

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 577.175.829,57.032,611.814.1

СИНТЕЗ L-ДИОКСИФЕНИЛАЛАНИНА МОНОФЕРМЕНТНЫМИ ТИРОЗИНГИДРОКСИЛАЗА-СОДЕРЖАЩИМИ НЕРВНЫМИ ВОЛОКНАМИ В СУПРАХИАЗМАТИЧЕСКОМ ЯДРЕ У КРЫС В ОНТОГЕНЕЗЕ

© 2020 г. Т. С. Пронина^{1,*}, Ю. О. Никишина¹, Л. К. Дильмухаметова¹,
А. Р. Муртазина¹, М. В. Угрюмов^{1,2}

¹Лаборатория нервных и нейроэндокринных регуляций, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

²Отделение психологии, факультет социальных наук, Национальный исследовательский университет
“Высшая школа экономики”, Москва, Россия

Поступила в редакцию 15.07.2019 г.

После доработки 03.08.2019 г.

Принята к публикации 04.09.2019 г.

Супрахиазматическое ядро (СХЯ) обеспечивает регуляцию функционирования организма в соответствии с циркадными ритмами благодаря содержащимся в нем нейронам-пейсмейкерам и афферентам, модулирующими эти нейроны. Один из афферентов представлен нервными волокнами, содержащими только первый фермент синтеза катехоламинов — тирозингидроксилазу (ТГ). В онтогенезе концентрация этих волокон (количество на единицу объема ткани) достигает максимума на 10-й постнатальный день (П10), а затем постепенно снижается. Целью данной работы явилась проверка нашего предположения о том, что в ТГ-содержащих волокнах в СХЯ у крыс из L-тирозина синтезируется L-ДОФА как конечный секреторный продукт, причем эффективность этого синтеза выше в раннем постнатальном периоде, чем у взрослых. Синтез L-ДОФА оценивали по увеличению суммарного содержания L-ДОФА в СХЯ и в инкубационной среде после двухчасовой инкубации СХЯ в среде с L-тирозином или без него. Показано, что добавление L-тирозина в среду инкубации приводило к многократному увеличению суммарного содержания L-ДОФА в СХЯ и в среде, что является доказательством синтеза L-ДОФА как конечного продукта в ТГ-содержащих волокнах. Сравнительный анализ синтеза L-ДОФА в СХЯ на П10 и П60 показал, что скорость синтеза (отношение суммарного содержания L-ДОФА в СХЯ и в инкубационной среде ко времени инкубации) на П60 превосходит скорость синтеза на П10, в то время как эффективность синтеза L-ДОФА (отношение скорости синтеза L-ДОФА к содержанию общего белка в СХЯ) выше на П10. Таким образом, получены доказательства синтеза L-ДОФА в ТГ-содержащих нервных волокнах СХЯ, причем эффективность этого синтеза у крыс в раннем постнатальном периоде выше, чем у взрослых животных.

Ключевые слова: супрахиазматическое ядро, дофамин, L-диоксифенилаланин (L-ДОФА), высокоэффективная жидкостная хроматография

DOI: 10.31857/S1027813320020089

ВВЕДЕНИЕ

Супрахиазматическое ядро (СХЯ) — уникальная структура мозга, обеспечивающая регуляцию важнейших функций организма в соответствии с циркадными ритмами [1, 2]. Хотя генерация циркадных ритмов в этом ядре нейронами-пейсмейкерами предeterminирована генетически, их функциональная активность модулируется в определенной степени тремя афферентными входами — аксонами: нейропептид-Y продуцирующих нейронов коленчатого

тела, серотонинергических нейронов ядра шва и нейронов сетчатки [3, 4].

Наряду с упомянутыми тремя афферентными входами существует и четвертый, который, однако, хорошо выражен только в раннем постнатальном периоде. Он представлен аксонами нейронов, расположенных вблизи от СХЯ, в которых содержится тирозингидроксилаза (ТГ) — первый скорость-лимитирующий фермент синтеза катехоламинов [5]. Получены доказательства того, что, несмотря на наличие первого ключевого фермента синтеза катехоламинов, эти аксоны не являются катехоламинергическими — они не экспрессируют декарбоксилазу ароматических L-аминокис-

* Адресат для корреспонденции: 119334 Россия, Москва, ул. Вавилова, д. 26; тел./факс: (499)135-88-42; e-mail: tatiana.pronina@mail.ru.



