

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
РАБОТЫ

УДК 577.175.82,577.175.328,611.814

**СИНТЕЗ ДОФАМИНА НЕДОФАМИНЕРГИЧЕСКИМИ НЕЙРОНАМИ
ТУБЕРОИНФУНДИБУЛЯРНОЙ СИСТЕМЫ У КРЫС В ОНТОГЕНЕЗЕ**

© 2019 г. Т. С. Пронина^{1, *}, Л. К. Дильмухаметова¹, А. И. Куртова¹, М. В. Угрюмов^{1, 2}

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

²Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Москва, Россия

Поступила в редакцию 03.12.2018 г.

После доработки 18.12.2018 г.

Принята к публикации 28.12.2018 г.

В начале 2000-х годов было показано, что дофамин синтезируется не только дофаминергическими нейронами, обладающими необходимым набором ферментов – тирозингидроксилазой и декарбоксилазой ароматических L-аминокислот (ДАА), но и совместно недофаминергическими (моноферментными) нейронами, содержащими по одному из ферментов. При этом L-диоксифенилаланин (L-ДОФА), синтезируемый в нейронах, содержащих тирозингидроксилазу, переносится в нейроны, содержащие ДАА, где синтезируется дофамин. Доказательством кооперативного синтеза дофамина в наших предыдущих исследованиях явилось снижение общего синтеза дофамина при инкубации суспензии нейронов тубероинфундибулярной системы (ТИС) плодов или срезов ТИС взрослых крыс в присутствии нейтральной аминокислоты – конкурентного ингибитора мембранного переносчика L-ДОФА. В данной работе примененный ранее методический подход был усовершенствован за счет использования только срезов ТИС и 2-амино-2-норборнанкарбоновой кислоты – синтетического неметаболизируемого ингибитора мембранного переносчика L-ДОФА. Это позволило подтвердить наличие кооперативного синтеза дофамина в ТИС у плодов и взрослых крыс и получить дополнительное доказательство этого синтеза в виде увеличения межклеточного содержания L-ДОФА при ингибировании его мембранного переносчика. Кроме того, использование усовершенствованного метода позволило впервые количественно охарактеризовать синтез дофамина недофаминергическими нейронами и сравнить его у плодов и взрослых крыс. Показано, что доля кооперативного синтеза дофамина от общего синтеза дофамина моноферментными и дофаминергическими нейронами в ТИС у плодов крыс в 1.8 раза больше, чем у взрослых животных. С точки зрения функциональной роли дофамина, продуцируемого моноферментными нейронами, особый интерес представляют данные, указывающие на шестикратное увеличение синтеза дофамина моноферментными нейронами ТИС у крыс с конца пренатального периода до взрослого состояния. Таким образом, в онтогенезе доля синтеза дофамина недофаминергическими моноферментными нейронами по отношению к общему синтезу дофамина значительно снижается, а абсолютное значение кооперативного синтеза дофамина многократно возрастает.

Ключевые слова: гипоталамус, черная субстанция, дофамин, L-диоксифенилаланин (L-ДОФА), 2-амино-2-норборнанкарбоновая кислота (АНК), высокоэффективная жидкостная хроматография

DOI: 10.1134/S1027813319040034

ВВЕДЕНИЕ

Дофамин (ДА) – один из наиболее широко распространенных в нервной системе нейротрансмиттеров, участвующий в регуляции важнейших функций организма – репродуктивной, двигательной, когнитивной и др. [1–3]. Участие в регуляции той или иной функции определяется локализацией нейронов, продуцирующих ДА, в нервной системе. Так, ДА-продуцирующие нейроны, расположенные в нигростриатной системе

мозга, являются ключевым звеном регуляции двигательной функции, а нейроны, локализованные в тубероинфундибулярной системе (ТИС) гипоталамуса – в регуляции репродуктивной функции [1].

До начала 2000-х годов господствовало представление о том, что ДА синтезируется только в так называемых ДА-ергических нейронах, содержащих оба необходимых для этого фермента – тирозингидроксилазу (ТГ) и декарбоксилазу ароматических L-аминокислот (ДАА). ТГ обеспечивает превращение L-тирозина в L-диоксифенилаланин (L-ДОФА), а ДАА – обеспечивает дальнейшее превращение L-ДОФА в ДА [4].

* Адресат для корреспонденции: 119334 Россия, Москва, ул. Вавилова, 26, e-mail: tatiana.pronina@mail.ru.

Однако с начала 2000-х накапливаются доказательства того, что ДА может синтезироваться не только в ДА-ергических нейронах, но и в так называемых моноферментных нейронах, содержащих только по одному из ферментов – ТГ или ДАА. При этом было показано, что L-ДОФА, синтезируемый в ТГ-содержащих нейронах, после поступления в межклеточную среду захватывается нейронами, содержащими только ДАА, в которых и происходит окончательный синтез ДА [5].

Первые доказательства кооперативного синтеза ДА недофаминергическими нейронами были получены при изучении ТИС у крыс в конце пренатального периода [6], когда в этой системе содержатся только моноферментные нейроны [7]. Следует уточнить, что тела нейронов ТИС расположены в аркуатном ядре, а их аксоны проецируются в срединное возвышение гипоталамуса, где ДА выделяется в гипофизарную портальную систему циркуляции, оказывая ингибирующее влияние на секрецию пролактина лактотрофами гипофиза [1]. В последующих работах было показано, что, несмотря на то, что после рождения в ТИС появляются ДА-ергические нейроны, и их число с возрастом постепенно увеличивается [7], кооперативный синтез ДА происходит и у взрослых животных [8].

Доказательства наличия кооперативного синтеза в ТИС у плодов и взрослых крыс были получены при использовании принципиально одного и того же оригинального методического подхода *ex vivo (in vitro)*. Это метод основан на оценке синтеза ДА в ТИС при ее инкубации в присутствии конкурентного ингибитора мембранного переносчика больших нейтральных L-аминокислот и L-ДОФА. При наличии кооперативного синтеза ДА моноферментными нейронами даже в присутствии ДА-ергических нейронов ингибирование мембранного переносчика L-ДОФА приводит к снижению общего синтеза ДА в ТИС [5].

