

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН
(ИБР РАН)

УДК 577.25

Рег. № ГЗ 0108-2018-0006

Рег. № НИОКТР АААА-А18-118041690136-4



УТВЕРЖДАЮ
Директор ИБР РАН
д-р биол. наук, чл.-корр. РАН

А.В. Васильев

«27» декабря 2018 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

РОЛЬ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ МОЗГА В НЕЙРОЭНДОКРИННЫХ И НЕРВНЫХ
РЕГУЛЯЦИЯХ В ОНТОГЕНЕЗЕ

по Разделу № 50 «Биология развития и эволюция живых систем»
Программы фундаментальных научных исследований
государственных академий наук на 2013-2020 гг.

(заключительный отчет)

Руководитель НИР,
главный научн. сотр.,
д-р биол. наук, проф.,
акад. РАН

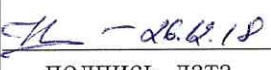
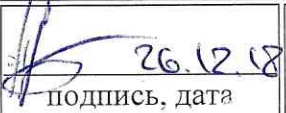
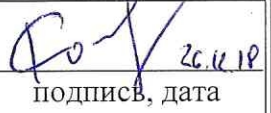
М.В. Угрюмов

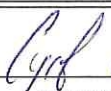
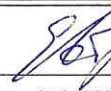
подпись, дата

27.12.2018

Москва 2018

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, академик	 26.12.18 подпись, дата	М.В. Угрюмов (Введение, заключение)
Исполнители: Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук	 26.12.18 подпись, дата	Т.С. Пронина (раздел 1)
Старший научный сотрудник, кандидат химических наук	 26.12.18 подпись, дата	Г. В. Малеев (раздел 1)
Научный сотрудник, кандидат биологических наук	 26.12.18 подпись, дата	Л.К. Дильмухаметова (раздел 1)
Научный сотрудник, кандидат биологических наук	 26.12.18 подпись, дата	Ю.О. Никишина (раздел 1)
Младший научный сотрудник	 26.12.18 подпись, дата	В.В. Сафандеев (раздел 1)
Младший научный сотрудник	 26.12.18 подпись, дата	А. Р. Муртазина (раздел 1)
Инженер-исследователь	 26.12.18 подпись, дата	А.В. Петровская (раздел 1)
Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук	 26.12.18 подпись, дата	А.Я. Сапронова (раздел 2)
Научный сотрудник, кандидат биол. наук	 26.12.18 подпись, дата	А.А. Колачева (раздел 2)
Научный сотрудник, кандидат биологических наук	 26.12.18 подпись, дата	А.Р. Ким (раздел 2)
Младший научный сотрудник	 26.12.18 подпись, дата	В.Е. Блохин (раздел 2)

Младший научный сотрудник	 26.12.18 подпись, дата	В.В. Богданов (раздел 2)
Инженер-исследователь	 26.12.2018 подпись, дата	С.А. Сурков (раздел 2)
Инженер-исследователь	 26.12.18 подпись, дата	Е.Н. Павлова (раздел 2)
Инженер-исследователь	 26.12.18 подпись, дата	К.М. Рябинкина (раздел 2)
Нормоконтроль, ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук	 подпись, дата 26.12.18	Е.Б. Абрамова

РЕФЕРАТ

Отчет 31 с., 12 рис., 25 источников, публикаций по теме ГЗ – 10

ОНТОГЕНЕЗ, НЕЙРОЭНДОКРИННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ, НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИЯ, НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТЬ, ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР, НОРАДРЕНАЛИН, ДОФАМИН, НЕЙРОН, НЕЙРОБЛАСТОМА, ДИФФЕРЕНЦИРОВКА.

Объектами исследования были крысы Вистар на 3-й и 30-й постнатальные дни (ПЗ и П30) и клеточные линии PC12 и SH-SY5Y. Цель работы: изучение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) для норадреналина (НА) в онтогенезе у крыс и морфофункциональная характеристика нейронов, дифференцированных из SH-SY5Y. Задачи: оценка клиренса НА в крови, захвата ^3H -НА *in vitro* и *in vivo* тканями мозга; дифференцировка клеток SH-SY5Y и оценка их фенотипа. В работе использованы методы ВЭЖХ, иммуногистохимия, ПЦР и радиометрия. Полученные результаты: (1) при введении НА в кровь его уровень в течение 4,5 мин был в 10 раз выше уровня эндогенного НА; (2) минимальный период специфического захвата ^3H -НА (более 45% от общего захвата НА) клетками и тканями при исследованиях *in vitro* – 4 мин; (3) *in vivo* специфический захват ^3H -НА обнаружен у крыс на ПЗ, но не на П30; (4) клетки SH-SY5Y после поэтапной дифференцировки приобретают морфологические признаки нейрона; (5) в нейронах, дифференцированных из клеток SH-SY5Y, выявляется тирозингидроксилаза, но не ее мРНК. Проведенные исследования подтвердили нашу гипотезу о формировании ГЭБ у крыс в раннем постнатальном периоде и функционировании мозга как эндокринного органа в период морфогенеза. Эти данные обуславливают необходимость пересмотреть патогенез врожденных заболеваний (неонатология). Дальнейшие исследования должны определить, какие именно факторы мозга являются индукторами развития и приводит ли нарушение их метаболизма к развитию врожденных заболеваний. Кроме того, предполагается из нейробластомы получить дофаминергические нейроны для изучения механизмов нейродегенерации и нейропластичности.

СОДЕРЖАНИЕ

СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ.....	6
ВВЕДЕНИЕ	7
РАЗДЕЛ I. РОЛЬ РАЗВИВАЮЩЕГОСЯ МОЗГА В НЕЙРОЭНДОКРИННОЙ РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЦЕЛОСТНОГО ОРГАНИЗМА	10
1.1 ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ	10
1.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	10
1.2.1 Инкубации с ^3H -норадреналином <i>in vitro</i> и радиометрия	11
1.2.2 Введение экзогенного норадреналина <i>in vivo</i> , ВЭЖХ и радиометрия	13
1.2.3 Статистический анализ	14
1.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	14
1.3.1 Клиренс «холодного» экзогенного норадреналина в крови.....	14
1.3.2 Специфический захват ^3H -норадреналина в клетки и ткани	15
1.3.3 Специфический захват ^3H -норадреналина из крови в разные отделы мозга в онтогенезе	17
РАЗДЕЛ II. ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ И НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТИ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ	21
2.1. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ	21
2.2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	21
2.2.1. Дифференцировка клеток.	21
2.2.2. Иммуноцитохимия и микроскопия	22
2.2.3. Экспрессия гена тирозингидроксилазы	22
2.2.4. Статистический анализ.....	23
2.3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	23
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	26
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	29
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ГЗ № 0108-2018-0006	30

СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения:

PC12 – клетки феохромацитомы

SH-SY5Y – нейробластома человека

БП – болезнь Паркинсона

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

ГЭБ - гематоэнцефалический барьер

ДА – дофамин

ДА-ергический – дофаминергический

ДМИ – десметилимипрамин

НА – норадреналин

П – постнатальный день

РК – ретиноевая кислота

ТГ – тирозингидроксилаза

ФБС – фетальная бычья сыворотка

ФМА – форбол-12-миристан-13-ацетат

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ВВЕДЕНИЕ

При изучении роли сигнальных молекул мозга в онтогенезе, наиболее актуальным представляется исследование роли мозга в нейроэндокринной регуляции развития и функционирования целостного организма, а так же изучение молекулярных механизмов нейродегенерации и нейропластичности в мозге [1, 2].

Раздел 1. В нашей лаборатории была сформулирована и доказана гипотеза, согласно которой мозг в онтогенезе до формирования гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) функционирует как эндокринный орган, выделяя в общую систему циркуляции физиологически активные вещества и оказывая эндокринное влияние на развитие и функционирование периферических органов и клеток-мишеней [3]. Основные исследования по первому разделу проводились в рамках выдвинутой нами гипотезы, согласно которой мозг в критический период морфогенеза функционирует как мультипотентный эндокринный орган [4]. Однако вопрос, касающийся времени формирования ГЭБ, для большинства важнейших регуляторов развития до сих пор не решен. В связи с этим проблема проницаемости ГЭБ для нейrogормонов в онтогенезе является актуальной и требует проведения специальных исследований. Результаты этих исследований позволят нам не только определить период формирования ГЭБ для отдельных нейротрансмиттеров, но и помогут предсказать возможные последствия нарушений сроков его созревания для мозга и всего организма [5].

ГЭБ представляет собой физиологический барьер между общей системой циркуляции и мозгом, функцией которого является поддержание постоянства внутримозговой среды [6]. Барьерная функция ГЭБ обеспечивается за счёт трёх основных составляющих: структурной - наличия плотных контактов между клетками эндотелия, отсутствие в них фенестр и минимальное количество пиноцитозных пузырьков, транспортной - наличие специальных механизмов транспорта веществ и метаболической - наличие ферментов, активность которых ограничивает поступление веществ из кровотока в мозг [7]. Хотя исследования проницаемости ГЭБ ведутся уже не одно десятилетие и накоплено много данных, о времени формирования ГЭБ в онтогенезе известно крайне мало [8]. Показано, что структурная основа ГЭБ 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 нейrogормоны могут преодолевать ГЭБ и это может свидетельствовать о его незрелости в отношении этих веществ в этот период [9, 10]. Однако вопрос, касающийся времени формирования ГЭБ для большинства важнейших регуляторов развития, требует дальнейшего уточнения. Поэтому целью наших исследований по Разделу 1 в 2018 году было изучение проницаемости ГЭБ для нейротрансмиттеров, в частности, для норадреналина (НА) в онтогенезе у крыс.

