

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ  
ФГБУН ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН

УДК 612.73.

№ ИС ГЗ 0108-2015-0054

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБР РАН

Член-корреспондент РАН

\_\_\_\_\_ А.В. Васильев



27 января 2017 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

КЛЕТОЧНО-МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ НЕЙРОЭНДОКРИННОЙ РЕГУЛЯЦИИ  
СЕКРЕЦИИ ПРОЛАКТИНА ГИПОФИЗА

Программы Президиума РАН I.26П «Механизмы интеграции молекулярных  
систем при реализации физиологических функций»

(отчет за 2016 г.)

Руководитель темы, акад., зав. лаб.

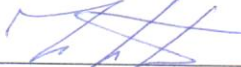
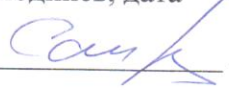
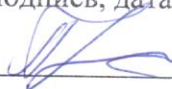

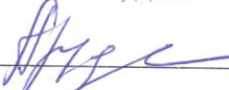
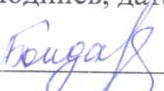



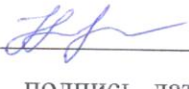
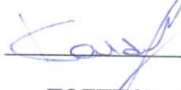
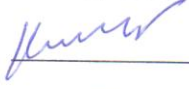
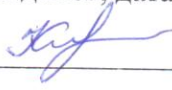
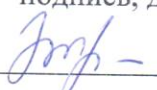
М.В. Угрюмов

\_\_\_\_\_

подпись, дата

Москва, 2017

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, академик РАН, д-р биологических наук	 _____	М.В. Угрюмов
	подпись, дата	
Исполнители:	 _____	А.Я. Сапронова
Кандидат биол. наук	подпись, дата	
Кандидат биол. наук	 _____	Т.С. Пронина
	подпись, дата	
Кандидат биол. наук	 _____	Е.В. Волина
	подпись, дата	
Кандидат биол. наук	 _____	Д.А. Андреев
	подпись, дата	
Кандидат биол. наук	 _____	Н.С. Бондаренко
	подпись, дата	
Кандидат биол. наук	 _____	Л.К. Дутьмухаметова
	подпись, дата	
Кандидат биол. наук	 _____	Г.Р. Хакимова
	подпись, дата	
Научный сотрудник	 _____	С.А. Сурков
	подпись, дата	
Младший научный сотрудник	 _____	Ю.О. Никишина
	подпись, дата	
Младший научный сотрудник	 _____	А.А. Колачева
	подпись, дата	
Младший научный сотрудник	 _____	А.Р. Ким
	подпись, дата	
Младший научный сотрудник	 _____	А.Ю. Курина
	подпись, дата	
Младший научный сотрудник	 _____	Э.Р. Мингазов
	подпись, дата	

## **СОДЕРЖАНИЕ**

Реферат	4
Введение	5
Обозначения и сокращения	7
Методы и подходы	8
Результаты исследования	10
1.1. Влияние дофамина и норадреналина на пролиферацию лактотрофов	10
1.2. Экспрессия генов и белков везикулярного цикла в стриатуме и черной субстанции	11
Публикации по проекту	13

## Реферат

Отчет 13 с., 1 ч., 2 рис., 2 источника (2 публикации)

**Ключевые слова:** дофамин-продуцирующие нейроны, гипоталамус, норадренергические нейроны, ствол мозга, лактотрофы, гипофиз.

Цель проекта - определить роль норадренергических нейронов ствола мозга и дофамин продуцирующих нейронов гипоталамуса в регуляции пролиферативной и секреторной активности лактотрофов гипофиза.

Гипоталамо-гипофизарная система является важнейшим звеном регуляции репродуктивной функции организма, в первую очередь, регуляции секреции пролактина лактотрофами гипофиза. Эта интегративная регуляторная система состоит из трех функционально взаимосвязанных элементов: норадренергических нейронов ствола мозга, дофамин-продуцирующих нейронов гипоталамуса и пролактин-секретирующих клеток гипофиза (лактотрофов). В предыдущие годы по данному проекту была дана оценка клеточных и молекулярных механизмов взаимодействия норадренергических и дофамин-продуцирующих нейронов, обеспечивающих регуляцию секреции пролактина. Однако до сих пор не были определены клеточные и молекулярные механизмы интегративного влияния катехоламинергических систем мозга на секрецию пролактина гипофиза – третьего элемента системы регуляции репродуктивной функции.

