

УДК 577.175.829

## ВЗАИМНАЯ ГУМОРАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭНДОКРИННЫХ ИСТОЧНИКОВ НОРАДРЕНАЛИНА В ПЕРИНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ РАЗВИТИЯ У КРЫС

© 2016 г. Ю. О. Никишина<sup>1</sup>, А. Р. Муртазина<sup>1</sup>, А. Я. Сапронова<sup>1, \*</sup>, В. И. Мельникова<sup>1</sup>, Н. С. Бондаренко<sup>1</sup>, М. В. Угрюмов<sup>1, 2, \*\*</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН  
119334, Москва, ул. Вавилова, 26

<sup>2</sup>Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”  
Москва, ул. Мясницкая 20

\*E-mail: anna\_sapronova@mail.ru

\*\*E-mail: mugrumov@mail.ru

Поступила в редакцию 09.12.2015 г.  
Окончательный вариант получен 08.04.2016 г.

Проведенное исследование направлено на проверку нашего предположения о том, что между органами, секретирующими норадреналин (НА) в перинатальном периоде онтогенеза, существует гуморальное взаимодействие, направленное на поддержание физиологически активной концентрации НА в крови. В качестве объектов исследований в данной работе использовали транзиторные органы — мозг, орган Цукеркандля, и постоянный эндокринный орган крыс — надпочечники, секретирующие НА в общую систему. Для решения поставленных в данном исследовании задач секреторную активность (содержание НА) надпочечников и органа Цукеркандля оценивали при разрушении НА-ергических нейронов мозга а) путем провоцирования их избирательной гибели введением в желудочки мозга неонатальных крысят гибридного молекулярного комплекса, состоящего из антител против дофамин-β-гидроксилазы (ДБГ), связанных с цитотоксином сапорином — анти-ДБГ-сапорин; б) путем микрохирургического разрушения мозга плодов (энцефалэктомия плодов *in utero*). Показано, что через 72 ч после фармакологического выключения синтеза норадреналина в мозге новорожденных крыс или микрохирургического выключения синтеза норадреналина в мозге плодов происходит повышение концентрации норадреналина в надпочечниках и снижение в органе Цукеркандля. Таким образом, на моделях хронического выключения синтеза норадреналина в мозге крыс в пре- и раннем постнатальном периодах развития показано изменение секреторной активности периферических источников норадреналина, что по-видимому способствует сохранению физиологически активной концентрации норадреналина в общей системе циркуляции.

**Ключевые слова:** норадреналин, гематоэнцефалический барьер, онтогенез, мозг, надпочечники, орган Цукеркандля, общая система циркуляции, нейротоксин, крыса

**DOI:** 10.7868/S0475145016050074

### ВВЕДЕНИЕ

Регуляция развития и функционирования организма в онтогенезе обеспечивается биологически активными веществами, действующими в качестве морфогенетических или транскрипционных факторов через рецепторы на клетках и органах-мишенях (Lauder, 1993; Nguyen et al., 2001). К таким веществам, обладающим широким спектром физиологического действия, относится норадреналин (НА), который синтезируется нейронами головного мозга и симпатической нервной системы, а также хромаффинными клетками надпочечников и параганглиев, в основном, органом Цукеркандля (ОЦ) (Moore and Bloom, 1979;

Goldstein et al., 2003; Huber et al., 2009; Tank and Wong, 2015). В онтогенезе у грызунов НА секретируется нейронами мозга и хромаффинными клетками надпочечников и ОЦ уже в середине пренатального периода (Tischler, 1989; Угрюмов, 1999; Huber et al., 2009). С этого момента и до раннего постнатального периода НА играет роль морфогенетического фактора, определяющего развитие клеток- и органов-мишеней (Nedergaard et al., 1995; Berger-Sweeney and Hohmann, 1997; Viemary et al., 2004; Kreider et al., 2004; Bianchi and Sieweke, 2008).

Нарушение метаболизма НА в критические периоды онтогенеза приводит у животных к нарушению развития сердечно-сосудистой и дыха-

тельной систем, а у человека — к развитию тяжелых врожденных заболеваний, а также повышает риск возникновения синдрома внезапной детской смерти (Thomas et al., 1995; Barker, 2002; Viemary et al., 2004; Hildreth et al., 2009; Kinney, Thach, 2009).

В пре- и раннем постнатальном периодах развития организма концентрация НА в общей системе циркуляции поддерживается на достаточно высоком уровне, сравнимом с его уровнем в порտальной системе циркуляции взрослых животных (Thomas et al., 1989; Зубова и др., 2015а). Среди источников НА в крови особый интерес представляют органы, которые секретируют НА только в определенный период онтогенеза, когда происходит регуляция развития клеток — и органов-мишеней. Одним из них является орган Цукеркандля, функционирующий у крыс в перинатальном периоде и претерпевающий инволюцию в раннем постнатальном периоде — к концу второй недели жизни (Schober et al., 2012). Еще одним транзитным источником НА в общей системе циркуляции в перинатальном периоде является мозг, который согласно нашим данным в отсутствие гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) играет роль эндокринного органа (Ugrumov et al., 2005, 2012; Zubova et al., 2014).

Результаты проведенных нами ранее исследований (Зубова и др., 2015) позволили предположить, что в перинатальном периоде онтогенеза поддержание определенной концентрации НА в плазме крови осуществляется благодаря гуморальному взаимодействию между органами, синтезирующими НА. Учитывая отсутствие нервной и преобладание гуморальной регуляции норадреналином периферических органов в перинатальном периоде развития (Tomlinson, Coupland, 1990; Bellinger et al., 1992), эти исследования приобретают особое значение.

**Цель:** проверка предположения о том, что в онтогенезе до формирования вегетативной иннервации органов существует взаимная гуморальная (эндокринная) регуляция временных и постоянных эндокринных источников норадреналина.