Рис. 1. Схема эксперимента: инкубация срезов супрахиазматического ядра в буфере Кребса–Рингера и толкапона с добавлением и в отсутствие L-тирозина. ВЭЖХ-ЭД, высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимической детекцией; ДА, дофамин; L-ДОФА, L-диоксифенилаланин; БКР, буфер Кребса–Рингера.

лот (далее – “декарбоксилаза”) – второй фермент синтеза катехоламинов, и не обладают механизмом обратного захвата катехоламинов [6]. На этом основании предполагается, что конечным секреторным продуктом моноферментных ТГ-содержащих нервных волокон в СХЯ является L-диоксифенилаланин (L-ДОФА).

Судьба L-ДОФА, гипотетически синтезированного в ТГ-содержащих нервных волокнах в СХЯ может быть двоякой. Во-первых, он может захватываться вазопрессинергическими нейронами и серотонинергическими аксонами, содержащими декарбоксилазу, где будет служить субстратом для синтеза дофамина (ДА) [7]. Наличие такого рода кооперативного синтеза ДА недофаминергическими нейронами, содержащими только ТГ, и нейронами, содержащими декарбоксилазу, было показано в ряде отделов мозга в норме и при патологии [8, 9]. Во-вторых, L-ДОФА может играть роль нейротрансмиттера [10], который оказывает действие на специфический рецептор к L-ДОФА GPR143 [11]. Несмотря на то, что уже давно было высказано предположение о возможности синтеза L-ДОФА в ТГ-содержащих волокнах СХЯ у животных в раннем постнатальном периоде [12], до сих пор это не было доказано. Поэтому целью данной работы явилась проверка нашего предположения о том, что в СХЯ синтезируется L-ДОФА, как конечный секреторный продукт, причем в раннем постнатальном периоде это синтез выражен в большей степени, чем у взрослых животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные, эксперименты. Работу проводили на самцах крыс линии Вистар на 10-й постнатальный день (П10) и П60. День рождения крысят считали П1. 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.

Инкубация срезов супрахиазматического ядра. Крысы на П10 ($n = 15$) и П60 ($n = 25$) 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-глюкозу 10, HEPES 20, аскорбиновая кислота 0.1, pH 7.4, 4°C) приготавливали фронтальные срезы мозга толщиной 300 мкм на уровне СХЯ: на П10 в соответствии с атласом Ashwell and Paxinos [13] и на П60 в соответствии с атласом Paxinos and Watson [14]. Далее под контролем бинокулярной лупы при 4°C каждое из билатеральных СХЯ вырезали из фронтальных срезов мозга. В термостатируемые (37°C) непроточные камеры объемом 1000 мкл помещали по одной пробе ткани: (а) оба билатеральных СХЯ от 5-ти животных на П10; (б) оба билатеральных СХЯ от 3-х животных на П60. В половину исследуемых камер добавляли буфер Кребса–Рингера, содержащий 0.1 мМ толкапона (Sigma, США) – ингибитора катехол-*o*-метилтрансферазы (фермента деградации катехоламинов и L-ДОФА) и 0.5 мМ L-тирозина (Sigma, США), а в оставшиеся камеры – буфер Кребса–Рингера с толкапоном в конечной концентрации 0.1 мМ. Затем пробы инкубировали в течение 2-х часов (рис. 1). После окончания инкубации пробы центрифугировали 10 мин при 1000 g при 4°C и разделяли осадок (ткань СХЯ) и супернатант (инкубационную среду). Осадок замораживали в жидком азоте. В собранный супернатант добавляли по 100 мкл 1 М HClO₄ и по 2 пмоль/мл 3,4-дигидроксibenзиламина в качестве внутреннего стандарта для высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ-ЭД). После этого супернатант также замораживали в жидком азоте. Замороженные образцы хранили при –70°C до определения ДА и L-ДОФА.

Высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимической детекцией. Содержание ДА и L-ДОФА определяли в срезах СХЯ, полученных от крыс на П10 и П60, а также в срезах СХЯ и в инкубационной среде после инкубации с помощью ВЭЖХ-ЭД. Перед проведением ВЭЖХ-ЭД образцы с замороженным осадком гомогенизировали с помощью ультразвукового гомогенизатора в 50 мкл 0.02 Н HClO₄ с 25 пмоль/мл 3,4-дигидроксibenзиламина. Полученные гомогенаты центрифугировали 20 минут при 20000 g при 4°C и собирали супернатант, в котором затем определяли содержание ДА и L-ДОФА.

Определение проводили на обращенно-фазовой колонке (100 × 4 mm ReproSil-Pur C18, 3 μm) (Dr. Maisch, Германия). Подвижной фазой служил

Таблица 1. Содержание дофамина, приведенное к содержанию в билатеральных супрахиазматических ядрах (СХЯ), полученных от одной крысы на 10-й постнатальный день (П10) или на П60 в срезах СХЯ, инкубационной среде и суммарно в срезах СХЯ и инкубационной среде после инкубации СХЯ в буфере Кребса–Рингера с добавлением L-тирозина (Тир+) или в буфере Кребса–Рингера без L-тирозина (Тир–)

Возраст крыс	П10		П60	
Буфер Кребса–Рингера с или без L-тирозина	Тир–	Тир+	Тир–	Тир+
Содержание дофамина, пг:				
В срезах СХЯ	2.526 ± 0.423	1.914 ± 0.441	3.929 ± 0.961	4.44 ± 0.698
В инкубационной среде	2.665 ± 1.223	4.567 ± 1.002	25.932 ± 10.581	41.452 ± 10.819
Суммарно в срезах СХЯ и в инкубационной среде	5.345 ± 1.076	6.481 ± 0.855	29.861 ± 11.26	45.891 ± 10.793

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 1 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). Общее содержание ДА и L-ДОФА в образцах, включающих СХЯ от нескольких животных пересчитывали на билатеральные СХЯ от одного животного.

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

Скорость синтеза L-ДОФА ТГ-содержащими нейронами в СХЯ рассчитывали как:

$$S_{\text{ДОФА}} = [(C_{\text{Т+}} + C_{\text{С+}}) - (C_{\text{Т-}} + C_{\text{С-}})]/h, \text{ где}$$

$C_{\text{Т-}}$ – содержание L-ДОФА в СХЯ после инкубации без добавления L-тирозина, приведенное на массу белка СХЯ от одного животного,

$C_{\text{С-}}$ – содержание L-ДОФА в инкубационной среде после инкубации без добавления L-тирозина, приведенное на массу белка СХЯ от одного животного,

$C_{\text{Т+}}$ – содержание L-ДОФА в СХЯ после инкубации с добавлением L-тирозина, приведенное на массу белка СХЯ от одного животного,

$C_{\text{С+}}$ – содержание L-ДОФА в инкубационной среде после инкубации с добавлением L-тирозина, приведенное на массу белка СХЯ от одного животного,

h – время инкубации в часах.

Коэффициент эффективности синтеза L-ДОФА ТГ-содержащими нейронами в СХЯ рассчитывали как:

$$K_{\text{ДОФА}} = S_{\text{ДОФА}}/m, \text{ где}$$

$S_{\text{ДОФА}}$ – скорость синтеза L-ДОФА,

m – масса белка СХЯ от одного животного.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Содержание дофамина в супрахиазматическом ядре и в инкубационной среде после инкубации срезов с L-тирозином и без L-тирозина

Содержание ДА в билатеральном СХЯ крысы. На П10 содержание ДА в срезах билатерального СХЯ (далее – СХЯ) крысы после их инкубации с L-тирозином не менялось по сравнению с содержанием ДА в срезах СХЯ крысы после их инкубации без L-тирозина (табл. 1). На П60 содержание ДА в срезах СХЯ после их инкубации с L-тирозином не менялось по сравнению с содержанием ДА в срезах СХЯ после их инкубации без L-тирозина (табл. 1). При этом содержание ДА в СХЯ на П60 было в 1.5 раза больше, чем содержание ДА в СХЯ на П10.

