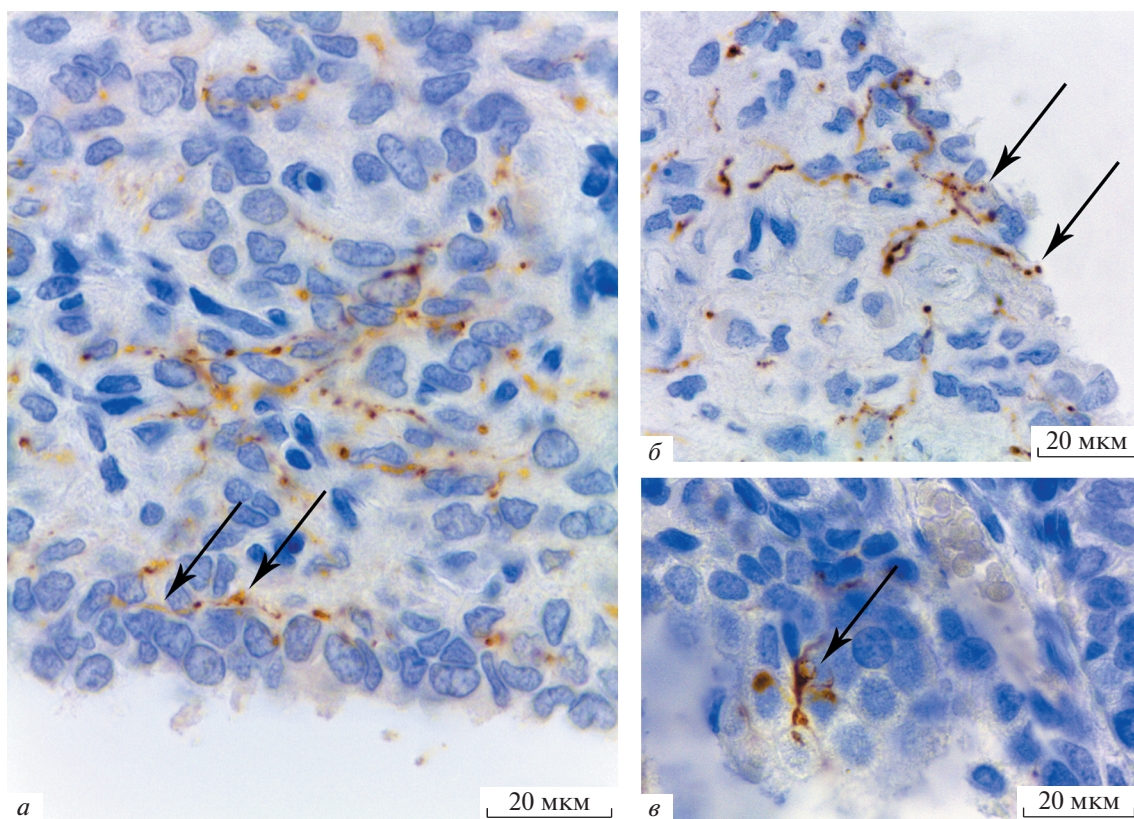


Рис. 2. Особенности локализации ТГ-положительных волокон в СФО. *а* – 30-е постнатальные сутки, стрелки указывают на субэпендимные волокна, *б* – взрослое животное, стрелки указывают на волокна в контакте с цереброспинальной жидкостью, *в* – ТГ-положительная реакция в сосудистом сплетении. Стрелка указывает на катехоламинергические волокна. Иммуногистохимическая реакция на тирозингидроксилазу с подкраской квасцовым гематоксилином. Объектив Plan-Apochromat 100×/1.25 Oil (масляная иммерсия). Масштабные отрезки – 20 мкм.

