

УДК 577.175.829,57.032,611.814.1

## ХАРАКТЕРИСТИКА ДОФАМИН-ПРОДУЦИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ И РЕЦЕПТОРОВ К ДОФАМИНУ В СУПРАХИАЗМАТИЧЕСКОМ ЯДРЕ У КРЫС В ОНТОГЕНЕЗЕ

© 2020 г. Т. С. Пронина<sup>1,\*</sup>, А. А. Колачева<sup>1</sup>, Л. К. Дильмухаметова<sup>1</sup>, Ю. О. Никишина<sup>1</sup>, К. К. Сухинич<sup>1</sup>, академик РАН М. В. Угрюмов<sup>1</sup>

Поступило 30.10.2019 г.

После доработки 30.10.2019 г.

Принято к публикации 30.10.2019 г.

Одной из особенностей развития супрахиазматического ядра (СХЯ) – “биологических часов” организма является ранняя экспрессия рецепторов к дофамину (ДА) в отсутствие дофаминергических нейронов как источника ДА. Только недавно нами было показано, что ДА в СХЯ синтезируется совместно нервными волокнами, содержащими только тирозингидроксилазу (ТГ), и нейронами, содержащими только декарбоксилазу ароматических L-аминокислот (ДАА). Целью данной работы явился анализ особенностей фенотипа ТГ-волокон в онтогенезе. Для этого было проведено ПЦР и иммуногистохимический анализ экспрессии таких генов и белков, как ТГ, ДАА, везикулярный моноаминовый транспортер (ВМАТ), рецепторы к ДА (D1, D2). В СХЯ у молодых и взрослых крыс обнаружены многочисленные ТГ-иммунореактивные волокна. В некоторых ТГ-волоках обнаружен ВМАТ, что предполагает везикулярное запасание L-ДОФА. Учитывая ключевую роль ТГ-волокон в кооперативном синтезе ДА, нами предполагалось наличие их дофаминовой регуляции. С помощью двойного иммуноочечения показано, что в ТГ-волоках у взрослых крыс присутствуют D1 и D2, а у молодых – только D1. По данным ПЦР, D1 и D2 также экспрессируются в нейронах СХЯ у взрослых крыс и только D1 у молодых. Таким образом, впервые показано, что в СХЯ у молодых и взрослых крыс в нервных волокнах, содержащих ТГ и синтезирующих L-ДОФА, ко-экспрессируют ВМАТ и D1 рецепторы, а у взрослых крыс еще и D2 рецепторы, что предполагает соответственно везикулярное запасание и дофаминовую регуляцию секреции L-ДОФА.

*Ключевые слова:* супрахиазматическое ядро, лазерная микродиссекция, ПЦР, тирозингидроксилаза, иммуногистохимия

DOI: 10.31857/S2686738920010205

Развитию супрахиазматического ядра (СХЯ) уделяется большое внимание, поскольку оно уже внутриутробно начинает функционировать как “биологические часы”, обеспечивающие у взрослых животных регуляцию многих функций в соответствии с циркадными ритмами [1–4]. Одной из важных характеристик развития СХЯ является высокий уровень экспрессии рецепторов к дофамину (ДА) особенно в перинатальном периоде [5–7]. Вызывает удивление то, что это происходит в отсутствие в СХЯ дофаминергических нейронов ДА (тел или волокон) как источника [8, 9].

Нами недавно было показано, что ДА в СХЯ так же, как и в аркуатном ядре, синтезируется совместно недофаминергическими нейронами,

содержащими по одному из комплементарных ферментов его синтеза – тирозингидроксилазу (ТГ) или декарбоксилазу ароматических L-аминокислот (ДАА) [10]. Эти структуры представлены вазопрессинергическими нейронами, ко-экспрессирующими ДАА [11], и некатехоламинергическими волокнами, содержащими ТГ и лишены ДАА [9]. Впервые наличие кооперативного синтеза ДА было продемонстрировано при изучении медиобазального гипоталамуса. В этом случае было показано, что L-диоксифенилаланин (L-ДОФА), синтезирующийся в ТГ-содержащих нейронах (телах и отростках), секретируется в межклеточные щели и захватывается с помощью мембранного транспортера ароматических L-аминокислот в нейроны, содержащие ДАА, где и происходит синтез ДА [12].

