

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

Врио директора ИБР РАН
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН

А.В. Васильев

«29» декабря 2020 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,
зав. лабораторией,
доктор биологических наук,
профессор,
академик РАН



М.В. Угрюмов

подпись, дата

29.12.2020

Москва 2020

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель: зав. лабораторией, доктор
биологических наук, профессор, академик
РАН

подпись, дата

М.В. Угрюмов (Введение,
заключение)
29.12.2020

Исполнители:
старший научный сотрудник, кандидат
биологических наук

подпись, дата

Т.С. Пронина (раздел 1)
29.12.2020

Научный сотрудник, кандидат
биологических наук

подпись, дата

Л.К. Дильмухаметова
(раздел 1)
29.12.2020

Научный сотрудник, кандидат
биологических наук

подпись, дата

Ю.О. Никишина
(раздел 1)
29.12.2020

Младший научный сотрудник

подпись, дата

В.В. Сафандеев (раздел 1)
29.12.2020

Младший научный сотрудник, кандидат
биологических наук

подпись, дата

А.Р. Муртазина
(раздел 1) 29.12.2020

Научный сотрудник, кандидат
биологических наук

подпись, дата

Н.С. Бондаренко
(раздел 1)
29.12.2020

Ведущий научный сотрудник, кандидат
биологических наук

подпись, дата

А.Я. Сапронова (раздел 2)
29.12.2020

Научный сотрудник, кандидат
биологических наук

подпись, дата

А.А. Колачева (раздел 2)
29.12.2020

Старший научный сотрудник, кандидат
биологических наук

подпись, дата

А.Р. Ким (раздел 2)
29.12.2020

Старший лаборант, аспирант

подпись, дата

В.Е. Блохин (раздел 2)
29.12.2020

Младший научный сотрудник

подпись, дата

В.В. Богданов (раздел 2)
29.12.2020

Инженер-исследователь

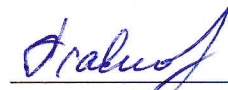


подпись, дата

С.А. Сурков (раздел 2)

29.12.20

Инженер-исследователь

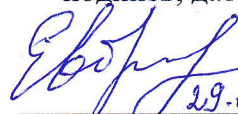


подпись, дата

Е.Н. Павлова (раздел 2)

29.12.2020

Нормоконтроль, руководитель
информационно-аналитического отдела,
кандидат биологических наук



подпись, дата

Е.Б. Абрамова

29.12.2020

РЕФЕРАТ

Отчет 32 с., 6 рис., 2 табл., 46 источников, 3 публикации по теме
ОНТОГЕНЕЗ, НЕЙРОЭНДОКРИННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ, НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИЯ,
НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТЬ, ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР, L-
ДИОКСИФЕНИЛАЛАНИН, ДОФАМИН, НЕЙРОН, РЕТИНОПАТИЯ
НЕДОНОШЕННЫХ

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

Задачи: 1) оценка изменения уровня катехоламинов в плазме крови на модели ретинопатии недоношенных; 2) оценка изменения уровня катехоламинов в мозге на модели ретинопатии недоношенных; 3) разработка протокола оценки влияния лекарственных или физиологически активных веществ на процессы нейропластичности и нейродегенерации; 4) исследование отдельных лекарственных или физиологически активных веществ на полученной клеточной модели дегенерации нейронов дофаминергического фенотипа по разработанному протоколу оценки влияния на процессы нейропластичности и нейродегенерации.

Объектами исследования были крысы Вистар на 14-й, 21-ый и 30-й постнатальные дни, мыши линии C57BL/6 на 13-й день эмбрионального развития (Э13) и самцы мышей линии C57BL/6 в возрасте 2 – 2.5 месяца. В работе использованы методы ВЭЖХ, иммуногистохимия и первичная культура дофаминергических нейронов.

Полученные результаты: (1) на 21-е сутки моделирования ретинопатии недоношенных у крыс концентрация L-диоксифенилаланина в плазме крови снижается в сравнении с контролем; (2) на этой же модели показано, что уровень L-диоксифенилаланина снижается в мозге на 14-е и 21-е сутки, что свидетельствует о том, что данная сигнальная молекула потенциально может быть задействована в развитии патогенеза ретинопатии недоношенных; (3) разработан протокола оценки влияния лекарственных или физиологически активных веществ на процессы нейропластичности и нейродегенерации; (4) на клеточной нейротоксической модели болезни Паркинсона показано, что вещество из семейства нейролипидов - N-докозагексаеноилдофамин имеет нейропротекторные свойства в концентрации 1мкМ и способствует сохранению тел нейронов, а также уровня дофамина близкому к контрольным значениям. 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

СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	8
РАЗДЕЛ 1. РОЛЬ РАЗВИВАЮЩЕГОСЯ МОЗГА В НЕЙРОЭНДОКРИННОЙ РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЦЕЛОСТНОГО ОРГАНИЗМА	8
1.1 Цели и задачи.....	8
1.2 Материалы и методы.....	8
1.2.1. Животные.....	8
1.2.2. Воспроизведение экспериментальной модели ретинопатии недоношенных....	8
1.2.3. Взятие и обработка материала.....	9
1.2.4. Высокоэффективная жидкостная хроматография.....	10
1.2.5. Статистическая обработка результатов.....	11
1.3. Результаты и обсуждение.....	11
РАЗДЕЛ 2. ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ И НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТИ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ.....	16
2.1. Цели и задачи.....	16
2.2. Материалы и методы.....	16
2.2.1. Экспериментальные животные.....	16
2.2.2. Первичная диссоциированная культура дофаминергических нейронов.....	16
2.2.3. Моделирование болезни Паркинсона <i>in vitro</i>	17
2.2.5. Высокоэффективная жидкостная хроматография.....	18
2.2.6. Статистика.....	19
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	26
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	27
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ.....	272

СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

В настоящем отчете НИР применяют следующие сокращения и обозначения:

БП – болезнь Паркинсона;

БСА – бычий сывороточный альбумин;

ВЭЖХ-ЭД – высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимической детекцией;

ДГБА – 3,4 гидробромида дигидроксибензиламин;

ДГК-ДА – N-докозагексаеноилдофамин;

МФП⁺ – 1-метил-4-фенилпиридиния ион;

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

П – постнатальный день развития;

РН – ретинопатия недоношенных;

ТГ – тирозингидроксилаза;

ФСБ – фосфатно-солевой буфер;

Э – эмбриональный день развития;

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусной кислоты;

L-ДОФА – L-диоксифенилаланин.

ВВЕДЕНИЕ

Раздел 1. Эндогенные химические сигналы, обеспечивающие межклеточные взаимодействия, являются важной составляющей механизмов сохранения целостности организма, поддержания гомеостаза и адаптации к изменяющимся условиям среды [1, 2]. В перинатальном периоде развития эти же химические сигналы могут действовать в качестве морфогенетических факторов, контролируя миграцию, образование и формирование специфического фенотипа дифференцирующихся клеток-мишеней [1, 3, 4, 5]. В зону научных 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. Для данных молекул в нашей лаборатории была сформулирована и доказана гипотеза, согласно которой мозг с момента образования нейронов (у грызунов – в середине внутриутробного развития) и до формирования синаптической нейротрансмиссии и закрытия гематоэнцефалического барьера функционирует как мультипотентный эндокринный орган [6, 7, 8]. При этом секретируемые им химические сигналы участвуют в прямой эндокринной регуляции развития периферических органов-мишеней и самого мозга по принципу ауторегуляции [6].