## Введение

Проект направлен на выяснение клеточных и молекулярных механизмов нейропластичности мозга при функциональной недостаточности специфических нейронов, что обычно наблюдается при патологии, обусловленной потерей части нейронов и возникновения дефицита синтезируемого ими нейротрансмиттера. Особое внимание привлечено к дофаминергическим нейронам как к источнику дофамина (ДА), играющего ключевую роль в регуляции функций мозга и организма в целом. Дофаминергические нейроны тубероинфундибулярной системы (ТИДАС) мозга ингибируют секрецию пролактина гипофиза, участвуя в регуляции репродукции, а дофаминергические нейроны нигростриатной системы (НСС) являются ключевым звеном регуляции двигательной (моторной) функции. В свою очередь, работа дофаминергических нейронов находится под афферентным контролем со стороны норадренергических нейронов. Благодаря нейропластичности упомянутые дофаминергические системы обладают большим «запасом прочности». Так, при прогрессирующей гибели дофаминергических нейронов ТИДАС, у человека при синдроме гиперпролактинемии, и нейронов НСС, при болезни Паркинсона, функциональная недостаточность обеих систем проявляется симптомно только спустя много лет после начала нейродегенерации. Гипоталамо-гипофизарная система - интегративная регуляторная система, которая состоит из трех функционально взаимосвязанных элементов: норадренергических нейронов ствола мозга, дофамин-продуцирующих нейронов гипоталамуса и пролактин-секретирующих клеток гипофиза (лактотрофов). Однако до сих пор не были определены клеточные и молекулярные механизмы интегративного влияния катехоламинергических систем мозга на секрецию пролактина гипофиза – третьего элемента системы регуляции репродуктивной функции.

Согласно существующим представлениям, гибель нейронов при нейродегенеративных заболеваниях начинается с дистальных отделов аксона, далее погибает сам аксон и только в последнюю очередь – тело нейрона. Болезнь Паркинсона – мультифакториальное заболевание. Предполагается, что одной из причин начала дегенерации аксонов может являться нарушение везикулярного цикла (экзо\_ и эндоцитоза везикул). Экзоцитоз везикул включает несколько этапов: докирование, прайминг и  $Ca^{2+}$ -опосредованное слияние везикул с пресинаптической мембраной. Центральным звеном экзоцитоза является комплекс SNARE, который состоит из трех мембранно-ассоциированных белков: синтаксина I (Syn1), SNAP\_25 и синаптобrevина. В экзоцитозе принимают участие небольшой цитозольный белок комплексин (Cplx), а синаптотагмин I (Syt I) обеспечивает  $Ca^{2+}$ -опосредованное слияние везикул с пресинаптической мембраной. Белок Rab5a играет важную роль в везикулярном транспорте и в регуляции раннего эндосомального цикла. Учитывая то, что ранняя диагностика болезни Паркинсона на досимптомной стадии, как и

патоморфологические исследования мозга у соответствующих больных, до сих пор невозможны, изучение механизмов нейродегенерации/нейропластичности, включая синаптическую нейротрансмиссию, на начальном этапе развития болезни Паркинсона возможно только на экспериментальных моделях досимптомной стадии болезни Паркинсона в надежде на то, что они адекватно воспроизводят упомянутые процессы у больных. При этом важно сопоставлять механизмы нейродегенерации/нейропластичности, выявленные на экспериментальных моделях досимптомной стадии, на экспериментальных моделях симптомной стадии и посмертно у больных при болезни Паркинсона. Так, снижение экспрессии мРНК белков, участвующих в везикулярном цикле, было обнаружено в черной субстанции у больных с болезнью Паркинсона, а также у животных при моделировании симптомной стадии с помощью 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП). Однако отсутствуют работы, где бы оценивали уровень экспрессии мРНК белков везикулярного транспорта на экспериментальных моделях досимптомной стадии болезни Паркинсона.

**Цель проекта** определение роли норадренергических нейронов ствола мозга и дофамин-продуцирующих нейронов гипоталамуса в регуляции пролиферативной активности лактотрофов гипофиза и роли дофамин-продуцирующих нейронов нигростриатной системы в обеспечении пластичности при нейродегенеративных заболеваниях.

**Задачи проекта:**

На разработанных ранее нейротоксических моделях функциональной недостаточности:

1. дофамин-продуцирующих нейронов гипоталамуса и норадренергических нейронов ствола мозга или только дофамин-продуцирующих нейронов гипоталамуса у крыс оценить пролиферативную активность лактотрофов на отдаленных сроках после создания модели.
2. нигростриатной дофаминергической системы оценить экспрессию генов и белков везикулярного цикла в стриатуме и черной субстанции.

