



Форма направления реферативно-библиографических сведений
о результатах научно-исследовательской, опытно-конструкторской и
технологической работы

I. Сведения о НИОКТР

Номер государственного учета НИОКТР

Дата постановки НИОКТР на учет

AAAA-A19-119032190096-3	21/03/2019
-------------------------	------------

Наименование НИОКТР

-Роль сигнальных молекул мозга в нейроэндокринных и нервных регуляциях в онтогенезе

Руководитель НИОКТР

Фамилия, Инициалы

Ученая степень

Ученое звание

Угрюмов М.В.	Доктор биологических наук	Академик
--------------	---------------------------	----------

II. Сведения об отчете

Номер государственного учета отчета

Дата постановки отчета на учет

AAAA-B20-220032090137-9	20/03/2020
-------------------------	------------

Наименование отчета

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)

Тематическая(-ие) рубрика(-и)

Индекс УДК

34.15.41; 34.15.43; 34.15.65; 34.39.39	577.2.05:612.43
--	-----------------

Коды международной классификации отраслей наук

01.00.00

Дата утверждения отчета

27/12/2019

Кол-во книг (томов)

1

Общее кол-во страниц

41

Номера книг (томов)/Кол-во страниц

1/41	2/0	3/0	4/0	5/0	6/0	7/0	8/0	9/0	10/0	11/0	12/0	13/0	14/0	15/0	16/0	17/0	18/0	19/0	20/0
------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

Приложений

0

Таблиц

0

Иллюстраций

15

Библиография

52

Публикаций по результатам НИОКТР

4

Фамилия, инициалы

Должность

СНИЛС

Подпись

Руководитель организации-исполнителя

Васильев А. В.	Директор	00133521977	
----------------	----------	-------------	--

Место для печати

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 0108-2019-0006

Рег. № НИОКТР АААА-А19-119032190096-3

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБР РАН

доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН



А.В. Васильев

«27» декабря 2019 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,
заведующий лабораторией,
доктор биологических наук,
профессор,
академик РАН

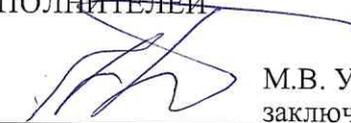
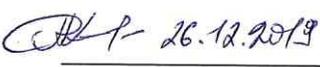
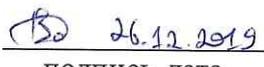
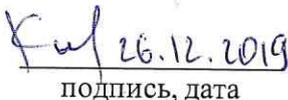
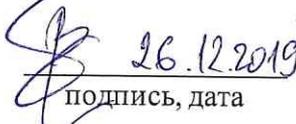
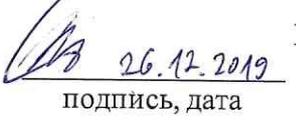
М.В. Угрюмов

24.12.2019

подпись, дата

Москва 2019

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель: зав. лабораторией, доктор биологических наук, профессор, академик РАН	 подпись, дата	М.В. Угрюмов (Введение, заключение) 24.12.2019
Исполнители: старший научный сотрудник, кандидат биологических наук	 подпись, дата	Т.С. Пронина (раздел 1) 26.12.2019
Научный сотрудник, кандидат биологических наук	 подпись, дата	Л.К. Дильмухаметова (раздел 1) 26.12.2019
Научный сотрудник, кандидат биологических наук	 подпись, дата	Ю.О. Никишина (раздел 1) 26.12.2019
Младший научный сотрудник	 подпись, дата	В.В. Сафандеев (раздел 1) 26.12.2019
Младший научный сотрудник, кандидат биологических наук	 подпись, дата	А.Р. Муртазина (раздел 1) 26.12.2019
Научный сотрудник, кандидат биологических наук	 подпись, дата	Н.С. Бондаренко (раздел 1) 26.12.2019
Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук	 подпись, дата	А.Я. Сапронова (раздел 2) 26.12.2019
Научный сотрудник, кандидат биологических наук	 подпись, дата	А.А. Колачева (раздел 2) 26.12.2019
Научный сотрудник, кандидат биологических наук	 подпись, дата	А.Р. Ким (раздел 2) 26.12.2019
Старший лаборант, аспирант	 подпись, дата	В.Е. Блохин (раздел 2) 26.12.2019
Младший научный сотрудник	 подпись, дата	В.В. Богданов (раздел 2) 26.12.2019

Инженер-исследователь

Сурков 26.12.2019 С.А. Сурков (раздел 2)
подпись, дата

Инженер-исследователь

Павлова 26.12.2019 Е.Н. Павлова (раздел 2)
подпись, дата

Инженер-исследователь

Рябинкина 26.12.2019 К.М. Рябинкина
(раздел 2)
подпись, дата

Нормоконтроль, ведущий научный
сотрудник, кандидат биологических наук

Абрамова 27.12.2019 Е.Б. Абрамова
подпись, дата

РЕФЕРАТ

Отчет 41 с., 15 рис., 52 источника, публикаций по теме 4

Ключевые слова: ОНТОГЕНЕЗ, НЕЙРОЭНДОКРИННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ, НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИЯ, НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТЬ, ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР, НОРАДРЕНАЛИН, ДОФАМИН, НЕЙРОН, РЕТИНОПАТИЯ НЕДОНОШЕННЫХ.

Объектами исследования были крысы Вистар на 3-й и 30-й постнатальные дни (ПЗ и ПЗ0) и мыши линии C57BL/6 на 13-й день эмбрионального развития (Э13).

Цель работы: изучение роли катехоламинов, синтезируемых мозгом, в процессе нормального развития организма, а так же в патогенезе социально значимых заболеваний.

Задачи: 1) получение доказательств того, что мозг в онтогенезе у крыс до закрытия гематоэнцефалического барьера является источником норадреналина в общей системе циркуляции; 2) оценка возможности участия катехоламинов в патогенезе ретинопатии недоношенных; 3) создание на основе первичной клеточной культуры модели болезни Паркинсона и ее характеристика по основным показателям; 4) оценка компенсаторных механизмов на модели БП *in vivo*.

В работе использованы методы ВЭЖХ, иммуногистохимия и радиометрия.

Полученные результаты: (1) мозг является источником норадреналина в общей системе циркуляции в раннем постнатальном периоде, и перестает быть таковым к препубертатному периоду развития; (2) на модели ретинопатии недоношенных у крыс показано, что L-диоксифенилаланин и норадреналин потенциально могут быть задействованы в развитии патогенеза данного заболевания; (3) разработана и охарактеризована клеточная нейротоксическая модель болезни Паркинсона: наблюдается значительное снижение количества ТГ-иммунореактивных нейронов и их нейритов, уменьшение содержания внутриклеточного дофамина, а так же снижение уровня его обратного захвата; (4) показано, что при моделировании клинической стадии болезни Паркинсона включаются компенсаторные механизмы кооперативного синтеза дофамина в недофаминергических нейронах. Полученные результаты вносят существенный вклад в фундаментальные представления о роли сигнальных молекул мозга в процессе онтогенеза, а так же в развитие методологии изучения функционирования мозга в норме и при патологии.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	9
РАЗДЕЛ 1. РОЛЬ РАЗВИВАЮЩЕГОСЯ МОЗГА В НЕЙРОЭНДОКРИННОЙ РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЦЕЛОСТНОГО ОРГАНИЗМА 9	
1.1 Цели и задачи	9
1.2 Материалы и методы	9
1.2.1. Животные	9
1.2.2. Стереотаксическое введения нейротоксина в боковые желудочки мозга	9
1.2.3. Воспроизведение экспериментальной модели ретинопатии недоношенных ..	10
1.2.4. Взятие и обработка материала	11
1.2.5. Высокоэффективная жидкостная хроматография	12
1.2.6. Статистическая обработка результатов	13
1.3. Результаты и обсуждение	13
РАЗДЕЛ 2. ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ И НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТИ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ	22
2.1. Цели и задачи	22
2.2. Материалы и методы	22
2.2.1. Экспериментальные животные	22
2.2.2. Первичная диссоциированная культура дофаминергических нейронов	22
2.2.3. Моделирование болезни Паркинсона <i>in vitro</i>	23
2.2.4. Моделирование болезни Паркинсона <i>in vivo</i>	23
2.2.5. Инкубация срезов <i>ex vivo</i>	24
2.2.6. Иммуноцитохимия	24
2.2.7. Анализ изображений	25
2.2.8. Изотопный метод	26
2.2.9. Высокоэффективная жидкостная хроматография	26
2.2.10. Статистика	27
2.3. Результаты и обсуждение	27
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	35
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	36
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ГЗ № 0108-2019-0006	36

СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

В настоящем отчете НИР применяют следующие сокращения и обозначения:

6-ГДА – 6-гидроксидофамин,

АНК - 2-амино-2-норборнанкарбоновая кислота,

БП – болезнь Паркинсона,

ВЭЖХ-ЭД – высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимической детекцией,

ДАТ – мембранный транспортер дофамина,

ДГБА – 3,4 гидробромида дигидроксибензиламин,

МФП⁺ - 1-метил-4-фенилпиридиния ион,

МФТП- 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин,

П – постнатальный день развития,

РН – ретинопатия недоношенных,

ФСБ – фосфатно-солевой буфер,

Э – эмбриональный день развития,

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота,

L-ДОФА - L-диоксифенилаланин.

ВВЕДЕНИЕ

Раздел 1. Мозг, и особенно гипоталамус, у взрослых животных является центральным звеном системы нейроэндокринной регуляции важнейших функций и поддержания постоянства внутренней среды организма [1]. Изучая роль сигнальных молекул мозга в нейроэндокринных и нервных регуляциях в онтогенезе, наиболее актуальным представляется исследование роли мозга в нейроэндокринной регуляции развития и функционирования целостного организма, а также изучение молекулярных механизмов нейродегенерации и нейропластичности в мозге.

Согласно сложившейся к концу 80-х годов концепции, мозг до своего полного созревания, т.е. до формирования межнейрональных синаптических связей и гематоэнцефалического барьера, не участвует в нейроэндокринной регуляции периферических органов и только после окончательной дифференцировки нейронов и установления синаптической нейротрансмиссии берет под свой контроль гипофиз, а через него опосредованно и все остальные эндокринные железы [2, 3, 4, 5].

В последние годы представления о роли мозга в нейроэндокринной регуляции в онтогенезе претерпели существенные изменения. В нашей лаборатории была сформулирована и для ряда веществ доказана гипотеза, согласно которой мозг в онтогенезе до формирования гематоэнцефалического барьера функционирует как эндокринный орган, выделяя в общую систему циркуляции физиологически активные вещества и оказывая, таким образом, влияние на развитие и функционирование периферических органов и клеток-мишеней [6, 7, 8, 9]. В данной работе мы продолжаем развивать нашу гипотезу: во первых, расширяя спектр молекул, для которых мозг является источником в общей системе циркуляции, а, во вторых, изучая роль мозга как эндокринного органа в патогенезе врожденных заболеваний.

Раздел 2. Болезнь Паркинсона (БП) – нейродегенеративное заболевание, характеризующееся гибелью дофаминергических нейронов nigrostriatной системы. Важной особенностью БП является длительное бессимптомное течение на протяжении многих лет, что обусловлено включением компенсаторных процессов по мере деградации nigrostriatной системы [10]. Молекулярные механизмы, запускающие нейродегенерацию, до сих пор не выяснены и их продолжают изучать как в клинике, так и на моделях *in vivo* и *in vitro*. Для более полного изучения развития БП и изменения молекулярных механизмов перспективными считаются клеточные культуры первичных нейронов, так как они содержат в себе истинные дофаминергические нейроны. Наличие такой хорошо описанной и воспроизводимой модели позволило бы более подробно

изучить проблему возникновения БП, а также найти механизмы позволяющие замедлить либо препятствовать развитию заболевания.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

РАЗДЕЛ 1. РОЛЬ РАЗВИВАЮЩЕГОСЯ МОЗГА В НЕЙРОЭНДОКРИННОЙ РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЦЕЛОСТНОГО ОРГАНИЗМА

1.1 Цели и задачи

Целью раздела 1 «Роль развивающегося мозга в нейроэндокринной регуляции развития и функционирования целостного организма» является изучение эндокринной функции мозга в норме и при патологии.