В данной работе мы продолжаем развивать нашу гипотезу, изучая роль мозга как эндокринного органа в патогенезе врожденных заболеваний.

Раздел 2. В соответствии с общепринятой методологией скрининга кандидатов лекарственных средств, исследования начинаются с тестирования физиологических эффектов *in vitro*, что позволяет доказать прямое действие на клеточную мишень и изучить молекулярные механизмы действия. Ранее нами была получена и подробно охарактеризована *in vitro* модель болезни Паркинсона. Чтобы можно было использовать эту модель для скрининга нейропротекторных веществ, нужно разработать протокол оценки влияния лекарственных или физиологически активных веществ на процессы нейропластичности и нейродегенерации [9]. С помощью этой методологии планируется оценить предполагаемое нейропротекторное действие N-докозагексаеноилдофамина (ДГК-ДА) на дегенерирующие ДА-нейроны нигростриатной системы мозга.

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:

- оценка изменения уровня катехоламинов на модели ретинопатии недоношенных: в мозге и в плазме крови.

1.2 Материалы и методы

1.2.1 Животные

Работа была выполнена на самцах крыс популяции Вистар на 14-й, 21-й и 30-й постнатальные дни (П). 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 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°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.

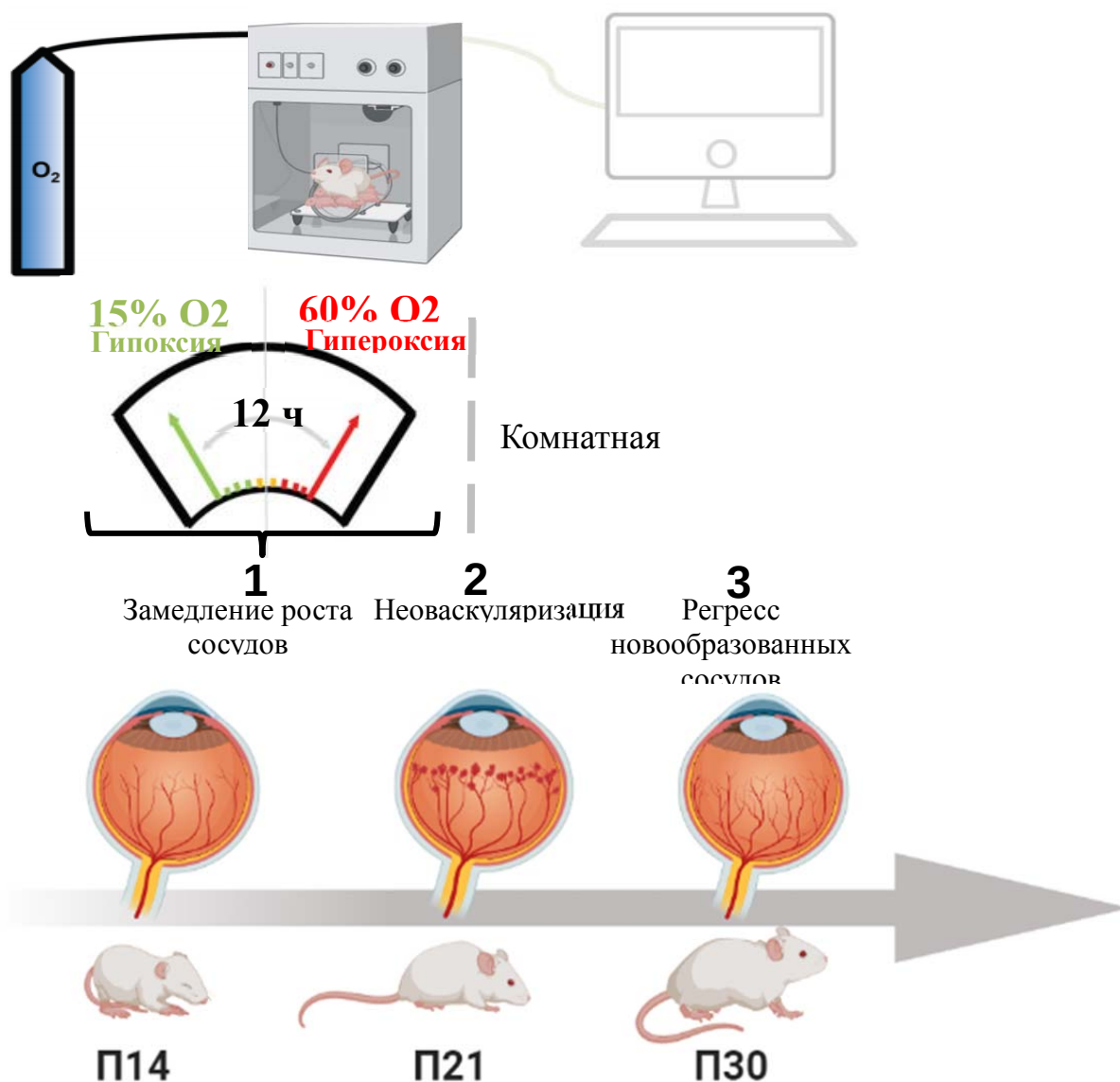


Рисунок 1.1 - Воспроизведение экспериментальной модели ретинопатии недоношенных у крыс

Крысят выводили из эксперимента на 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) выделяли мозг и собирали кровь из сердца.

1.2.3. Взятие и обработка материала

Выделенный мозг гомогенизировали в 10 объемах 0,1н $HClO_4$, содержащей 250 пмоль/мл 3,4 гидробромида дигидроксибензиламина (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 высокоэффективной жидкостной хроматографией с электрохимической детекцией (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 1350g в течение 10 минут и добавляли 50 пмоль ДГБА (Sigma, США) в 0,1 н HClO_4 . Для освобождения от высокомолекулярных белков плазму, переносили в пробирки и хранили при -70°C . Перед определением катехоламинов и их метаболитов пробы экстрагировали осаждением на оксиде алюминия.

1.2.4. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Измерение концентрации катехоламинов в плазме крови и в мозге 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 $+0,85\text{В}$. Разделение веществ проводили на обратно-фазной колонке ReproSil-Pur, ODS-3, 4×100 мм с диаметром пор 3 мкм (Dr.Majsch GMBH, Германия) при температуре $+30^\circ\text{C}$ 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), ($\text{pH} = 2,52$). 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.

1.2.5. 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 $0,05 < p < 0,1$ рассценивалось 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

На протяжении многих лет одним из основных направлений лаборатории было изучение роли мозга в развитии целостного организма. В рамках данной тематики была сформулирована и для ряда веществ доказана теория об эндокринной функции мозга в онтогенезе до формирования гематоэнцефалического барьера. Так было показано, что развивающийся мозг в данный период вносит существенный вклад в формирование физиологически активной концентрации ряда моноаминов в общей системе циркуляции. [6, 7, 8, 10]. Более того, на примере дофамина было показано, что вещества, поступающие из мозга в кровь в данный период онтогенеза, оказывают прямое влияние на функционирование периферических органов-мишеней [11, 12].

