



УДК 615.214.2.015.4:612.822.1.014.467

ВЛИЯНИЕ L-3,4-ДИОКСИФЕНИЛАЛАНИНА НА ГИДРОКСИЛИРОВАНИЕ ТИРОЗИНА И СОДЕРЖАНИЕ БИОГЕННЫХ АМИНОВ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ В СИНАПТОСОМАХ ПОЛОСАТОГО ТЕЛА МОЗГА КРЫС

ШЕМАНОВ А. Ю., МИРОШНИЧЕНКО И. И., КУДРИН В. С., РАЕВСКИЙ К. С.

Институт фармакологии АМН СССР, Москва

Показано, что мадопар (L-ДОФА: бенсеразид—4:1) при системном введении крысам вызывал угнетение гидроксилирования тирозина, а также уменьшение относительного ингибиторного эффекта дофамина (ДА) на скорость данной реакции и увеличение уровней L-ДОФА, ДА, 3,4-диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) в синаптических везикулах, полученных из полосатого тела мозга. Содержание гомованилиновой кислоты (ГВК), норадреналина (НА), 5-окситриптамина (5-ОТ) и 5-оксиндолуксусной кислоты (5-ОИУК) не изменялось. Предполагается, что угнетение гидроксилирования тирозина в синаптических везикулах крыс, получающих мадопар, объясняется повышением концентрации ДА в микроокружении фермента тирозингидроксилазы. Рассматривается возможная роль увеличения содержания ДА в синаптических везикулах мозга крыс, получающих мадопар, в механизме уменьшения относительного ингибиторного эффекта этого медиатора на гидроксилирование тирозина. Обсуждается проблема компартментации ДА в нервных окончаниях и механизмы регуляции активности тирозингидроксилазы мозга.

В настоящее время имеются данные, указывающие на существование функционально различных «пулов» резервирования ДА в пресинаптических нервных окончаниях ДА-ергических систем мозга животных. Наиболее признанным можно считать выделение пула хранения ДА (стабильного) и пула вновь синтезированного нейротрансмиттера (лабильного). Предполагается, что процесс высвобождения ДА, сопряженный с нервным импульсом, связан преимущественно именно с последним и зависит от скорости синтеза медиатора [1]. Различные психотропные вещества, как оказалось, неодинаковым образом влияют на содержание медиатора в различных пулах [2]. Имеются данные, указывающие на функциональные различия пулов ДА, синтезированного из различных предшественников L-ДОФА, тирозина, L-фенилаланина. Изучение компартментации ДА, синтезированного из различных его предшественников, имеет важное значение для выработки рациональной стратегии заместительной терапии при болезни Паркинсона, патогенез которой связывают с дефицитом ДА-ергической передачи в nigrostriatalной системе мозга [3]. Как известно, существенный прогресс в лечении этого заболевания был достигнут благодаря введению ДОФА, особенно в сочетании

с ингибиторами периферической декарбоксилазы ароматических аминокислот карбидопа и бенсеразидом [4]. Несмотря на то, что имеется значительное число работ, в которых изучались превращения экзогенного ДОФА [5], сведения о происходящих при этом изменениях биосинтеза ДА из тирозина практически отсутствуют. Между тем, такого рода данные могут прояснить некоторые аспекты компартментации ДА, синтезированного из различных предшественников и их роль в регуляции биосинтеза медиаторов. В связи с этим целью данной работы явилось изучение влияния ДОФА, вводимого системно в сочетании с бенсеразидом, на гидроксילирование тирозина—ключевой этап биосинтеза ДА в мозгу крыс—и содержание биогенных аминов и некоторых их метаболитов в синапсосомах полосатого тела мозга этих животных.

