ДОКЛАДЫ АКАДЕМИИ НАУК, 2019, том 486, № 6, с. 748–752

БИОХИМИЯ, БИОФИЗИКА, МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК *577.175.82, 57.054*

РОЛЬ МОЗГА В РЕГУЛЯЦИИ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НОРАДРЕНАЛИН-ПРОДУЦИРУЮЩИХ ОРГАНОВ В ПЕРИОД МОРФОГЕНЕЗА У КРЫС

А. Р. Муртазина[1], Ю. О. Никишина[1,*], Л. К. Дильмухаметова[1], А. Я. Сапронова[1], академик РАН М. В. Угрюмов[1]

Поступило 26.03.2019 г.

Исследование является одним из фрагментов исследований, направленных на проверку нашей гипотезы о том, что в перинатальном периоде между норадреналин-продуцирующими органами существует взаимная гуморальная регуляция. С этой целью на модели выключения синтеза норадреналина в мозге оценивали экспрессию генов и содержание основных ферментов синтеза норадреналина – тирозингидроксилазы и дофамин-бета-гидроксилазы в периферических норадреналин-продуцирующих органах. Было показано увеличение экспрессии генов тирозингидроксилазы и дофамин-бета-гидроксилазы в надпочечниках. Полученные данные указывают на то, что при выключении синтеза норадреналина в мозге неонатальных крыс компенсаторно повышается синтез норадреналина в надпочечниках, что направлено на поддержание уровня норадреналина в крови и свидетельствует о взаимной гуморальной регуляции этих норадреналин-продуцирующих органов.

Ключевые слова: тирозингидроксилаза, дофамин-бета-гидроксилаза, норадреналин, неонатальный период, крыса.

DOI: https://doi.org/10.31857/S0869-56524866748-752

В период морфогенеза, который включает в себя образование и развитие органов (эмбриональный и перинатальный периоды развития у крыс), химические сигналы оказывают необратимые регуляторные воздействия на развитие жизненно важных систем организма. Одним из таких сигналов является норадреналин. Так, норадреналин играет ключевую роль в развитии и регуляции центральной нервной системы, сердечно-сосудистой и дыхательной систем [1].

Перинатальный период развития является одним из ключевых в процессе морфогенеза у крыс. Несмотря на то, что основной этап органогенеза уже завершен, в данный период происходит развитие и становление функций большинства систем и органов. В перинатальном периоде источниками норадреналина в крови являются как постоянный (надпочечники), так и транзиторные (развивающийся мозг, орган Цукеркандля) органы [2, 3]. Наличие в этот период трёх источников норадреналина в крови предполагает, что они взаимодействуют между собой посредством гуморальной регуляции. Данная работа является одним из фрагментов исследований, направленных на проверку нашей гипотезы о том, что в перинатальном периоде между норадреналин-продуцирующими органами существует взаимная гуморальная регуляция.

Ранее в нашей лаборатории были получены весомые аргументы в пользу данной гипотезы. Так, было показано, что при выключении синтеза норадреналина в мозге происходит значительное снижение его концентрации в плазме крови. Впоследствии наблюдалась гиперкомпенсация норадреналина в плазме крови, которая сопровождалась изменением его уровня в периферических норадреналин-продуцирующих органах [4]. В связи с этим целью данной работы стало изучение механизмов компенсаторного усиления синтеза норадреналина в периферических норадреналин-продуцирующих органах в ответ на его снижение в мозге. Поэтому в задачи этой работы входило на модели выключения синтеза норадреналина в мозге оценить уровень экспрессии генов ферментов синтеза норадреналина — тирозингидроксилазы (ТГ) и дофамин-бета-гидроксилазы (ДБГ) и содержание этих ферментов в надпочечниках и органе Цукеркандля у неонатальных крыс.

Работа проведена на самцах крыс популяции Вистар на 2-й и 5-й дни жизни. День рождения крысят считался первым днём жизни. Крыс содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к пище и воде. Все манипуляции с животными были проведены согласно протоколу, утверждённому комиссией по биоэтике Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН и находящемуся в соответствии с национальными и международными требованиями.