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 для изучения 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 [13]. Одним из таких заболеваний, в основе патогенеза которого лежит перепад содержания кислорода в окружающей среде, является РН. Данное заболевание характеризуется нарушением развития кровеносных сосудов в сетчатке у недоношенных детей. Особый интерес представляет то, что в одних случаях РН разрешается самостоятельно, в то время как в других без своевременного хирургического вмешательства может привести к полной слепоте. До сих пор остается неизвестным что именно влияет на путь развития данного заболевания [14]. В ранее проведенных исследованиях мы показали, что такие катехоламины как L-ДОФА и норадреналин могут быть задействованы в патогенезе РН. Так было показано значительное снижение

содержания данных катехоламинов в сетчатке на экспериментальной животной модели РН [15]. Целью данной работы было оценить носит ли снижение уровня моноаминов системный характер, и может ли этот факт помочь в ранней диагностике и лечении данного заболевания. Для этого в первую очередь необходимо было оценить содержание моноаминов в общей системе циркуляции у крыс при моделировании РН. Воспроизведение модели осуществлялось на крысах разных сроков развития, которые соответствовали определенным фазам РН: П14 – фаза задержки роста сосудов, П21 – фаза вазопротиферации, П30 – фаза регресса новообразованных сосудов [16].

Долгое время L-ДОФА рассматривался лишь как предшественник дофамина, не несущий какой-либо собственной функции. Однако около 20 лет назад в клетках пигментного эпителия сетчатки были обнаружены рецепторы, лигандом которых является L-ДОФА – GPR143 [17]. При этом на культуре клеток пигментного эпителия человека было показано, что L-ДОФА является антиангиогенным фактором, вызывая снижение VEGF через путь GPR143 [18]. В нашей предыдущей работе мы так же показали значительное снижение уровня L-ДОФА в сетчатке крыс на стадии патологического разрастания сосудов экспериментальной РН [15]. Эти данные позволяют рассматривать L-ДОФА как ключевую молекулу, вовлеченную в патогенез РН.

В данной работе мы оценили содержание L-ДОФА в общей системе циркуляции. Уже на П14 L-ДОФА определяется в периферической крови крыс в физиологически активной концентрации 0,4 нг/мл. К П21 она увеличивается более чем в 3 раза, составляя в норме порядка 1,5 нг/мл, а к П30 вновь падает до значений 0,2 нг/мл (рисунок 1.2). Так как рецепторы GPR143 были обнаружены не только в клетках пигментного эпителия сетчатки, но и в других органах и тканях [19], данное транзитное увеличение уровня L-ДОФА в крови может быть связано с его непосредственным участием в развитии и функционировании этих органов в данный период онтогенеза. Этот факт, с нашей точки зрения, является очень перспективным для дальнейших исследований.

На экспериментальной модели РН значимое снижение уровня L-ДОФА в крови на 25% выявляется уже на П14. На П21 оно составляет уже 43%, а на П30 мы видим гиперкомпенсацию L-ДОФА в крови у экспериментальных животных (рисунок 1.2). Таким образом, из-за системного воздействия колебания концентрации кислорода, изменения в уровне L-ДОФА в крови появляются раньше, чем в сетчатке глаза. Это дает нам возможность рассматривать L-ДОФА в качестве периферического маркера, указывающего на высокий риск развития РН.

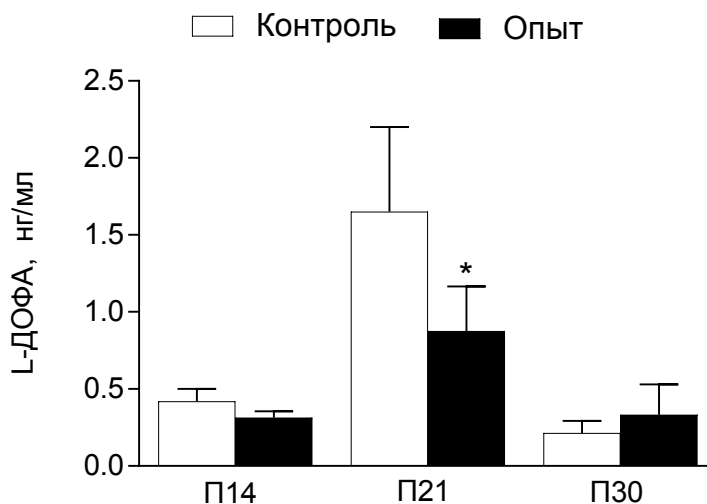


Рисунок 1.2 - Концентрация L-ДОФА в крови крыс на экспериментальной модели ретинопатии недоношенных в онтогенезе
 П – постнатальный день развития. * $P < 0,05$ различия между контрольной и опытной группами

Особо следует отметить тот факт, что в ранее проведенных исследованиях мы показали снижение L-ДОФА в сетчатке на П30, в то время как в крови мы видим увеличение ее уровня по сравнению с контролем. Учитывая, что у крыс регресс новообразованных сосудов всегда происходит самостоятельно, и это происходит именно к П30 [16], можно предположить, что L-ДОФА из общей системы циркуляции способен поступать в сетчатку и оказывать воздействие на клетки-мишени, способствуя разрешению патологического процесса.

Считается, что основным источником L-ДОФА в крови во взрослом организме являются клетки симпатической нервной системы [20]. Кроме того, в наших предыдущих работах было показано, что развивающийся мозг так же может быть источником L-ДОФА в общей системе циркуляции [21]. В данной работе мы оценили уровень L-ДОФА в целом мозге, чтобы понять, может ли он в данный период онтогенеза участвовать в развитии РН. На П14 и на П21 мы видим снижение L-ДОФА в мозге на 23% и 30% соответственно (рисунок 1.3), в то время как к П30 его уровень возрастает и становится выше контрольных значений на 20%. Эти данные находятся в соответствии с уровнем L-ДОФА в общей системе циркуляции.

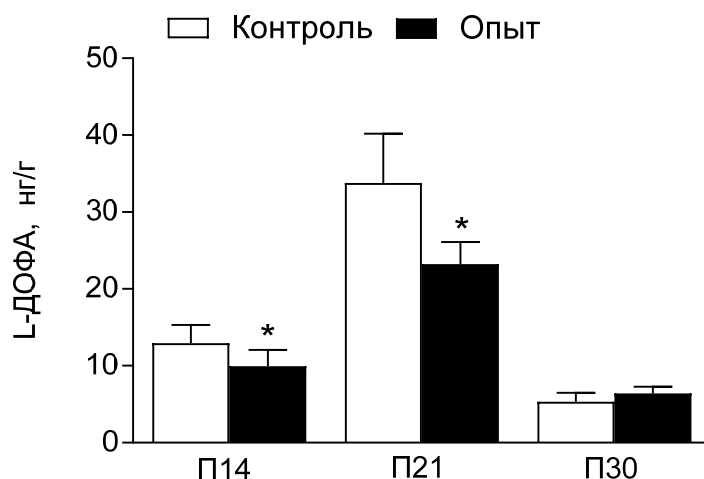


Рисунок 1.3 - Концентрация L-ДОФА в мозге крыс на экспериментальной модели ретинопатии недоношенных в онтогенезе
П – постнатальный день развития. * $P < 0,05$ различия между контрольной и опытной группами.