Материалы и методы

Опыты проводили на белых крысах-самцах линии Wistar массой 220 ± 50 г. Крысам контрольной группы внутривенно вводили 0,9%-ный раствор хлорида натрия (с добавлением твина-21) из расчета 2 мл/кг. Животным опытной группы вводили суспензию мадопара с твином-21 в 0,9%-ном растворе хлорида натрия из расчета 125 или 250 мг/кг в том же объеме. Через 1 ч после инъекции крыс декапитировали. Коммерческий препарат «Мадопар» («Roche», Швейцария) представляет собой смесь L-ДОФА и бенсеразида в весовом отношении 4:1. Были выбраны дозы мадопара, вызывавшие отчетливые изменения в поведении крыс, наиболее выраженные через 1 ч после введения [6]. Использовали метод определения скорости гидроксילирования меченного по тритию тирозина в синапсосомах (фракция P_2), являющийся модификацией методики Nagatsu и соавт. [7] и в основном соответствовавший процедуре, описанной нами ранее [8]. В данной работе были внесены следующие изменения: буфер инкубации не карбогенизировали; контролем на ферментативное образование меченой воды служили пробы, которые, как и опытные пробы, инкубировали 15 мин при 37° , но при этом синапсосомы вносили после инкубации непосредственно перед добавлением 400 мкл 3,5%-ной ТХУ. Для изменения радиоактивности использовали толуольный сцинтиллятор с тритоном X-100 [9]. Применяли 3,5- ^3H -L-тирозин со специфической активностью 1,85 Ки/ммоль (IZINTA, Венгрия).

Для определения содержания моноаминов в структурах мозга использовали методику ВЭЖХ с электрохимической детекцией. Применяли хроматографию в обращенных фазах с ионопарным реагентом октисульфатом натрия (ОСН). Маточные растворы моноаминов и внутреннего стандарта 3,4-диоксибензиламина (ДОБА) с концентрацией 0,1 мг/мл готовили 2 раза в месяц в 0,1 н. HClO_4 с добавлением 1%-ного м-абисульфита натрия. Рабочие стандарты (100 нг/мл), необходимые для калибровки прибора, готовили ежедневно. Для определения катехоламинов и ДОФА использовали метод избирательного осаждения их на окиси алюминия в щелочной среде. 100 мкл синапсосомной фракции,

разбавляли 0,1 н. HClO_4 до 2 мл. Затем образцы центрифугировали при 10000 g в течение 5 мин. Осаждение на окиси алюминия проводили в градуированном пузырьке. Смесь содержала: 2 мл супернатанта, 2,5 мкл ДОБА, 50 мг Al_2O_3 и 1 мл трис- HCl буфера с 1,5 М ЭДТА, pH 8,6. После трехкратной промывки 2 мл бидистиллированной воды катехоламины и ДОФА элюировали с помощью 200 мкл 0,1 н. HClO_4 центрифугированием через целлюлозные фильтры (0,2 мкм) [10]. Для определения катехоламинов, 5-ОТ, 5-ОИУК, ДОФУК и ГВК к 100 мл синаптосомной смеси добавляли равное количество 0,2 н. HClO_4 , содержащей ДОБА (100 нг/мл). Затем образцы центрифугировали при 15000 g в течение 10 мин. Супернатант фильтровали центрифугированием в течение 2 мин через 0,2 мкм целлюлозные фильтры. 20 мкл чистого фильтрата наносили на колонку путем прямой инъекции [11]. Разделение изучаемых веществ проводили на хроматографе LC-304 T («BAS», США), снабженным инжектором 7125 Rheodyne (США) с 20 мкл петлей для нанесения образцов. Использовали колонку Biophase RP-18 октадецилсилановую 4,6 мм×250 мм, защищенную предколонкой RP-18 4,6 мм×30 мм, 20 мкм. Колонку термостатировали при 45°. В качестве детектора использовали двойной амперометрический детектор LC-4B с ячейками LC-17D и двумя параллельными стеклоуглеродными электродами TL-5. Потенциалы, приложенные к рабочим электродам, составляли +650 мВ и +850 мВ против Ag/AgCl электрода сравнения RE-1. Скорость потока—1 мл/мин. Для определения катехоламинов, 5-ОТ, 5-ОИУК, ДОФУК и ГВК использовали следующую подвижную фазу: маточные растворы 0,02 М лимонной кислоты и 0,02 М NaH_2PO_4 буфера, содержащего 0,269 мМ ЭДТА, смешивали в пропорции 2,4:1. Затем добавляли 0,3 мМ OCH и 40% ацетонитрила, pH 3,6-устанавливали добавлением фосфорной кислоты. Подвижную фазу фильтровали, используя вакуумный насос, через целлюлозные фильтры «Synpro» (0,25 мкм, СССР) [10]. Для определения катехоламинов и ДОФА в качестве подвижной фазы использовали 0,15 М буфер монохлоруксусной кислоты, содержащей 2 мМ $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ и 25—30 мг/л OCH , pH 3,0, которое устанавливали добавлением NaOH . Подвижную фазу также фильтровали [11].

