

УДК 57.053+577.352.5

## ВЛИЯНИЕ БЛОКАТОРОВ ПЕРЕНОСЧИКОВ МОНОАМИНОВ НА ДИНАМИКУ ЗАХВАТА ДОФАМИНА В ПОВЫШЕННОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ СРЕЗАМИ МОЗГА КРЫСЫ

© 2008 г. М. Ю. Инюшин, Д. А. Сибаров, А. Б. Вольнова,  
К. А. Хименес-Ривера, академик А. Д. Ноздрачев

Поступило 25.09.2007 г.

Хорошо известно, что фоновая экстраклеточная концентрация дофамина в мозге не превышает 0.1 мкМ и лишь спорадически повышается до величин более 1 мкМ после активации дофаминовых нейронов [1]. В процессе поддержания уровня внеклеточного дофамина в мозге участвуют высокоаффинные Na-зависимые переносчики DAT (dopamine transporter) и NET (norepinephrine transporter). Однако после применения ряда наркотических препаратов (кокаина, D-амфетамина и др.), блокирующих данный тип переносчиков дофамина, наблюдается значительное повышение концентрации дофамина, обуславливающее наркотический эффект [2]. Например, показано, что после инъекции кокаина средний уровень дофамина в межклеточном пространстве вырастает в 14–17 раз [3].

Кроме того, были описаны переносчики моноаминов с промежуточной или низкой аффинностью к дофамину, менее специфичные, однако обладающие значительной (в 10–100 раз большей) транспортной емкостью – OСТ/EMT (organic cation transporter/extraneuronal monoamine transporter) и PMAT (plasma membrane monoamine transporter) [4, 5]. Эти типы переносчиков являются Na-независимыми и не блокируются кокаином.

Таким образом, удаление дофамина из внеклеточного пространства производится двумя способами: при помощи высокоаффинных переносчиков, обеспечивающих быстрый обратный захват небольших концентраций медиатора (uptake-1), и низкоаффинных переносчиков, осуществляющих захват при высоких концентрациях вещества (ur-

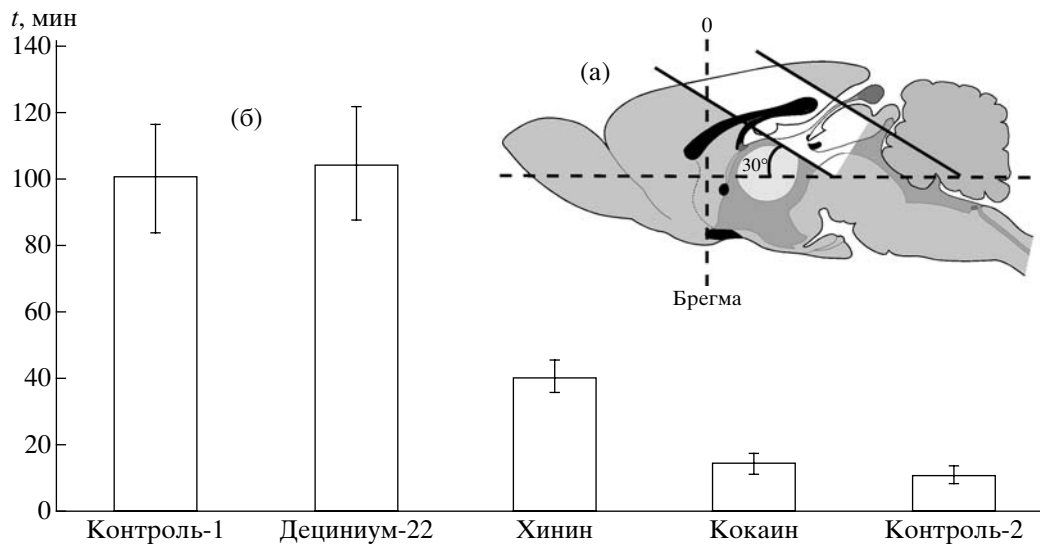
take-2) [6]. Показано, что противомаларийный препарат хинин является блокатором переносчиков группы OСТ [7, 8]. Дециниум-22 (decynium22 или 1,1'-Diethyl-2,2'-cyanine iodide) блокирует низкоаффинные переносчики моноаминов еще более эффективно, чем хинин, не действуя на высокоаффинные переносчики типа DAT и NET [9].