#### **Задачи:**

1) определение концентрации норадреналина в надпочечниках и органе Цукеркандля при разрушении норадренергической системы мозга в перинатальном периоде развития у крыс.

2) сравнительная характеристика реакции органов-источников норадреналина при разрушении норадренергической системы мозга в перинатальном периоде развития у крыс.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проведена на самцах крыс популяции Вистар на 18-й эмбриональный день (Э18), Э21, 2-й день постнатального периода развития (П2), П3, П4, П5. День обнаружения сперматозоидов в вагинальном мазке считали первым днем беременности, день рождения крысят считали 1-ым днем жизни. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к пище и воде.

### *Хроническое ингибирование синтеза НА в мозге крыс*

Для разрушения норадренергических нейронов крысятам на П2 в желудочки мозга вводили анти-ДБГ-сапорин — гибридный молекулярный комплекс, состоящий из антител против дофамин-β-гидроксилазы, связанных с цитотоксином сапорином (Coradazzi, 2010, Wiley, 2000).

Всего было использовано 60 животных.

В опыте 0.5 мкг анти-ДБГ-сапорина в 2 мкл 0.9% NaCl стереотаксически вводили в боковой желудочек мозга. Для этого крысам под изофуранным наркозом на голове разрезали кожу и латерально от брегмы вырезали в черепной коробке отверстие 2 × 2 мм. Затем животных помещали в стереотаксический прибор, адаптированный для молодых животных, и вводили стеклянную микроканюлю (диаметр 50 мкм), содержащую раствор для инъекции и соединенную тefлоновой трубкой с микрошприцем Hamilton, в боковой желудочек мозга по координатам 1.2 мм латерально от брегмы, 2.0–2.5 мм вглубь мозга. Контрольным животным вводили 2 мкл 0.9% NaCl.

### *Микрохирургическое выключение синтеза НА в мозге крыс*

У самок на 18-й день беременности под нембуталовым наркозом (40 мг/кг веса) осуществляли лапаротомию и проводили энцефалэктомию плодов *in utero*, т.е. микрохирургически разрушали передний мозг и частично средний и ромбовидный мозг по описанной ранее методике (Mitskevich et al., 1970). Ложно оперированные животные служили контролем. Всего использовано 46 плодов.

### *Взятие и обработка материала*

У крыс через 24, 48 или 72 ч после внутрижелудочковых введений на П2 анти-ДБГ-сапорина собирали кровь из сердца, мозг (одно полушарие), надпочечники, орган Цукеркандля, сердце и двенадцатиперстную кишку. На пробу приходился материал от одного животного.

У плодов крыс после энцефалэктомии *in utero* на Э18 через 72 ч собирали кровь из сердца, над-

почечники и орган Цукеркандля. Кровь пулировали от 2-х плодов, в остальных случаях на пробу приходился материал от одного животного.

Кровь переносили в пробирку, содержащую 30 мкл 5% раствора ЭДТА (Sigma, США) и 10 мкл 10% раствора метабисульфита натрия (Sigma, США). Затем отделяли плазму от форменных элементов центрифугированием при 400 g в течение 10 мин и добавляли в нее 250 пмоль/мл 3,4-дигидроксibenзиламин гидробромида (ДГБА) — внутренний стандарт (Sigma, США) в 0.1 н HClO<sub>4</sub>. Для освобождения от высокомолекулярных белков плазму центрифугировали при 2000 g 20 мин, переносили в чистую пробирку и хранили при -70°C до определения НА.

Выделенные мозг и периферические органы гомогенизировали в 10 объемах 0.1 н HClO<sub>4</sub>, содержащей 500 пмоль/мл ДГБА, при помощи ультразвукового гомогенизатора (Labsonic M, Sartorius), центрифугировали при 2000 g в течение 20 мин и в полученном супернатанте определяли НА. Перед определением НА экстрагировали на оксиде алюминия.

Измерение НА в плазме крови и в образцах ткани проводили при помощи обратно-фазной ВЭЖХ (Amperometric detector LC-4B, Bioanalytical Systems, США) при потенциале 850 мВ. Пробы вводили в инжектор (Rheodyne 7125, США) с петлей объемом 100 мкл. Разделение производили на 10-сантиметровой колонке с внутренним диаметром 4 мм и наполнителем C-18, 3.3 мкм (Dr. Maisch GmbH, Германия). Подвижной фазой служил 0.1 М цитратно-фосфатный буфер, содержащий 0.3 мМ октансульфоната натрия (Sigma, США), 0.1 мМ ЭДТА (Sigma, США) и 8% ацетонитрила (Sigma, США) (pH 3.0). Скорость потока 0.8 мл/мин обеспечивалась насосом (Gilson 307, Франция). Пики катехоламинов и метаболитов идентифицировали, ориентируясь на время выхода веществ в стандарте, содержание рассчитывали методом внутреннего стандарта, используя отношение площадей пиков в стандартной смеси и в образце, с помощью программы "Мультихром" (Россия).

Концентрацию НА вычисляли путем сравнения величины пика в пробе с величиной пика в стандарте. Полученные данные обрабатывали статистически с помощью F-теста для оценки однородности выборки и теста Стьюдента для определения достоверности различий. Оба теста входят в пакеты программ Sigma Plot Version 9.1 и GraphPad Prism Version 5.0 для Windows (GraphPad Software, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

*Норадреналин в крови, мозге и периферических органах через 24 ч после стереотаксического введения анти-ДБГ-сапорина*

Через 24 ч после введения анти-ДБГ-сапорина в боковые желудочки мозга крыс на П2 концентрация НА не изменялась ни в плазме, ни в органах по сравнению с контролем (рис. 1).

