

УДК 577.175.82;577.175.328

КООПЕРАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ДОФАМИНА В МЕДИОБАЗАЛЬНОМ ГИПОТАЛАМУСЕ КРЫС КАК КОМПЕНСАТОРНЫЙ МЕХАНИЗМ ПРИ ГИПЕРПРОЛАКТИНЕМИИ

© 2017 А.Ю. Курина*, Т.С. Пронина, Л.К. Дильмухаметова,
Г.В. Малеев, М.В. Угрюмов

*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
119334 Москва, Россия; электронная почта: kurina.anya@gmail.com*

Поступила в редакцию 18.10.16
После доработки 29.11.16

Известно, что дофамин, синтезирующийся в медиобазальном гипоталамусе дофаминергическими нейронами, содержащими два фермента синтеза дофамина – тирозингидроксилазу и декарбоксилазу ароматических L-аминокислот, и в кооперации моноферментными недофаминергическими нейронами, содержащими по одному из этих ферментов, оказывает ингибирующее влияние на секрецию пролактина. Нарушение этого ингибиторного контроля приводит к повышению уровня пролактина в крови и развитию синдрома гиперпролактинемии. У крыс на модели гиперпролактинемии, вызванной введением нейротоксина, вызывающего дегенерацию дофаминергических и норадренергических нейронов, уровень дофамина сначала снижается, что приводит к увеличению концентрации пролактина (стадия декомпенсации), а затем оба показателя восстанавливаются до нормы (стадия компенсации). Однако до сих пор неясен механизм такой компенсации. Цель данной работы – проверка гипотезы о том, что усиление кооперативного синтеза дофамина моноферментными нейронами при гиперпролактинемии является проявлением компенсаторного механизма как частного случая нейропластичности. Вклад кооперативного синтеза на модели гиперпролактинемии и в контроле оценивался по уровню синтеза дофамина и L-диоксифенилаланина (L-ДОФА) – промежуточного продукта синтеза дофамина, при ингибировании переноса L-ДОФА из нейронов, содержащих тирозингидроксилазу, в нейроны, содержащие декарбоксилазу ароматических L-аминокислот. При этом уровень синтеза ДА на стадии декомпенсации не изменялся, а на стадии компенсации был ниже по сравнению с контролем. Наряду со снижением дофамина, на стадии компенсации показано повышение межклеточной концентрации L-ДОФА в среде. Таким образом, компенсация дефицита дофамина при дегенерации дофаминергических нейронов медиобазального гипоталамуса осуществляется за счет усиления кооперативного синтеза дофамина моноферментными нейронами, содержащими по одному из комплементарных ферментов синтеза дофамина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: медиобазальный гипоталамус, нейропластичность, дофамин, норадреналин, L-диоксифенилаланин, 6-гидроксидофамин, ВЭЖХ.

Дофамин (ДА), синтезирующийся в нейронах медиобазального гипоталамуса (МБГ), и выделяющийся в срединном возвышении в гипофизарную портальную систему циркуляции, оказывает ингибирующее влияние на секрецию пролактина лактотрофами гипофиза [1]. Гибель дофаминергических (ДАергических) нейронов МБГ сопровождается синдромом гиперпролактинемии, характеризующимся повышением уровня пролактина в крови, что приводит к нарушению репро-

дуктивной функции организма. ДАергические нейроны обладают двумя ферментами синтеза ДА – тирозингидроксилазой (ТГ), превращающей L-тирозин в L-диоксифенилаланин (L-ДОФА), и декарбоксилазой ароматических L-аминокислот (ДАА), превращающей L-ДОФА в ДА [2, 3, 4]. Ранее нами были получены прямые доказательства того, что ДА, помимо ДАергических нейронов, синтезируется совместно моноферментными нейронами, содержащими по одному из ферментов синтеза ДА – ТГ или ДАА. При этом промежуточный продукт синтеза ДА – L-ДОФА выделяется из нейронов, содержащих только ТГ, в межклеточное пространство, а затем с помощью переносчика нейтральных аминокислот поступает в нейроны, экспрессирующие только ДАА, где и происходит синтез ДА [5, 6].

Принятые сокращения: ДА – дофамин; МБГ – медиобазальный гипоталамус; ДА-ергические – дофаминергические; ТГ – тирозингидроксилаза; L-ДОФА – L-диоксифенилаланин; ДАА – декарбоксилаза ароматических L-аминокислот; 6-ГДА – 6-гидроксидофамин.

* Адресат для корреспонденции.

Для изучения клеточных и молекулярных механизмов развития гиперпролактинемии используют экспериментальные модели, основанные на введении в желудочки мозга 6-гидроксидофамина (6-ГДА) – нейротоксина, вызывающего гибель катехоламинергических (ДАергических и норадренергических) нейронов [7, 8]. На данной модели нами ранее было показано, что на 14-й день после введения 6-ГДА происходит снижение уровня ДА в МБГ и увеличение уровня пролактина в крови, т.е. происходит декомпенсация. Однако уже на 45-й день оба показателя приходят в норму [9], т.е. наблюдается компенсация. Нами была выдвинута гипотеза, что такая компенсация обусловлена проявлением механизмов нейропластичности, в частности усилением кооперативного синтеза ДА моноферментными нейронами.