Цель данной работы – оценить роль низкоаффинных переносчиков моноаминов в динамике захвата повышенных (до 40 мкМ) концентраций дофамина срезами, содержащими фронтальную кору, ростральную часть гиппокампа и подлежащие структуры среднего мозга крыс, блокируя различные этапы захвата моноаминов при помощи кокаина, хинина и дециниума-22.

Для изготовления срезов мозга использовали крыс линии Sprague–Dawley весом 100–150 г. Блок мозговой ткани вырезался под углом 30° так, чтобы срезы толщиной 350 мкм содержали часть правой и левой фронтальной коры и гиппокампа, как структуры, получающие богатую дофаминэргическую иннервацию (рис. 1а). Измерения уровня дофамина производили амперометрически с помощью угольного микроэлектрода Carbostar-4 сопротивлением 0.8 МОм (“Kation Scientific”), индифферентом служил хлорсеребряный электрод, в качестве потенциостата использовали Axopatch 1-D (“Axon Instr.”) в двухэлектродном режиме. Электрод помещали в растворе вблизи поверхности среза, на рабочем электроде удерживали потенциал 370 мВ, необходимый для окисления дофамина. Измеряемый ток фильтровали низкочастотным фильтром в 10 Гц.

Динамику изменения концентрации дофамина измеряли в следующих экспериментах. Контроль-1: самоокисление дофамина в отсутствие обратного захвата (в камере, не содержащей среза); контроль-2: захват дофамина необработанными срезами; опыт-1: захват дофамина срезами после добавления к раствору 15 мкМ кокаина; опыт-2: захват дофамина срезами после добавления к раствору 100 мкМ хинина; опыт-3: захват

*Departament Physiology, School of Medicine,  
Universidad Central del Caribe, Bayamon, Puerto Rico*  
*Институт физиологии им. И.П. Павлова  
Российской Академии наук, Санкт-Петербург*  
*Санкт-Петербургский государственный  
университет*  
*Departament Physiology, University of Puerto Rico,  
San Juan, Puerto Rico*



**Рис. 1.** а – ориентация блока мозговой ткани. б – диаграмма динамики захвата дофамина в контрольных и экспериментальных сериях,  $t$  – постоянная времени,  $p < 0.05$ .

$t$ (мин)	100.1 ± 16.5	104.4 ± 17.2	40.7 ± 5.1	14.4 ± 3.1	10.8 ± 2.8
A	30.6 ± 2.1	29.0 ± 1.8	24.5 ± 3.8	28.9 ± 2.0	27.6 ± 1.9
K	0.007 ± 0.001	0.004 ± 0.0003	0.017 ± 0.003	0.048 ± 0.005	0.063 ± 0.004
Число опытов	$n = 8$	$n = 6$	$n = 6$	$n = 6$	$n = 8$

дофамина срезами после добавления к раствору 5 мкМ дециниума-22.

Использовали реактивы компании “Sigma” (USA).

В процессе матобработки кривые, показывающие уменьшение концентрации дофамина со временем в результате самоокисления и/или захвата его срезом, аппроксимировались как простая экспонента по формуле:  $Y = A \cdot \exp(-K \cdot T)$ , где  $Y$  – скорость уменьшения концентрации дофамина в инкубационной среде, равная скорости его захвата срезами,  $A$  и  $K$  – условные коэффициенты, описывающие форму кривой,  $T$  – время. Затем определяли постоянную времени ( $t$  – время полуспада экспоненты), определяющую процесс захвата дофамина срезом. Конечную концентрацию дофамина полагали равной нулю. Указанные характеристики усредняли по опытам. Аналогичным образом определяли характеристики процесса после применения блокаторов захвата дофамина. Статистическое сравнение групп производили с помощью  $t$ -теста, используя программу GrafPad Prism 4.03.