### **Обозначения и сокращения:**

DAPI - 4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид

БрдУ - бромдезоксипурин

6-ГДА – 6-гидроксидофамин

ДА – дофамин

ДМИ - десметилимипрамин

м-ДНК – матричная ДНК

МФТП - -метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (нейротоксин)

НА - норадреналин

НСС - нигростриатная система

ТИДАС - тубероинфундибулярная система

ПЦР – полимеразная цепная реакция

## Методы и подходы

Для решения первой задачи были использованы разработанные ранее модели компенсируемой и хронической гиперпролактинемии. Исследования проводили на взрослых самцах крыс линии Вистар на 45-й день после введения в боковой желудочек мозга 250 мкг 6-ГДА – нейротоксина, проникающего в катехоламинергические нейроны и вызывающего их гибель. Дополнительное системное введение десметилмипрамина (ДМИ, 25 мг/кг) – ингибитора мембранного транспортера норадреналина за 30 минут до внутрижелудочкового введения 6-ГДА позволяло сохранить норадренергические аксоны при дегенерации ДАергических нейронов. Для выявления пролиферирующих лактотрофов гипофиза дополнительно проводили внутрибрюшинный инъекции бромдезоксисуридина один раз в день в течение 4 дней с интервалом 24 часа. Пролактин и бромдезоксисуридин выявляли иммуногистохимически на срезах гипофиза толщиной 10 мкм, приготовленных на криостате (Leica, Германия) и смонтированных на стеклах. Ядра клеток выявляли с помощью DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорида). Срезы гипофиза после двойного мечения по пролактину и бромдезоксисуридину были исследованы с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Observer Z1, который был оснащен фильтрами для DAPI (для визуализации клеточных ядер), Alexa 488 (для бромдезоксисуридина) и Alexa 546 (для пролактина) с использованием программного обеспечения AxioVision 4.8. Анализировали по 3 среза гипофиза. На каждом срезе было случайно выбрано 10 областей при увеличении объектива  $\times 40$ , на которых в дальнейшем проводили подсчет клеток, иммуно-позитивных по пролактину, и клеток, иммуно-позитивных по бромдезоксисуридину с помощью программы Image J. Митотический индекс лактотрофов (процент делящихся лактотрофов от общего числа лактотрофов) высчитывали по отношению количества клеток, меченных одновременно по пролактину и БрДУ к количеству клеток, меченных только по пролактину:

$$\text{Митотический индекс} = \frac{\text{пролактин} + \text{бромдезоксисуридин}}{\text{пролактин}} \times 100$$

Для решения второй задачи были использованы разработанные ранее модели досимптомной и ранней симптомной стадий паркинсонизма у мышей самцов линии C57BL/6N в возрасте 2–2.5 мес. и массой тела 22–24 г. Для воспроизведения досимптомной стадии болезни Паркинсона мышам вводили МФТП двукратно по 8 мг/кг с двухчасовым интервалом между инъекциями. Для воспроизведения ранней симптомной стадии болезни Паркинсона МФТП вводили в дозе 10 мг/кг четырехкратно с двухчасовым интервалом. Через 2 нед. после введения МФТП животных декапитировали, извлекали мозг и выделяли стриатум и черную субстанцию. В полученных тканевых образцах определяли содержание мРНК *Syn 1a*, *Syt1*, *Cplx I* и *II*, *Rab5a* методом ПЦР в

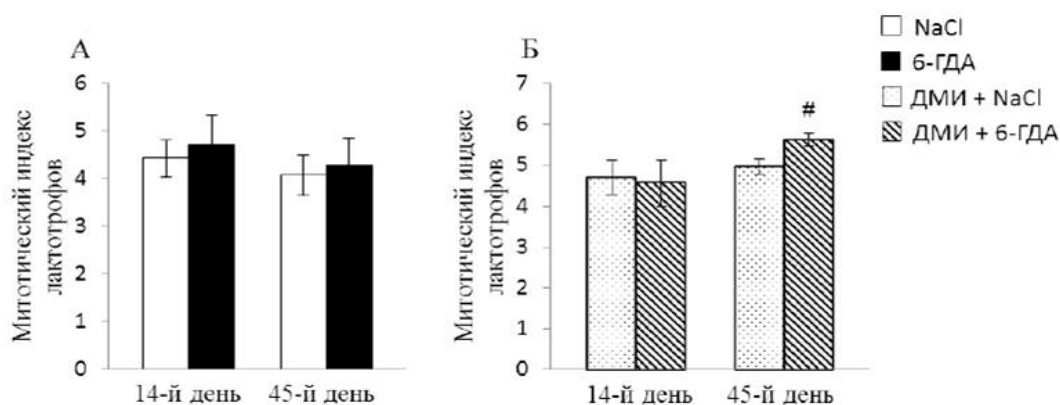


реальном времени. Выделение тотальной РНК из образцов ткани мозга проводили путем гомогенизации образцов в TRIzol. При стандартизации реакции определяли содержание мРНК гипоксантингуанинфосфорибозил-трансферазы.