Содержание ДА в инкубационной среде после инкубации СХЯ крысы. На П10 содержание ДА в инкубационной среде после инкубации срезов СХЯ крысы с L-тирозином не менялось по сравнению с содержанием ДА в инкубационной среде после инкубации срезов СХЯ без L-тирозина (табл. 1). На П60 содержание ДА в инкубационной среде после инкубации срезов СХЯ крысы с L-тирозином не менялось по сравнению с содержанием ДА в инкубационной среде после инкубации срезов СХЯ без L-тирозина (табл. 1). При

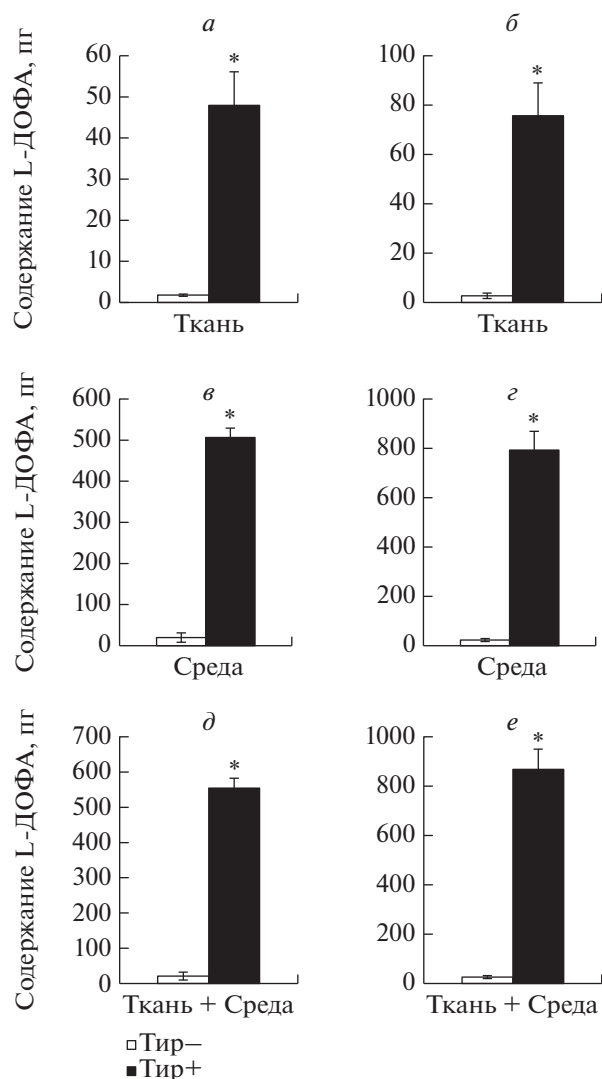


Рис. 2. Содержание L-диоксифенилаланина (L-ДОФА) в билатеральном супрахиазматическом ядре (СХЯ) крысы на 10-й постнатальный день (П10) (а, в, д) и на П60 (б, г, е): а, б – в срезах СХЯ (а, б), в инкубационной среде (в, г) и суммарно в срезах СХЯ и в инкубационной среде (д, е) после инкубации СХЯ в буфере Кребса–Рингера и толкапона с добавлением L-тирозина (Тир+) или в его отсутствие (Тир–). * $p < 0.05$, при сравнении групп после инкубации с L-тирозином (Тир+) и без него (Тир–).

этом содержание ДА в инкубационной среде на П60 было в 9.5 раз больше, чем содержание ДА в инкубационной среде на П10.

Суммарное содержание ДА в срезах СХЯ и в инкубационной среде. На П10 суммарное содержание ДА в срезах СХЯ и в инкубационной среде после инкубации срезов с L-тирозином не менялось по сравнению с содержанием ДА в СХЯ и инкубационной среде после инкубации срезов без L-тирозина (табл. 1). На П60 суммарное содержание ДА в срезах СХЯ и в инкубационной

среде после инкубации срезов с L-тирозином не менялось по сравнению с содержанием ДА в срезах СХЯ и в инкубационной среде после инкубации срезов без L-тирозина (табл. 1). При этом суммарное содержание ДА в СХЯ и в инкубационной среде увеличилось в 5.6 раза с П10 по П60.

