

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

ФГБУН ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН

УДК 612.73.

№ ИНГЗ 0108-2015-0054

№ НИОКТР АААА-А16-116120810100-1

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБР РАН

Член-корреспондент РАН

А.В. Васильев



«27» декабря 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 2017 г.)

Руководитель темы, акад., зав. лаб.

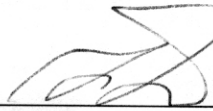
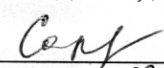
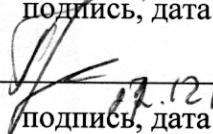
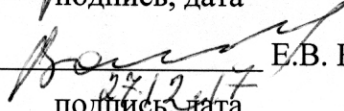


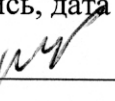
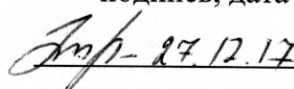
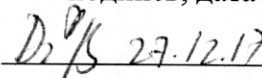
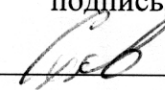
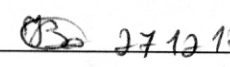
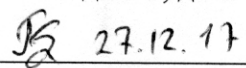
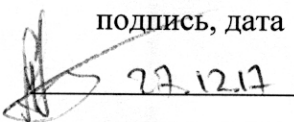
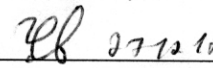
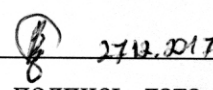
27.12.17

подпись, дата

М.В. Угрюмов

Москва, 2017

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

<p>Руководитель, академик РАН, д-р биологических наук</p>	<p style="text-align: center;"> _____ М.В. Угрюмов 27.12.17 подпись, дата</p>
<p>Исполнители: Кандидат биол. наук</p>	<p style="text-align: center;"> _____ А.Я. Сапронова 27.12.17 подпись, дата</p>
<p>Кандидат биол. наук</p>	<p style="text-align: center;"> _____ Т.С. Пронина 27.12.17 подпись, дата</p>
<p>Кандидат биол. наук</p>	<p style="text-align: center;"> _____ Е.В. Волина 27.12.17 подпись, дата</p>
<p>Кандидат биол. наук</p>	<p style="text-align: center;"> _____ Л.К. Дульмухаметова 27.12.17 подпись, дата</p>
<p>Кандидат биол. наук</p>	<p style="text-align: center;"> _____ А.А. Колачева 27.12.17 подпись, дата</p>
<p>Кандидат биол. наук</p>	<p style="text-align: center;">27.12.17  _____ А.Р. Ким подпись, дата</p>
<p>Кандидат биол. наук</p>	<p style="text-align: center;"> _____ Э.Р. Мингазов 27.12.17 подпись, дата</p>
<p>Кандидат биол. наук</p>	<p style="text-align: center;"> _____ А.И. Куртова 27.12.17 подпись, дата</p>
<p>Научный сотрудник</p>	<p style="text-align: center;"> _____ С.А. Сурков 27.12.2017 подпись, дата</p>
<p>Младший научный сотрудник</p>	<p style="text-align: center;"> _____ В.В. Сафандеев 27.12.17 подпись, дата</p>
<p>Инженер-Исследователь</p>	<p style="text-align: center;"> _____ К.М. Рябинкина 27.12.17 подпись, дата</p>
<p>Аспирант</p>	<p style="text-align: center;"> _____ А.Р. Муртазина 27.12.17 подпись, дата</p>
<p>Аспирант</p>	<p style="text-align: center;"> _____ М.Д. Чибирева 27.12.17 подпись, дата</p>
<p>Аспирант</p>	<p style="text-align: center;"> _____ В.Е. Блохин 27.12.2017 подпись, дата</p>

СОДЕРЖАНИЕ

Реферат	4
Введение	5
Обозначения и сокращения	8
Методы и подходы	9
Результаты исследования	11
1.1. Влияние дофамина и норадреналина на синтез пролактина лактотрофами гипофиза.	11
1.2. Влияние дофамина и норадреналина на пролиферацию лактотрофов	12
1.3. Экспрессия генов и белков везикулярного цикла в стриатуме и черной субстанции	14
1.4. Влияние норадреналина на экспрессию тирозингидроксилазы в аркуатном ядре	16
Список литературы	18
Публикации по проекту	19

Реферат

Отчет 20 с., 1 ч., 6 рис., 1 табл., 8 источников, 5 публ по проекту

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. Кроме того, при выполнении данного проекта в экспериментах *in vitro* при инкубации срезов целого аркуатного ядра интактных животных было показано влияние экзогенного норадреналина на выделение ДА и его предшественника L-ДОФА. Однако до сих пор не выяснен молекулярный механизм влияния норадреналина на моно- и би-ферментные дофамин-продуцирующие нейроны аркуатного ядра.