Задачи:

-получение доказательств того, что мозг в онтогенезе у крыс до закрытия гематоэнцефалического барьера является источником норадреналина в общей системе циркуляции;

-оценка возможности участия катехоламинов в патогенезе ретинопатии недоношенных.

1.2 Материалы и методы

1.2.1. Животные

Работа была выполнена на самцах крыс популяции Вистар на 2, 3, 7, 14, 21, 30 и 31 постнатальные дни (П1). Животных содержали при 21-23°C при светло-темном 12-часовом цикле со свободным доступом к пище и воде. Для получения датированной беременности взрослых самцов вечером помещали в клетку с взрослыми самками, а на следующее утро исследовали мазки из влагалища. День обнаружения спермы в мазке считался первым днем беременности или эмбриональным днем (Э1). День рождения крыс считался П1. Пол животных определяли путем оценки аногенитального расстояния у постнатальных животных.

1.2.2. Стереотаксическое введения нейротоксина в боковые желудочки мозга

Крыс на П2 и П30 анестезировали изофлураном, используя систему Kent Scientific, США. Далее в боковой желудочек мозга вводили нейротоксин - 6-гидроксидофамин (6-ГДА), 7,5 мкг на П2 и 150 мкг на П30. Для защиты дофаминергических нейронов предварительно за 30 минут до введения нейротоксина системно вводили GBR 12909 – ингибитор обратного захвата дофамина [11]. Внутрижелудочковая инъекция была сделана через стеклянную микроканюлю (диаметр наконечника – 50 мкм), которая была стереотаксически введена в боковой желудочек мозга на П2 на 1,2 мм латеральнее брегмы

и вглубь мозга на 2,0-2,4 мм крысам, а на ПЗ0 на 1,3 мм латерально и на 0,4 мм каудально от брегмы и вглубь мозга на 2,5 мм. Через 24 часа после инъекции собирали мозг и плазму крови, образцы хранили при -70°C до определения в них катехоламинов.

1.2.3. Воспроизведение экспериментальной модели ретинопатии недоношенных

При воспроизведении экспериментальной модели ретинопатии недоношенных (РН) новорожденных крысят помещали в инкубатор вместе с родившей их самкой. Каждые 12 часов концентрация кислорода в инкубаторе колебалась от 60 до 15%. Затем крысят помещали в условия с нормальным содержанием кислорода (21%). На протяжении эксперимента в помещении поддерживали постоянный температурный ($+26^{\circ}\text{C}$) и световой (12 часов день, 12 часов ночь) режимы (рисунок 1.1). Контрольную группу составили крысята, находившиеся с момента рождения в условиях с нормальным содержанием кислорода.

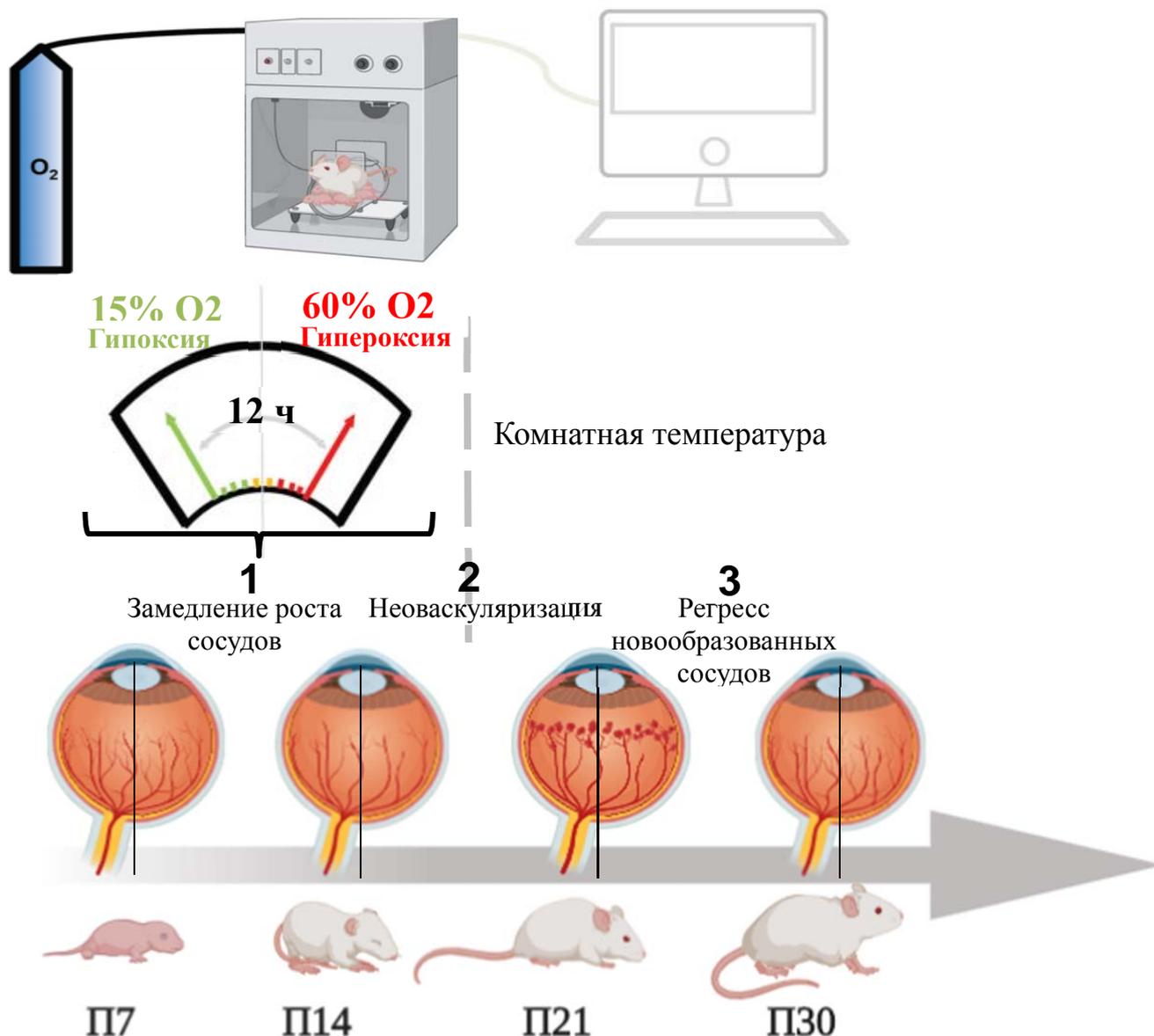


Рисунок 1.1. - Воспроизведение экспериментальной модели ретинопатии недоношенных у крыс.

Крысят выводили из эксперимента на 7-е, 14-е, 21-е и 30-е сутки. У контрольных крыс и на воспроизведенной экспериментальной модели РН в указанные сроки под наркозом (хлоралгидрат, 400 мг/кг) (Sigma, США) собирали кровь из сердца и проводили бинокулярную энуклеацию.

1.2.4. Взятие и обработка материала

Выделенные сетчатки гомогенизировали в 10 объемах 0,1 н HClO₄, содержащей 50 пмоль/мл 3,4 –гидробромида - дигидроксибензиламина (ДГБА) в качестве внутреннего стандарта, при помощи ультразвукового гомогенизатора (Labsonic M, Sartorius), центрифугировали при 16500g в течение 20 минут. Супернатант отбирали и хранили при -

70°C до определения катехоламинов и их метаболитов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ-ЭД).

Выделенный мозг гомогенизировали в 10 объемах 0,1 н HClO₄, содержащей 250 пмоль/мл ДГБА при помощи ультразвукового гомогенизатора (Labsonic M, Sartorius), центрифугировали при 16500g в течение 20 минут, далее отбирали супернатант и экстрагировали осаждением на оксиде алюминия. Затем определяли катехоламины с помощью ВЭЖХ-ЭД.

Для определения катехоламинов в плазме, собранную кровь переносили в пробирку, содержащую 30 мкл 5% раствора этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) (Sigma, США) и 10 мкл 10% раствора метабисульфита натрия (Sigma, США). Далее проводили отделение плазмы от форменных элементов. Для этого образцы центрифугировали при 1350 g в течение 10 минут и добавляли 50 пмоль ДГБА (Sigma, США) в 0,1 Н HClO₄. Для освобождения от высокомолекулярных белков плазму, переносили в пробирки и хранили при -70 °С. Перед определением катехоламинов и их метаболитов пробы экстрагировали осаждением на оксиде алюминия.

1.2.5. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Измерение содержания катехоламинов в сетчатке, мозге и их концентрации в плазме крови у крыс осуществляли с помощью ВЭЖХ-ЭД на хроматографе LC-20ADsp (Shimadzu, Japan). Электрохимический детектор DECADE II (Antec, Нидерланды) был оборудован стеклянной углеродной проточной кюветой и солевым мостиком Ag/AgCl, электрод сравнения с потенциалом, установленным на + 0,85В. Разделение веществ проводили на обратно-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 мл/мин. В качестве подвижной фазы использовали 0,1 М цитратно-фосфатный буфер, состоящий из 0,3 мМ октансульфоната натрия, 0,1 мМ ЭДТА и 8% ацетонитрила (все реактивы – Sigma, США), (pH = 2,52). Пики катехоламинов определяли по времени их выхода в стандартном растворе. Содержание рассчитывали методом внутреннего стандарта с помощью программного обеспечения LabSolutions (Shimadzu, Япония), используя отношение площадей пиков в стандартной смеси и образце:

$$C_{\text{КА пр}} = \frac{S_{\text{КА пр}}}{S_{\text{ДГБА пр}}} \times \frac{S_{\text{ДГБА ст}}}{S_{\text{КА ст}}} C_{\text{ДГБА пр}}$$

$C_{\text{КА пр}}$ – концентрация катехоламинов в пробе, $S_{\text{КА пр}}$ – площадь пика катехоламинов в пробе, $S_{\text{ДГБА пр}}$ – площадь пика ДГБА в пробе, $S_{\text{ДГБА ст}}$ – площадь пика ДГБА в стандарте, $S_{\text{КА ст}}$ – площадь пика катехоламинов в стандарте, $C_{\text{ДГБА пр}}$ – концентрация ДГБА в пробе.

1.2.6. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы GraphPad Prism 6. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Достоверность различий признавалась при $p < 0,05$, при $0,05 < p < 0,1$ расценивалось как тенденция к изменению, при $p > 0,1$ различия считали недостоверными. Для определения статистической значимости полученных результатов был использован непараметрический критерий Манна–Уитни.

1.3. Результаты и обсуждение

Долгое время считалось, что мозг у млекопитающих до окончательного формирования и установления нейротрансмиссии не участвует в регуляции функций целостного организма [2, 3, 4, 5]. Однако в последние годы в нашей лаборатории были получены данные, которые указывают на то, что мозг задолго до своего полного созревания и формирования гематоэнцефалического барьера может быть источником физиологически активных веществ в общей системе циркуляции, и таким образом оказывать влияние на развитие и функционирование периферических органов и клеток-мишеней [12, 13, 14, 7]. Ключевым моментом в данной гипотезе является гематоэнцефалический барьер и время его формирования, так как большинство физиологически-активных веществ, синтезируемых мозгом, не способны проникать через него [15, 16, 17]. Гематоэнцефалический барьер - это сложная система, которая включает в себя не только структурную составляющую - плотные контакты между эндотелиальными клетками кровеносных сосудов, но так же и целую систему специфических для каждого определенного вещества транспортеров и ферментов деградации [18]. В связи с этим возникает необходимость получения доказательств эндокринной функции мозга для каждого конкретного вещества. В зону интересов нашей лаборатории уже на протяжении многих лет входят моноамины, которые обладают широким спектром физиологического действия не только в центральной нервной системе, но и на периферии. Кроме того, многие из них являются мощными индукторами развития. Среди веществ, входящих в

данную группу, нами ранее была показана эндокринная функция мозга для дофамина и серотонина [8, 9]. В рамках данной работы было необходимо получить доказательство того, что мозг в онтогенезе до формирования гематоэнцефалического барьера может являться источником норадреналина в общей системе циркуляции.