Несмотря на корректность полученных ранее данных о кооперативном синтезе ДА в ТИС у плодов и у взрослых крыс и интерпретации этих данных [6, 8], использованный ранее методический подход может быть существенно усовершенствован на основе новых знаний и появления новых методических возможностей. Исходя из этого, целью данной работы явилась ревизия полученных ранее данных о синтезе ДА недофаминергическими нейронами ТИС на новом методическом уровне и количественная оценка уровня кооперативного синтеза ДА на различных этапах индивидуального развития. Задачами данного исследования являются: (1) количественная оценка кооперативного синтеза ДА недофаминергическими нейронами ТИС у крыс в конце пренатального периода; (2) количественная оценка кооперативного синтеза ДА недофаминергическими нейронами

ТИС у взрослых крыс; (3) количественная оценка соотношения кооперативного синтеза ДА в ТИС у плодов и взрослых крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные, эксперименты. Работу проводили на самцах крыс линии Вистар на 60-й постнатальный день (П60) и на плодах на 21-й эмбриональный день (Э21). Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к пище и воде и 12-часовом режиме день–ночь. Все манипуляции с животными были проведены в соответствии с национальными и международными требованиями и правилами, утвержденными комитетом по охране животных ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

Крыс на П60 ($n = 20$) и на Э21 ($n = 114$) под наркозом изофлураном декапитировали, и затем выделяли мозг. Далее на вибраторе (Vibratome 1000 plus Sectioning system, Германия) в буфере Кребса-Рингера (мМ: NaCl 120, KCl 4.8, CaCl₂ 2, MgSO₄ 1.3, NaHCO₃ 25, d-глюкоза 10, HEPES 20, аскорбиновая кислота 0.1, pH 7.4, 4°C) приготавливали срезы мозга толщиной 300 мкм на уровне ТИС и черной субстанции. Далее ТИС и черную субстанцию вырезали из фронтальных срезов мозга, полученных у крыс на П60 в соответствии с атласом Paxinos and Watson [9] и на Э21 в соответствии с атласом Ashwell and Paxinos [10].

На П60 от мозга первой группы животных ($n = 12$) брали по 3 фронтальных среза (координаты от 2.2 до 3.1 мм каудальнее брегмы), после чего под контролем бинокулярной лупы при 4°C вырезали левые и правые половинки ТИС.

На П60 от мозга второй группы животных ($n = 8$) брали по 3 фронтальных среза (координаты от 4.6 до 5.5 мм каудальнее брегмы), после чего под контролем бинокулярной лупы при 4°C вырезали левые и правые половинки черной субстанции.

На Э21 от мозга плодов третьей группы животных ($n = 72$) брали по 1 фронтальному срезу, после чего под контролем бинокулярной лупы при 4°C вырезали обе половинки ТИС.

На Э21 от мозга плодов четвертой группы животных ($n = 42$) брали по 2 фронтальных среза, после чего под контролем бинокулярной лупы при 4°C вырезали левые и правые половинки черной субстанции.

Инкубация срезов *ex vivo*. В термостатируемые (37°C) проточные камеры объемом 400 мкл отдельно помещали выделенные левые или правые половинки ТИС или черной субстанции от каждого животного из первой и второй групп на П60, а также по обе половинки ТИС от 6 плодов или все половинки черной субстанции от 3 плодов из третьей и четвертой групп животных на Э21. Срезы мозга на П60 инкубировали в буфере Кребса-Рингера в тече-

ние 40 мин, а на Э21 – 20 мин, при скорости потока раствора через камеру 100 мкл/мин (рис. 1).

После периода стабилизации в половину исследуемых камер поступал буфер Кребса-Рингера, содержащий 0.5 мМ 2-амино-2-норборнанкарбоновой кислоты (АНК) (Сигма, США) – синтетический неметаболизируемый конкурентный ингибитор мембранного переносчика больших нейтральных аминокислот и L-ДОФА, а в оставшиеся камеры – буфер Кребса-Рингера без АНК. Затем срезы инкубировали в течение 1 ч и собирали инкубационную среду, оттекавшую из камер. После окончания инкубации срезы замораживали в жидком азоте. В собранную среду добавляли по 100 мкл 1 М HClO₄ и по 2 пмоль/мл 3,4-дигидроксibenзиламина (ДГБА) в качестве внутреннего стандарта для высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией. После этого инкубационную среду замораживали и вместе с замороженными срезами хранили при –70°C до определения ДА и L-ДОФА.

Высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимической детекцией. Концентрацию и содержание ДА и L-ДОФА определяли в срезах ТИС и черной субстанции, полученных от крыс на Э21 и П60, а также в инкубационной среде методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией. Ткань гомогенизировали с помощью ультразвукового гомогенизатора. Срезы ТИС на Э21 и П60 гомогенизировали в 50 мкл 0.1 М HClO₄ с 125 пмоль/мл ДГБА. Срезы черной субстанции на Э21 гомогенизировали в 50 мкл 0.1 М HClO₄ с 25 пмоль/мл ДГБА, а на П60 – в 100 мкл 0.1 М HClO₄ с 50 пмоль/мл ДГБА. Полученные гомогенаты центрифугировали 20 минут при 20000 g при 4°C и собирали супернатант. Определение ДА и L-ДОФА проводили на обращенно-фазовой колонке (100 × 4 mm ReproSil-Pur C18, 3 μm) (Dr. Maisch, Германия). Подвижной фазой служил 0.1 М цитратно-фосфатный буфер, содержащий 0.25 мМ октансульфоната натрия, 0.1 М ЭДТА и 9% ацетонитрила (рН 2.5). Потенциал веществ выходящих из колонки определяли с помощью электрохимического детектора DECADE II (Antec Leyden, Нидерланды) (+0.8 В, чувствительность детектора 2 нА). Регистрацию и обработку данных проводили с помощью программы LabSolutions Analysis Data System (Shimadzu, Япония). Во всех пробах ткани определяли содержание общего белка с помощью набора “BCA Protein Assay Kit” в соответствии с инструкцией производителя (The Thermo Scientific Pierce, США).

Статистика. Статистический анализ данных выполняли с использованием GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, США). Нормальность данных проверяли с помощью критерия Шапиро-Вилка.



Рис. 1. Схема эксперимента. АНК, 2-амино-2-норборнанкарбоновая кислота; АНК–, отсутствие в среде, АНК+, содержание в среде в концентрации 0.5 мМ; КРБ, Кребс-Рингер буфер.

Для статистического сравнения выбранных групп использовали t-тест Стьюдента для параметрических данных и U-тест Манна-Уитни для непараметрических данных. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (SEM). Значение $p < 0.05$ считалось статистически значимым.