Таким образом, целью данной работы являлась проверка гипотезы о том, что усиление кооперативного синтеза дофамина моноферментными нейронами при гиперпролактинемии у крыс является проявлением компенсаторного механизма как частного случая нейропластичности. Для этого были поставлены задачи: на 14-й день (стадия декомпенсации) и 45-й день (стадия компенсации) после введения 6-ГДА и в соответствующих контролях при блокировании поступления L-ДОФА в нейроны, экспрессирующие ДАА, оценить синтез L-ДОФА в нейронах, экспрессирующих ТГ, а также вклад моноферментных нейронов в синтез ДА.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Работа проведена на 40 самцах крыс линии Вистар весом 220–250 г. Крысам стереотаксически в боковой желудочек мозга (координаты от брегмы: каудально – 0,8 мм, латерально – 1,5 мм, 3,2 мм от поверхности мозга) [10] вводили по 250 мкг 6-ГДА («Sigma», США) в 15 мкл 0,9%-ного NaCl («Sigma», США) с 0,1% аскорбиновой кислотой («Sigma», США) в экспериментальной группе, а в соответствующем контроле – 0,9%-ный NaCl с 0,1% аскорбиновой кислотой со скоростью 3 мкл/мин в обоих случаях. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к пище и воде и 12-часовом режиме день–ночь. Все манипуляции с животными были проведены в соответствии с национальными и международными этическими требованиями, а также с требованиями комиссии по биоэтике ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН.

Проточная инкубация срезов МБГ. На 14-й и 45-й день после введения нейротоксина или

0,9%-ного NaCl ($n = 10$ для каждой группы) крысы под наркозом (хлоралгидрат 400 мг/кг, «Sigma», США) декапитировали и выделяли мозг. Далее приготавливали 5 вибротомных срезов мозга толщиной 250 мкм с координатами 1,92–3,36 мм каудальнее брегмы с помощью вибратома Vibratome 1000 plus («Sectioning system», Германия) в растворе Кребса–Рингера (NaCl 120 мМ, KCl 4,8 мМ, CaCl₂ 2 мМ, MgSO₄ 1,3 мМ, NaHCO₃ 25 мМ, D-глюкоза 10 мМ, HEPES 2 мМ, аскорбиновая кислота 0,1 мМ («Sigma», США), pH 7,4, 4° С). Из этих вибротомных срезов под контролем бинокулярной лупы выделяли МБГ, делили на две симметричные половины – левую и правую (рис. 1) и помещали в термостатируемые (37° С) проточные камеры объемом 400 мкл, заполненные раствором Кребса–Рингера. Камеры перфузировали с помощью насоса («Ismatec», Германия) с постоянной скоростью потока раствора 100 мкл/мин. В период стабилизации системы в течение первых 40 мин пробы не собирали, затем срезы из правой половины МБГ инкубировали в растворе Кребса–Рингера, а срезы из левой половины – в растворе Кребса–Рингера с добавлением 0,5 мМ L-лейцина («Sigma», США), собирая три последовательные 20-минутные фракции оттекающего раствора. L-лейцин был использован в качестве ингибитора поступления L-ДОФА в моноферментные нейроны, содержащие ДАА, пос-

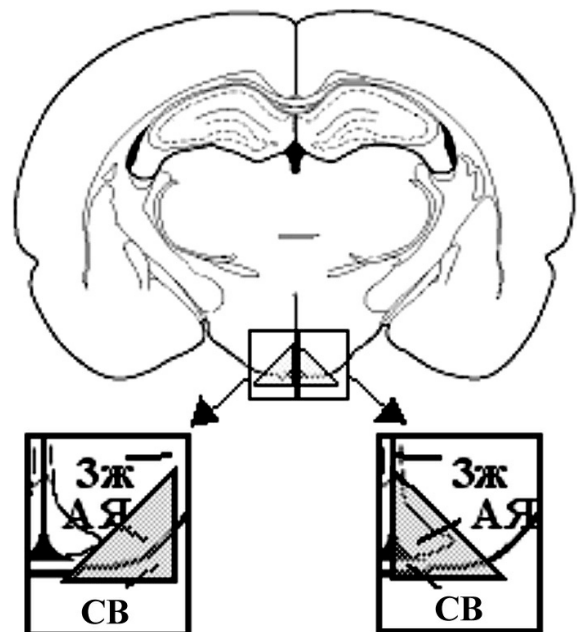


Рис. 1. Схема выделения медиобазального гипоталамуса из вибротомных срезов мозга (от брегмы – 2,3 мм). Обозначения: АЯ – аркуатное ядро, СВ – срединное возвышение, Зж – третий желудочек

кольку он конкурирует с L-ДОФА за связывание с переносчиком больших нейтральных аминокислот. Собранные фракции и срезы после инкубации замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C до определения ДА и L-ДОФА.

Высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимической детекцией (ВЭЖХ-ЭД). В собранных фракциях инкубационной среды и в срезах МБГ определяли концентрацию ДА и L-ДОФА методом ВЭЖХ-ЭД. Ткань гомогенизировали с помощью ультразвукового гомогенизатора Labsonic M («Sartorius», Франция) в 110 мкл $0,1\text{ M HClO}_4$ («Sigma», США) с добавлением 1 нг 3,4-дигидроксипензиламина в качестве внутреннего стандарта. Гомогенаты центрифугировали 10 мин при 4°C и 15 000 g и собирали супернатант. К фракциям инкубационной среды (1 мл) добавляли по 10 мг оксида алюминия («Sigma», США), и полученные образцы инкубировали 15 мин при 4°C со встряхиванием, затем центрифугировали 10 мин при 1200 g и 4°C . К осадку добавляли 100 мкл $0,2\text{ M HClO}_4$, повторно центрифугировали 10 мин при 1200 g, затем собирали супернатант. Разделение моноаминов производили на обратно-фазной 10-сантиметровой колонке с внутренним диаметром 3 мм и наполнителем Reprosil-Pur C 18,5 мкм («Элсико», Россия) при потенциале 850 мВ. Подвижной фазой служил $0,1\text{ M}$ цитратно-фосфатный буфер, содержащий $0,3\text{ mM}$ октансульфоната натрия, $0,1\text{ mM}$ ЭДТА и 12% ацетонитрила (pH 3,0) («Sigma», США). Скорость потока 800 мкл/мин обеспечивалась перистальтическим насосом («Gilson», Франция). Пики ДА и L-ДОФА на хроматограмме идентифицировали по времени выхода веществ в стандартном растворе. Регистрацию и обработку хроматограмм проводили с помощью программы Мультихром v.1.5 («Ampersand Ltd.»,

США). Концентрацию ДА и L-ДОФА рассчитывали методом внутреннего стандарта, используя отношение площадей пиков в стандартной смеси и в образце, с помощью программного обеспечения «Мультихром» (Россия).

Статистика. Нормальное распределение внутри каждой группы проверяли с использованием критериев Шапиро–Уилка и Колмогорова–Смирнова в среде интегрированных программ GraphPad Prism Version 6.0 для Windows («GraphPad Software», США). Полученные данные обрабатывали статистически с помощью *t*-теста Стьюдента. Стандартную ошибку среднего определяли при уровне достоверности 95% ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

14-й день после стереотаксического введения 6-ГДА в эксперименте и 0,9%-ного NaCl в контроле. Концентрация ДА и L-ДОФА в срезах МБГ после инкубации. На 14-й день после введения 6-ГДА (экспериментальная группа) концентрация ДА в срезах МБГ после инкубации в растворе Кребса–Рингера с добавлением L-лейцина снижалась на 48% по сравнению с концентрацией ДА после инкубации в растворе Кребса–Рингера без L-лейцина. После введения 0,9%-ного NaCl (группа контроля) концентрация ДА в срезах МБГ после инкубации в растворе Кребса–Рингера, содержащем L-лейцин, была на 47% ниже по сравнению с концентрацией ДА после инкубации в растворе Кребса–Рингера без L-лейцина (рис. 2, а).

На 14-й день после введения 6-ГДА концентрация L-ДОФА в срезах МБГ после инкубации в растворе Кребса–Рингера с добавлением L-лейцина не изменилась по сравнению с концент-

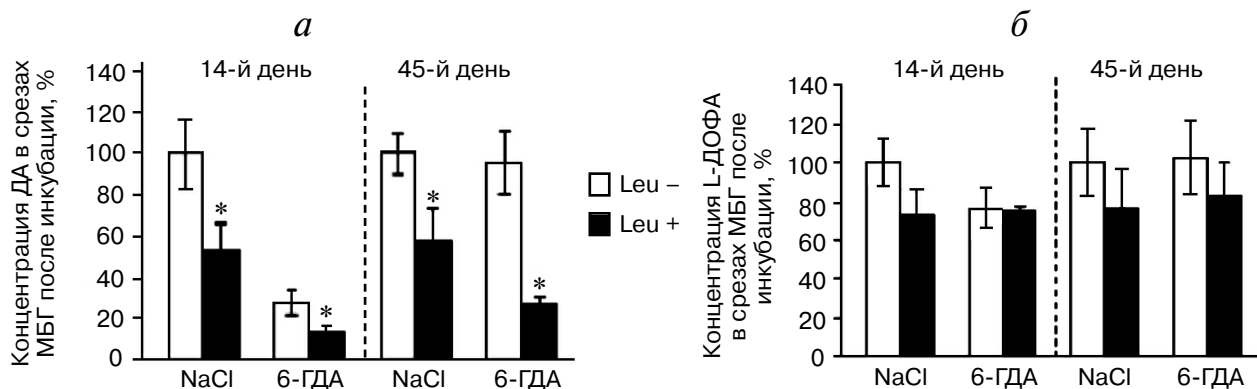


Рис. 2. Концентрации дофамина (ДА) (а) и L- ДОФА (б) в срезах медиобазального гипоталамуса после инкубации в растворе Кребса–Рингера с добавлением L-лейцина (Leu +) и без него (Leu -) на 14-й и 45-й день после стереотаксических введений 0,9% NaCl в контроле и 6-ГДА в эксперименте. $n = 10$ для каждой группы, $*p < 0,05$ Leu + по сравнению с Leu -

рацией L-ДОФА в срезах МБГ после инкубации в растворе Кребса–Рингера без L-лейцина. Концентрация L-ДОФА в срезах МБГ группы контроля после инкубации в растворе Кребса–Рингера с добавлением L-лейцина также не привела к изменениям по сравнению с концентрацией L-ДОФА после инкубации без L-лейцина (рис. 2, б).