С этой целью нами была разработана модель выключения синтеза норадреналина в мозге неонатальных крыс. Основным требованием, предъявляемым к разрабатываемой модели, являлось выключение синтеза норадреналина только в мозге, не затрагивая при этом его синтез в периферических органах. Для этого стереотаксически в боковые желудочки мозга вводили 6-ГДА – специфический нейротоксин катехоламинергических нейронов, который захватывается мембранными переносчиками дофамина и норадреналина и вызывает разобщение цепи окислительного фосфорилирования в митохондриях, что приводит к гибели нейронов [19]. Для того, чтобы вызвать избирательную гибель только норадренергических нейронов и сохранить дофаминергические, до введения 6-ГДА подкожно вводили GBR 12909 – ингибитор обратного захвата дофамина, а, следовательно, и 6-ГДА в дофаминергические нейроны [11, 20].

Поскольку у новорожденных крыс нет гематоэнцефалического барьера [21, 22], 6-ГДА может диффундировать из желудочков мозга в кровотоки, оказывая прямое токсическое действие на периферические органы, экспрессирующие мембранный переносчик норадреналина. Чтобы избежать этого, мы провели предварительное скрининговое исследование, в ходе которого была подобрана доза 7,5 мкг, при которой 6-ГДА вызывает снижение содержания норадреналина в мозге, но не влияет на периферические органы. Норадреналин и дофамин измеряли в мозге и периферических органах через 24 часа после внутрижелудочкового введения 6-ГДА, который является периодом нейродегенерации, вызванной специфическими токсинами катехоламинергических нейронов [23, 24]. При стереотаксическом введении 6-ГДА на фоне GBR 12909 в боковые желудочки мозга было показано снижение концентрации норадреналина в мозге на 53% и в плазме крови на 45%, тогда как концентрация норадреналина в периферических органах не изменялась (рисунок 1-2). Таким образом, в данной работе мы впервые показали, что у новорожденных крыс норадреналин поступает из мозга в общую систему циркуляции.

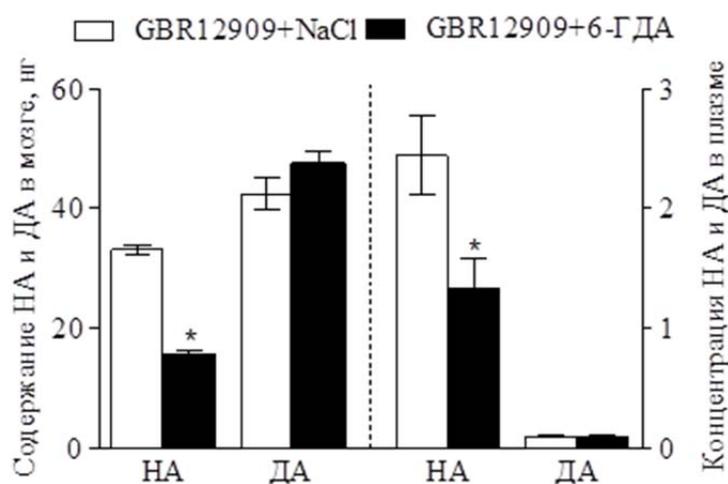


Рисунок 1.2. - Содержание норадреналина (НА) и дофамина (ДА) в мозге (слева) и концентрация НА и ДА в плазме (справа) у крыс на 3 постнатальный день после подкожного введения GBR 12 909 (40 мг / кг) и через 1 ч внутрижелудочкового введения 6-ГДА в дозе 7,5 мг или 0,9% NaCl (контроль), * $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Следующая задача этого исследования состояла в том, чтобы проверить нашу гипотезу о том, что норадреналин доставляется из мозга в кровоток только в период морфогенеза, но не позднее. Чтобы решить эту задачу, мы ингибировали синтез норадреналина в мозге крыс на П30 путем внутрижелудочкового введения 6-ГДА на фоне GBR 12909. Учитывая то, что гематоэнцефалический барьер непроницаем для моноаминов у взрослых крыс [21, 22], мы выбрали максимальную дозу 6-ГДА – 150 мкг, при которой этот токсин при подкожном введении не влияет на периферические катехоламин-содержащие органы. Как и у новорожденных крыс, внутрижелудочковое введение 6-ГДА крысам на П30 через 24 часа приводило к аналогичному снижению содержания норадреналина в мозге. Следует подчеркнуть, что, в отличие от неонатальных крыс, на П30 не было изменений концентрации норадреналина в плазме после введения GBR и 6-ГДА, что свидетельствует об отсутствии поступления норадреналина из мозга в общий кровоток в данный период онтогенеза (рисунок 1.3). По-видимому, это связано с установлением гематоэнцефалического барьера у крыс к П30.

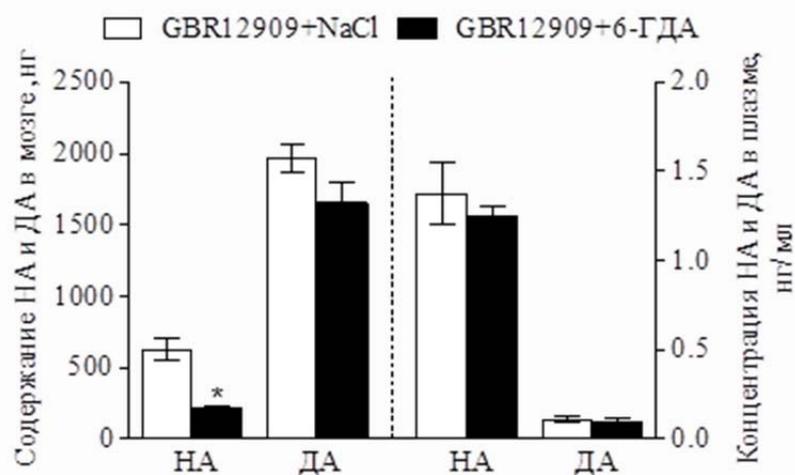


Рисунок 1.3. - Содержание норадреналина (НА) и дофамина (ДА) в мозге (слева) и концентрация НА и ДА в плазме (справа) у крыс на 31 постнатальный день после подкожного введения GBR 12909 (40 мг / кг) и через 1 ч внутрижелудочкового введения 6-ГДА в дозе 150 мг или 0,9% NaCl (контроль), * $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Последнее подтверждается отсутствием изменений содержания норадреналина и дофамина в исследуемых периферических органах (данные не представлены). При изучении эндокринной функции мозга одним из важнейших аспектов является развитие различных заболеваний при ее нарушении. Поиск таких патологий осложняется тем, что ранее участие мозга никогда не рассматривалось в патогенезе врожденных или приобретенных в раннем постнатальном периоде заболеваний. С этой точки зрения нам кажутся перспективными заболевания, которые развиваются у недоношенных детей, так как преждевременные роды очень часто сопровождаются гипоксией плода, что в свою очередь оказывает сильное влияние на развитие и функционирование мозга [25]. В данной работе мы попытались оценить возможность участия молекул, потенциально секретируемых мозгом, в патогенезе РН, которая характеризуется нарушением развития кровеносных сосудов в сетчатке у недоношенных детей. Согласно современным представлениям, ключевую роль в развитии РН играет изменение соотношения экспрессии различных ростовых факторов, которые регулируют ангиогенез [26]. Однако в последние годы предметом активного изучения являются ангиогенные свойства моноаминов, одним из источников которых в общей системе циркуляции является развивающийся мозг.

На первом этапе данного исследования мы должны были оценить принципиальную возможность участия катехоламинов в развитии РН. С этой целью мы оценили их содержание в сетчатке крыс на экспериментальной модели данного заболевания. Воспроизведение модели осуществлялась на крысах разных сроков развития, которые

соответствовали определенным фазам РН (задержки роста сосудов сетчатки и фазу вазопрлиферации).

В сетчатке дофамин синтезируется в специализированных дофаминергических амакриновых клетках. В онтогенезе эти клетки, содержащие тирозингидроксилазу (ТГ), выявляются в сетчатке крыс на 10-14 постнатальные (П) дни жизни [27]. Эти данные хорошо согласуются с результатами данной работы. Действительно, дофамин нами так же впервые обнаружен в сетчатке у крыс на П14, причем его содержание незначительно и составляет около 0,5 пмоль (рисунок 1-4). Далее содержание дофамина в сетчатке у крыс в норме (контроль) растет и к П30 увеличивается более чем в 10 раз (рисунок 1-4), что согласуется с морфологическими данными об увеличении числа амакриновых клеток и разрастании их отростков [27]. Из этих данных следует, что развитие сети амакриновых клеток и становление их физиологической функции приходится на основной период развития заболевания – неоваскуляризацию и регресс новообразованных сосудов.

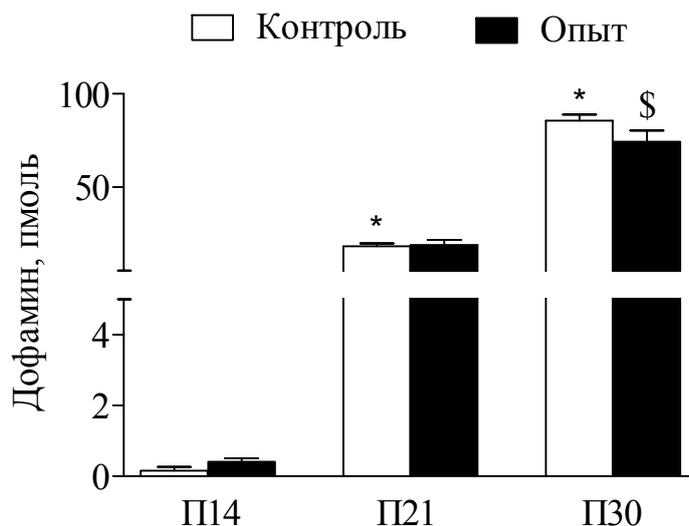


Рисунок 1.4. - Содержание дофамина в сетчатке крыс на экспериментальной модели ретинопатии недоношенных в онтогенезе. П – постнатальный день развития. * $P < 0,05$ различия по сравнению с предыдущим сроком исследования между контрольными группами. \$ $P < 0,1$ тенденция по сравнению с контролем

Работ, посвященных определению дофамина в сетчатке крыс на экспериментальной модели РН крайне мало, полученные в них данные весьма противоречивы. Так, Zhang с соавт. на крысиной модели и Spix с соавт. на мышинной модели РН выявили снижение содержания дофамина и его метаболита (ДОФУК) в сетчатке животных с РН [28, 29]. Авторы показали, что на их модели РН снижение уровня дофамина вызвано гибелью дофаминергических амакриновых клеток. В нашем исследовании наблюдалась лишь тенденция ($p=0,14$) к снижению уровня дофамина в экспериментальной группе на П30. Данный период соответствует фазе регресса новообразованных сосудов. Принимая во внимание то, что дофамин способен проявлять антиангиогенную активность, можно предположить, что поддержание нормального физиологического уровня дофамина в сетчатке (на уровне контроля) в процессе неоваскуляризации проявляется как компенсаторное усиление синтеза дофамина в выживших дофаминергических амакриновых клетках направленное на подавление неконтролируемого ангиогенеза. Когда же рост сосудов приостанавливается и наступает фаза регресса, выжившие клетки прекращают гиперсекрецию дофамина, и мы видим тенденцию к снижению его уровня в наших экспериментах. Однако данное предположение требует дальнейших исследований.