Учитывая ключевую роль некатехоламинергических ТГ-содержащих волокон в СХЯ в синтезе L-ДОФА как нейротрансмиттера и предшественника синтеза ДА в ДАА-содержащих нейронах,

<sup>1</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Колюцова  
Российской Академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: tatiana.pronina@mail.ru

**Таблица 1.** Специфические гексоолигонуклеотиды

Ген	5'-3' смысловой	5'-3' антисмысловой
TH	CTGTCCGCCCCTGATTTT	GAGGCCCCCAGAGATG
AADC	CCCCAGGAGCCAGAAACA	AGCCCAGGAGAAGCCAATG
VMAT2	TATAACCGCGCAGTCACAGG	AGCAGCAGCGCAAGGAAC
D1R	CAACTGGGGCTGAACAAGAAG	GGAAACAGGCCCTGAGGAT
D2R	CAGACAGGCCCACTACAACТА	ACAACCCACGGCATTACCA

представлялось целесообразным оценить особенности их фенотипа, отражающие специфику функционирования.

Работу проводили на самцах крыс Вистар на 10-й и 60-й постнатальные дни (П). День рождения крысят считали П1. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к пище и воде и 12-часовом режиме день–ночь. Все манипуляции с животными были проведены в соответствии с национальными и международными требованиями и правилами, утвержденными комитетом по охране животных ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

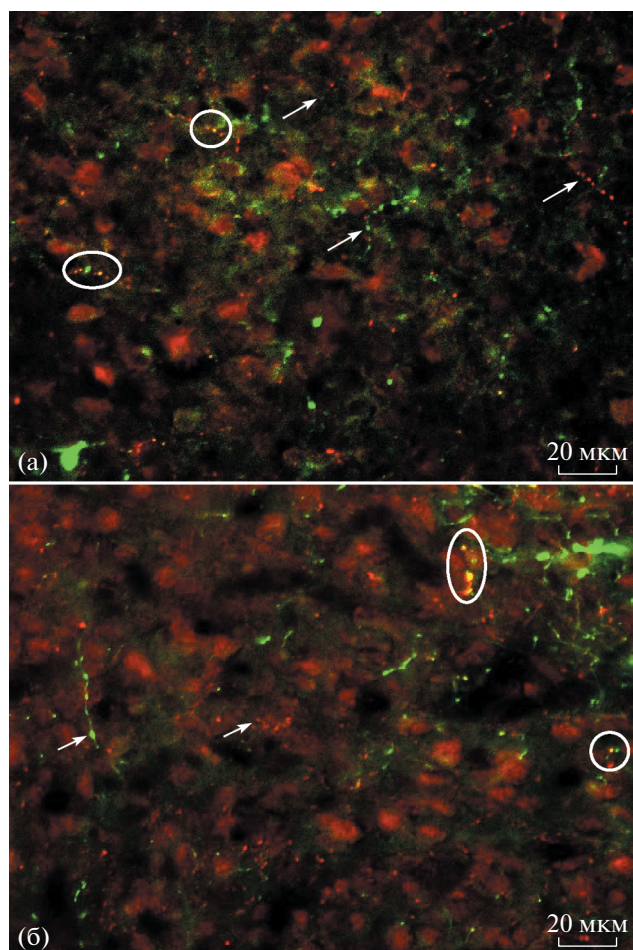
В первой серии экспериментов крыс под наркозом изофлураном декапитировали, выделяли мозг, вырезали блок с областью СХЯ, который замораживали в парах азота. На криостате Leica CM1950 (“Leica”, Германия) делали серийные фронтальные срезы толщиной 12 мкм и монтировали на POL-мембраны (FrameSlides, “Leica”, Германия). Срезы на мембранах фиксировали ацетоном 5 мин при 4°C, окрашивали 1%-м толуидиновым синим и высушивали 70%-м спиртом. Затем проводили лазерную микродиссекцию каждого из билатеральных СХЯ, которые собирали в фиксатор IntactRNA (“Евроген”). В одну пробу собирали СХЯ от шести крыс на П10 и трёх крыс на П60. Тотальную РНК выделяли с использованием RNeasy Micro Kit (“QIAGEN”, Германия) согласно протоколу производителя. Библиотеки кДНК синтезировали при помощи набора реактивов RevertAid™ H MinusFirstStrand-cDNASynthesisKit (“ThermoScientific”, США), используя случайные гексоолигонуклеотиды и всю выделенную на первом этапе РНК в качестве матрицы. Продукты ПЦР анализировали с помощью агарозного гель-электрофореза и системы видеорегистрации Chemidoc Touch (“BioRad”, США). Специфические олигонуклеотиды для проведения ПЦР (табл. 1) подбирали с помощью сервиса NCBI Primer-BLAST с учетом экзон-интронной структуры генов.