Исходя из этого, мы можем предполагать, что мозг как источник участвует в восстановлении концентрации L-ДОФА в крови, и таким образом, способствует разрешению патологического процесса РН на экспериментальной модели.

Средний системный уровень дофамина не имел значимых отличий в опытной и контрольной группах на всех сроках эксперимента (таблица 1).

Таблица 1 - Средний уровень дофамина в плазме крови крысят опытной и контрольной групп на 14-е, 21-е и 30-е сутки эксперимента (нг/мл)

	П14	П21	П30
Контрольная группа	0,04±0,02	0,18±0,02	0,09±0,01
Опытная группа	0,03±0,02	0,14±0,02	0,09±0,01

Следует отметить, что в проведенном нами ранее исследовании на местном уровне в сетчатке также не было получено статистически значимых различий уровня данного моноамина между группами крысят на всех сроках [15].

Аналогично дофамину, средний уровень норадреналина в плазме крови крысят не имел различий в исследуемых группах животных на всех сроках наблюдения (таблица 2).

Таблица 2 - Средний уровень норадреналина в плазме крови крысят опытной и контрольной групп на 14-е, 21-е и 30-е сутки эксперимента (нг/мл).

	П14	П21	П30
Контрольная группа	3,67±1,73	3,63±1,22	3,42±1,72
Опытная группа	3,03±1,54	3,39±1,91	2,82±0,58

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

2.1. Цели и задачи

Целью работ на 2020 год было создание методики и её апробация для оценки влияния лекарственных или физиологически активных веществ на процессы нейропластичности и нейродегенерации на полученной ранее клеточной модели дегенерации нейронов дофаминергического фенотипа.

Для достижения данной цели необходимо было выполнить две задачи:

- разработка протокола оценки влияния лекарственных или физиологически активных веществ на процессы нейропластичности и нейродегенерации;
- исследование отдельных лекарственных или физиологически активных веществ на полученной модели клеточных моделях дегенерации нейронов дофаминергического фенотипа по разработанному протоколу оценки влияния на процессы нейропластичности и нейродегенерации.

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 [22]. 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°C и 200g. Образовавшийся осадок ресуспендировали в среде культивирования следующего состава: Neurobasal medium, бессывороточная добавка B-27, 0.5 mM L-глутамин, 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-лизин 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-глутамин 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, а в контрольные лунки добавляли аналогичный объем 0.9% NaCl. Для оценки нейропотекторных свойств одновременно с МФП⁺ добавляли N-докозагексаеноилдофамин (ДГК-ДА 98%-ной чистоты синтезирован в лаборатории оксипиринов ИБХ РАН) [23], в конечной концентрации 0.5, 1.0 или 2.0 мкМ. Через 24 часа после введения проводили морфологический и биохимический анализ культуры.

2.2.4. Иммуногистохимия.

Во всех опытах с культурой клеток иммуноцитохимически выявляли нейроны, содержащие тирозингидроксилазу (ТГ). Для этого культуральную среду отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ: NaCl – 137 mM, KCl – 2.7 mM, Na₂HPO₄ – 10 mM, KH₂PO₄ – 1.76 mM, pH 7.3) 10 мин при 4°C и клетки фиксировали 4%-ным параформальдегидом на 0.2 M фосфатном буфере (pH 7.2 – 7.4) в течение 1 ч при 4°C. Затем культуру клеток инкубировали поэтапно: (1) с 3%-ным бычьим сывороточным альбумином (БСА) (Sigma) и 0.3% Triton X-100 (Sigma) на ФСБ 30 мин при 20°C; (2) с

кроличьими антителами к ТГ (1 : 5000) (предоставлены проф. Ж. Тибо, Франция) в ФСБ, содержащем 1%-ный БСА и 0.1%-ный Triton X-100, в течение 20 ч при 20°C; (3) с биотинилированными козьими антителами к антителам кролика (1 : 400) (VectorLaboratories, США) на ФСБ в течение 2 ч при 20°C; (4) с авидин-биотиновым комплексом, связанным с пероксидазой хрена (VectorLaboratories) на ФСБ в течение 1 ч при 20°C. После каждой инкубации лунки промывали ФСБ в течение 30 мин при 20°C. В контроле на втором этапе инкубации клеток из инкубационной среды исключали кроличьи антитела к ТГ. Пероксидазу авидин-биотинового комплекса выявляли в процессе инкубации с 0.05% 3,3'-диаминобензидинтетрагидрохлорида (Sigma) и 0.02% H₂O₂ на ФСБ при 20°C под визуальным контролем. Культуру клеток заключали в Mowiol 4-88 (Sigma).

После выявления ТГ-иммунореактивных (ТГ-ИР) нейронов лунки с культурой клеток сканировали с помощью микроскопа Zeiss Observer Z1 (Zeiss, Германия), оснащенного координатным столом и фотокамерой, при увеличении объектива ×20/NA 0,4 EC Plan-Neofluar (Zeiss). С помощью модуля MosaiXAxioVision (Zeiss) и программного обеспечения AxioVision 4.8 воссоздавали целостное изображение лунки. В каждой лунке с помощью программы Image J (Wayne Rasband – NIH, США) подсчитывали общее число ТГ-ИР нейронов. Кроме того, в каждой лунке случайным образом выбирали по 100 ТГ-ИР нейронов и определяли длину нейритов у каждого из них в соответствии с ранее описанной методикой [24]. Для этого с помощью программы Photoshop CS 5.1 на изображение ТГ-ИР нейронов накладывали сеть параллельных линий с интервалом 20 мкм и подсчитывали число пересечений нейритов с этими линиями, определяя длину нейритов (L) по формуле

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

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

2.2.5. 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 +30°C 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).

2.2.6. 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 $\pm$ стандартная ошибка среднего.

3. Результаты

Характеристика ТГ-ИР нейронов в первичной культуре среднего мозга. Через 8 суток культивирования клеток среднего мозга эмбрионов мыши с добавлением в последние 24 ч в среду 0.9% NaCl (контроль) были выявлены ТГ-ИР-нейроны с овальными или полигональными телами размером 8 – 10 мкм. Эти нейроны обладают 2 – 6 отростками (нейритами), ветвящимися по мере отдаления от тел (рисунок 2.1А).