Наряду с дофамином в данном исследовании мы определили содержание L-ДОФА в сетчатке. Известно, что в нервной системе L-ДОФА является предшественником дофамина и синтезируется из тирозина с участием фермента ТГ. Также L-ДОФА является

предшественником меланина, который синтезируется в пигментном эпителии сетчатки с помощью фермента тирозиназы. Стоит отметить, что непосредственно в сетчатке был найден рецептор к L-ДОФА – GPR143 [30]. При этом на культуре клеток пигментного эпителия человека было показано, что L-ДОФА является антиангиогенным фактором, вызывая снижение VEGF через путь GPR143 [31]. Эти данные позволяют рассматривать L-ДОФА как ключевую молекулу, вовлеченную в патогенез РН.

В данной работе L-ДОФА детектируется в образцах сетчатки в норме (контроль) на П7, первый изученный срок. Учитывая, что в пробах на П14 мы не обнаружили дофамин, можно предположить, что основным источником L-ДОФА на протяжении первых двух недель жизни крыс являются клетки пигментного эпителия сетчатки. С П14 по П21 происходит резкое увеличение L-ДОФА в норме (контроль) (в 14 раз), что может быть связано с наличием двух источников – дофаминергических амакриновых клеток и клеток пигментного эпителия.

На экспериментальной модели РН первые изменения были обнаружены на П21, когда содержание L-ДОФА снизилось в 2 раза по сравнению с контролем. Такое же снижение сохранялось и на П30 (рисунок 1.5). Период с П18 по П22 является пиком неоваскуляризации. С учетом того, что L-ДОФА в сетчатке ингибирует продукцию VEGF через рецепторы GPR143, а, следовательно, проявляет антиангиогенную активность [31], снижение его содержания может вносить вклад в развитие неконтролируемой неоваскуляризации сетчатки.

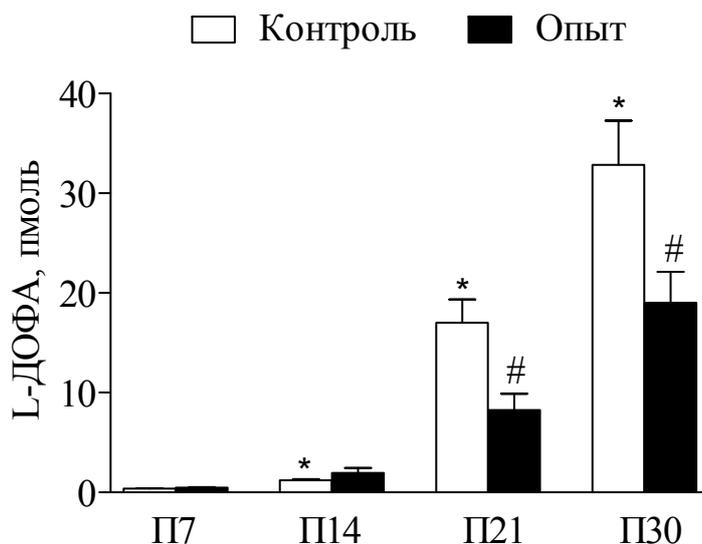


Рисунок 1.5. - Содержание L-дезоксифенилаланина (L-ДОФА) в сетчатке у крыс на экспериментальной модели ретинопатии недоношенных в онтогенезе. П – постнатальный день развития. *P<0,05 различия по сравнению с предыдущим сроком исследования между контрольными группами. #P<0,05 различия по сравнению с контролем

Согласно данным литературы, норадреналин является проангиогенным фактором, повышающим продукцию VEGF через воздействие на β -адренорецепторы. Более того, было показано усиление синтеза норадреналина при моделировании кислород-индуцированной ретинопатии у мышей, а также эффективность пропранолола в ингибировании процессов неоваскуляризации [32]. В ходе пилотного рандомизированного контролируемого исследования при активной фазе РН, на 2 стадии II зоны у детей были получены положительные результаты в отношении торможения прогрессирования РН при пероральном введении пропранолола, однако наблюдалось развитие системных побочных эффектов в виде брадикардии и гипотензии [33]. В связи с этим мы в своей работе также оценивали уровень норадреналина на модели РН на всех исследуемых сроках. На П7 норадреналин детектируется в сетчатке, но различий в его содержании между опытной и контрольной группами нет (рисунок 1.6). На П14, когда, согласно результатам проведенных нами ранее исследований [34], выявляется экспрессия ядерного антигена пролиферирующих клеток – PCNA в клетках эндотелия, свидетельствующая об активизации их репликативного потенциала, содержание норадреналина возрастало на порядок у экспериментальных животных по сравнению с контролем. Начиная с П21 в нашем исследовании норадреналин не детектировался в сетчатке ни у контрольных, ни у экспериментальных животных. Этот факт заслуживает особого внимания, поскольку на протяжении всего периода постнатального развития в сетчатке присутствует

норадренергическая иннервация и выявляются адренорецепторы [35, 32]. К сожалению, работ посвященных изучению возрастной динамики содержания норадреналина в сетчатке крайне мало, однако Shelke и соавторы детектировали норадреналин в сетчатке крыс на П21, но для этого они пулировали по 6-8 образцов на пробу [36]. По-видимому, содержание свободного норадреналина в сетчатке после второй недели постнатального развития достаточно мало и находится за пределами разрешающей способности ВЭЖХ-ЭД. Эти данные дают нам возможность предполагать, что именно в первые две недели постнатального онтогенеза, когда содержание норадреналина максимально, он играет особую роль в развитии сетчатки. В это же время в процессе нормального развития происходит васкуляризация сетчатки.

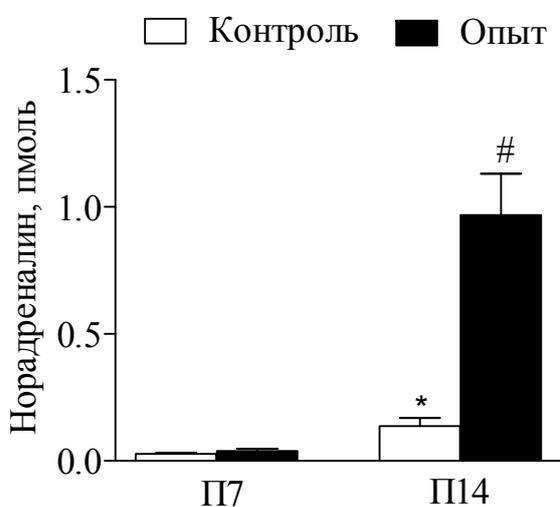


Рисунок 1.6. - Содержание норадреналина в сетчатке у крыс на экспериментальной модели ретинопатии недоношенных в онтогенезе. П – постнатальный день развития. * $P < 0,05$ различия по сравнению с предыдущим сроком исследования между контрольными группами. # $P < 0,05$ различия по сравнению с контролем

На основании полученных данных и анализа литературы, с высокой долей вероятности можно полагать, что норадреналин участвует в нормальном ангиогенезе сетчатки, а так же играет немаловажную роль в процессе развития РН. Однако данное предположение требует дальнейшей проверки.

Таким образом, в ходе данной работы мы показали, что катехоламины могут играть значительную роль в развитии РН, что открывает для нас новые перспективы, как в изучении патогенеза самого заболевания, так и в выяснении роли развивающегося мозга в данном процессе. В связи с этим в дальнейшем планируется оценить, носит ли изменение катехоламинов на модели РН системный характер (меняется ли их уровень в плазме крови и мозге).

РАЗДЕЛ 2. ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ И НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТИ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ

2.1. Цели и задачи

Основной целью работ на 2019 год было изучение нейродегенерации и компенсаторных механизмов в популяциях дофаминергических и недофаминергических нейронов nigrostriатной системы на экспериментальных *in vitro* и *in vivo* моделях БП. Для достижения данной цели необходимо было выполнить две задачи:

- получить клеточную культуру максимально приближенную к nigrostriатным дофаминергическим нейронам по своим характеристикам и оценить адекватность воспроизводимого патогенеза БП;
- оценка компенсаторных механизмов на модели БП.

2.2. Материалы и методы

2.2.1. Экспериментальные животные

Для приготовления культуры клеток были использованы плоды мышей линии C57BL/6 на Э13. Время зачатия определяли по образованию вагинальной пробки у самок после спаривания с самцами и считали этот день за нулевой день. На 13-й день беременности у самок под ингаляционным наркозом (изофлуран) извлекали матку и промывали ее охлажденным буфером Хенкса без Ca^{2+} и Mg^{2+} (Gibco, США) с добавлением антибиотиков гентамицина и амфотерицина (Gibco, США). После декапитации эмбрионов извлекали мозг и в охлажденном стерильном буфере Хенкса без Ca^{2+} и Mg^{2+} выделяли вентральную область среднего мозга.

При моделировании БП использовали самцов мышей линии C57BL/6J в возрасте 2 – 2.5 месяца и весом 23 – 25 грамм.

2.2.2. Первичная диссоциированная культура дофаминергических нейронов

Диссоциацию ткани и культивирование клеток проводили согласно ранее опубликованному протоколу [37]. Выделенную ткань помещали в микропробирку со средой для суспендирования DMEM/F12, содержащей также бессывороточную добавку B-27, 0.5 mM L-глутамин (все - Gibco, США). Кусочки ткани механически диссоциировали пипетированием. Полученную суспензию клеток фильтровали через нейлоновый фильтр (поры фильтра - 70 мкм) и центрифугировали 5 мин при $+4^{\circ}\text{C}$ и $200 \times g$. Образовавшийся осадок ресуспендировали в среде культивирования следующего состава: Neurobasal

medium, бессывороточная добавка B-27, 0.5 mM L-глутамина, 100 нг/мл фактора роста нервов и 10 нг/мл мышинового фактора роста фибробластов с добавлением гентамицина (все реактивы - Gibco, США).

Клеточную суспензию окрашивали трипановым синим и проводили подсчет живых клеток в камере Горяева. Выживаемость составляла 80-90 %. Затем клетки высаживали в предварительно обработанные поли-L-лизином 24-луночные планшеты (Corning, США) по 400 тыс. клеток на лунку и культивировали в атмосфере с 5% CO₂ при 37°C. Среду культивирования заменяли каждые 2 дня. На четвертый день культивирования в среду вводили 10 мкМ цитарабина (Sigma, США) на 24 часа для устранения глии из первичной культуры клеток. Все эксперименты проводили на 7-й день культивирования в среде Neurobasal medium, содержащей 0.5 mM L-глутамина и бессывороточную добавку N-2 (Gibco, США).

2.2.3. Моделирование болезни Паркинсона *in vitro*

Для моделирования БП *in vitro* на седьмой день культивирования нейронов среднего мозга в среду культивирования вводили нейротоксин 1-метил-4-фенилпиридиния ион (МФП⁺) (Sigma, США) в дозе 10 мкМ на 3, 6 и 24 часа, а в контрольные лунки добавляли аналогичный объем 0.9% NaCl. После окончания инкубации с МФП⁺ культуру клеток использовали для иммуоцитохимического выявления ТГ-иммунореактивных нейронов и дофаминавого транспортера (ДАТ), определения содержания катехоламинов в клеточном экстракте и оценки обратного захвата дофамина клетками. Для проверки специфичности действия нейротоксина МФП⁺ в лунки добавляли ингибитор обратного захвата дофамина GBR 12909 (1 мкМ) за 15 мин до введения в культуральную среду МФП⁺.

2.2.4. Моделирование болезни Паркинсона *in vivo*

Мышам в первой группе подкожно вводили физиологический раствор. Мышам во второй группе подкожно вводили дважды с интервалом в 2 часа 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП) (8 мг/кг веса) (Sigma-Aldrich, США) в физиологическом растворе, для моделирования болезни Паркинсона на доклинической стадии. Для моделирования болезни Паркинсона на клинической стадии мышам вводили 4 раза МФТП (10 мг/кг веса) в физиологическом растворе с интервалом в 2 часа между инъекциями.