Во второй серии экспериментов проводили моно и двойное иммуногистохимическое мечение на срезах СХЯ ТГ, ДАТ, VMAT2, Д1 и Д2. Выделение мозга и приготовление замороженных

фронтальных срезов СХЯ толщиной 20 мкм проводили по ранее описанной методике [13]. Для двойного иммуномечения использовали: 1) антитела овцы к ТГ (1 : 700) (“Chemicon”, США), 2) кроличьи антитела к VMAT2 (1 : 100) (“Chemicon”, США), к рецептору Д1 (1 : 200) (“Abcam”, США) и к рецептору Д2 (1 : 200) (“Chemicon”, США), 3) козы антитела к иммуноглобулинам кролика Cy3 (1 : 800) (“Sigma”, США) и овцы Alexa Fluor 488 (1 : 1000) (“Thermo Fisher Scientific”, США). Инкубации проводили в соответствии с рекомендациями производителей. Срезы изучали с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Observer Z1 (“Zeiss”, Германия) и конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (“Leica”, Германия) при увеличении объектива 40×. Целостное изображение СХЯ воссоздавали с помощью модуля MosaiX Axio Vision (“Zeiss”, Германия).

В данной работе, как и в предыдущих исследованиях [8, 9], в СХЯ у молодых крыс (П10) были обнаружены многочисленные ТГ-иммунореактивные волокна, образующие плотное сплетение в вентромедиальной области ядра. Более того, было показано, что это немоноаминергические волокна, поскольку в них отсутствует ДАА – второй фермент синтеза моноаминов [8]. Многочисленные ТГ-иммунореактивные волокна нами были выявлены в СХЯ не только у молодых (П10), но и у взрослых (П60) крыс (рис. 1). Важно отметить, что тела ТГ-иммунореактивных нейронов, которым принадлежат описанные волокна, по данным иммуноцитохимического анализа, располагаются не в самом СХЯ, а по его границе и поблизости от ядра [13]. Однако с помощью ПЦР в СХЯ нами была выявлена мРНК ТГ (рис. 2). Вероятно, несмотря на то, что для выделения СХЯ использовали лазерную микродиссекцию, в некоторые образцы для анализа попали ТГ-экспрессирующие нейроны, расположенные вдоль границы СХЯ.