Полученные данные статистически обрабатывали, используя критерий Стьюдента и U-критерий Манна-Уитни. При изучении изменения влияния ДА на гидроксילирование тирозина в синапсосмах под действием введения мадопара сравнивалась величина эффекта ДА, выраженная в % к соответствующему контролю.

Результаты и обсуждение

Эксперименты показали, что мадопар в дозах 125 и 250 мг/кг при внутрибрюшинном введении крысам вызывал угнетение гидроксילирования тирозина в синапсосмах полосатого тела мозга крыс на 30,6 и 35,9% соответственно (рис. 1). Как видно из этих данных, увеличение

дозы вещества в 2 раза в наших опытах практически не сказывалось на эффекте. В дальнейшем в экспериментах применяли дозу 125 мг/кг.

Известно, что процесс гидроксирования тирозина испытывает на себе многосторонний регуляторный контроль в ДА-ергических структурах мозга, причем одним из его эндогенных регуляторов является ДА, способный ингибировать этот процесс. Различные пулы ДА вносят, по-видимому, неодинаковый вклад в регуляцию биосинтеза медиатора [2]. В связи с этим, нами было изучено влияние ДА на скорость реакции в синапсосамах, выделенных из мозга контрольных и получавших мадопар крыс. Результаты этих опытов представлены на рис. 2, из которого следует, что скорость гидроксирования тирозина в синапсосамах из мозга контрольных крыс в присутствии 10^{-6} М ДА уменьшалась до $40,7 \pm 1,8\%$ от исходного уровня, принятого за 100%, в то время как в синапсосамах из мозга крыс, получавших мадопар, — лишь $54,2 \pm 2,5\%$ по отношению к соответствующему контролю. Таким образом, ДА вызывает менее выраженное относительное ингибирование реакции в синапсосамах из мозга животных, которым вводили мадопар, где скорость реакции была исходно снижена на 30% по сравнению с этим показателем для контрольных животных.

Введение экзогенного ДОФА, согласно литературным данным, вызывает увеличение содержания ДОФА, ДА, ДОФУК, ГВК в ДА-ергических нервных окончаниях. Однако в этих работах содержание ДОФА и его метаболитов определяли лишь непосредственно в тканях [5]. Поэтому представлялось интересным выяснить, сохраняются ли указанные изменения уровней этих веществ в синапсосамах. Кроме того, в наших опытах измеряли содержание в синапсосамах стриатума НА, 5-ОТ и его метаболита 5-ОИУК. Как можно видеть из рис. 3, синапсосы полосатого тела мозга крыс, которым вводили мадопар, содержат значительно больше ДОФА, ДА и продукта его окислительного дезаминирования ДОФУК. В то же время содержание ГВК не изменялось, что, по-видимому, связано с преимущественно внесинапсосомным образованием этого метаболита, а также с более высокой, чем для ДОФУК, скоростью его вымывания из тканей [12]. Содержание НА в синапсосах также не изменялось (рис. 3). Это согласуется с данными о том, что экзогенно введенный ДОФА в полосатом теле мозга крыс, по-видимому, не служит источником образования НА, во всяком случае в заметной степени [13]. Вопреки имеющимся сведениям о том, что ДОФА при инкубации с тканью, предварительно «нагруженной» $[^3\text{H}]$ серотонином, способен усиливать высвобождение этого индоламина [14], в наших опытах изменение уровня 5-ОТ и его метаболита 5-ОИУК в синапсосах было небольшим (рис. 3). Полученные данные позволяют предположить, что повышение под действием мадопара уровня ДА в синапсосах является причиной угнетения гидроксирования тирозина. Это предположение, естественно, основано на том, что ДА, возрастание концентрации которого отмечается в синапсосах, имеет доступ к ТГ. Считается, что часть этого фермента, равно как и декарбоксилаза ароматических аминокислот,