2.2.5. Инкубация срезов *ex vivo*

Через 2 недели после инъекций мышей наркотизировали изофлураном (KentScientific, США), декапитировали и выделяли мозг. Далее на вибраторе (Vibratome 1000 plus Sectioning system, Германия) в растворе Кребса-Рингера (NaCl 120 мМ, KCl 4.8 мМ, CaCl₂ 2 мМ, MgSO₄ 1.3 мМ, NaHCO₃ 25 мМ, D-глюкоза 10 мМ, HEPES 20 мМ, аскорбиновая кислота 0.1 мМ, pH 7.4) при +4°C приготавливали фронтальные срезы мозга толщиной 300 мкм на уровне стриатума. Из полученных срезов под контролем бинокулярной лупы при 4°C выделяли стриатум из обоих полушарий в соответствии с атласом мозга мышей [38].

Проточную инкубацию полученных срезов стриатума проводили при 37°C в термостатируемых камерах. Инкубация состояла из двух этапов: первый этап - стабилизация, когда во все камеры поступал раствор Кребса-Рингера в течение 40 минут. Второй этап - инкубация в течение 60 минут. Во время инкубации в камеры со срезами стриатума из правых полушарий продолжал поступать раствор Кребса-Рингера, а в камеры со срезами из левых полушарий раствор Кребса-Рингера с 2-амино-2-норборнандикарбоновой кислотой (АНК) в концентрации 0.5 мМ. Инкубационную среду собирали, добавляли к ней ДГБА, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C. После инкубаций срезы замораживали для дальнейшего анализа содержания катехоламинов при помощи ВЭЖХ-ЭД.

2.2.6. Иммуноцитохимия

Для проведения иммуноцитохимической реакции на ТГ культуру нервных клеток отмывали от культуральной среды изотоническим фосфатно-солевым буфером (ФСБ) 10 мин при +4 °С, после чего фиксировали в 4% параформальдегиде на 0,2 М ФСБ (pH 7.2-7.4) 1 час при +4°C. Затем культуру клеток последовательно инкубировали с: (а) 3% бычьим сывороточным альбумином (Sigma, США) и 0.3% тритоном-X100 (Triton-X100, Sigma, США) на 0.02 М ФСБ 30 мин при +20°C; (б) кроличьими антителами к ТГ (1:5000) (предоставлены проф. Ж. Тибо, Франция) (Arluison, et al., 1984) на 0.02 М ФСБ, содержащем 1% бычий сывороточный альбумин и 0.1% Triton X-100 в течение 20 часов при +20°C; (в) биотинилированными козьими антителами к гамма-глобулинам кролика (1:400) (Vector Laboratories, США) на 0.02 М ФСБ в течение 2-х часов при +20°C; (д) авидин-биотиновым комплексом, связанным с пероксидазой хрена (Vector Laboratories, США), на 0.02 М ФСБ в течение 1 часа при +20°C. После каждой инкубации лунки промывали в 0.02 М ФСБ в течение 30 минут при +20°C. В контроле проводили те же

самые инкубации, но без антител к ТГ. Peroксидазу авидин-биотинового комплекса выявляли путем инкубации с 0.05% 3,3'-диаминобензидинтетрагидрохлоридом (Sigma, США) и 0.02% H₂O₂ на ФСБ при +20°C под визуальным контролем. Культуру клеток заключали в гидрофильную среду Mowiol 4-88 (Sigma, США).

Двойное мечение ТГ и ДАТ проводили по следующей схеме: фиксированную культуру клеток последовательно инкубировали с: (а) блокирующим раствором (3% бычьим сывороточный альбумин, 0.3% Triton-X100 на 0.02 М ФСБ) 30 мин, при +20°C; (б) смесью овечьих поликлональных антител к ТГ (1:750, Millipore, США) с крысиными моноклональными антителами к дофаминовому транспортеру (1:500, Abcam, США) на 0.02 М ФСБ, содержащем 1% бычий сывороточный альбумин и 0.1% Triton X-100 в течение 20 часов при +20°C; (в) ослиными антителами к гамма-глобулинам овцы, конъюгированными с красителем Alexa Fluor 488 (1:500, Invitrogen, США) на 0.02 М ФСБ в течение 2-х часов при +20 °C; (г) куриными антителами к гамма-глобулинам крысы, конъюгированными с красителем Alexa Fluor 647 (1:200, Invitrogen, США) на 0.02 М ФСБ в течение 2-х часов при +20°C. Инкубировали клетки с раствором DAPI в течении 5 минут и отмывали в ФСБ 3 раза по 5 минут. Обработанную антителами клеточную культуру заключали в гидрофильную среду Mowiol 4-88 (Sigma, США).

2.2.7. Анализ изображений

После иммуноцитохимической реакции на ТГ лунки с культурой клеток исследовали с помощью микроскопа Zeiss Observer Z1 (Zeiss, Германия), оснащенного сканирующим координатным столиком и фотокамерой при увеличении объектива ×20/NA 0,4 (ЕС “Plan-Neofluar”, Zeiss, Германия) и с использованием программного обеспечения AxioVision 4.8. С помощью модуля MosaiX Axio Vision (Zeiss, Германия) воссоздавали целостное изображение лунки и подсчитывали общее число ТГ-ИР нейронов на лунку с помощью программы Image J (Wayne Rasband – НИИ, США).

В каждой лунке случайным образом выбирали 100 ТГ-иммунореактивных нейронов и определяли длину нейритов по ранее описанной методике [39]. С помощью программы Photoshop CS 5.1 на изображениях ТГ-иммунореактивных нейронов создавали сеть параллельных линий, расстояние между которыми соответствовало 20 мкм. Затем подсчитывали количество пересечений нейритов (отростков) с этими линиями, вычисляя длину нейритов (L) по формуле:

$$L = \frac{\pi d}{2} I$$

где I - количество пересечений нейритов с параллельными линиями, d - расстояние (20 мкм) между параллельными линиями.

Иммунофлуоресценцию на ТГ и ДАТ детектировали с помощью инвертированного микроскопа Leica DMI 6000.

2.2.8. Изотопный метод

Измерение обратного захвата дофамина нейронами проводили в искусственной спинномозговой жидкости (иСМЖ) следующего состава: NaCl - 126 мМ; KCl - 2,5 мМ; NaH_2PO_4 - 1,2 мМ; CaCl_2 - 2,4 мМ; MgCl_2 - 1,2 мМ; NaHCO_3 - 25 мМ; HEPES - 20 мМ; глюкоза - 11 мМ с добавлением аскорбиновой кислоты - 0,15 мМ и паргилина-HCl - 0,1 мМ (Sigma, США) при pH - 7,4. Культуру клеток как в контроле, так и после инкубации с МФП⁺, отмывали от среды и инкубировали в иСМЖ 15 мин при 37⁰С в присутствии 32 нМ [³H]-дофамина, 33 Ки/ммоль (синтезирован в Институте молекулярной генетики РАН). Реакцию останавливали охлаждением на льду до 0⁰С и последующей двукратной промывкой охлажденной иСМЖ. Поглощенный клетками [³H]-дофамин экстрагировали в 0,5 мл 96% этанола. Экстракты вносили во флаконы с 10 мл сцинтилляционной жидкости (Liquid scintillator 402, Koch-light LTD, Англия); измерения проводили на счетчике (Tri-Carb 2810 TR, Perkin Elmer). Специфический захват меченого тритием дофамина определяли как разницу между значениями радиоактивности образцов, полученных без использования ингибитора мембранного транспортера дофамина GBR 12909 (общий захват) и с его применением (неспецифический захват).

2.2.9. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Пробы для измерения концентрации дофамина в инкубационной среде и пробы полученные из образцов культуры клеток, подготавливали методом твердофазной экстракции на оксиде алюминия. Разделение осуществляли на обращённо-фазной колонке ReproSil-Pur, ODS-3, 4x100 мм с диаметром пор 3 мкм (Dr.Majsch GmbH, Германия) при температуре +30⁰С и скорости подвижной фазы 1 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, США), pH 2,5. Электрохимический детектор Decade II (AntecLeyden, Нидерланды) был укомплектован стеклоуглеродным рабочим электродом (+0.85 V) и хлорсеребряным электродом сравнения. Пики дофамина и L-ДОФА

идентифицировали по времени их выхода в стандартном растворе. Содержание катехоламинов и метаболитов рассчитывали методом внутреннего стандарта как отношение площадей пиков в стандартной смеси и в образце, с помощью программного обеспечения LabSolutions (Shimadzu, Япония).

2.2.10. Статистика

Статистическую обработку данных выполняли при помощи программы GraphPad Prism Version 6.0 для Windows (GraphPad Software, США). Статистическую значимость результатов определяли с использованием двухфакторного дисперсионного анализа (1-way ANOVA) с последующим использованием теста Тьюки для множественного сравнения средних и t-тест Стьюдента. Данные представлены как среднее арифметическое \pm средняя ошибка.

2.3. Результаты и обсуждение

Отсутствие адекватной клеточной модели БП является острой проблемой в исследовании молекулярных механизмов, приводящих к возникновению заболевания. В настоящее время многие разработанные модели БП *in vitro* основаны на перевиваемых клеточных линиях, в частности нейробластом человека или мыши [40, 41], однако эти клеточные модели обладают существенными недостатками. Главный из них заключается в том, что дифференцируемые нейроны на этих моделях не воспроизводят в полной мере дофаминергический фенотип, поскольку они также обладают некоторыми другими признаками, например частичным холинергическим фенотипом [42]. Этому недостатка лишены модели на основе диссоциированной первичной культуры эмбриональных дофаминергических нейронов среднего мозга грызунов. Однако число работ, проведенных с использованием первичных нейрональных культур, существенно уступает числу работ, выполненных на моделях с использованием нейробластом, что объясняется техническими трудностями и высокой затратностью культивирования первичных дофаминергических нейронов.

Для создания клеточной модели были использованы первичные дофаминергические нейроны эмбриона мыши на Э13. Через 7 дней роста клетки были хорошо развиты с широкой сетью нейритов, позволяющей производить необходимые измерения. Проведённое двойное иммуногистохимическое мечение и наличие колокализации по ТГ и ДАТ доказывает, что мы имеем дело с дофаминергическими нейронами, которые синтезируют дофамин, а также способны к его специфическому

обратному захвату с помощью ДАТ, наличие которого было подтверждено с использованием радиоактивного дофамина. Это также говорит о том, что нейроны должны быть чувствительны к нейротоксину МФП+. Помимо этого клетки синтезировали дофамин, а также возможно было детектировать L-ДОФА. Все эти результаты доказывают успешное создание основы для моделирования БП *in vitro*.

На 7-й день культивирования нейроны уже имели хорошо развитую сеть нейритов, содержащих ТГ (рисунок 2.1).

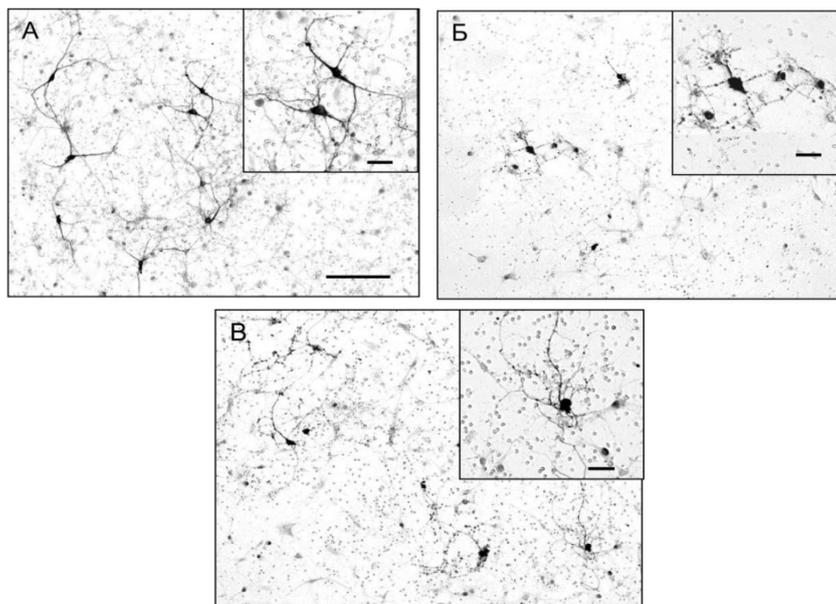


Рисунок 2.1. Культура тирозингидроксилаза-иммунореактивных (ТГ-ИР) нейронов в контроле (а), после инкубации с МФП+ в концентрации 10 мкМ (б) и после совместной инкубации с МФП+ (10 мкМ) и ингибитором GBR 12909 (1 мкМ) (в). Масштабные отрезки — 100 мкм и 20 мкм (на большем увеличении)

Для полного подтверждения принадлежности культивируемых нейронов дофаминергическому фенотипу было произведено двойное мечение культуры нейронов на ТГ и ДАТ (рисунок 2.2).