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 возникновением 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 симптомами 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.

В наших предыдущих исследованиях было показано, что дофамин в аркуатном ядре синтезируется не только дофаминергическими нейронами, содержащими оба фермента синтеза дофамина – тирозингидроксилазу и декарбоксилазу ароматических L-аминокислот, но и недофаминергическими нейронами, содержащими по одному из ферментов синтеза дофамина (Ugrumov, 2008; Ugrumov, 2009; Ugrumov, 2013; Ugrumov, 2014; Ugrumov et al., 2004). Биферментные дофаминергические нейроны и моноферментные нейроны, содержащие декарбоксилазу ароматических L-аминокислот, располагаются в дорсомедиальной области аркуатного ядра, а моноферментные нейроны, содержащие тирозингидроксилазу – в вентролатеральной области (Ershov et al., 2002). По данным *in vitro* норадреналин ингибирует секрецию пролактина через α_1 , α_2 , и β -адренорецепторы на лактотрофах, в то время как *in vivo* этот эффект удалось выявить только при действии норадреналина через α_2 -адренорецепторы (Colthorpe et al., 2000). Помимо прямого

ингибирующего влияния на лактотрофы, норадреналин оказывает не прямое стимулирующее влияние на выделение пролактина опосредованно через нейроны аркуатного ядра (Freeman et al., 2000; Koshiyama et al., 1987).

Ранее при выполнении данного проекта в экспериментах *in vitro* при инкубации срезов целого аркуатного ядра интактных животных было показано влияние экзогенного норадреналина на выделение ДА и его предшественника L-ДОФА. Однако до сих пор не выяснен молекулярный механизм влияния норадреналина на моно- и би-ферментные дофамин-продуцирующие нейроны аркуатного ядра.

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 (Synt 1) 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:

1. Оценить влияние норадреналина и дофамина на синтез пролактина лактотрофами гипофиза на моделях функциональной недостаточности дофамин-продуцирующих нейронов гипоталамуса и норадренергических нейронов ствола мозга или только дофамин-продуцирующих нейронов гипоталамуса у крыс.
2. Оценить пролиферативную активность лактотрофов на отдаленных сроках после создания модели функциональной недостаточности дофамин-продуцирующих нейронов гипоталамуса и норадренергических нейронов ствола мозга или только дофамин-продуцирующих нейронов гипоталамуса у крыс.
3. Оценить экспрессию генов и белков везикулярного цикла в стриатуме и черной субстанции нигростриатной на модели функциональной недостаточности дофаминергической системы.
4. Определить, как влияет норадреналин на экспрессию тирозингидроксилазы в дофамин-продуцирующих нейронах аркуатного ядра у крыс.
5. Определить тип рецепторов к норадреналину, через который оказывается влияние на моно-и би-ферментные нейроны аркуатного ядра у крыс.

Обозначения и сокращения:

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

БрдУ - бромдезоксиуредин

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 1 и 2 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 десметилимипрамина (ДМИ, 25 мг/кг) – ингибитора мембранного транспортера норадреналина за 30 минут до внутрижелудочкового введения 6-ГДА позволяло сохранить норадренергические аксоны при дегенерации ДоАергических 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-фенилиндола 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 3 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

субстанции.. 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.

Для решения задач 4 и 5 задачи исследования проводили на интактных взрослых крысах линии Вистар в возрасте 2-х месяцев. Для решения поставленных задач были проведены эксперименты *in vitro* на слайсах дорсо-медиальной и вентро-латеральной областей аркуатного ядра.

Области аркуатного ядра инкубировали в течение 3-х часов в растворе Кребс-Рингера (контрольная группа) или с добавлением норадреналина или агонистов адренорецепторов – изопротеренола (агониста β -адренорецепторов), фенилэфрина (агониста $\alpha 1$ -адренорецепторов), аминоклонидина (агониста $\alpha 2$ -адренорецепторов) (экспериментальные группы) (таблица 1).