находится в растворенном состоянии в цитоплазме нервного окончания, где и протекают, по-видимому, главным образом реакции гидроксирования тирозина и декарбоксилирования ДОФА [1]. Вместе с тем имеются также данные, что значительная часть ТГ ассоциирована с наружной поверхностью мембраны синаптических везикул [15]. Некоторые авторы придают большое значение везикулярному пулу ДА в регуляции активности фермента [6], хотя имеются данные о том, что эта роль зависит

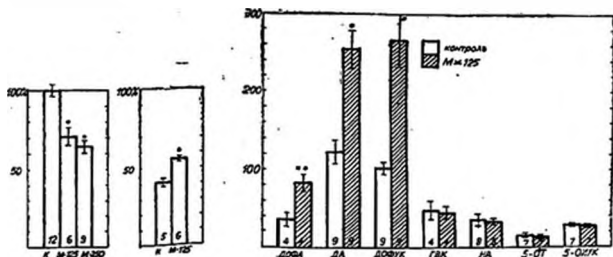


Рис. 1. Влияние системно вводимого мадопара на гидроксирование тирозина в синапсосах полосатого тела. По оси ординат—скорость реакции в % к контролю (100% соответствует 2,43 пмоль/мин/мг белка). Здесь и на рис. 2, 3 цифры в столбиках—количество опытов. К—контроль, М-125—мадопар в дозе 125 мг/кг, М-250—мадопар в дозе 250 мг/кг. * $p < 0,01$ —уровень достоверности отличий от контроля (критерий Стьюдента)

Рис. 2. Влияние системно вводимого мадопара на ингибирование дофамином гидроксирования тирозина в синапсосах полосатого тела. По оси ординат—скорость реакции в % по отношению к соответствующему контролю (ингибированные в отсутствие дофамина синапсосы контрольных животных, получавших мадопар). 100% для синапсосов контрольных крыс соответствует скорости реакции 4,03 пмоль/мин/мг белка. 100% для синапсосов крыс, получавших мадопар, составляет $70 \pm 2,5\%$ от скорости реакции в синапсосах контрольных крыс в отсутствие дофамина. К—контроль, М-125—мадопар в дозе 125 мг/кг. * $p < 0,01$ —уровень достоверности отличия от эффекта дофамина в контроле (критерий Манна-Уитни)

Рис. 3. Влияние системно вводимого мадопара на содержание моноаминов и их метаболитов в синапсосах полосатого тела (в пг/мг белка). * $p < 0,01$ и ** $p < 0,05$ —уровни достоверности отличий от контроля по критерию Манна-Уитни

от используемого предшественника биосинтеза ДА [3]. ДА, по-видимому, влияет на активность двумя способами—действуя через пресинаптические дофаминовые рецепторы и непосредственно ингибируя фермент [1]. Концентрация ДА в цитоплазме нервных окончаний, которая определяет степень прямого влияния ДА на фермент, зависит от протекания 4-х основных процессов. Увеличение концентрации ДА происходит, с одной стороны, благодаря постоянному биосинтезу ДА при участии соответствующих ферментов, а с другой стороны—благодаря обратному захвату

