

УДК 577.175.829

ИЗМЕНЕНИЕ СЕКРЕТОРНОЙ АКТИВНОСТИ ОРГАНОВ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ НОРАДРЕНАЛИН, ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ ЕГО СИНТЕЗА В МОЗГЕ НЕОНАТАЛЬНЫХ КРЫС

© 2017 г. А. Р. Муртазина^а, Л. К. Дильмухаметова^а, Ю. О. Никишина^а,
А. Я. Сапронова^{а, *}, Е. В. Волина^а, М. В. Угрюмов^{а, б}

^аИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН
119334, Москва, ул. Вавилова, 26

^бНациональный исследовательский университет “Высшая школа экономики”
101000, Москва, ул. Мясницкая 20

*E-mail: anna_sapronova@mail.ru

Поступила в редакцию 05.11.2016 г.

Окончательный вариант получен 10.04.2017 г.

Исследование посвящено изучению гуморального взаимодействия органов – источников важнейшего морфогенетического фактора – норадреналина (НА) в общей системе циркуляции у крыс в неонатальном периоде развития. В качестве одного из механизмов такого взаимодействия мы рассматривали изменение синтеза НА в центральных и периферических органах при выключении его синтеза в мозге у неонатальных крыс. С этой целью в мозге, надпочечниках и органе Цукеркандля определяли уровень экспрессии генов и содержание ферментов синтеза НА – тирозингидроксилазы (ТГ) и дофамин-β-гидроксилазы (ДБГ). Выключение синтеза НА при разрушении норадренергических нейронов вызывали введением в желудочки мозга неонатальных крыс анти-ДБГ-сапориона – антител против дофамин-β-гидроксилазы, связанных с цитотоксином сапорином. Содержание мРНК ТГ и ДБГ в органах определяли с помощью ПЦР в реальном времени, содержание белков ферментов – методом Вестерн-блоттинга. Показано, что выключение синтеза НА в мозге двухдневных животных через 48 ч приводит к резкому повышению содержания мРНК ТГ и ДБГ в надпочечниках и органе Цукеркандля при сохранении содержания обоих ферментов на уровне контроля. Эти данные свидетельствуют о компенсаторном усилении экспрессии генов ферментов синтеза НА на уровне транскрипции в результате гуморального взаимодействия центральных и периферических источников НА в неонатальном периоде онтогенеза.

Ключевые слова: норадреналин, мозг, надпочечники, орган Цукеркандля, общая система циркуляции, иммунотоксин, онтогенез, крыса

DOI: 10.7868/S0475145017050056

ВВЕДЕНИЕ

На всех этапах онтогенеза жизнедеятельность организма и сохранение гомеостаза обеспечивается эндогенными химическими сигналами. К таким сигнальным молекулам, обладающим наиболее широким спектром физиологического действия во взрослом и развивающемся организме, относится норадреналин (НА). У взрослых животных НА оказывает кратковременное обратимое влияние на клетки и органы-мишени, а в развивающемся организме – еще и долгосрочное необратимое “морфогенетическое” влияние в критические периоды морфогенеза (Lauder, 1993; Nguyen et al., 2001).

НА синтезируется в нейронах головного мозга, в симпатических ганглиях и в хромоаффинных клетках мозгового вещества надпочечников и параганглиев. В перинатальном периоде развития у

крыс все эти органы являются источниками НА в общей системе циркуляции (Moore and Bloom, 1979; Tischler, 1989; Угрюмов, 1999; Goldstein et al., 2003; Huber et al., 2009; Никишина и др., 2016). В это время концентрация НА в периферической крови поддерживается на уровне, сравнимом с его уровнем в портальной системе циркуляции взрослых животных, т.е. она достаточна для регуляции функций органов-мишеней (Thomas et al., 1989; Зубова и др., 2015а). При этом каждый из источников НА вносит определенный вклад в поддержание этой концентрации (Муртазина и др., 2016). В это же время – у крыс до 7-го дня жизни отсутствует симпатическая регуляция как самих источников НА, так и их мишеней (сердце, легкие, лимфоидные органы) (Seidler, Slotkin, 1985; Tomlinson, Coupland, 1990; Bellinger et al., 1992; Hildreth et al., 2009). При этом функционирует не