Таблица 1. Концентрация активного действующего вещества в инкубационном растворе.

Группа	Активный компонент инкубационной среды
Контроль	Кребс-рингер
Норадреналин (НА)	Норадреналин, 10^{-7} М
Агонист β -адренорецепторов (Изо)	Изопротеренол, 10^{-5} М
Агонист $\alpha 1$ -адренорецепторов (Фен)	Фенилэфрин, 10^{-5} М
Агонист $\alpha 2$ -адренорецепторов (Ами)	Аминоклонидин, 10^{-5} М

Затем ткань взвешивали, замораживали и хранили при -70°C до определения содержания общего белка и относительной концентрации тирозингидроксилазы методом Вестерн блот. При стандартизации реакции определяли экспрессию тирозингидроксилазы в области стриатума. За единицу концентрации белка тирозингидроксилазы на микрограмм общего белка ткани брали концентрацию тирозингидроксилазы в стриатуме.

Результаты исследования

1.1. Влияние дофамина и норадреналина на синтез пролактина лактотрофами гипофиза.

Для оценки скорости синтеза пролактина лактотрофами оценивали содержание пролактина в передней доле гипофиза методом иммуноферментного анализа. На 14-й день после введения 6-ГДА содержание пролактина в гипофизе было меньше, чем в контроле (рис. 1), что, вероятно, обусловлено большей скоростью выделения пролактина по сравнению со скоростью его синтеза и коррелирует с пониженным содержанием дофамина и норадреналина в гипоталамусе, которое было показано ранее при разработке модели. Это означает, что на начальном этапе развития гиперпролактинемии отсутствие катехоламинов приводит к увеличению скорости выделения пролактина по сравнению со скоростью его синтеза. На 45-й день содержание пролактина в гипофизе не менялось по сравнению с 14-м днем и было пониженным по сравнению с контролем (рис. 1). Это может свидетельствовать о замедлении синтеза и выделения пролактина при восстановлении ДА-ергического контроля.

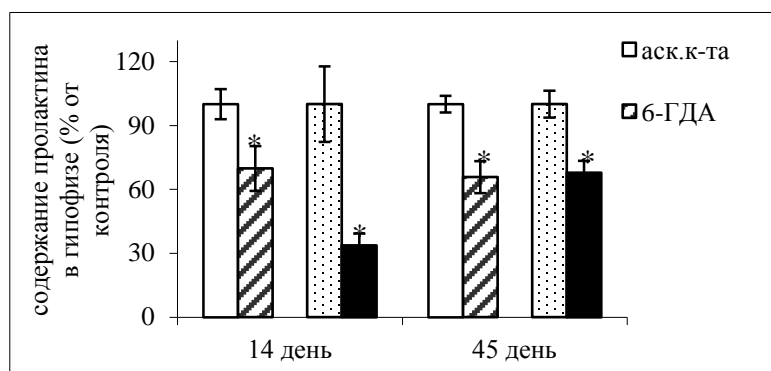


Рис. 1. Содержание пролактина в передней доле гипофиза у крыс на 14-й и 45-й дни после введения только 6-ГДА или десметилимипрамина (ДМИ) с 6-ГДА. В контроле вводили физраствор. * $P < 0.05$, достоверные различия между опытом и контролем.

На 14-й день при введении 6-ГДА на фоне ДМИ содержание пролактина в гипофизе было меньше, чем при введении только 6-ГДА (рис. 1), что, по-видимому, обусловлено еще большей скоростью выделения пролактина по сравнению со скоростью его синтеза при более низком уровне дофамина и более высоком содержании норадреналина. Это указывает также на доза-зависимый ингибиторный контроль дофамина над выделением пролактина на начальном этапе развития гиперпролактинемии. На 45-й день после введения 6-ГДА с ДМИ содержание пролактина в гипофизе повышается по сравнению с 14-м днем, но остается ниже, чем в контроле (рис. 1). Это может быть связано с усилением синтеза пролактина при понижении ингибиторного влияния ДА.

1.2. Влияние дофамина и норадреналина на пролиферацию лактотрофов.

Для оценки пролиферативной активности лактотрофов вводили 5-бромо-2'-деоксиуридина (БрдУ) (Sigma, 100 мг/кг) – аналог тимидина, встраивающийся в S-фазу митоза в ДНК клетки, ежедневно с 11 по 14 дни или с 42 по 45 дни после стереотаксических операций. Для определения пролиферативной активности лактотрофов использовали метод двойного иммунофлюоресцентного мечения пролактина и БрдУ (рис. 2).