Раздел 2. Изучение молекулярных механизмов нейродегенерации и нейропластичности нейронов мозга может оказаться важным для разработки превентивной фармакотерапии, направленной на остановку или замедление нейродегенерации. Прогрессирующая дегенерация нейронов является важнейшей характеристикой нейродегенеративных заболеваний, в частности, болезни Паркинсона (БП) [11]. Нейродегенерация сопровождается нарушением аксонального транспорта [12], нарушением синтеза нейромедиаторов, протеинопатией, а в конечном итоге дегенерацией нейритов и тел нейронов. Так, дегенерация дофаминергических нейронов (ДА-ергических нейронов) nigrostriatной системы является причиной нарушения двигательной функции, что является основным симптомом 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 ДА-ергических нейронов в мозге больного [13].

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 70 %) и «истощения» компенсаторных процессов проявляются первые моторные симптомы. В настоящее время изучение механизмов нейропластичности при допороговой деградации ДА-ергической nigrostriatной системы возможно только на экспериментальных моделях животных из-за отсутствия ранней доклинической диагностики заболевания [14].

Исходя из вышеизложенного, перед исследователями стоит задача разработки ранней доклинической диагностики заболевания [15] путем поиска маркёров БП в крови либо, как это делается, например, в случае с эссенциальной артериальной гипертензией [16]; а также превентивного лечения, способствующего замедлению гибели ДА-

ергических нейронов. Для разработки превентивного лечения проводится поиск новых лекарственных веществ, обладающих нейропротекторными свойствами. Однако всё это невозможно реализовать без изучения молекулярных механизмов патогенеза БП и компенсаторных процессов, развивающихся на ранних стадиях БП. Например, на моделях ранней доклинической стадии БП было показано, что происходят изменения транскрипции мРНК везикулярных белков в нейронах [17], а так же в выделении ДА из нейрона и его обратном захвате из межклеточной среды [18] и изменение активности фермента ТГ, отвечающего за синтез ДА [19]. Как отдельный компенсаторный процесс также стоит отметить наличие так называемого кооперативного синтеза ДА в стриатуме [20], что ещё сильнее осложняет изучение БП. Все это очень важно учитывать при разработке диагностики и последующего превентивного лечения.

Поэтому проводимые в рамках данной проблемы исследования направлены на изучение механизмов гибели нейронов и компенсаторных процессов на молекулярном уровне, а также на скрининг потенциальных нейропротекторов [21]. Для выполнения этих задач требуется создание *in vitro* модели, максимально адекватной и приближенной к патогенезу БП. В этой связи в качестве клеточной модели широко используется клеточная линия SH-SY5Y, являющаяся нейробластомой человека [22].

Целью наших исследований по разделу 2 в 2018 году явилось получение нейрональной культуры из перевиваемой клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y и морфо-функциональная оценка ДА-ергического фенотипа полученных клеток.

РАЗДЕЛ I. РОЛЬ РАЗВИВАЮЩЕГОСЯ МОЗГА В НЕЙРОЭНДОКРИННОЙ РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЦЕЛОСТНОГО ОРГАНИЗМА

1.1 ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Цель: Исследование проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) в онтогенезе у крыс.

Задачи: На 3 и 30 постнатальные дни (ПЗ и ПЗ0) оценить:

- (а) клиренс экзогенного НА в крови;
- (б) специфический захват ^3H -НА в срезах мозга *in vitro*;
- (в) специфический захват мозгом введенного в общий кровоток ^3H -НА.

1.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1.2.1. Введение норадреналина и его количественный анализ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией

Работа проводилась на самцах крыс линии Вистар на 3-й и 30-й постнатальные дни (ПЗ и ПЗ0). Крысам под наркозом хлоралгидратом (400 мг/кг, “Sigma-Aldrich”) через микроканюлю вводили раствор НА (1,5 мкМ) в левый желудочек сердца в течение 2,5 мин со скоростью: 14,8 мкл/мин на ПЗ и 43,2 мкл/мин на ПЗ0 (Рис. 1-1). В контроле вводили физиологический раствор по такой же схеме. Затем собирали кровь из сердца сразу после окончания введения НА или через 1 и 2 минуты. В контроле кровь из сердца собирали через 1 минуту после окончания введения физиологического раствора (Рис. 1-1).

Кровь собирали в охлаждаемую льдом пластиковую пробирку, содержащую 100 мкл 5% ЭДТА и 50 мкл 10% метабисульфита калия и центрифугировали со скоростью 400 g. при 4⁰С в течение 20 минут. Полученную плазму (супернатант) отбирали, добавляли 0.1 NHCIO₄ (Sigma, США), содержащую внутренний стандарт 3,4-дигидроксибензиламин (ДГБА, Sigma), после чего замораживали и хранили при -70⁰С.

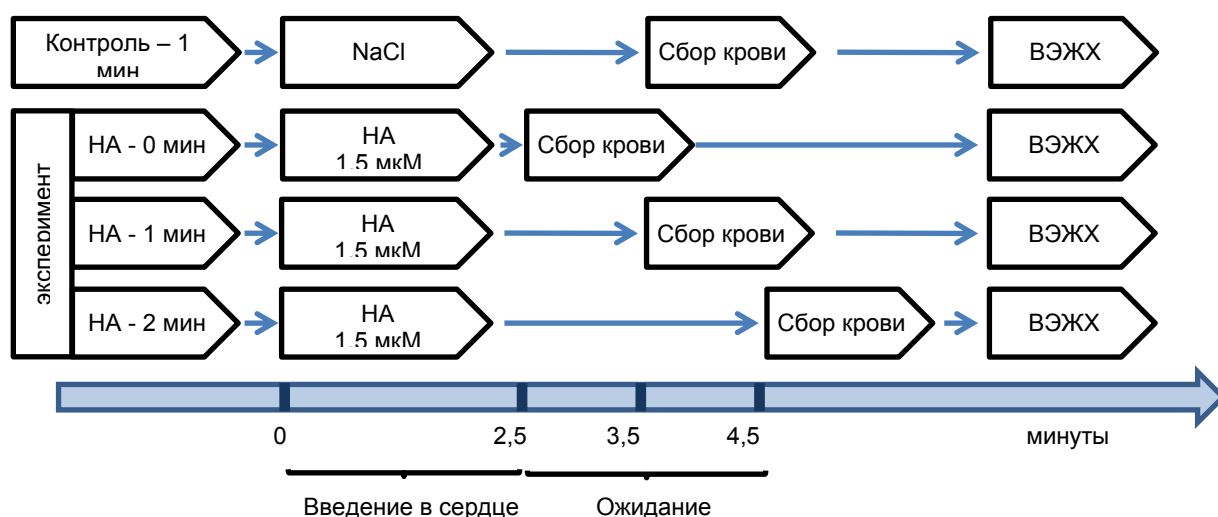


Рисунок 1-1. Схема эксперимента по введению НА в сердце. NaCl, физиологический раствор; НА, норадреналин; ВЭЖХ, высокоэффективная жидкостная хроматография.

Все количественные измерения содержания биогенных аминов в исследуемых пробах плазмы проводили методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с электрохимической детекцией. Размороженные образцы плазмы центрифугировали 20 мин при 2000 g. ВЭЖХ-разделение осуществляли на обращенно-фазной колонке ReproSil-Pur, ODS-3, 4x100 мм с диаметром пор 3 мкм (Dr.Majsch GMBH, Германия) при температуре +30°C и скорости подвижной фазы 1.2 мл/мин, поддерживаемой жидкостным хроматографом LC-20ADsp (Shimadzu, Япония). В состав мобильной фазы входили: 0.1 М цитратно-фосфатный буфер, 0.3 мМоктансульфат натрия, 0.1 мМ ЭДТА и 9% ацетонитрил (все реактивы – Sigma), pH 2.5. Электрохимический детектор Decade II (AntecLeyden, Нидерланды) был укомплектован стеклоуглеродным рабочим электродом (+0.85 V) и Ag/AgCl электродом сравнения. Пики биогенных аминов и метаболитов идентифицировали по времени их выхода в стандартном растворе. Содержание веществ рассчитывали методом внутреннего стандарта, используя отношение площадей пиков в стандартной смеси и в образце с помощью программного обеспечения LabSolutions (Shimadzu).

1.2.1 Инкубации с ^3H -норадреналином *in vitro* и радиометрия

Оценку специфического захвата ^3H -НА (^3H -НА) проводили в клетках феохромоцитомы PC12, экспрессирующих мембранный транспортёр НА [23] и толстых срезах ствола мозга и среднего мозга крыс-самцов линии Wistar на ПЗ и ПЗ0 [24]. Величину специфического захвата определяли как разницу между общим захватом ^3H -НА

и неспецифическим захватом ^3H -НА после введения ингибитора мембранного транспортера НА – десметилимипрамина (ДМИ).