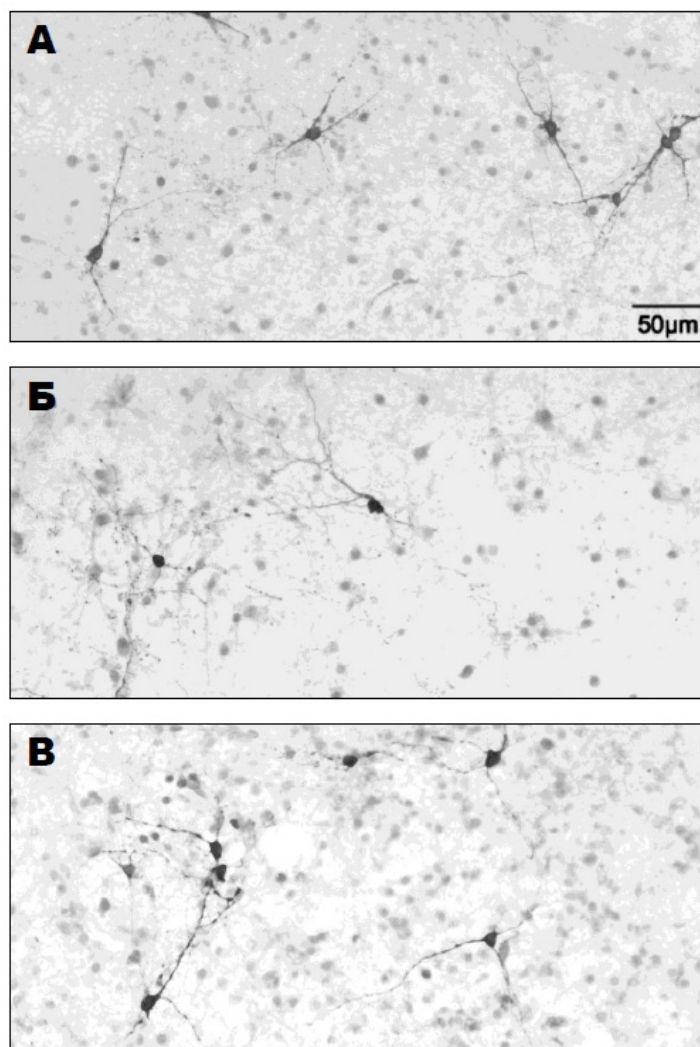


Рисунок 2.1 - Тирозингидроксилаза-иммунореактивные (ТГ-ИР) нейроны в 8-дневной диссоциированной культуре после 24 часов инкубации
(А) - 0.9% NaCl - контроль; (Б) - МФП⁺ в концентрации 10 мкМ; (В) - МФП⁺ (10 мкМ) совместно с 1.0 мкМ ДГК-ДА. Масштабный отрезок — 50 мкм.

ТГ-ИР нейроны после инкубации с МФП⁺. Введение через 7 суток после начала культивирования нейронов в культуральную среду МФП⁺ (10 мкМ) через 24 ч привело к снижению числа ТГ-ИР-нейронов на лунку на 58% по сравнению с контролем – после введения 0.9% NaCl вместо МФП⁺ (рисунок 2.1Б, 2.2А). При этом под влиянием МФП⁺ средняя длина нейритов на нейрон уменьшилась на 55% (рисунок 2.2Б), а общее содержание ДА в нейронах на лунку – на 56% по сравнению с контролем (рисунок 2.3).

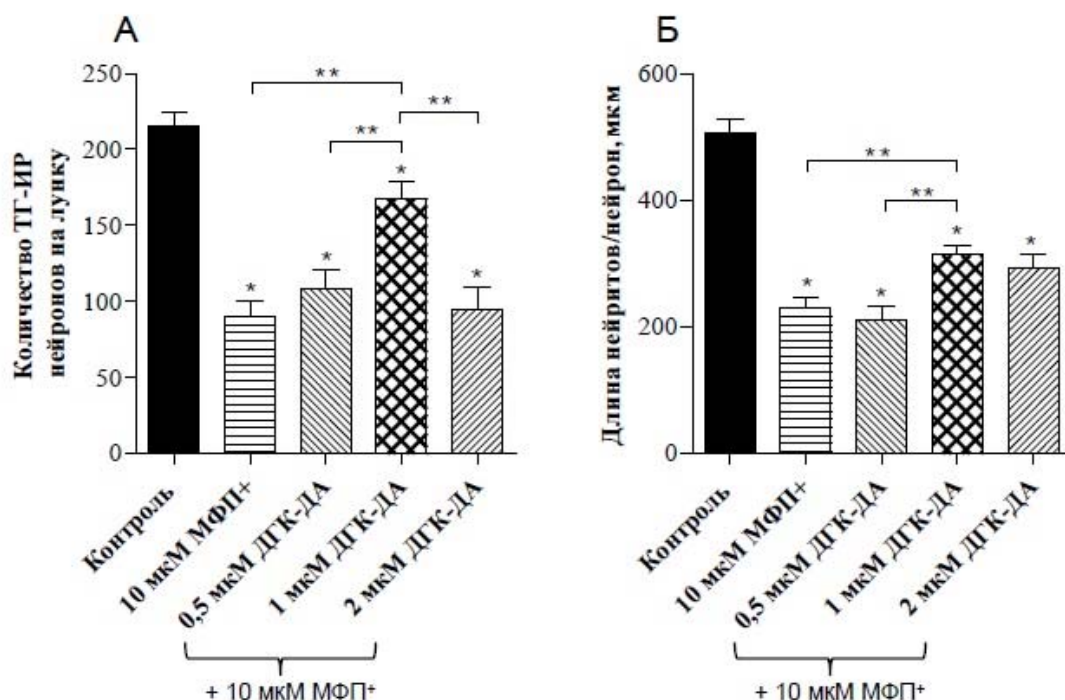


Рисунок 2.2 - Количество тел нейронов на лунку (А) и длина нейритов на нейрон (Б) В контроле и через 24 часа после введения МФП⁺ (10 мкМ) или МФП⁺ (10 мкМ) одновременно с ДГК-ДА в различных концентрациях. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем. ** $p < 0.05$ по сравнению с выбранным параметром.

ТГ-ИР нейроны после инкубации с МФП⁺ и ДГК-ДА. Одновременное добавление в культуру клеток из среднего мозга эмбрионов мыши 10 мкМ МФП⁺ и 0.5 мкМ ДГК-ДА через 24 часа привело к уменьшению числа ТГ-ИР-нейронов на 49.5% и общей длины нейритов на нейрон на 58% по сравнению с контролем (введение в среду 0.9% NaCl) (рисунок 2.2). При введении в культуральную среду 1 мкМ ДГК-ДА и 10 мкМ МФП⁺ число нейронов уменьшилось на 22%, а общая длина нейритов на нейрон – на 38% по сравнению с контролем (введение в среду 0.9% NaCl) (рис. 2.1В, 2.2). При этом общее содержание дофамина в нейронах было снижено на 19% по сравнению с контролем (0.9% NaCl) (рисунок 2.3). При добавлении в культуральную среду 2 мкМ ДГК-ДА и 10 мкМ МФП⁺ число ТГ-ИР-нейронов на лунку уменьшилось на 56%, а общая длина нейритов на нейрон – на 42% по сравнению с контролем (введение в среду 0.9% NaCl) (рисунок 2.2). Общее содержание дофамина на лунку уменьшилось на 29% по сравнению с контролем (введение в среду 0.9% NaCl) (рисунок 2.3).

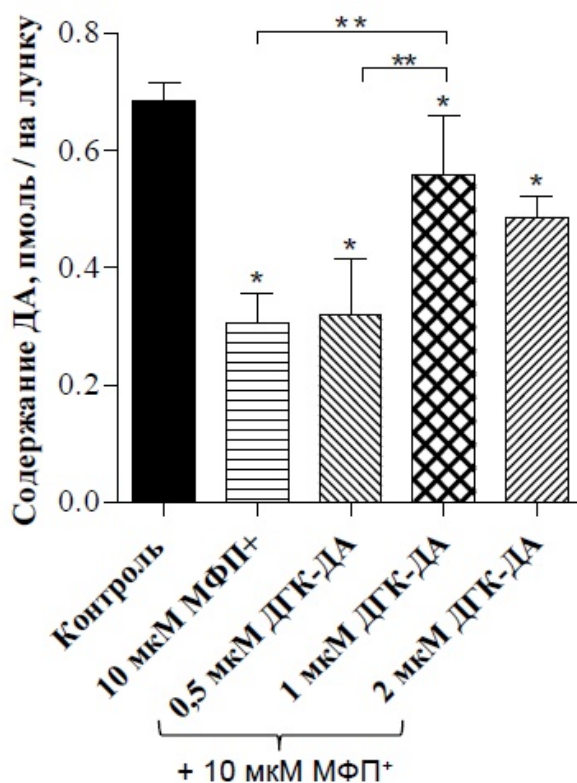


Рисунок 2.3 - Содержание ДА в культуре ТГ-ИР нейронов

В контроле и через 24 часа после введения МФП⁺ (10 мкМ) или МФП⁺ одновременно с ДГК-ДА в различных концентрациях. *- $p < 0.05$ по сравнению с контролем. **- $p < 0.05$ по сравнению с выбранной пробой.