ДА из синаптической щели [17], уровень ДА в которой, в свою очередь, зависит от интенсивности высвобождения медиатора. Напротив, концентрация ДА в цитоплазме уменьшается благодаря захвату ДА синаптическими везикулами [16, 18], а также в результате энзиматического дезаминирования [17]. Таким образом, интенсивность первых двух процессов определяет увеличение ингибирующего влияния ДА на тирозингидроксилазу [17], в то время как депонирование ДА, а также его дезаминирование приводят к уменьшению концентрации ДА в микроокружении фермента, что выражается в повышении его активности [16, 17]. В последнее время появились работы, свидетельствующие о функциональной роли разобщенности пулов ДА, синтезируемого из различных предшественников, хотя механизм их разграничения в нервных окончаниях остается пока неясным [3]. По данным Melamed, Dafni [19], скорость синтеза и метаболизма ДА, образующегося из экзогенного ДОФА, не зависит от частоты импульсации в ДА-ергических нейронах в отличие от соответствующих показателей для ДА, синтезируемого из тирозина; по-видимому, местом накопления ДА, синтезируемого из ДОФА, является преимущественно функционально малоактивный пул. Однако, по нашим данным, синтез ДА из тирозина в условиях введения ДОФА уменьшен. Это, возможно, говорит об отсутствии четкой пространственной разобщенности различных пулов нейротрансмиттера друг от друга, что согласуется с данными об увеличении высвобождения ДА после введения ДОФА, хотя увеличение высвобождения ДА по некоторым данным не коррелирует с повышением уровня ДА в мозгу [20, 5]. Вопрос о том, каким образом и из каких терминалей в полосатом теле высвобождается ДА, синтезированный из ДОФА, остается в настоящее время не вполне ясным, хотя многочисленные факты свидетельствуют о значительной роли ДА-ергических, а не серотонин- или НА-ергических окончаний [5].

Суммируя результаты этой работы, попытаемся выделить наиболее вероятные, с нашей точки зрения, предположения и выводы, которые можно сделать на их основе. В синапсоммах мозга крыс, получавших мадопар, обнаружено повышение содержания ДОФА, ДА и ДОФУК, угнетение гидроксилирования тирозина, а также уменьшение регуляторного действия ингибитора реакции ДА на этот процесс. Увеличение содержания ДА, по-видимому, происходит частично за счет накопления его в синаптических пузырьках нервных окончаний. ДА, содержащийся в них, вероятно, прямо не контактирует с ТГ, однако, находясь в динамическом равновесии с везикулярным ДА, может участвовать в регуляции фермента, в особенности той его фракции, которая ассоциирована с синаптическими везикулами [16]. Поэтому в условиях введения животным ДОФА можно ожидать повышения уровня ДА в цитоплазме, особенно если предположить, что при этом происходит насыщение синаптических везикул дофамином, следствием чего является замедление удаления ДА из цитоплазмы. Эти предположения нуждаются в экспериментальной проверке. С этим согласуется также и наблюдавшийся нами

факт уменьшения относительного ингибиторного эффекта на синаптосомы экзогенного ДА (рис. 2), при инкубации с которым посредством механизма обратного захвата, как можно предполагать, повышается уровень цитоплазматического ДА. Одним из объяснений этого факта может быть то, что ингибиторный эффект ДА при повышении его концентрации увеличивается логарифмически [21], при этом одинаковый прирост содержания ДА в цитоплазме будет приводить к ингибированию реакции в неодинаковой степени, тем меньшей, чем больше исходный уровень медиатора в микроокружении фермента, что, как уже говорилось, может иметь место в данном случае, факт угнетения гидроксирования тирозина после введения ДОФА, по-видимому, свидетельствует об отсутствии полной пространственной разобщенности пулов медиатора, синтезируемого из различных предшественников, что не исключает, однако, их функциональной разобщенности. В качестве ее возможного механизма, по-видимому, может служить ассоциация определенной части ТГ с синаптическими везикулами.

В целом, полученные в этой работе данные свидетельствуют о том, что изучение характеристик синаптосом, выделенных из мозга животных после введения ряда фармакологически активных веществ, может дать важную дополнительную информацию о происходящих в нервных окончаниях процессах, их физиологической регуляции, а также механизмах действия изучаемых веществ.