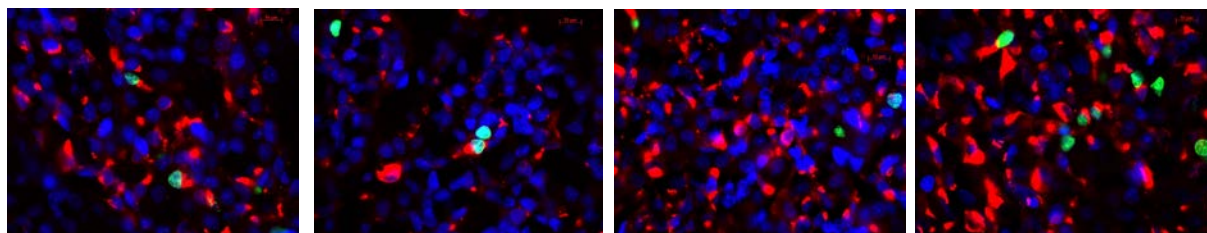


Рис. 2. Лактотрофы, в передней доле гипофиза у крыс, с тройной меткой пролактина (красный), БрдУ (зеленый) и DAPI (ядерный маркер, синий) на 14-й (А и Б) и 45-й (В и Г) дни после введения десметилимипрамина (контроль) (А и В) или десметилимипрамина с 6-ГДА (опыт) (Б и Г). Масштаб, 10 мкм.

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.

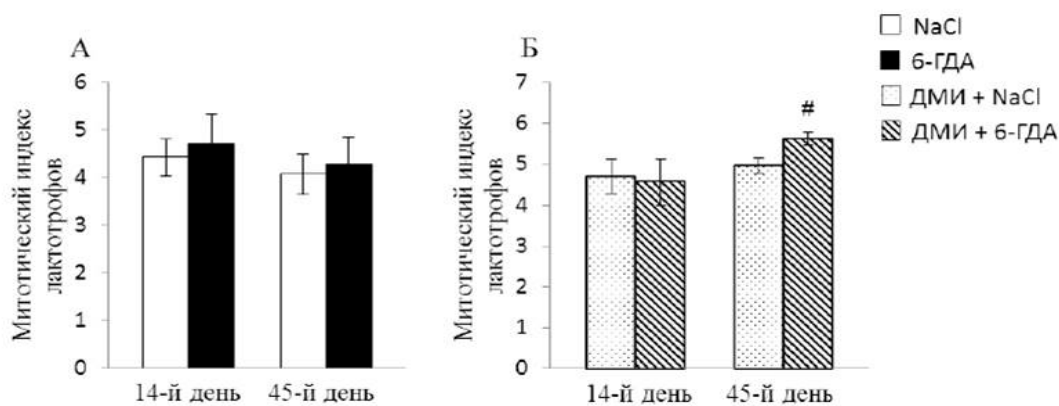


Рисунок 3. Митотический индекс лактотрофов на 14-й и 45-й день после введений в желудочки мозга 6-ГДА в опыте и 0,9% NaCl в контроле (А) или 6-ГДА в опыте и 0,9% NaCl в контроле на фоне системного введения ДМИ (Б). #– тенденция между опытом и контролем ($p < 0,1$)

Результаты данного исследования показали, что через 14 дней после внутрижелудочкового введения 6-ГДА пролиферативная активность лактотрофов не отличалась от контрольного уровня на обеих моделях (рисунок 3А, 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 3А). 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 3Б). 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 [Дильмухометова и др., 2010]. Вероятно, при дальнейшем дефиците ДА пролиферативная активность гипофиза увеличится, учитывая, что у мышей, с нокаутом гена D_2 -рецепторов гиперплазия лактотрофов развивается значительно позднее - с восьмого месяца жизни животного [Saiardi et al., 1997].

1.3. 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. 4), (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.

