

УДК 577.175.82,57.054

РОЛЬ МОЗГА В РЕГУЛЯЦИИ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ ОРГАНОВ-ИСТОЧНИКОВ НОРАДРЕНАЛИНА У НЕОНАТАЛЬНЫХ КРЫС: АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ СИНТЕЗА НОРАДРЕНАЛИНА

© 2020 г. А. Р. Муртазина¹, Ю. О. Никишина^{1,*}, академик РАН М. В. Угрюмов¹

Поступило 25.03.2020 г.

После доработки 15.04.2020 г.

Принято к публикации 15.04.2020 г.

Исследование направлено на изучение механизмов гуморальной взаиморегуляции норадреналин-продуцирующих органов у крыс в перинатальном периоде развития. Через 48 и 72 ч после введения иммунотоксина (анти-дофамин-бета-гидроксилаза-сапорин) в желудочки мозга крыс, в мозге, надпочечниках определяли активность ферментов синтеза норадреналина – тирозингидроксилазы и дофамин-бета-гидроксилазы. Было показано, что через 48 ч после введения иммунотоксина в мозг активность тирозингидроксилазы в мозге падает, при этом через 72 ч восстанавливается до уровня контроля, что указывает на то, что в выживших нейронах усиливается синтез норадреналина. В надпочечниках через 72 ч после введения иммунотоксина в мозг увеличивается активность дофамин-бета-гидроксилазы, что свидетельствует о компенсаторном увеличении скорости синтеза норадреналина в надпочечниках при ингибировании синтеза норадреналина в мозге.

Ключевые слова: дофамин-бета-гидроксилаза, крыса, норадреналин, тирозингидроксилаза

DOI: 10.31857/S2686738920040174

В перинатальном периоде развития физиологически активные вещества играют важную роль в регуляции развития и функционирования организма в качестве индукторов развития. Синтез этих веществ и поддержание в крови их физиологически активной концентрации является необходимым условием нормального развития, сохранения гомеостаза и целостности организма [1, 2]. Одним из таких физиологически активных веществ является норадреналин (НА), который в перинатальном периоде развития – критический период морфогенеза, участвует в регуляции развития центральной нервной системы, сердечно-сосудистой и дыхательной систем [3].

НА синтезируется в нейронах головного мозга и симпатической нервной системы, а также в хромоаффинных клетках надпочечников и параганглиев. Все эти органы в критический период морфогенеза могут быть источниками НА в общей системе циркуляции крови [4, 5]. На основании результатов, проведенных ранее исследований, мы предположили, что в перинатальном периоде развития поддержание физиологически активной

концентрации НА в плазме крови осуществляется благодаря гуморальному взаимодействию между его центральными и периферическими источниками. Доказательством этого было сначала снижение, а затем восстановление уровня НА в крови после ингибирования его синтеза в мозге [6]. Кроме того, при вызванном снижении уровня НА в мозге, мы обнаружили увеличение его содержания и выделения в надпочечниках [6, 7]. Эти данные позволяют предположить, что одним из механизмов такой компенсации может быть усиление секреторной активности одних источников НА в ответ на снижение его синтеза в других. Поэтому мы решили оценить секреторную активность одних органов источников НА при экспериментально вызванном снижении секреции НА другими органами. Так, в нашей предыдущей работе было показано, что при дефиците синтеза НА в мозге повышается экспрессия генов основных ферментов синтеза НА – тирозингидроксилазы (ТГ) и дофамин-бета-гидроксилазы (ДБГ) в надпочечниках [8, 9]. Однако экспрессия генов не является показателем изменения содержания самого фермента и его активности.

Исходя из вышеизложенного, целью данного исследования было изучение роли мозга в гуморальной регуляции секреторной активности периферических органов-источников НА. Задачей работы явилось определение активности ТГ и

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: zubova.y@gmail.com

ДБГ – прямого показателя скорости синтеза соответственно предшественника НА (L-дезоксифенилаланина – L-ДОФА) и самого НА, в надпочечниках и в мозге, на модели ингибирования синтеза НА в мозге неонатальных крыс.