Концентрация ДА и L-ДОФА в инкубационной среде. На 14-й день после введения 6-ГДА концентрация ДА во фракциях инкубационной среды снизилась на 33% после инкубации в растворе Кребса–Рингера с добавлением L-лейцина по сравнению с концентрацией ДА после инкубации в растворе Кребса–Рингера без L-лейцина. Добавление L-лейцина в инкубационную среду контрольной группы привело к 37%-ному снижению концентрации ДА во фракциях инкубационной среды по сравнению с концентрацией ДА после инкубации в растворе Кребса–Рингера, не содержащем L-лейцин (рис. 3, а).

Инкубация срезов МБГ с L-лейцином не привела к изменениям концентрации L-ДОФА во фракциях среды по сравнению с пробами, инкубированными без L-лейцина, ни в экспериментальной, ни в контрольной группах (рис. 3, б).

Суммарная концентрация ДА и L-ДОФА в срезах МБГ и в инкубационной среде. После проточной инкубации срезов МБГ в растворе Кребса–Рингера с добавлением L-лейцина суммарная концентрация ДА снизилась на 37% для экспериментальной группы и на 41% для группы контроля по сравнению с пробами, инкубированными в растворе Кребса–Рингера без добавления L-лейцина (рис. 4, а).

На 14-й день после стереотаксических введений в экспериментальной и контрольной группах суммарная концентрация L-ДОФА в срезах и в среде после инкубации в растворе Кребса–

са–Рингера с добавлением L-лейцина достоверно не изменилась по сравнению с суммарной концентрацией L-ДОФА после инкубаций в растворе Кребса–Рингера, не содержащим L-лейцин (рис. 4, б).

45-й день после стереотаксического введения 6-ГДА в эксперименте и 0,9%-ного NaCl в контроле. Концентрация ДА и L-ДОФА в срезах МБГ после инкубации. На 45-й день после введения 6-ГДА концентрация ДА в срезах МБГ после инкубации в растворе Кребса–Рингера с добавлением L-лейцина снизилась на 72% по сравнению с концентрацией ДА в срезах, инкубированных в растворе Кребса–Рингера без L-лейцина. Концентрация ДА в срезах МБГ контрольной группы после инкубации в растворе Кребса–Рингера с добавлением L-лейцина снизилась на 34% по сравнению с концентрацией ДА после инкубации без L-лейцина (рис. 2, а).

В экспериментальной и контрольной группах концентрация L-ДОФА не менялась в срезах МБГ после инкубации в растворе Кребса–Рингера с добавлением L-лейцина по сравнению с инкубацией в растворе Кребса–Рингера без добавления L-лейцина (рис. 2, б).

Концентрация ДА и L-ДОФА в инкубационной среде. После проточной инкубации срезов МБГ в растворе Кребса–Рингера с добавлением L-лейцина концентрация ДА во фракциях инкубационной среды снизилась на 30% для экспериментальной группы и на 29% для группы контроля по сравнению с пробами, инкубированными в растворе Кребса–Рингера без добавления L-лейцина (рис. 3, а).

На 45-й день после введения 6-ГДА концентрация L-ДОФА во фракциях инкубационной среды выросла на 93% после инкубации в растворе Кребса–Рингера с добавлением L-лейцина, по сравнению с концентрацией L-ДОФА в

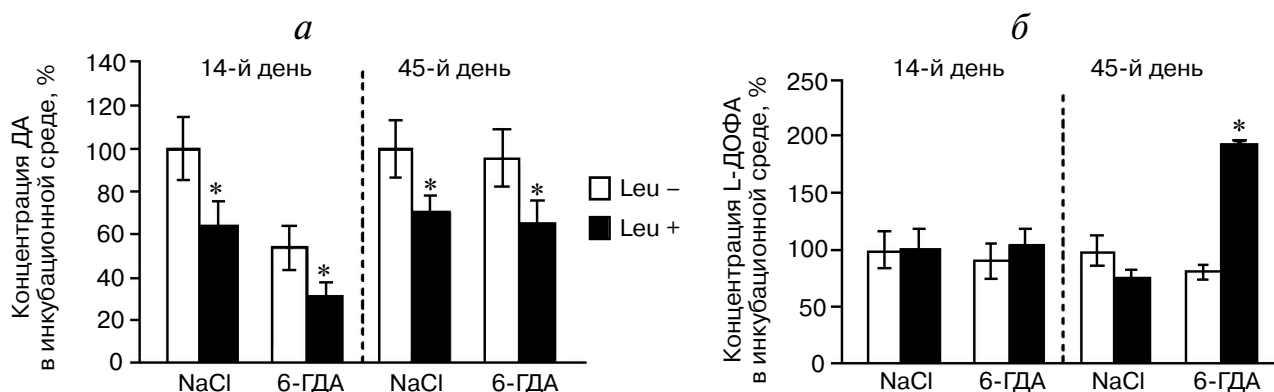


Рис. 3. Концентрации дофамина (ДА) (а) и L-ДОФА (б) в среде после инкубации срезов медиобазального гипоталамуса в растворе Кребса–Рингера с добавлением L-лейцина (Leu +) и без него (Leu -) на 14-й и 45-й день после стереотаксических введений 0,9% NaCl в контроле и 6-ГДА в эксперименте. $n = 10$ для каждой группы, * $p < 0,05$ Leu + по сравнению с Leu -

