



УДК 612.816.7:615.214.001.6

## РАЗЛИЧИЯ В МЕХАНИЗМАХ АУТОРЕЦЕПТОРНОЙ РЕГУЛЯЦИИ БИОСИНТЕЗА И ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ДОФАМИНА В ПОДКОРКОВЫХ СТРУКТУРАХ МОЗГА КРЫС

КУДРИН В. С., МИРОШНИЧЕНКО И. И., РАЕВСКИЙ К. С.

НИИ фармакологии АМН СССР, Москва

С помощью метода ВЭЖХ с электрохимической детекцией показано, что антагонисты дофамина (ДА)—галоперидол (1 мг/кг), сульпирид (50 мг/кг) и карбидин (25 мг/кг) увеличивают накопление ДОФА, диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) в стриатуме и прилежащем ядре мозга крыс на фоне ингибитора ДОФА—декарбоксилазы (3-оксисбензилгидразин (3-ОН-БГ) 50 мг/кг), что указывает на активацию тирозингидроксилазы и усиление высвобождения ДА из нервных терминалей.  $\gamma$ -Бутиролактон на фоне 3-ОН-БГ усиливает накопление ДОФА, что обусловлено снижением активности ДА-ауторецепторов. Причиной этого является блокада импульсного потока в ДА-ергических нейронах и уменьшение высвобождения ДА. В этих условиях агонист ДА-рецепторов апоморфин (0,3 мг/кг), активируя ауторецепторы, препятствует накоплению ДОФА и ДОФУК. Галоперидол и сульпирид отчетливо инвертируют действие апоморфина, что выражается в увеличении уровня ДОФА и ДОФУК. В отличие от этого, карбидин проявляет антагонизм к апоморфину только в отношении высвобождения ДА, на что указывает увеличение уровня ДОФУК.

Полученные результаты позволяют предположить, что синтез и высвобождение ДА регулируются различными типами ДА-ауторецепторов.

Как известно, нейролептики ускоряют кругооборот ДА в головном мозгу двумя основными механизмами: блокируют постсинаптические ДА-рецепторы, в результате чего ДА-ергические нейроны активизируются по механизму обратной нейрональной связи; блокируют ДА-ауторецепторы, вследствие чего нарушается ингибирование активности тирозингидроксилазы (ТГ) ДА [1].

ДА-рецепторы подразделяются на два основных типа: активирующие дефаминчувствительную аденилатциклазу (D<sub>1</sub>) и ингибирующие или не влияющие на ее активность (D<sub>2</sub>) [2]. По анатомической локализации ДА-рецепторы делятся на пре- и постсинаптические. Полагают, что пресинаптические ДА-рецепторы (ауторецепторы) локализованы на нервных окончаниях, соме и дендритах ДА-нейронов, а постсинаптические ДА-рецепторы расположены на других (холин-, ГАМК-ергических) нейронах [3]. Кроме того, показано, что ауторецепторы по своим свой-

ствам весьма сходны с постсинаптическими ДА-рецепторами  $D_2$  типа [4], но, по-видимому, представляют собой отдельный пул, так как найдены их специфические агонисты—соединения 3-PPP и TL-99. Атипично-хотическое действие атипичных нейролептиков принято связывать с блокадой пресинаптических ДА-рецепторов.

Для оценки функционирования ДА-ауторецепторов на аксональных терминалах в настоящее время широко используется метод, основанный на фармакологическом эффекте  $\gamma$ -бутиролактона ( $\gamma$ -БЛ) [5], который прерывает импульсацию в ДА нейронах, в результате чего снижается выброс медиатора в синаптическую щель, и, таким образом, уменьшается стимуляция пресинаптических ауторецепторов. В свою очередь, это ведет к активации ТГ и накоплению внутриклеточного ДА. Указанный эффект устраняется агонистами ДА-рецепторов, например, апоморфином (АПО) [6]. Антагонисты  $D_2$ -рецепторов, к которым относятся многие нейролептики, инвертируют действие АПО.

В настоящей работе была поставлена задача оценить участие ауторецепторов ДА в реализации фармакологического действия атипичного нейролептика карбидина в nigrostriарной и мезолимбической ДА-ергических системах мозга. Карбидин (3,6-диметил-1, 2, 3, 4, 4a, 9a-гексагидро- $\gamma$ -карболлин-дигидрохлорид) по своему фармакологическому спектру занимает положение между классическими и атипичными нейролептиками [7]. Для сравнения были использованы атипичный нейролептик сульпирид, селективный антагонист  $D_2$ -рецепторов и эталонный нейролептик галоперидол, который воздействует на оба типа рецепторов [8].