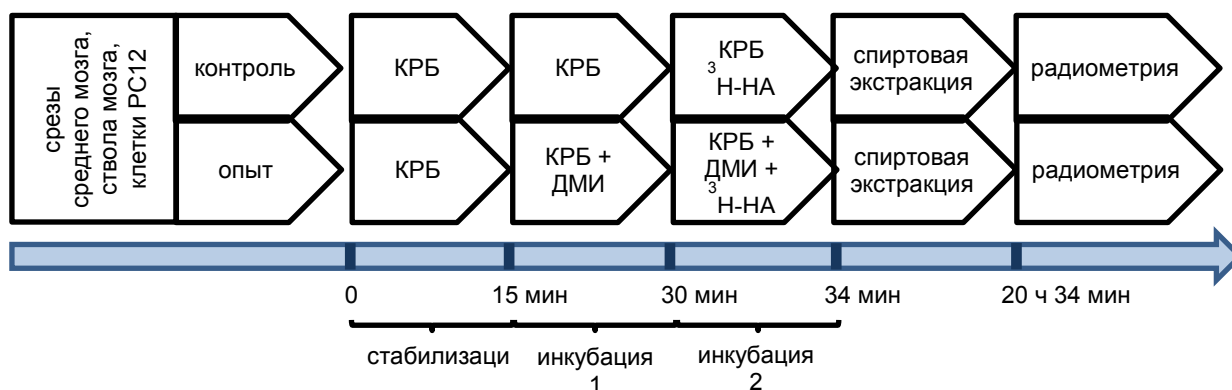


Рисунок 1-2. Схема экспериментов по оценке включения ^3H -НА в клетки PC12 и в клетки среднего мозга и ствола мозга. КРБ, Кребса-Рингера буфер; ^3H -НА, ^3H -норадреналин; ДМИ, десметилимипрамин.

Суспензии клеток PC12 инкубировали в среде RPMI-1640 с добавлением глутамина при $+37^\circ\text{C}$ и 5% CO_2 в CO_2 -инкубаторе. Пробы, содержащие $2,28 \times 10^6$ клеток PC12, инкубировали в растворе Кребса–Рингера без ингибитора (контроль) или с добавлением 1 мкМ ДМИ (Рис. 1-2). Клетки осаждали центрифугированием. Затем осадок клеток ресуспендировали в 1 мл раствора Кребса–Рингера, содержащем 10 нМ ^3H -НА. Инкубацию проводили при 37°C . Поглощённый клетками ^3H -НА экстрагировали 1 мл этанола. Экстракты вносили во флаконы с 10 мл сцинтилляционной жидкости Liquid scintillator 402 (“Koch-Light Laboratories, Ltd”, Великобритания). Измерения радиоактивности проводили на счётчике Tri-Carb 2810 TR (“PerkinElmer”, США).

На ПЗ и ПЗ0 крыс под наркозом (хлоралгидрат 400 мг/кг, “Sigma-Aldrich”) декапитировали. Затем в растворе Кребса–Рингера при 4°C из мозга приготовили на вибраторе (Vibratome 1000 Plus, Sectioning system, “DOTmed.com Inc.” США) фронтальные срезы толщиной 300 мкм на уровне ствола (по 11 срезов) и среднего мозга (по 11 срезов). Из фронтальных срезов целого мозга бод контролем бинокулярной лупы выделяли средний мозг. Левые и правые половинки каждой области от каждого животного поместили в отдельную лунку планшета с раствором Кребса–Рингера для проведения статической инкубации. Во всех пробах ткани после периода стабилизации меняли инкубационную среду (Рис. 1-2). Срезы из правой половины ствола мозга и среднего мозга инкубировали в растворе Кребса–Рингера, а срезы из левой половины – в растворе Кребса–Рингера с добавлением ДМИ (1 мкМ). Затем во все лунки добавили ^3H -НА (10 нМ) и инкубировали 4 мин. Реакцию останавливали погружением планшета в лед. Пробы ткани промывали 20 мл холодного раствора Кребса–Рингера и взвешивали.

Поглощённый тканью ^3H -НА экстрагировали 1 мл этанола и оценивали захват ^3H -НА, как описано выше.

1.2.2 Введение экзогенного норадреналина *in vivo*, ВЭЖХ и радиометрия

Исследование уровня специфического захвата экзогенного ^3H -НА из крови в ткани мозга проводили на ПЗ и ПЗ0 на самцах крыс линии Вистар (рис. 1-3).

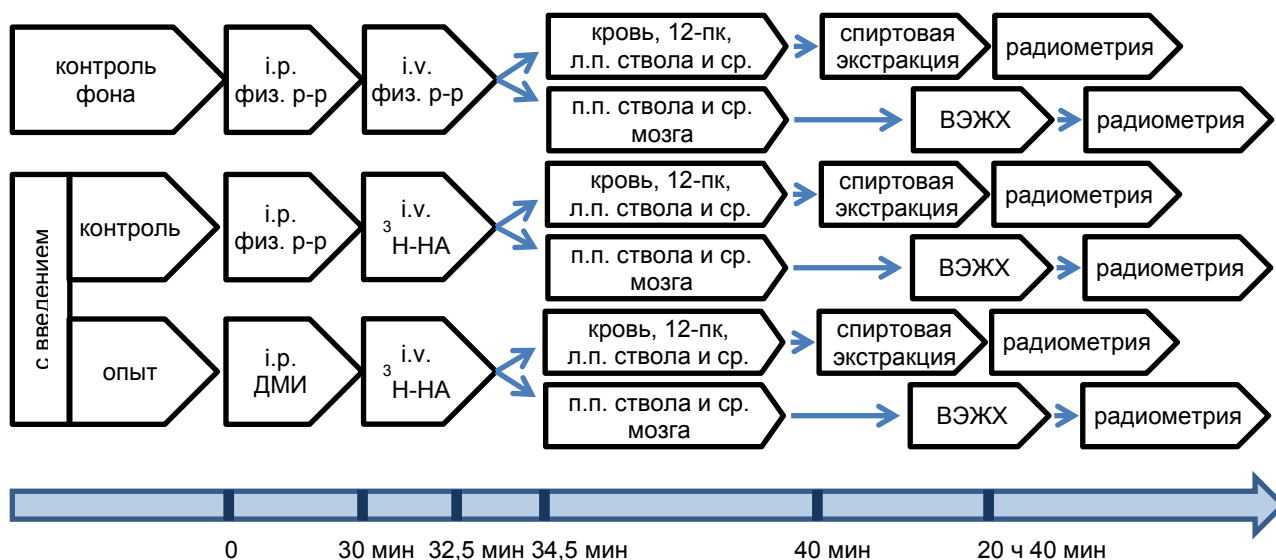


Рисунок 1-3. Схема экспериментов по оценке включения ^3H -НА из крови в клетки среднего мозга и ствола мозга *in vivo*. ^3H -НА, ^3H -норадреналин; ДМИ, десметилимипрамин, физ. р-р, физиологический раствор; i.p., внутривенно; i.v., внутрь желудочка сердца; л.п., левая половина; п.п., правая половина; ср. мозга, среднего мозга; 12-пк, 12-перстная кишка; ВЭЖХ, высокоэффективная жидкостная хроматография.

На ПЗ и ПЗ0 крысам подкожно вводили ДМИ (25 мг/кг веса), остальным животным в качестве контроля вводили физиологический раствор. Через 30 мин по разработанной на первом этапе исследования методике в левый желудочек сердца вводили ^3H -НА (1,5 мкМ) в течение 2,5 минут, спустя 2 минуты собирали кровь и образцы ткани: среднего мозга, ствола мозга и 12-перстной кишки. Оценку захвата ^3H -НА проводили в два этапа. Вначале проводили радиометрию образцов крови, ткани среднего мозга, ствола мозга и 12-перстной кишки (рис. 1-3) по методике, описанной для исследований *in vitro* (раздел 1.2.2).

Затем, часть образцов ткани среднего мозга и ствола мозга гомогенизировали с помощью ультразвукового гомогенизатора Labsonic M (Sartorius, Франция) в 0.1 NH_4ClO_4 (Sigma, США), содержащих внутренний стандарт 3,4-дигидроксibenзиламин (ДГБА, Sigma), после чего центрифугировали 20 мин при 2000 g.

ВЭЖХ-разделение осуществляли на обращённо-фазной колонке ReproSil-Pur, ODS-3, 4x100 мм с диаметром пор 3 мкм (Dr. Majsch GmbH, Германия) при температуре +30°C и скорости подвижной фазы 1.2 мл/мин, поддерживаемой жидкостным хроматографом LC-20ADsp (Shimadzu, Япония). В состав мобильной фазы входили: 0.1 М цитратно-фосфатный буфер, 0.3 мМ октансульфат натрия, 0.1 мМ ЭДТА и 9% ацетонитрил (все реактивы – Sigma), pH 2.5. Электрохимический детектор Decade II (Antec Leyden, Нидерланды) был укомплектован стеклоуглеродным рабочим электродом (+0.85 V) и Ag/AgCl электродом сравнения. Пики биогенных аминов и метаболитов идентифицировали по времени их выхода в стандартном растворе и собирали отдельно, добавляли 10 мл сцинтилляционной жидкости Liquid scintillator 402. Измерения радиоактивности проводили на счётчике Tri-Carb 2810 TR (“PerkinElmer”, США).

1.2.3 Статистический анализ

Полученные данные были проверены на соответствие нормальному распределению с помощью критерия Шапиро-Уилка. Статистический анализ результатов проводили с помощью двухстороннего непарного t-теста Стьюдента с критерием статистической значимости $p < 0,05$ в программном пакете Graph Pad Prism 6.0 (Graph Pad Software, США).

Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего.

1.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1.3.1 Клиренс «холодного» экзогенного норадреналина в крови

Для решения первой задачи по оценке клиренса «холодного» НА (не содержащего специфической изотопной метки) оценивали его концентрацию в крови через равные промежутки времени после окончания введения экзогенного немеченого НА в левый желудочек сердца. Было показано, что концентрация НА в крови по окончании введения экзогенного НА составляла 50 нМ, а спустя 2 минуты после окончания введения – 28 нМ (рис. 1-4). При такой схеме введения НА его уровень в крови был на 1 порядок выше эндогенного уровня НА в течение 4,5 минут.