У половозрелых животных плотность распределения катехоламинергических волокон в центральной зоне субфорникального органа сравнима с таковой в латеральной зоне. Возрастает плотность распределения ТГ-положительных волокон центральной зоны, отростки активно ветвятся (рис. 1*в*). Значительная часть отростков занимает субэпендимное положение. Как и на Р30, отдельные катехоламинергические волокна у взрослых животных находятся в прямом контакте с ЦСЖ (рис. 2*б*). В составе септальных вен отмечены ТГ-иммунопозитивные периваскулярные клетки (рис. 3*а*). Двигаясь ростральнее, можно заметить, что интенсивность реакции на ТГ снижается, и в этой области наблюдается малое количество катехоламинергических волокон. Однако здесь отмечали наличие слабоокрашенных ТГ-положительных клеток (рис. 3*б*).

С целью изучить пространственную организацию катехоламинергических волокон в СФО была поставлена двойная иммунофлуоресцентная реакция на виментин и тирозингидроксилазу. В результате иммуногистохимической реакции четко выявляются ТГ-положительные волокна и виментин-положительные эпендимоциты и танициты, и их удлинен-

ные отростки (рис. 4). Эти отростки прослеживаются на большом расстоянии и проходят через весь СФО. Часть отростков оканчивается на кровеносных сосудах внутри СФО. ТГ-положительные волокна направляются параллельно отросткам эпендимоцитов и таницитов и часто идут совместно с ними (см. рис. 4*б*, *з*).

ОБСУЖДЕНИЕ

Для того чтобы проследить становление катехоламинергической иннервации и, возможно, установить ее источники, были проанализированы препараты СФО крыс на разных сроках постнатального онтогенеза. Как считается, у крыс формирование СФО продолжается от 17-х сут эмбрионального развития до 5-х постнатальных суток. Предполагается, что к 5-м постнатальным суткам все клеточные элементы СФО уже дифференцированы, и дальнейшие структурные изменения носят преимущественно количественный характер (Dellmann, Stahl, 1984). Тем не менее, наши результаты показывают, что на 14-е постнатальные сутки наблюдается довольно скудное обогащение СФО катехоламинергическими волокнами

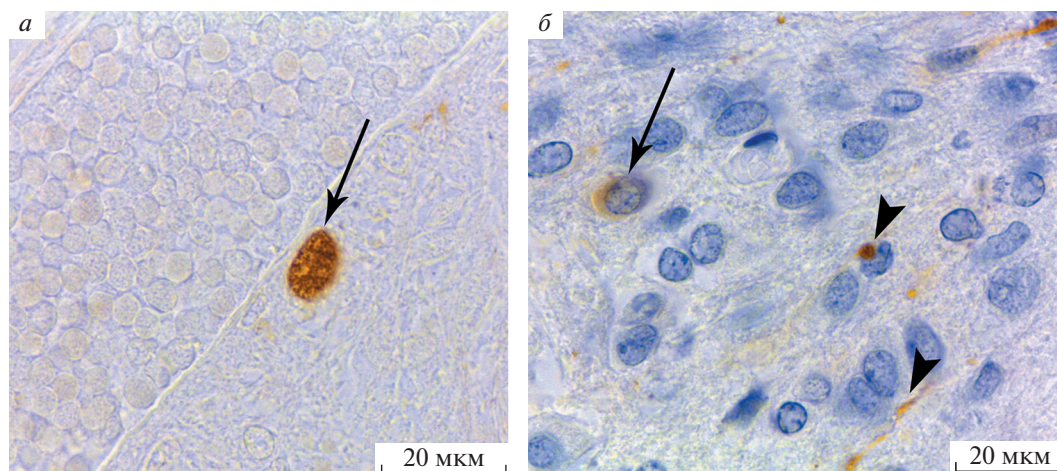


Рис. 3. Клетки в составе СФО, содержащие тирозингидроксилазу. Стрелки указывают на ТГ-положительные клетки, *головка стрелки* — катехоламинергические волокна. *а* — Периваскулярная клетка рядом с септальной веной. Иммуногистохимическая реакция на тирозингидроксилазу. *б* — ТГ-положительная клетка СФО. Иммуногистохимическая реакция на тирозингидроксилазу с подкраской квасцовым гематоксилином. Объектив Plan-Apochromat 100×/1.25 Oil (масляная иммерсия). Масштабные отрезки — 20 мкм.

