

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

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

УДК 612.43

№ ИНГЗ 0108-2016-0007

№ НИОКТР АААА-А16-116120810092-9

УТВЕРЖДАЮ
Директор ИБР РАН

Член-корреспондент РАН

А.В. Васильев



27 декабря 2017 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

ТЕМА 6. РОЛЬ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ МОЗГА В НЕЙРОЭНДОКРИННЫХ И НЕРВНЫХ РЕГУЛЯЦИЯХ В ОНТОГЕНЕЗЕ

(заключительный отчет)

Руководитель темы: академик РАН,
зав. лаб.


27.12.2017
М.В. Угрюмов

подпись, дата

Москва, 2017

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы, д-р биологических наук, академик РАН, зав. лаб.



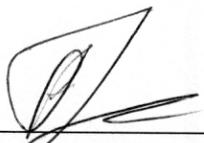
подпись, дата

М.В. Угрюмов (введение, заключение)

27.12.2017

Ведущие исполнители темы:

Ведущие исполнители темы:
Кандидат биол. наук, старший научный сотрудник

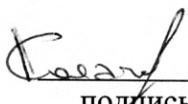


подпись, дата

Т.С. Пронина (раздел 1)

27.12.2017

Кандидат биологических наук, м.н.с.


_____ 27-12-17

подпись, дата

А.А. Колачева (раздел 2)

Научный сотрудник


_____ 27.12.2017

подпись, дата

С.А. Сурков (раздел 2)

ОГЛАВЛЕНИЕ

Реферат	4
Определения, обозначения и сокращения	4
Введение	5
Раздел 1. Роль развивающегося мозга в нейроэндокринной регуляции развития и функционирования целостного организма	7
Раздел 2. Изучение молекулярных механизмов нейродегенерации и нейропластичности в головном мозге	8
Заключение	9
Публикации по теме	10

Реферат

Отчет 11 с., 8 публикаций по теме

Ключевые слова: развивающийся мозг, нейроэндокринная система, онтогенез, болезнь Паркинсона, nigrostriataldopaminergic (DA-ergic) система, стриатум., физиологически активные вещества, гематоэнцефалический барьер (ГЭБ)

Для изучения проницаемости ГЭБ для нейротрансмиттеров в онтогенезе у крыс отработывалась доза и время после введения в кровь меченого тритием дофамина с последующей оценкой его концентрации в мозге крыс. Для решения поставленных задач использовали разные методические подходы: оценивали специфический обратный захват меченого дофамина срезами стриатума *in vitro*, а так же *in vivo* после введения меченого дофамина в кровь. Было показано, что введение меченого дофамина в кровь 3-х дневных крыс приводит к специфическому включению экзогенного дофамина в нейроны стриатума, что свидетельствует о проницаемости ГЭБ для дофамина в раннем постнатальном периоде развития. Результаты этих исследований позволят нам не только определить период формирования ГЭБ, но и помогут предсказать возможные последствия нарушений сроков его созревания для мозга и всего организма.

Изучение механизмов гибели нейронов и компенсаторных процессов, а также скрининг потенциальных нейропротекторов требует создания модели *in vitro*, максимально адекватной патогенезу БП. В данной работе были детально охарактеризованы морфологические, физиологические и биохимические показатели первичной культуры эмбриональных нейронов среднего мозга мыши. Показано, что на 7-ой день культивирования нейроны имели хорошо развитую сеть нейритов с варикозами и синтезировали ключевой фермент синтеза дофамина – тирозингидроксилазу. И, наконец, в нашей работе были получены прямые доказательства того, что культивируемые нейроны синтезируют дофамин и способны к его выделению и обратному захвату. Таким образом, нами была получена клеточная культура нейронов, полностью экспрессирующих DA-ергический фенотип. Параметры разработанной модели позволяют использовать ее для изучения клеточных и молекулярных механизмов нейродегенерации и нейропластичности и оценивать эффективность потенциальных нейропротекторов.

:

Обозначения и сокращения:

БП – болезнь Паркинсона

ГЭБ - гематоэнцефалический барьер

ДА - дофамин

Введение

Основные исследования по первому разделу проводились в рамках выдвинутой нами ранее гипотезы, согласно которой мозг в критический период морфогенеза функционирует как мультипотентный эндокринный орган, секреторирующий в кровь в отсутствие гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) морфогенетические факторы. Однако вопрос, касающийся времени формирования ГЭБ для большинства важнейших регуляторов развития, до сих пор не решен. В связи с этим проблема проницаемости ГЭБ для нейрогормонов в онтогенезе является актуальной и требует пристального внимания. Результаты этих исследований позволят нам не только определить период формирования ГЭБ, но и помогут предсказать возможные последствия нарушений сроков его созревания для мозга и всего организма.