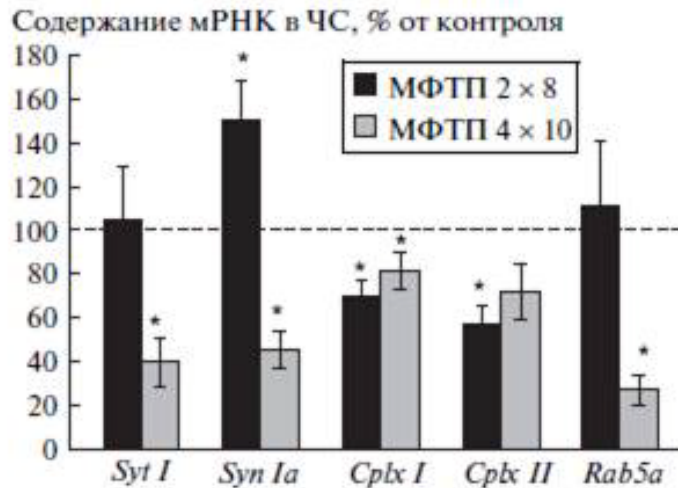


Рисунок 4. Содержание мРНК генов везикулярного цикла (*Syt I*, *Syn Ia*, *Cplx I*, *Cplx II*, *Rab5a*) в чёрной субстанции у мышей при моделировании досимптомной и ранней симптомной стадий болезни Паркинсона. Пунктирная линия соответствует контролю (0.9% NaCl), $M \pm m$, * – $p < 0.05$ по сравнению 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.

1.4. Влияние норадреналина на экспрессию тирозингидроксилазы в аркуатном ядре

Результаты данного исследования показали, что в дорсо-медиальной области аркуатного ядра, где расположены в основном би-ферментные дофамин-продуцирующие нейроны, относительная концентрация белка тирозингидроксилазы выше, чем в вентро-латеральной области (рис. 5 и 6).

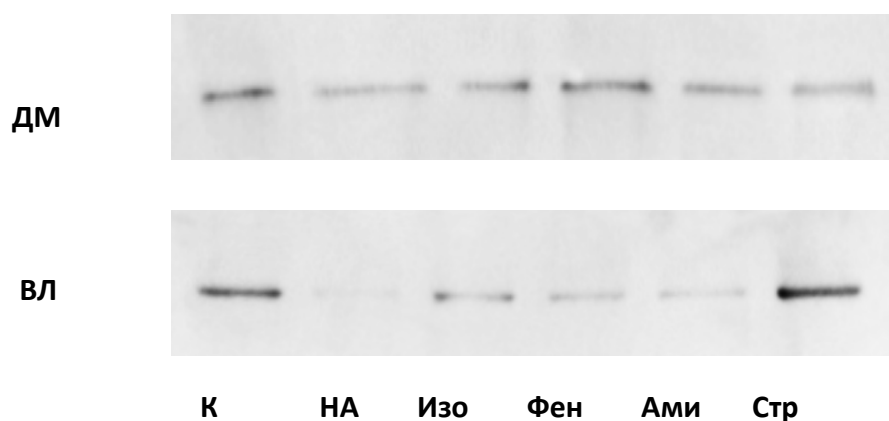


Рисунок 5. Экспрессия тирозингидроксилазы в области стриатума (Стр) и в дорсо-медиальной (ДМ) и вентро-латеральной (ВЛ) областях аркуатного ядра: в контроле (К) и экспериментальных группах с добавлением норадреналина (НА), изопротерина (Изо), фенилэфрина (Фен), аминоклонидина (Ами).