INFLUENCE OF L-3,4-DIHYDROXYPHENYLALANINE ON TYROSINE HYDROXYLATION AND CONTENT OF BIOGENIC AMINES AND THEIR METABOLITES IN RAT BRAIN STRIATAL SYNAPTOSOMES

SHEMANOV A. Yu., MIROSHNICHENKO I. I., KUDRIN V. S., RAYEVSKY K. S.

Institute of Pharmacology, the USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

After systemic administration, madopar (l-DOPA : benserazide—4:1) was shown to cause an inhibition of tyrosine hydroxylation, as well as a reduction of relative inhibitory effect of dopamine on the reaction velocity and an increase of levels l-DOPA, dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in synaptosomes from brain striatum. The content of homovanilic acid, norepinephrine, 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindolacetic acid failed to be modified. The inhibition of tyrosine hydroxylation in brain synaptosomes of rats treated with madopar is suggested to be mediated by the increase of dopamine concentration in the closest surrounding of tyrosine hydroxylase. The possible role of increasing dopamine concentration in rat brain synaptosomes in the mechanism of decrease of relative inhibitory effect of the neurotransmitter on tyrosine hydroxylation is considered. The problem of dopamine compartmentation in nerve endings and the mechanisms of tyrosine hydroxylase activity regulation are discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. *McMillen B. A., German D. C., Shore P. A.* Biochem. Pharmacol., v. 29, p. 3045—3050, 1980.
2. *Bagchi S. P., Bagchi P., Smith T. M.* Brain Res., v. 187, p. 403—414, 1980.
3. *Bagchi S. P.* Neuropharmacology, v. 24, p. 37—41, 1985.
4. *DaPrada M., Keller H. H., Pletl L., Kettler R., Haefely W. E.* Experientia, v. 40, p. 1165—1172, 1984.
5. *Hefft F., Melamed E.* Brain Res., v. 225, p. 333—346, 1981.
6. *Бондаренко Нина А., Бондаренко Н. А.* Фармакол. и токсикол., № 4, с. 31—34, 1985.
7. *Nagatsu T., Levitt M., Udenfriend S.* Analyt. Biochem., v. 9, p. 122—126, 1964.
8. *Шеманов А. Ю., Кудрин В. С., Раевский К. С.* Нейрохимия, т. 3, с. 227—235, 1984.
9. *Остерман Л. А.* Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радионуклидными методами, М., Наука, 1983.
10. *Bruntlett C. S.* Current Separations BAS, v. 2, № 2, 1980.
11. *Kontur P., Dawson P., Monjan A. J.* Neurosci. Meth., v. 11, p. 249—318, 1984.
12. *Westernik B. H. C., Korff J.* Eur. J. Pharmacol., v. 37, p. 249—255, 1976.
13. *Hefft F., Melamed E., Wurtman R. J.* J. Pharmacol. and exp. Ther., v. 183, p. 189—197, 1981.
14. *Ng L. K. I., Colburn R. W., Kopin I. J.* J. Pharmacol. and exp. Ther., v. 183, p. 316—325, 1972.
15. *Fahn S., Rodman J. S., Cote L. J.* J. Neurochem., v. 16, p. 1293—1300, 1969.
16. *McMillen B. A., Shore P. A., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 313, p. 39—44, 1980.
17. *Cerrito F., Rattler M.* Eur. J. Pharmacol., v. 68, p. 465—470, 1980.
18. *Kuhr W. G., Ewing A. G., Near J. A., Wightman R. M.* J. Pharmacol. and exp. Ther., v. 232, p. 388—394, 1985.
19. *Melamed E., Dafni N. J.* Pharm. Pharmacol., v. 34, p. 820—822, 1982.
20. *Ponzo F., Achilli G., Perego G., Rinaldi G., Alpert S.* Brain Res., v. 273, p. 45—51, 1983.
21. *Compton D. R., Johnson K. M.* Eur. J. Pharmacol., v. 110, p. 157—162, 1985.
22. *Tsudzuki T. J.* Biochem., v. 89, p. 61—69, 1981.

Поступила 20. IV 1988