4. Обсуждение результатов

В соответствии с общепринятой методологией скрининга кандидатов лекарственных средств, исследования начинаются с тестирования физиологических эффектов *in vitro*, что позволяет доказать прямое действие на клеточную мишень и изучить молекулярные механизмы действия. С помощью этой методологии оценивали предполагаемое нейропротекторное действие ДГК-ДА на дегенерирующие ДА-нейроны nigrostriatalной системы мозга, играющие в норме ключевую роль в центральной регуляции двигательной функции, а при дегенерации, являющиеся ключевым звеном патогенеза болезни Паркинсона [6].

В данной работе в качестве источника ДА-ергических нейронов использовали первичную культуру нейронов среднего мозга, полученную от эмбрионов мыши на 13-е сутки развития. Дегенерацию ДА-ергических нейронов вызывали через 7 суток после начала культивирования путем добавления в среду МФП⁺ – специфического токсина catecholaminergic нейронов, вызывающего окислительный стресс. Специфичность действия МФП⁺ на ДА-ергические нейроны обусловлена его захватом из среды в эти нейроны с помощью мембранного транспортера ДА [25, 26, 27]. МФП⁺ – продукт

дезаминирования в мозге протоксина – МФТП, который широко используется для моделирования БП *in vivo*, а его аналог (героин) вызывает паркинсонизм у людей [28, 29, 30].

ДА-ергические нейроны в культуре идентифицировали по наличию ТГ – первого ключевого фермента синтеза катехоламинов, который является идеальным маркером, поскольку равномерно распределен по всему катехоламинергическому нейрону (от дендритов до терминалей аксонов). Использование этого маркера позволяет гарантировано выявить в эмбриональной закладке черной субстанции (в вентральной части среднего мозга) только ДА-ергические нейроны, поскольку в ней не содержатся другие катехоламинергические нейроны [31]. Более того, ранее было показано, что для количественной оценки дегенерации ДА-ергических нейронов может быть использован только количественный иммуноцитохимический анализ ТГ-ИР-нейронов. Так, было показано, что уменьшение числа ТГ-ИР-нейронов в черной субстанции под действием специфических нейротоксинов идентично числу дегенерировавших в этой области нейронов [32, 33]. Альтернативный подход к оценке дегенерации клеточной культуры с помощью подсчета апоптозных клеток с морфологически измененными ядрами после их окрашивания флуоресцентными красителями [34, 35, 36] недостаточно точен, так как основан на субъективной оценке изменения либо морфологии ядра, либо изменения интенсивности флуоресценции, а поэтому используются для качественной, а не для количественной характеристики нейродегенерации.

На первом этапе работы дана количественная оценка дегенерации ДА-ергических нейронов при добавлении в среду культивирования нейронов среднего мозга 10 мкМ МФП⁺. В качестве прямых показателей дегенерации нейронов использовали уменьшение числа ТГ-ИР-нейронов на лунку и укорочение нейритов на нейрон при действии МФП⁺ по сравнению с контролем (0.9% NaCl), а в качестве косвенного показателя – снижение общего содержания ДА в нейронах на лунку. По полученным данным эти показатели снизились в опыте по сравнению с контролем соответственно на 58.2, 54.7 и 55.6%.

В дальнейших экспериментах в среду добавляли одновременно 10 мкМ МФП⁺ и ДГК-ДА – тестируемый нейропротектор в концентрациях – 0.5, 1.0 и 2.0 мкМ. Добавление в культуральную среду 0.5 мкМ ДГК-ДА не повлияло на действие МФП⁺ ни по одному из оцениваемых показателей. Ярко выраженный нейропротекторный эффект ДГК-ДА проявился при добавлении в культуральную среду вместе с МФП⁺ ДГК-ДА в концентрации 1 мкМ. При этом число ТГ-ИР-нейронов, длина нейритов и содержание ДА, хотя и уменьшились по сравнению с контролем (0.9% NaCl), но в гораздо меньшей степени, чем при действии только МФП⁺. В такой же степени была снижена деградация

нейритов ТГ-ИР-нейронов и уменьшено снижение общего содержания дофамина в нейронах.

Несмотря на то, что ДГК-ДА оказывает нейропротекторное влияние на дофаминергические нейроны и в более высокой дозе (2 мкМ), характер действия существенно отличается от такового в дозе 1 мкМ. Так, при культивировании нейронов в присутствии МФП⁺ и ДГК-ДА в дозе 2 мкМ, деградации подвергается такое же число дофаминергических нейронов, как и при добавлении в среду только МФП⁺, однако длина нейритов на ТГ-ИР-нейрон и общее содержание в выживших нейронах дофамина увеличены в такой же степени, как и при действии ДГК-ДА в дозе 1 мкМ, по сравнению с инкубацией культуры в присутствии только МФП⁺ [37].

Из полученных данных следует, что нейропротекторное действие ДГК-ДА на дегенерирующие дофаминергические нейроны меняется количественно и качественно в зависимости от концентрации нейропротектора. Так, при самой низкой из использованных концентраций (0.5 мкМ) ДГК-ДА нейропротекторное действие не наблюдается, тогда как при средней концентрации (1 мкМ) отмечено наиболее выраженное нейропротекторное воздействие, причем в этом случае ДГК-ДА в гораздо большей степени защищает тела нейронов от деградации, чем их отростки (нейриты). В самой высокой из использованных концентраций (2 мкМ) ДГК-ДА в меньшей степени защищает от гибели тела нейронов, но в гораздо большей степени защищает и/или стимулирует рост нейритов выживших нейронов. Важно отметить, что общее содержание ДА на лунку, являющееся важнейшим показателем нейротрансмиттерной функции нейронов, поддерживается на одном уровне независимо от характера нейропротекторных эффектов при дозах ДГК-ДА 1 и 2 мкМ [37].

Гетерогенный характер влияния ДГК-ДА в различных концентрациях на дегенерирующие дофаминергические нейроны косвенно свидетельствует о различных дозозависимых механизмах действия этого нейропротектора. Вероятно, речь идет об антиоксидантных свойствах ДГК-ДА. С одной стороны, показано, что оксидативный стресс приводит к гибели ДА-ергических нейронов как при моделировании БП *in vitro* и *in vivo*, так и у больных при БП [38], а с другой стороны продемонстрировано, что ДГК-ДА способствует выживанию гранулярных нейронов мозжечка крысы в условиях оксидативного стресса, вызванного H₂O₂ [39].