Содержание L-ДОФА в супрахиазматическом ядре и в инкубационной среде после инкубации срезов с L-тирозином и без L-тирозина

Содержание L-ДОФА в билатеральном СХЯ крысы. На П10 содержание L-ДОФА в срезах СХЯ крысы после инкубации срезов с L-тирозином (48 ± 8.1 пг) было в 27 раз больше, чем содержание L-ДОФА в срезах СХЯ после их инкубации без L-тирозина (1.8 ± 0.3 пг) (рис. 2а). На П60 содержание L-ДОФА в срезах СХЯ после их инкубации с L-тирозином (75.7 ± 13.3 пг) было в 28 раз больше, чем содержание L-ДОФА в срезах СХЯ после их инкубации без L-тирозина (2.7 ± 1.1 пг) (рис. 2б). При этом содержание L-ДОФА в срезах СХЯ на П60 было в 1.5 раза больше, чем содержание L-ДОФА в срезах СХЯ на П10.

Содержание L-ДОФА в инкубационной среде после инкубации СХЯ крысы. На П10 содержание L-ДОФА в инкубационной среде после инкубации срезов СХЯ с L-тирозином (506 ± 23 пг) было в 25.5 раз больше по сравнению с содержанием L-ДОФА в инкубационной среде после инкубации срезов СХЯ без L-тирозина (19.9 ± 11 пг) (рис. 2в). На П60 содержание L-ДОФА в инкубационной среде после инкубации срезов СХЯ с L-тирозином (793 ± 76 пг) было в 34 раза больше по сравнению с содержанием L-ДОФА в инкубационной среде после инкубации срезов СХЯ без L-тирозина (23.4 ± 6 пг) (рис. 2г). При этом содержание L-ДОФА в инкубационной среде при инкубации СХЯ без L-тирозина на П60 было на 17% больше, чем на П10.

Суммарное содержание ДА в срезах СХЯ и в инкубационной среде. На П10 суммарное содержание L-ДОФА в срезах СХЯ и в инкубационной среде после инкубации срезов СХЯ с L-тирозином (554 ± 28 пг) было в 27 раз больше по сравнению с содержанием L-ДОФА в срезах СХЯ и в инкубационной среде после инкубации срезов СХЯ без L-тирозина (21.1 ± 11 пг) (рис. 2д). На П60 суммарное содержание L-ДОФА в срезах СХЯ и в инкубационной среде после инкубации срезов СХЯ с L-тирозином (868 ± 81 пг) было в 33 раз больше по сравнению с содержанием L-ДОФА в срезах СХЯ и в инкубационной среде после инкубации срезов СХЯ без L-тирозина (26.1 ± 5.9 пг) (рис. 2е). При этом суммарное содержание L-ДОФА в СХЯ и в инкубационной среде после инкубации срезов СХЯ без L-тирозина на П60 была на 24% меньше, чем на П10.

Синтез L-ДОФА. Скорость синтеза L-ДОФА на П10 (276 ± 12.6 пг/ч) была в 1.5 раза меньше, чем на П60 (421 ± 40.7 пг/ч) (рис. 3а). При этом эффективности синтеза L-ДОФА с учетом размеров СХЯ на П10 (17.4 ± 0.8 пг/ч/мкг) была на 24% больше, чем на П60 (14 ± 1.4 пг/ч/мкг) (рис. 3б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то, что уже десять лет назад было сформулировано предположение о том, что конечным секреторным продуктом в многочисленных ТГ-иммунореактивных немонаминергических волокнах в СХЯ у грызунов в раннем постнатальном периоде является L-ДОФА [12], до сих пор отсутствовали попытки проверить это предположение [12]. Не было также предпринято попыток проверить и второе предположение о том, что L-ДОФА, синтезирующийся в ТГ-содержащих моноферментных волокнах после выделения может захватываться в нейроны, содержащие декарбоксилазу (вазопрессинергические нейроны и серотонинергические аксоны) для последующего синтеза ДА (рис. 4) [12]. В первую очередь, это объясняется трудностями, связанными с выделением и манипуляциями с СХЯ животных, особенно в раннем постнатальном периоде из-за его малого размера. Более того, содержание в таком малом объеме нервной ткани моноаминов и их метаболитов а priori должно находиться на грани или за пределами разрешающей способности даже таких высокочувствительных биохимических методов как ВЭЖХ-ЭД. Объем СХЯ у крыс на П10 равен 0.0024 мм^3 (6.3 мкг белка), а на П60 — 0.0055 мм^3 (21.5 мкг белка). Действительно нам удалось выявить ДА и L-ДОФА с помощью ВЭЖХ-ЭД только при пулировании СХЯ от нескольких животных и добавлении в инкубационную среду ингибитора фермента деградации.