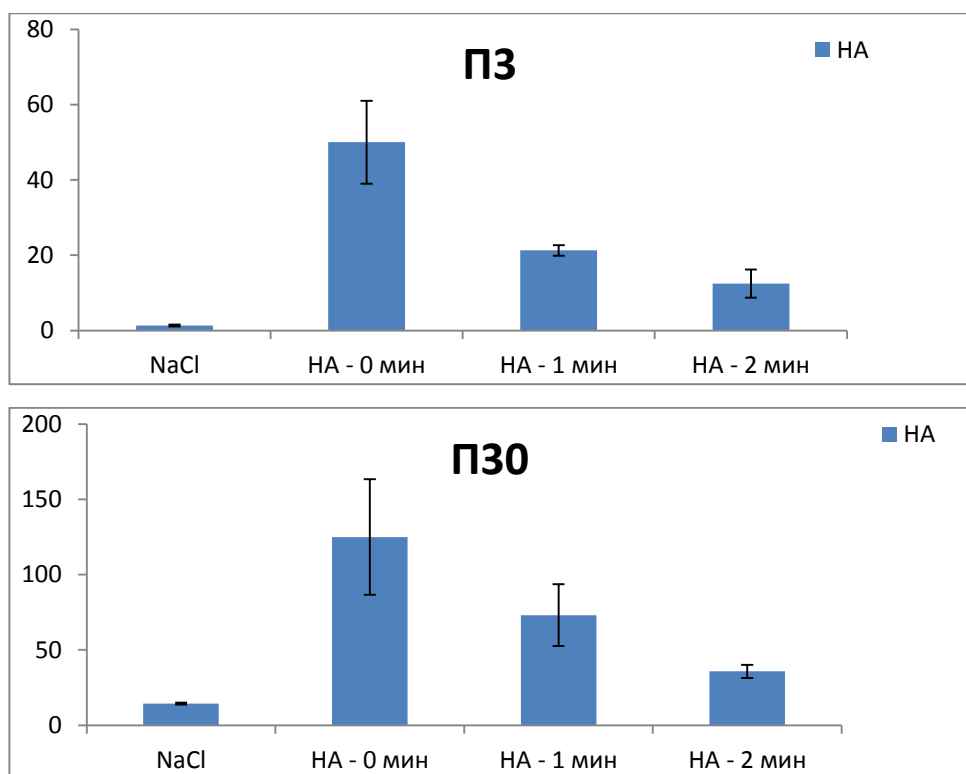


Рисунок 1-4. Концентрация НА в крови на 3-й (верхний график) и 30-й (нижний график) постнатальные дни у крыс (ПЗ и П30). NaCl, физиологический раствор; НА, норадреналин.

Полученные данные позволяют оценить скорость выведения НА из крови. Кроме того, разработанная в результате этих исследований схема введения НА открыла возможность для исследований проницаемости ГЭБ. Период повышенной концентрации НА (на 1 порядок выше, чем эндогенный) составлял более 4 минут.

1.3.2 Специфический захват ^3H -норадреналина в клетки и ткани

В ходе решения второй задачи мы оценивали минимальный период, в течение которого можно зафиксировать специфический захват экзогенного НА в ткань. В стандартных исследованиях по оценке специфического захвата *in vitro* минимальный период, за который оценивают специфический захват в клетки и ткани, составляет 15 минут [18, 25]. В данной работе нас интересовало, возможно ли сократить этот период. Исследования были проведены *in vitro* на культуре клеток PC12, и на толстых срезах среднего мозга и ствола мозга, выделенных у крыс в возрасте ПЗ (ранний постнатальный период) и П30 (взрослый период). Величину специфического захвата определяли как разницу между общим захватом ^3H -НА и неспецифическим захватом ^3H -НА после введения ингибитора мембранного транспортера НА – ДМИ.

Было показано, что общий захват ^3H -НА клетками феохромоцитомы PC12 составлял 2393 ± 313 dpm на пробу, а неспецифический захват (после введения

ингибитора мембранного транспортера НА) – 441 ± 39 dpm на пробу (рис. 1-5). Следовательно, специфический захват ^3H -НА составляет 81,5% от общего захвата в клетках PC12 [24].

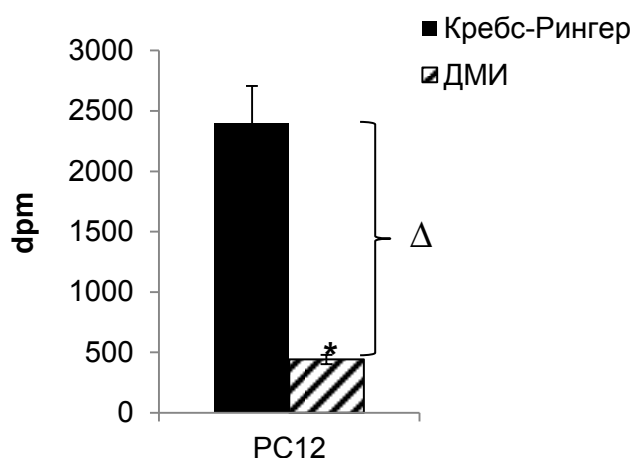


Рисунок 1-5. Общий (Кребс-Рингер) и неспецифический (ДМИ) захват ^3H -НА в клетки PC12. ДМИ, десметилимипрамин. * $p \leq 0.05$ при сравнении групп с ДМИ и без него.

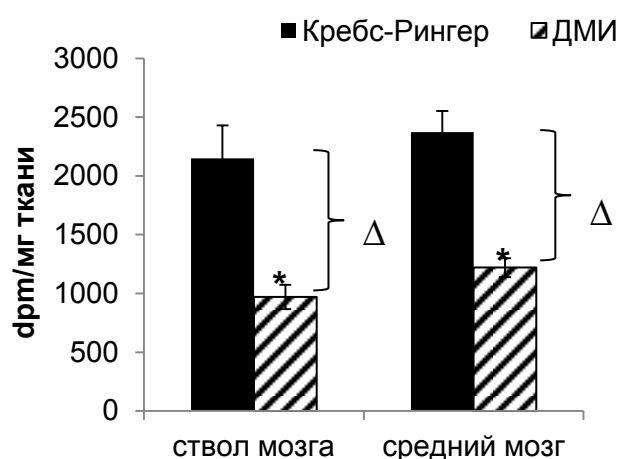


Рисунок 1-6. Общий (Кребс-Рингер) и неспецифический (ДМИ) захват ^3H -НА в клетки ствола мозга и среднего мозга на ПЗ. ДМИ, десметилимипрамин. * $p \leq 0.05$ при сравнении групп с ДМИ и без него.

На ПЗ общий захват ^3H -НА в срезах ствола мозга был 2148 ± 373 dpm/мг ткани, а неспецифический захват (после введения ингибитора мембранного транспортера НА) составил 971 ± 36 dpm/мг ткани (рис. 1-6). При этом общий захват ^3H -НА в срезах среднего мозга был 2372 ± 103 dpm/мг ткани, а неспецифический захват (после введения ингибитора мембранного транспортера НА) составил 1220 ± 46 dpm/мг ткани (рис. 1-6). Следовательно, специфический захват ^3H -НА составил в стволе мозга 54% от общего захвата в ткани, а в среднем мозге – 48 %. На ПЗ0 общий захват ^3H -НА в срезах ствола мозга был 2654 ± 240 dpm/мг ткани, а неспецифический захват (после введения

ингибитора мембранного транспортера НА) составил 662 ± 38 dpm/мг ткани (рис. 1-7). При этом общий захват ^3H -НА в срезах среднего мозга был 2350 ± 136 dpm/мг ткани, а неспецифический захват (после введения ингибитора мембранного транспортера НА) составил 1077 ± 73 dpm/мг ткани (рис. 1-7). Следовательно, специфический захват ^3H -НА составил в стволе мозга 75% от общего захвата в ткани, а в среднем мозге – 54% [24].

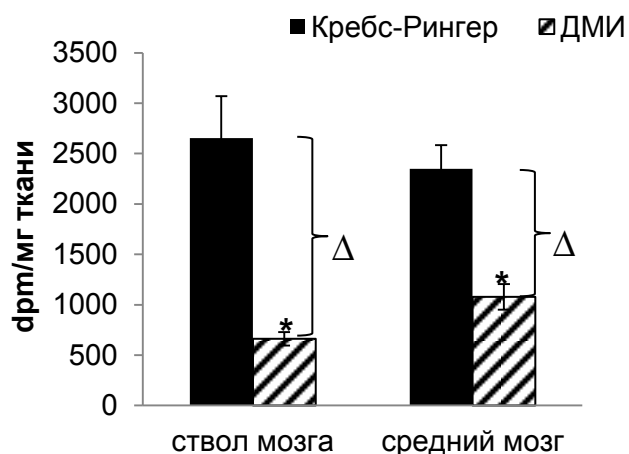


Рисунок 1-7. Общий (Кребс-Рингер) и неспецифический (ДМИ) захват НА в клетки ствола мозга и среднего мозга на ПЗ0. ДМИ, десметилимипрамин. * $p \leq 0.05$ при сравнении групп с ДМИ и без него.

Таким образом, решая вторую задачу, мы показали, что в течение 4-х минут происходит специфический захват ^3H -НА не менее 48%, и это достаточный период для достоверного определения специфического захвата НА из инкубационной среды в клетки и срезы мозга.