Уровень синтеза ДА недофаминергическими нейронами ТИС на животное рассчитывали как:

$$\Delta_{\text{ДА}} = \frac{(C_{\text{ДАТанк-}} + C_{\text{ДАСанк-}}) - (C_{\text{ДАТанк+}} + C_{\text{ДАСанк+}})}{Nn},$$

где

$C_{\text{ДАТанк-}}$ – содержание ДА в срезах после инкубации без добавления АНК, усредненное на массу белка ТИС от одного животного,

$C_{\text{ДАСанк-}}$ – содержание ДА в инкубационной среде после инкубации без добавления АНК, усредненное на массу белка ТИС от одного животного,

$C_{\text{ДАТанк+}}$ – содержание ДА в срезах после инкубации с добавлением АНК, усредненное на массу белка ТИС от одного животного,

$C_{\text{ДАСанк+}}$ – содержание ДА в инкубационной среде после инкубации с добавлением АНК, усредненное на массу белка ТИС от одного животного,

N – число структур (левая или правая – 0.5 структуры, левая и правая – 1 структура) от одного животного, взятых в каждую инкубационную камеру,

n – число животных, от которых были взяты образцы ткани в каждую инкубационную камеру.

Доля синтеза ДА моноферментными нейронами по отношению к общему синтезу ДА в ТИС рассчитывали как:

$$D_{\text{ДА}} = \frac{(C_{\text{ДАТанк-}} + C_{\text{ДАСанк-}}) - (C_{\text{ДАТанк+}} + C_{\text{ДАСанк+}})}{(C_{\text{ДАТанк-}} + C_{\text{ДАСанк-}})},$$

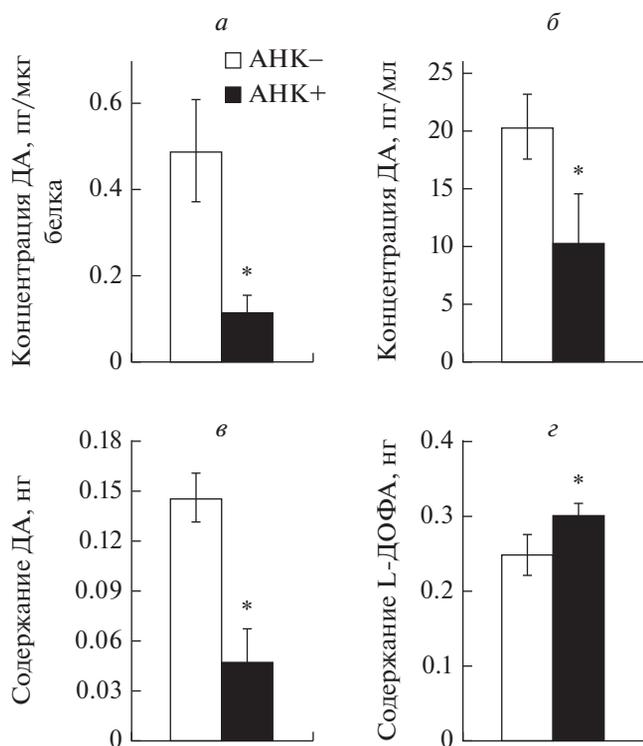


Рис. 2. Концентрация дофамина (ДА) в срезах (а) и инкубационной среде (б), суммарное содержание ДА срезах и инкубационной среде (в) и содержание L-диоксифенилаланина (L-ДОФА) в инкубационной среде (г) после инкубации срезов ТИС в буфере Кребса-Рингера с добавлением 2-амино-2-норборнанкарбонной кислоты (АНК+) или в буфере Кребса-Рингера без 2-амино-2-норборнанкарбонной кислоты (АНК-) на 21-й эмбриональный день (группы: число инкубаций постоянного количества срезов с АНК или без нее – б). **p* < 0.05, при сравнении между группами после инкубации с АНК (АНК+) и без нее (АНК-).

где

$C_{дaТанк-}$ – содержание ДА в срезах после инкубации без добавления АНК, усредненное на массу белка ТИС от одного животного,

$C_{дaСанк-}$ – содержание ДА в инкубационной среде после инкубации без добавления АНК, усредненное на массу белка ТИС от одного животного,

$C_{дaТанк+}$ – содержание ДА в срезах после инкубации с добавлением АНК, усредненное на массу белка ТИС от одного животного,

$C_{дaСанк+}$ – содержание ДА в инкубационной среде после инкубации с добавлением АНК, усредненное на массу белка ТИС от одного животного.

Концентрация ДА, синтезированного недофаминергическими нейронами ТИС на содержание белка в ТИС:

$$K_{дa} = \frac{(C_{дaТанк-} + C_{дaСанк-}) - (C_{дaТанк+} + C_{дaСанк+})}{m}$$

где

$C_{дaТанк-}$ – содержание ДА в срезах после инкубации без добавления АНК, усредненное на массу белка ТИС от одного животного,

$C_{дaСанк-}$ – содержание ДА в инкубационной среде после инкубации без добавления АНК, усредненное на массу белка ТИС от одного животного,

$C_{дaТанк+}$ – содержание ДА в срезах после инкубации с добавлением АНК, усредненное на массу белка ТИС от одного животного,

$C_{дaСанк+}$ – содержание ДА в инкубационной среде после инкубации с добавлением АНК, усредненное на массу белка ТИС от одного животного,

m – масса белка ТИС от одного животного.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Содержание ДА и L-ДОФА в срезах медиобазального гипоталамуса и в инкубационной среде после инкубации с АНК и без АНК. У крыс на Э21 концентрация ДА в срезах ТИС после инкубации с АНК (0.11 ± 0.046 пг/мкг белка) была на 77.2% меньше, чем в срезах ТИС после инкубации без АНК (0.49 ± 0.117 пг/мкг белка) (рис. 2а). Концентрация ДА в инкубационной среде после инкубации срезов с АНК (10.3 ± 4.4 пг/мл) была на 50% меньше, чем в инкубационной среде после инкубации срезов без АНК (20.4 ± 2.9 пг/мл) (рис. 2б). При этом общее содержание ДА в инкубационной среде и ткани снижалось на 68% после инкубации с АНК (0.046 ± 0.02 нг) по сравнению с инкубацией без нее (0.145 ± 0.014 нг) (рис. 2в). На Э21 содержание L-ДОФА в инкубационной среде увеличивалось на 21.4% после инкубации срезов ТИС с АНК (0.301 ± 0.017 нг) по сравнению с инкубацией без нее (0.248 ± 0.027 нг) (рис. 2г).