Предполагается, что в отсутствии катехоламинергических волокон в СХЯ [6], детектируемый в этом ядре ДА может синтезироваться только совместно недофаминергическими нейрональными структурами, содержащими по одному из комплементарных ферментов синтеза ДА — ТГ или декарбоксилазу (рис. 4). Так, в процессе доказательства наличия кооперативного синтеза ДА недофаминергическими моноферментными нейронами в аркуатном ядре было показано, что L-ДОФА, синтезированный, как конечный продукт, в моноферментных ТГ-содержащих нейронах, поступает в моноферментные декарбоксилаза-содержащие нейроны, где происходит синтез ДА [8]. По аналогии L-ДОФА, синтезирующийся в моноферментных ТГ-содержащих нервных волокнах, может поступать в серотонинергические волокна и в вазопрессинергические нейроны, экспрессирующие декарбоксилазу, где возможно его превращение в ДА [12].

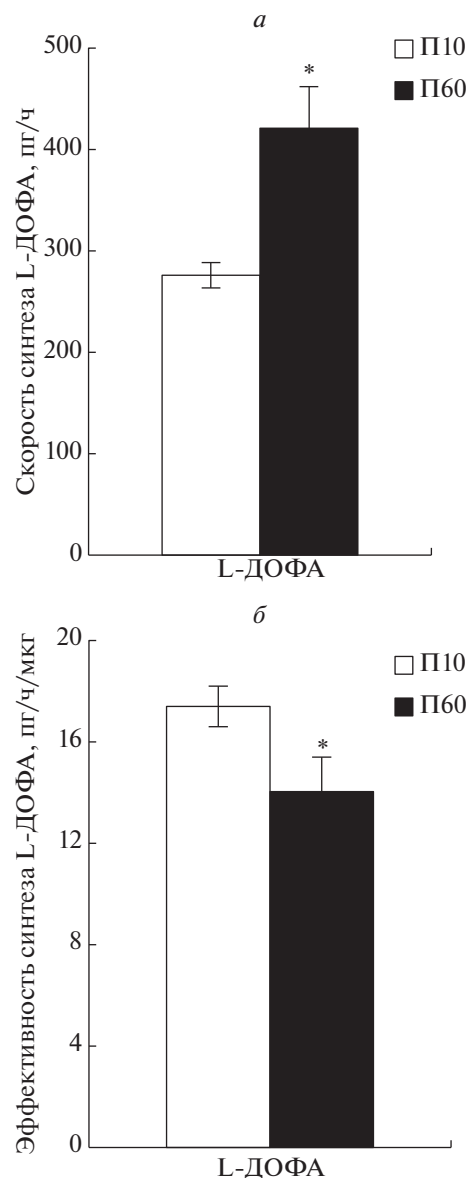


Рис. 3. Скорость синтеза L-диоксифенилаланина (L-ДОФА) (а) и эффективность синтеза L-ДОФА (б) в супрахиазматическом ядре у крыс на 10-й постнатальный день (П10) и на П60. * $p < 0.05$, при сравнении между группами на П10 и П60.

В этой работе нами впервые была предпринята попытка получить прямое доказательство синтеза L-ДОФА в моноферментных ТГ-содержащих волокнах СХЯ, как конечного секреторного продукта. С этой целью выделенные СХЯ инкубировали в буфере Кребса–Рингера с добавлением в среду L-тирозина — субстрата синтеза, и толкапона — ингибитора катехол-*o*-метил трансферазы, метаболизирующего L-ДОФА и ДА [15]. По нашим представлениям, в этом опыте экзогенный L-тирозин должен, с одной стороны, включаться в синтез L-ДОФА в моноферментных ТГ-содержа-

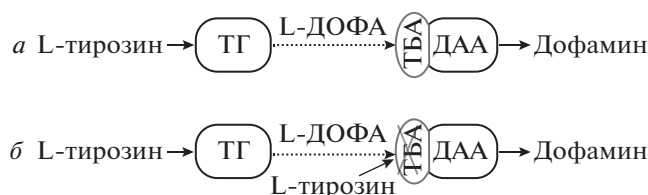


Рис. 4. а — Схема кооперативного синтеза дофамина моноферментными недофаминергическими нейрональными элементами — ТГ-содержащими нервными волокнами и декарбоксилаза-содержащими серотонинергическими нервными волокнами и/или вазопрессинергическими нейронами. б — Схема синтеза Л-ДОФА, как конечного секреторного продукта, моноферментными ТГ-содержащими нервными волокнами. ДАА, декарбоксилаза ароматических L-аминокислот; Л-ДОФА, L-диоксифенилаланин; ТБА, транспортер больших нейтральных аминокислот; ТГ, тирозингидроксилаза.