Для выключения синтеза норадреналина в мозге крысятам на 2-й постнатальный день в желудочки

[1] *Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской Академии наук, Москва*

** E-mail: zubova.y@gmail.com*

мозга вводили 0,5 мкг анти-ДБГ-сапорина – гибридный молекулярный комплекс, состоящий из антител против ДБГ, связанных с цитотоксином сапорином. Контрольным животным в боковой желудочек мозга вводили 0,9% NaCl [4]. Всего было использовано 16 животных в контрольной группе и 16 животных в экспериментальной группе.

Через 72 часа после внутрижелудочковых введений анти-ДБГ-сапорина у крыс под наркозом (хлоралгидрат 400 мг/кг, Sigma, USA) собирали одно полушарие мозга, надпочечники, орган Цукеркандля. На пробу приходился материал от одного животного.

Содержание мРНК ТГ и ДБГ определяли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Гуанидин-изотиоцианатным методом проводили выделение общей РНК из исследуемых органов. Концентрацию общей РНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop 8000 (Thermo Scientific, США). Реакцию обратной транскрипции с использованием набора RevertAid™ H Minus First Strandc DNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, США). ПЦР проводили с использованием интеркалирующего красителя SYBRGreen (Maxima™ SYBR GreenKit, ThermoScientific, США) на приборе Applied Biosystems 7500 (США). Результаты обрабатывали с помощью программы 7500 Software (Applied Biosystems, США). Значения, полученные для каждого образца, нормировали на экспрессию референсного гена *GAPDH* и выражали в условных единицах. Расчёт относительной экспрессии гена проводили методом ΔΔCt с учётом эффективности ПЦР. Эффективность ПЦР определяли методом построения стандартных кривых [5].

Содержание ТГ и ДБГ в мозге, надпочечниках и в органе Цукеркандля определяли методом вестерн-блоттинга. Для этого образцы исследуемых органов гомогенизировали в RIPA буфере (pH 8) (Sigma, США) и центрифугировали 20 мин при +4 °C и 12000 g. Концентрацию общего белка в супернатанте определяли методом BCA (набор BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, США) [6]. Электрофорез проводили в 12%-м полиакриламидном геле по методу Лэммли [7] в камере для вертикального фореза Mini-ProteinTetraSystem (BioRad, США) в буфере для электрофореза белков (pH 8,3). На дорожки наносили одинаковое количество белка (20 мкг для выявления ТГ и 40 мкг – для ДБГ).

Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли в течение 1 ч 15 мин при 290 мА в буфере для переноса (25 мМ Трис HCl (pH 7,5), 192 мМ глицин, 20% этанол). Для предотвращения неспецифической сорбции антител мембраны инкубировали в блокирующем растворе (5% обезжиренное молоко, 0,1% TWEEN-20) в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем инкубировали в течение 10 ч с моноклональными антителами мыши к ТГ (1:1500) (Sigma, США) или поликлональными антителами овцы к ДБГ (1:1000) (Abcam, США) при +4 °C. По окончании инкубации мембраны несколько раз промывали в TNT буфере и инкубировали со вторыми антителами (конъюгированными с пероксидазой хрена) к IgG мыши (1:50 000) или овцы (1:50 000) (Thermo Scientific, США) в течение 2 ч при 20 °C. Мембраны проявляли стандартным методом усиленной хемилюминесценции (ECL) с помощью набора Amersham (ECL Western Blotting Detection Reagent, США). Рентгеновские пленки сканировали и полученные изображения обрабатывали в программе ImageJ, оценивая интегральное поглощение белковых полос. Содержание ТГ и ДБГ было нормировано на общее содержание белка и выражено в процентах от контроля.

Полученные данные обрабатывали статистически в программе GraphPad Prism6 с помощью критерия Манна–Уитни.

Известно, что в перинатальном периоде развития норадреналин в крови у крыс поддерживается в физиологически активной концентрации, т.е. в той концентрации, в которой он может оказывать влияние на органы-мишени [8, 9]. Такой уровень норадреналина в рассматриваемый так называемый “критический период” морфогенеза является важным условием для нормального развития организма, так как известно, что при нарушении норадреналиновой регуляции возникают врожденные заболевания, часто несовместимые с жизнью [1].