1.3.3 Специфический захват ^3H -норадреналина из крови в разные отделы мозга в онтогенезе

Решение третьей задачи основывалось на исследованиях первых двух вопросов, стоявших перед нами в этом году. В ходе решения третьей задачи проводилась оценка уровня специфического захвата экзогенного ^3H -НА из крови в ткани мозга в разные периоды онтогенеза у крыс. *In vivo* на ПЗ у крыс специфический захват ^3H -НА составил в стволе мозга 53% от общего захвата в ткани, а в среднем мозге – 42% (рис. 1-8). При этом, специфический захват ^3H -НА на ПЗ0 у крыс не наблюдался: на фоне действия ДМИ уровень неспецифического включения экзогенной метки даже повышался в среднем мозге по сравнению с группой без ДМИ.

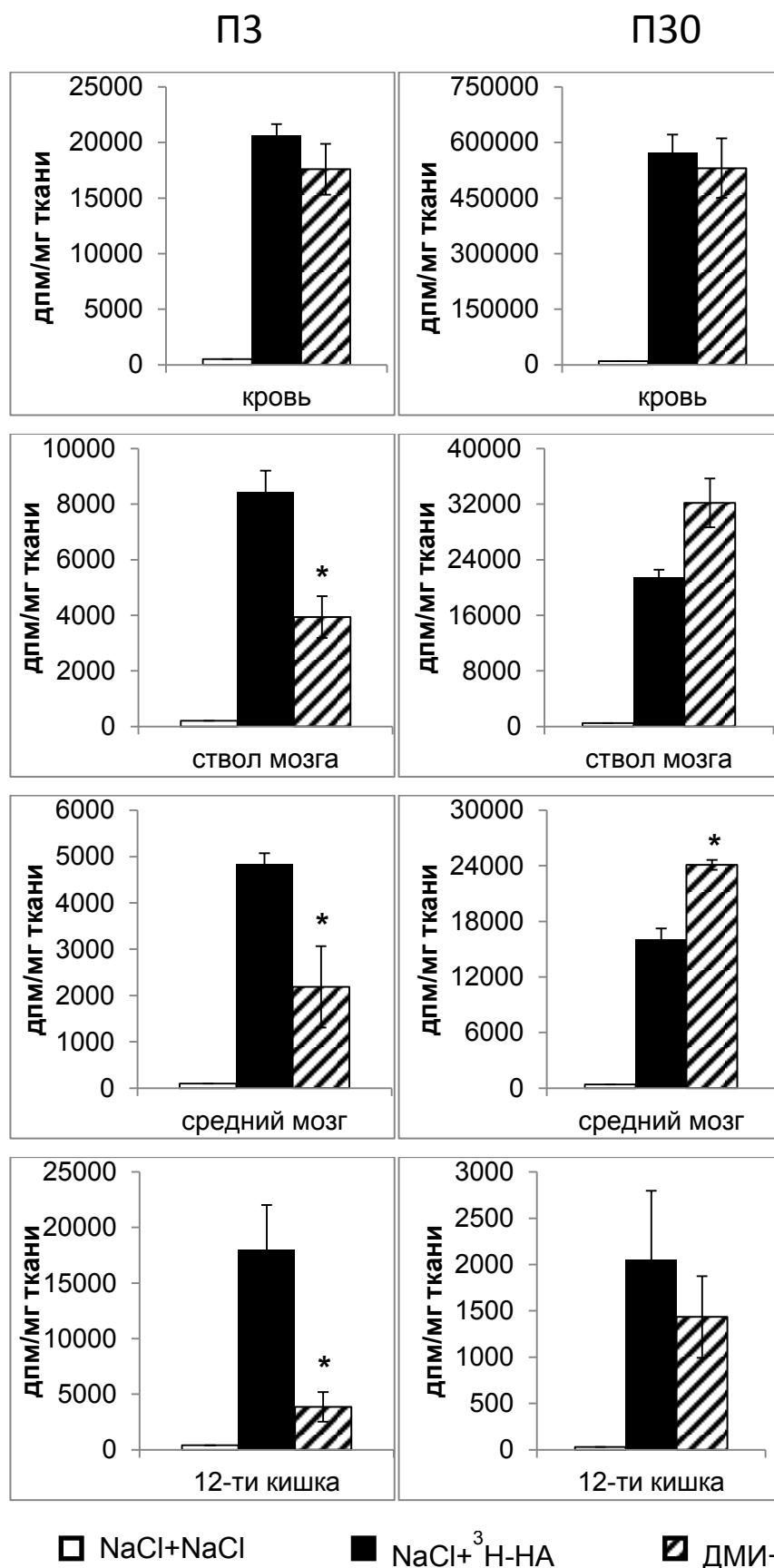


Рисунок 1-8. Концентрация НА в крови и общий (Кребс-Рингер) и неспецифический (ДМИ) захват НА в клетки ствола мозга, среднего мозга и 12-перстной кишки на ПЗ и ПЗ0 в норме и после введения введения ³H-НА (³H-НА) на фоне действия десметилимипрамина (ДМИ) и без него. * $p \leq 0.05$ при сравнении групп после введения ³H-НА на фоне ДМИ и без него.

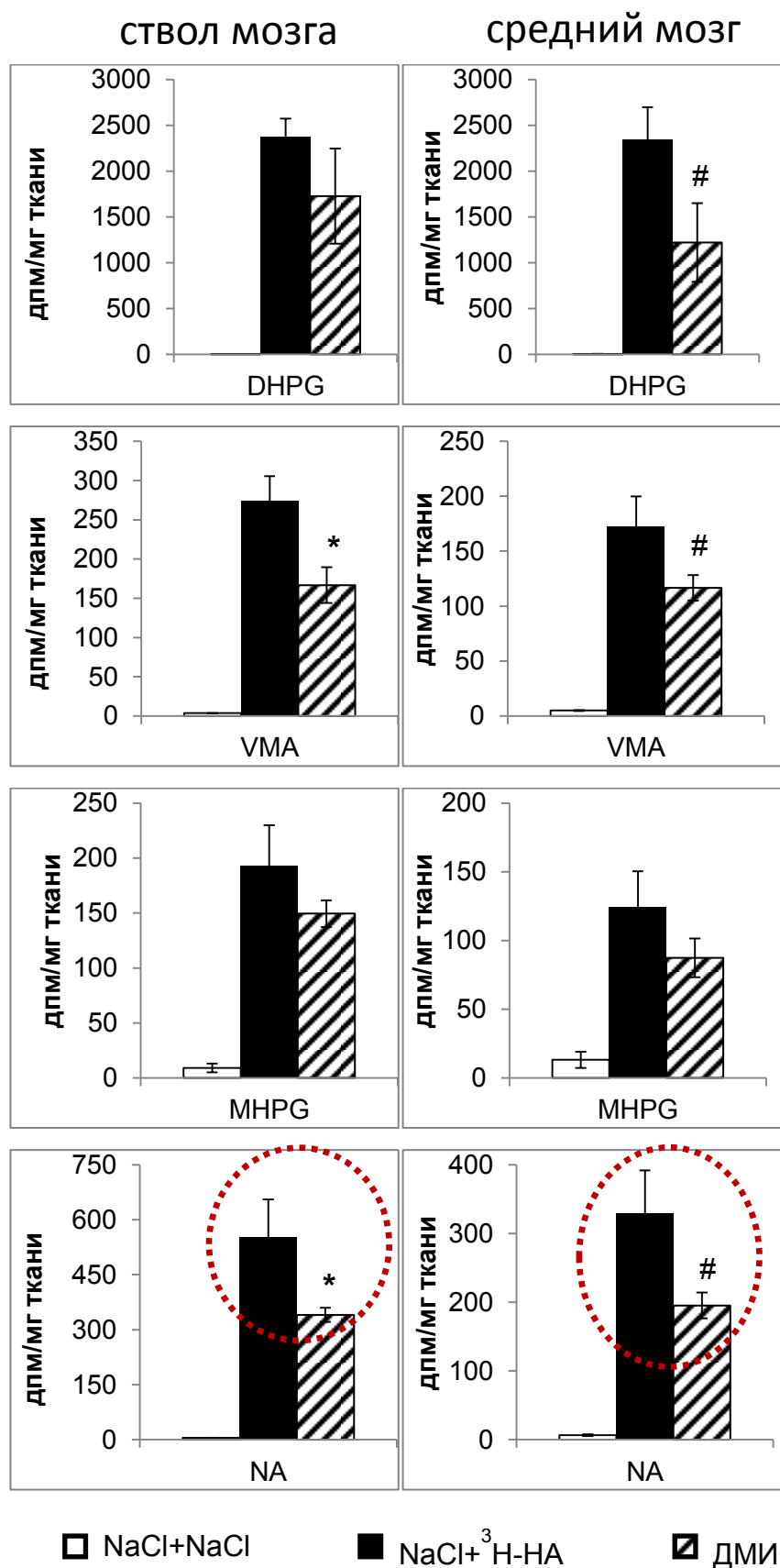


Рисунок 1-9. Концентрация НА и его метаболитов в среднем мозге и стволе мозга крыс на ПЗ в норме и после введения введения ³H-НА на фоне действия десметилимипрамина (ДМИ) и без него. DHPG, дигидроксифенилгликоль; VMA, ванилилминдальная кислота; MHPG, метоксигидроксифенилгликоль; NA–норадреналин. * $p \leq 0.05$, # $p \leq 0.1$ при сравнении групп после введения ³H-НА на фоне ДМИ и без него.