### Материалы и методы

Опыты проводили на белых крысах-самцах линии *Wistar* массой 180—220 г. Скорость биосинтеза ДА *in vivo* в структурах мозга крыс оценивали по накоплению его предшественника—ДОФА в ткани мозга после ингибирования декарбоксилазы ароматических аминокислот (ДААК) 3-ОН-БГ («Aldrich», США), который вводили животным в дозе 50 мг/кг за 30 мин до декапитации; галоперидол—1 мг/кг, сульпирид—50 мг/кг или карбидин—25 мг/кг за 15 мин до инъекции 3-ОН-БГ [10]. Все вещества вводили внутривенно в объеме 2 мл/кг. При изучении пресинаптической регуляции биосинтеза ДА препараты вводили животным в следующей последовательности: нейролептики в вышеуказанных дозах или физиологический раствор (2 мл/кг) контрольной группе вводили за 45 мин,  $\gamma$ -БЛ—750 мг/кг за 40 мин, АПО—0,3 мг/кг, растворенный в 0,1%-ном растворе аскорбиновой кислоты в физиологическом растворе, за 35 мин и 3-ОН-БГ 50 мг/кг за 30 мин до декапитации. Содержание порадриналина (НА), ДОФА, ДА и ДОФУК в структурах мозга определяли методом ВЭЖХ с электрохимической детекцией. Мозг извлекали, на холоде выделяли ДА-содержащие структуры: стриатум и прилежащее ядро перегородки, которые гомогенизировали соответственно в 20 и 40 объемах 0,1н. HClO<sub>4</sub> с добавлением внутреннего стан-

дарты—диоксибензиламида (ДОБА) 100 нг/мл. Затем пробы центрифугировали при 10 000g в течение 10 мин. Катехоламины, ДОФА и ДОФУК осаждали на окиси алюминия в присутствии 1 мл трис-ЭДТА 1,5 М буфера, рН 8,6. После 3-кратной промывки по 2 мл бидистиллированной водой катехоламины элюировали с  $Al_2O_3$  через целлюлозные фильтры (0,2 мкм) 200 мкл 0,1 н.  $HClO_4$  центрифугированием при 1000g, в течение 1 мин [9].

Разделение изучаемых веществ проводили на хроматографе LC-304 T (BAS, США). Использовали термостатируемую при 35° октадецилсилиловую колонку (4,6 мм×250 мм), «Biophase RP-18» и двойной амперометрический детектор LC-4B с ячейкой LC-17D. Потенциал, приложенный к рабочим стеклоуглеродным электродам TL-5, составлял +650 мВ против  $Ag/AgCl$  электрода сравнения RE-1. Скорость элюции—2 мл/мин. В качестве подвижной фазы использовали 0,15 М буфер монохлоруксусной кислоты, содержащей 2 мМ  $Na_2$  ЭДТА и 25—30 мг/л ионопарного реагента октилсульфата натрия (BAS, США), рН 3,0 [9]. Все реактивы были высокого класса чистоты: о.с.ч. или analytical grade.

Полученные данные статистически обрабатывали, используя t-критерий Стьюдента и U-критерий Манна-Уитни.

### Результаты и обсуждение

Как видно из таблицы,  $\gamma$ -БЛ вызывает отчетливое увеличение накопления ДОФА и уровня ДА по сравнению с контролем, причем в стриатуме эффект выражен сильнее, чем в прилежащем ядре. Агонист ДА-рецепторов АПО в дозе 0,3 мг/кг уменьшает вызванное  $\gamma$ -БЛ накопление ДОФА и замедляет оборот ДА, по-видимому, за счет снижения интенсивности высвобождения из нервных окончаний, о чем свидетельствует достоверное уменьшение уровня ДОФУК как в стриатуме, так и в прилежащем ядре.

Нейролептики при системном однократном введении увеличивали накопление ДОФА в структурах стриатума и прилежащего ядра, что указывает на активацию биосинтеза ДА (рис. 1). Наибольшим эффектом обладал галоперидол, который также вызывал значительное увеличение содержания ДОФУК, уменьшая при этом уровень НА и ДА по сравнению с контролем (только 3-ОН-БГ) в обеих исследованных структурах (таблица). Умеренное увеличение содержания ДОФУК в изучаемых структурах наблюдалось и в случае применения карбидина и сульпирида (рис. 1).