нервная, а гуморальная регуляция. Согласно доминирующей в настоящее время концепции формирования нейроэндокринных регуляций в онтогенезе, периферические эндокринные железы, включая параганглии, функционируют автономно до окончательного созревания мозга и становления гипоталамо-гипофизарного контроля этих желез. Однако недавно нами были получены данные, свидетельствующие в пользу нашего предположения о гуморальном (эндокринном) взаимодействии между органами — источниками НА в онтогенезе через специфические ауторецепторы, экспрессия генов которых обнаруживается в нервных и хромаффинных клетках уже в пренатальном периоде развития (Fujinaga, Scott, 1997). Ранее мы показали, что 1) мозг в неонатальном периоде развития до формирования гематоэнцефалического барьера является источником НА в периферической крови; 2) ингибирование синтеза НА в мозге приводит к снижению концентрации НА в периферической крови и изменению секреторной активности — содержания и выделения НА — его периферических источников (Зубова и др., 2015а, 2015б; Никишина и др., 2016; Бондаренко и др., 2017).

Секреторная активность органов — источников НА определяется их способностью синтезировать, запасать и выделять НА.

Целью данной работы было изучение молекулярно-генетических механизмов синтеза НА в центральных и периферических органах — источниках НА при ингибировании его синтеза в мозге у неонатальных крыс.

В задачи работы входило оценить в мозге, надпочечниках и органе Цукеркандля у неонатальных крыс:

1. Уровень экспрессии генов ферментов синтеза НА (тирозингидроксилазы — ТГ и дофамин-β-гидроксилазы — ДБГ).
2. Содержание ферментов синтеза НА (ТГ и ДБГ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Работа проведена на самцах крыс популяции Вистар на 2-й и 4-й дни жизни. День рождения крысят считали первым днем жизни. Крыс содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к пище и воде.

Хроническое ингибирование синтеза НА в мозге крыс. Для разрушениянорадренергическихнейронов крысам на 2-й день жизни в желудочки мозга вводили анти-ДБГ-сапорин — гибридный молекулярный комплекс, состоящий из антител против дофамин-β-гидроксилазы, связанных с цитотоксином сапорином (Wiley, Kline, 2000; Coradazzi, 2010). Всего было использовано 28 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 тефлоновой 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.

Взятие и обработка материала. У крыс через 48 ч после внутри желудочковых введений на 2-й день жизни анти-ДБГ-сапорина под наркозом (хлоралгидрат 400 мг/кг, Sigma, США) собирали мозг (одно полушарие), надпочечники, орган Цукеркандля. На пробу приходился материал от одного животного.

Содержание мРНК ТГ и ДБГ в органах определяли с помощью ПЦР в реальном времени, которое проводили на автоматическом амплификаторе 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) с использованием смеси qPCRmix-HS SYBR + ROX (Fermentas, США) и специфических олигонуклеотидов (Евроген, Россия; Литех, Россия). Смысловая последовательность к ТГ 5'-AGTCTGGCCTTCCGCGT-GTTTCAA-3'; антисмысловая последовательность 5'-CCCCAGAGATGCAAGTCCAATG-3', смысловая последовательность к ДБГ 5'-GCC-GAAATCTGGAATCCGCATCTT-3'; антисмысловая последовательность 5'-TGGGGGCTGTAGT-GGTTGTCTCTG-3. Значения экспрессии генов ферментов нормировали на экспрессию гена “домашнего хозяйства” GAPDH. Уровень экспрессии гена GAPDH определяли с использованием праймеров: смыслового — 5'-CTGACATGCCG-CCTGGAGAAA-3' и антисмыслового — 5'-TGG-AAGAATGGGAGTTGCTGTTGA-3'. Расчет относительной экспрессии гена проводили методом ΔΔCt с учетом эффективности ПЦР, который определяли методом построения стандартных кривых (Bookout et al., 2006).