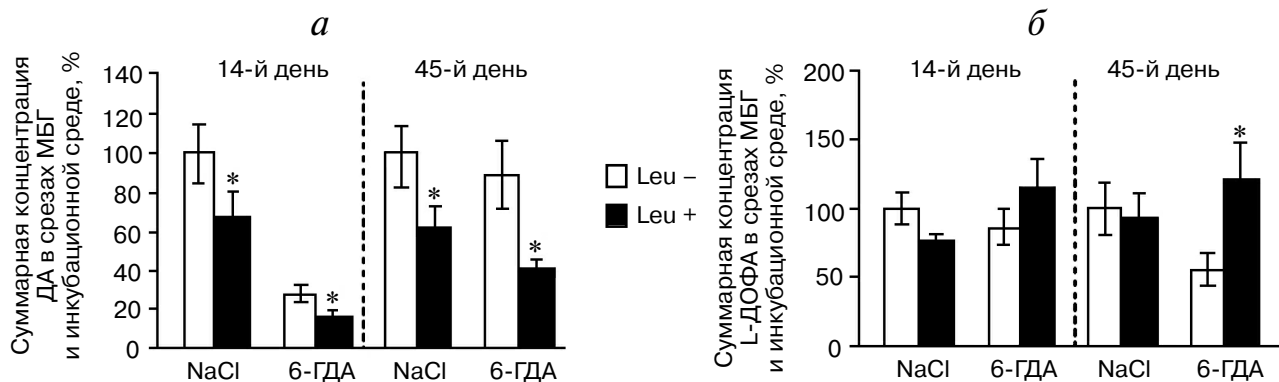


Рис. 4. Суммарные концентрации дофамина (ДА) (а) и L-ДОФА (б) в срезах медиобазального гипоталамуса и среде после инкубации в растворе Кребса–Рингера с добавлением L-лейцина (Leu +) и без него (Leu –) на 14-й и 45-й день после стереотаксических введений 0,9% NaCl в контроле и 6-ГДА в эксперименте. $n = 10$ для каждой группы, $*p < 0,05$ Leu + по сравнению с Leu –

пробах, инкубированных в растворе Кребса–Рингера без L-лейцина. Концентрация L-ДОФА во фракциях инкубационной среды группы контроля после инкубации в растворе Кребса–Рингера с добавлением L-лейцина не привела к изменениям по сравнению с концентрацией L-ДОФА во фракциях инкубационной среды после инкубации в растворе Кребса–Рингера без L-лейцина (рис. 3, б).

Суммарная концентрация ДА и L-ДОФА в срезах МБГ и в инкубационной среде. После проточной инкубации срезов МБГ в растворе Кребса–Рингера с добавлением L-лейцина суммарная концентрация ДА в срезах и в среде после инкубации, снизилась на 55% для экспериментальной группы и на 36% для группы контроля по сравнению с суммарной концентрацией после инкубации в растворе Кребса–Рингера без L-лейцина (рис. 4, а).

В экспериментальной группе суммарная концентрация L-ДОФА в срезах МБГ и в среде после инкубации в растворе Кребса–Рингера с добавлением L-лейцина увеличилась на 65% по сравнению с суммарной концентрацией L-ДОФА после инкубации в растворе Кребса–Рингера без L-лейцина. В группе контроля инкубация в растворе Кребса–Рингера, содержащем L-лейцин, не привела к изменениям суммарной концентрации L-ДОФА, по сравнению с концентрацией L-ДОФА после инкубации без L-лейцина (рис. 4, б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее было показано, что при моделировании гиперпролактинемии с помощью 6-ГДА сначала развивается дефицит дофамина в МБГ и

повышается уровень пролактина в крови, а затем наблюдается восстановление уровня как ДА, так и пролактина [7, 9]. В этой связи данное исследование проводили сначала на 14-й день после введения токсина, т.е. на стадии декомпенсации, когда должна была закончиться дегенерация нейронов в ответ на введение токсина, а затем на 45-й день, т.е. на стадии компенсации, когда реализуются компенсаторные процессы – механизмы пластичности мозга. При дегенерации DAергических нейронов и возникающем при этом дефиците ДА может включаться ряд компенсаторных процессов таких, как: а) увеличение синтеза ДА сохранившимися DAергическими нейронами; б) включение экспрессии генов ферментов синтеза ДА в не-DAергических нейронах и начало кооперативного синтеза ДА нейронами, содержащими только ТГ, и нейронами, экспрессирующими только ДАА; в) прораствание аксонов DAергических нейронов из неповрежденных токсином областей мозга [5, 11].