Для понимания механизмов развития врожденных заболеваний необходимо изучение функциональной активности органов-источников норадреналина. До последнего времени считалось, что норадреналин в перинатальном периоде секретируется только хромаффинными клетками надпочечников и экстраадреналовыми клетками параганглиев (один из крупнейших – орган Цукеркандля), однако в нашей лаборатории было показано, что мозг до закрытия гематоэнцефалического барьера также может быть источником норадреналина в крови [9]. Учитывая наличие этих трёх источников норадреналина в рассматриваемый период развития, возникает вопрос, каков же механизм взаимодействия этих органов, обеспечивающих норадреналиновый гомеостаз в крови.

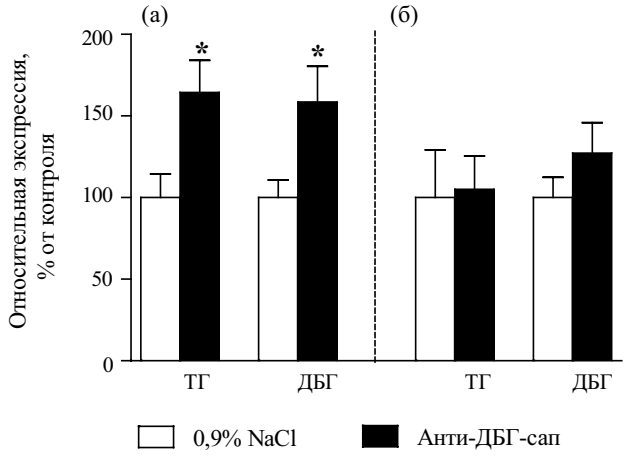

Рис. 1. Экспрессия мРНК тирозингидроксилазы (ТГ) и дофамин-бета-гидроксилазы (ДБГ) в надпочечниках (а) и органе Цукеркандля (б) через 72 ч после стереотаксического введения 0,5 мкг анти-ДБГ-сапорина в боковые желудочки мозга крыс на П2; в контроле вводили 0,9% NaCl; * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Чтобы проверить наше предположение, мы выключили синтез норадреналина в мозге неонатальных крыс с помощью специфического иммунотоксина – анти-ДБГ-сапорин. Известно, что синтез норадреналина на последней стадии осуществляется в секреторных гранулах путём превращения дофамина в норадреналин с помощью ДБГ – фермента, содержащегося в гранулах. В процессе выделения из клетки содержимого гранулы экзоцитозом мембрана гранулы, с включенной в неё ДБГ встраивается в плазматическую мембрану, становясь мишенью для молекулярного комплекса анти-ДБГ-сапорин – антител против ДБГ, связанных с цитотоксином сапорином [10]. Этот комплекс захватывается в клетку эндоцитозом и после освобождения и поступления токсина в цитоплазму вызывает избирательную гибель только норадренергических нейронов в мозге.

Ранее нами было показано, что через 48 ч после введения иммунотоксина в боковой желудочек мозга содержание норадреналина в мозге снижается в три раза, при этом в надпочечниках и органе Цукеркандля оно остается на уровне контроля. Также мы обнаружили, что концентрация норадреналина в плазме крови снижается в 1,5 раза. Через 72 ч содержание норадреналина в мозге остается сниженным, при этом в крови восстанавливается до уровня контроля и превышает его. Со стороны периферических органов также наблюдались изменения: содержание норадреналина в надпочечниках увеличилось, что, по нашим представлениям, связано с компенсаторным ответом на сниженный уровень норадреналина в крови [4]. Получив серьёзные основания считать, что между ними есть функциональное взаимодействие, направленное на поддержание норадреналинового гомеостаза, мы постарались оценить механизм этого компенсаторного ответа и для этого оценили экспрессию ферментов синтеза норадреналина. По нашим данным, компенсаторное усиление экспрессии генов ТГ и ДБГ наступает раньше, чем изменения в содержании норадреналина в органах. А именно экспрессия генов ТГ и ДБГ в надпочечниках и органе Цукеркандля увеличивается уже через 48 ч после введения иммунотоксина в боковые желудочки мозга. Однако содержание самих ферментов оставалось на уровне контроля [11]. Учитывая, что компенсаторный ответ по изменению содержания норадреналина в органах мы впервые обнаружили через 72 ч после введения анти-ДБГ-сапорина в боковые желудочки мозга, мы также решили оценить уровень экспрессии ТГ и ДБГ в этом интервале времени. В результате, через 72 ч после введения иммунотоксина в боковой желудочек мозга повышенная экспрессия генов ТГ и ДБГ в надпочечниках по сравнению с контролем сохранялась (рис. 1а). При этом содержание самих ферментов не менялось (рис. 2а) так же, как и через 48 ч, что, по-видимому, связано с изменением активности ферментов на данной модели.

