

УДК 577.032.22;577.175.82; 611.81.013

Сравнительный анализ содержания моноаминов как нейрогормонов в ликворе и крови крыс в онтогенезе

А. Р. Муртазина, Н. С. Бондаренко, Т. С. Пронина, К. И. Чандрян, В. В. Богданов, Л. К. Дильмухаметова, М. В. Угрюмов*

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, 119334 Россия

*E-mail: michael.ugrumov@mail.ru

Поступила в редакцию 12.07.2021

Принята к печати 15.10.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11516

РЕФЕРАТ Ликвор желудочков мозга содержит многочисленные физиологически активные вещества нейронального происхождения, которые в качестве нейрогормонов могут участвовать в объемной нейротрансмиссии в перивентрикулярной области мозга. Нами проведен сравнительный анализ уровня моноаминов в ликворе и крови крыс в онтогенезе как показателя возрастных особенностей их поступления в указанные гуморальные среды и участия в качестве нейрогормонов в объемной нейротрансмиссии в мозге. Показано, что ликвор взрослых крыс и крыс в перинатальном периоде содержит функционально наиболее значимые моноамины – дофамин, норадреналин и серотонин. Из сопоставления концентраций моноаминов в ликворе и в крови животных разных возрастных групп следует, что моноамины, содержащиеся в ликворе, имеют преимущественно нейрональное (мозговое) происхождение и практически не поступают из общей системы циркуляции. Кроме того, показано, что в ликворе моноамины присутствуют в физиологически активной концентрации, в которой они могут действовать как нейрогормоны в обратимой объемной нейротрансмиссии в мозге взрослых животных и в регуляции развития мозга в перинатальном периоде.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА крыса, мозг, ликвор, плазма, моноамины, онтогенез.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3-МТ – 3-метокситирамин; 5-ГТ – 5-гидрокситриптамин (серотонин); А – адреналин; АД – альдегиддегидрогеназа; ГВК – гомованилиновая кислота; ГИУК – 5-гидроксииндолуксусная кислота; ДВГ – дофамин-β-гидроксилаза; ДА – дофамин; ДГБА – 3,4-дигидроксибензиламин; ДОФУК – 3,4-дигидроксибензилуксусная кислота; КОМТ – катехол-О-метилтрансфераза; МАО – моноаминоксидаза; НА – норадреналин; П – постнатальный день; ФМТ – фенилэтанол-амин-N-метилтрансфераза; Э – эмбриональный день.

ВВЕДЕНИЕ

Важную роль в регуляции работы мозга в виде объемной нейротрансмиссии (действие на всю поверхность нейрона) и синаптической нейротрансмиссии (действие в области синапса) играют моноамины – дофамин, норадреналин и серотонин, продуцируемые нейронами мозга [1]. У взрослых животных моноамины в мозге обеспечивают обратимую ауторегуляцию синтезирующих их нейронов, а также регуляцию нейронов-мишеней другой ергичности. В перинатальном периоде онтогенеза моноамины, действуя на те же самые рецепторы на нейронах-мишенях, оказывают необратимое морфогенетическое влияние на развитие этих нейронов и мозга в целом [2–5].

Опубликованы доказательства того, что моноамины нейронального происхождения, содержащи-

еся в ликворе желудочков мозга, поступают в мозг и участвуют в объемной нейротрансмиссии в качестве нейрогормонов, чему способствует отсутствие для них ликвор-энцефалического барьера [1, 6]. Хотя моноамины также синтезируются в периферических органах и поступают в кровеносные сосуды, их нейрогормональное влияние на мозг возможно только до закрытия гематоэнцефалического барьера, что происходит в раннем постнатальном периоде [7]. Тем не менее, незначительный обмен моноаминов между ликвором и кровью возможен в течение всего онтогенеза – в области (а) хориоидных сплетений в боковых желудочках, где вещества поступают из плазмы в ликвор; (б) в месте перехода желудочков в каудальную область мозга в сосудистую систему; (в) в циркумвентрикулярных органах мозга, лишенных гематоэнцефалического барьера [7, 8].

Несмотря на обилие работ, констатирующих наличие физиологически активных веществ, включая моноамины, в ликворе и в крови, до сих пор не изучена динамика изменений уровня моноаминов в этих гуморальных средах в онтогенезе. Кроме того, отсутствует оценка градиента концентраций моноаминов на границе ликвор–кровь на различных этапах онтогенеза. Учитывая наши последние данные об отсутствии ликвор–энцефалического барьера для моноаминов в онтогенезе крыс [9], концентрация моноаминов в межклеточном пространстве в перивентрикулярной области мозга должна быть такой же, как в ликворе. Получение ответа на поставленные вопросы позволит определить, на каких этапах онтогенеза концентрация моноаминов в ликворе достаточно высока для их участия в качестве нейрого르몬ов в регуляции функционирования и развития мозга.

Исходя из вышеизложенного, цель нашей работы состояла в проведении сравнительного анализа уровня моноаминов в ликворе и в крови крыс в онтогенезе как показателя возрастных особенностей их поступления в указанные гуморальные среды и участия в качестве нейрого르몬ов в объемной нейротрансмиссии в мозге. Для достижения цели поставлены следующие задачи: (а) определить концентрацию моноаминов (дофамина, норадреналина, адреналина и серотонина) как показателя секреторной активности соответствующих нейронов в ликворе крыс на 18-й эмбриональный день (Э18), на 5-й постнатальный день (П5) и П30; (б) определить концентрацию моноаминов у тех же животных в плазме; (в) оценить соотношение концентрации моноаминов в ликворе и в плазме как интегрального показателя существования барьеров для моноаминов между желудочками мозга и общей системой циркуляции.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные

В работе использованы крысы Вистар – самки и самцы на 18-й эмбриональный день (Э18), самцы на 5-й постнатальный день (П5) и на П30 (рис. 1). Для получения датированного потомства использованы беременные самки крыс весом 250–350 г. День обнаружения сперматозоидов во влагалищных мазках принимали за Э1, а день родов – П1. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к пище и воде и 12-часовом режиме день–ночь. Эксперименты проводили в соответствии с требованиями Национальных институтов здоровья (NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) и комитета по биоэтике Института биологии развития им. Н.К. Кольцова (протокол № 3 от 10.09.2020 и протокол № 44 от 24.12.2020).