Поскольку изотопная метка может присутствовать не только в молекуле НА, но и в его метаболитах были проведены дополнительные исследования с оценкой экзогенных НА и его метаболитов по фракциям в тканях среднего мозга и ствола мозга. Было показано, что на ПЗ ДМИ снижает включение в ткани мозга, как НА, так и его метаболитов (рис 1-9). Следовательно, можно предположить, что на ПЗ существует специфический захват именно НА в нейроны. Таким образом, на ПЗ ГЭБ для НА еще не сформирован.

На ПЗ0 у крыс не наблюдалось достоверных изменений концентрации экзогенного НА и его метаболитов в тканях мозга после введения ДМИ по сравнению с соответствующим контролем. Следовательно, можно предположить, что на ПЗ0 не существует специфический захват НА в нейроны, но происходит активное метаболизирование НА клеточными компонентами, входящими в состав ГЭБ. По-видимому, на ПЗ0 у крыс ГЭБ для НА является полностью сформированным.

Однако данный метод не позволяет однозначно сделать выводы о клеточных структурах, в которые происходит захват НА, и где происходит его метаболизирование, что не позволяет сделать окончательные выводы о сроках формирования ГЭБ.

РАЗДЕЛ II. ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ И НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТИ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ

2.1. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Цель исследований: получение нейрональной культуры и морфо-функциональная характеристика полученных клеток, дифференцированных из перевиваемой клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y, для подтверждения наличия в них ДА-ергического фенотипа.

2.2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клетки SH-SY5Y культивировали в среде DMEM/F-12, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС, Lifetech, США), пенициллин / стрептамицин (Sigma-Aldrich, США). Среду меняли каждые 2 суток.

2.2.1. Дифференцировка клеток.

За сутки клетки пассировали и высаживали в 24 луночные планшеты в количестве 150000 клеток на 1 мл среды. Через 24 часа среду заменяли на Neurobasal, содержащую B-27, NGF, FGF, а также ретиноевую кислоту (РК) в концентрации 50 мкМ. Клетки растили в таких условиях четверо суток с заменой среды каждые двое суток. Далее среду заменяли на идентичную, но вместо РК, добавляли форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА) в концентрации 80 нМ. Клетки также инкубировали четверо суток с заменой среды каждые двое суток (Рис. 2-1).

Схема эксперимента дифференцировки клеток SH-SY5Y

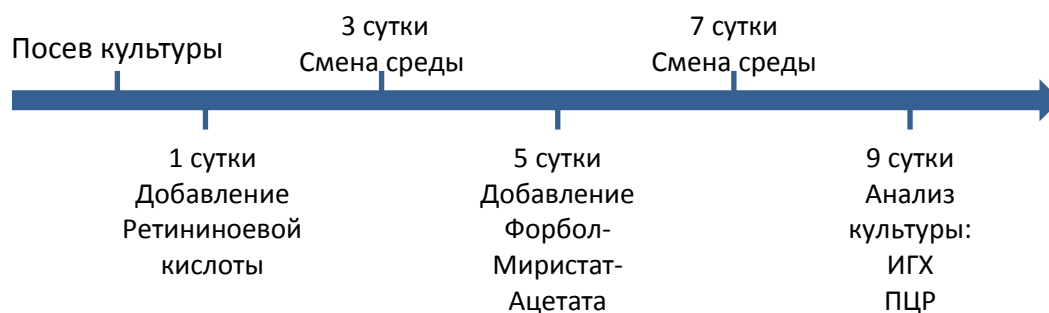


Рисунок 2-1. Схема эксперимента дифференцировки клеток SH-SY5Y при помощи ретиноевой кислоты и форбол-миристат-ацетата.

2.2.2. Иммуноцитохимия и микроскопия

Для иммуноцитохимического подтверждения дифференцировки клетки отмывали от культуральной среды фосфатно-солевым буфером (ФСБ, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM, pH=7,3) три раза по 5 мин при +4°C, после чего фиксировали в 4% параформальдегиде на 0,2 М фосфатном буфере (pH 7.2-7.4) 1 час при +4°C. Далее для предотвращения неспецифического связывания 1-х и 2-х антител с клетками проводили блокировку препаратов раствором 3% бычьего сывороточного альбумина (БСА) (Sigma, США) и 0,3% TritonX-100 (Triton-X100, Sigma, США) в ФСБ в течение 30 мин при +20 °C. Затем клетки инкубировали в ФСБ, содержащем 1% БСА и антитела овцы к тирозингидроксилазе (ТГ) (1:500) (Abcam, США) в течение 20 часов при +20 °C. На следующий день клетки отмывали трижды ФСБ буфером по 10 минут и инкубировали с раствором биотинилированных антител козы к антителам овцы (1:400) (Vector Laboratories, США) в течение 2-х часов при +20 °C. Далее клеточные препараты инкубировали 1 час в ФСБ, содержащем авидин-биотиновый комплекс (1:1:100) (Vector Laboratories, США) в течение 1 часа при +20 °C. Пероксидазу хрена выявляли 0.05 % 3,3'-диаминобензидинтетрагидрохлорида (Sigma, США) с 0.02 % перекиси водорода. Пробы клеток заключали в гидрофильную среду Mowiol 4-88 (Sigma, США).

Анализ препаратов производили при помощи микроскопа ZeissObserver Z1 (Zeiss, Германия).

2.2.3. Экспрессия гена тирозингидроксилазы

Для проверки изменений экспрессии гена тирозингидроксилазы (ТГ) клетки высаживали в 12 луночные планшеты с плотностью 200000 клеток. Дифференцировку проводили по вышеуказанной методике. После проведения дифференцировки (на 9-й день эксперимента) клетки отмывали от среды ФСБ буфером и из них выделяли РНК. Выделение РНК осуществляли при помощи QiaGenRNeasyKit (QiaGen, США) в соответствии с протоколом производителя. кДНК синтезировали с использованием обратной транскриптазы М-MLV и гексамерных олигонуклеотидов. ПЦР производили на амплификаторе iQ5 Bio-Rad (Bio-Rad, США) с использованием готовой смеси для ПЦР ScreenMix (Евроген, Россия). Для амплификации использовались следующие последовательности праймеров:

1: CGGGCTGCTGTCCTCCTA

2: AGCTTGTCCCTTGGCGTCATC

После амплификации был проведён электрофорез проб, анализ геля проводили при помощи ChemiDoc Touch (Bio-Rad, США).

2.2.4. Статистический анализ

Полученные данные были проверены на соответствие нормальному распределению с помощью критерия Шапиро-Уилка. Статистический анализ результатов проводили с помощью двухстороннего непарного t-теста Стьюдента с критерием статистической значимости $p < 0,05$ в программном пакете GraphPadPrism 6.0 (GraphPadSoftware, США).

Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего.

2.3.РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В 2017 году в рамках гос. задания нами было показано, что культивирование ДА-ергических нейронов, полученных из первичной культуры, для моделирования болезни Паркинсона - сложный и многоэтапный процесс. Аналогами такой культуры могут служить клетки нейробластомы человека, дифференцируемые в ДА-ергические нейроны.

В данной работе мы проводили дифференцировку клеток линии нейробластомы человека SH-SY5Y в нейроноподобную культуру, содержащую ДА-ергические нейроны. Был создан протокол и подобраны условия дифференцировки при помощи ретиноевой кислоты (РК) и форбол-12-миристан-13-ацетата (ФМА).

В результате было показано, что требуется 8 суточная поэтапная дифференцировка клеток SH-SY5Y, в ходе которой 4 суток клетки инкубируют в присутствии РК, а затем 4 суток в присутствии ФМА. В ходе дифференцировки и на 8-ой день наблюдались морфологические изменения клеток, образование нейритов и их сетей, характерных для нейрональных клеточных культур (Рис.2-2).

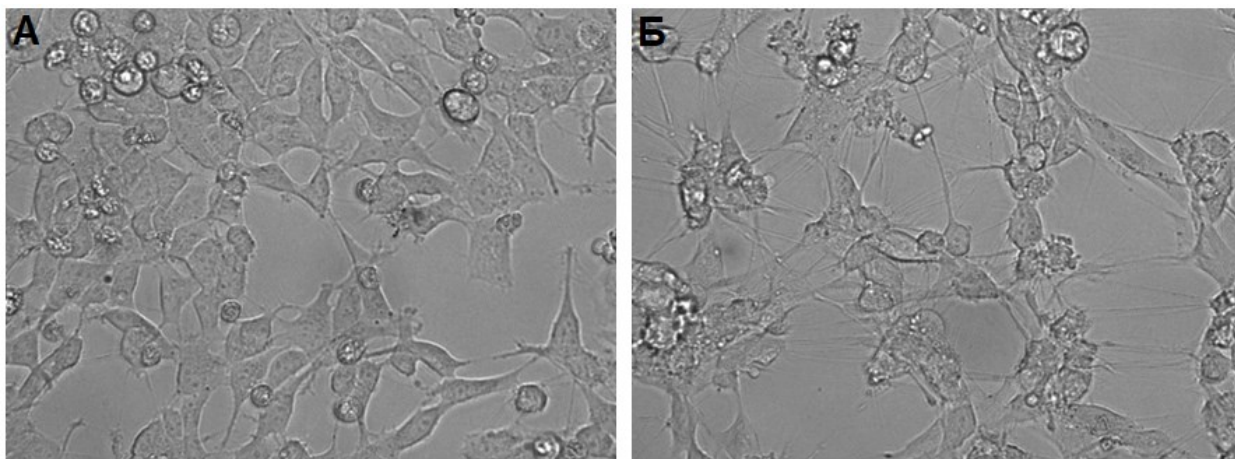


Рисунок 2-2. Отличия дифференцированной культуры от недифференцированной.
А. Недифференцированные SH-SY5Y после всего периода инкубации. Б. Клетки SH-SY5Y после всех этапов дифференцировки.