Компенсаторное увеличение синтеза норадреналина в надпочечниках, обнаруженное на данной модели, возможно, осуществляется через специфические ауторецепторы, которые как в нервных, так и хромаффинных клетках у крыс начинают экспрессироваться уже в пренатальном периоде [12]. Так, известно, что в надпочечниках экспрессируются альфа-2-адренорецепторы, в частности подтип альфа-2с [13].

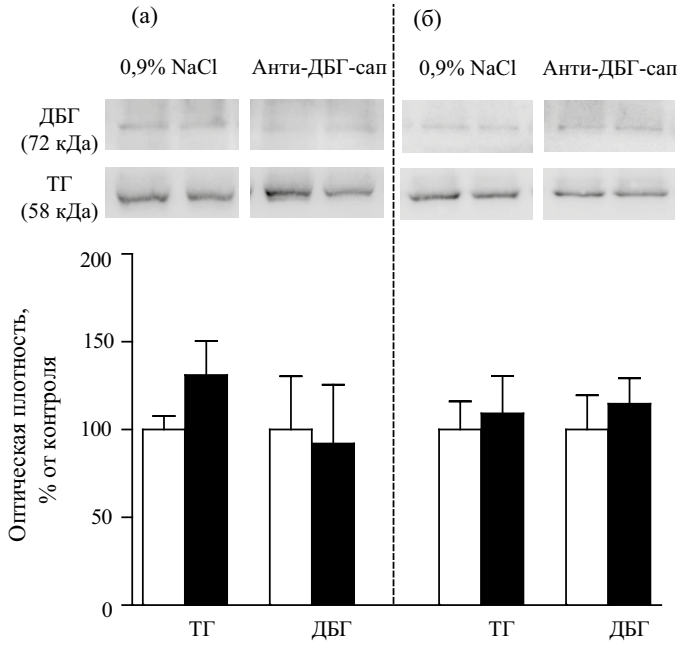

Рис. 2. Экспрессия тирозингидроксилазы (ТГ) и дофамин-бета-гидроксилазы (ДБГ) в надпочечниках (а) и органе Цукеркандля (б) через 72 ч после стереотаксического введения 0,5 мкг анти-ДБГ-сапорина в боковые желудочки мозга крыс на П2; в контроле вводили 0,9% NaCl.

Все три подтипа альфа-2- адренорецепторов связаны с Gαi белками, что приводит к ингибированию аденилатциклазы. Аденилатциклаза регулирует различные функции клетки путём активации или ингибирования специфических клеточных белков посредством сАМФ-зависимой протеинкиназы А. В свою очередь, активация протеинкиназы А может привести к фосфорилированию ТГ, что увеличивает активность данного фермента [14]. Учитывая, что на данной модели происходит снижение концентрации норадреналина в крови, то логично предположить, что запускаются компенсаторные процессы, необходимые для выравнивания уровня норадреналина, опосредованные активацией альфа-2а-дренорецепторов и, как следствие, изменением активности ТГ.

Наряду с оценкой синтеза норадреналина в хромаффинной ткани надпочечников, нами была дана оценка экспрессии ферментов в органе Цукеркандля. Через 72 ч после введения иммунотоксина в боковой желудочек мозга экспрессия генов и содержание ТГ и ДБГ оставалась на уровне контроля (рис. 1б, рис. 2б), в то же время произошло снижение содержания норадреналина, но при этом его спонтанное выделение увеличилось, что, по-видимому, связано с особенностью данного органа.