*Норадреналин в крови, мозге и периферических органах через 48 ч после стереотаксического введения анти-ДБГ-сапорина*

Через 48 ч после введения анти-ДБГ-сапорина в боковые желудочки мозга крыс на П2 концентрация НА в мозге падает почти в три раза по сравнению с контролем, а в плазме крови снижается в 1.5 раза. В надпочечниках, ОЦ, сердце и в двенадцатиперстной кишке концентрация НА не изменялась (рис. 2).

*Норадреналин в крови, мозге и периферических органах через 72 ч после стереотаксического введения анти-ДБГ-сапорина*

Через 72 ч после введения анти-ДБГ-сапорина в боковые желудочки мозга на П2 концентрация НА в мозге падает в 2.4 раза по сравнению с контролем, тогда как в плазме крови повышается в 1.5 раза, в надпочечниках — повышается в 1.4 раза, в ОЦ — снижается в 1.5 раза. В сердце и в двенадцатиперстной кишке (контроль) концентрация НА на модели не изменялась (рис. 3).

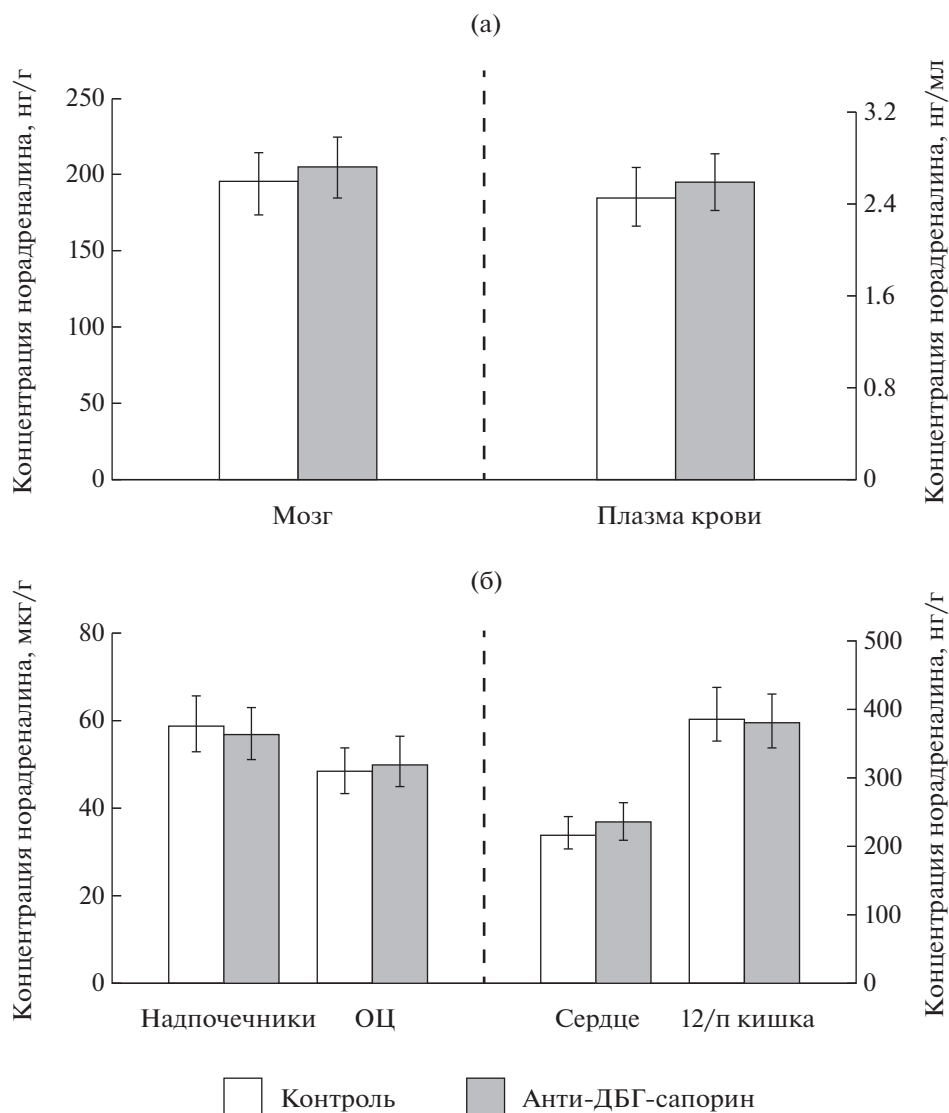
*Норадреналин в крови и периферических органах плодов крыс через 72 ч после энцефалэктомии 18-дневных плодов in utero*

Концентрация НА в крови у энцефалэктомированных плодов не изменилась по сравнению с ложнооперированным контролем, тогда как в надпочечниках она возросла в 1.7 раза, а в ОЦ снижалась вдвое (рис. 4).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование направлено на проверку нашего предположения о том, что в онтогенезе до формирования вегетативной иннервации существует взаимная гуморальная (эндокринная) регуляция временных и постоянных эндокринных источников НА по принципу прямых и обратных связей. Ранее мы показали, что в пре- и раннем постнатальном периодах онтогенеза в крови поддерживается физиологически активная концентрация НА (Зубова и др., 2015а).

В качестве объектов исследований в данной работе использовали транзиторные органы —



**Рис. 1.** Концентрация норадреналина в мозге, плазме крови, надпочечниках, органе Цукеркандля (ОЦ), сердце и 12-й перстной кишке (12-пк) через 24 ч после стереотаксического введения 0.5 мкг анти-ДБГ сапорина в мозг 2-х дневных крысят. \*  $P < 0.05$ , различия между предыдущим и последующим значениями.