Все манипуляции с животными проводили под наркозом хлоралгидратом (Sigma, США) в дозе 100 мг/кг на П5, 400 мг/кг на П30 и Э18 или 1% изофлурана на П30 (Laboratorios Karizoo, Испания).

Получение ликвора и крови крыс на Э18, П5 и П30

У крыс на Э18 ($n = 112$), П5 ($n = 30$) и П30 ($n = 20$) получали ликвор (рис. 1). Крысам на 18-й день беременности проводили лапаротомию, плоды извлекали из матки, не прерывая целостности пупочного канатика. После этого в каждый из боковых желудочков плодов по ранее описанной методике вводили стеклянную микроканюлю [10], соединенную тefлоновой трубкой с гамильтоновым шприцом, заполненным физраствором. Кончик канюли заполняли небольшим пузырьком воздуха, чтобы физраствор не смешался с ликвором. Из обоих же-

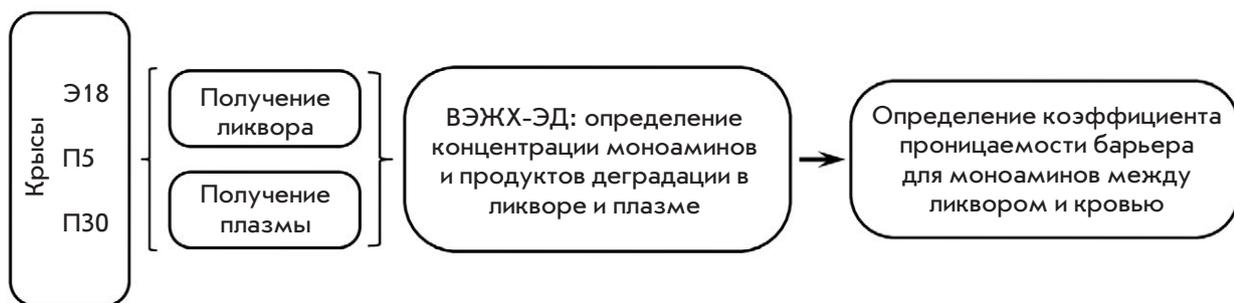


Рис. 1. Схема экспериментов на крысах на 18-й эмбриональный день (Э18), 5-й постнатальный день (П5) и П30: получение ликвора и плазмы крови, определение концентрации моноаминов и продуктов деградации в ликворе и плазме, определение коэффициента проницаемости барьера ликвор–кровь для моноаминов. ВЭЖХ-ЭД – высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимической детекцией

лудочков плода получали в среднем 1.5 ± 0.5 мкл ликвора.

Ликвор у крыс на П5 и П30 получали из цистерны магна по ранее описанной методике [11]. Для этого голову животного фиксировали в стереотаксическом приборе (NarishigeLab, Япония) и обеспечивали доступ к цистерне магна. После этого в цистерну магна стереотаксически вводили стеклянную микроканюлю, соединенную с гамльтоновым шприцом, используя описанную выше систему. От каждой крысы на П5 получали 25 ± 10 мкл, а на П30 – 55 ± 15 мкл ликвора. В образцы ликвора добавляли HClO_4 в конечной концентрации 0.1 М и 3,4-дигидроксифениламин (ДГБА) (Sigma, США) – внутренний стандарт для определения моноаминов и продуктов деградации – в конечной концентрации 25 пмоль. В качестве одного образца на Э18 использовали ликвор, полученный от 14 плодов, а на П5 и П30 – ликвор от трех животных. Ликвор замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C до определения моноаминов (дофамина, норадреналина и серотонина), а также основных продуктов их деградации – 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК), 3-метокситирамина (3-МТ), гомованилиновой кислоты (ГВК) и 5-гидроксииндолуксусной кислоты (ГИУК) (рис. 2).

На П30 ликвор получали не только из цистерны магна, но из боковых желудочков. С этой целью крысам ($n = 4$) под изофлурановым наркозом в боковой желудочек мозга стереотаксически по рассчитанным в соответствии с атласом мозга [12] координатам (-0.4 мм каудальнее и 1.4 мм латеральнее брегмы; 2.2 мм вглубь) вводили направляющую канюлю для микродиализного зонда (СМА-11 Guide Cannula, СМА, Швеция). Канюлю фиксировали на кости черепа с помощью микроболтов и стоматологического полимера («Протакрил-М», Украина). Через 48 ч в направляющую канюлю вводили микродиализный зонд (СМА 11 55 kDa Microdialysis Probe, СМА, Швеция), заполненный искусственным ликвором (мМ): 147 NaCl ; 2.7 KCl ; 1 MgCl_2 ; 1.2 CaCl_2 . С помощью тефлоновых трубочек зонд подсоединяли к насосу для микродиализа СМА 4004 (СМА, Швеция). Микродиализ начинали через 3 ч после введения зонда – боковые желудочки перфузировали в течение 20 мин со скоростью 2 мкл/мин. К полученному диализату добавляли 4 мкл 1 н. HClO_4 , замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C до определения моноаминов и продуктов деградации (рис. 2).