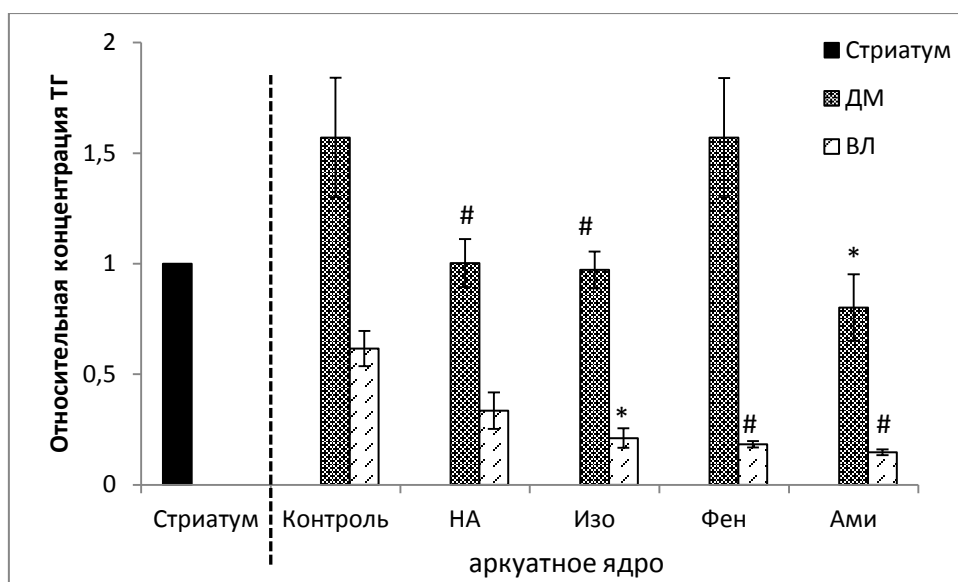


Рисунок 6. Относительная концентрация белка тирозингидроксилазы в области стриатума (Стр) (взятая за 1) и в дорсо-медиальной (ДМ) и вентро-латеральной (ВЛ) областях аркуатного ядра: в контроле (К) и экспериментальных группах с добавлением норадреналина (НА), изопротерина (Изо), фенилэфрина (Фен), аминоклонидина (Ами), #– $p < 0.1$ и *– $p < 0.05$ при сравнении экспериментальных групп с контрольной.

В норме концентрация белка тирозингидроксилазы в стриатуме меньше, чем в дорсо-медиальной области аркуатного ядра, но больше, чем в вентро-латеральной области аркуатного ядра.

При добавлении норадреналина в инкубационную среду было показано, что концентрация белка тирозингидроксилазы снижается почти в два раза в обеих областях аркуатного ядра. Это свидетельствует об ингибирующем влиянии норадреналина на экспрессию тирозингидроксилазы, как в би-ферментных нейронах дорсо-медиальной области аркуатного ядра, так и в моно-ферментных нейронах вентролатеральной области аркуатного ядра.

В дорсо-медиальной области аркуатного ядра при добавлении аминоклонидина, агониста $\alpha 2$ -адренорецепторов, наблюдалось достоверное снижение экспрессии белка тирозингидроксилазы, а при добавлении изопротеринола, агониста β -адренорецепторов, только тенденция к снижению. При этом фенилэфрин, агонист $\alpha 1$ -адренорецепторов, не оказал никакого влияния на экспрессию тирозингидроксилазы. Это свидетельствует о том, что ингибирующее влияние норадреналина на экспрессию тирозингидроксилазы в биферментных дофамин-продуцирующих нейронах, расположенных в дорсо-медиальной области аркуатного ядра, оказывается через $\alpha 2$ - и β -адренорецепторы.

В вентро-латеральной области аркуатного ядра при добавлении аминоклонидина, агониста $\alpha 2$ -адренорецепторов, и фенилэфрина, агониста $\alpha 1$ -адренорецепторов, наблюдалась тенденция к снижению экспрессии белка тирозингидроксилазы, а при добавлении изопротеринола, агониста β -адренорецепторов, достоверное снижение. Это свидетельствует о том, что ингибирующее влияние норадреналина на экспрессию тирозингидроксилазы в моноферментных дофамин-продуцирующих нейронах, расположенных в вентро-латеральной области аркуатного ядра, оказывается через $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - и β -адренорецепторы.

Таким образом, был определен молекулярный механизм ингибирующего влияния норадреналина на дофамин-продуцирующие нейроны аркуатного ядра. Было показано, что норадреналин ингибирует экспрессию тирозингидроксилазы в моно- и биферментных нейронах аркуатного ядра через $\alpha 2$ - и β -адренорецепторы, а в моно-ферментных нейронах еще и через $\alpha 1$ -адренорецепторы.