за исключением латеральной зоны органа, по сравнению с одномесячными и половозрелыми животными. В качестве путей вставания волокон катехоламинергических нейронов на ранних сроках можно предположить три: идущие через свод мозга, белое вещество спайки свода или вдоль кровеносных сосудов. Сообщалось, что на активность нейронов СФО влияют норадренергические волокна, исходящие из ядра одиночного пути (NTS) (Tanaka et al., 1997). Эти волокна идут в составе медиального переднемозгового пучка (Kawai, 2018), в составе которого, как известно, проходят и дофаминергические волокна мезолимбического пути (Moini, Piran, 2020). Показано также, что многие афферентные волокна, идущие к СФО, проходят в субэпендимном пространстве вдоль стенок желудочка через спайку свода (Lind et al., 1982). Таким образом, опираясь на литературные данные, и также на полученные нами результаты, можно предположить, что одним из основных путей катехоламинергических волокон в СФО является ветвь переднемозгового пучка, проходящая через спайку свода.

Поскольку СФО относится к циркумвентрикулярным органам головного мозга, для него характерно наличие специализированных эпендимных клеток — таницитов — которые отличаются от клеток эпендимы своей морфологией, цитохимической и ультраструктурной организацией (Langlet et al., 2013; Суфиева и др., 2018; Korzh, Kondrychyn, 2020). Одной из морфологических особенностей таких клеток является наличие длинного базального отростка, концами которого танициты оплетают кровеносные сосуды подлежащей нервной ткани и, благодаря этому, могут участвовать в транспорте сигнальных молекул из крови к клеткам СФО, влияя на метаболическую функцию органа. При этом результаты проведен-

ной конфокальной сканирующей микроскопии показали, что ход отдельных катехоламинергических волокон в СФО параллелен виментин-положительным отросткам таницитов. Несмотря на то, что значение этого факта до конца не понятно, можно предположить, что танициты, принимая во внимание их схожесть с радиальной глией (Bolborea, Dale, 2013; Goodman, Najihosseini, 2015), могут выступать в качестве скаффолда для растущих катехоламинергических нервных волокон.

Что касается отмеченной реакции на ТГ вблизи эндотелия капилляров и септальных вен, то данное наблюдение согласуется с данными Кавано и Масуко (Kawano, Masuko, 2001), полученными при использовании методов электронной микроскопии. Согласно им, окончания ТГ-иммунопозитивных аксонов обращены в сторону перикапиллярных пространств кровеносных сосудов СФО, в том числе ферестрированных капилляров. Данный факт представляется важным рассматривать в совокупности с еще одним результатом нашего исследования, а именно тем, что ТГ-позитивные волокна СФО крыс часто занимают субэпендимное положение, непосредственно под телами таницитов, и направлены вдоль покрывающего СФО слоя, а отдельные отростки проникают сквозь эпендимный слой и контактируют с ЦСЖ. В виду отсутствия данных о наличии на мембране таницитов рецепторов к катехоламинам, можно было бы предположить, что эти клетки напрямую не являются мишенью субэпендимных волокон. Однако, исследование другого циркумвентрикулярного органа — медиобазального гипоталамуса, предпринятое Мейстером с сотрудниками (Meister et al., 1988), показало, что отдельные популяции таницитов экспрессируют нейрональный фосфопротеин, регулируемый дофамином и цАМФ