После получения ликвора инсулиновым шприцом собирали кровь из левого желудочка сердца тех же животных под хлоралгидратным наркозом. У животного на Э18 объем получаемого образца крови был равен 30 ± 5 мкл, на П5 – 100 ± 10 мкл

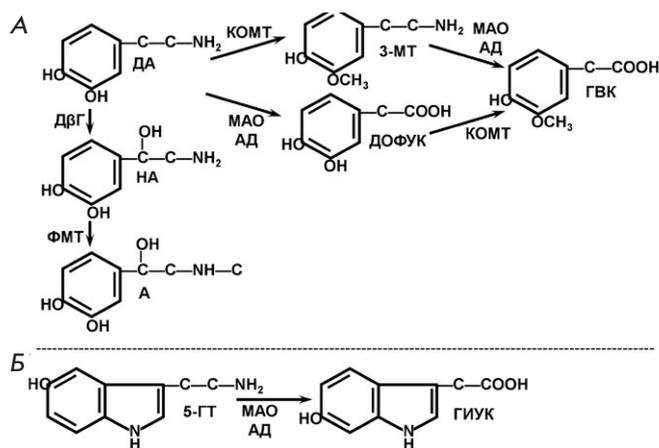


Рис. 2. Схемы синтеза катехоламинов и деградации дофамина (А) и деградации серотонина (Б). ДА – дофамин; НА – норадреналин; А – адреналин; ДОФУК – 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота; 3-МТ – 3-метокситирамин; ГВК – гомованилиновая кислота; 5-ГТ – 5-гидроксиทริปтамин (серотонин); ГИУК – 5-гидроксииндолуксусная кислота

и на П30 – 2000 ± 20 мкл. В образцы крови добавляли 5% этилендиаминтетрауксусной кислоты (Sigma, США) и 10% метабисульфита натрия (Sigma). Образцы центрифугировали при $1350 g$ (10 мин, 4°C) и собирали супернатант (плазму), в который добавляли 10% 1 н. HClO_4 и 25 пмоль ДГБА. Плазму центрифугировали при $16500 g$ в течение 20 мин при 4°C , супернатант замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C до определения моноаминов и продуктов деградации (рис. 2).

Высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимической детекцией

Концентрацию моноаминов и продуктов их деградации в ликворе, плазме и в микродиализатах определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией. Пробы ликвора и плазмы делили на две части. Одну часть экстрагировали, осаждая катехоламины и продукты деградации на оксиде алюминия, вторую часть использовали в неосажденном виде для измерения серотонина и ГИУК. Микродиализаты использовали в неосажденном виде.

Определяемые вещества разделяли с использованием обращенно-фазовой колонки ReproSil-Pur, ODS-3 размером 4×100 мм с диаметром пор 3 мкм (Dr.Majsch GmbH, Германия) при температуре 28°C и скорости подвижной фазы 1 мл/мин, поддерживаемой жидкостным хроматографом LC-20ADsp (Shimadzu, Япония) при потенциале 850 мВ. В качестве подвижной фазы использовали 0.1 М цитратно-

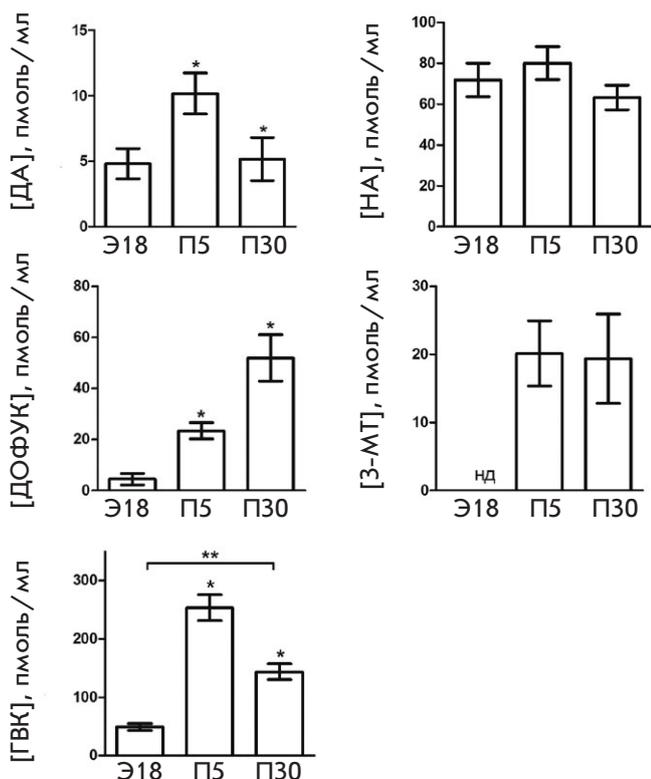


Рис. 3. Концентрация катехоламинов и продуктов деградации в ликворе крыс на Э18, П5 и П30. * $p < 0.05$, сравнение с предыдущим возрастом; ** $p < 0.05$, сравнение выбранных параметров; нд – не детектируется. Здесь и далее сокращения как на рис. 2

фосфатный буфер pH 2.58 (0.3 мМ октансульфонат натрия, 0.1 мМ EDTA и 8% ацетонитрила) (все реактивы Sigma). Определение моноаминов проводили с помощью электрохимического детектора Decade II (AntecLeyden, Нидерланды) со стеклоуглеродным рабочим электродом (0.85 В) и хлорсеребряным электродом сравнения. Пики моноаминов и метаболитов определяли по времени их выхода в стандартном растворе.