На П60 концентрация ДА в срезах ТИС после инкубации с АНК (0.38 ± 0.056 пг/мкг белка) была на 75.5% меньше, чем в срезах ТИС после инкубации без АНК (1.56 ± 0.289 пг/мкг белка) (рис. 3а). Концентрация ДА в инкубационной среде после инкубации срезов с АНК (16 ± 1.3 пг/мл) не менялась по сравнению с концентрацией ДА в инкубационной среде после инкубации срезов без АНК (14.4 ± 1.3 пг/мл) (рис. 3б). При этом общее содержание ДА в инкубационной среде и ткани снижалось на 29.6% после инкубации с АНК (0.131 ± 0.01 нг) по сравнению с инкубацией без нее (0.184 ± 0.017 нг) (рис. 3в). На П60 содержание L-ДОФА в инкубационной среде увеличивалось на 23% после инкубации срезов ТИС с АНК (0.365 ± 0.033 нг) по сравнению с инкубацией без нее (0.297 ± 0.017 нг) (рис. 3г).

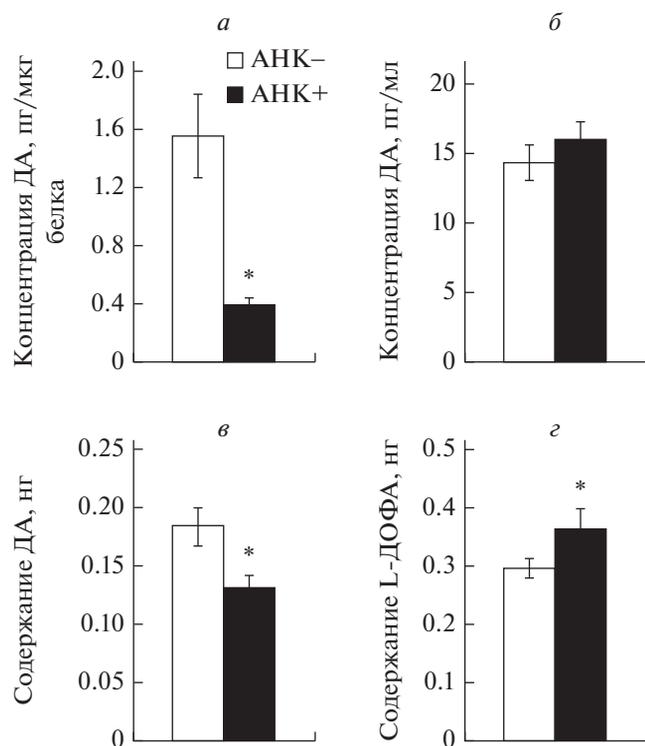


Рис. 3. Концентрация дофамина (ДА) в срезах (а) и инкубационной среде (б), суммарное содержание ДА срезах и инкубационной среде (в) и содержание L-диоксифенилаланина (L-ДОФА) в инкубационной среде (г) после инкубации срезов ТИС в буфере Кребса-Рингера с добавлением 2-амино-2-норборнанкарбоновой кислоты (АНК+) и без добавления 2-амино-2-норборнанкарбоновой кислоты (АНК-) на 60-й постнатальный день (группы: число инкубаций постоянного количества срезов с АНК или без нее – 12). * $p < 0.05$, при сравнении между группами после инкубации с АНК (АНК+) и без нее (АНК-).

Синтез ДА недофаминергическими моноферментными нейронами на ТИС от одного животного увеличивается с Э21 (38.96 ± 19.8 пг) по П60 (244.5 ± 78.5 пг) в 6 раз (рис. 4а). При этом доля синтеза ДА недофаминергическими моноферментными нейронами в общем синтезе ДА на Э21 составляла 72% и снижалась к П60 до 39%, т.е. в 1.8 раза (рис. 4б).

Содержание ДА и L-ДОФА в срезах черной субстанции и в инкубационной среде после инкубации с АНК и без АНК. На Э21 концентрация ДА в срезах черной субстанции после инкубации с АНК (0.06 ± 0.02 пг/мкг белка) не менялась по сравнению с концентрацией ДА в срезах после инкубации без АНК (0.054 ± 0.006 пг/мкг белка) (рис. 5а). Концентрация ДА в инкубационной среде после инкубации срезов с АНК или без АНК не определялась (была ниже разрешающей способности метода) (рис. 5б). Общее содержание ДА в инкубационной среде и в срезах не изменялось после инкубации с АНК (0.01 ± 0.004 нг) по сравнению с инку-

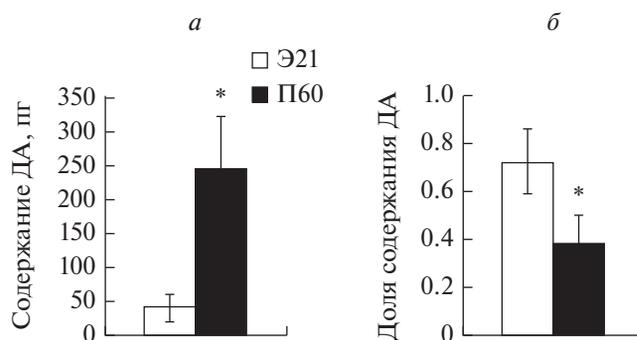


Рис. 4. Содержание дофамина (ДА), синтезированного моноферментными не дофаминергическими нейронами в срезах тубероинфундибулярной системы в течение 1 ч (а) и доля дофамина, синтезированного моноферментными недофаминергическими нейронами (б) от общего синтеза дофамина на 21-й эмбриональный день (Э21) и 60-й постнатальный (П60) день (группы: число инкубаций постоянного количества срезов на Э21 – 6 и на П60 – 12). * $p < 0.05$, при сравнении между группами на Э21 и П60.

бацией без АНК (0.008 ± 0.0008 нг) (рис. 5в). На Э21 содержание L-ДОФА в инкубационной среде так же не менялось после инкубации срезов черной субстанции с АНК (0.063 ± 0.027 нг) по сравнению с инкубацией без нее (0.074 ± 0.023 нг) (рис. 5г).

На П60 концентрация ДА в срезах черной субстанции после инкубации с АНК (0.86 ± 0.078 пг/мкг белка) не менялась по сравнению с концентрацией ДА в срезах после инкубации без АНК (0.77 ± 0.11 пг/мкг белка) (рис. 6а). Концентрация ДА в инкубационной среде после инкубации срезов с АНК (15.2 ± 2.6 пг/мл) не менялась по сравнению с концентрацией ДА в инкубационной среде после инкубации срезов без АНК (10.6 ± 3.4 пг/мл) (рис. 6б). Общее содержание ДА в инкубационной среде и в срезах не изменялось после инкубации с АНК (0.317 ± 0.036 нг) по сравнению с инкубацией без нее (0.26 ± 0.042 нг) (рис. 6в).

На П60 содержание L-ДОФА в инкубационной среде так же не менялось после инкубации срезов черной субстанции с АНК (0.431 ± 0.11 нг) по сравнению с инкубацией без нее (0.402 ± 0.13 нг) (рис. 6г).