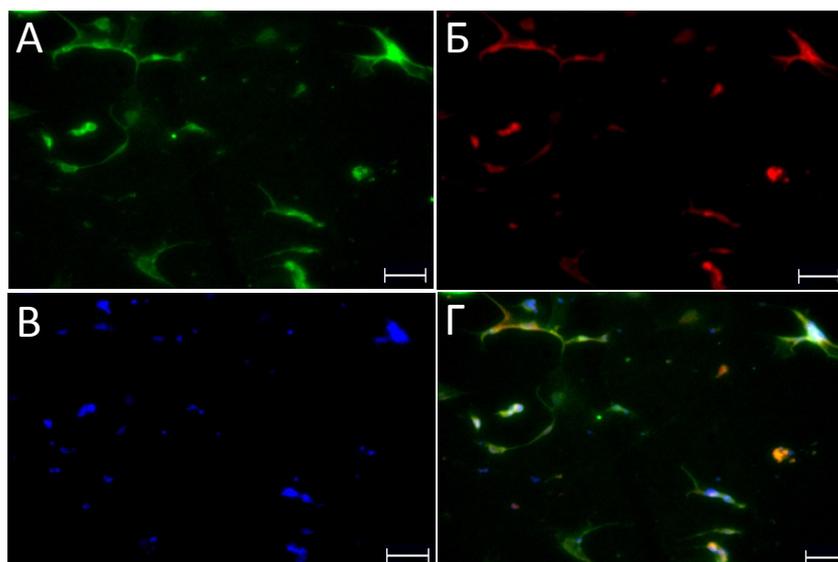


Рисунок 1.2. - Иммунофлуоресцентное мечение полученной нейрональной клеточной культуры на тирозингидроксилазу (А), транспортер дофамина (Б), ядра клеток красителем DAPI (В), и совмещение изображений (Г)

Подсчёт дофаминергических нейронов показал, что в среднем на одну лунку приходится 487 ± 56 нейронов (рисунок 2.3А), а средняя длина нейритов на один нейрон составляет 628 ± 76 мкм (рисунок 2.3Б).

Для моделирования БП *in vitro* в культуральную среду вводили 10 мкМ специфического нейротоксина МФП⁺, что вызывало характерную гибель нейронов (рисунок 2.3 А,Б).

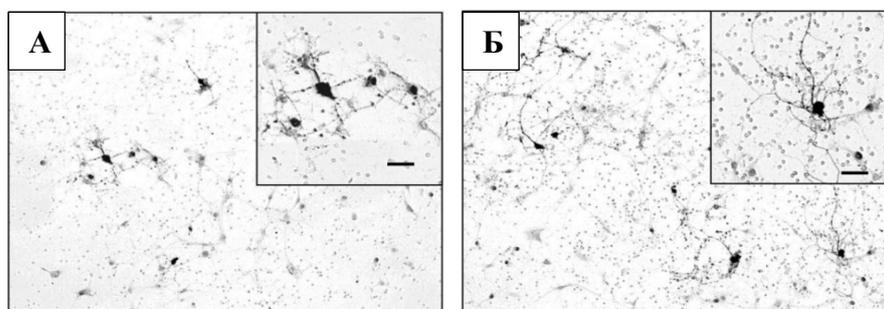


Рисунок 2.3. - Культура тирозингидроксилаза-иммунореактивных нейронов после инкубации с МФП⁺ в концентрации 10 мкМ (А) и после совместной инкубации с МФП⁺ (10 мкМ) и ингибитором GBR 12909 (1 мкМ) (Б). Масштабные отрезки — 100 мкм и 20 мкм (на большем увеличении)

Через сутки инкубации с МФП⁺ на 58% снижалось количество ТГ-иммунореактивных нейронов. Добавление 1 мкМ GBR 12909 (селективный ингибитор обратного захвата дофамина) приводило к увеличению количества ТГ-иммунореактивных нейронов на 56% по сравнению с количеством нейронов после инкубации с МФП⁺ (рисунок 2.4А), но не достигало уровня ТГ-иммунореактивных нейронов в контроле.

Добавление нейротоксина в культуру клеток вызывало не только уменьшение числа нейронов, но и уменьшение длины нейритов у выживших нейронов на 65% по отношению к контролю (рисунок 2.4Б). Совместное добавление МФП⁺ с GBR-12909 приводило к снижению средней длины нейритов только на 34% по сравнению с контролем (рисунок 2.4Б).

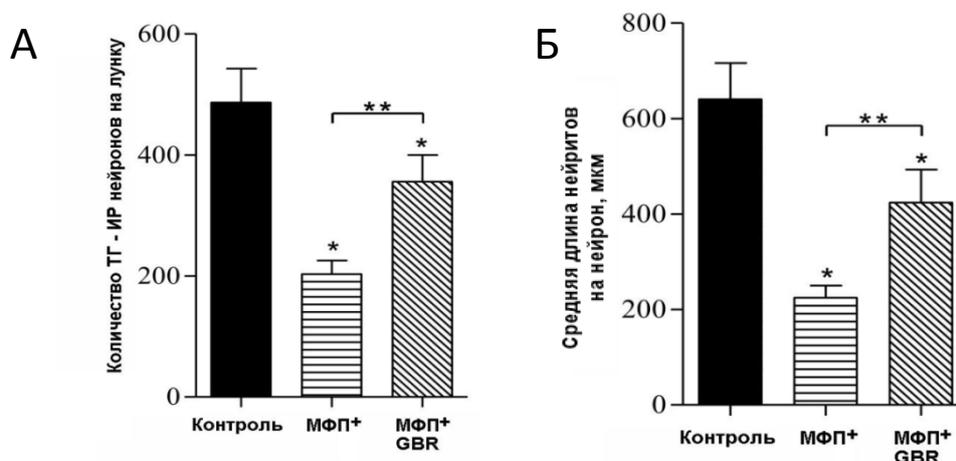


Рисунок 2.4. - Количество тирозингидроксилаза-иммунореактивных (ТГ-ИР) нейронов (А) и длина нейритов (Б) в контроле и через 24 часа после введения МФП⁺ (10 мкМ) или МФП⁺ (10 мкМ) совместно с ингибитором дофаминового транспортера - GBR-12909 (1 мкМ). *P < 0,05 по сравнению с контролем. **P < 0,05 по сравнению с выбранным параметром

Помимо изменения числа тел клеток и длины нейритов наблюдалось снижение содержания внутриклеточного дофамина в нейронах на 52% после инкубации с 10 мкМ МФП⁺ в течение 24 часов. При этом при одновременной инкубации с МФП⁺ и GBR-12909 содержание дофамина снижалось только на 18% (рисунок 2.5).

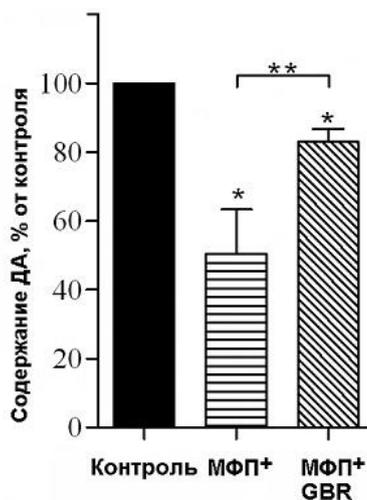


Рисунок 2.5. - Содержание дофамина (ДА) в культуре дофаминергических нейронов в контроле и через 24 часа после введения МФП⁺ (10 мкМ) или МФП⁺ (10 мкМ) совместно с ингибитором дофаминового переносчика GBR 12909 (1 мкМ). *P < 0,05 по сравнению с контролем. **P < 0,05 по сравнению с выбранным параметром.

Также было экспериментально показано, что культивируемые мезенцефальные нейроны специфически захватывают меченый дофамин, причем специфический захват составил 82% от общего (рисунок 2.6).

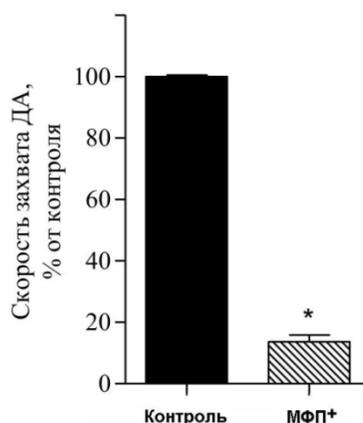


Рисунок 2.6. - Специфический захват дофамина (ДА) в культуре дофаминергических нейронов в контроле и через 24 часа после начала инкубации с 10 мкМ МФП+. *P < 0,05 по сравнению с контролем

Оценка нейродегенерации на ранних сроках после введения токсина показала, что при инкубации культуры клеток с МФП⁺ в течение 3 часов отсутствуют изменения как числа ТГ-иммунореактивных нейронов, так и длины и строения их нейритов (рисунок 2-7). Шестичасовая инкубация культуры клеток с МФП+ привела к тому, что число ТГ-иммунореактивных нейронов не изменялось. Однако в этом случае средняя длина нейритов уменьшалась на 30% (рисунок 2.7).

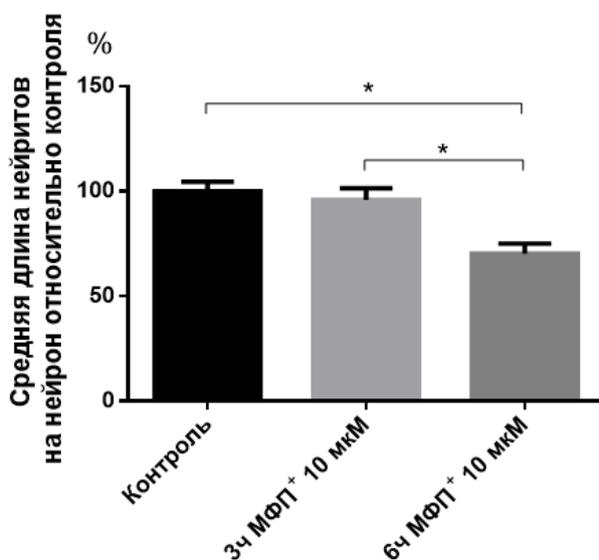


Рисунок 2.7. - Изменение длины нейритов тирозингидроксилаза-иммунореактивных нейронов через 3 и 6 ч после добавления 10 мкМ МФП+. *Достоверные различия между группами (P < 0.05)

Также через 6 часов после добавления МФП⁺ были замечены морфологические изменения нейронов – появились характерные участки фрагментации нейритов, которые выглядят как «варикозные» расширения (рисунок 2.8).