В наших экспериментах наиболее значимой величиной, характеризующей скорость утилизации дофамина срезами, явилась постоянная времени (рис. 1б). В отсутствие среза (контроль-1) в растворе дофамина 40 мкМ (более высокие концентрации токсичны для ткани) после 3–4 мин стабилизации наблюдалось снижение концентрации с постоянной времени  $t = 100 \pm 16$  мин, наи-

большей в наших экспериментах. Мы полагаем, что это время самоокисления дофамина, так как использованный нами угольный микроэлектрод при токе 30 пА давал незначительный вклад в окисление. Захват дофамина срезом мозга без добавления блокаторов (контроль-2) осуществлялся с  $t = 10.8 \pm 2.8$  мин, т.е. утилизация дофамина в этом случае осуществлялась наиболее эффективно. Таким образом, контроль-1 характеризует самую медленную модель убывания концентрации дофамина, а контроль-2 – самую быструю.

В следующих сериях экспериментов дофамин подавался совместно с одним из блокаторов переносчиков дофамина: кокаином 15 мкМ (опыт-1), хинином 100 мкМ (опыт-2) и дециниумом-22 5 мкМ (опыт-3). Из рис. 1б видно, что добавление любого из этих веществ тормозит захват дофамина срезом по сравнению с контролем-2. Кокаин удлиняет время захвата дофамина на 40%, в то время как хинин действует в 3 раза эффективнее, увеличивая время захвата в 4 раза. Применение дециниума-22 практически полностью блокировало захват дофамина срезом, так что постоянная времени ( $t = 104.4 \pm 17.2$ ) статистически не отличалась от контрольной величины для самоокисления дофамина ( $t = 100.1 \pm 16.5$ , контроль-1). Таким образом, дециниум-22 приводит к 10-кратному уменьшению скорости захвата дофамина срезом по сравнению с интактным срезом.

Какова же роль низкоаффинных переносчиков в динамике процесса захвата повышенных концентраций дофамина срезам?

После блокирования кокаином высокоаффинных переносчиков уровень дофамина повышается и зависит уже от высокопроизводительных низкоаффинных переносчиков – существование такого Na-независимого транспорта моноаминов было обнаружено в глиальных клетках [10]. Данная группа переносчиков вступает в действие уже при аномально высоких концентрациях дофамина в межклеточном пространстве, а их блокада, в свою очередь, должна приводить к дополнительному уменьшению захвата дофамина.

В работах, посвященных исследованию обратного захвата дофамина префронтальной корой крысы, использовалась концентрация около 2 мкМ (точка А на рис. 2), при которой DAT и NET максимально активны и утилизируют практически весь дофамин [11]. ОСТ начинают насыщаться только при высоких концентрациях 200–4000 мкМ [4]. Однако такая высокая концентрация дофамина токсична для среза, поэтому в наших экспериментах мы использовали исходную концентрацию дофамина 40 мкМ (точка Б на рис. 2).

Хинин не является блокатором высокоаффинных переносчиков дофамина и, следовательно, не обладает собственным наркотическим эффектом, прямая наркотическая зависимость на хинин не вырабатывается, зато, как показано в литературе, легко вырабатывается предпочтение у крыс на это вещество после приема наркотика [12]. Намного более сильным блокатором оказался децениум-22, который блокирует ОСТ и PMAT [5] и сводит динамику утилизации дофамина к самоокислению (рис. 16). Поскольку низкоаффинные переносчики, расположенные на астроцитах [5], включаются в работу при повышенных концентрациях дофамина, то именно динамика экспрессии этих переносчиков может определять толерантность к наркотику. Таким образом, понимание динамики процессов захвата дофамина низкоаффинными переносчиками может пролить свет на механизмы формирования наркотической зависимости.