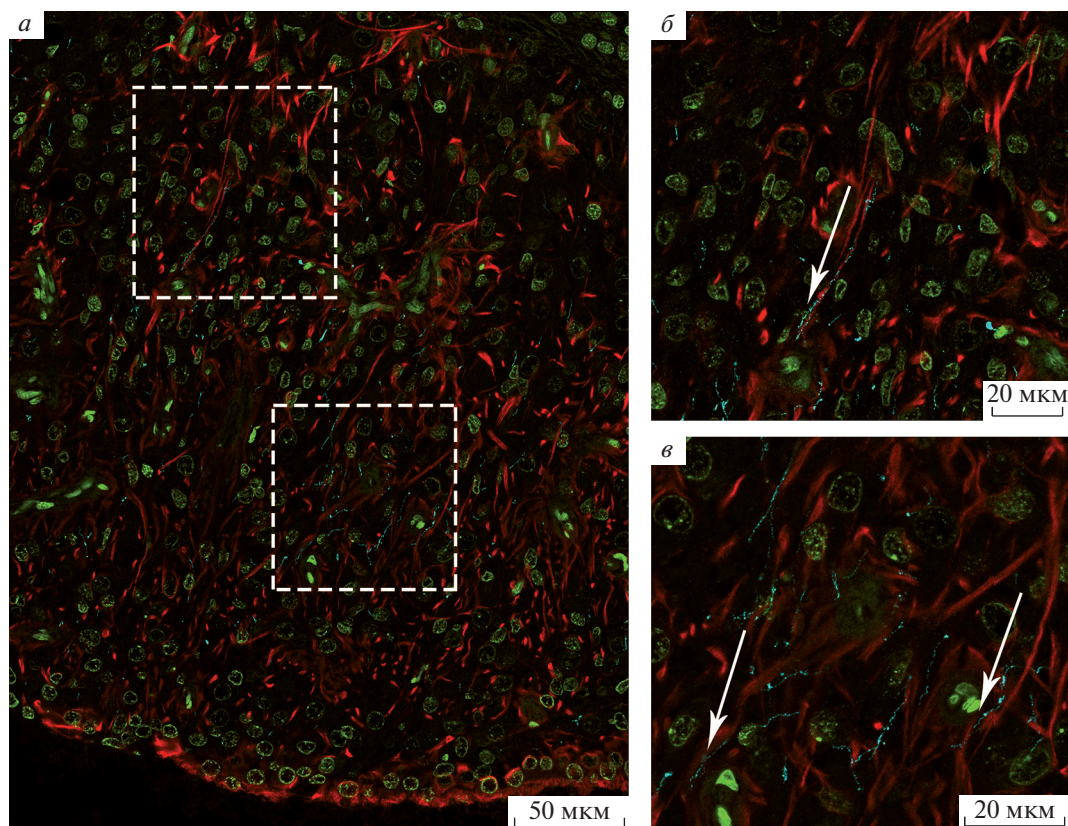


Рис. 4. Пространственное распределение виментина и тирозингидроксилазы в тканях субфорникального органа. Двойная иммунофлуоресцентная реакция на виментин и ТГ, визуализация с помощью флуорохромов Су3 (голубой цвет) и Су5 (красный цвет) с окраской ядер SYTOX Green (зеленый цвет). Конфокальная лазерная микроскопия. Объектив Plan-Apochromat 63×/1.40 Oil DICM27 (масляная иммерсия). *a* – Общий вид. Двухмерная проекция 3х оптических срезов панорамы из 12-ти кадров. Величина Z-серии – 1 мкм. Рамки ограничивают области, представленные на *б*, *в*. Масштабный отрезок – 50 мкм. *б*, *в* – области интереса на большом увеличении. *Стрелки* указывают на совместно расположенные отростки эпендимоцитов СФО и ТГ-положительные волокна. Масштабные отрезки – 20 мкм.

(32-kD dopamine and cAMP regulated phosphoprotein, DARPP-32). Двойное иммуномечение антителами против ТГ и DARPP-32 выявило тесную связь между ТГ-положительными волокнами и DARPP-32-содержащими таницитами, что, в совокупности, дает основание считать, что дофамин контролирует активность таницитов (Hökfelt et al., 1988). Как и мы в СФО, Мейстер с сотрудниками в области медиобазального гипоталамуса выявляли ТГ-иммунопозитивные отростки, проникающие между эпендимными клетками в просвет желудочка. Высказывается предположение, что большинство нервных клеток, контактирующих с ЦСЖ, могут выступать в качестве хеморецепторов и отвечать за несинаптическое восприятие сигналов и дальнейшую их передачу в различные области головного мозга (Vigh et al., 2004). Существует вероятность, что роль этих контактов не ограничивается хеморецепцией. Отмечается, что присутствующие в ликворе моноамины, а именно: дофамин, норадреналин и серотонин, преимущественно имеют нейрональное происхождение, а не поступают из кровотока. Еще одно важное