ОБСУЖДЕНИЕ

Появление в конце 80-х годов иммуногистохимического метода выявления одновременно двух внутриклеточных антигенов, позволило показать, что в мозге, наряду с нейронами, содержащими оба фермента синтеза ДА – ТГ и ДАА, имеются нейроны, обладающие только одним из ферментов [11–14]. Несмотря на последующие многочисленные попытки понять функциональное значение этих нейронов, это не удалось

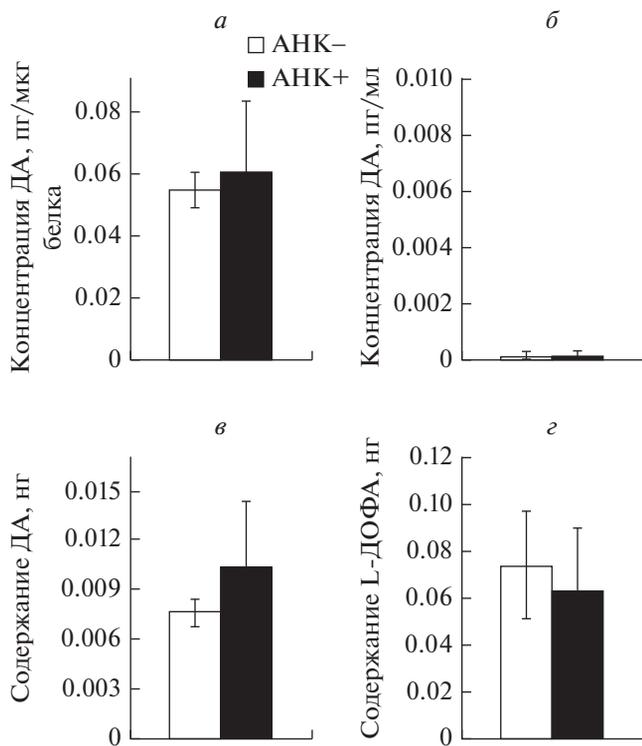


Рис. 5. Концентрация дофамина (ДА) в срезах (а) и инкубационной среде (б), суммарное содержание ДА срезах и инкубационной среде (в) и содержание L-диоксифенилаланина (L-ДОФА) в инкубационной среде (з) после инкубации срезов черной субстанции в буфере Кребса-Рингера с добавлением 2-амино-2-норборнанкарбоновой кислоты (АНК+) и без добавления 2-амино-2-норборнанкарбоновой кислоты (АНК-) на 21-й эмбриональный день (группы: число инкубаций постоянного количества срезов с АНК или без нее – 7). * $p < 0.05$, при сравнении между группами после инкубации с АНК (АНК+) и без нее (АНК-).

сделать до тех пор, пока не была найдена область мозга – ТИС, в которой у плодов крыс в конце пренатального периода содержатся практически только моноферментные нейроны [7]. Одновременно были получены косвенные доказательства синтеза ДА в этой области мозга, несмотря на отсутствие ДА-ергических нейронов в этот период онтогенеза. К ним относится высокое содержание ДА в культуре клеток эмбриональной ТИС и становление у крыс в конце пренатального периода характерного для взрослых животных дофаминового ингибиторного контроля секреции гипофизарного пролактина [15, 16].

Синтез ДА недофаминергическими нейронами тубероинфундибулярной системы у крыс в конце пренатального периода. Получение прямого доказательства синтеза ДА недофаминергическими моноферментными нейронами стало возможным только после разработки принципиально нового методического подхода *ex vivo* [5]. Этот подход

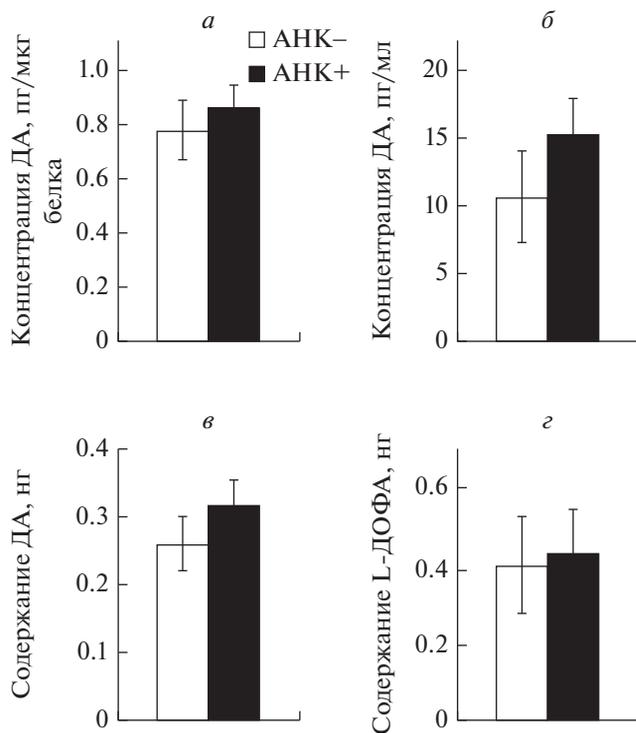


Рис. 6. Концентрация дофамина (ДА) в срезах (а) и инкубационной среде (б), суммарное содержание ДА срезах и инкубационной среде (в) и содержание L-диоксифенилаланина (L-ДОФА) в инкубационной среде (з) после инкубации срезов черной субстанции в буфере Кребса-Рингера с добавлением 2-амино-2-норборнанкарбоновой кислоты (АНК+) и без добавления 2-амино-2-норборнанкарбоновой кислоты (АНК-) на 60-й постнатальный день (группы: число инкубаций постоянного количества срезов с АНК или без нее – 8). * $p < 0.05$, при сравнении между группами после инкубации с АНК (АНК+) и без нее (АНК-).

позволил оценить и сравнить уровень синтеза ДА при инкубации нейронов ТИС в буфере Кребса-Рингера и после инкубации в буфере Кребса-Рингера в присутствии конкурентного ингибитора мембранного переносчика L-ДОФА и, следовательно, при ингибировании кооперативного синтеза ДА. В качестве показателя уровня синтеза ДА использовали общее содержание ДА в нейронах и в среде после инкубации в течение часа. Так, было показано, что при инкубации суспензии нейронов ТИС плодов крыс в буфере Кребса-Рингера в присутствии L-тирозина в качестве конкурентного ингибитора мембранного переносчика L-ДОФА, синтез ДА был значительно ниже, чем при инкубации без добавления L-тирозина. В контроле оценивали синтез ДА в суспензии однородной популяции ДА-ергических нейронов в черной субстанции. В отличие от нейронов ТИС, инкубация нейронов ЧС с L-тирозином сопровождалась увеличением синтеза ДА, поскольку

L-тирозин является субстратом синтеза ДА в этих нейронах [6].