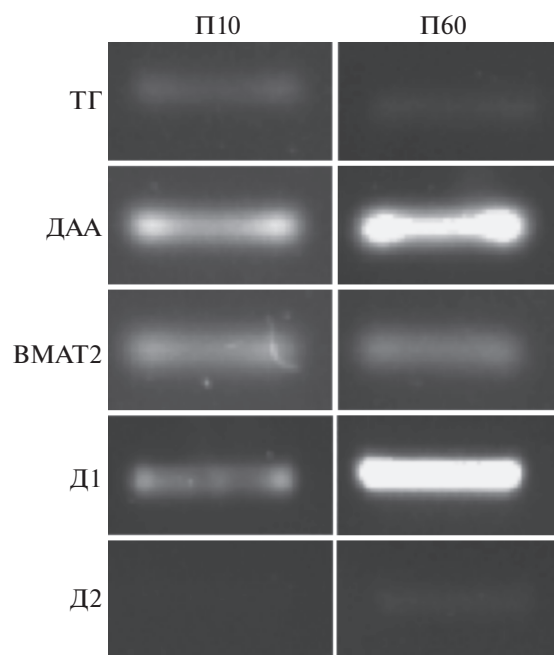
Недавно нами было впервые показано, что конечным секреторным продуктом в моноферментных ТГ-содержащих волокнах СХЯ у молодых и взрослых крыс является L-ДОФА [10]. При этом выделившийся из ТГ-содержащих волокон L-ДОФА превращается в ДА в ДАА-содержащих структурах [11], хотя L-ДОФА может играть и самостоятельную роль нейротрансмиттера. Данные лите-



**Рис. 1.** Двойное иммуномечение на тирозингидроксилазу (ТГ) (зеленый цвет) и везикулярный моноаминовый транспортер 2-го типа (VMAT2) (красный цвет) в супрахиазматическом ядре у крыс на 10-й (а) и 60-й (б) постнатальные дни. Стрелки – моноамеченные волокна и их варикозные расширения; овал – ко-локализация ТГ и VMAT2 (желтый цвет).

ратуры о наличии в СХЯ ДАА-содержащих нейронов [12], в которых может синтезироваться ДА из L-ДОФА, подтверждаются нашими данными об экспрессии гена ДАА как у молодых, так и у взрослых крыс (рис. 2).

Уже более десяти лет назад нами при изучении медиомазального гипоталамуса впервые были получены доказательства того, что конечным секреторным продуктом в моноферментных ТГ-содержащих нейронах является L-ДОФА [13], однако до сих пор непонятно, выделяется ли L-ДОФА из моноферментных ТГ-нейронов сразу же после синтеза в цитозоле или существует механизм его депонирования и выделения в ответ на определенный сигнал. Вопрос о возможности внутринейронального депонирования L-ДОФА до сих пор вообще не стоял, поскольку в катехоламинер-



**Рис. 2.** Экспрессия мРНК генов тирозингидроксилазы (ТГ), декарбоксилазы ароматических L-аминокислот (ДАА), везикулярного транспортера моноаминов 2-го типа (VMAT2), рецепторов к дофамину 1-го (D1) и 2-го (D2) типа в супрахиазматическом ядре у крыс на 10-й постнатальный день (P10) и на P60.

гических нейронах L-ДОФА быстро превращается в ДА.

Одним из гипотетических механизмов депонирования L-ДОФА в моноферментных ТГ-нейронах может быть его захват везикулами с помощью мембранного моноаминового транспортера (VMAT), участвующего в везикулярном запасании моноаминов в моноаминергических нейронах [15]. Действительно, нам удалось выявить у молодых и взрослых крыс в СХЯ в моноферментных ТГ-содержащих волокнах ко-локализацию ТГ и VMAT2 (рис. 1), что позволяет предположить наличие везикулярного запаса L-ДОФА. Однако в большинстве ТГ-содержащих волокон VMAT2 отсутствует (рис. 1). Это может означать, что в ТГ-содержащих волокнах в СХЯ: (а) L-ДОФА не депонируется, (б) механизм депонирования L-ДОФА отличается от депонирования моноаминов в моноаминергических нейронах, (в) содержание VMAT2 незначительно и находится за пределами разрешения иммуногистохимии. Нельзя также исключить, что наряду с подавляющим большинством моноферментных ТГ-содержащих волокон в СХЯ присутствуют единичные дофаминергические волокна. Однако это маловероятно, поскольку в СХЯ в ТГ-содержащих волокнах отсутствует ДАА и ДАТ [8, 9].