## Результаты исследования

### 1.1. Влияние дофамина и норадреналина на пролиферацию лактотрофов.

Влияние катехоламинов и их дефицита на секрецию пролактина было продемонстрировано в наших предыдущих исследованиях: на модели дефицита ДА и НА уровень пролактина восстанавливается к 45-му дню, а на модели дефицита только ДА наблюдается хроническая гиперпролактинемия [Зиязетдинова и др., 2008; Дильмухаметова и др., 2009], однако не было проведено оценки пролиферативной активности лактотрофов при функциональной недостаточности тубероинфундибулярной ДА-ергической системы. Для оценки влияния НА и ДА на пролиферацию лактотрофов на модели дефицита ДА и НА, вызванного введением 6-ГДА, и дефицита ДА, вызванного сочетанным введением 6-ГДА и ДМИ проводился сравнительный анализ изменения митотического индекса на 14-й и 45-й дни после введений в желудочки мозга 6-ГДА в опыте и 0,9% NaCl в контроле.



**Рисунок 1.** Митотический индекс лактотрофов на 14-й и 45-й день после введений в желудочки мозга 6-ГДА в опыте и 0,9% NaCl в контроле (А) или 6-ГДА в опыте и 0,9% NaCl в контроле на фоне системного введения ДМИ (Б). #– тенденция между опытом и контролем ( $p < 0,1$ )

Результаты данного исследования показали, что через 14 дней после внутримозгового введения 6-ГДА пролиферативная активность лактотрофов не отличалась от контрольного уровня на обеих моделях (рисунок 1А, Б). На модели дефицита ДА и НА, т.е. при восстановлении уровня ДА к 45-му дню после введения токсина изменения пролиферативной активности лактотрофов также не происходило (рисунок 1А). В то же время на модели дефицита только ДА на 45-й день после введения 6-ГДА на фоне действия ДМИ наблюдалась тенденция к увеличению пролиферативной активности лактотрофов (рисунок 1Б). Это может свидетельствовать о том, что пролиферативная активность лактотрофов будет усиливаться при длительном дефиците ДА (более 1,5 месяцев).

Полученный нами результат хорошо согласуется с результатами предыдущих исследований, в которых показано отсутствие увеличения веса гипофиза к 45-му дню на модели дефицита ДА

[Дильмухаметова и др., 2010]. Вероятно, при дальнейшем дефиците ДА пролиферативная активность гипофиза увеличится, учитывая, что у мышей, с нокаутом гена D<sub>2</sub>-рецепторов гиперплазия лактотрофов развивается значительно позднее - с восьмого месяца жизни животного [Saiardi et al., 1997].

## **1.2. Экспрессия генов и белков везикулярного цикла в стриатуме и черной субстанции**

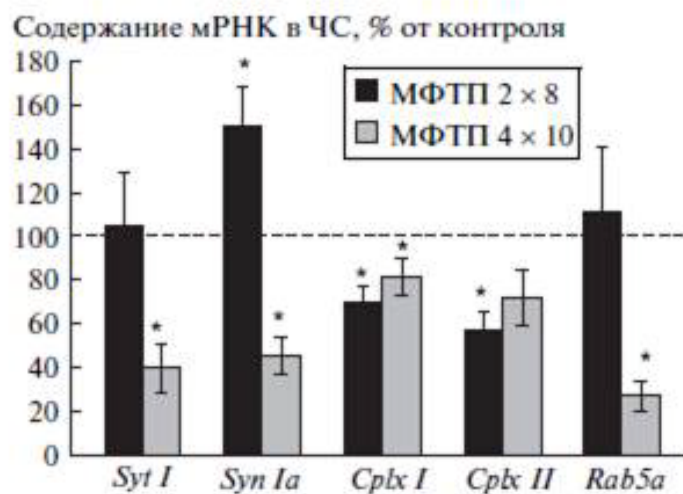
*На досимптомной стадии стадии паркинсонизма в черной субстанции* содержание: (а) мРНК SytI не изменялось, (б) мРНК Syn Ia увеличивалось на 50% (рис. 2), (в) мРНК CplxI снижалось на 28%, (г) мРНК CplxII снижалось на 39%, (д) мРНК Rab5a достоверно не изменялось. При этом при пересчете полученных значений на отдельные тела сохранившихся ДА-ергических нейронов наблюдалось увеличение содержания: (а) мРНК Syn Ia в 2 раза, (б) мРНК Syt I на 44%, (в) Rab5a на 55%.