Несмотря на то, что приведенные выше доказательства кооперативного синтеза ДА моноферментными нейронами не вызывают сомнения, они не позволили количественно оценить уровень кооперативного синтеза ДА в ТИС у крыс в конце пренатального периода, по крайней мере, по трем причинам. Во-первых, кооперативный синтез оценивали только во фракции тел нейронов ТИС, хотя наиболее интенсивный синтез ДА происходит в терминалах аксонов в срединном возвышении. Во-вторых, L-тирозин, который, хотя и является ингибитором мембранного переносчика L-ДОФА, способен включаться в метаболизм ДА. И, наконец, из известных в настоящее время конкурентных ингибиторов, L-тирозин обладает не самой высокой аффинностью к мембранному переносчику L-ДОФА [17]. Это означает, что L-тирозин не в состоянии полностью заингибировать кооперативный синтез ДА, а следовательно в экспериментах с его использованием нельзя количественно оценить уровень кооперативного синтеза ДА.

Исходя из выше изложенных критических замечаний, при проведении данной работы были внесены соответствующие изменения в схему экспериментов, позволившие дать не только качественную, но и количественную оценку кооперативного синтеза ДА недофаминергическими нейронами. Во-первых, кооперативный синтез ДА оценивали у плодов крыс на Э21 в вибратомных срезах ТИС, включающих не только тела нейронов, локализованных в аркуатном ядре, но и в терминалах аксонов, проецирующихся в срединное возвышение. Во-вторых, в качестве конкурентного ингибитора мембранного переносчика L-ДОФА использовали синтетический ингибитор АНК (рис. 7а), не включающийся в нейрональный метаболизм и обладающую наиболее высокой аффинностью по сравнению с другими конкурентными ингибиторами мембранного переносчика больших нейтральных аминокислот [17–19].

Как и предполагалось, при использовании усовершенствованного методического подхода в данной работе удалось получить не только такие же, как и раньше, качественные результаты [6], но и важные количественные характеристики кооперативного синтеза ДА недофаминергическими нейронами. Так, независимо от использования суспензии нейронов или срезов ТИС и различных ингибиторов мембранного переносчика L-ДОФА – L-тирозина или АНК, общее содержание ДА в нейронах/срезах и в среде после инкубации в буфере Кребса-Рингера было намного выше, чем после инкубации в буфере Кребса-Рингера с добавлением конкурентного ингибитора мембранного переносчика L-ДОФА. При этом в данной и в предыдущей работах было обнаружено увеличение

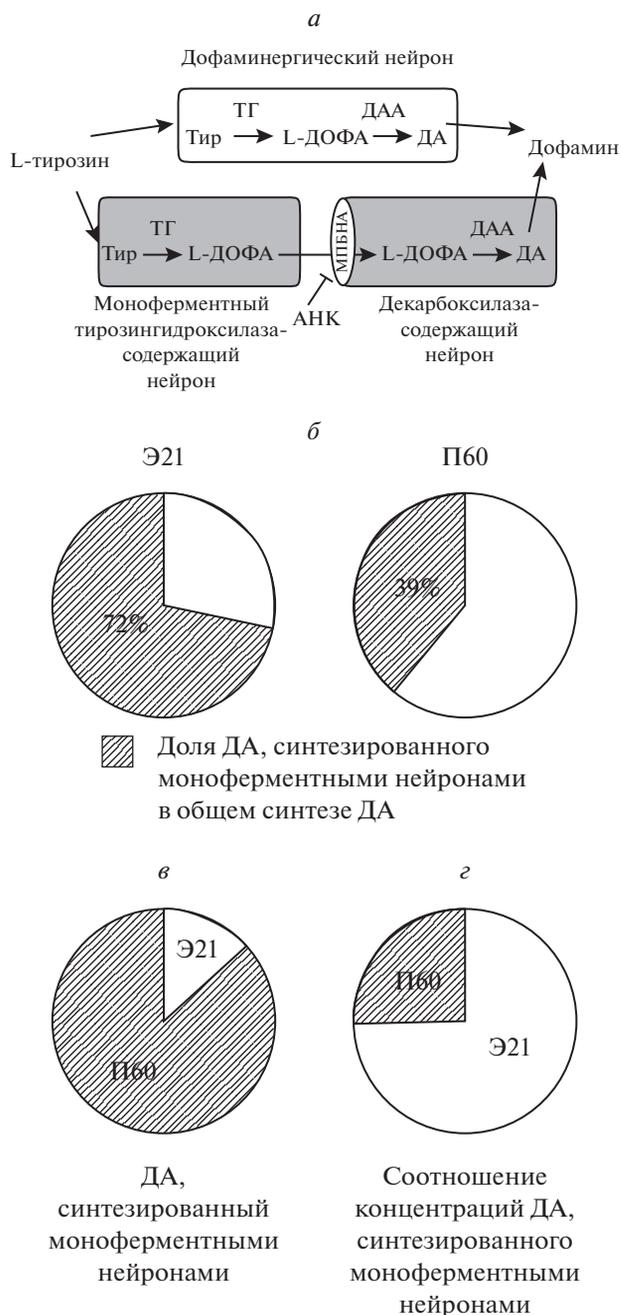


Рис. 7. Схема синтеза дофамина (ДА) дофаминергическими нейронами и нейронами, содержащими только тирозингидроксилазу (ТГ) и только декарбоксилазу ароматических L-аминокислот (ДАА) (а); схематическое изображение синтеза дофамина моноферментными нейронами в тубероинфундибулярной системе у крыс на 21-й эмбриональный день (Э21) и 60-й постнатальный день (П60); (б) вклад моноферментных нейронов в общий синтез дофамина, (в) соотношения величин абсолютного синтеза дофамина моноферментными нейронами и (г) соотношения концентраций дофамина, синтезированного моноферментными нейронами. АНК, 2-амино-2-норборнанкарбионовая кислота; L-ДОФА, L-диоксифенилаланин; МПБНА, мембранный переносчик больших нейтральных L-аминокислот; Тир, L-тирозин.