Помимо антиоксидантного ДГК-ДА демонстрирует также антиапоптотические свойства, снижая активность каспаз 3 и 9 [40, 41] – ферментов, запускающих апоптоз – основной путь дегенерации нейронов при хронических заболеваниях мозга, включая дегенерацию нигростриатных дофаминергических нейронов при БП [42, 43, 44]. Кроме

того, было показано, что ДГК-ДА обладает выраженными иммуномодулирующими свойствами [45].

Таким образом, на клеточной культуре нейронов получены доказательства нейропротекторного дозозависимого воздействия ДК-ДА на дегенерирующие ДА-ергические нейроны среднего мозга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках работ по разделу, во-первых, был проведен анализ литературы о связи патологии сетчатки и мозга [46]. Во-вторых, воспроизведена экспериментальная модель РН на 14-й, 21-ый, 30-й дни жизни. Показано, что у крыс при моделировании РН количество L-ДОФА в крови на 21-й день жизни снижается по сравнению с контролем. При этом на этой же модели показано, что L-ДОФА снижается в мозге на 14-й и 21-ый дни жизни. Полученные результаты свидетельствуют о том, что L-ДОФА может принимать участие в развитии РН и рассматриваться как важный маркер в патогенезе этого тяжелейшего заболевания.

В результате работ по разделу 2 были выбраны критерии на основе которых можно оценить эффективность нейропротекторных веществ, а именно следует оценить уровень дофамина, изменение числа дофаминергических нейронов и длину нейритов.

Руководствуясь этими параметрами оценки, было показано что нейролипин ДГК-ДА имеет ярко выраженный нейропротекторный эффект при концентрации 1мкМ. Полученные данные показывают, что данная модель дегенерации дофаминергических нейронов в совокупности с критериями может быть использована как эффективная основа для оценки нейропротекторных свойств различных веществ.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lauder J.M. Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers//Trends in neurosciences – 1993. – Vol. 16. P. 233-240.
2. Nguyen L., Rigo J.M., Rocher, V., Belachew S., Malgrange B., Rogister B., Moonen G. Neurotransmitters as early signals for central nervous system development//Cell and tissue research – 2001. – Vol. 305, No. 2. P. 187-202.
3. Ugrumov M.V. Hypothalamic monoaminergic systems in ontogenesis: development and functional significance//International Journal of Developmental Biology – 1997. – Vol. 41, No. 6. P. 809-816.
4. Gaspar P., Cases O., Maroteaux L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics//Nature Reviews Neuroscience – 2003. – Vol. 4, No. 12. P. 1002.
5. Izvolskaia M., Duittoz A.H., Tillet Y., & Ugrumov M.V. The influence of catecholamine on the migration of gonadotropin-releasing hormone-producing neurons in the rat fetuses//Brain Structure and Function – 2009. – Vol. 213, No. 3. P. 289-300.
6. Ugrumov M.V. Developing brain as an endocrine organ: a paradoxical reality//Neurochemical research – 2010. – Vol. 35, No. 6. P. 837-850.
7. Ugrumov M.V., Saifetyarova J.Y., Lavrentieva A.V., Sapronova A.Y. Developing brain as an endocrine organ: secretion of dopamine//Molecular and Cellular Endocrinology - 2012. – Vol. 348, N 1. P. 78 - 86.
8. Zubova, 2014 Zubova Yu.O., Nasyrova D.I., Sapronova 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.
9. Ugrumov M. Development of early diagnosis of Parkinson's disease: Illusion or reality//CNS Neuroscience & Therapeutics – 2020. – Vol. 26, No. 10. P. 997-1009.
10. 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, No. 9. P. 3059 - 3073.
11. Бондаренко Н.С., Зубова Ю.О., Сапронова А.Я., Волина Е.В., Угрюмов М.В. Роль аденогипофизотропных нейрогормонов в эндокринной парааденогипофизарной регуляции периферических органов-мишеней в онтогенезе у крыс//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2015. – Т. 159, N. 3. С. 268-272.

12. Nikishina Y.O., Sapronova A.Y., Ugryumov M.V. The effect of dopamine secreted by the brain into the systemic circulation on prolactin synthesis by the pituitary gland in ontogenesis//Acta Naturae (англоязычная версия) – 2016. – Vol. 8, No. 3 (30).
13. Nyakas C., Buwald B., Luiten P.G.M. Hypoxia and brain development//Progress in neurobiology - 1996. - Vol. 49, No. 1. P. 1 - 51.
14. Катаргина Л.А., Слепова О.С., Демченко Е.Н., Осипова Н.А. Роль системного дисбаланса цитокинов в патогенезе ретинопатии недоношенных//Российская педиатрическая офтальмология – 2015. – Т. 10, N. 4.
15. 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//Доклады Академии наук – 2019. – Т. 489, N. 3. С. 313-317.
16. Barnett J.M., Yanni S.E., Penn J.S. The development of the rat model of retinopathy of prematurity//Documenta ophthalmologica – 2010. – Vol. 120, No. 1. P. 3-12.
17. 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.
18. 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.
19. Fukuda N., Naito S., Masukawa D., Kaneda M., Miyamoto H., Abe T., Goshima Y. Expression of ocular albinism 1 (OA1), 3, 4-dihydroxy-L-phenylalanine (DOPA) receptor, in both neuronal and non-neuronal organs//Brain Research – 2015. Vol. 1602, P. 62-74.
20. Goldstein D.S., Eisenhofer G., Kopin I.J. Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans//Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics – 2003. – Vol. 305, N. 3. P. 800-811.
21. Melnikova V.I., Sapronova A.Y., Lavrentyeva A.V., Proshlyakova E.V., Voronova S. N., Ogurtsov S.I., Ugryumov M.V. The brain is one of the sources of L-dihydroxyphenylalanine in systemic circulation in fetuses and neonatal rats//Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology – 2006. – Vol. 42, No. 1. P. 21-29.
22. 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.
23. Bezuglov V., Bobrov M., Gretskeya N., Gonchar A., Zinchenko G., Melck D., Bisogno T., Di Marzo V., Kuklev D., Rossi J.C., Vidal J.P., Durand T. Synthesis and biological

evaluation of novel amides of polyunsaturated fatty acids with dopamine// *Bioorganic & medicinal chemistry letters* – 2001. Vol. 11, No. 4. P. 447–449.

24. Rønn L., Ralets I., Hartz B., Bech M., Berezin A., Berezin V., Moller A., Bock E. A simple procedure for quantification of neurite outgrowth based on stereological principles// *Journal of Neuroscience Methods* – 2000. – Vol. 100. P. 25–32.

25. Bezard E., Gross C.E., Fournier M.C., Dovero S., Bloch B., Jaber M. Absence of mptp-induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter// *Experimental neurology* – 1999. – Vol. 155, No. 2. P. 268–273.

26. Choi S.J., Panhelainen A., Schmitz Y., Larsen K.E., Kanter E., Wu M., Sulzer D., Mosharov E.V. Changes in neuronal dopamine homeostasis following 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) exposure// *Journal of Biological Chemistry* – 2015. – Vol. 290, No. 11. P. 6799–6809.

27. Langston J.W., Langston E.B., Irwin I. MPTP-induced parkinsonism in human and non-human primates=clinical and experimental aspects// *Acta neurologica Scandinavica. Supplementum* – 1984. – Vol. 70, No. 100. P. 49–54.