Целью данной работы являлась проверка гипотезы о том, что именно усиление кооперативного синтеза ДА моноферментными нейронами в МБГ является механизмом компенсации гиперпролактинемии у крыс.

Оценку кооперативного синтеза проводили согласно описанной нами ранее оригинальной методологии [6], при которой срезы МБГ инкубировали в растворе Кребса–Рингера с добавлением конкурентного ингибитора захвата L-ДОФА в нейроны, содержащие ДАА, предотвращая таким образом кооперативный синтез ДА моноферментными нейронами. Инкубация вибротомных срезов МБГ позволяет измерять выделение ДА и L-ДОФА в среду и их накопление в ткани в течение нескольких часов *in vitro*. В от-

личие от оригинальной методологии, в данной работе использована только проточная инкубация, которая, в отличие от статичной, позволяет исключить влияние накопленных в среде продуктов синтеза и деградации на метаболизм катехоламинов, благодаря быстрому удалению выделенного медиатора с током инкубационной среды [12].

Захват L-ДОФА из межклеточного пространства в нейроны, содержащие ДАА, осуществляется с помощью относительно специфического мембранного переносчика, который также переносит крупные нейтральные аминокислоты, такие как L-лейцин, L-тирозин, и др. Учитывая то, что все эти аминокислоты конкурируют за один и тот же мембранный переносчик [13–15], они могут быть использованы в качестве конкурентных ингибиторов поступления L-ДОФА в моноферментные нейроны, содержащие ДАА. Ранее нами на срезах МБГ животных в норме было показано, что L-лейцин ингибирует поступление L-ДОФА из межклеточной среды в нейроны, экспрессирующие ДАА, и таким образом блокирует кооперативный синтез ДА моноферментными нейронами [5, 6]. В данном исследовании также был использован L-лейцин, который не является предшественником L-ДОФА, а, следовательно, не участвует в метаболизме ДА.

Влияние L-лейцина как ингибитора поступления L-ДОФА в нейроны, содержащие ДАА, на синтез ДА и L-ДОФА оценивали путем сравнения концентрации ДА и L-ДОФА в инкубационной среде и срезах МБГ после инкубации в растворе Кребса–Рингера с добавлением L-лейцина и без него. В качестве показателя уровня синтеза ДА оценивали суммарную концентрацию ДА или L-ДОФА, рассчитываемую как сумму их концентраций в срезах после инкубации и в среде. Снижение концентрации ДА в срезах МБГ и в инкубационной среде в присутствии L-лейцина, предотвращающего попадание L-ДОФА в моноферментные нейроны, следует рассматривать как количественный показатель синтеза ДА моноферментными ТГ-содержащими нейронами в кооперации с другими нейронами, экспрессирующими ДАА [5].

Используя эту методологию в данном исследовании было показано, что на стадии декомпенсации на 14-й день после введения 6-ГДА уровень синтеза ДА в присутствии L-лейцина не изменился по сравнению с контрольной группой. Другими словами, добавление в инкубационную среду L-лейцина привело к одинаковому снижению концентрации ДА в срезах после инкубации и в среде контрольной, и экспериментальной групп, по сравнению с пробами, инкубированными без L-лейцина. На стадии ком-

пенсации на 45-й день в аналогичном эксперименте уровень синтеза ДА в присутствии L-лейцина существенно снизился по сравнению с контрольной группой, а также по сравнению с опытной группой на 14-й день, что говорит об усилении кооперативного синтеза ДА моноферментными нейронами. Концентрация ДА в срезах является результирующей его синтеза и накопления, а в среде – результат его спонтанного выделения [16]. Значительное снижение концентрации ДА на 45-й день после введения 6-ГДА наблюдалось только в срезах МБГ после инкубации с L-лейцином, что свидетельствует о снижении продукции ДА при блокировании его синтеза в моноферментных нейронах. Усиление кооперативного синтеза ДА на 45-й день после введения 6-ГДА согласуется с нашими предыдущими результатами о восстановлении уровня ДА [9].

Помимо ДА, измеряли концентрацию L-ДОФА в срезах после инкубации и в инкубационной среде. Уровень L-ДОФА в срезах после инкубации не менялся. Это может быть связано с тем, что L-ДОФА синтезируется в цитоплазме и не накапливается в ткани. Такое предположение можно сделать исходя из того, что в биферментных дофаминергических нейронах следующий этап синтеза ДА из L-ДОФА происходит так же в цитоплазме с помощью второго фермента синтеза ДА – ДАА [17]. Кроме того, в инкубационной среде уровень синтеза L-ДОФА в присутствии L-лейцина значительно увеличился именно на стадии компенсации на 45-й день после введения 6-ГДА, что демонстрирует повышение скорости синтеза L-ДОФА в нейронах, содержащих только ТГ, по сравнению со стадией декомпенсации.