Список литературы

- [1] Colthorpe K.L., Nalliah J., Anderson S.T., Curlewis J.D. Adrenoceptor subtype involvement in suppression of prolactin secretion by noradrenaline. *Journal of neuroendocrinology*. 12 (4): 297-302. 2000.
- [2] Ershov P.V., Ugrumov M.V., Calas A., Krieger M., Thibault J. Differentiation of tyrosine hydroxylase-synthesizing and/or aromatic L-amino acid decarboxylase-synthesizing neurons in the rat mediobasal hypothalamus: quantitative double-immunofluorescence study. *The Journal of comparative neurology*. 446 (2): 114-122. 2002.
- [3] Freeman M.E., Kanyicska B., Lerant A., Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiological reviews* 80 (4): 1523-1631. 2000.
- [4] Koshiyama H., Kato Y., Ishikawa Y., Murakami Y., Inoue T., Imura H. Stimulation of prolactin secretion by L-3,4-dihydroxyphenyl-serine (L-DOPS) via central norepinephrine in the rat. *Life sciences*. 41 (8): 983-988. 1987.
- [5] Ugrumov M.V. Brain neurons partly expressing monoaminergic phenotype: distribution, development, and functional significance in norm and pathology. In: Lajtha A., Vizi S., editors. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. 3 ed. Heidelberg. Springer. 21-73. 2008.
- [6] M.V. Ugrumov. «Non-dopaminergic neurons partly expressing dopaminergic phenotype: Distribution in the brain, development and functional significance». *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 38: 241–256. 2009.
- [7] Ugrumov M.V. Brain neurons partly expressing dopaminergic phenotype: location, development, functional significance, and regulation. *Adv. Pharm* Ugrumov M.V. Brain neurons partly expressing dopaminergic phenotype: location, development, functional significance, and regulation. *Adv. Pharmacol.* 2013; 68: 37-91.
- [8] Ugrumov M.V., Melnikova V.I., Lavrentyeva A.V., Kudrin V.S., Rayevsky K.S. Dopamine synthesis by non-dopaminergic neurons expressing individual complementary enzymes of the dopamine synthetic pathway in the arcuate nucleus of fetal rats. *Neuroscience*. 124 (3): 629-635. 2004.

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.

Публикации 2017 года

3. **Бондаренко Н.С., Шнейдерман А.Н., Гусева А.А., Умарова Б.А.** Пептид пролил-глицил-пролин (PGP) препятствует повышению проницаемости кровеносных сосудов при воспалении // Acta Naturae .2017. Т. 9. № 1 (32). С. 55-59. (РИНЦ). (Bondarenko N.S., Shneiderman A.N., Guseva A.A., Umarova B.A. Prolyl-glycyl-proline (PGP) peptide prevents an increase in vascular permeability in inflammation // Acta Naturae. **2017**. Т. 9. № 1 (32). С. 52-55. (WoS, Scopus)
4. **Бондаренко Н.С., Дильмухаметова Л.К., Курина А.Ю., Муртазина А.Р., Сапронова А.Я., Сысоева А.П., Угрюмов М.В.** Пластичность центральных и периферических источников норадреналина в онтогенезе у крыс // Биохимия. 2017. Т. 82. № 3. С. 519-527. (РИНЦ) (Bondarenko N.S., Dilmukhametova L.K., Kurina A.Y., Murtazina A.R., Sapronova A.Y., Sysoeva A.P., Ugrumov M.V. Plasticity of central and peripheral sources of noradrenaline in rats during ontogenesis // Biochemistry (Moscow). **2017**. Т. 82. № 3. С. 373-379. DOI: 10.1134/S0006297917030166. (WoS, Scopus)
5. **Курина А.Ю., Пронина Т.С., Дильмухаметова Л.К., Малеев Г.В., Угрюмов М.В.** Кооперативный синтез дофамина в медиобазальном гипоталамусе крыс как компенсаторный механизм при гиперпролактинемии // Биохимия. 2017. Т. 82. № 3. С. 511-518. (РИНЦ). (Kurina A.U., Pronina T.S., Dilmukhametova L.K., Maleev G.V., Ugrumov M.V. Cooperative synthesis of dopamine in rat mediobasal hypothalamus as a compensatory mechanism in hyperprolactinemia // Biochemistry (Moscow). **2017**. Т. 82. № 3. С. 366-372. DOI: 10.1134/S0006297917030154. (WoS, Scopus).

Сданные в печать статьи по результатам проекта

Курина А.Ю., Пронина Т.С., Малеев Г.В, Угрюмов М.В. Ингибирующее влияние норадреналина на кооперативный синтез дофамина недофаминергическими нейронами тубероинфундибулярной системы гипоталамуса крыс // Нейрохимия, в печати.

Пронина Т.С., Угрюмов М.В. Влияние норадреналина на экспрессию тирозингидроксилазы в нейронах аркуатного ядра // ДАН, в печати.

Доклады по материалам проекта на научных конференциях

Курина А.Ю., Пронина Т.С., Угрюмов М.В. Роль моноферментных нейронов в синтезе дофамина в медиобазальном гипоталамусе крыс. Четвертая Международная междисциплинарная конференция «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций». Москва (Россия), 17-18 сентября 2015

Отчет утвержден Ученым советом « 06 » декабря 2017 г., Протокол № 9 .