Однако анализ полученных в результате дифференцировки клеток не показал существенных изменений на молекулярном уровне по основному признаку ДА-ергических нейронов - наличию фермента ТГ, по сравнению с не дифференцированными клетками SH-SY5Y. Иммуноцитохимически не было выявлено существенного увеличения экспрессии ТГ в дифференцированных клетках по сравнению с не дифференцированными клетками SH-SY5Y (Рис.2-3). Клетки SH-SY5Y и дифференцированные имели одинаково слабую гистохимическую реакцию. Это показывает, что минимальное количество ТГ имеется уже в недифференцированных клетках нейробластомы, причем ее содержание в процессе дифференцировки меняется незначительно.

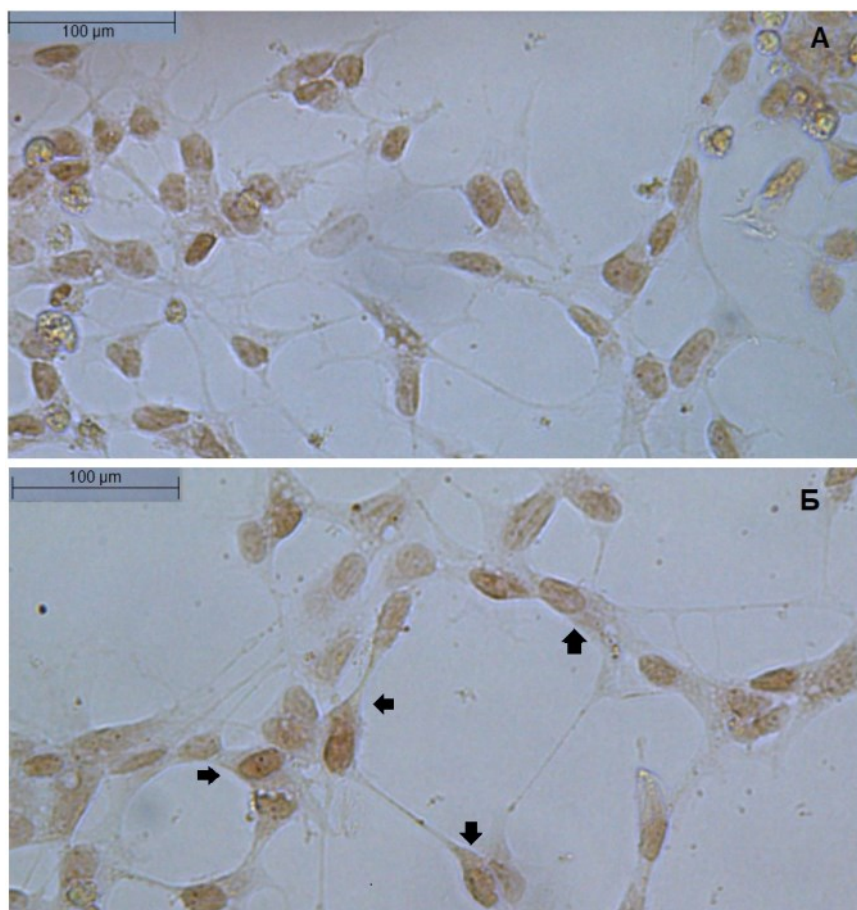


Рисунок 2-3. Иммуногистохимическое окрашивание при помощи пероксидазы на наличие в клетках фермента тирозингидроксилазы (ТГ). А. Недифференцированные SH-SY5Y. Б. Клетки SH-SY5Y после всех этапов дифференцировки.

В дополнении к иммуногистохимической оценке также была проведена оценка уровня экспрессии гена ТГ. Результаты ПЦР показали, что экспрессия гена ТГ не изменилась и осталась на уровне контрольных не дифференцированных клеток.

Основываясь на полученных результатах можно сделать следующие выводы. Во-первых, возможно дифференцировать клетки линии SH-SY5Y при помощи использования ретиноевой кислоты и форбол-миристат-ацетата. Во-вторых, при дифференцировке нейробластомы наблюдаются морфологические изменения: клетки приобретают нейроноподобный фенотип, появляются нейриты. На молекулярном уровне можно выявить незначительное содержание ТГ. Это свидетельствует, что клетки линии SH-SY5Y только отчасти дифференцируются в ДА-ергические нейроны. Эти данные накладывают определенные ограничения для использования клеток линии SH-SY5Y для изучения молекулярных механизмов нейродегенерации и компенсаторных процессов, включающихся при развитии болезни Паркинсона.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Угрюмов М.В. Синтез дофамина недофаминергическими нейронами как эффективный механизм нейропластичности//Нейрохимия. - 2018. - Т. 35. № 4. - С. 281 – 288. DOI: 10.1134/S1027813318040088.
2. Kurtova A.I., Dil'mukhametova L.K., Mingazov E.R., Ugrumov M.V. General Sources of Dopamine As a Potential Morphogenic Factor in the Developing Striatum of Rats//Doklady Biochemistry and Biophysics. - 2018. - V. 479. - P. 1 – 4. (WoS, Scopus) - Куртова А.И., Дильмухаметова Л.К., Мингазов Э.Р., Угрюмов М.В. Источники дофамина как потенциального морфогенетического фактора в развивающемся стриатуме у крыс//Доклады Академии наук. - 2018. - Т. 479. - № 6. - С. 1 – 5.
3. Ugrumov M.V. Developing brain as an endocrine organ: a paradoxical reality//Neurochem. Res. – 2010. - Vol. 35, P. 837 - 850.
4. Ugrumov M.V., Saifetyarova J.Y., Lavrentieva A.V., Saprionova A.Y. Developing brain as an endocrine organ: secretion of dopamine//Mol. Cell. Endocrinol. – 2012. - Vol. 348, P. 78 - 86.
5. Fernandez-Lopez D., Faustino J., Daneman R., Zhou L., Lee S.Y., Derugin N., Wendland M.F., Vexler Z.S. Blood–brain barrier permeability is increased after acute adult stroke but not neonatal stroke in the rat//J. Neurosci. – 2012. - Vol. 32, P. 9588 - 9600.
6. Daneman R. The blood–brain barrier in health and disease//Ann. Neurol. – 2012. – Vol. 72, P. 648 - 672.
7. Bauer H.C., Krizbai I.A., Bauer H., Traweger A. “You Shall Not Pass”—tight junctions of the blood brain barrier//Front. Neurosci. – 2014. – Vol. 8, P. 392.
8. Kostrzewa R.M. The blood-brain barrier for catecholamines – Revisited//Neurotox. Res. – 2007. - Vol. 11, P. 261 – 271.
9. Ugrumov M.V., Saprionova A.Y., Melnikova V.I., Proshlyakova E.V., Adamskaya E.I., Lavrentieva A.V., Nasirova D.I., Babichev V.N. Brain is an important source of GnRH in general circulation in the rat during prenatal and early postnatal ontogenesis//Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. – 2005. – Vol. 141, P. 271 - 279.
10. Zubova Yu., Nasyrova D., Saprionova A., Ugrumov M. Brain as an endocrine source of circulating 5-hydroxytryptamine in ontogenesis in rats//Mol. Cell. Endocrinol. – 2014. – Vol. 393, P. 92 - 98.
11. Olanow C.W., Tatton W.G. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease//Neuroscience. - 1999. - Vol. 22, P 123 – 144.

12. Chu Y., Morfini G.A., Kordower J.H. Alterations in activity-dependent neuroprotective protein in sporadic and experimental Parkinson's disease//Journal of Parkinson's Disease. - 2016. - Vol. 6, P. 77 – 97.
13. Barbeau A. L-DOPA therapy in Parkinson's disease. A critical review of nine years' experience//Canadian Medical Association Journal. - 1969. - Vol. 101, P. 59 – 68.
14. 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. - 2018. - Vol. 55, P. 2991 – 3006.
15. Ugrumov M., Kim A., Kolacheva A., Khakimova G., Nigmatullina R., Zalyalova Z., Georgieva S., Kudrin V. Novel paradigm for the development of preclinical diagnosis of Parkinson's disease based on searching blood markers and a provocation test//Parkinsonism & Related Disorders. - 2018. - Vol. 46 (Suppl 2), P. 44.
16. Aflyatunova G.N., Nigmatullina R.R., Sadykova D.I., Chibireva M.D., Fugetto F., Serra R. Endothelin-1, nitric oxide, serotonin and high blood pressure in male adolescents//Vascular Health and Risk Management. - 2018. - Vol. 14, P. 213 - 223.
17. Alieva A.K., Zyrin V.S., Rudenok M.M., Kolacheva A.A., Shulskaya M.V., Ugrumov M.V., Slominsky P.A., Shadrina M.I. Whole-transcriptome analysis of mouse models with MPTP-induced early stages of Parkinson's disease reveals stage-specific response of transcriptome and a possible role of myelin-linked genes in neurodegeneration//Molecular Neurobiology. - 2018. - Vol. 3, P. 1 - 13.
18. Mingazov E., Khakimova G., Kolacheva A., Kozina E., Medvedev A., Bazyan A., Ugrumov M. Molecular mechanisms of neurodegeneration and neuroplasticity in the nigrostriatal system at modeling Parkinson's disease as an instrument for translational medicine//Parkinsonism & Related Disorders. - 2018. - Vol. 46 (Suppl 2), P. 43 - 44.
19. Kolacheva A.A., Ugrumov M.V. Dopamine synthesis as a mechanism of brain plasticity in nigrostriatal system pathology//Doklady Biochemistry and Biophysics. - 2018. - Vol. 479, N 1, P. 83 - 86.
20. Kim A., Kozina E., Kurina A., M. Ugrumov. Cooperative synthesis of dopamine by striatal non-dopaminergic neurons as a mechanism of neuroplasticity at parkinsonism//Parkinsonism & Related Disorders. - 2018. - Vol. 46 (Suppl 2), P. 26 – 27.
21. Sarkar S., Raymick J., Imam S. Neuroprotective and therapeutic strategies against Parkinson's disease: recent perspectives//International Journal of Molecular Science. - 2016. - Vol. 17, P. 1 – 31.