наблюдение состоит в том, что эти вещества обнаруживаются в ЦСЖ на физиологически активных уровнях (Муртазина и др., 2021). Таким образом, катехоламинергические волокна СФО, по всей видимости, могут выделять в ЦСЖ биологически активные вещества, действующие как нейрогормоны. Из этого следует, что катехоламинергические волокна СФО могут двунаправленно влиять на состав крови и ЦСЖ как напрямую, так и опосредованно, через воздействие на танициты, и могут быть задействованы в регуляции энергетического гомеостаза организма.

Известно также, что в СФО находится особая популяция нейронов, локализованных на поверхности краевых клеток – супраэпендимные нейроны (Dellmann, Simpson, 1979). Несмотря на то, что ряд авторов предполагает серотонинергическую медиаторную супраэпендимных клеток (Richards et al., 1981; Lopez, Richards, 1982), это предположение относится к областям, отличным от СФО, а именно к клеткам дна IV-го желудочка. Наше исследование показало, что ТГ-положительные нейроны СФО не находятся

на поверхности, а ТГ-положительные отростки занимают субэпендимное положение, также могут проникать сквозь эпендимциты и танициты, и контактировать с ЦСЖ. Таким образом, среди супраэпендимных нейронов СФО катехоламинергические не обнаружены.

Еще одним важным структурным компонентом СФО являются периваскулярные клетки – перициты (Nicks et al., 2021). Перициты располагаются снаружи эндотелиального слоя кровеносных сосудов и являются составной частью ГЭБ (Zheng et al., 2020). Мы показали, что в СФО по крайней мере некоторые периваскулярные клетки дают положительную иммуногистохимическую реакцию на ТГ. Располагаются такие клетки вблизи эндотелия крупных сосудов, расположенных в латеральных зонах СФО. Как утверждается в литературе, кровоснабжение СФО в основном обеспечивается системой субфорникальной артерии, ветви передней мозговой артерии. Разветвления субфорникальной артерии формирует в СФО плотное капиллярное сплетение из фенестрированных и нефенестрированных капилляров, которые поступают в крупные тонкостенные сосуды, расположенные латерально – септальные вены, впадающие в систему большой вены Галена (McKinley et al., 2003). Таким образом, ТГ-иммунопозитивные перициты СФО оказываются структурными единицами ГЭБ септальных вен. Было обнаружено, что эндотелиальные клетки и перициты являются первым местом поглощения предшественника катехоламинов – L-ДОФА, а также экспрессируют высокие уровни декарбоксилазы ароматических аминокислот (ДАА) (Bertler et al., 1966; Cenci, 2014). В дополнение к этому, следует упомянуть о наличии в головном мозге моноферментных, ТГ или ДАА-содержащих, нейронов, экспрессирующих только один из ферментов синтеза дофамина (Угрюмов, 2009). Принимая во внимание вышесказанное, можно предположить, что перициты, как и моноферментные нейроны, способны участвовать в комплементарном синтезе дофамина, а в СФО могут оказаться также и сайтом синтеза L-ДОФА.

У взрослого животного в пределах СФО была обнаружена клетка с ТГ-иммунопозитивной реакцией средней интенсивности. До настоящего времени считалось, что в СФО отсутствует собственная популяция катехоламинергических нейронов. Ввиду недостаточной изученности, физиологическая роль этих клеток остается неизвестной. Принимая во внимание то, что в СФО наблюдались лишь одиночные ТГ-положительные клетки и только у взрослых животных, можно говорить о том, что популяция катехоламинергических нейронов в СФО немногочисленна и появляется на более поздних сроках.