Содержание ТГ и ДБГ в органах определяли методом Вестерн-блоттинга. ОЦ гомогенизировали в RIPA-буфере (50 мМ Трис (pH 8), 150 мМ NaCl, 0.1% SDS, 1% NP40) с помощью ультразвукового гомогенизатора (Labsonic M “Sartorius AG”, Германия) и центрифугировали при 2000 g и 4°C в течение 20 мин. В супернатантах определяли содержание белка методом “BCA”. Затем к 100 мкл супернатанта добавляли 5 мкл β-меркаптоэтанола и кипятили 5 мин. Полученные осветленные гомогенаты использовали для Вестерн-блоттинга. Электрофорез выполняли по методу Лэммли (La-

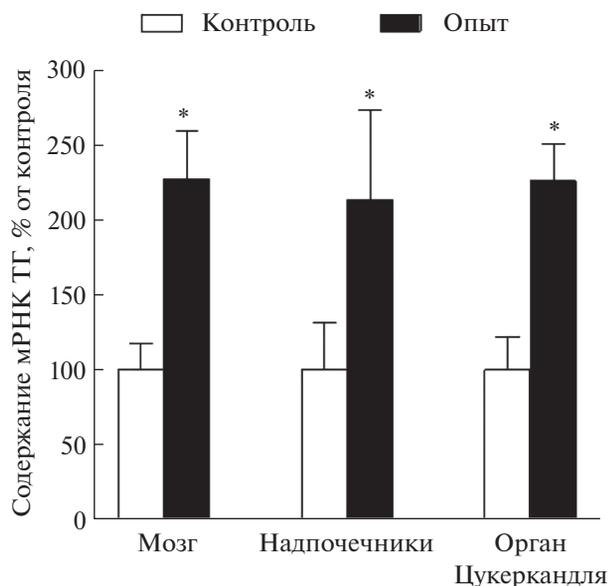


Рис. 1. Содержание мРНК тирозингидроксилазы (ТГ) в мозге, надпочечниках и органе Цукеркандля через 48 ч после стереотаксического введения 0.5 мкг анти-ДБГ-сапорина в мозг крысам на второй день жизни. * $p < 0.05$ между контролем и опытом.

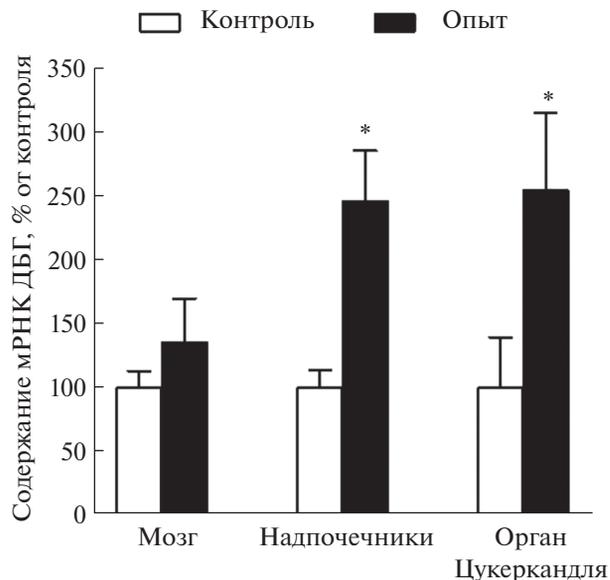


Рис. 2. Содержание мРНК дофамин- β -гидроксилазы (ДБГ) в мозге, надпочечниках и органе Цукеркандля через 48 ч после стереотаксического введения 0.5 мкг анти-ДБГ-сапорина в мозг крысам на второй день жизни. * $p < 0.05$ между контролем и опытом.