Статистика

Данные обрабатывали в программе GraphPadPrism 6.0 (GraphPad Software, США) и представляли как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего ($\text{mean} \pm \text{SEM}$). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$; $0.05 < p < 0.1$ расценивали как тенденцию к изменению, при $p > 0.1$ различия считали недостоверными. Статистическую значимость результатов определяли с использованием параметрического t -критерия Стьюдента (t -тест) и непараметрического U -критерия Манна–

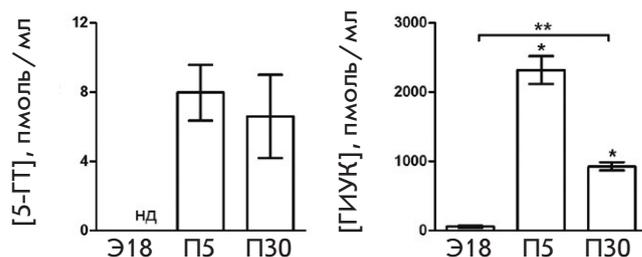


Рис. 4. Концентрация серотонина и продукта деградации в ликворе крыс на Э18, П5 и П30. * $p < 0.05$, сравнение с предыдущим возрастом; ** $p < 0.05$, сравнение выбранных параметров; нд – не детектируется

Уитни (U -тест), для множественных сравнений применяли поправку Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Концентрация катехоламинов, серотонина и продуктов их деградации в ликворе в цистерне magna крыс в онтогенезе

Концентрация дофамина на Э18 равна примерно 5 пмоль/мл, причем она удваивается на П5, а на П30 становится такой же, как у плодов (рис. 3).

Концентрация норадреналина в течение всего изученного периода онтогенеза не изменяется, оставаясь во всех возрастных группах на высоком уровне – около 70 пмоль/мл. В отличие от дофамина и норадреналина, адреналин в ликворе не определяется ни в пренатальном, ни в постнатальном периоде.

В ликворе крыс всех возрастных групп наряду с катехоламинами выявлены продукты их деградации – 3-МТ (кроме Э18), ДОФУК и ГВК (рис. 3). Хотя 3-МТ не определяется у плодов, на П5 и П30 он содержится в ликворе в довольно высокой концентрации – около 20 пмоль/мл. В отличие от 3-МТ, ДОФУК определяется уже на Э18 (почти 4.5 пмоль/мл). На П5 этот показатель возрастает примерно в 5 раз, а на П30 снижается на 55%. При этом конечный продукт деградации дофамина – ГВК – определяется в ликворе в значительной концентрации (почти 50 пмоль/мл) уже на Э18. На П5 этот показатель возрастает примерно в 5 раз, а на П30 снижается на 45%.

Серотонин не определяется в ликворе крыс на Э18, однако на П5 и П30 он содержится в ликворе в довольно высокой концентрации – 8 пмоль/мл (рис. 4). При этом на Э18 концентрация конечного продукта деградации серотонина – ГИУК – достаточно высокая, а на П5 концентрация ГИУК превышает концентрацию серотонина почти в 300 раз.

К П30 концентрация ГИУК в ликворе снижается более чем в 2 раза по сравнению с П5 (рис. 4).

Моноамины и продукты деградации в боковых желудочках крыс на 30-й постнатальный день

В боковых желудочках мозга крыс на П30 из всех измеряемых моноаминов и продуктов деградации с помощью микродиализа удалось выявить только ДОФУК и ГИУК. Для установления базового уровня измеряемых веществ проводили не менее трех измерений. Измеренные в диализатах концентрации ДОФУК составляют: 5.2 ± 1.1 пмоль/мл, а ГИУК – 105.7 ± 14.8 пмоль/мл.

Концентрация катехоламинов, серотонина и продуктов их деградации в плазме крыс в онтогенезе

Концентрация дофамина в плазме крыс на Э18 не превышает 0.4 пмоль/мл, на П5 этот показатель возрастает в 6 раз, а к П30 снижается примерно в 2 раза (рис. 5). Концентрация норадреналина меняется в онтогенезе примерно так же, как и концентрация дофамина – с Э18 до П5 возрастает в 3.5 раза, а затем к П30 снижается в 3 раза. При этом во всех возрастных группах концентрация норадреналина на порядок выше, чем дофамина. В отличие от ликвора, в плазме определяется адреналин, концентрация которого возрастает с Э18 по П5 более чем в 50 раз, а к П30 снижается в 2.5 раза. Наряду с катехоламином в плазме обнаружены продукты их деградации. Так, 3-МТ определяется в плазме только на П30, а ДОФУК (в небольшой концентрации) уже на Э18. К П5 происходит многократное увеличение концентрации ДОФУК, и на этом уровне она сохраняется на П30. Концентрация ГВК – конечного продукта деградации дофамина, возрастает более чем в 4 раза с Э18 по П5, а к П30 становится ниже, чем у плодов (рис. 5).

Концентрация серотонина в плазме на Э18 равна примерно 5.5 пмоль/мл (рис. 6). К П5 этот показатель возрастает в 85 раз, а на П30 почти возвращается к эмбриональному уровню. Аналогичным образом изменяется и концентрация ГИУК: с Э18 по П5 возрастает в 10 раз, а на П30 становится в 2 раза ниже, чем в эмбриональный период.

Соотношение концентраций моноаминов и продуктов их деградации в ликворе и в плазме крови крыс в онтогенезе

Во всех возрастных группах концентрация дофамина, норадреналина и продуктов деградации в ликворе многократно превышает их концентрацию в плазме (рис. 7А). Однако пик различий приходится на разные периоды онтогенеза. Так, пик