22. Schneider L., Giordano S., Zelickson B.R., Johnson M. S., Benavides G. A., Ouyang X., Fineberg N., Darley-USmar V. M., Zhang J. Differentiation of SH-SY5Y cells to a neuronal phenotype changes cellular bioenergetics and the response to oxidative stress//Free Radical Biology and Medicine. - 2011. - Vol. 51, P. 2007 – 2017.
23. Zhu M.Y., Ordway G.A. Down-regulation of norepinephrine transporters on PC12 cells by transporter inhibitors//J. Neurochem. - 1997. - Vol. 68, № 1, P. 134 - 141.
24. Shevchenko V.P., Nagaev I.Y., Pronina T.S., Shevchenko K.V., Murtazina A.R., Surkov S.A., Ugryumov M.V., Myasoedov N.F. Synthesis of deuterium- or tritium-labeled norepinephrine and evaluation of its biological activity//Doklady Chemistry. - 2018. - Vol. 480, Is. 2. P. 117 - 120. (Scopus). - Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Пронина Т.С., Шевченко К.В., Муртазина А.Р., Сурков С.А., Угрюмов М.В., Мясоедов Н.Ф. Получение меченного дейтерием или тритием норадреналина и оценка его биологической активности//Доклады Академии наук. - 2018. - Т. 480. - № 5. - С. 551 - 554.
25. Хакимова Г.Р., Козина Е.А., Сапронова А.Я., Угрюмов М.В. Обратный захват дофамина в черной субстанции и стриатуме на досимптомной и ранней симптомной стадиях паркинсонизма у мышей//Доклады Академии наук. - 2010. - Т. 435. - № 2. - С. 272 - 274.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При проведении исследований по разделу 1 была дана оценка клиренса в крови «холодного» НА, введенного в сердце крысам на 3 и 30 постнатальные дни. При этом показано, что в течение 4,5 минут уровень НА в крови в 10 раз выше, по сравнению с уровнем эндогенного НА. Показано, что минимальный период специфического захвата ^3H -НА (не менее 45% от общего захват) в клетки РС12 и в срезы ствола и среднего мозга у крыс на 3 и 30 постнатальные дни был равен 4 минутам. Такого же уровня специфический захват был обнаружен *in vivo* в стволе мозга при введении ^3H -НА в кровь крысам на 3 постнатальный день, что указывает на проницаемость ГЭБ на этой стадии онтогенеза. Напротив, в аналогичном опыте на крысах на 30 постнатальный день специфического захвата ^3H -НА мозгом обнаружено не было, что свидетельствует о закрытии ГЭБ к этому возрасту. Эти данные подтверждают нашу гипотезу, что в критические периоды морфогенеза мозг может оказывать эндокринное влияние на развитие периферических органов и целостного организма. Дальнейшие исследования должны определить, какие именно факторы мозга являются индукторами развития, и приводит ли нарушение их метаболизма в период морфогенеза к развитию врожденных заболеваний.

При проведении исследований по разделу 2 было показано, что клетки SH-SY5Y (нейробластома человека) после поэтапной дифференцировки в течение 4-х суток под влиянием ретиноевой кислоты и 4-х суток под влиянием форбол-миристат-ацетата приобретают морфологические признаки нейрона – становятся овальными с длинными разветвленными нейритоподобными отростками. В этих клетках отмечена слабая иммунопозитивная реакция на ТГ, что свидетельствует, по крайней мере, о частичной экспрессии катехоламинергического фенотипа. Экспрессия гена ТГ в этих нейронах находится на таком низком уровне, что в проведенном исследовании не удалось обнаружить соответствующую мРНК с помощью ПЦР, т.е. содержание мРНК находится за пределами разрешающей способности метода.

Таким образом, исследования по разделу 1 подтвердили нашу гипотезу о формировании ГЭБ у крыс в раннем постнатальном периоде. Исследования по разделу 2, заложили основу для получения ДА-ергических нейронов из нейробластомы человека для их использования при изучении молекулярных механизмов нейродегенерации и нейропластичности, а также для скрининга лекарственных средств нового поколения с нейропротекторными свойствами.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ГЗ № 0108-2018-0006

*Отчетные публикации по теме ГЗ

1 *Aflyatunova G.N., Nigmatullina R.R., Sadykova D.I., **Chibireva M.D.**, Fugetto F., Serra R. Endothelin-1, nitric oxide, serotonin and high blood pressure in male adolescents//Vascular Health and Risk Management. - 2018. - Vol. 14, P. 213 - 223.

2 *Alieva A.K., Zyrin V.S., Rudenok M.M., **Kolacheva A.A.**, Shulskaya M.V., **Ugrumov M.V.**, Slominsky P.A., Shadrina M.I. Whole-transcriptome analysis of mouse models with MPTP-induced early stages of Parkinson's disease reveals stage-specific response of transcriptome and a possible role of myelin-linked genes in neurodegeneration//Molecular Neurobiology. - 2018. - Vol. 3, P. 1 - 13.

3 ***Kim A., Kozina E., Kurina A., M. Ugrumov.** Cooperative synthesis of dopamine by striatal non-dopaminergic neurons as a mechanism of neuroplasticity at parkinsonism//Parkinsonism & Related Disorders. - 2018. - Vol. 46 (Suppl 2), P. 26 – 27.

4 ***Kolacheva A.A., Ugrumov M.V.** Dopamine synthesis as a mechanism of brain plasticity in nigrostriatal system pathology//Doklady Biochemistry and Biophysics. - 2018. - Vol. 479, N 1, P. 83 - 86.

5 ***Kurtova A.I., Dil'mukhametova L.K., Mingazov E.R., Ugrumov M.V.** General sources of dopamine as a potential morphogenic factor in the developing striatum of rats//Doklady Biochemistry and Biophysics. - 2018. - V. 479. - P. 1–4. DOI: 10.1134/S1607672918020199). (WoS, Scopus) Куртова А.И., Дильмухаметова Л.К., Мингазов Э.Р., Угрюмов М.В. Источники дофамина как потенциального морфогенетического фактора в развивающемся стриатуме у крыс//Доклады Академии наук. - 2018. - Т. 479. - № 6. - С. 1 – 5. DOI: 10.7868/S0869565218120204. (РИНЦ)

6 ***Mingazov E., Khakimova G., Kolacheva A., Kozina E., Medvedev A., Bazyan A., Ugrumov M.** Molecular mechanisms of neurodegeneration and neuroplasticity in the nigrostriatal system at modeling Parkinson's disease as an instrument for translational medicine//Parkinsonism & Related Disorders. - 2018. - Vol. 46 (Suppl 2), P. 43 - 44.

7 ***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. - 2018. - Vol. 55, P. 2991 – 3006.

8 *Shevchenko V.P., Nagaev I.Y., Pronina T.S., Shevchenko K.V., **Murtazina A.R., Surkov S.A., Ugrumov M.V., Myasoedov N.F.** Synthesis of deuterium- or tritium-labeled norepinephrine and evaluation of its biological activity//Doklady Chemistry. - 2018. - Vol. 480, Is. 2. P. 117-120. DOI: 10.1134/S001250081806006X). (Scopus). Шевченко В.П., Нагаев

И.Ю., Пронина Т.С., Шевченко К.В., Муртазина А.Р., Сурков С.А., Угрюмов М.В., Мясоедов Н.Ф. Получение меченного дейтерием или тритием норадреналина и оценка его биологической активности//Доклады Академии наук. - 2018. - Т. 480. - № 5. - С. 551 - 554. DOI: 10.7868/S0869565218050109. (РИНЦ).

9 ***Ugrumov M., Kim A., Kolacheva A.,** Khakimova G., Nigmatullina R., Zalyalova Z., Georgieva S., Kudrin V. Novel paradigm for the development of preclinical diagnosis of Parkinson's disease based on searching blood markers and a provocation test//Parkinsonism & Related Disorders. - 2018. - V. 46 (Suppl 2), P. 44.

10 ***Ugryumov M.V.** Dopamine synthesis by non-dopaminergic neurons as an effective mechanism of neuroplasticity//Neurochemical Journal. 2018. - Vol. 12. No. 4. - P. 288 – 294 . DOI: 10.1134/S1819712418040086. (WoS, Scopus). Угрюмов М.В. Синтез дофамина недофаминергическими нейронами как эффективный механизм нейропластичности//Нейрохимия. - 2018. - Т. 35, - № 4, - С. 281 – 288. DOI: 10.1134/S1027813318040088.

Отчет утвержден на заседании Ученого совета, протокол № 12 от 27 декабря 2018 г