ГЭБ представляет собой физиологический барьер между общей системой циркуляции и мозгом, функцией которого является поддержание постоянства внутримозговой среды. Барьерная функция ГЭБ обеспечивается за счёт трёх основных составляющих: физической (наличие плотных контактов между клетками эндотелия), транспортной (наличие специальных механизмов транспорта веществ) и метаболической (наличие ферментов, активность которых ограничивает поступление веществ из кровотока). Хотя исследования проницаемости ГЭБ ведутся уже не одно десятилетие и накоплен большой массив данных, о сроках формирования ГЭБ в онтогенезе известно крайне мало. Показано, что физическая составляющая барьера формируется у млекопитающих довольно рано: у мышей с 10 дня эмбрионального развития начинается образование плотных контактов, у крыс – с 11 дня. У людей экспрессия белков, участвующих в формировании плотных контактов, выявлена у 14-недельных плодов. Однако данных о времени созревания других составляющих ГЭБ, в частности метаболической, которая играет важную роль для таких веществ, как, например, моноамины, у млекопитающих практически ничего не известно.

Существуют данные, косвенно свидетельствующие о том, что в перинатальном периоде онтогенеза у грызунов нейрогормоны могут преодолевать ГЭБ и это может свидетельствовать о его незрелости в отношении этих веществ в этот период. Однако вопрос, касающийся времени формирования ГЭБ для большинства важнейших регуляторов развития, требует дальнейших исследований. Цель исследований в 2017 году - изучение проницаемости ГЭБ для нейротрансмиттеров в онтогенезе у крыс.

Второй раздел исследований посвящен изучению молекулярных механизмов нейродегенерации и нейропластичности в головном мозге. Прогрессирующая дегенерация нейронов является важнейшей характеристикой нейродегенеративных заболеваний, в частности болезни Паркинсона. Нейродегенерация сопровождается нарушением аксонального транспорта, нарушением синтеза нейромедиаторов, протеинопатией, а в конечном итоге дегенерацией нейритов и тел нейронов. Так, дегенерация дофаминергических нейронов (ДА-

ергическихнейронов) nigrostriatной системы является причиной нарушения двигательной функции, что является основным симптомом болезни Паркинсона (БП). Лечение проводится в основном симптоматическое (медикаментозное) и направлено на компенсацию дефицита дофамина (ДА) в nigrostriatной системе и, следовательно, снижение моторных нарушений у больного. Такое лечение позволяет продлить комфортную жизнь пациента на непродолжительное время, что связано в первую очередь с прогрессирующей гибелью дофаминергических нейронов в мозге в мозгу больного. Главной особенностью БП является длительное бессимптомное течение заболевания на протяжении многих лет (доклиническая стадия), что связано с включением компенсаторных процессов по мере деградации nigrostriatной системы. Только при достижении определенного уровня деградации nigrostriatной ДА системы (снижение количества нейронов черной субстанции на 50% и уровня ДА в стриатуме на 80 %) и «истощения» компенсаторных процессов проявляются первые моторные симптомы. В настоящее время изучение механизмов нейропластичности при допороговой деградации ДА-ергическойnigrostriatной системы возможно только на экспериментальных моделях из-за отсутствия ранней доклинической диагностики заболевания.

Исходя из вышеизложенного, перед исследователями стоит задача разработки ранней доклинической диагностики заболевания и лечения, способствующего замедлению гибели ДА-ергических нейронов. С этой целью проводится поиск новых лекарственных веществ, обладающих нейропротекторными свойствами. Для изучения механизмов гибели нейронов и компенсаторных процессов, а также скрининга потенциальных нейропротекторов требуется созданиemodelи *in vitro* максимально адекватной патогенезу БП.

Целью наших исследований в 2017 году явилось воспроизведение и максимально полная характеристика на клеточном и молекулярном уровне модели БП на основе культивируемых дофаминергических нейронов среднего мозга эмбрионов мыши, которая позволила бы исследовать молекулярные механизмы нейродегенерации и нейропластичности.

Раздел 1. Роль развивающегося мозга в нейроэндокринной регуляции развития и функционирования целостного организма

Цель исследований в 2017 году - изучение проницаемости ГЭБ для нейротрансмиттеров в онтогенезе у крыс. На сегодняшний момент существует ряд подходов к изучению проницаемости ГЭБ, а также описаны показатели для её характеристики. Самыми распространёнными подходами наряду с иммуногистохимическими методами, начиная с 70-х годов, является введение животным красителей, таких как Evansblue, радиоактивно меченых и флуоресцентных агентов. Также описаны электрофизиологические методы исследования ионной проницаемости микрососудов мозга. Механизмы формирования и функционирования ГЭБ изучаются *in vitro* при совместном культивировании клеток, формирующих его морфологическую составляющую, а также с помощью математических методов. Для исследования проницаемости ГЭБ у человека с начала 90-х годов стали использовать МРТ с введением Gd-DTPA и ПЭТ с использованием $^{68}\text{Ga-EDTA}$. В последнее время особое внимание уделяется исследованиям механизмов изменения проницаемости ГЭБ при различных патологических состояниях и поиску способов доставки лекарственных веществ через ГЭБ, однако эта проблема для большинства случаев остаётся всё ещё не решённой.