mml, 1970). На дорожку наносили равное количество белка (20 мкг белка на ТГ и 40 мкг ДБГ). В качестве маркеров молекулярных масс использовали коммерческий препарат (Thermo Scientific PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, США). Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли в течение 1 ч 15 мин при 290 мА в буфере для переноса (25 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 192 мМ глицин, 20% этанол). Качество переноса оценивали после окрашивания Понсо С. Мембраны отмывали от красителя в ТNТ буфере (10 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 150 мМ NaCl, 0.1% Tween 20). Для предотвращения неспецифической сорбции антител мембраны инкубировали в блокирующем растворе (5% обезжиренное молоко, 0.1% Tween-20) в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем в течение 10 часов с моноклональными антителами мыши к ТГ (1 : 1500) (Sigma, США) и поликлональными антителами овцы к ДБГ (1 : 1000) (Abcam, США) при 4°C. По окончании инкубации мембраны несколько раз промывали в ТNТ буфере и инкубировали со вторыми антителами (конъюгированными с пероксидазой хрена) к IgG мыши (1 : 50000) и овцы (1 : 50000) (Thermo Scientific, США) в течение 2 ч при 20°C. После инкубации со вторыми антителами мембраны несколько раз промывали в ТNТ буфере и 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.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экспрессия генов ТГ и ДБГ в мозге, надпочечниках и ОЦ через 48 ч после стереотаксического введения анти-ДБГ-сапорина в мозг двухдневных крыс. Согласно полученным нами результатам через 48 ч после введения анти-ДБГ-сапорина в мозг двухдневных крыс экспрессия гена ТГ относительно контрольного гена GAPDH, была на 56% выше, чем в контроле, в надпочечниках – на 53% выше, чем в контроле, а в органе Цукеркандля на 55.8% выше, чем в контроле (рис. 1).

Содержание мРНК ДБГ в мозге после введения анти-ДБГ-сапорина в мозг двухдневных крыс не изменилось по сравнению с контролем, в надпочечниках возросло на 59.4%, а в органе Цукеркандля – на 60.8% (рис. 2).

Содержание ТГ и ДБГ в мозге, надпочечниках и ОЦ через 48 ч после стереотаксического введения анти-ДБГ-сапорина в мозг двухдневных крыс. Содержание белка ТГ после введения анти-ДБГ-сапорина в мозг двухдневных крыс не изменилось

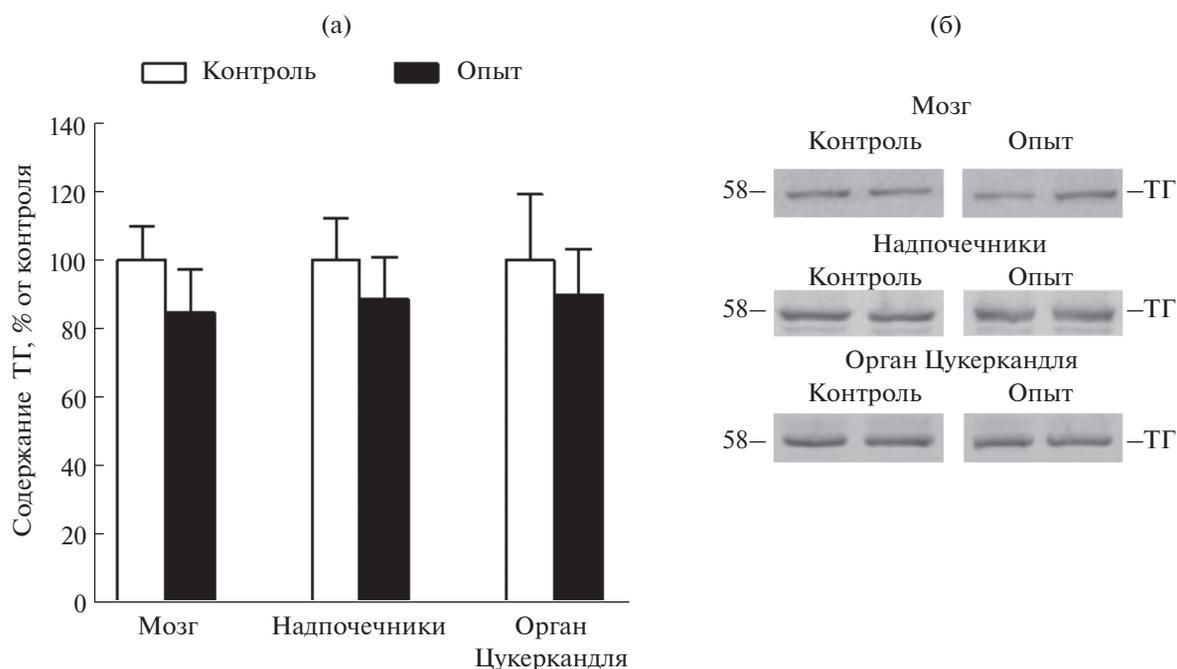


Рис. 3. Содержание тирозингидроксилазы (ТГ) в мозге, надпочечниках, в органе Цукеркандля (а, б) через 48 ч после стереотаксического введения 0.5 мкг анти-ДБГ-сапорина крысам на второй день жизни.