щих нервных волокнах, а с другой стороны, выделившись из моноферментных ТГ-содержащих волокон, накапливаться в среде. При этом захват Л-ДОФА в вазопрессинергические нейроны и серотонинергические волокна, содержащие декарбоксилазу, с последующим синтезом ДА можно исключить, поскольку мембранный транспортер больших ароматических аминокислот и Л-ДОФА ингибируется Л-тирозином (рис. 4).

В проведенных экспериментах были получены доказательства сформулированного выше предположения о синтезе Л-ДОФА в моноферментных ТГ-содержащих волокнах. Так, добавление L-тирозина в среду инкубации СХЯ крыс как на П10, так и на П60 привело к многократному увеличению суммарного содержания Л-ДОФА в ткани СХЯ и в среде на фоне неизменного суммарного содержания ДА в ткани и в среде. Важно подчеркнуть, что при инкубации СХЯ в присутствии L-тирозина содержание Л-ДОФА увеличивается в гораздо большей степени в инкубационной среде, чем в ткани ядра. Этот факт свидетельствует о том, что в моноферментных ТГ-содержащих нервных волокнах отсутствует механизм запасаения Л-ДОФА как конечного секреторного продукта. Предполагается, что Л-ДОФА, секретируемый ТГ-содержащими волокнами, может в качестве нейротрансмиттера участвовать в регуляции функций СХЯ как биологических часов в течение всей жизни, и в качестве морфогенетического фактора в регуляции развития СХЯ в раннем постнатальном периоде онтогенеза. Кроме того, Л-ДОФА, секретируемый ТГ-содержащими волокнами, вероятно, может служить субстратом для синтеза ДА в декарбоксилаза-содержащих нейрональных структурах СХЯ — в вазопрессинергических нейронах и серотонинергических нервных волокнах.

Второй задачей данной работы было оценить количественно и сравнить синтез Л-ДОФА в СХЯ

у крыс на П10 и П60. В нашем раннее проведенном количественном иммуоцитохимическом исследовании было показано, что плотность сплетения моноферментных ТГ-содержащих волокон (количество волокон на единицу объема ткани) в СХЯ быстро возрастает от П2 до П10, а затем постепенно снижается [6]. На этом основании было сделано предположение о снижении после П10 с возрастом уровня кооперативного синтеза ДА в СХЯ [12]. С этой точки зрения, наиболее важными количественными характеристиками синтеза Л-ДОФА, по которым его можно сравнивать на различных этапах онтогенеза, является скорость синтеза Л-ДОФА на ядро (отношение суммарного содержания Л-ДОФА в ткани ядра и в инкубационной среде к времени инкубации) и эффективность синтеза Л-ДОФА на единицу содержания общего белка в СХЯ (отношение скорости синтеза Л-ДОФА на ядро к содержанию общего белка в ядре). По первому показателю скорость синтеза Л-ДОФА в СХЯ у крыс на П60 превосходит скорость синтеза Л-ДОФА в СХЯ у крыс на П10. Дополнительным доказательством этого является вдвое большее увеличение содержания Л-ДОФА в инкубационной среде при инкубации СХЯ в присутствии L-тирозина у крыс на П60, чем на П10. По второму, наиболее важному и объективному показателю — эффективности синтеза Л-ДОФА в СХЯ у крыс в раннем постнатальном периоде выше, чем в СХЯ у взрослых животных.