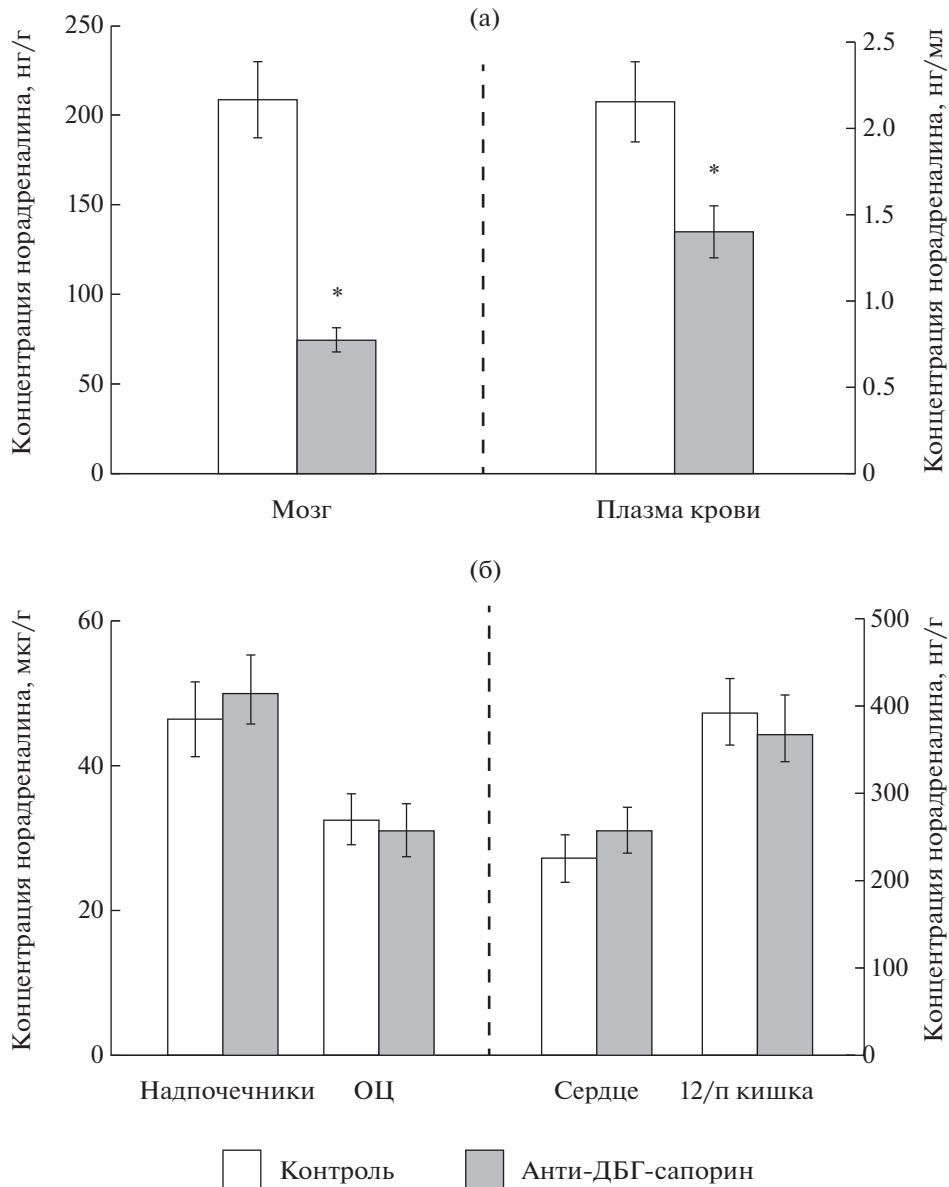
мозг, орган Цукеркандля, и постоянный эндокринный орган крыс – мозговое вещество надпочечников, секретирующие НА в общую систему циркуляции.

Для решения поставленных в данном исследовании задач секреторную активность (содержание НА) надпочечников и органа Цукеркандля оценивали при разрушении НА-ергических нейронов мозга способами:

1) путем провоцирования их избирательной гибели введением в желудочки мозга неонатальных крысят гибридного молекулярного комплекса, состоящего из антител против дофамин- $\beta$ -гидроксилазы (ДБГ), связанных с цитотоксином сапорином – анти-ДБГ-сапорин (Coradazzi, 2010; Wiley, 2000);

2) путем микрохирургического разрушения мозга (энцефалэктомия плодов *in utero*).

Как известно, синтез НА осуществляется в секреторных гранулах путем превращения дофамина в НА с помощью дофамин- $\beta$ -гидроксилазы – фермента, содержащегося в гранулах в свободной форме или встроенного в мембрану гранулы. В процессе выделения из клетки содержимого гранулы экзоцитозом мембрана гранулы с включенной в нее дофамин- $\beta$ -гидроксилазой встраивается в плазматическую мембрану (Wiley, 2000; Wteng, 1996), становясь мишенью для молекулярного комплекса антитело–токсин. Далее этот комплекс захватывается в клетку эндоцитозом и после освобождения и поступления токсина в цитоплазму вызывает гибель клетки. Введение ан-