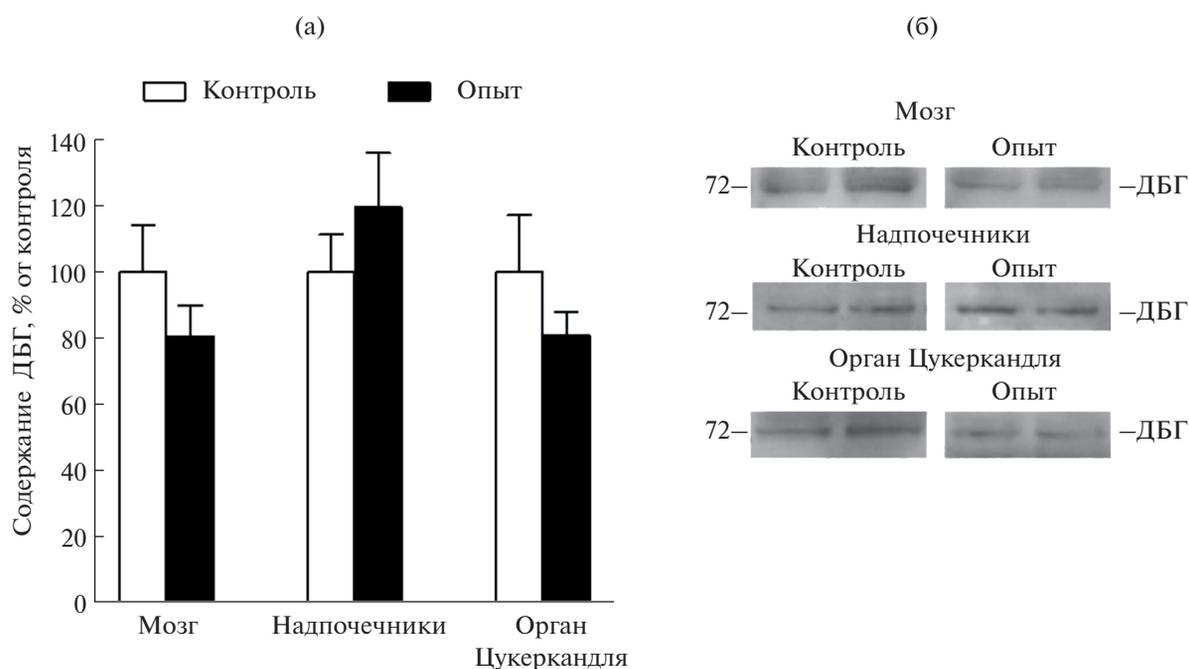


Рис. 4. Содержание дофамин- β -гидроксилазы (ДБГ) в мозге, надпочечниках, в органе Цукеркандля (а, б) через 48 ч после стереотаксического введения 0.5 мкг анти-ДБГ-сапорина крысам на второй день жизни.

по сравнению с контролем ни в мозге, ни в надпочечниках, ни в органе Цукеркандля (рис. 3).

Содержание белка ДБГ после введения анти-ДБГ-сапорина в мозг двухдневных крыс не изменилось по сравнению с контролем ни в мозге, ни в надпочечниках, ни в органе Цукеркандля (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Поддержание физиологически активной концентрации НА в плазме крови является необходимым условием для нормального развития организма. Нарушение метаболизма НА в перинатальном периоде развития приводит к необратимым

изменениям, часто не совместимым с жизнью (Thomas et al., 1995; Viemari et al., 2004; Hildreth et al., 2009; Kinney, Thach, 2009). В данной работе мы постарались приблизиться к пониманию механизмов пластичности органов-источников НА, обеспечивающих гомеостаз НА. С этой целью мы оценивали молекулярно-генетические механизмы синтеза НА в центральных и периферических органах-источниках НА при ингибировании его синтеза в мозге у крыс в неонатальном периоде развития. В качестве показателей, характеризующих синтез НА, мы рассматривали экспрессию генов и содержание 2-х основных ферментов — ТГ и ДБГ. ТГ является скоростью лимитирующим ферментом всей цепи реакций превращения тирозина в НА, ДБГ — является последним ферментом синтеза в рассматриваемой цепи реакций.