Функциональная роль нейрональных элементов, включая моноферментные ТГ-волокна в

СХЯ, определяется не только секреторной активностью, но и её регуляцией. Показателем такой регуляции может служить наличие в нейронах рецепторов к химическим сигналам. Учитывая участие ТГ-содержащих волокон в СХЯ в кооперативном синтезе ДА, мы предполагали существование дофаминовой регуляции этого первого скоростнымитирующего этапа синтеза. Проведенное нами для проверки этого предположения двойное иммуномечение, с одной стороны, ТГ, а с другой – одного из рецепторов к ДА—Д1 или Д2 показало, что в СХЯ оба рецептора присутствуют в ТГ-волокнах у взрослых крыс (П60) и только Д1 рецептор у молодых крыс (П10). Полученные данные свидетельствуют о том, что в постнатальном периоде формируется дофаминовый контроль моноферментных ТГ-волокон.

Вполне возможно, что дофаминовая регуляция в СХЯ не ограничивается ТГ-содержащими волокнами, а распространяется и на другие нейроны, включая моноферментные ДАА-содержащие нейроны, участвующие в кооперативном синтезе дофамина. Действительно, как показано в данной работе с помощью ПЦР, в СХЯ у молодых крыс (П10) экспрессируется ген Д1 рецептора, а у взрослых крыс не только Д1, но и Д2 рецепторы (рис. 2). В будущей работе следует проверить с помощью двойного иммуномечения наше предположение о том, что эти рецепторы могут экспрессироваться в ДАА-содержащих нейронах, участвуя в регуляции кооперативного синтеза дофамина.

Таким образом, впервые показано, что в СХЯ у молодых и взрослых крыс в нервных волокнах, содержащих только ТГ и синтезирующих L-ДОФА, могут ко-экспрессироваться VMAT2 и Д1 рецепторы, а у взрослых крыс еще и Д2 рецепторы, что предполагает соответственно везикулярное запасаение L-ДОФА и формирование дофаминовой регуляции секреции L-ДОФА в онтогенезе.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РФФИ 17–14–01422.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Honma S., Ono D., Suzuki Y., Inagaki N., et al. Suprachiasmatic Nucleus: Cellular Clocks and Networks // *Progress in Brain Research*. 2012. V. 199. P. 129–141. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59427-3.00029-0>
2. Moore R.Y. Organization of the Mammalian Circadian System // *Ciba Found. Symp.* 1995. V. 183. P. 88–99.
3. Kartasoreos I.N., Silver R. Karatsoreos I. N., Silver R. Minireview: The Neuroendocrinology of the Suprachiasmatic Nucleus as a Conductor of Body Time in Mammals // *Endocrinology*. 2007. V. 148. P. 5640–5647. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1083>
4. Carmona-Alcocer V., Abel J. H., Sun T. C., et al. Ontogeny of Circadian Rhythms and Synchrony in the Suprachiasmatic Nucleus // *J. Neuroscience*. 2018. V. 38. № 6. P. 1326–1334. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2006-17.2017>
5. Shearman L.P., Zeitzer J., Weaver D.R. Widespread Expression of Functional D1-dopamine Receptors in Fetal Rat Brain // *Developmental brain research*. 1997. V. 102. P. 105–115. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(97\)00091-6](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(97)00091-6)
6. Schambra U.B., Duncan G.E., Breese G.R., et al. Ontogeny of D1A and D2 Dopamine Receptor Subtypes in Rat Brain Using in Situ Hybridization and Receptor Binding // *Neuroscience*. 1994. V. 62. P. 65–85. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90315-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90315-8)
7. Strother W.N., Norman A.B., Lehman M.N. D1-dopamine Receptor Binding and Tyrosine Hydroxylase-immunoreactivity in the Fetal and Neonatal Hamster Suprachiasmatic Nucleus // *Developmental brain research*. 1998. V. 106. P. 137–144. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(97\)00205-8](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(97)00205-8)
8. Battaglia A.A., Beltramo M., Thibault J., et al. A Confocal Approach to the Morphofunctional Characterization of the Transient Tyrosine Hydroxylase System in the Rat Suprachiasmatic Nucleus // *Brain Research*. 1995. V. 696. P. 7–14. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00675-G](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00675-G)
9. Beltramo M., Calas M., Chernigovskaya E., et al. Postnatal Development of the Suprachiasmatic Nucleus in the Rat. Morpho-functional Characteristics and Time Course of Tyrosine Hydroxylase Immunopositive Fibers // *Neuroscience*. 1994. V. 63. P. 603–610. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90553-3](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90553-3)
10. Пронина Т.С., Дильмухаметова Л.К., Куртова А.И., Угрюмов М.В. Синтез дофамина недофаминергическими нейронами тубероинфундибулярной системы у крыс в онтогенезе // *Нейрохимия*. 2019. Т. 36. С. 292–301. <https://doi.org/10.1134/S1027813319040034>
11. Jaeger C. B., Albert V. R., Joh T. H. et al. Aromatic L-amino Acid Decarboxylase in the Rat Brain: Coexistence with Vasopressin in Small Neurons of the Suprachiasmatic Nucleus // *Brain Research*. 1983. V. 276. P. 362–366. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)90748-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)90748-5)
12. Ugrumov M.V., Melnikova V.I., Lavrentyeva A.V., et al. Dopamine Synthesis by Non-dopaminergic Neurons Expressing Individual Complementary Enzymes of the Dopamine Synthetic Pathway in the Arcuate Nucleus of Fetal Rats // *Neuroscience*. 2004. V. 124. P. 629–635. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.01.002>
13. Мирочник В.В., Макаренко И.Г., Угрюмов М.В. Источник транзитной иннервации супрахиазматического ядра тирозингидроксилаза-иммуреактивными волокнами в постнатальном периоде у крыс // *Онтогенез*. 2002. Т. 33. С. 182–186.
14. Hoffman B.J., Hansson S.R., Mezey E., et al. Localization and Dynamic Regulation of Biogenic Amine Transporters in the Mammalian Central Nervous System // *Frontiers in neuroendocrinology*. 1998. V. 19. № 3. P. 187–231. <https://doi.org/10.1006/frne.1998.0168>