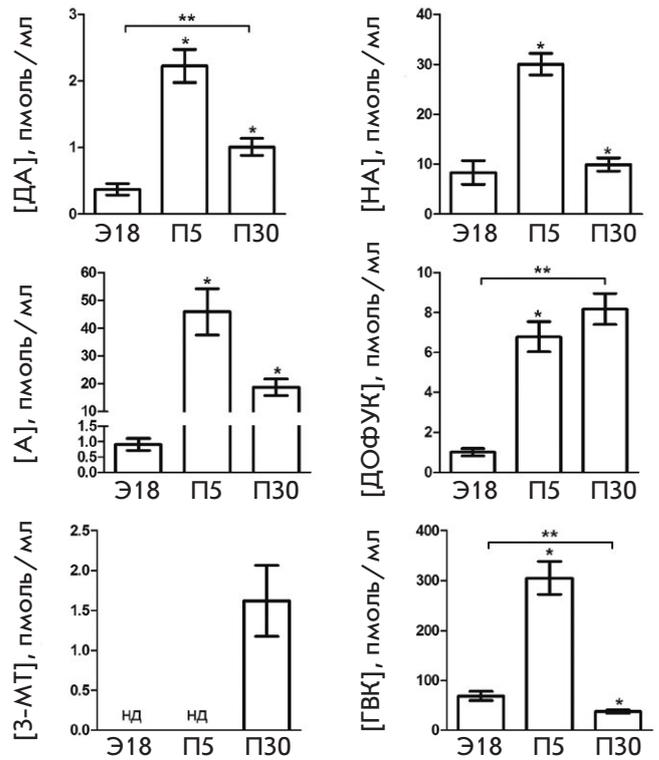


Рис. 5. Концентрация катехоламинов и продуктов деградации в плазме крыс на Э18, П5 и П30. * $p < 0.05$, сравнение с предыдущим возрастом; ** $p < 0.05$, сравнение выбранных параметров; нд – не детектируется

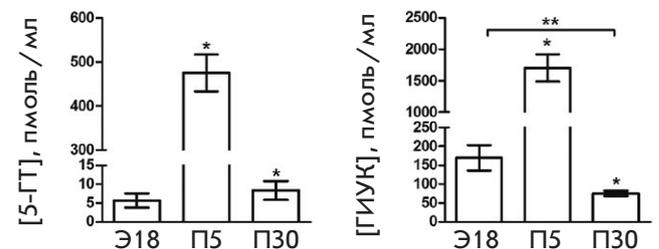


Рис. 6. Концентрация серотонина и продукта деградации в плазме крыс на Э18, П5 и П30. * $p < 0.05$, сравнение с предыдущим возрастом; ** $p < 0.05$, сравнение выбранных параметров

дофамина и норадреналина наблюдается на Э18, а у ДОФУК, 3-МТ и ГВК – на П30.

Концентрация серотонина на П30 и ГИУК на П5 и П30 в ликворе превышает концентрацию этих веществ в плазме (рис. 7Б). Следует отметить, что на П5 концентрация серотонина в ликворе в 60 раз ниже, чем в плазме.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ключевой задачей данной работы было проведение сравнительного анализа уровня моноаминов в ликворе и крови крыс в онтогенезе как показателя возрастных особенностей поступления этих соединений в эти гуморальные среды и участия в качестве нейрогормонов в регуляции функционирования и развития мозга. В этом контексте особое внимание уделено ликвору как гуморальной среде, в которую, с одной стороны, из мозга поступают моноамины, а с другой – моноамины в отсутствие ликвор-энцефалического барьера поступают из ликвора в перивентрикулярную область мозга, участвуя в качестве нейрогормонов в объемной нейротрансмиссии. Исторической предпосылкой для предположения о поступлении физиологически активных веществ из мозга в ликвор послужило обнаружение ликвор-контактирующих нейронов [8, 13].

Содержащиеся в ликворе моноамины как нейрогормоны – потенциальные участники объемной нейротрансмиссии и морфогенетического контроля развития мозга

Несмотря на то, что в нейронах мозга синтезируются десятки нейротрансмиттеров и нейромодуляторов, наиболее широко распространенными по мозгу классическими нейротрансмиттерами являются моноамины – дофамин, норадреналин и серотонин. У взрослых животных они вовлечены в регуляцию функциональной активности нейронов-мишеней, а в перинатальном периоде – в регуляцию развития нейронов и мозга в целом [2–5].

Исходя из представлений о качественных различиях в действии моноаминов на различных этапах онтогенеза, концентрацию моноаминов определяли в ликворе крыс в трех возрастных периодах. В первую возрастную группу входили крысы на Э18, поскольку к этому времени: (а) заканчивается образование нейронов из клеток-предшественников; (б) дифференцирующиеся нейроны мигрируют в места их окончательной локализации в мозге; (в) нейроны экспрессируют специфический фенотип; (г) аксоны дифференцирующихся нейронов начинают достигать желудочков мозга и кровеносных сосудов в циркумвентрикулярных органах, формируя пути поступления нейрогормонов в ликвор (аксо-вентрикулярные контакты) и в кровеносные сосуды (аксо-вазальные контакты) соответственно. Вторая возрастная группа включала крыс на П5. К этому времени: (а) заканчивается миграция дифференцирующихся нейронов в места их окончательной локализации; (б) заканчивается формирование аксо-вентрикулярных и аксо-вазальных контактов; (в) продолжает формироваться афферентная синапти-