Для выключения синтеза НА в норадренергических нейронах мозга использовали анти-ДБГ-сапорин, относящийся к аксонально транспортируемым иммунотоксинам. При введении в желудочки мозга он диффундирует по нейрональной поверхности и связывается с молекулой-мишенью (дофамин- β -гидроксилаза) на плазматической мембране аксонов. Затем этот комплекс захватывается в клетку эндоцитозом и после освобождения и поступления токсина в цитоплазму в течение нескольких часов продвигается по аксону к телу нейрона, еще какое-то время (часы) необходимо для поступления его к рибосомам, ингибирования синтеза белка и нарушения функции нейрона. Гибель же нейронов продолжается от нескольких дней до двух недель (Wiley, Kline, 2000).

Ранее мы показали, что через 48 ч после введения анти-ДБГ-сапорина в желудочки мозга крыс на 2-й день жизни содержание НА в мозге снизилось в 3 раза, а в периферических органах не изменилось, т.е. именно через 48 ч токсин избирательно разрушил норадренергические нейроны мозга и не затронул синтез НА в других клетках. При этом концентрация НА в плазме крови снизилась в 1.5 раза (Никишина и др., 2016). Через 72 ч на этой же модели изменилась секреторная активность периферических органов, синтезирующих НА (содержание и выделение НА), что сопровождалось восстановлением уровня НА в плазме крови (Никишина и др., 2016; Бондаренко и др., 2017). Поскольку содержание НА в ткани это результирующая синтеза и выделения, в данной работе мы оценивали синтез НА в мозге и периферических источниках при выключении его в мозге.

При оценке экспрессии генов основных ферментов синтеза НА — ТГ и ДБГ в мозге через 48 ч после введения анти-ДБГ-сапорина в мозг мы обнаружили значительное увеличение содержания мРНК ТГ и сохранение содержания мРНК ДБГ на уровне контроля, однако содержание ферментов не изменилось. Учитывая, что число ДБГ-иммуно-

позитивных нейронов было снижено после введения анти-ДБГ-сапорина на 32% (Бондаренко и др., 2017), мы полагаем, что в сохранившихся норадренергических нейронах продолжается экспрессия гена ДБГ, с чем и связано отсутствие изменения содержания мРНК ДБГ по сравнению с контролем.

Экспрессию ферментов синтеза НА мы определяли в целом мозге, который включает системы, как норадренергические, так и дофаминергические. Известно, что терминали аксонов норадренергических нейронов голубого пятна обнаруживаются в структурах среднего мозга (Mejías-Arante et al., 2009) и НА может оказывать ингибирующее действие на секрецию дофамина через альфа 2-адренорецепторы (Guiard et al., 2008). Учитывая такое воздействие НА на дофаминергические нейроны можно предположить, что при ингибировании синтеза НА, происходит увеличение экспрессии ТГ как скорость лимитирующего фермента в дофаминергических нейронах.

В надпочечниках через 48 ч после ингибирования синтеза НА в мозге двухдневных крыс уровень мРНК ТГ и ДБГ резко возростал, тогда как содержание ферментов не изменилось. Предполагается, что усиление экспрессии генов основных ферментов синтеза НА является началом компенсаторной реакции усиления их синтеза в ответ на снижение уровня НА в периферической крови. Это предположение подтверждается и тем, что через 72 ч после введения в желудочки мозга анти-ДБГ-сапорина содержание НА в надпочечниках и спонтанное выделение НА достоверно увеличиваются (Никишина и др., 2016). Все это вместе свидетельствует о компенсаторном усилении синтеза НА в надпочечниках при ингибировании его синтеза в мозге.