Таким образом, в настоящей работе были охарактеризованы катехоламинергические структуры СФО. Исследование препаратов на разных сроках постнатального онтогенеза показало, что существу-

ет главное направление вращивания катехоламинергических волокон в СФО и особенно отчетливо это наблюдается на ранних сроках. Полученные данные позволяют полагать, что волокна катехоламинергических нейронов на ранних сроках поступают в СФО от переднемозгового пучка через спайку свода. Параллельный отросткам эпендимцитов и таницитов ход ТГ-положительных волокон можно трактовать в пользу того, что танициты играют роль таницитов скэффолда для развивающейся в процессе онтогенеза катехоламинергической иннервации. Локализованные в субэпендимном слое катехоламинергические волокна проходят сквозь эпендимный пласт и контактируют напрямую с ЦСЖ. В работе впервые получено свидетельство существования в СФО собственных катехоламинергических нейронов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-25-00105, <https://rscf.ru/project/22-25-00105/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При проведении исследования были соблюдены все применимые международные принципы использования животных. Исследование было одобрено Локальным этическим комитетом ФГБНУ “ИЭМ” (заключение № 1/22 от 18.02.2022).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Муртазина А.Р., Бондаренко Н.С., Пронина Т.С., Чандрян К.И., Богданов В.В., Дильмухаметова Л.К., Угрюмов М.В. 2021. Сравнительный анализ содержания моноаминов как нейрогормонов в ликворе и крови крыс в онтогенезе. *Acta Naturae*. Т. 13. № 4. С. 89. (Murtazina A.R., Bondarenko N.S., Pronina T.S., Chandryan K.I., Bogdanov V.V., Dilmukhametova L.K., Ugrumov M.V. 2021. A comparative analysis of CSF and the blood levels of monoamines as neurohormones in rats during ontogenesis. *Acta Naturae*. V. 13. № 4. P. 89.) <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11516>
- Суфиева Д.А., Кирик О.В., Коржевский Д.Э. 2018. Нуклеолин и ядрышки в эпендимоцитах и таницитах третьего желудочка головного мозга крысы. *Цитология*. 2018. Т. 60. № 1. С. 30. (Sufieva D.A., Kirik O.V., Korzhevskii D.E. 2018. Nucleolin and nucleoli in ependymocytes and tancytes of the third ventricle of the rat brain. *Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya)*. V. 12. № 2. P. 167.) <https://doi.org/10.31116/tsitol.2018.01.04> <https://doi.org/1134/S1990519X18020116>
- Угрюмов М.В. 2009. Синтез моноаминов немонаминергическими нейронами: иллюзия или реальность? *Российский физиологический журн. им. И.М. Сеченова*. Т. 95. № 3. С. 273. (Ugrumov M.V. 2009. Monoamine syn-