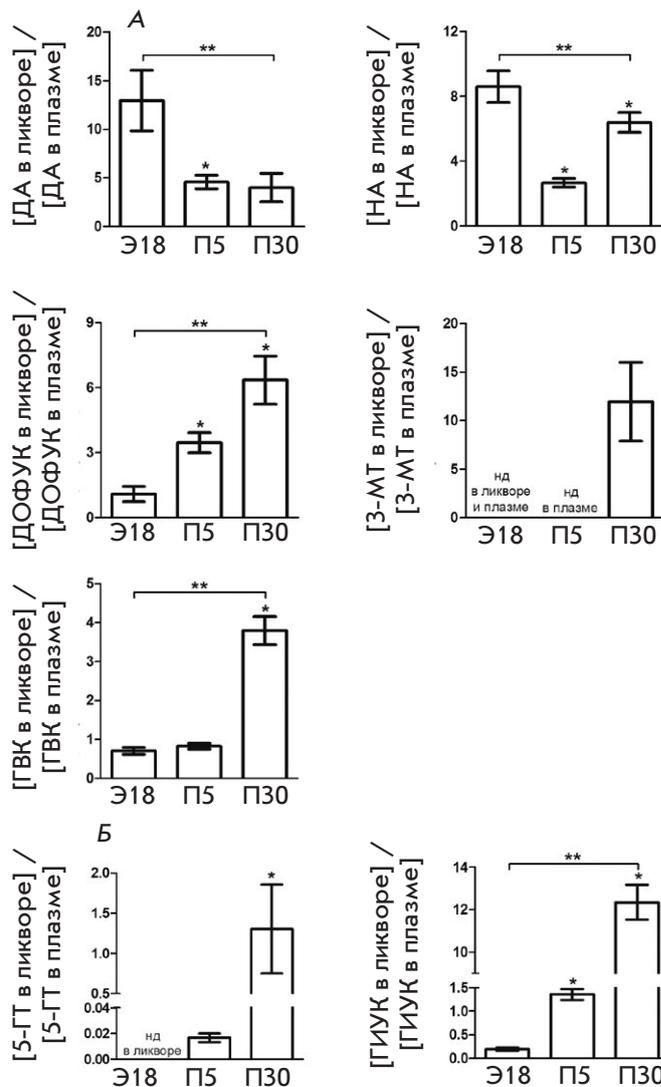


Рис. 7. Соотношение концентраций катехоламинов (А), серотонина (Б) и продуктов деградации (А, Б) в ликворе и плазме крови крыс на Э18, П5 и П30. **p* < 0.05, сравнение с предыдущим возрастом; ***p* < 0.05, сравнение выбранных параметров; нд – не детектируется

ческая иннервация нейронов. И, наконец, в третью возрастную группу вошли крысы на П30. К этому времени: (а) заканчивается формирование синаптических контактов; (б) заканчивается формирование гематоэнцефалического барьера, препятствующего проникновению большинства нейротрансмиттеров нелипидной природы из мозга в кровь и обратно [14–17].

С позиции представления о нейрогормональном действии моноаминов, содержащихся в ликворе, на нейроны мозга-мишени, важнейшим функцио-

нальным показателем считается концентрация моноаминов в ликворе. Действительно, в проведенных ранее, в основном *in vitro*, работах показано, что моноамины оказывают нейротрансмиттерное влияние на нейроны в широком диапазоне концентраций – от 10^{-11} до 10^{-8} М [18]. При этом *in vivo* моноамины способны влиять на нейроны в еще более низкой концентрации [19–21].

На первом этапе нашей работы необходимо было определить, изменяется ли качественный состав и концентрация моноаминов по ходу тока ликвора из боковых желудочков, где ликвор образуется в результате «фильтрации» плазмы крови из сосудов хориоидного сплетения до цистерны magna – каудального отдела желудочковой системы. Для этого у крыс на П30 был сопоставлен состав моноаминов и продуктов их деградации в ликворе боковых желудочков, получаемом с помощью микродиализа, и в ликворе цистерны magna, получаемом с помощью микроканюли. При этом в цистерне magna обнаружены все детектируемые нами моноамины и продукты их деградации, а в боковых желудочках только некоторые продукты их деградации – ДОФУК и ГИУК. Эти данные свидетельствуют о том, что моноамины поступают в ликвор не из плазмы сосудов хориоидного сплетения и нервной ткани, окружающей боковые желудочки, а в основном из нервной ткани каудальнее боковых желудочков мозга.

В дальнейшей работе определили состав ликвора, полученного только из цистерны magna. Катехоламины – дофамин и норадреналин, выявлены в ликворе крыс всех возрастных групп, однако динамика изменения их концентрации с возрастом существенно меняется. Так, норадреналин содержится в ликворе в значительной концентрации на Э18 (7.2×10^{-8} М), и этот показатель не меняется на П5 (8×10^{-8} М) и П30 (6.3×10^{-8} М). Полученные данные свидетельствуют о том, что норадренергические нейроны секреторируют моноамины в ликвор в пренатальном и в постнатальном периодах. Это предположение подтверждается тем, что по данным *in vitro* норадреналин приблизительно в такой же концентрация, как и в ликворе, способен оказывать нейротрансмиттерный эффект на нейроны взрослых крыс [22–24]. Учитывая также то, что рецепторы к норадреналину, как и к другим моноаминам, экспрессируются еще в пренатальном периоде [25–27], наши данные позволяют предположить, что норадреналин, содержащийся в ликворе, способен в качестве нейрого르몬а не только участвовать в объемной нейротрансмиссии у взрослых животных, но и оказывать морфогенетическое влияние на нейроны мозга в перинатальном периоде.

Возрастная динамика изменений концентраций дофамина и норадреналина в ликворе имеет принципиальные отличия. Во-первых, на Э18 концентрация дофамина в ликворе (0.3×10^{-9} М) как минимум на порядок меньше, чем норадреналина (0.48×10^{-8} М), что, однако, не уменьшает вероятность его морфогенетического влияния на нейроны-мишени. К П5 концентрация дофамина в ликворе увеличивается вдвое (1×10^{-8} М), хотя и остается значительно ниже, чем концентрация норадреналина. Следует отметить, что концентрация дофамина могла бы возрасти в перинатальном периоде (Э18–П5) намного больше, если бы одновременно не повысилась активность ферментов деградации дофамина – MAO и КОМТ. Об этом свидетельствует значительное увеличение концентрации продуктов ферментативной активности MAO и КОМТ – ДОФУК, 3-МТ и ГВК в перинатальном периоде. Тем не менее, увеличение концентрации дофамина в ликворе к П5 существенно повышает вероятность его морфогенетического влияния на дифференцирующиеся нейроны-мишени и развивающийся мозг в целом [28]. Второе отличие возрастной динамики концентрации дофамина в ликворе от динамики норадреналина – снижение концентрации дофамина к П30 в 2 раза по сравнению с П5. Это важный, хотя и косвенный показатель того, что содержащийся в ликворе дофамин может оказывать морфогенетическое влияние на нейроны-мишени, причем в основном в раннем постнатальном периоде.