АПО, не вызывая существенных сдвигов в содержании аминов, отчетливо уменьшал эффект накопления ДОФА, отмеченный при введении  $\gamma$ -БЛ и снижал уровень ДОФУК (таблица). Как видно из рис. 2, галоперидол и сульпирид устраняли ингибирующее действие АПО на синтез и высвобождение в стриатуме и прилежащем ядре, увеличивая накопление ДОФА и уровень метаболита ДА—ДОФУК. Карбидин, в

отличие от двух других нейролептиков, не инвертировал ингибирующее влияние АПО на биосинтез ДОФА, но повышал содержание ДОФУК, что, как полагает Commissiong [11], указывает на усиление высвобождения ДА из терминалей ДА-ергических нейронов.

Таблица

Влияние апоморфина и галоперидола на содержание катехоламинов и их метаболитов в условиях ингибирования декарбоксилазы ароматических аминокислот и блокады импульсного потока

Условия опыта	НА	ДОФА	ДА	ДОФУК
3-ОН-БГ (50)	1,32±0,05	7,62±0,20	47,1±1,9	4,51±0,53
3-ОН-БГ+галоперидол (1)	0,81±0,05 <sup>a</sup>	30,4±1,42 <sup>a</sup>	41,0±1,6	10,42±0,71 <sup>a</sup>
3-ОН-БГ+γ-БА (750)	0,85±0,08 <sup>a</sup>	19,77±1,16 <sup>a</sup>	77,3±4,0 <sup>a</sup>	3,81±0,26
3-ОН-БГ+γ-БА+АПО (0,3)	1,22±0,14	10,05±1,04 <sup>b</sup>	71,0±4,1	2,37±0,23 <sup>b</sup>

Прилежащее ядро

3-ОН-БГ (50)	7,15±0,85	8,29±0,50	34,9±2,0	4,16±0,48
3-ОН-БГ+Галоперидол (1)	4,72±0,57 <sup>a</sup>	22,46±1,68 <sup>a</sup>	23,5±1,1 <sup>a</sup>	8,88±0,40 <sup>a</sup>
3-ОН-БГ+γ-БА (750)	5,94±0,55	11,65±0,60 <sup>a</sup>	53,7±2,4 <sup>a</sup>	3,87±0,33
3-ОН-БГ+γ-БА+АПО (0,3)	7,0±0,9	5,33±0,59 <sup>b</sup>	45,9±1,5	2,42±0,24 <sup>b</sup>

Примечание. Все данные выражены в мкмоль/г ткани; <sup>a</sup>  $p < 0,05$ , отличие от контроля (только 3-ОН-БГ). <sup>b</sup>  $p < 0,05$ , отличие от контроля (3-ОН-БГ+γ-БА), эффект АПО в условиях выключенного импульсного потока. В скобках указана доза в мг вещества/кг веса животного.

Известно, что АПО замедляет синтез ДА, ингибируя активность ТГ в срезах и синапсосомах стриатума [12]. Кроме того, показано, что АПО, обладая катехолподобной структурой, может ингибировать ТГ конкурентно по отношению к птеридиновому кофактору [6]. Активация ТГ может быть следствием многих факторов: ингибирования пре- и постсинаптических рецепторов ДА, снижения ингибирующего воздействия конечным продуктом, активации протеникиназной системы, аллостерической регуляции и т. д. [13].

Карбидин и сульпирид активировали ТГ *in vivo*, увеличивая синтез и метаболизм ДА, хотя и значительно менее эффективно, чем галоперидол. Это свойство, как известно, характерно для всех нейролептиков, однако сильнее выражено у типичных представителей данного класса.