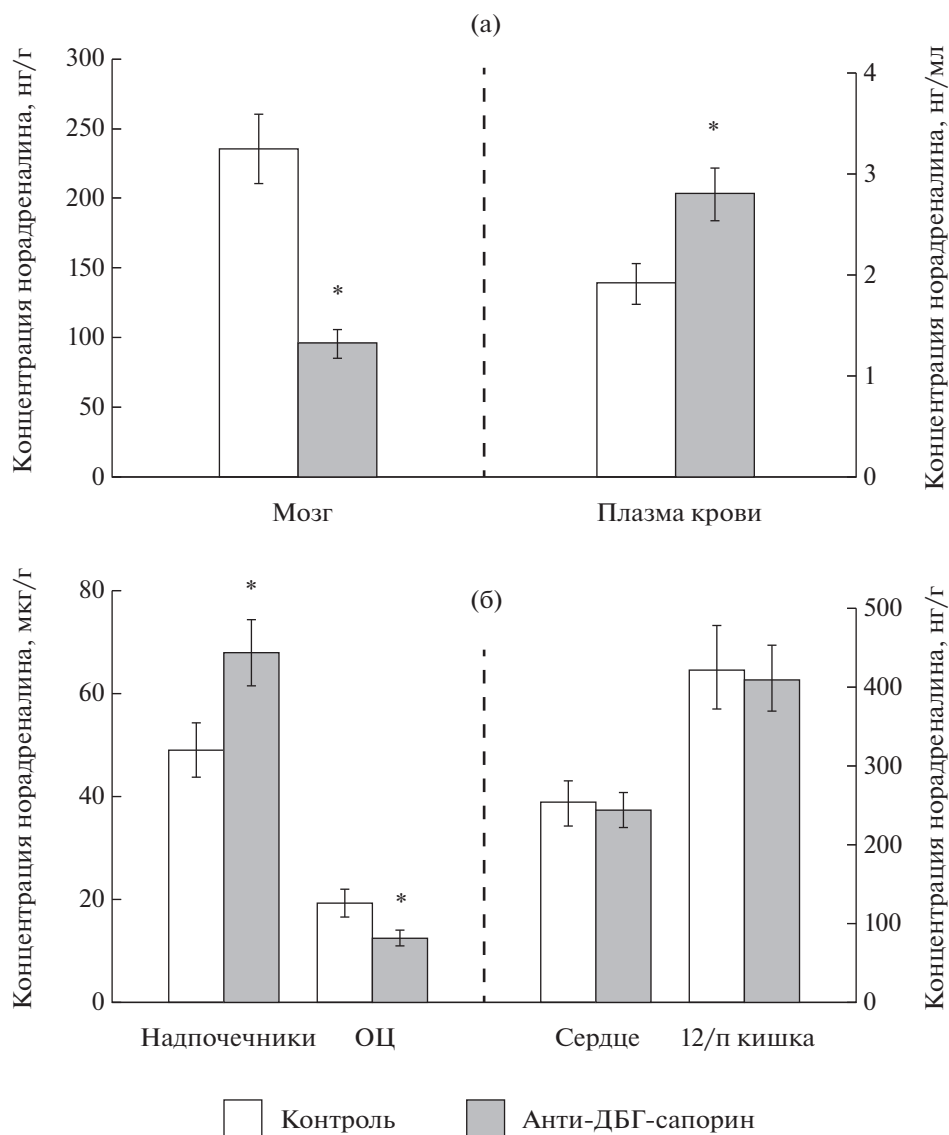


**Рис. 2.** Концентрация норадреналина в мозге, плазме крови, надпочечниках, органе Цукеркандля (ОЦ), сердце и 12-и перстной кишке (12-пк) через 48 ч после стереотаксического введения 0.5 мкг анти-ДБГ сапорина в мозг 2-х дневных крысят. \*  $P < 0.05$ , различия между предыдущим и последующим значениями.

ти-ДБГ-сапорина в боковые желудочки мозга должно оказать действие только на НА-ергические нейроны, однако в виду отсутствия ГЭБ нельзя было исключить диффузию нейротоксина в кровь, и, как следствие, его действие на НА-синтезирующие клетки в периферических органах. В качестве контроля влияния нейротоксина на периферические источники НА мы использовали двенадцатиперстную кишку и сердце, обладающие богатой симпатической иннервацией.

В предварительных экспериментах сначала был проведен подбор дозы токсина, которая бы вызывала гибель значительной части НА-их нейронов в

мозге, однако при диффузии в кровь не вызывала бы гибель НА-синтезирующих хромаффинных клеток. Нами была выбрана доза 0.5 мкг, т.к. по данным литературы эта доза вызывала значительное снижение концентрации НА в мозге (Wrenn et al., 1996). Далее необходимо было выбрать время после введения токсина в подобранной дозе для измерения у животных содержания НА в периферических НА-синтезирующих органах и в крови. В этом случае мы могли опираться только на собственные данные по действию другого нейротоксина – 6-ГДА (Зубова и др., 2015a).