- thesis by non-monoaminergic neurons: illusion or reality. Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal imeni I.M. Sechenova. V. 95. P. 273.)
- Cenci M.A.* 2014. Presynaptic mechanisms of l-DOPA-induced dyskinesia: the findings, the debate, and the therapeutic implications. *Front. Neurol.* V. 5. Article 242. <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2014.00242>
- Bertler A., Falck B., Owman C., Rosengrenn E.* 1966. The localization of monoaminergic blood-brain barrier mechanisms. *Pharmacol. Rev.* V. 18. P. 369. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5904153/>
- Bolborea M., Dale N.* 2013. Hypothalamic tanycytes: potential roles in the control of feeding and energy balance. *Trends Neurosci.* V. 36. P. 91. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2012.12.008>
- Dellmann H.D., Simpson J.B.* 1979. The subfornical organ. *Int. Rev. Cytol.* V. 58. P. 333. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61479-5](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61479-5)
- Dellmann H.D., Stahl S.J.* 1984. Fine structural cytology of the rat subfornical organ during ontogenesis. *Brain Res. Bull.* V. 13. P. 135. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(84\)90015-7](https://doi.org/10.1016/0361-9230(84)90015-7)
- Goodman T., Hajihosseini M.K.* 2015. Hypothalamic tanycytes—masters and servants of metabolic, neuroendocrine, and neurogenic functions. *Front. Neurosci.* V. 9. P. 387. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2015.00387/BIBTEX>
- Hicks A.I., Kobrinsky S., Zhou S., Yang J., Prager-Khoutorsky M.* 2021. Anatomical organization of the rat subfornical organ. *Front. Cell. Neurosci.* V. 15, № 691711. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2021.691711>
- Hökfelt T., Foster G., Schultzberg M., Meister B., Schalling M., Goldstein M., Hemmings H.C., Ouimet C., Greengard P.* 1988. DARPP-32 as a marker for D-1 dopaminergic cells in the rat brain: Prenatal development and presence in glial elements (tanycytes) in the basal hypothalamus. *Adv. Exp. Med. Biol.* V. 235. P. 65. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2723-1_6
- Kawai Y.* 2018. Differential ascending projections from the male rat caudal nucleus of the tractus solitarius: an interface between local microcircuits and global macrocircuits. *Front. Neuroanat.* V. 12. P. 63. <https://doi.org/10.3389/FNANA.2018.00063/BIBTEX>
- Kawano H., Masuko S.* 2001. Tyrosine hydroxylase-immunoreactive projections from the caudal ventrolateral medulla to the subfornical organ in the rat. *Brain Res.* V. 903. P. 154. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02435-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02435-0)
- Korzh V., Kondrychyn I.* 2020. Origin and development of circumventricular organs in living vertebrate. *Semin. Cell Dev. Biol.* V. 102. P. 13. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2019.10.010>
- Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Kirik O. V., Grigorev I.P.* 2015. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. *Eur. J. Histochem.* V. 59. P. 5. <https://doi.org/10.4081/EJH.2015.2530>
- Langlet F., Mullier A., Bouret S.G., Prevot V., Dehouck B.* 2013. Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* V. 521. P. 3389. <https://doi.org/10.1002/CNE.23355>
- Lind R.W., van Hoesen G.W., Johnson A.K.* 1982. An HRP study of the connections of the subfornical organ of the rat. *J. Comp. Neurol.* V. 210. P. 265. <https://doi.org/10.1002/CNE.902100306>
- Lorez H.P., Richards J.G.* 1982. Supra-ependymal serotonergic nerves in mammalian brain: morphological, pharmacological and functional studies. *Brain Res. Bull.* V. 9. P. 727. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(82\)90179-4](https://doi.org/10.1016/0361-9230(82)90179-4)
- McKinley M.J., McAllen R.M., Davern P., Giles M.E., Penschow J., Sunn N., Uschakov A., Oldfield B.J.* 2003. The sensory circumventricular organs of the mammalian brain. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* V. 172. P. 1. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-55532-9>
- Meister B., Hökfelt T., Tsuruo Y., Hemmings H., Ouimet C., Greengard P., Goldstein M.* 1988. DARPP-32, a dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein in tanycytes of the mediobasal hypothalamus: distribution and relation to dopamine and luteinizing hormone-releasing hormone neurons and other glial elements. *Neuroscience.* V. 27. P. 607. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(88\)90292-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(88)90292-8)
- Miyahara N., Ono K., Hitomi S., Hirase M., Inenaga K.* 2012. Dopamine modulates neuronal excitability pre- and post-synaptically in the rat subfornical organ. *Brain Res.* V. 1447. P. 44. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2012.01.063>
- Moini J., Piran P.* 2020. Limbic, olfactory, and gustatory systems. In: *Functional and Clinical Neuroanatomy*. London: Academic Press. P. 467. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817424-1.00015-X>
- Pulman K.J., Fry W.M., Cottrell G.T., Ferguson A. V.* 2006. The subfornical organ: a central target for circulating feeding signals. *J. Neurosci.* V. 26. P. 2022. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3218-05.2006>
- Richards J.G., Lorez H.P., Colombo V.E., Guggenheim R., Kiss D., Wu J.Y.* 1981. Demonstration of supra-ependymal 5-HT nerve fibres in human brain and their immunohistochemical identification in rat brain. *J. Physiol. (Paris, 1946–1992).* V. 77. P. 219. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7026769/>
- Rosas-Arellano M.P., Solano-Flores L.P., Ciriello J.* 1996. Arcuate nucleus inputs onto subfornical organ neurons that respond to plasma hypernatremia and angiotensin II. *Brain Res.* V. 707. P. 308. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01368-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01368-7)
- Takahashi M., Tanaka J.* 2017. Noradrenaline receptor mechanisms modulate the angiotensin II-induced water intake in the subfornical organ in rats. *Exp. Brain Res.* V. 235. P. 833. <https://doi.org/10.1007/S00221-016-4844-9>
- Tanaka J., Hayashi Y., Shimamune S., Nomura M.* 1997. Ascending pathways from the nucleus of the solitary tract to the subfornical organ in the rat. *Brain Res.* V. 777. P. 237. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)01211-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)01211-0)
- Tanaka J., Seto K.* 1988. Neurons in the lateral hypothalamic area and zona incerta with ascending projections to the subfornical organ area in the rat. *Brain Res.* V. 456. P. 397. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90247-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90247-8)
- Tsukashima A., Tsuchihashi T., Abe I., Nakamura K., Uchimura H., Fujishima M.* 1996. Angiotensin II increases norepinephrine turnover in the anteroventral third ventricle of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* V. 28. P. 224. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.28.2.224>
- Vígh B., Manzano e Silva M.J., Frank C.L., Vincze C., Czjrok S.J., Szabó A., Lukáts A., Szél A.* 2004. The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons. Its supposed role in the