Вклад пресинаптического компонента регуляции активности ТГ оценивали с помощью модельных опытов с γ-БА и АПО. Уменьшение накопления ДОФА АПО при выключенном импульсном потоке, как полагают, связано с активацией пресинаптических ДА-рецепторов, функция которых состоит в ингибировании биосинтеза нейромедиатора [5]. Наши данные подтверждают эту гипотезу. Галоперидол и сульпирид заметно

инвертировали ингибирующее действие АПО. Как известно [8], нейролептики *in vitro* не активируют ТГ, и поэтому можно исключить конкурентное взаимодействие АПО и нейролептиков на молекуле фермента. При этом галоперидол вызывал более значительное накопление ДОФА, а повышение уровня ДОФУК под влиянием обоих нейролептиков было приблизительно одинаковым. Поскольку сульпирид в отсутствие  $\gamma$ -БЛ вызывал лишь незначительное увеличение синтеза и оборота ДА, логично допустить, что пресинаптический компонент является главенст-

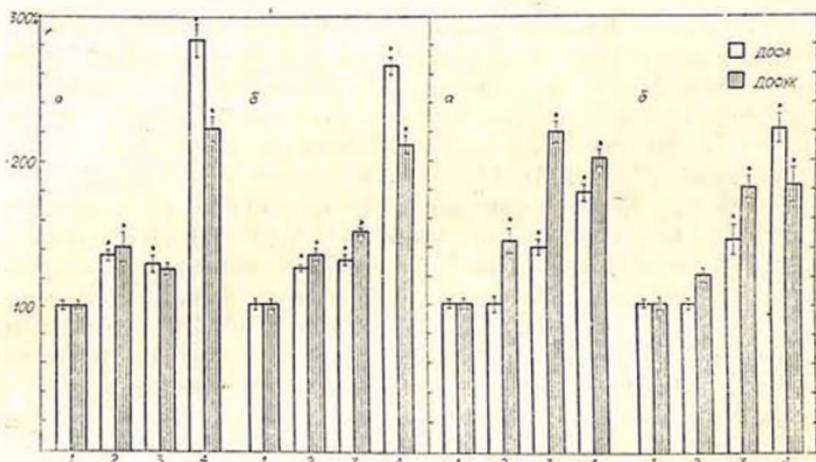


Рис. 1. Влияние нейролептиков на биосинтез и оборот дофамина в стриатуме (а) и прилежащем ядре (б) мозга крыс. Здесь и на рис. 2: 1—контроль; 2—карбидин, 25 мг/кг, 45 мин; 3—сульпирид, 50 мг/кг, 45 мин; 4—галоперидол, 1 мг/кг, 45 мин. Всем животным через 15 мин после введения препарата или 0,9%-ного NaCl (контроль) делали инъекцию 3-ОН-БГ, 50 мг/кг; \*—достоверные отличия от контроля ( $p < 0,05$ ); данные представлены в % от контроля

Рис. 2. Устранение ингибирующего воздействия апоморфина (0,3 мг/кг) на синтез и высвобождение дофамина в стриатуме (а) и прилежащем ядре (б) мозга крыс. Всем животным через 5 мин после введения препарата или 0,9%-ного NaCl вводили апоморфин (0,3 мг/кг), через 10 мин— $\gamma$ -БЛ (750 мг/кг), через 15 мин—3-ОН-БГ (50 мг/кг); \*—достоверные отличия от контроля ( $p < 0,05$ ); данные представлены в % от контроля

ающим в механизме действия этого нейролептика. Наши результаты согласуются с ранее полученными данными [14], согласно которым сульпирид рассматривается как специфический антагонист пресинаптических рецепторов типа  $D_2$ . Действие галоперидола менее избирательно, он воздействует как на пре-, так и на постсинаптические рецепторы, нельзя исключить и прямого его воздействия на активность ТГ, отмеченной в условиях *in vitro* [14].

Карбидин, нейролептик с антидепрессивным компонентом фармакологического действия [7], обладает своеобразным спектром действия

как в поведенческих [15, 16], так и в биохимических экспериментах [16, 17]. Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что карбидин не блокирует пресинаптические рецепторы, регулирующие биосинтез ДА по принципу «обратной связи», однако стимулирует высвобождение медиатора, показателем чего служит увеличение уровня ДОФУК [11] при выключении импульсного потока ДА-ергического нейрона.

Ранее нами было показано *in vitro*, что карбидин в незначительной степени ингибирует активность ТГ, причем эффект проявлялся только в условиях деполаризации синапсом стриатума и не был связан с вовлечением ауторецепторов ДА, тогда как сульфид снижал ингибирующий эффект ДА на активность ТГ независимо от концентрации  $K^+$  в среде инкубации, не оказывая непосредственного влияния на фермент, что служит еще одним подтверждением пресинаптического действия этого нейрорептика [18].