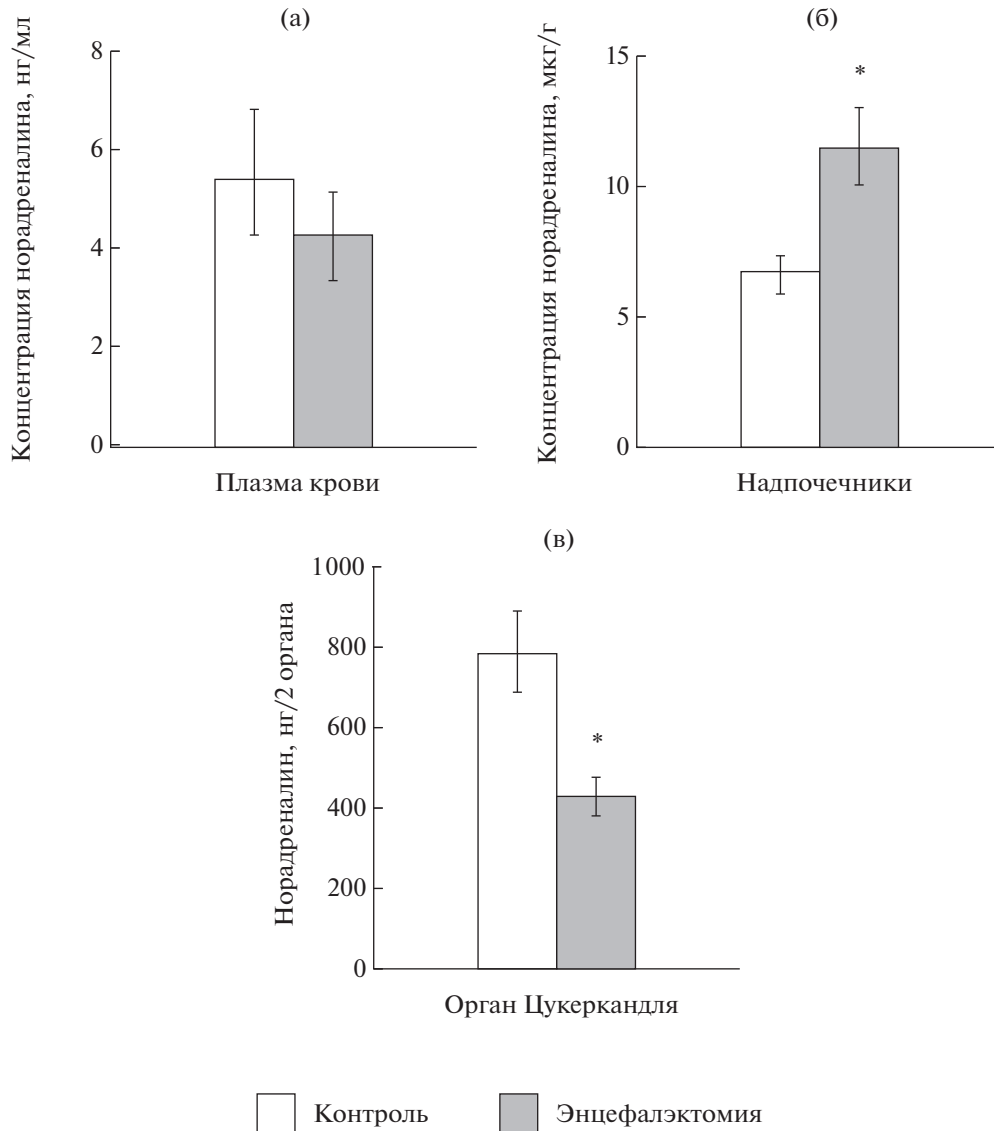
**Рис. 3.** Концентрация норадреналина в мозге, плазме крови, надпочечниках, органе Цукеркандля (ОЦ), сердце и 12-й перстной кишке (12-пк) через 72 ч после стереотаксического введения 0.5 мкг анти-ДБГ сапорина в мозг 2-х дневных крысят. \*  $P < 0.05$ , различия между предыдущим и последующим значениями.

Оказалось, что через 24 часа после введения анти-ДБГ-сапорина в боковые желудочки мозга концентрация НА не изменялась нигде по сравнению с контролем, тогда как ранее при введении 6-ГДА мы обнаруживали резкое снижение в мозге и плазме крови. По-видимому 24-х часов не достаточно для эффекта анти-ДБГ-сапорина, т.к. сапорин действует через рибосомы, нарушая синтез белков в клетках, а 6-ГДА действует через митохондрии, вызывая окислительный стресс и быструю гибель клетки.

Значительное снижение концентрации НА в мозге мы наблюдали через 48 ч после введения нейротоксина и в это время в периферических органах изменений не произошло. Это означает,

что именно через 48 ч нейротоксин избирательно разрушил норадренергические нейроны и не затронул синтез НА в других клетках. При этом концентрация НА в плазме крови снизилась.

Ранее через 72 ч после введения другого нейротоксина — 6-ГДА — на фоне резкого снижения концентрации НА в мозге мы не обнаружили изменений в крови и предположили, что в ответ на выключение мозгового источника НА в крови в течение трех дней, прошедших после введения нейротоксина, произошло компенсаторное выделение НА из других источников — хромаффинных клеток надпочечников и ОЦ, в результате чего концентрация НА в крови не изменилась (Зубова и др., 20156). В данной работе через 72 ч



**Рис. 4.** Концентрация норадреналина в плазме крови, надпочечниках и содержании в органе Цукеркандля (ОЦ) через 72 ч после энцефалэктомии 18-и дневных плодов *in utero*. \*  $P < 0.05$ , различия между энцефалэктомированными и ложнооперированными (контроль плодами).

после введения анти-ДБГ-сапорина концентрация НА в плазме крови даже повысилась, в надпочечниках – выросла, а в ОЦ – снизилась.

Описанные выше изменения наблюдались после рождения, поэтому нам представлялось важным оценить, происходят ли подобные изменения в органах-источниках НА и в пренатальном периоде, в активной фазе морфогенеза. Поскольку технически невозможно стереотаксически ввести ингибитор синтеза катехоламинов в мозг плодов *in utero*, как мы это делали у неонатальных крыс, в данной работе мы проводили энцефалэктомию плодов крыс на Э18 с последующей оценкой через три дня изменения концентрации НА в периферической крови, надпочечниках и ОЦ по

сравнению с ложнооперированными плодами. Оказалось, концентрация НА в плазме крови энцефалэктомированных плодов не изменилась, тогда как в надпочечниках концентрация НА повысилась, а в ОЦ – снизилась. В ранее проведенных нами работах энцефалэктомия плодов *in utero* приводила к снижению концентрации дофамина (ДА) и гонадотропин-рилизинг гормона (ГРГ) в периферической крови у плодов крыс (Ugrumov, 2010). Это расхождение с нашими предыдущими работами, вероятно, обусловлено тем, что основным источником ДА и ГРГ, содержащихся в периферической крови до закрытия ГЭБ, является мозг, в то время как НА секретируется не только мозгом, но периферической симпато-адренало-

вой системой и вне надпочечниковой хро-маффинной тканью. В этом случае в ответ на выключение мозгового источника НА в течение трех дней, прошедших после энцефалэктомии плодов, скорее всего произошло компенсаторное выделе-ние НА из периферических источников, о чем сви-детельствует изменение концентрации НА в над-почечниках и органе Цукеркандля.