Наряду с оценкой синтеза НА в хромаффинной ткани надпочечников мы также рассматривали синтез НА во вненадпочечниковой хромаффинной ткани, наиболее крупное скопление которой представлено ОЦ. ОЦ достигает максимальной функциональной активности у крыс к третьему дню жизни и далее претерпевает инволюцию к концу второй недели жизни (Schober et al., 2013). Через 48 ч после введения в желудочки мозга анти-ДБГ-сапорина содержание мРНК ТГ и ДБГ резко возросло, а содержание самих ферментов ТГ и ДБГ не изменилось. Интересно, что в предыдущих исследованиях на этой же модели через 72 ч содержание НА в ОЦ было немного снижено по сравнению с контролем, однако при отсутствии изменений в спонтанном выделении изменился характер стимулированного выделения: если в контроле отсутствует реакция ОЦ на K^+ -деполяризацию, то после ингибирования синтеза НА в мозге появляется способность отвечать на стимуляцию (Никишина и др., 2016; Бондаренко и др.,

2017). Можно предположить, что такая же компенсаторная реакция ОЦ в виде усиления экспрессии ферментов синтеза НА наблюдается и в данной работе.

Важно отметить, что ингибирование синтеза НА в мозге через 48 ч привело к росту экспрессии генов ТГ и ДБГ в периферических источниках НА – надпочечниках и ОЦ, в то время как содержание этих ферментов оставалось неизменным. Скорее всего это связано с тем, что изменения на уровне транскрипции происходят гораздо раньше (быстрее), чем изменение на уровне трансляции. Так, в ранее проведенном исследовании четко прослеживался поэтапный ответ периферических источников НА на ингибирование его синтеза в мозге – через 48 ч после введения токсина происходило снижение содержания НА в мозге и концентрации в плазме крови, тогда как в периферических органах содержание НА не менялось. Однако еще через 24 ч (т.е. через 72 ч после введения токсина) происходило компенсаторное восстановление концентрации НА в крови до контрольного уровня и повышение содержания НА в надпочечниках (Никишина и др., 2016). Поэтому мы полагаем, что обнаруженное нами усиление экспрессии генов ферментов синтеза НА – это первый этап такой компенсаторной реакции периферических источников НА, а повышение содержания самих ферментов мы можем увидеть позднее.

Таким образом, в проведенном исследовании показано, что при ингибировании синтеза НА в мозге неонатальных животных резко возрастает экспрессия генов ферментов синтеза НА – ТГ и ДБГ в надпочечниках и органе Цукеркандля, что свидетельствует о компенсаторном усилении экспрессии этих ферментов на уровне транскрипции в результате гуморального взаимодействия источников норадреналина в неонатальном периоде онтогенеза.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-15-01122.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бондаренко Н.С., Дильмухаметова Л.К., Курина А.Ю., Муртазина А.Р., Сапронова А.Я., Сысоева А.П., Угрюмов М.В. Пластичность центральных и периферических источников норадреналина в онтогенезе у крыс // Биохимия. 2017. Т. 82. № 3. С. 519–527.
- Зубова Ю.О., Бондаренко, Н.С., Сапронова А.Я., Угрюмов М.В. Секретия норадреналина из мозга в общую систему циркуляции в онтогенезе у крыс // Нейрохимия. 2015а. Т. 32. № 2. С. 116–122.
- Зубова Ю.О., Бондаренко Н.С., Сапронова А.Я., Угрюмов М.В. Моделирование хронического избирательного выключения синтеза норадреналина в головном мозге неонатальных крыс // ДАН. 2015б. Т. 461. № 5. С. 608–611.
- Муртазина А.Р., Никишина Ю.О., Бондаренко Н.С., Сапронова А.Я., Угрюмов М.В. Сигнальные молекулы в развитии организма: центральные и периферические источники норадреналина в онтогенезе крыс // ДАН – Биохимия, биофизика и молекулярная биология. 2016. Т. 466. № 6. С. 730–733.
- Никишина Ю.О., Муртазина А.Р., Сапронова А.Я., Мельникова В.И., Бондаренко Н.С., Угрюмов М.В. Взаимная гуморальная регуляция эндокринных источников норадреналина в перинатальном периоде развития у крыс // Онтогенез. 2016. Т. 47. № 5. С. 287–295.
- Угрюмов М.В. Механизмы нейроэндокринной регуляции. М.: Наука, 1999. 236 с.
- Bellinger D.L., Lorton D., Felten S.Y., Felten D.L. Innervation of lymphoid organs and implications in development, aging, and autoimmunity // International Journal of Immunopharmacology. 1992. V. 14. № 3. P. 329–344.
- Bookout A.L., Cummins C.L., Mangelsdorf D.J., Pesola J.M., Kramer M.F. High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. Curr. Protoc Mol. Biol. 2006 Feb., 2006. Chapter 15. Unit 15.8.
- Coradazzi M., Gulino R., Garozzo S., Leanza G. Selective lesion of the developing central noradrenergic system: short- and long-term effects and reinnervation by noradrenergic-rich tissue grafts // J. Neurochem. 2010. V. 114. P. 761–771.
- Goldstein D.S., Eisenhofer G., Kopin I.J. Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2003. V. 305. P. 800–811.
- Guiard B.P., El Mansari M., Merali Z., Blier P. Functional interactions between dopamine, serotonin and norepinephrine neurons: an *in vivo* electrophysiological study in rats with monoaminergic lesions // International J. Neuropsychopharmacology. 2008. V. 11. P. 625–639.
- Hildreth V., Anderson R.H., Henderson D.J. Autonomic innervation 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.
- Fujinaga M., Scott J.C. Gene expression of catecholamine synthesizing enzymes and β adrenoceptor subtypes during rat embryogenesis // Neuroscience Letters. 1997. V. 231. № 3. P. 108–112.
- Kinney H.C., Thach B.T. The sudden infant death syndrome // N. Engl. J. Med. 2009. V. 361. P. 795–805.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
- Lauder J.M. Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers // Trends Neurosci. 1993. V. 16. P. 233–240.
- Mejías-Aponte C.A., Drouin C., Aston-Jones G. Adrenergic and noradrenergic innervation of the midbrain ventral tegmental area and retrorubral field: prominent inputs from medullary homeostatic centers // J. Neuroscience. 2009. V. 29. P. 3613–3626.
- Moore R.Y., Bloom F.E. Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems // Annu. Rev. Neurosci. 1979. V. 2. P. 113–168.