содержания L-ДОФА в инкубационной среде при использовании ингибитора мембранного переносчика нейтральных аминокислот. В совокупности приведенные данные, полученные в предыдущем [6] и в данном исследовании, являются прямым качественным доказательством наличия кооперативного синтеза ДА моноферментными нейронами у крыс в конце пренатального периода. Однако в данной работе был дополнительно получен ряд важных количественных результатов. Во-первых, использование АНК в качестве конкурентного ингибитора L-ДОФА привело к многократному снижению содержания/синтеза ДА как в срезах, так и в среде, а в предыдущей работе с использованием L-тирозина — только в среде. Эти данные подтверждают наше предположение о том, что основной синтез ДА в моноферментных нейронах осуществляется в терминалях аксонов в срединном возвышении. Во-вторых, разница между общим содержанием ДА в срезах и в среде после инкубации в буфере Кребса-Рингера и в этом же буфере, но с добавлением АНК значительно превышает разницу между общим содержанием ДА в суспензии нейронов и в среде после инкубации в буфере Кребса-Рингера и после инкубации в буфере с добавлением L-тирозина. Эти данные подтверждают более высокую специфичность АНК по сравнению с известными конкурентными ингибиторами мембранного переносчика больших молекул нейтральных аминокислот.

Преимущество использования АНК — неметаболизирующегося синтетического ингибитора мембранного переносчика L-ДОФА, по сравнению с использованием L-тирозина — предшественника ДА, проявилось также в контроле. Так, при инкубации суспензии нейронов черной субстанции в присутствии L-тирозина значительно увеличилось содержание/синтез ДА, в то время как при инкубации срезов черной субстанции в присутствии АНК содержание/синтез ДА не изменились.

Синтез ДА недофаминергическими нейронами тубероинфундибулярной системы у взрослых крыс. Только через десять лет после получения прямых доказательств синтеза ДА недофаминергическими нейронами ТИС у крыс в конце пренатального периода [6], появились доказательства наличия такого же синтеза у взрослых животных [8]. Исследование кооперативного синтеза ДА у взрослых животных было выполнено на более высоком уровне, чем исследование кооперативного синтеза ДА у плодов. А именно, синтез ДА оценивали не в суспензии нейронов, а в срезах ТИС. При этом в качестве конкурентного ингибитора мембранного переносчика L-ДОФА использовали L-лейцин, не включающийся в метаболизм ДА [4, 20]. Учитывая то, что в отличие от плодов, у взрослых животных в ТИС, наряду с моноферментными нейронами, содержатся ДА-ергические нейроны и моноаминерги-

ческие аксоны (серотонинергические, норадренергические, дофаминергические) экстрагипоталамического происхождения, представления о спектре нейронов, участвующих в кооперативном синтезе были существенно расширены. Единственным обязательным и ключевым элементом кооперативного синтеза ДА недофаминергическими нейронами, независимо от возраста животного, остаются моноферментные нейроны, экспрессирующие ТГ и синтезирующие L-ДОФА. Что касается дальнейшей судьбы L-ДОФА, то он может превращаться в ДА не только в моноферментных ДАА-экспрессирующих нейронах, но и во всех моноаминергических нейронах, обладающих ДАА [5].

В данной работе, как и в предыдущей, исследование кооперативного синтеза ДА проводили, используя срезы ТИС взрослых крыс, однако вместо L-лейцина в буфере Кребса-Рингера вводили АНК — синтетический неметаболизирующийся ингибитор (рис. 7а), с более высокой аффинностью к мембранному переносчику L-ДОФА [17–19]. Это позволило подтвердить наличие кооперативного синтеза ДА и получить его новые важные количественные характеристики. Так, в данной работе получено дополнительное доказательство кооперативного синтеза ДА в нейронах ТИС у взрослых крыс в виде повышения содержания L-ДОФА в инкубационной среде в присутствии АНК. В предыдущей работе с использованием L-лейцина в качестве конкурентного ингибитора мембранного переносчика больших нейтральных аминокислот увеличение содержания L-ДОФА было обнаружено только после дополнительного применения толкопона — ингибитора катехол-О-метилтрансферазы — фермента деградации L-ДОФА [21]. Самое важное то, что с помощью АНК удалось показать, что абсолютное значение кооперативного синтеза ДА недофаминергическими нейронами ТИС значительно выше, чем это представлялось на основе данных полученных при инкубации срезов в присутствии L-лейцина.

Сравнительный количественный анализ кооперативного синтеза ДА в тубероинфундибулярной системе у крыс в онтогенезе. В исследованиях развития мозга с акцентом на дифференцировку моноаминергических нейронов было показано, что в ряде отделов мозга в перинатальном периоде доминируют моноферментные нейроны, экспрессирующие только ТГ или только ДАА [5]. Наиболее ярким примером является развивающаяся ТИС. Так, у крыс в конце пренатального периода более 99% нейронов, экспрессирующих ферменты синтеза ДА, представлены в равной пропорции моноферментными нейронами, содержащими только ТГ или только ДАА. В постнатальном периоде, наряду с моноферментными нейронами появляются ДА-ергические нейроны, число и доля которых постепенно возрастает в постнатальном периоде. У взрослых животных

около половины нейронов ТИС, экспрессирующих ферменты синтеза ДА, являются моноферментными и столько же ДА-ергическими [7]. Однако по соотношению нейронов с различным набором ферментов невозможно судить об уровне кооперативного синтеза ДА на различных этапах индивидуального развития. Поэтому в данной работе для решения этой задачи проведен сравнительный количественный анализ кооперативного синтеза ДА недофаминаргическими моноферментными нейронами в ТИС у крыс в конце пренатального периода и у взрослых животных. При этом показано, что доля кооперативного синтеза ДА от общего синтеза ДА моноферментными и ДА-ергическими нейронами в ТИС у плодов крыс почти в два раза больше, чем у взрослых животных (рис. 7б). Этот показатель в определенной степени коррелирует с изменением количественного соотношения моноферментных и ДА-ергических нейронов у плодов и у взрослых крыс [7]. С точки зрения функциональной роли ДА, произведенного моноферментными нейронами, особый интерес представляют наши данные, указывающие на шестикратное увеличение синтеза ДА моноферментными нейронами ТИС у крыс с Э21 до П60 (рис. 7в). При этом концентрация ДА, синтезированного моноферментными нейронами ТИС снижается в три раза с Э21 до П60 у крыс (рис. 7г).

Таким образом, доля синтеза ДА недофаминаргическими моноферментными нейронами по отношению к общему синтезу ДА гораздо выше у плодов крыс, чем у взрослых животных, причем абсолютное значение кооперативного синтеза ДА в этот период онтогенеза многократно возрастает.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе был применен усовершенствованный оригинальный метод изучения кооперативного синтеза на срезах ткани с использованием синтетического неметаболизируемого ингибитора мембранного переносчика больших нейтральных аминокислот – АНК. Это позволило провести сравнительный анализ кооперативного синтеза ДА недофаминаргическими нейронами в ТИС в онтогенезе – у плодов и взрослых крыс. Было впервые показано шестикратное увеличение синтеза ДА моноферментными нейронами ТИС у крыс с конца пренатального периода до взрослого состояния. Также впервые показано, что доля кооперативного синтеза ДА от общего синтеза ДА моноферментными и ДА-ергическими нейронами в ТИС у плодов крыс почти в два раза больше, чем у взрослых животных.