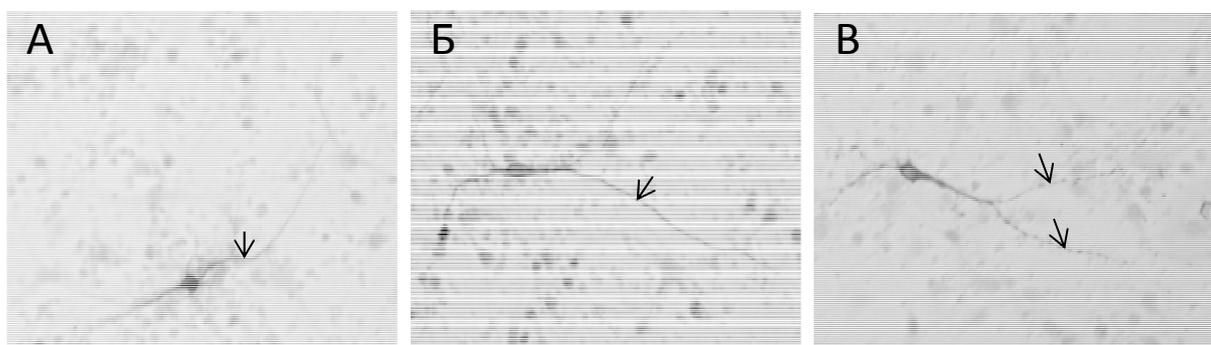


Рисунок 2.8. Морфология тирозингидроксилаза-иммунореактивных нейронов в контроле (А), через 3 ч (Б) и через 6 ч (В) после введения МФП⁺ (10 мкМ)

На молекулярном уровне инкубация с МФП⁺ приводила, как к снижению уровня дофамина, что обусловлено гибелью нейритов и тел нейронов, так и к существенному уменьшению обратного захвата дофамина. Одновременное добавление селективного ингибитора ДАТ – GBR-12909 приводило к увеличению выживаемости нейронов, повышению уровню дофамина и частичному сохранению нейритов. Данные положительные изменения говорят о том, что основные механизмы моделирования БП на полученной *in vitro* модели идентичны моделируемому патогенезу БП на мышах при использовании в качестве нейротоксина МФП. В связи с этим особый интерес представляет определение момента начала дегенерации. Считается, что дегенерация нейронов начинается именно с терминалей аксонов, и мы попытались отследить момент её начала [43, 44]. Было показано, что после 3 часов нейриты и клетки выглядят также как в контроле, а после 6 часов инкубации наблюдаются морфологические изменения на концах нейритов, а также присутствует частичная фрагментация. Основываясь на этом, можно предположить, что для установления начальных механизмов дегенерации нужно исследовать молекулярные изменения в клетках в интервале от 3 до 6 часов.

Использование полученной и исчерпывающе охарактеризованной в этой работе модели первичной культуры дофаминергических нейронов среднего мозга может позволить существенно продвинуться в изучении молекулярных механизмов нейродегенерации и нейропластичности при БП, начатом нами ранее на моделях БП *in vivo* [45, 46, 47].

В основе данной модели *in vitro*, как и в основе модели *in vivo*, лежит нейротоксическое действие токсина МФП⁺ на дофаминергические нейроны, приводящее к

оксидативному стрессу, а в конечном итоге к гибели нейронов путем апоптоза, что было показано в ранее опубликованных работах [48, 49, 50, 51]. Однако существуют процессы и механизмы, оценка которых значительно осложняется при использовании клеточных моделей БП в отличие от моделирования заболевания на животных, такие как оценка изменения кооперативного синтеза и оценка лизосомной патологии при БП.

Одним из компенсаторных механизмов при БП является кооперативный синтез дофамина моноферментными нейронами, содержащими либо ТГ, либо декарбоксилазу больших L-аминокислот. Для оценки кооперативного синтеза необходимо было заингибировать ключевое звено – транспортер больших аминокислот, который отвечает за транспортировку L-ДОФА. Это возможно сделать при инкубации слайсов ткани мозга с использованием неметаболизируемого ингибитора данного транспортера – АНК. Эксперименты показали, что в стриатуме на модели доклинической стадии БП, превалирует синтез дофамина в дофаминергических нейронах, что обусловлено тем, что внутри клеток активизируются компенсаторные процессы, увеличивается активность везикулярного цикла. Тогда как на клинической стадии наступает декомпенсация и основным источником дофамина становятся моноферментные нейроны (рисунок 2.9). Основываясь на этих данных, можно предположить, что между моноферментными нейронами и дофаминергическими нейронами существует какой-то регуляторный процесс.

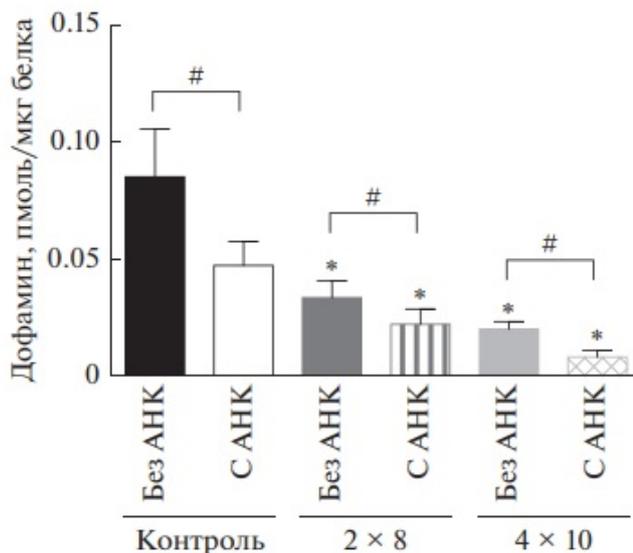


Рисунок 2.9. - Содержание дофамина в стриатуме у мышей после введения физиологического раствора (контроль), после двукратного введения МФТП в разовой дозе 8 мг/кг (2 × 8), после четырехкратного введения МФТП в разовой дозе 10 мг/кг (4 × 10) и инкубированных в растворе Кребса-Рингера без АНК или с АНК (0.5 мМ). Статистическая значимость: *p < 0.05 – относительно контроля, #p < 0.05 – между парами проб, инкубированными без АНК и с 0.5 мМ АНК

Еще одной задачей, которая более эффективно решается на экспериментальных моделях БП *in vivo* является оценка изменения экспрессии генов, связанных с нормальным функционированием лизосом. Найденное снижение экспрессии Lamp2 может приводить к нарушению функций лизосом и, как следствие, к накоплению агрегированных белков в клетке. Так, например, может накапливаться альфа-синуклеин в олигомерной форме, оказывая токсическое влияние и гибель дофаминергических нейронов. Одновременно увеличивается экспрессия гена Slca18a2 в чёрной субстанции а в стриатуме – Hspa8. Увеличение Slca18a2 обусловлено запуском компенсаторных механизмов, способствующих накоплению моноаминов. Увеличение же Hspa8 является ответом на накопление поврежденных белков, так как этот ген кодирует одну из важнейших субъединиц комплекса деградации неправильно свёрнутых белков [52].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При проведении исследований по разделу 1 была разработана модель выключения синтеза норадреналина в мозге неонатальных и препубертатных крыс. При этом было показано, что развивающийся мозг может быть источником норадреналина в общей системе циркуляции. Также была воспроизведена экспериментальная модель РН на 7, 14, 21, 30 дни жизни. Показано, что у крыс при моделировании РН содержание L-ДОФА на 21 и 30 дни жизни снижалось по сравнению с контролем, при этом содержание норадреналина, напротив, увеличивалось в опыте на П14. Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что катехоламины могут принимать значимое участие в развитии данной патологии и рассматриваться как важный маркер в патогенезе этого тяжелейшего заболевания.

По разделу 2 была исчерпывающе охарактеризована на клеточном и на молекулярном уровне первичная культура дофаминергических нейронов в норме и при моделировании БП. Это позволит использовать ее как модель БП *in vitro*, которая может существенно дополнить возможности экспериментальных моделей *in vivo* для изучения клеточных и молекулярных механизмов нейродегенерации и нейропластичности, а также для оценки эффективности лекарственных средств с нейропротекторными свойствами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Механизмы нейроэндокринной регуляции/М.В. Угрюмов. - М.: Наука, 1999. - 299 с.
2. Гормональные регуляции в онтогенезе животных/М.С. Мицкевич. - М.: Наука, 1978. - 224 с.
3. Dörner G. Sex hormones and neurotransmitters as mediators for sexual differentiation of the brain//Endokrinologie - 1981. - Vol. 78, No. 2-3. P. 129 - 138.
4. Fuse Y. Development of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in humans//Reprod Fertil Dev - 1996. - Vol. 8, No. 1. P. 1- 21.
5. O'shaughnessy P.J. Fetal Development of Leydig Cell Activity in the Mouse Is Independent of Pituitary Gonadotroph Function 1//Endocrinology - 1998. - Vol. 139, No. 3. P. 1141 - 1146.
6. Угрюмов М.В. Мозг в роли эндокринной железы во взрослом и развивающемся организме//Российский физиологический журнал им. ИМ Сеченова - 2004. - Т. 90. - N 5. - С. 625 - 637.
7. Ugrumov M.V. Developing brain as an endocrine organ: a paradoxical reality//Neurochemical research - 2010. - Vol. 35, No. 6. P. 837 - 850.
8. 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, N 1. P. 78 - 86.
9. Zubova Yu.O., Nasyrova D.I., Saprionova A.Y., Ugrumov M.V. Brain as an endocrine source of circulating 5-hydroxytryptamine in ontogenesis in rats//Molecular and cellular endocrinology - 2014. - Vol. 393, No. 1-2. P. 92 - 98.
10. Agid Y. Parkinson's disease: pathophysiology//The Lancet - 1991. - Vol. 33, No. 8753. P. 1321 - 1324.
11. Teicher M.H., Barber N.I., Reichheld J.H., Baldessarini R.J., Finklestein S.P. Selective depletion of cerebral norepinephrine with 6-hydroxydopamine and GBR-12909 in neonatal rat//Developmental Brain Research - 1986. - Vol. 30, No. 1. - P. 124 - 128.
12. Ugrumov M.V., Taxi J., Tixier-Vidal A., Thibault J., Mitskevich M.S. Ontogenesis of tyrosine hydroxylase-immunopositive structures in the rat hypothalamus. An atlas of neuronal cell bodies//Neuroscience - 1989. - Vol. 29, No. 1. P. 135 - 156.
13. Borisova N.A., Saprionova A.Y., Proshlyakova E.V., Ugrumov M.V. Ontogenesis of the hypothalamic catecholaminergic system in rats: synthesis, uptake and release of catecholamines//Neuroscience - 1991. - Vol. 43, No. 1. P. 223 - 229.

14. Ugrumov M.V., Popov A.P., Vladimirov S.V., Kasmambetova S., Novodjilova A.P., Tramu G. Development of the suprachiasmatic nucleus in rats during ontogenesis: serotonin-immunopositive fibers//Neuroscience - 1994. - Vol. 58, No. 1. P. 161 - 165.
15. Axelrod J., Albers W., Clemente C.D. Distribution of catechol-O-methyl transferase in the nervous system and other tissues//Journal of Neurochemistry - 1959. - Vol. 5, No. 1. P. 68 - 72.
16. Glowinski J., Axelrod J., Kopin I.J., Wurtman R.J. Physiological disposition of H3-norepinephrine in the developing rat//Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics - 1964. - Vol. 146, No 1. P. 48 - 53.
17. Bertler A., Falck B., Owman C., Rosengrenn E.B. The localization of monoaminergic blood-brain barrier mechanisms//Pharmacological reviews - 1966. - Vol. 18, No 1. P. 369 - 385.
18. Abbott N.J., Patabendige A.A., Dolman D.E., Yusof S.R., Begley D.J. Structure and function of the blood–brain barrier//Neurobiology of disease. - 2010. - Vol. 37, No. 1. P. 13 - 25.
19. Blum D. Torch, S., Lambeng N., Nissou M. F., Benabid A. L., Sadoul R., Verna J. M. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease//Progress in neurobiology - 2001. - Vol. 65, No. 2. P. 135 - 172.
20. Davids E., Zhang K., Kula N.S., Tarazi F.I., Baldessarini R.J. Effects of norepinephrine and serotonin transporter inhibitors on hyperactivity induced by neonatal 6-hydroxydopamine lesioning in rats//Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics - 2002. - Vol. 301, No. 3. P. 1097 - 1102.
21. Loizou L.A. Uptake of monoamines into central neurones and the blood-brain barrier in the infant rat//British journal of pharmacology - 1970. - Vol. 40, No. 4. P. 800 - 813.
22. Kostrzewa R.M. The blood-brain barrier for catecholamines – Revisited//Neurotoxicity research - 2007. - Vol. 11, No. 3-4. P. 261 - 271.
23. Колачева А.А., Козина Е.А., Волина Е.В., Угрюмов М.В. Динамика дегенерации дофаминергических нейронов и сопутствующих компенсаторных процессов в nigrostriatalной системе у мышей//Доклады АН. 2014. - Т. 456. - N 2. - С. 246 - 250. Kolacheva A.A., Kozina E.A., Volina E.V., Ugrumov M.V. Time course of degeneration of dopaminergic neurons and respective compensatory processes in the nigrostriatal system in mice//Doklady Biological Sciences. – Springer Science & Business Media - 2014. - Vol. 456, No. 1. P. 160.
24. Yokoyama C., Okamura H., Ibata Y. Resistance of hypothalamic dopaminergic neurons to neonatal 6-hydroxydopamine toxicity//Brain research bulletin - 1993. - Vol. 30, No. 5-6. P. 551 - 559.