Поскольку Syn I и Syt I регулируют выделение нейромедиаторов в синаптическую щель увеличение экспрессии генов этих белков в ДАергических нейронах черной субстанции на модели досимптомной стадии болезни Паркинсона может свидетельствовать о компенсаторной стимуляции выделения ДА из аксонов этих нейронов в полосатом теле. Учитывая то, что CplxI и CplxII синхронизируют выделение нейромедиаторов, незначительное снижение экспрессии их генов в ДАергических нейронах черной субстанции у животных может быть проявлением начальных изменений в регуляции выделения ДА из аксонов в стриатуме. В то же время белки Rab5 играют важную роль в регуляции раннего эндосомального цикла, обеспечивая однородность рециклирующих везикул и транспорт везикул к ранним эндосомам. Кроме того, белки Rab5 регулируют сохранность нейритов путем участия в транспорте нейротрофинов и их рецепторов к телам нейронов. Исходя из вышеизложенных представлений, увеличение экспрессии гена Rab5a в ДАергических нейронах у мышей в условиях модели досимптомной стадии болезни Паркинсона может быть еще одним компенсаторным механизмом, направленным на усиление транспорта везикул и на выживаемость нейронов.

*На ранней симптомной стадии паркинсонизма в черной субстанции* содержание: (а) мРНК Syt I в черной субстанции снижалось на 60%, (б) Syn Ia снижалось на 55% (рис. 1), (в) мРНК Cplx I не менялось, (г) мРНК Cplx II снижалось на 29%, (д) мРНК Rab5a снижалось на 74%. При этом при пересчете полученных значений на отдельные тела сохранившихся ДА-ергических нейронов наблюдалось увеличение содержания: мРНК CplxI и мРНК CplxII.

Снижение экспрессии генов Syt I и Syn Ia на модели ранней симптомной стадии болезни Паркинсона по сравнению с экспрессией генов этих белков на модели досимптомной стадии может быть причиной снижения выброса ДА в стриатуме и, как следствие, одной из причин появления нарушений двигательных функций. Обнаруженное нами увеличение содержания мРНК

Cplx I и II на симптомной стадии по сравнению с досимптомной стадией может быть проявлением компенсаторного механизма, направленного на усиление выброса ДА в стриатуме.



**Рисунок 2.** Содержание мРНК генов везикулярного цикла (*Syt I*, *Syn Ia*, *Cplx I*, *Cplx II*, *Rab5a*) в чёрной субстанции у мышей при моделировании досимптомной и ранней симптомной стадий болезни Паркинсона. Пунктирная линия соответствует контролю (0.9% NaCl),  $M \pm m$ , \* –  $p < 0.05$  по сравнению с контролем.

Существенное снижение содержания мРНК *Rab5a* может свидетельствовать о глубоких изменениях в транспорте везикул к ранним эндосомам и в поступлении нейротрофинов от нейритов к телу нейрона, что может способствовать гибели ДАергических нейронов в черной субстанции.

Таким образом, в черной субстанции у мышей на модели досимптомной стадии болезни Паркинсона компенсаторно увеличивается экспрессия генов белков, ответственных за экзоцитоз, тогда как на модели симптомной стадии болезни Паркинсона происходит снижение экспрессии генов белков, ответственных за экзоцитоз, эндоцитоз и выживаемость нейритов, что может быть одной из причин нарушения двигательных функций.

**Опубликованные статьи по результатам проекта** (научные публикации в журналах, индексируемых в международной информационно-аналитической системе научного цитирования Web of Science)

1. Курина А.Ю., Пронина Т.С., Кудрин В.С., Угрюмов М.В. Недостающие доказательства кооперативного синтеза дофамина недофаминергическими нейронами // Доклады АН - биохимия, биофизика, молекулярная биология. 2016. Т. 468. № 3. С. 336-338.
2. Угрюмов М.В. Представления о механизмах нейропластичности как основа для трансляционной медицины // ActaNaturae. 2016. Спецвыпуск. Т. 1. С. 15-18.

Запланированный в ГЗ на 2016 год показатель, характеризующий объем работ, выполнен.

Отчет утвержден Ученым советом «27» декабря 2016 г., Протокол № 14.