Такие разнонаправленные изменения концен-трации НА в надпочечниках и ОЦ после выклю-чения синтеза НА в мозге могут быть связаны с особенностями секреции НА в надпочечниковой и вне надпочечниковой хромаффинной ткани. Так как содержание НА в ткани это суммарный по-казатель его синтеза и выделения, то повышение концентрации НА в надпочечниках свидетельствует о превалировании синтеза НА над его выделением в этой ткани. Снижение содержания НА в ОЦ после введения анти-ДБГ-сапорина скорее всего связано с тем, что скорость выделения из этого органа прева-лирует над скоростью синтеза НА.

НА играет критическую (жизненно важную) роль в течение перинатального периода развития и важность поддержания тонкого баланса катехо-ламинов в процессе перинатального развития хо-рошо изучена (Nguyen et al., 2001; Kinney, Thach, 2009). У большинства животных и у крыс, в част-ности, симпатическая иннервация чревным нер-вом периферических источников НА отсутствует до 7-го дня жизни. Поэтому регуляция синтеза и выделения НА из хромаффинных клеток надпо-чечников и парагангиев (ОЦ) в этот период раз-вития может осуществляться благодаря эндо-кринному негативному feedback контролю через существующие адренорецепторы (Bournaud et al., 2007; Moura et al., 2006).

Можно полагать, что снижение концентрации НА мозге, вызванное в наших экспериментах вы-ключением синтеза НА в мозге, привело через 48 ч к снижению НА в плазме крови, а затем через еще че-рез 24 ч (т.е. в целом через 72 ч после операции) к компенсаторному повышению секреции НА други-ми источниками НА (н/п, ОЦ). В результате уровень НА в крови вернулся к физиологической норме.

Для изучения конкретных молекулярных ме-ханизмов взаимной гуморальной регуляции эн-докринных источников норадреналина необхо-димо проведение дальнейших исследований их секреторной активности.

Таким образом, на моделях хронического вы-ключения синтеза НА в мозге крыс в пре- и неона-тальном периодах развития показано изменение секреторной активности периферических источни-ков НА, что, по-видимому, способствует поддержа-нию физиологически активной концентрации НА в общей системе циркуляции. Полученные данные свидетельствуют о гуморальной взаимосвязи вре-

менных и постоянных источников норадреналина в перинатальном периоде онтогенеза.

Работа поддержана грантом РФФ № 14-15-01122.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Зубова Ю.О., Бондаренко Н.С., Сапронова А.Я., Угрю-мов М.В. Секреция норадреналина из мозга в об-щую систему циркуляции в онтогенезе у крыс // Нейрохимия. 2015а. Т. 32. № 2. С. 116–122.
- Зубова Ю.О., Бондаренко Н.С., Сапронова А.Я., Угрю-мов М.В. Моделирование хронического избира-тельного выключения синтеза норадреналина в го-ловном мозге неонатальных крыс // ДАН. 2015б. Т. 461. № 5. С. 608–611.
- Угрюмов М.В. Механизмы нейроэндокринной регуля-ции. М.: Наука, 1999. 236 с.
- Mitskevich M.S., Rummyantseva O.N., Proshlyakova E.V. // Sov. J. Devel. Biol. 1970. V. 1. P. 466–470.
- Barker D.J. Fetal programming of coronary heart disease // Trends Endocrinol. Metab. 2002. V. 13. P. 364–368.
- Bellinger D.L., Lorton D., Felten S.Y., Felten D.L. Innervation of lymphoid organs and implications in develop-ment, aging, and autoimmunity // International J. Im-munopharmacology. 1992. V. 14. № 3. P. 329–344.
- Berger-Sweeney J., Hohmann C.F. Behavioral consequences of abnormal cortical development: insights into devel-opmental disabilities // Behav. Brain Res. 1997. V. 86. P. 121–142.
- Blanchi B.C., Sieweke M.H. Transcription factor control of central respiratory neuron development // In: Genetic Basis for Respiratory Control Disorders. Claude Gaultier Ed. New York: Springer, 2008. P. 191–221.
- Bournaud R., Hidalgo J., Yu H., Girard E., Shimahara T. Catecholamine secretion from rat foetal adrenal chro-maffin cells and hypoxia sensitivity // Pflügers Archiv-European J. Physiology. 2007. V. 454. P. 83–92.
- Coradazzi M., Gulino R., Garozzo S., Leanza G. Selective le-sion of the developing central noradrenergic system: short- and long-term effects and reinnervation by nor-adrenergic-rich tissue grafts // J. Neurochem. 2010. V. 114. P. 761–771.
- Goldstein D.S., Eisenhofer G., Kopin I.J. Sources and signif-icance of plasma levels of catechols and their metabo-lites in humans // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2003. V. 305. P. 800–811.
- Hildreth V., Anderson R.H., Henderson D.J. Autonomic in-nervation of the developing heart: origins and function // Clin. Anat. 2009. V. 22. P. 36–46.
- Huber K., Kalcheim C., Unsicker K. The development of the chromaffin cell lineage from the neural crest // Auton. Neurosci. 2009. V. 151. P. 10–16.
- Kinney H.C., Thach B.T. The sudden infant death syndrome // N. Engl. J. Med. 2009. V. 361. P. 795–805.
- Kreider M.L., Seidler F.J., Cousins M., Tate C.A., Slotkin T.A. Transiently overexpressed  $\alpha_2$ -adrenoceptors and their control of DNA synthesis in the developing brain // Brain Res. Dev. Brain Res. 2004. V. 152. P. 233–239.
- Lauder J.M. Neurotransmitters as growth regulatory sig-nals: role of receptors and second messengers // Trends Neurosci. 1993. V. 16. P. 233–240.
- Moore R.Y., Bloom F.E. Central catecholamine neuron sys-tems: anatomy and physiology of the norepinephrine