Известно, что орган Цукеркандля достигает максимальной функциональной активности у крыс к третьему дню жизни и далее претерпевает инволюцию к концу второй недели жизни [15]. По-видимому, в ответ на снижение концентрации норадреналина в плазме усиливается выделение норадреналина из органа Цукеркандля, хотя из-за протекающих в это время процессов инволюции орган не в состоянии восстановить пул норадреналина до исходного уровня.

Таким образом, в проведённом исследовании показано, что при выключении синтеза норадреналина в мозге неонатальных крыс компенсаторно повышается синтез норадреналина в надпочечниках, что направлено на поддержание уровня норадреналина в крови и свидетельствует о взаимной гуморальной регуляции этих норадреналин-продуцирующих органов.

Источник финансирования. Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18–34–00929).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hildreth V., Anderson R.H., Henderson D.J.* // Clin. Anat. 2009. V. 22. P. 36–46.
2. *Moore R.Y., Bloom E.* // Ann. Rev. Neurosci. 1979. V. 2. P. 113–168.
3. *Huber K., Kalcheim C., Unsicker K.* // Auton. Neurosci. 2009. V. 151. P. 10–16.
4. *Никишина Ю.О., Муртазина А.Р., Сапронова А.Я., Мельникова В.И., Бондаренко Н.С., Угрюмов М.В* // Онтогенез. 2016. Т. 47. № 5. С. 287–295.

5. *Bookout A.L., Cummins C.L., Mangelsdorf D.J., et al.* // Curr. Protoc. Mol. Biol. 2006. P. 15–8.
6. *Smith P.K., Krohn R. I., Hermanson G.T., et al.* // Anal. Biochem. 1985. V. 150. № 1. P. 76–85.
7. *Laemmli U.K.* // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
8. *Thoma G.B., Cummins J.T., G. Smythe, et al.* // J. Endocrinol. 1989. № 121. P. 141–147.
9. *Зубова Ю.О., Бондаренко Н.С., Сапронова А.Я., Угрюмов М.В.* // Нейрохимия. 2015. Т. 32. С. 116–122.
10. *Wrenn C.C., Picklo M.J., Lappi D.A.* // Brain research. 1996. V. 740. № 1/2. P. 175–184
11. *Муртазина А.Р., Дильмухаметова Л.К., Никишина Ю.О., Сапронова А.Я., Волина Е.В., Угрюмов М.В.* // Онтогенез. 2017. Т. 48. № 5. С. 1–7.
12. *Fujinaga M., Scott J.C.* // Neurosci. let. 1997. V. 231. № 2. P. 108–112.
13. *Brede M., Nagy G., Philipp M. et al.* // Mol. Endocrinol. 2003. V. 17. № 8. P. 1640–1646.
14. *Jakubowski H.* // Biochemistry Online: an Approach Based on Chemical Logic. College of St. Benedict, St. John's University, 2003.
15. *Schober A., Parlato R., Huber K., et al.* // J. Neuroendocrinol. 2013. V. 25. № 1. P. 34–47.

THE ROLE OF THE BRAIN IN THE REGULATION OF PERIPHERAL NORADRENALINE-PRODUCING ORGANS IN RATS DURING MORPHOGENESIS

A. R. Murtazina, Yu. O. Nikishina, L. K. Dil'mukhametova, A. Ya. Sapronova,
Academician of the RAS M. V. Ugrumov

Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Received March 26, 2019

This work represents one part of our research project, in which we try to prove, that in the perinatal period exist a humoral regulation between noradrenaline producing organs. In this study we used a rat model that allowed blocking synthesis of noradrenalin in the brain and evaluated gene expression and protein levels of noradrenaline key synthesis enzymes such as tyrosine hydroxylase (TH) and dopamine beta-hydroxylase (DBH) in peripheral noradrenaline producing organs. As a result we showed increased gene expression of TH and DBH in adrenal glands. This data indicate that if neonatal rat brain lacks an ability to produce noradrenaline, then as a compensatory process synthesis of noradrenaline increased in adrenal glands, so that the concentration levels in blood are kept at normal levels. This indicates that there is a humoral regulation between brain and adrenal glands which is not fully understood yet.

Keywords: tyrosine hydroxylase, dopamine beta-hydroxylase, noradrenaline, neonatal period, rat.