В последнее время описан специфический антагонист  $D_1$ -рецепторов SCH 23390, который не снимает вызванное АПО угнетение активности ДА-нейронов, слабо стимулирует синтез ДА и не влияет на кинетические свойства ТГ [19]. Как видно из проведенных нами исследований, карбидин, так же как и SCH 23390, не влияет на ДА-ауторецепторы, регулирующие биосинтез ДА. В то же время он практически не изменял активность ДА-чувствительной аденилатциклазы в гомогенате стриатума крыс [20], что свидетельствует о низком сродстве к  $D_1$ -рецепторам, однако увеличение накопления ДОФА под воздействием карбидина в отсутствие  $\gamma$ -БЛ, указывает на то, что нельзя исключить и влияние препарата на постсинаптические  $D_2$ -рецепторы.

Как было показано нами ранее [16], карбидин, подобно другим нейрорептикам, *in vitro* усиливает как спонтанное, так и  $K^+$  (30 мМ) стимулированное высвобождение [ $^3H$ ] ДА из синапсом стриатума и прилежащего ядра. Кроме того, сульфид и карбидин устраняют ингибирующее действие ДА на высвобождение [ $^3H$ ] ДА из синапсом прилежащего ядра. Таким образом, в данной работе было получено подтверждение того, что карбидин является антагонистом ДА в механизме регуляции высвобождения медиатора из аксональных терминалей как нигростриатной, так и мезолимбической ДА-ергических систем. Высказано предположение, что механизм ауторецепторной регуляции высвобождения ДА отличается от такового по отношению к биосинтезу ДА [21]. Так, на окончаниях ДА-ергических нейронов префронтальной коры функционируют только ауторецепторы, регулирующие высвобождение ДА и отсутствуют ауторецепторы, регулирующие биосинтез ДА [22].

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что карбидин не оказывает влияния на пресинаптическую регуляцию биосинтеза ДА в подкорковых структурах мозга крыс и, возможно, является специфическим антагонистом ДА-ауторецепторов, регулирующих высвобождение медиатора. На основании этих данных можно заключить, что на

ДА-ергических окончаниях в стриатуме и прилежащем ядре перегородки ДА-ауторецепторы можно функционально разделить на два подтипа—независимо регулирующие биосинтез и высвобождение медиатора, а карбидин является специфическим инструментом для этой дифференцировки.

## DIFFERENCE IN THE MECHANISM OF THE AUTORECEPTOR REGULATION OF DOPAMINE RELEASE AND BIOSYNTHESIS IN RAT BRAIN SUBCORTICAL REGIONS

KUDRIN V. S., MIROSHNICHENKO I. I., RAYEVSKY K. S.

Institute of Pharmacology, USSR Academy of Medical Sciences,  
Moscow

The antagonists of dopamine (DA)—haloperidol, sulpiride and carbidine (1; 50; 25 mg/kg i. p. respectively) stimulated the accumulation of DOPA and DOPAC following inhibition of the DOPA decarboxylase with m-hydroxybenzylhydrazine (m-HBH) 50 mg/kg, i. p. in the striatum and n. accumbens of Wistar male rats. The accumulation of DOPA and DOPAC determined by HPLC EC served as an index of tyrosine hydroxylase activity and release of DA respectively. Joint administration of gamma-butyrolactone and m-HBH caused an increase in DOPA levels. Systemic administration of direct-acting agonist of DA apomorphine (APO; 0.3 mg/kg, i. p.) prevented the increase in DOPA levels and decreased DOPAC levels presumably through stimulation of autoreceptors. Haloperidol and sulpiride nullified the inhibitory effects of APO both on the release and synthesis of DA. Carbidine blocked the inhibitory effect of APO only on the release of DA, resulting in the increase in DOPAC levels. Data obtained can be interpreted as indicative of the release and biosynthesis of DA to be controlled by different subtypes of DA autoreceptors.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Kehr W., Carlsson A., Lindqvist M. *Adv. Neurology*, v. 9, p. 185–195, 1975.
2. Keabian J. W., Calne D. B. *Nature*, v. 277, № 5726, p. 93–96, 1979.
3. Nowycky M. C., Roth R. H., Naunyn-Schmiedeberg's *Arch. Pharmacol.*, v. 289, № 5, p. 419–427, 1977.
4. Feenstra M. G. P., Sumners C., Goedemoed J. H., de Vries J. B., Rollema H., Horn A. S., Naunyn-Schmiedeberg's *Arch. Pharmacol.*, v. 324, № 2, p. 108–115, 1983.
5. Walters J. R., Roth R. H., Naunyn-Schmiedeberg's *Arch. Pharmacol.*, v. 2'6, № 1, p. 5–14, 1976.
6. Saller C. F., Salama A. I. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 121, № 2, p. 181–188, 1985.
7. Бэрков Н. К., Фармакология и токсикология, т. 36, № 2, с. 154–157, 1973.
8. Magnusson O., Fowler C. J., Kohler C., Orgen S. O. *Neuropharmacology*, v. 25, № 2, p. 187–197, 1986.
9. Bruntlett C. S. *Current Separation BAS*, v. 2, № 2, p. 8–9, 1989.
10. Kehr W., Naunyn-Schmiedeberg's *Arch. Pharmacol.*, v. 284, № 2, p. 149–159, 1974.