- and epinephrine systems // *Annu. Rev. Neurosci.* 1979. V. 2. P. 113–168.
- Moura E., Afonso J., Hein L., Vieira-Coelho M.A.  $\alpha$ 2-Adrenoceptor subtypes involved in the regulation of catecholamine release from the adrenal medulla of mice // *Brit. J. Pharmacol.* 2006. V. 149. P. 1049–1058.
- Nedergaard J., Herron D., Jacobsson A., Rehnmark S., Cannon B. Norepinephrine as a morphogen? its unique interaction with brown adipose tissue // *Int. J. Dev. Biol.* 1995. V. 39. P. 827–837.
- Nguyen L., Rigo J.M., Rocher V., Belachew S., Malgrange B., Rogister B., Leprince P., Moonen G. Neurotransmitters as early signals for central nervous system development // *Cell. Tissue Res.* 2001. V. 305. P. 187–202.
- Schober A., Parlato R., Huber K., Kinscherf R., Hartleben B., Huber T.B., Schütz G., Unsicker K. // *J. Neuroendocrinol.* 2013. V. 25. P. 34–47.
- Tank W.A., Wong L.D. Peripheral and central effects of circulating catecholamines // *American Physiological Society. Compr Physiol.* 2015. V. 5. P. 1–15.
- Thomas G.B., Cummins J.T., Smythe G., Gleeson R.M., Dow R.C., Fink G., Clarke I.J. Concentrations of dopamine and noradrenaline in hypophysial portal blood in the sheep and the rat // *J. Endocrinol.* 1989. V. 121. P. 141–147.
- Thomas S.A., Matsumoto A.M., Palmiter R.D. Noradrenaline is essential for mouse fetal development // *Nature.* 1995. V. 374. P. 643–646.
- Tishler A. The rat adrenal medulla // *Toxicologic Pathology.* 1989. V. 17. P. 330–332.
- Tomlinson A., Coupland R.E. The innervation of the adrenal gland. IV. Innervation of the rat adrenal medulla from birth to old age. A descriptive and quantitative morphometric and biochemical study of the innervation of chromaffin cells and adrenal medullary neurons in Wistar rats // *J. Anat.* 1990. V. 169. P. 209–236.
- 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. V. 348. P. 78–86.
- Ugrumov M.V., Saprionova A.Y., Melnikova V.I., Proshlyakova E.V., Adamskaya E.I., Lavrentieva A.V., Nasirova D.I., Babichev V.N. Brain is an important source of GnRH in general circulation in the rat during prenatal and early postnatal ontogenesis // *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 2005. V. 141. P. 271–279.
- Viemari J.C., Bévengut M., Burnet H., Coulon P., Pequignot J.M., Tiveron M.C., Hilaire G. Phox2a gene, A6 neurons, and noradrenaline are essential for development of normal respiratory rhythm in mice // *J. Neurosci.* 2004. V. 24. P. 928–937.
- Wiley R., Kline R. Neuronal lesioning with axonally transported toxins // *J. Neuroscience Methods.* 2000. V. 103. P. 73–82.
- Wrenn C., Picklo M., Lappi D., Robertson D., Wiley R. Central noradrenergic lesioning using anti-DBHsaporin: anatomical findings // *Brain Research.* 1996. V. 740. P. 175–184.
- Zubova Yu., Nasyrova D., Saprionova A., Ugrumov M. Brain as an endocrine source of circulating 5-hydroxytryptamine in ontogenesis in rats // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2014. V. 393. P. 92–98.

## Reciprocal Humoral Regulation of Endocrine Norepinephrine Sources in Perinatal Development of Rats

Y. O. Nikishina<sup>a</sup>, A. R. Murtazina<sup>a</sup>, A. Ya. Saprionova<sup>a</sup>, V. I. Melnikova<sup>a</sup>,  
N. S. Bondarenko<sup>a</sup>, and M. V. Ugrumov<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, 119334, Moscow, Russia

e-mail: anna\_saprionova@mail.ru

<sup>b</sup>Higher School of Economy National Research University, Moscow, Russia

e-mail: mugrumov@mail.ru

Received December 9, 2016; in final form, April 8, 2016

The goal of the present study was to verify our hypothesis of humoral interaction between the norepinephrine secreting organs in the perinatal period of ontogenesis that is aimed at the sustaining of physiologically active level of norepinephrine in blood. The objects of the study were the transitory organs, such as brain, Zuckerkandl's organ, and adrenals, the permanent endocrine organ of rats that releases norepinephrine into the bloodstream. To reach this goal, we assessed the adrenal secretory activity (norepinephrine level) and activity of the Zuckerkandl's organ under the conditions of destructed noradrenergic neurons of brain caused by (1) their selective death induced by introduction of a hybrid molecular complex, which consisted of antibodies against dopamine- $\beta$ -hydroxylase (DBH) conjugated with saporin cytotoxin (anti-DBH-saporin) into the encephalocoels of neonatal rats; and (2) microsurgical in utero destruction of embryo's brain (in utero encephalotomy). It was observed that 72 h after either pharmacological or microsurgical norepinephrine synthesis turn off in the newborn rat's brain, the level of norepinephrine was increased in adrenals and, conversely, decreased in the Zuckerkandl's organ. Therefore, the experiments with model chronic turn off on norepinephrine synthesis in prenatal and early postnatal rat's brain revealed changes in the secretory activity of peripheral norepinephrine sources. This, apparently, favors the sustaining of physiologically active norepinephrine level in the bloodstream.

**Keywords:** norepinephrine, hematoencephalic barrier, ontogenesis, brain, adrenals, Zuckerkandl's organ, bloodstream, neurotoxin, rat