## CHARACTERISTIC OF DOPAMINE-PRODUCING SYSTEM AND DOPAMINE RECEPTORS IN THE SUPRACHIASMATIC NUCLEUS IN RATS IN ONTOGENESIS

**T. S. Pronina<sup>a, #</sup>, A. A. Kolacheva<sup>a</sup>, L. K. Dil'muhametova<sup>a</sup>, Yu. O. Nikishina<sup>a</sup>,  
K. K. Suhinich<sup>a</sup>, and Academician of the RAS M. V. Ugrumov<sup>a</sup>**

*<sup>a</sup> Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

*<sup>#</sup>e-mail: tatiana.pronina@mail.ru*

One of the features of the developing suprachiasmatic nucleus (SCN), the “biological clock” of the body, is the early expression of dopamine (DA) receptors in the absence of dopaminergic neurons as a source of DA. Only recently we showed that DA in SCN is synthesized together by nerve fibers containing only tyrosine hydroxylase (TH) and neurons containing only aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC). This study was aimed to assess specific characteristics of the phenotype of TH-fibers in ontogenesis. For this, PCR and immunohistochemical analysis of the expression of such genes and proteins as: TH, AADC, vesicular monoamine transporter (VMAT), receptors for DA (D1, D2) was performed. We have detected numerous TH-immunoreactive fibers in SCN of young and adult rats. VMAT was observed in some of them, which suggests vesicular storage of L-DOPA. Considering the key role of TH-fibers in cooperative synthesis of DA, we assumed the presence of their dopamine regulation. Using double immunolabeling, it was shown that D1 and D2 are present in TH-fibers in adult rats, and only D1 in young rats. According to PCR, D1 and D2 are also expressed in neurons of SCN in adult rats and only D1 in young rats. Thus, it was shown for the first time that VMAT and D1 are co-expressed in TH-fibers synthesizing L-DOPA in SCN in young and adult rats, and also D2 receptors in adult rats, which suggests vesicular storage and dopamine regulation of L-DOPA secretion, respectively.

*Keywords:* suprachiasmatic nucleus, laser microdissection, PCR, tyrosine hydroxylase, immunohistochemistry