В МБГ иммуногистохимически были выявлены нейроны, содержащие только ТГ [18, 19] и нейроны, содержащие только ДАА [18, 20]. Полученные нами данные согласуются с результатами предыдущих исследований, в которых было показано, что в МБГ у крыс при действии 6-ГДА происходит дегенерация примерно половины ДАергических нейронов, и при этом увеличивается число моноферментных нейронов [5]. Такие нейроны, содержащие ТГ или ДАА, были обнаружены во многих других областях мозга у взрослых млекопитающих. Так, в стриатуме грызунов моноферментные нейроны выявлены только при нейродегенерации [21, 22], а у приматов обнаружено большое количество нейронов, содержащих ТГ, в норме [23–25], а при нейродегенерации их количество резко возрастает [23, 24]. Это свидетельствует о возможной роли кооперативного синтеза ДА этими нейронами как о механизме пластичности, включаю-

щемся при функциональной недостаточности DAергических нейронов не только в МБГ, но и в других отделах мозга.

Таким образом, было показано, что увеличение уровня DA в МБГ, наблюдаемое у крыс на 45-й день после введения нейротоксина, обусловлено усилением кооперативного синтеза DA не-DAергическими моноферментными нейрона-

ми и является проявлением компенсаторного механизма как частного случая нейропластичности.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 14-15-01122).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ben-Jonathan, N., and Hnasko, R. (2001) Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor, *Endocr. Rev.*, **22**, 724–763.
- Bjorklund, A., and Lindvall, O. (1984) Dopamine-containing systems in CNS, in *Handbook of Chemical Neuroanatomy* (Bjorklund, A., and Hokfelt, T., eds) Elsevier, Amsterdam, **2**, pp. 55–122.
- Dahlström, A., and Fuxe, K. (1964) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons, *Acta Physiol. Scand.*, **232**, S1–55.
- Hökfelt, T., Johansson, O., and Goldstein, M. (1984) Central catecholamine neurons as revealed by immunohistochemistry with special reference to adrenaline neurons, in *Handbook of Chemical Neuroanatomy* (Bjorklund, A., and Hokfelt, T., eds) Elsevier, Amsterdam, **2**, pp. 157–276.
- Ugrumov, M.V. (2013) Brain neurons partly expressing dopaminergic phenotype: location, development, functional significance, and regulation, *Adv. Pharmacol.*, **68**, 37–91.
- Ugrumov, M., Taxi, J., Pronina, T., Kurina, A., Sorokin, A., Sapronova, A., and Calas, A. (2014) Neurons expressing individual enzymes of dopamine synthesis in the mediobasal hypothalamus of adult rats: Functional significance and topographic interrelations, *Neuroscience*, **277**, 45–54.
- Fenske, M., and Wuttke, W. (1976) Effects of intraventricular 6-hydroxydopamine injections on serum prolactin and LH levels: absence of stress-induced pituitary prolactin release, *Brain Res.*, **104**, 63–70.
- Jonsson, G. (1983) Chemical lesioning techniques: monoamineneurotoxins, in *Handbook of Chemical Neuroanatomy* (Bjorklund, A., and Hokfelt, T., eds) Elsevier, Amsterdam, **1**, pp. 463–507.
- Зиязетдинова Г.З., Сапронова А.Я., Киясова В.А., Нанаев А.К., Кудрин В.С., Мартина Н., Тийе И., Угрюмов М.В. (2008) Компенсаторная реакция при дегенерации дофаминергических нейронов аркуатного ядра у крыс, *Журн. эвол. биохим. физиол.*, **44**, 72–77.
- Paxinos, G., and Watson, C. (1997) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 3rd Edn., Academic Press, London.
- Vos, P.E., Steinbusch, H.W., Ronken, E., and Van Ree, J.M. (1999) Short and long term plasticity after lesioning of the cell body or terminal field area of the dopaminergic mesocorticolimbic system in the rat, *Brain Res.*, **831**, 237–247.
- Mulder, A.H., Van Den Berg, W.B., and Stoof, J.C. (1975) Calcium-dependent release of radiolabeled catecholamines and serotonin from rat brain synaptosomes in a superfusion system, *Brain Res.*, **99**, 419–424.
- Misu, Y., Kitahama, K., and Goshima, Y. (2003) L-3, 4-Dihydroxyphenylalanine as a neurotransmitter candidate in the central nervous system, *Pharmacol. Ther.*, **97**, 117–137.
- Vieira-Coelho, M.A., and Soares-da-Silva, P. (1998) Uptake and intracellular fate of L-DOPA in a human intestinal epithelial cell line: Caco-2, *Am. J. Physiol.*, **275**, 104–112.
- Uchino, H., Kanai, Y., Kim, D.K., Wempe, M.F., Chairoungdua, A., Morimoto, E., Anders, M.W., and Endou, H. (2002) Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): insights into the mechanisms of substrate recognition, *Mol. Pharmacol.*, **61**, 729–737.
- Хакимова Г.Р., Козина Е.А., Сапронова А.Я., Угрюмов М.В. (2011) Выделение дофамина в черной субстанции и стриатуме на досимптомной и ранней симптомной стадиях паркинсонизма у мышей, *Нейрохимия*, **28**, 42–48.
- Cartier, E.A., Parra, L.A., Baust, T.B., Quiroz, M., Salazar, G., Faundez, V., Egana, L., and Torres, G.E. (2010) A biochemical and functional protein complex involving dopamine synthesis and transport into synaptic vesicles, *J. Biol. Chem.*, **285**, 1957–1966.
- Okamura, H., Kitahama, K., Nagatsu, I., and Geffard, M. (1988) Comparative topography of dopamine- and tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the rat arcuate nucleus, *Neurosci. Lett.*, **95**, 347–353.
- Zoli, M., Agnati, L.F., Tinner, B., Steinbusch, H.W.M., and Fuxe, K. (1993) Distribution of dopamine-immunoreactive neurons and their relationships to transmitter and hypothalamic hormone-immunoreactive neuronal systems in the rat mediobasal hypothalamus. A morphometric and microdensitometric analysis, *J. Chem. Neuroanat.*, **6**, 293–310.
- Ershov, P.V., Ugrumov, M.V., Calas, A., Krieger, M., and Thibault, J. (2002) Differentiation of tyrosine hydroxylase-synthesizing and/or aromatic L-amino acid decarboxylase-synthesizing neurons in the rat mediobasal hypothalamus: Quantitative double-immunofluorescence study, *J. Comp. Neurol.*, **446**, 114–122.
- Meredith, G.E., Farrell, T., Kellaghan, P., Tan, Y., Zahm, D.S., and Totterdell, S. (1999) Immunocytochemical characterization of catecholaminergic neurons in the rat striatum following dopamine-depleting lesions, *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 3585–3596.
- Lopez-Real, A., Rodriguez-Pallares, J., Guerra, M.J., and Labandeira-Garcia, J.L. (2003) Localization and functional significance of striatal neurons immunoreactive to aromatic L-amino acid decarboxylase or tyrosine hydroxylase in rat Parkinsonian models, *Brain Res.*, **969**, 135–146.
- Betarbet, R., Turner, R., Chockkan, V., DeLong, M. R., Allers, K. A., Walters, J., Levey, A.I., and Greenamyre, J.T. (1997) Dopaminergic neurons intrinsic to the primate striatum, *J. Neurosci.*, **17**, 6761–6768.
- Palfi, S., Leventhal, L., Chu, Y., Ma, S.Y., Emborg, M., Bakay, R., Döglon, N., Hantraye, P., Aebischer, P., and