Работа проведена на самцах крыс популяции Вистар на 2-й, 4-й и 5-й постнатальные дни жизни. День рождения крысят считался первым днем жизни. Крыс содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к пище и воде. Все манипуляции с животными были проведены согласно протоколу, утвержденному комиссией по биоэтике Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, и находящемуся в соответствии с национальными и международными требованиями.

Для ингибирования синтеза НА в мозге крысам на 2-й постнатальный день под изофлурановым наркозом в боковой желудочек мозга вводили 0.5 мкг анти-ДБГ-сапорина (гибридный молекулярный комплекс, состоящий из антител против ДБГ, связанных с цитотоксином сапорином). Контрольным животным в боковой желудочек мозга вводили 0.9% NaCl. Было использовано по 10 животных в контрольных и экспериментальных группах в эксперименте по определению активности ТГ и такое же количество животных по определению активности ДБГ.

Через 48 и 72 ч после внутрижелудочковых введений анти-ДБГ-сапорина или 0.9% NaCl у крыс после декапитации собирали одно полушарие мозга и оба надпочечника. На пробу приходился материал от одного животного.

Активность ТГ в исследуемых органах определяли по скорости превращения тирозина в L-ДОФА (*in vitro*), как было ранее описано в работе Brusco et al. [10]. Органы гомогенизировали в охлажденном 0.1 М фосфатном буфере. Далее к 100 мкл гомогената добавляли 50 мкл 3-дигидроксibenзилгидразина (NSD-1015) (конечная концентрация 100 мкМ) и инкубировали 10 мин при 37°C. После инкубации реакцию останавливали на льду и в каждый образец добавляли по 10 мкл сульфата аммония (конечная концентрация 800 мкМ), 6-метил-5,6,7,8-тетрагидроптерин дигидрохлорида (конечная концентрация 800 мкМ), гидрохлорида тирозина (конечная концентрация 200 мкМ) (все реактивы – Sigma, США). Далее все пробы инкубировали 30 мин при 37°C. В качестве контроля использовали 100 мкл гомогената ткани каждого исследуемого образца. После инкубации реакцию останавливали на холоде и в каждый образец добавляли 100–500 пМ внутреннего стандарта – 3.4 гидробромида дигидроксibenзиламина, после чего пробы центрифугировали при 16 500 g в течение 25 мин. Далее супернатант переносили в пробирки и определяли активность ТГ по накоплению L-ДОФА, содержание которого

измеряли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией.

Активность ДБГ определяли по скорости превращения тирамина в октопамин (*in vitro*) [11]. Тирамин, так же, как и дофамин является субстратом для ДБГ. Мозг и надпочечники гомогенизировали в 10 объемах 0.02 фосфатно-солевого буфера (pH 7.3) и центрифугировали при 16500 g в течение 1.5 ч. К полученному супернатанту добавляли 200 мкл 1 М натрий-ацетатного буфера (pH 5.0), 100 мкл 0.1 М N-этилмалеимида, 50 мкл 20 мкМ сульфата меди, 50 мкл 0.2 М фумарата натрия, 50 мкл 0.2 М аскорбиновой кислоты (свежеприготовленный), 50 мкл 20 мМ паргилина, 50 мкл водного раствора каталазы (1 мг/мл) и 50 мкл 0.4 М тирамина. В качестве контроля использовали две пробы – супернатант ткани, выдержанный в течение 5 мин при 95°C, в один из которых добавляли 4 нМ октопамина. После добавления в пробы смеси компонентов реакции, образцы инкубировали при 37°C в течение 45 мин при постоянном помешивании и доступе кислорода. Инкубация была остановлена добавлением 1/10 1Н HClO₄, далее пробы центрифугировали при 200 g в течение 10 мин, переносили в колонки (0.5 × × 10 см) Dowex-50W-X4 (Sigma, США) (H⁺, 200–400 mesh) и элюировали 3 Н NH₂OH. Полученный в результате реакции октопамин измеряли на спектрофотометре при длине волны 360 нм (UNICO, США).

Полученные данные обрабатывали статистически с помощью программы GraphPad Prism 6, используя критерий Манна–Уитни.