Таким образом, доля синтеза ДА недофаминаргическими моноферментными нейронами по отношению к общему синтезу ДА гораздо выше у плодов крыс, чем у взрослых животных, причем

абсолютное значение кооперативного синтеза ДА в этот период онтогенеза многократно возрастает.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РФФ 17-14-01422.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ben-Jonathan N., Hnasko R. // *Endocrine Reviews*. 2001. V. 22. P. 724–763.
2. Carli M., Evenden J.L., Robbins T.W. // *Nature*. 1985. V. 313. P. 679–682.
3. McDowell K., Chesselet M.F. // *Neurobiol. Dis.* 2012. V. 46. P. 597–606.
4. Vieira-Coelho M.A., Soares-Da-Silva P. // *Am. J. Phys.* 1998. V. 275. P. 104–112.
5. Ugrumov M.V. // *Adv. Pharmacol.* 2013. V. 68. P. 37–91.
6. Ugrumov M.V., Melnikova V.I., Lavrentyeva A.V., Kudrin V.S., Rayevsky K.S. // *Neuroscience*. 2004. V. 124. P. 629–635.
7. Ershov P.V., Ugrumov M.V., Calas A., Krieger M., Thibault J. // *J. Comp. Neurol.* 2002. V. 446. P. 114–122.
8. Ugrumov M., Taxi J., Pronina T., Kurina A., Sorokin A., Sapronova A., Calas A. // *Neuroscience*. 2014. V. 277. P. 45–54.
9. Paxinos G., Watson C. // *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Compact 6th ed. London: Academic Press, 2009.
10. Ashwell K.W.S., Paxinos G. // *Atlas of the Developing Rat Nervous System*. Compact 3d ed. London: Academic Press, 2008.
11. Meister B., Hökfelt T., Steinbusch H.W., Skagerberg G., Lindvall O., Geffard M., Joh T.H., Cuervo A.C., Goldstein M. // *J. Chem. Neuroanat.* 1988. V. 1. P. 59–64.
12. Okamura H., Kitahama K., Mons N., Ibata Y., Jouvet M., Geffard M. // *Neurosci. Lett.* 1988. V. 95. P. 42–46.
13. Nagatsu I., Komori K., Takeuchi T., Sakai M., Yamada K., Karasawa N. // *Brain Res.* 1990. V. 511. P. 55–62.
14. Ikemoto K., Kitahama K., Nishimura A., Jouvet A., Nishi K., Arai R., Jouvet M., Nagatsu I. // *Neurosci. Lett.* 1999. V. 269. P. 37–40.
15. Melnikova V.I., Orosco M., Rouch C., Calas A., Nicolaidis S., Proshlyakova E.V., Sapronova A.Y., Ugrumov M.V. // *Eur. J. Endocrinol.* 1998. V. 139. P. 337–342.
16. Melnikova V., Orosco M., Calas A., Sapronova A., Gainetdinov R., Delhay-Bouchaud N., Nicolaidis S., Rayevsky K., Ugrumov M. // *Neuroscience*. 1999. V. 89. P. 235–241.
17. Pankovich J.M., Jimbow K. // *Biochem. J.* 1991. V. 280. P. 721–725.
18. Sebastianelli L., Ledonne A., Marrone M.C., Bernardi G., Mercuri N.B. // *Experimental. Neurology*. 2008. V. 212. P. 230–233.
19. Handlogten M.E., Weissbach L., Kilberg M.S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1982. V. 104. P. 307–313.
20. Uchino H., Kanai Y., Kim D.K., Wempe M.F., Chairoungdua A., Morimoto E., Anders M.W., Endou H. // *Mol. Pharmacol.* 2002. V. 61. P. 729–737.
21. Reenilä I., Männistö P.T. // *Medical. Hypotheses*. 2001. V. 57. P. 628–632.

Synthesis of Dopamine by Non-dopaminergic Neurons of the Rat Tuberoinfundibular System during Ontogeny

T. S. Pronina^a, L. K. Dil'mukhametova^a, A. I. Kurtova^a, and M. V. Ugrumov^{a, b}

^aLaboratory of Neural and Neuroendocrine Regulations, Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^bDepartment of Psychology, Faculty of Social Sciences, The National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russia

Received December 3, 2018;

Revised December 18, 2018;

Accepted December 28, 2018

In the early 2000s, it was shown that dopamine is synthesized not only by dopaminergic neurons possessing the necessary set of enzymes, tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase (AAD), but also by jointly non-dopaminergic (monoenzymatic) neurons containing one of the enzymes. In this case, L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), which is synthesized in neurons containing tyrosine hydroxylase, is transferred to neurons containing AAD, where dopamine is synthesized. The evidence of cooperative dopamine synthesis in our previous studies was a decrease in the total dopamine synthesis during incubation of a suspension of neurons of the tuberoinfundibular system (TIS) of fetuses or TIS slices from adult rats in the presence of neutral amino acid, a competitive inhibitor of the membrane L-DOPA carrier. In this work, the previously applied methodological approach was improved by using only sections of TIS and 2-amino-2-norbornanecarboxylic acid, a synthetic non-metabolizable L-DOPA membrane carrier inhibitor. This made it possible to confirm the presence of cooperative dopamine synthesis in TIS in fetuses and adult rats, and to obtain additional evidence of this synthesis in the form of an increase in the intercellular content of L-DOPA during inhibition of its membrane carrier. In addition, using an improved method we quantitatively characterized the synthesis of dopamine by nondopaminergic neurons and compared it in fetuses and adult rats. It was shown that the proportion of cooperative dopamine synthesis from the total dopamine synthesis by monoenzymatic and dopaminergic neurons in TIS in rat fetuses is 1.8 times higher than in adult animals. A six-fold increase in the synthesis of dopamine by rat TIS monoenzymatic neurons from the end of the prenatal period to adulthood are of particular interest from the view point of the functional role of dopamine produced by monoenzymatic neurons. Thus, in ontogeny, the proportion of dopamine synthesis by nondopaminergic monoenzymatic neurons in the general synthesis of dopamine is significantly reduced, and the absolute value of cooperative dopamine synthesis increases by many times.

Keywords: hypothalamus, substantia nigra, dopamine, L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), 2-amino-2-norbornane carboxylic acid (ANC), high performance liquid chromatography