Для изучения проницаемости ГЭБ для нейротрансмиттеров в онтогенезе у крыс отработывалась доза и время после введения в кровь меченого тритием дофамина с последующей оценкой его концентрации в мозге крыс. Для решения поставленных задач использовали разные методические подходы: оценивали специфический обратный захват меченого дофамина срезами стриатума *in vitro*, а так же *in vivo* после введения меченого дофамина в кровь. Было показано, что введение меченого дофамина в кровь 3-х дневных крыс приводит к специфическому включению экзогенного дофамина в нейроны стриатума, что свидетельствует о проницаемости ГЭБ для дофамина в раннем постнатальном периоде развития.

Раздел 2. Изучение молекулярных механизмов нейродегенерации и нейропластичности в головном мозге.

Цель исследований в 2017 году – морфо-функциональная характеристика дофаминергических нейронов, полученных в первичной культуре мезенцефалона мышей. Культивирование нейронов среднего мозга для последующего моделирования БП требует определенных условий. Так, эмбриональные предшественники нейронов должны пройти процесс дифференцировки, а культура клеток должна быть избавлена от глии. В данной работе мы проводили иммуногистохимический анализ основных маркеров дофаминергических нейронов, оценивали секрецию и обратный захват дофамина. Показано, что на 7-ой день культивирования нейроны имели хорошо развитую сеть нейритов с варикозами и синтезировали ключевой фермент синтеза дофамина – тирозингидроксилазу. И, наконец, в нашей работе были получены прямые доказательства того, что культивируемые нейроны синтезируют дофамин и способны к его выделению и обратному захвату. Таким образом, нами была получена клеточная культура нейронов, полностью экспрессирующих ДА-ергический фенотип. Параметры разработанной модели позволяют использовать ее для изучения клеточных и молекулярных механизмов нейродегенерации и нейропластичности и оценивать эффективность потенциальных нейропротекторов.

Заключение

Формирование и функционирование нейроэндокринной системы регуляции в онтогенезе представляет огромный интерес, поскольку на определенном этапе индивидуального развития в так называемые критические периоды гипоталамические физиологически активные вещества и гормоны эндокринных желез контролируют не только и, возможно, не столько функциональную активность клеток и органов - мишеней, сколько их развитие, причем в последнем случае их действие носит необратимый (импринтинговый, морфогенетический) характер. Дефицит такого рода влияния в критический период развития может приводить к возникновению врожденных заболеваний, которые практически невозможно корригировать в течение всей последующей жизни. Мозг секретирует в кровь морфогенетические факторы только в отсутствие ГЭБ, поэтому проблема проницаемости ГЭБ для нейрогормонов в онтогенезе является актуальной и требует пристального внимания. Результаты этих исследований позволят нам не только определить период формирования ГЭБ, но и помогут предсказать возможные последствия нарушений сроков его созревания для мозга и всего организма.

Болезнь Паркинсона (БП) - нейродегенеративное заболевание, характеризующееся гибелью дофаминергических нейронов нигростриатной системы и расстройством двигательной функции больного. Молекулярные механизмы, запускающие процесс нейродегенерации до сих пор не выяснены и продолжают изучаться как в клинике, так и на различных экспериментальных моделях *in vivo* и *in vitro*. Наиболее актуальными являются модели *in vitro* на основе первичных культур дофаминергических нейронов. Воспроизведение и максимально полная характеристика на клеточном и молекулярном уровне модели БП на основе культивируемых дофаминергических нейронов среднего мозга эмбрионов мыши, позволит исследовать молекулярные механизмы нейродегенерации и нейропластичности, моделировать на ней БП и оценивать эффективность потенциальных нейропротекторов.