В наших предыдущих исследованиях было показано, что в раннем постнатальном периоде между центральными и периферическими источниками НА существует гуморальное взаимодействие. Так при снижении синтеза НА в мозге снижается его уровень в общей системе циркуляции [6]. В то же время, в надпочечниках наблюдалось увеличение уровня НА и усиление его выделения [6, 7]. Однако механизмы, за счет которых это происходит до конца не ясны.

По результатам данной работы через 48 ч после введения иммунотоксина (анти-ДБГ-сапорина) в боковой желудочек мозга активность ТГ в мозге снижается на 32%, через 72 ч возвращается к контрольному значению (рис. 1). Эти данные свидетельствуют о том, что в мозге происходит компенсаторные механизмы, направленные на усиление синтеза НА в выживших норадренергических нейронах. При этом в надпочечниках активность ТГ остается на уровне контроля как через 48, так и через 72 ч после введения иммунотоксина в мозг (рис. 1). Стоит отметить, что в обоих исследованных органах на момент снижения НА в крови (через 48 ч после введения иммунотоксина в

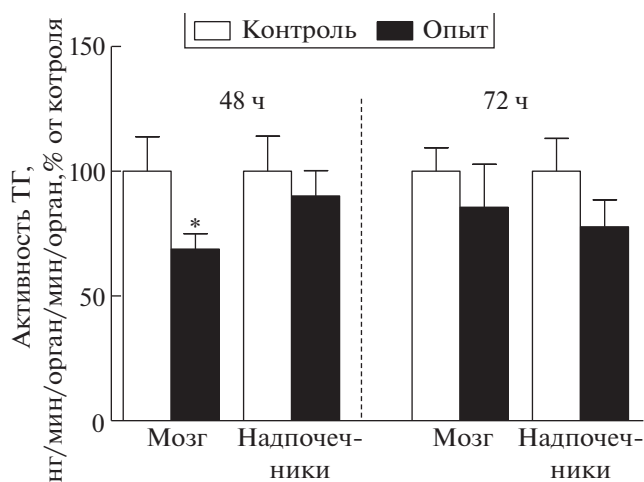


Рис. 1. Активность тирозингидроксилазы (ТГ) в мозге и надпочечниках через 48 и 72 ч после введения 0.5 мкг анти-ДБГ-сапорина в боковой желудочек мозга крыс. * $p < 0.05$ различия по сравнению с контролем.

мозг) увеличивается экспрессия гена ТГ, однако через 72 ч повышенная экспрессия гена сохраняется только в надпочечниках. При этом содержание самих ферментов остается неизменным [8]. В данном случае стоит учесть, что изменения мРНК не всегда коррелируют с активностью фермента и его количеством, регуляция активности ТГ также зависит от продолжительности и характера стимула. Так, в работе Sun et al. показано, что у крыс при хроническом системном введении никотина (14 дней), действуя через холинэргические рецепторы, приводит к устойчивому увеличению мРНК, белка и активности ТГ в мозговом веществе надпочечников. Однако единичная инъекция никотина вызывала лишь небольшое и кратковременное увеличение мРНК ТГ, но не самого фермента [12].

Принимая во внимание отсутствие изменения активности ТГ в надпочечниках, можно предположить, что увеличение содержания НА вероятнее всего осуществляется за счет второго важного фермента – ДБГ. Поэтому наряду с ТГ мы решили также оценить активность ДБГ. Активность ДБГ в мозге через 48 ч после введения иммунотоксина в мозг не менялась, однако, через 72 ч снижалась на 27% по сравнению с контролем (рис. 2), что является следствием дегенерации норадренергических нейронов. В надпочечниках, наоборот, при отсутствии изменений через 48 ч после введения анти-ДБГ-сапорина в мозг, через 72 ч активность ДБГ увеличилась на 17% по сравнению с контролем (рис. 2). В надпочечниках активность ДБГ через 72 ч имеет однонаправленные изменения с экспрессией гена ДБГ [9]. При этом нужно отметить, что экспрессия гена также увеличилась и через 48 ч [8]. Эти данные свидетельствуют о том, что наряду со снижением активно-