Известно также, что у больных болезнью Паркинсона в качестве заместительной терапии применяется метаболический предшественник дофамина – леводопа [13]. При длительном применении леводопы у больных наблюдается привыкание, что ведет к необходимости увеличения дозы, вызывая побочные явления: гиперкинезию, хореоатетоз, депрессию [14, 15], а также симптомы шизофрении [6]. Можно предположить, что важным компонентом привыкания к действию леводопы является компенсаторное усиление системы захвата повышенных концентраций дофамина, осуществляемых низкоаффинными переносчиками моноами-

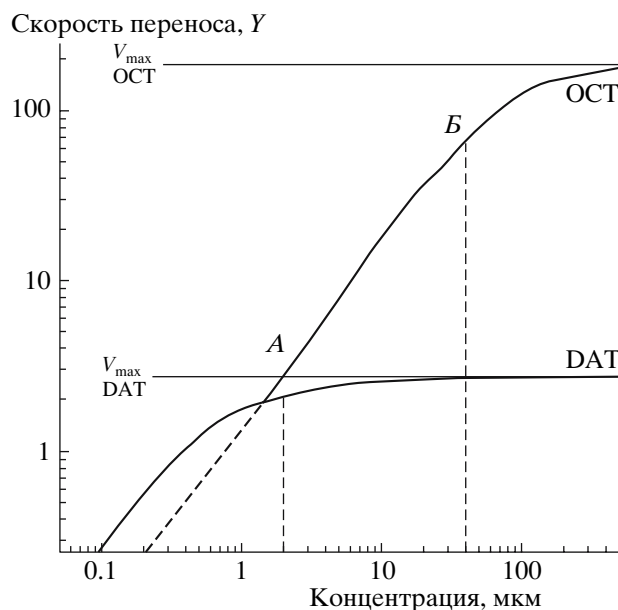


Рис. 2. Кинетика работы переносчиков типа ОСТ (низкоаффинный переносчик дофамина) и DAT (высокоаффинный переносчик дофамина). А – концентрация дофамина 2 мкМ, Б – 40 мкМ.

нов. Вполне возможно, что обратимое блокирование этих избыточно активных переносчиков, показанное в наших экспериментах, позволит снизить терапевтические дозы леводопы и существенно продлить эффект однократного применения этого препарата у больных, страдающих паркинсонизмом.

Кокаин (15 мкМ) не оказывает значительного влияния на динамику захвата повышенных концентраций дофамина (40 мкМ). Хинин (100 мкМ) и децениум-22 (5 мкМ) эффективно блокируют всасывание дофамина в высоких концентрациях, причем децениум-22 практически полностью сводит динамику утилизации дофамина к самоокислению.

Это подтверждает участие низкоаффинных переносчиков дофамина, блокируемых хинином и децениумом-22, в процессе устранения его высоких концентраций в мозге.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Robinson D.L., Venton B.J.* // Clin. Chem. 2003. V. 49. № 10. P. 1763–1773.
2. *Elliott J.M., Beveridge T.J.* // Curr. Opin. Pharmacol. 2005. V. 5. № 1. P. 94–100.
3. *Nakachi N., Kiuchi Y., Inagaki M. et al.* // Eur. J. Pharmacol. 1995. V. 281. № 2. P. 195–203.
4. *Grundemann D., Koster S., Kiefer N. et al.* // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. № 47. P. 30915–30920.
5. *Engel K., Zhou M., Wang J.* // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. № 48. P. 50042–50049.

6. Millian M.J. // *Pharmacology & Ther.* 2006. V. 110. P. 135–370.
7. Busch A.E., Karbach U. // *Mol. Pharmac.* 1998. V. 54. P. 342–352.
8. Arndt P., Volk C., Gorboulev V. et al. // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2001. V. 281. P. 454–468.
9. Russ H., Sonna J., Keppler K. et al. // *Arch. Pharmacol.* 1993. V. 348. № 5. P. 458–465.
10. Paterson I.A., Hertz L. // *J. Neurosci. Res.* 1989. V. 23. № 1. P. 71–77.
11. Wayment H.K., Schenk J.O., Sorg B.A. // *J. Neurosci.* 2001. V. 21. № 1. P. 35–44.
12. Falk J.L., Yosef E., Schwartz A., Lau C.E. // *Behav. Pharmacol.* 1999. V. 10. № 1. P. 27–38.
13. Jenner P. // *Neurology.* 1995. V. 45. P. S6–S12.
14. Markham C.H., Treciokas L.J., Diamond S.G. // *West J. Med.* 1974. V. 121. P. 188–206.
15. Шток В.Н., Федорова Н.В. // *Рос. мед. журн.* 1998. Т. 6. № 13. С. 95–98.