25. Nyakas C., Buwald B., Luiten P.G.M. Hypoxia and brain development//Progress in neurobiology - 1996. - Vol. 49, No. 1. P. 1 - 51.
26. Heidary G., Vanderveen D., Smith L.E. Retinopathy of prematurity: current concepts in molecular pathogenesis//Seminars in ophthalmology. - Taylor & Francis - 2009. - Vol. 24, No. 2. P. 77 - 81.
27. Witkovsky P., Arango-Gonzalez B., Haycock J.W., Kohler K. Rat retinal dopaminergic neurons: differential maturation of somatodendritic and axonal compartments//Journal of Comparative Neurology - 2005. - Vol. 481, No. 4. P. 352 - 362.
28. Spix N.J. Liu L.L., Zhang Z., Hohlbein J.P., Prigge C.L., Chintala S., Ribelayga C.P., Zhang D.Q. Vulnerability of dopaminergic amacrine cells to chronic ischemia in a mouse model of oxygen-induced retinopathy//Investigative ophthalmology & visual science - 2016. - Vol. 57, No. 7. P. 3047 - 3057.
29. Zhang N., Favazza T.L., Baglieri A.M., Benador I.Y., Noonan E.R., Fulton A.B., Hansen R.M. Iuvone P.M., Akula J.D. The rat with oxygen-induced retinopathy is myopic with low retinal dopamine//Investigative ophthalmology & visual science - 2013. Vol. 54, No. 13. P. 8275 - 8284.
30. Lopez V.M., Decatur C.L., Stamer W.D., Lynch R.M., McKay B.S. L-DOPA is an endogenous ligand for OA1//PLoS biology - 2008. - Vol. 6, No. 9. P. e236.
31. Falk T., Congrove N.R., Zhang S., McCourt A.D., Sherman S.J., McKay B.S. PEDF and VEGF-A output from human retinal pigment epithelial cells grown on novel microcarriers//BioMed Research International - 2012. - Vol. 2012.
32. Dal Monte M., Cammalleri M., Mattei E., Filippi L., Bagnoli P. Protective effects of β 1/2 adrenergic receptor deletion in a model of oxygen-induced retinopathy//Investigative ophthalmology & visual science - 2015. - Vol. 56, No. 1. P. 59 - 73.
33. Makhoul I.R., Peleg O., Miller B., Bar-Oz B., Kochavi O., Mechoulam H., Mezer E., Ulanovsky I., Smolkin T., Yahalom C., Khoury A., Lorber A., Nir A., Blazer S. Oral propranolol versus placebo for retinopathy of prematurity: a pilot, randomised, double-blind prospective study//Archives of disease in childhood - 2013. - Vol. 98, No. 7. P. 565 - 567.
34. Катаргина Л.А., Хорошилова-Маслова И.П., Майбогин А.М. Панова И.Г., Осипова Н.А. Патоморфологические особенности развития экспериментальной ретинопатии недоношенных//Межд. журн. прикладных и фундаментальных иссл. - 2017. - Т. 3. - P. 190 - 194.
35. Hadjiconstantinou M., Neff N.H. Catecholamine systems of retina: a model for studying synaptic mechanisms//Life sciences - 1984. - Vol. 35, No. 11. P. 1135 - 1147.

36. Shelke R.R.J., Lakshmana M.K., Ramamohan Y., Raju, T.R. Levels of dopamine and noradrenaline in the developing retina—effect of light deprivation//International journal of developmental neuroscience - 1997. - Vol. 15, No. 1. P. 139 - 143.
37. Pruszek J., Just, L., Isacson, O., Nikkhah, G. Isolation and culture of ventral mesencephalic precursor cells and dopaminergic neurons from rodent brains//Current protocols in stem cell biology - 2009. - Vol. 11, No. 1. P. 2D. 5.1 - 2D. 5.21.
38. Franklin K.B.J. George P. The mouse brain in stereotaxic coordinates. – New York: : Academic press, 2008. - Vol. 3.
39. Rønn L.C.B., Ralets I, Hartz B.P, Bech M, Berezin A, Berezin V, Møller A, Bock E. A simple procedure for quantification of neurite outgrowth based on stereological principles//Journal of neuroscience methods - 2000. - Vol. 100, No. 1 - 2. P. 25 - 32.
40. Amazzal L., Lapotre A., Quignon F., Bagrel D. Mangiferin protects against 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity mediated by oxidative stress in N2A cells//Neuroscience letters - 2007. - Vol. 418, No. 2. P. 159 - 164.
41. Constantinescu R., Constantinescu A.T., Reichmann H., Janetzky B. Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y//Neuropsychiatric disorders an integrative approach. - Springer, Vienna - 2007. P. 17 - 28.
42. Kovalevich J., Langford D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology//Neuronal cell culture. – Humana Press, Totowa, NJ. - 2013. P. 9-21.
43. Raff M.C., Whitmore A.V., Finn J.T. Axonal self-destruction and neurodegeneration//Science - 2002. - Vol. 296, No. 5569. P. 868 - 871.
44. Li L.H., Qin H.Z., Wang J.L., Wang J., Wang X.L., Gao G.D. Axonal degeneration of nigra-striatum dopaminergic neurons induced by 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine in mice//Journal of International Medical Research. - 2009. - Vol. 37, No. 2. P. 455 - 463.
45. Ugrumov M.V., Khaindrava V.G., Kozina E.A., Kucheryanu V.G., Bocharov E.V., Kryzhanovsk G.N., Kudrin V.S., Narkevich V.B., Klodt P.M., Rayevsky K.S., Pronina T.S. Modeling of presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism in mice//Neuroscience - 2011. - Vol. 181, P. 175 - 188.
46. Kozina E.A., Khakimova G.R., Khaindrava V.G., Kucheryanu V.G., Vorobyeva N.E., Krasnov A.N., Georgieva S.G., Kerkerian-Le Goff L., Ugrumov M.V. Tyrosine hydroxylase expression and activity in nigrostriatal dopaminergic neurons of MPTP-treated mice at the presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism//Journal of the neurological sciences - 2014. - Vol. 340, No. 1 - 2. P. 198 - 207.
47. 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, No. 4. P. 2991 - 3006.

48. Fallon J., Matthews R.T., Hyman B.T., Beal M.F. MPP⁺ produces progressive neuronal degeneration which is mediated by oxidative stress//Experimental neurology - 1997. - Vol. 144, No. 1. P. 193 - 198.

49. Kaul S., Kanthasamy A., Kitazawa M., Anantharam V., Kanthasamy A.G. Caspase-3 dependent proteolytic activation of protein kinase C δ mediates and regulates 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-induced apoptotic cell death in dopaminergic cells: relevance to oxidative stress in dopaminergic degeneration//European Journal of Neuroscience - 2003. - Vol. 18, No. 6. P. 1387 - 1401.

50. Nakai M., Mori A., Watanabe A., Mitsumoto Y. 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) decreases mitochondrial oxidation-reduction (REDOX) activity and membrane potential ($\Delta\Psi_m$) in rat striatum//Experimental neurology - 2003. - Vol. 179, No. 1. P. 103 - 110.

51. Zawada W.M., Banninger G.P., Thornton J., Marriott B., Cantu D., Rachubinski A.L., Das M., Griffin W.S., Jones S.M. Generation of reactive oxygen species in 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) treated dopaminergic neurons occurs as an NADPH oxidase-dependent two-wave cascade//Journal of neuroinflammation - 2011. - Vol. 8, No. 1. P. 129.

52. Руденок М.М., Алиева А.Х., Николаев М.А., Колачева А.А., Угрюмов М.В., Пчелина С.Н., Сломинский П.А., Шадрина М.И. Возможная роль генов, связанных с лизосомными болезнями накопления, в патогенезе болезни Паркинсона//Молекулярная биология. - 2019. - Т. 53. - N 1. - С. 28 - 36. Rudenok M.M., Alieva A.K., Nikolaev M.A., Kolacheva A.A., Ugryumov M.V., Pchelina S.N., Slominsky P.A., Shadrina M.I. Possible Involvement of Genes Related to Lysosomal Storage Disorders in the Pathogenesis of Parkinson's Disease//Molecular Biology - 2019. - V. 53, No. 1. P. 24 - 31.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ГЗ № 0108-2019-0006

*Отчетные публикации по теме ГЗ

1. ***Murtazina A.R., Nikishina Y.O., Bondarenko N.S., Dil'mukhametova L.K., Sapronova A.Y., Ugrumov M.V.** Developing brain as a source of circulating norepinephrine in rats during the critical period of morphogenesis//Brain Structure and Function. - 2019. - Vol. 224, N 9. P. 3059 - 3073.
2. ***Murtazina A.R., Nikishina Y.O., Bondarenko N.S., Dil'mukhametova L.K., Sapronova A.Y., Ugrumov M.V.** Brain as an endocrine source of circulating norepinephrine in ontogenesis in rats//FEBS OPEN BIO. - 2019. Vol. 9, Is. 1. P-06-042. P. 135.
3. ***Blokhin V.E., Pronina T.S., Ugrumov M.V.** Dopamine synthesis by non-dopaminergic neurons in the striatum of normal and parkinsonian mice//FEBS OPEN BIO. - 2019. Vol. 9, Is. 1. ShT-24-2. P. 41.
4. ***Руденок М.М., Алиева А.Х., Николаев М.А., Колачева А.А., Угрюмов М.В., Пчелина С.Н., Сломинский П.А., Шадрина М.И.** Возможная роль генов, связанных с лизосомными болезнями накопления, в патогенезе болезни Паркинсона//Молекулярная биология. - 2019. - Т. 53. - N 1. - С. 28 - 36. Rudenok M.M., Alieva A.K., Nikolaev M.A., **Kolacheva A.A., Ugrumov M.V., Pchelina S.N., Slominsky P.A., Shadrina M.I.** Possible Involvement of Genes Related to Lysosomal Storage Disorders in the Pathogenesis of Parkinson's Disease//Molecular Biology. - 2019. - Vol. 53, N 1. P. 24 - 31.
5. **Катаргина Л.А., Осипова Н.А., Панова А.Ю., Петровская А.В., Никишина Ю.О., Муртазина А.Р., Угрюмов М.В.** Роль катехоламинов в развитии патологической неоваскуляризации сетчатки на экспериментальной модели ретинопатии недоношенных у крыс//ДАН. - 2019. - Т. 489. - N 3. - С. 313 - 317
6. **Сурков С.А., Мингазов Э.Р., Стурова А.И., Блохин В.Е., Угрюмов М.В.** Клеточная нейротоксическая модель болезни Паркинсона – динамика дегенерации дофаминергических нейронов под влиянием токсина МФП+//Цитология. - 2019. - Т. 61. - N 12. - С. 978 - 986.

Отчет утвержден на заседании Ученого совета, протокол № 14 от 27 декабря 2019 г.