- 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.
- Seidler F.J., Slotkin T.A. Adrenomedullary function in the neonatal rat: responses to acute hypoxia // *J. Physiology.* 1985. V. 358. P. 1–16.
- 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.
- 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.

Changes in the Secretory Activity of Organs Producing Noradrenaline upon Inhibition of Its Synthesis in Neonatal Rat Brain

A. R. Murtazina¹, L. K. Dilmukhametova¹, Yu. O. Nikishina¹, A. Ya. Sapronova^{1,*}, E. V. Volina¹, and M. V. Ugrumov^{1,2}

¹Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

²National Research University Higher School of Economics, Moscow, 101000 Russia

*e-mail: anna_sapronova@mail.ru

Received November 5, 2016; in final form, April 10, 2017

The study is devoted to investigating the humoral interaction of the organs that are major sources of the morphogenetic factor noradrenaline (noradrenaline) in the general circulation system of rats in the neonatal period of development. The change in the synthesis of noradrenaline in the central and peripheral organs when its synthesis in the brains of neonatal rats is switched off was considered as one of the mechanisms of such interaction. For this purpose, the level of gene expression and the content of enzymes involved in the synthesis of noradrenaline—tyrosine hydroxylase (TH) and dopamine- β -hydroxylase (DBH)—was determined in the brain, adrenal glands, and the organ of Zuckerkandl. The synthesis of noradrenaline after destruction of noradrenergic neurons was switched off by injecting anti-DBH-saporin antibodies against dopamine- β -hydroxylase conjugated to the cytotoxin saporin into the cerebral ventricles of neonatal rats. The content of TH and DBH mRNA in organs was determined by real-time PCR, and the protein content of enzymes was determined by Western blotting. It is shown that, 48 h after switching off the synthesis of noradrenaline in the brain of 2-day-old animals, a sharp increase in TH and DBH mRNA content in adrenal glands and the organ of Zuckerkandl was observed, although the content of both enzymes was retained at the control level. These data indicate a compensatory enhancement of expression of the genes encoding noradrenaline synthesis enzymes at the transcriptional level as a result of humoral interaction of central and peripheral sources of noradrenaline in the neonatal period of ontogeny.

Keywords: noradrenaline, brain, adrenal glands, organ of Zuckerkandl, general circulation system, immunotoxin, ontogeny, rat