28. Javitch J.A., D'Amato R.J., Strittmatter S.M., Snyder S.H. Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity// *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 1985. – Vol. 82, No. 7. P. 2173–2177.

29. D'Amato R.J., Lipman Z.P., Snyder S.H. Selectivity of the parkinsonian neurotoxin MPTP: toxic metabolite MPP+ binds to neuromelanin// *Science* – 1986. – Vol. 231, No. 4741. P. 987–989.

30. Sawamoto K., Nakao N., Kobayashi K., Matsushita N., Takahashi H., Kakishita K., Yamamoto A., Yoshizaki T., Terashima T., Murakami F., Itakura T., Okano H. Visualization, direct isolation, and transplantation of midbrain dopaminergic neurons// *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2001. – Vol. 98, No. 11. P. 6423–6428.

31. Petroske E., Meredith G.E., Callen S., Totterdell S., Lau Y.S. Mouse model of Parkinsonism: a comparison between subacute MPTP and chronic MPTP/probenecid treatment// *Neuroscience* – 2001. – Vol. 106, No. 3, P. 589–601.

32. Turmel H., Hartmann A., Parain K., Douhou A., Srinivasan A., Agid Y., Hirsch E.C. Caspase-3 activation in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mice// *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* – 2001. – Vol. 16, No. 2. P. 185–189.

33. Columbano A. Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo//Journal of cellular biochemistry – 1995. – Vol. 58, No. 2. P. 181-190.
34. Choi S.J., Panhelainen A., Schmitz Y., Larsen K.E., Kanter E., Wu M., Sulzer D., Mosharov E.V. Changes in neuronal dopamine homeostasis following 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) exposure//Journal of Biological Chemistry – 2015. – Vol. 290, No. 11. P. 6799–6809.
35. Choi K.H., Hama-Inaba H., Wang B., Haginoya K., Odaka T., Yamada T., Hayata I., Ohyama H. UVCinduced apoptosis in human epithelial tumor A431 cells: sequence of apoptotic changes and involvement of caspase (-8 and -3) cascade//Journal of radiation research – 2000. – Vol. 41, No. 3. P. 243–258.
36. Bessmel'tsev S.S., Kozlov A.V., Syasina T.V., Udal'eva V.Yu. Comparative evaluation of methods for determining apoptotic activity of bone marrow cells in patients with chronic myelogenous leukemia//Fundam. Issled. – 2011. – Vol. 10, No. 1. P. 33–36.
37. Surkov S.A., Mingazov E.R., Blokhin V.E., Sturova A.I., Gretskaya N.M., Zinchenko G.N., Bezuglov V.V., Ugrumov M.V. The Neuroprotective Effect of N-Docosahexaenoyldopamine on Degenerating Dopaminergic Neurons of the Mesencephalon//Biology Bulletin – 2020. – Vol. 47, No. 5. P. 466-473.
38. Dexter D.T., Jenner P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms//Free Radical Biology and Medicine – 2013. – Vol. 62, P. 132–144.
39. Bobrov M.Y., Lizhin A.A., Andrianova E.L., Gretskaya N.M., Frumkina L.E., Khaspekov L.G., Bezuglov V.V. Antioxidant and neuroprotective properties of N-arachidonoyldopamine//Neuroscience letters – 2008. – Vol. 431, No. 1. P. 6–11.
40. Genrikhs E.E., Barskov I.V., Bobrov M.Yu. Bezuglov V.V. Neuroprotective properties of modulators of the endogenous cannabinoid system in vivo and in vitro, in Sovremennye napravleniya issledovaniy funktsional'noi mezhpolutsharnoi asimmetrii i plastichnosti mozga. Eksperimental'nye i teoreticheskie aspekty neiroplastichnosti (Modern Directions in Research on Functional Interhemispheric Asymmetry and Brain Plasticity. Experimental and Theoretical Aspects of Neuroplasticity)//Moscow: Nauchnyi Mir. – 2010.
41. Bobrov M.Y., Gretskaya N.M., Akimov M.G., Bezuglov V.V., Neuroleptins as endogenous neuroprotectors in brain ischemia and the basis for designing new hybrid multifunctional drugs, in Neurodegenerativnye zabolevaniya: ot genoma do tselostnogo organizma (Neurodegenerative Diseases: From the Genome to the Whole Organism)//Moscow: Nauchnyi Mir. – 2014. P. 726–762.

42. Anglade P., Vyas S., Hirsch E., Agid Y. Apoptosis in dopaminergic neurons of the human substantia nigra during normal aging// *Histology and histopathology* – 1997. – Vol. 12, No. 3. P. 603–610.
43. Olanow C.W., Tatton W.G. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease//*Annual review of neuroscience* – 1999. – Vol. 22, No. 1. P. 123–144.
44. Hartmann A., Hunot S., Michel P.P., Muriel M.P., Vyas S., Faucheux B.A., Mouatt-Prigent A., Turmel, H., Srinivasan A., Ruberg M., Evan G.I., Agid Y., Hirsch E.C., Caspase-3: a vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease//*Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2000. – Vol. 97, No. 6. P. 2875–2880.
45. Wang Y., Plastina P., Vincken J.P., Jansen R., Balvers M., Ten Klooster J.P., Gruppen H., Witkamp R., Meijerink J. N-Docosahexaenoyl dopamine, an endocannabinoid-like conjugate of dopamine and the n-3 fatty acid docosahexaenoic acid, attenuates lipopolysaccharide-induced activation of microglia and macrophages via COX-2//*ACS Chemical Neuroscience* – 2017. – Vol. 8, No. 3. P. 548–557.
46. Pavlenko T.A., Chesnokova N.B., Nodel M.R., Kim A.R., Ugrumov M.V. Molecular mechanisms and clinical manifestations of catecholamine dysfunction in the eye in Parkinson's disease as a basis for developing early diagnosis//*Acta Naturae* – 2020. – Vol. 12, Is. 2. P. 52-62.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ГЗ № 0108-2019-0006

*Отчетные публикации по теме ГЗ

1. *Pavlenko T.A., Chesnokova N.B., Nodel M.R., **Kim A.R.¹**, **Ugrumov M.V.¹** Molecular mechanisms and clinical manifestations of catecholamine dysfunction in the eye in Parkinson's disease as a basis for developing early diagnosis//Acta Naturae. – 2020. – Vol. 12. – Is. 2. – P. 52-62. DOI: 10.32607/actanaturae.10906.
2. ***Ugrumov M.¹** Development of early diagnosis of Parkinson's disease: Illusion or reality?//CNS Neuroscience & Therapeutics. – 2020. DOI: 10.1111/cns.13429.
3. ***Surkov S.A.¹**, **Mingazov E.R.¹**, **Blokhin V. E.¹**, **Sturova A. I.¹**, Gretskeya N.M., Zinchenko G.N.2, Bezuglov V.V., **Ugrumov M.V.¹** The Neuroprotective Effect of N-Docosahexaenoyldopamine on Degenerating Dopaminergic Neurons of the Mesencephalon//Biology Bulletin. – 2020. – Vol. 47. – No 5. – P. 466-473. DOI: 10.1134/S1062359020050106.

Отчет утвержден на заседании Ученого совета, протокол № 10 от 29 декабря 2020 г.