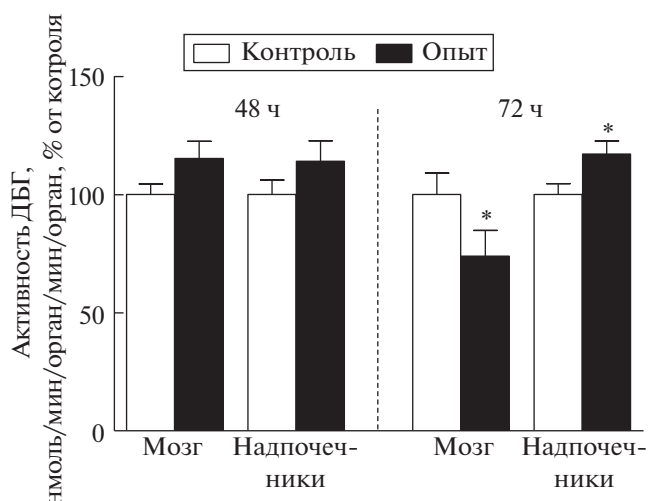


Рис. 2. Активность дофамин-бета-гидроксилазы (ДБГ) в мозге и надпочечниках через 48 и 72 ч после введения 0.5 мкг анти-ДБГ-сапорина в боковой желудочек мозга крыс. * $p < 0.05$ различия по сравнению с контролем.

сти ДБГ в мозге, в надпочечниках, наоборот, происходит увеличение ее активности, что вероятнее всего приводит к большему накоплению и выделению НА, что мы и наблюдали в предыдущих наших экспериментах [7].

В литературе считается, что скорость-лимитирующим ферментом синтеза катехоламинов является ТГ [13]. Однако, обнаружив увеличение активности ДБГ в надпочечниках на нашей модели, мы предположили, что возможно данный фермент может принимать на себя роль скорость-лимитирующего фермента, при недостаточном уровне НА в крови. ДБГ менее изученный фермент, в отличие от ТГ, поэтому в литературе мало информации о его регуляции. Известно, что некоторые транскрипционные факторы могут принимать участие в ее регуляции. Так, транскрипционный фактор Egr1 может играть ингибирующую роль в регуляции транскрипции гена ДБГ [14]. Также существуют предположения, что в условиях, которые увеличивают активность норадренергических нейронов, увеличивается не только активность ТГ, но также и активности ДБГ, которая фактически становится скорость-лимитирующим ферментом синтеза НА [15]. Поскольку ДБГ не обнаруживается в цитозоле, но локализуется в везикуле, при активации норадренергических нейронов происходит насыщение ДБГ, что приводит к большему накоплению дофамина в везикулах. Деполяризация может вызывать высвобождение дофамина, а также НА при насыщении ДБГ [13]. Увеличение активности ДБГ в надпочечниках, которое мы обнаружили на нашей модели, может свидетельствовать о том, что на уровне ДБГ может также происходить регуляция синтеза НА. Однако для получения пря-

мых доказательств необходимо провести дополнительные исследования.