Возрастная динамика концентрации серотонина в ликворе существенно отличается от динамики катехоламинов. Так, серотонин практически не определяется в ликворе на Э18, тогда как к П5 его концентрация приближается к концентрации дофамина. Концентрация серотонина в ликворе могла бы вырасти к П5 в еще большей степени, если бы не существенное повышение в это время активности фермента деградации серотонина – MAO, на что указывает высокий уровень продукта его ферментативной активности – ГИУК. На таком же уровне концентрация серотонина сохраняется и на П30. Из приведенных данных следует, что содержащийся в ликворе серотонин может участвовать как в объемной нейротрансмиссии в постнатальном периоде, так и в регуляции развития нейронов-мишеней и мозга в целом в раннем постнатальном периоде у крыс.

Мозг – единственный источник моноаминов в ликворе в онтогенезе

Как показано в нашей работе, ликвор крыс на П5 и П30 содержит моноамины в физиологически активной концентрации, причем, в отличие от се-

ротонина, катехоламины присутствуют в ликворе и на Э18. Однако эти данные не могут служить прямым доказательством того, что мозг является единственным источником моноаминов в ликворе. Действительно, в отсутствие гематоэнцефалического барьера для моноаминов в перинатальном периоде [14, 29, 30], а также при возможности обмена веществ между ликвором и кровью в области хориоидного сплетения в боковых желудочках, в циркуляторных органах и в области каудального венозного синуса даже у взрослых животных [7], нельзя исключить, что моноамины поступают в ликвор не только из нейронов мозга, но и из кровотока. Тем более, что на периферии имеются такие мощные источники моноаминов, как надпочечники, желудочно-кишечный тракт и симпатическая нервная система [31–33].

Ответить в первом приближении на вопрос, является ли мозг единственным источником моноаминов в ликворе, можно, рассчитав интегральный показатель проницаемости всех возможных барьеров на пути моноаминов из крови в ликвор в виде отношения концентрации моноаминов в ликворе и в крови. При этом могут рассматриваться три варианта: (1) коэффициент проницаемости приближается к единице, указывая на отсутствие барьера между ликвором и кровью; (2) коэффициент проницаемости больше единицы, что свидетельствует о барьерном препятствии поступления моноаминов из ликвора в кровь; (3) коэффициент проницаемости меньше единицы, что свидетельствует о барьерном ограничении поступления моноаминов из крови в ликвор.

Для расчета коэффициента проницаемости барьеров между ликвором и кровью для моноаминов концентрация моноаминов была измерена как в ликворе, так и в крови крыс в онтогенезе. Выявлено сходство в возрастной динамике изменений концентрации моноаминов – дофамина, норадреналина и серотонина – в плазме. В незначительной концентрации эти моноамины обнаружены в крови на Э18, к П5 их концентрация многократно возрастает, а затем к П30 снижается практически до уровня на Э18. Тем не менее, концентрация отдельных моноаминов в каждой возрастной группе существенно различается. Так, например, на П5 концентрация норадреналина в плазме в 15 раз больше, чем дофамина, и более чем в 150 раз меньше концентрации серотонина.

Определение соотношения концентраций моноаминов в ликворе и крови показало, что коэффициент проницаемости барьеров между ликвором и кровью на Э18 равен 8.5 и 13 для норадреналина и дофамина соответственно. Это означает, что катехоламины, содержащиеся в ликворе, поступают туда только из мозга. Для серотонина такие расчеты не могли быть проведены, поскольку серотонин в ликворе плодов в это время не определяется. В постнатальном периоде, хотя коэффициент проницаемости для катехоламинов значительно снижается, он остается больше единицы. Это означает, что и в этот период катехоламины поступают в ликвор только из нейронов мозга.

В отличие от катехоламинов коэффициент проницаемости для серотонина на П5 лишь незначительно меньше единицы, однако он резко возрастает к П30. Это означает, что барьер, препятствующий обмену моноаминов между ликвором и кровью, действует и для серотонина. Наиболее важным доказательством того, что моноамины не способны проникать через барьеры на пути из крови в ликвор, служит высокий уровень адреналина в крови крыс на П5 и П30 при его отсутствии в ликворе у крыс такого же возраста. Полученные данные подтверждают представления о существовании в пре- и постнатальном периоде барьеров, препятствующих поступлению веществ из ликвора в кровь и обратно [34–36].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены доказательства того, что: (1) ликвор взрослых крыс и крыс в перинатальном периоде содержит функционально наиболее значимые моноамины – дофамин, норадреналин и серотонин; (2) моноамины, содержащиеся в ликворе, имеют преимущественно нейрональное (мозговое) происхождение и практически не поступают из общей системы циркуляции; (3) моноамины содержатся в ликворе в физиологически активной концентрации, в которой они могут действовать в качестве нейрогормонов в объемной нейротрансмиссии – в перинатальном периоде в необратимой регуляции развития нейронов в качестве морфогенетических факторов, а у взрослых животных – в обратимой регуляции функциональной активности нейронов-мишеней. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (№ 20-14-00325).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fuxe K., Borroto-Escuela D.O. // Neural. Regen. Res. 2016. V. 11. № 8. P. 1220–1223.
2. Ugrumov M.V. // Int. J. Dev. Biol. 1997. V. 41. № 6. P. 809–816.

3. Gaspar P., Cases O., Maroteaux L. // Nat. Rev. Neurosci. 2003. V. 4. № 12. P. 1002–1012.
4. Pronina T., Ugrumov M., Adamskaya E., Kuznetsova T., Shishkina I., Babichev V., Calas A., Tramu G., Mailly P., Makarenko I. // J. Neuroendocrinol. 2003. V. 15. № 6.