Публикации по теме:

1. Kozina E.A., Kim A.R., Kurina A.Y., Ugrumov M.V. Cooperative synthesis of dopamine by non-dopaminergic neurons as a compensatory mechanism in the striatum of mice with MPTP-induced Parkinsonism // *Neurobiol Dis.* 2017. V. 98. P. 108–121. 10.1016/j.nbd.2016.12.005. (WoS, Scopus)
2. Mingazov E.R., Khakimova G.R., Kozina E.A., Medvedev A.E., Buneeva O.A., Bazyan A.S., Ugrumov M.V. MPTP mouse model of preclinical and clinical Parkinson's disease as an instrument for translational medicine // *Molecular Neurobiology.* 2017. DOI: 10.1007/s12035-017-0559-6. (WoS, Scopus)
3. Бондаренко Н.С., Муртазина А.Р., Никишина Ю.О., Сапронова А.Я., Угрюмов М.В. Молекулярные механизмы синтеза норадреналина, индуктора развития, надпочечниками крыс в онтогенезе // *Доклады Академии наук.* 2017. Т. 472. № 3. С. 341-344. DOI:10.7868/S0869565217030239. (РИНЦ). (Bondarenko N.S., Murtazina A.R., Nikishina Y.O., Sapronova A.Y., Ugrumov M.V. Molecular mechanisms of synthesis of noradrenaline as an inducer of development in the adrenal glands of rats in ontogenesis // *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2017. Т. 472. № 1. С. 23-26. DOI: 10.1134/S1607672917010070. (WoS, Scopus)
4. Муртазина А.Р., Дильмухаметова Л.К., Никишина Ю.О., Сапронова А.Я., Волина Е.В., Угрюмов М.В. Изменение секреторной активности органов, продуцирующих норадреналин, при ингибировании его синтеза в мозге неонатальных крыс // *Онтогенез.* 2017. Т. 48. № 5. С. 345-351. DOI: 10.7868/S0475145017050056. (РИНЦ). (Murtazina A.R., Dilmukhametova L.K., Nikishina Y.O., Sapronova A.Y., Volina E.V., Ugrumov M.V. Changes in the secretory activity of organs producing noradrenaline upon inhibition of its synthesis in neonatal rat brain // *Russian Journal of Developmental Biology.* 2017. V. 48. 5. P. 295-300. DOI: 10.1134/S1062360417050058. (WoS, Scopus)
5. Муртазина А.Р., Никишина Ю.О., Бондаренко Н.С., Сапронова А.Я., Волина Е.В., Угрюмов М.В. Экспрессия ферментов синтеза норадреналина в органе Цукеркандля в критический период морфогенеза у крыс // *Доклады Академии наук.* 2017. Т. 474. № 3. С. 382-385. DOI: 10.7868/S0869565217150257. (РИНЦ). (Murtazina A.R., Nikishina Y.O., Bondarenko N.S., Sapronova A.Y., Volina E.V., Ugrumov M.V. Gene expression and content of enzymes of noradrenaline synthesis in the rat organ of Zuckerkandl at the critical period of morphogenesis // *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2017. V. 474. N 1. P. 200-203. DOI: 10.1134/S1607672917030097. (WoS, Scopus)

6. Муртазина А.Р., Никишина Ю.О., Бондаренко Н.С., Сапронова А.Я., Волина Е.В., Угрюмов М.В. Экспрессия генов и содержание ферментов синтеза норадреналина в мозге крыс в критический период морфогенеза // Нейрохимия. 2017. Т. 34 № 3. С. 1-5. DOI:10.7868/S1027813317030074 (РИНЦ). (Murtazina A.R., Nikishin Y.O., Bondarenko N.S., Saproнова A.Y., Volina E.V., Ugrumov M.V. Gene expression and the contents of noradrenaline synthesis enzymes in the rat brain during the critical period of morphogenesis // Neurochemical Journal. 2017. V. 11. N 3. P. 272-276. DOI: 10.1134/S1819712417030072. (WoS, Scopus)
7. Афлятумова Г.Н., Садыкова Д.И., Нигматуллина Р.Р., Чибирева М.Д. Характер нарушения функции эндотелия при эссенциальной артериальной гипертензии у подростков (клиникоэкспериментальное исследование) // Артериальная гипертензия. 2017. Т. 23. № 2. С. 131-140. DOI: 10.18705/1607-419X-2017-23-2-131-140. (РИНЦ). (Aflyatumova G.N., Sadykova D.I., Nigmatullina R.R., Chibireva M.D. Endothelial dysfunction in essential hypertension in adolescents (clinical and experimental study) // Arterial Hypertension (Russian Federation). 2017. T. 23. № 2. C. 131-140. DOI:10.18705/1607-419X-2017-23-2-131-140. (Scopus)
8. Чеснокова Н.Б., Павленко Т.А., Угрюмов М.В. Патология органа зрения как одно из проявлений болезни Паркинсона // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2017. Т. 117. № 9. С. 124-131. DOI: 10.17116/jnevro201711791124-131. (РИНЦ). (Chesnokova N.B., Pavlenko T.A., Ugrumov M.V. Ophthalmic disorders as a manifestation of Parkinson's disease // Zhurnal Nevrologii i Psihiatrii imeni S.S. Korsakova. 2017. V. 117. 9. P. 124-131. DOI: 10.17116/jnevro201711791124-131. (WoS, Scopus)

Отчет утвержден решением Ученого совета ИБР РАН, «06»_декабря 2017 г., Протокол № 9