Таким образом, получены доказательства синтеза Л-ДОФА в моноферментных ТГ-содержащих нервных волокнах СХЯ, причем эффективность этого синтеза у крыс в раннем постнатальном периоде выше, чем у взрослых животных.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РФФИ 17-14-01422.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moore R.Y. // Ciba Found. Symp. 1995. V. 183. P. 88–99.
2. Kartasoreos I.N., Silver R. // Endocrinology. 2007. V. 148. P. 5640–5647.
3. Medanic M., Gillette M.U. // J. Physiol. 1992. V. 450. P. 629–642.
4. Medanic M., Gillette M.U. // Brain Res. 1993. V. 620. P. 281–286.
5. Мирочник В.В., Макаренко И.Г., Угрюмов М.В. // Онтогенез. 2002. V. 33. P. 182–186.
6. Beltramo M., Calas M., Chernigovskaya E., Borisova N., Polenova O., Tillet Y., Thibault J., Ugrumov M. // Neuroscience. 1994. V. 63. P. 603–610.
7. Ugrumov M.V. // Adv. Pharmacol. 2013. V. 68. P. 37–91.

8. Ugrumov M., Taxi J., Pronina T., Kurina A., Sorokin A., Sapronova A., Calas A. // *Neuroscience*. 2014. V. 277. P. 45–54.
9. Kozina E.A., Kim A.R., Kurina A.Y., Ugrumov M.V. // *Neurobiol. Dis.* 2017. V. 98. P. 108–121.
10. Misu Y., Kitahama K., Goshima Y. // *Pharmacol. Therapeut.* 2003. V. 97. P. 117–137.
11. Fukuda N., Naito S., Masukawa D., Kaneda M., Miyamoto H., Abe T., Yamashita Y., Endo I., Nakamura F., Goshima Y. // *Brain Res.* 2015. V. 1602. P. 62–74.
12. Ugrumov M.V. // *J. Chem. Neuroanat.* 2009. V. 38. P. 241–256.
13. Ashwell K.W.S., Paxinos G. // *Atlas of the Developing Rat Nervous System*. Compact 3d ed. London: Academic Press, 2008.
14. Paxinos G., Watson C. // *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Compact 6th ed. London: Academic Press, 2009.
15. Reenilä I., Männistö P.T. // *Medical Hypotheses*. 2001. V. 57. P. 628–632.

Synthesis of L-Dioxyphenylalanine by Monoenzymatic Tyrosine Hydroxylase-Containing Nerve Fibers in the Suprachiasmatic Nucleus of Rats in Ontogeny

T. S. Pronina^a, Yu. O. Nikishina^a, L. K. Dilmukhametova^a,
A. R. Murtazina^a, and M. V. Ugryumov^{a, b}

^a*Laboratory of Nervous and Neuroendocrine Regulation, Koltsov Institute of Developmental Biology,
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^b*Department of Psychology, Faculty of Social Sciences, National Research University
Higher School of Economics, Moscow, Russia*

The suprachiasmatic nucleus (SCN) regulates functioning of the body in accordance with circadian rhythms thanks to the pacemaker neurons present in it and afferents that modulate these neurons. One of the afferents is nerve fibers that contain only the first enzyme for the synthesis of catecholamines, tyrosine hydroxylase (TH). In ontogeny, the concentration of these fibers (amount per unit volume of tissue) reaches maximum on the 10th postnatal day (P10), and then gradually decreases. The aim of this work was to verify our assumption that in TH-containing fibers in SCN in rats L-DOPA is synthesized as the final secretory product from L-tyrosine, and the efficiency of this synthesis is higher in the early postnatal period than in adults. The synthesis of L-DOPA was evaluated by the increase in the total content of L-DOPA in SCN and in the incubation medium after a two-hour incubation of SCN in the medium with or without L-tyrosine. We found that the addition of L-tyrosine to the incubation medium led to a manifold increase in the total L-DOPA content in SCN and in the medium, which is evidence of the synthesis of L-DOPA as a final product in TH-containing fibers. A comparative analysis of the L-DOPA synthesis in SCN at P10 and P60 showed that the synthesis rate (the ratio of the total content of L-DOPA in SCN and in the incubation medium to the incubation time) at P60 exceeds the synthesis rate at P10, while the efficiency of L- synthesis DOPA (the ratio of the rate of L-DOPA synthesis to the total protein content in SCN) is higher by P10. Thus, we showed that L-DOPA is synthesized in TH-containing SCN nerve fibers, and the efficiency of this synthesis in rats in the early postnatal period is higher than in adult animals.

Keywords: *suprachiasmatic nucleus, dopamine, L-dioxyphenylalanine (L-DOPA), high performance liquid chromatography*