- nonsynaptic signal transmission of the brain. *Histol. Histopathol.* V. 19. P. 607.
<https://doi.org/10.14670/HH-19.607>
- Zheng Z., Chopp M., Chen J. 2020. Multifaceted roles of pericytes in central nervous system homeostasis and disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* V. 40. P. 1381.
<https://doi.org/10.1177/0271678X20911331>
- Zimmerman C.A., Huey E.L., Ahn J.S., Beutler L.R., Tan C.L., Kosar S., Bai L., Chen Y., Corpuz T. V., Madisen L., Zeng H., Knight Z.A. 2019. A gut-to-brain signal of fluid osmolarity controls thirst satiation. *Nature.* V. 568. P. 98.
<https://doi.org/10.1038/S41586-019-1066-X>
- Zimmerman C.A., Lin Y.C., Leib D.E., Guo L., Huey E.L., Daly G.E., Chen Y., Knight Z.A. 2016. Thirst neurons anticipate the homeostatic consequences of eating and drinking. *Nature.* V. 537. P. 680.
<https://doi.org/10.1038/NATURE18950>

Catecholaminergic Structures of Rat's Subfornical Organ

V. A. Razenkova^{a, *} and D. E. Korzhevskii^a

^a*Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376 Russia*

^{*}*e-mail: valeriya.raz@yandex.ru*

Due to the fact that the studies of subfornical organ's tissue components and neurotransmitter systems have a high relevance nowadays, the aim of this research was to investigate morphological features of the catecholaminergic innervation of this area. Brain samples of rat's subfornical organ were studied at the different stages: at postnatal days 14 and 30, and at the age of 4–6 months, using immunohistochemical and confocal scanning microscopy methods. The main direction of ingrowing into the subfornical organ catecholaminergic fibers at the early stages of postnatal development was determined. It has been established that the processes of catecholaminergic cells can contact with the cells covering the subfornical organ, and can also pass through the ependymal layer. This allows processes to contact the cerebrospinal fluid directly and, presumably, to influence its compositions. It was revealed that some of the catecholaminergic fibers have a parallel arrangement with the basal processes of specialized ependymal cells – tanycytes. Such finding suggests possible function of tanycytes as a scaffold for growing catecholaminergic fibers. Previously unidentified catecholaminergic cell population of subfornical organ was obtained.

Keywords: tyrosine hydroxylase, forebrain, subfornical organ, development, immunohistochemistry