Таким образом, в проведенном исследовании показано, что при ингибировании синтеза НА в мозге неонатальных крыс происходит компенсаторное увеличение активности ДБГ в надпочечниках, что, вероятно, и приводит к повышению уровня НА в крови до нормы.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантами: РФФИ – 18-34-00929 (эксперименты по определению активности ТГ и ДБГ через 72 ч после введения анти-ДБГ-сап. в мозг), РНФ 14–15–01122 (эксперименты по определению активности ТГ и ДБГ через 48 ч после введения анти-ДБГ-сап. в мозг).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lauder J.M.* Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers // *Trends Neurosci.* 1993. V. 16. № 6. P. 233–240.
2. *Nguyen L., Rigo J.M., Rocher V., et al.* Neurotransmitters as early signals for central nervous system development // *Cell. Tissue Res.* 2001. V. 305. P. 187–202.
3. *Hildreth V., Anderson R.H., Henderson D.J.* Autonomic innervation of the developing heart: origins and function // *Clinical Anatomy: The Official Journal of the American Association of Clinical Anatomists and the British Association of Clinical Anatomists.* 2009. V. 22. № 1. P. 36–46.
4. *Moore R.Y., Bloom F.E.* Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems // *Annual review of neuroscience.* 1979. V. 2. № 21. P. 113–168.
5. *Huber K., Kalcheim C., Unsicker K.* The development of the chromaffin cell lineage from the neural crest // *Autonomic Neuroscience.* 2009. V. 151. № 1. P. 10–16.
6. *Никишина Ю.О., Муртазина А.Р., Сапронова А.Я. и др.* Взаимная гуморальная регуляция эндокринных источников норадреналина в перинатальном периоде развития у крыс // *Онтогенез.* 2016. Т. 47. № 5. С. 287–295
7. *Бондаренко Н.С., Дильмухаметова Л.К., Курина А.Ю. и др.* Пластичность центральных и периферических источников норадреналина в онтогенезе у крыс // *Биохимия.* 2017. Т. 82. № 3. С. 519–527.
8. *Муртазина А.Р., Дильмухаметова Л.К., Никишина Ю.О. и др.* Изменение секреторной активности органов, продуцирующих норадреналин, при ингибировании его синтеза в мозге неонатальных крыс // *Онтогенез.* 2017. Т. 48. № 5. С. 345–351.
9. *Муртазина А.Р., Никишина Ю.О., Дильмухаметова Л.К. и др.* Роль мозга в регуляции периферических норадреналин-продуцирующих органов в период морфогенеза у крыс // *ДАН.* 2019. Т. 486. № 6. С. 748–752.
10. *Brusco L.I. García-Bonacho M., Esquifino A.I., et al.* Diurnal rhythms in norepinephrine and acetylcholine synthesis of sympathetic ganglia, heart and adrenals of aging rats: effect of melatonin // *Journal of the autonomic nervous system.* 1998. V. 74. № 1. P. 49–61.
11. *Kato T., Kuzuya H., Nagatsu T.* A simple and sensitive assay for dopamine- β -hydroxylase activity by dual-wavelength spectrophotometry // *Biochemical medicine.* 1974. V. 10. № 4. P. 320–328.
12. *Sun B., Sterling C.R., Tank A.W.* Chronic nicotine treatment leads to sustained stimulation of tyrosine hydroxylase gene transcription rate in rat adrenal medulla // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2003. V. 304. № 2. P. 575–588.
13. *Fillenz M.* Regulation of catecholamine synthesis: multiple mechanisms and their significance // *Neurochemistry international.* 1990. V. 17. № 2. P. 303–320.
14. *Cheng S.Y., Serova L.I., Glazkova D., et al.* Regulation of rat dopamine β -hydroxylase gene transcription by early growth response gene 1 (*Egr1*) // *Brain research.* 2008. V. 1193. P. 1–11.
15. *Scatton B., Dennis T., Curet O.* Increase in dopamine and DOPAC levels in noradrenergic terminals after electrical stimulation of the ascending noradrenergic pathways // *Brain research.* 1984. V. 298. № 1. P. 193–196.

THE ROLE OF THE BRAIN IN REGULATION OF PERIPHERAL NORADRENALINE ORGANS-SOURCES IN NEONATAL RATS: NORADRENALINE SYNTHESIS ENZYME ACTIVITY

A. R. Murtazina^a, Yu. O. Nikishina^{a, #}, and Academician of the RAS M. V. Ugrumov^a

^a *Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*
[#] *e-mail: zubova.y@gmail.com*

The study is aimed at studying the mechanisms of reciprocal humoral regulation of noradrenaline-producing organs in rats in the perinatal period of development. 48 and 72 h after injection of immunotoxin (Anti-dopamine β -hydroxylase-saporin) into ventricles of rat brain, noradrenaline synthesis enzyme activity of tyrosine hydroxylase and dopamine-beta-hydroxylase was measured in the brain and adrenal glands. It was observed, that 48 h after injection of immunotoxin tyrosine hydroxylase activity on the brain decreases, however 72 h after injection it reaches control levels. This shows that noradrenaline synthesis increases in remaining neurons. In adrenal glands, 72 h after injection of immunotoxin in the brain, increases activity of dopamine-beta-hydroxylase. It points to on a compensatory increase in the rate of synthesis of noradrenaline in the adrenal glands while inhibiting the synthesis of noradrenaline in the brain.

Keywords: dopamine-beta-hydroxylase, rat, noradrenaline, tyrosine hydroxylase