- Kordower, J.H. (2002) Lentivirally delivered glial cell line-derived neurotrophic factor increases the number of striatal dopaminergic neurons in primate models of nigrostriatal degeneration, *J. Neurosci.*, **22**, 4942–4954.
25. Tande, D., Hoglinger, G., Debeir, T., Freundlieb, N., Hirsch, E.C., and Francois, C. (2006) New striatal dopamine neurons in MPTP-treated macaques result from a phenotypic shift and not neurogenesis, *Brain*, **129**, 1194–1200.

COOPERATIVE SYNTHESIS OF DOPAMINE IN RAT MADIOBASAL HYPOTHALAMUS AS A COMPENSATORY MECHANISM IN HYPERPROLACTINEMIA

A. U. Kurina*, T. S. Pronina, L. K. Dilmukhametova,
G. V. Maleev, and M. V. Ugrumov

*Koltzov Institute of Developmental Biology,
Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia;
E-mail: kurina.anya@gmail.com*

Received October 18, 2016
Revision received November 29, 2016

It is known that dopamine in the mediobasal hypothalamus is synthesized by dopaminergic neurons containing two enzymes of dopamine synthesis – tyrosine hydroxylase and decarboxylase of aromatic L-amino acids and by monoenzymatic nondopaminergic neurons containing one of these enzymes in cooperation. This dopamine has inhibitory effect on the secretion of prolactin. Violation of this inhibitory control leads to increased prolactin concentration in the blood and the development of hyperprolactinemia syndrome. With a rat model of hyperprolactinemia induced by administration of a neurotoxin, causing degeneration of dopaminergic and noradrenergic neurons, dopamine level is first reduced, which leads to increase in prolactin levels (decompensation stage), and then both indicators are restored to normal values (compensation stage). However, until now there is no clear mechanism for such compensation. The aim of this study was to test the hypothesis that the increase in cooperative synthesis of dopamine by monoenzymatic neurons during hyperprolactinemia is a manifestation of a compensatory mechanism as a case of neuroplasticity. The level of cooperative synthesis in the hyperprolactinemia model and in the control was evaluated by the detection of the level of synthesis of dopamine and L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) – an intermediate product of dopamine synthesis during the inhibiting of L-DOPA transfer from neurons containing tyrosine hydroxylase into neurons containing decarboxylase of aromatic L-amino acids. Thus, the level of dopamine synthesis in the decompensation stage was not changed, and in the compensation stage it was lower compared to the control. Along with a reduction in dopamine levels in the compensation stage, an increase in extracellular L-Dopa levels in the medium was shown. Thus, the compensation of dopamine deficiency after degeneration of dopaminergic neurons in the mediobasal hypothalamus is due to increase in cooperative synthesis of dopamine by monoenzymatic neurons containing one of the complementary enzymes of dopamine synthesis.

Keywords: mediobasal hypothalamus, neuroplasticity, dopamine, noradrenaline, L-dihydroxyphenylalanine, 6-hydroxydopamine, high-performance liquid chromatography