- P. 549–558.
5. Izvol'skaia M., Duittoz A.H., Tillet Y., Ugrumov M.V. // *Brain Struct. Funct.* 2009. V. 213. № 3. P. 289–300.
 6. Shaywitz B.A., Anderson G.M., Cohen D.J. // *Brain Res.* 1985. V. 349. № 1–2. P. 225–232.
 7. Abbott N.J., Pizzo M.E., Preston J.E., Janigro D., Thorne R.G. // *Acta Neuropathol.* 2018. V. 135. № 3. P. 387–407.
 8. Kaur C., Ling E.A. // *Histol. Histopathol.* 2017. V. 32. № 9. P. 879–892.
 9. Муртазина А.Р., Пронина Т.С., Чандрян К.И., Дильмухаметова Л.К., Бондаренко Н.С., Блохин В.Е., Богданов В.В., Угрюмов М.В. // *Онтогенез.* 2021. Т. 52. № 6. С. 467–475.
 10. Zappaterra M.W., LaMantia A.S., Walsh C.A., Lehtinen M.K. // *J. Vis. Exp.* 2013. № 73. P. e50333.
 11. Liu L., Duff K. // *J. Vis. Exp.* 2008. № 21. P. e960.
 12. Ashwell K.W.S., Paxinos G. *Atlas of the developing rat nervous system.* 3d ed. London: Acad. Press, 2008.
 13. Vigh B., Manzano e Silva M.J., Frank C.L., Vincze C., Czirok S.J., Szabó A., Lukáts A., Szel A. // *Histol. Histopathol.* 2004. V. 19. № 2. P. 607–628.
 14. Ugrumov M.V. // *Neurochem. Res.* 2010. V. 35. № 6. P. 837–850.
 15. Угрюмов М.В. *Механизмы нейроэндокринной регуляции.* М.: Наука, 1999. 299 с.
 16. Nguyen L., Rigo J.M., Rocher V., Belachew S., Malgrange B., Rogister B., Leprince P., Moonen G. // *Cell Tissue Res.* 2001. V. 305. № 2. P. 187–202.
 17. Niederkofler V., Asher T.E., Dymecki S.M. // *ACS Chem. Neurosci.* 2015. V. 6. № 7. P. 1055–1070.
 18. Thomas G.B., Cummins J.T., Smythe G., Gleeson R.M., Dow R.C., Fink G., Clarke I.J. // *J. Endocrinol.* 1989. V. 121. P. 141–147.
 19. Liu J., Morrow A.L., Devaud L., Grayson D.R., Lauder J.M. // *J. Neurosci.* 1997. V. 17. № 7. P. 2420–2428.
 20. Dai S.Q., Yu L.P., Shi X., Wu H., Shao P., Yin G.Y., Wei Y.Z. // *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2014. V. 47. № 9. P. 759–765.
 21. Martínez-Méndez R., Padilla-Cortés P., Gómez-Chavarín M., Gutiérrez-Ospina G. // *PeerJ. PrePrints.* 2016. V. 4. P. e1782v1. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.1782v1>
 22. Baba H., Shimoji K., Yoshimura M. // *Anesthesiology.* 2000. V. 92. № 2. P. 473–484.
 23. Ghosh A., Purchase N.C., Chen X., Yuan Q. // *Front. Cell. Neurosci.* 2015. V. 9. P. 450.
 24. Bacon T.J., Pickering A.E., Mellor J.R. // *Cerebral Cortex.* 2020. V. 30. № 12. P. 6135–6151.
 25. Bruinink A., Lichtensteiger W. // *J. Neurochem.* 1984. V. 43. № 2. P. 578–581.
 26. Schlumpf M., Bruinink A., Lichtensteiger W., Cortés R., Palacios J.M., Pazos A. // *Dev. Pharmacol. Ther.* 1987. V. 10. № 6. P. 422–435.
 27. Happe H.K., Coulter C.L., Gerety M.E., Sanders J.D., O'Rourke M., Bylund D.B., Murrin L.C. // *Neuroscience.* 2004. V. 123. № 1. P. 167–178.
 28. Zhang L., Lidow M.S. // *Int. J. Dev. Neurosci.* 2002. V. 20. № 8. P. 593–606.
 29. Miyaguchi H., Kato I., Sano T., Sobajima H., Fujimoto S., Togari H. // *Pediatr. Int.* 1999. V. 41. № 4. P. 363–368.
 30. Murtazina A.R., Nikishina Y.O., Bondarenko N.S., Dil'mukhametova L.K., Sapronova A.Y., Ugrumov M.V. // *Brain Struct. Funct.* 2019. V. 224. № 9. P. 3059–3073.
 31. *Catecholamine research: From molecular insights to clinical medicine: Advances in Behavioral Biology.* V. 53 / Eds Nagatsu T., Nabeshima T., McCarty R., Goldstein D.S. Springer, 2002. 558 p.
 32. Goldstein D.S., Eisenhofer G., Kopin I.J. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003. V. 305. № 3. P. 800–811.
 33. Bornstein S.R., Ehrhart-Bornstein M., Androutsellis-Theotokis A., Eisenhofer G., Vukicevic V., Licinio J., Wong M.L., Calissano P., Nisticò G., Preziosi P., et al. // *Mol. Psychiatry.* 2012. V. 17. № 4. P. 354–358.
 34. Redzic Z. // *Fluids Barriers CNS.* 2011. V. 8. № 1. P. 3.
 35. Saunders N.R., Daneman R., Dziegielewska K.M., Liddelov S.A. // *Mol. Aspects. Med.* 2013. V. 34. № 2–3. P. 742–752.
 36. Bueno D., Parvas M., Nabiuni M., Miyan J. // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2020. V. 102. P. 3–12.