11. *Commissstong J. W.* Biochem. Pharmacol., v. 34, № 8, p. 1127—1131, 1985.
12. *Laschinski G., Kittner B., Brautigam M., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 327, № 2, p. 114—118, 1981.
13. *Masserano J. M., Weiner N.* Mol. and Cell. Biochem., v. 53/54, № 1, p. 129—152, 1983.
14. *Mineyeva M. F., Kudrin V. S., Shemanov A. Ju.* Drug Depend. Emoth. Behav.: Neurochem. Neurophysiol. Approach, New-York, Plenum Press, p. 303—325, 1986.
15. *Калинин В. В.* Фармакология и токсикология, т. 40, № 1, с. 16—19, 1977
16. *Kudrin V. S., Hetey L., Morgenstern R., Rayevsky K. S., Oelssner W.*, Biogenic Amines, v. 3, № 2, p. 153—159, 1985.
17. *Мирошниченко И. И., Кудрин В. С., Раевский К. С.* Тезисы I Всесоюзн. конф «Химия, биохимия и фармакология производных индола», с. 103, Тбилиси, 1986.
18. *Мсос А. А., Кудрин В. С., Раевский К. С.*, Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 98, № 9, с. 305—307, 1984.
19. *Onali P., Mereu G., Oltanas M. C., Bunse B., Rosetti Z., Gesa G. L.*, Brain Res., v. 340, № 1, p. 1—7, 1985.
20. *Жарковский А. М., Классен Н. Е., Жарковская Т. А.* Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 99, № 6, с. 700—702, 1985.
21. *Brown F., Campbell W., Mitchell P. J., Randall P.* Brit. J. Pharmacol., v. 84, № 4, p. 853—860, 1985.
22. *Vannon M. J., Mtschaud R. L., Roth R. H.* Mol. Pharmacol., v. 19, № 3, p. 270—275, 1981.

Поступила 20. IV 1987

---

*Нейропептиды и поведение, т. 2. Гормоны нейрогипофиза. Pergamon Press, 190 с, 1986.*

*Neuropeptides and Behavior. v. 2. The Neurohypophysial Hormones. (Ed. D. De Wied et al.), Pergamon Press, Oxford, England, 1986, 190 p.*

Эта книга является вторым томом серии «Нейропептиды и поведение», где сведены современные обзоры относительно центральных эффектов нейрогипофизарных гормонов, их локализации, распределения и процессинга. В том включены следующие статьи: В. Т. Pickering et al. «Биосинтез и процессинг нейрогипофизарных гормонов»; Г. Р. Kozlowski et al. «Локализация нейрогипофизарных гормонов в мозгу млекопитающих»; Р. М. Vuijs «Вазопрессин и окситоцин, их роль в нейротрансмиссии»; Д. Н. G. Versteeg «Нейрогипофизарные гормоны и функция мозга»; Р. Е. J. Dybale, А. Т. Paterson «Нейрогипофизарные эффекты окситоцина и вазопрессина»; Т. J. B. Van Wimersma Greidanus et al. «Вазопрессин и память»; Г. L. Kovacs, G. L. Kovacs «Роль окситоцина в процессах памяти и в амнезии»; С. А. Pedersen, А. J. Prange, Jr. «Окситоцин и материнский инстинкт у крыс»; В. Sturpp et al. «Нейрогипофизарные пептиды в толерантности и зависимости».

Предназначена для фармакологов, нейрологов, биохимиков и эндокринологов.