

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АНТАГОНИСТОВ D1-РЕЦЕПТОРОВ ДОФАМИНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НЕРВНОПСИХИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НА ПРИМЕРЕ (+)-SCH-23390

УДК 615.21

© А. А. Букинич

ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург

Ключевые слова

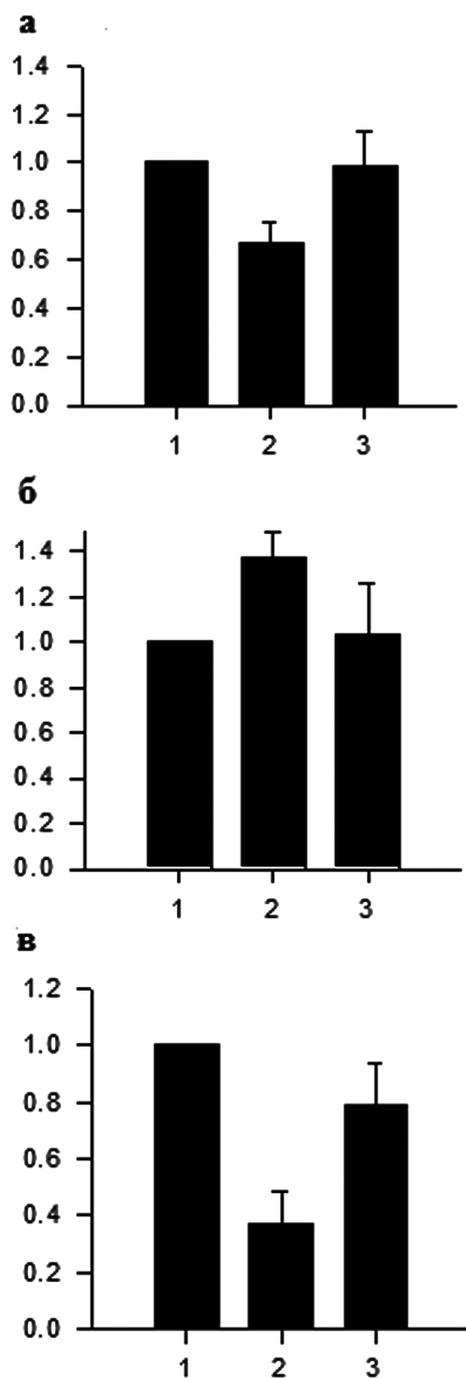
дофамин; SCH-23390; квинпирол; ГАМК-ергические нейроны; личинки миноги *Lampetra planeri*; пэтч-кламп.

Резюме

На изолированных мультиполярных нейронах спинного мозга пескоройки (личинки миноги *Lampetra planeri*) методом пэтч-кламп в модификации «целая клетка» было исследовано модулирующее действие дофамина и его агонистов и антагонистов на амплитуду ГАМК-активируемых токов. Показано, что антагонист D1-рецепторов (+)-SCH-23390 блокирует эффекты дофамина на амплитуду ГАМК-активируемых токов на $63,0 \pm 4,7\%$ и на $77,1 \pm 2,0\%$. Эффекты, вызванные агонистом D2-рецепторов (-)-квинпиролом на амплитуду ГАМК-активируемых токов, были заблокированы на $78,8 \pm 0,4\%$ и на $85,0 \pm 5,7\%$ антагонистом D1-рецепторов (+)-SCH-23390. Так как хемоуправляемые токи подчиняются градуальному закону, результаты по блокированию антагонистом D1-рецепторов (+)-SCH-23390 эффектов дофамина является идеальными, что может быть основанием для рассмотрения вопроса о клинической апробации и возможности применения (+)-SCH-23390 и подобных соединений для лечения эпилепсии, невротических расстройств, депрессии.

Целью настоящего исследования является выявление новых подходов к лечению эпилепсии, невротических расстройств, депрессии, в частности возможность применения являющегося на настоящее время сугубо тестовым препаратом антагониста D1-рецепторов (+)-SCH-23390 в качестве лекарственного препарата. Методом для подтверждения возможности внедрения данного препарата в лечебный процесс был выбран прогрессивный электрофизиологический метод пэтч-кламп в модификации «целая клетка», с помощью которого можно проследить блокирование ионотропных хемоуправляемых токов, вызываемых ГАМК, на мембране единичного нейрона центральной нервной системы позвоночных животных. Так как в основе вышеописанных заболеваний лежит сопряженный механизм, вовлекающий системы дофамина и ГАМК, находящиеся в реципрокных функциональных отношениях [1–6], на изолированных мультиполярных нейронах спинного мозга пескоройки (личинки миноги *Lampetra planeri*) методом пэтч-кламп

в модификации «целая клетка» было исследовано модулирующее действие дофамина на амплитуду ГАМК-активируемых токов. Перед каждым тестом проверялось наличие потенциалактивируемых Na⁺-K⁺-токов, которые указывали на жизнеспособность клеток, и выбирался командный потенциал, при котором амплитуда ГАМК-активируемых токов была максимальной или приближена к максимальной. Командный потенциал в большинстве случаев составлял –100 мВ. Концентрация ГАМК во всех сериях экспериментов составляла 2 мМ. Согласно проведенным исследованиям, на пескоройке и на миноге концентрация насыщения для ГАМК была обусловлена этими цифрами [7–8], поэтому эта концентрация была использована в наших исследованиях как рабочая. Дофамин, (+)-SKF-38393 (агонист D1-рецепторов), (-)-quinpirole (квинпирол) — агонист D2-рецепторов, (+)-SCH-23390 (антагонист D1-рецепторов), (-)-sulpiride (сульпирид) — антагонист D2-рецепторов (все препараты Sigma, США), в нужной дозировке разводили в дистиллированной воде и помещали в морозильную камеру (-20° С). Непосредственно перед тестированием раствор размораживали и доводили физиологическим раствором до концентрации необходимой для тестирования. Все указанные реактивы разлагаются при воздействии света, поэтому хранение и все операции с ними проводили в темноте. Исходя из тех же соображений, экспериментальная часть работы также была выполнена в условиях затемнения. Концентрации дофамина, его агонистов и антагонистов во всех сериях экспериментов составляли 5 мкМ. Протокол записи был следующий: вначале апплицировалась ГАМК, затем после 2 минут отмыва — апплицировалась ГАМК с агонистом дофаминовых рецепторов, после чего следовал отмыв в течение 2 мин и снова апплицировалась ГАМК. При изучении эффектов антагонистов перед тестированием проводилась преинкубация антагонистом в течение 2 минут. Для регистрации токов использовали усилитель АХОРАТН-1D с головкой CV-4 (AxonInstrument, США) и аналого-цифровой преобразователь DigiData-1200 (AxonInstrument, США). Данные получали с использованием программ CLAMPEX пакета pCLAMP 6.2 и анализировали с использованием программ CLAMPFIT 6.2, CLAMPFIT 8.1, MicrosoftExcel, SigmaPlot.



■ Рисунок 1. Действие дофамина 5 мкМ и агониста D1-рецепторов (+)-SKF-38393 5 мкМ на амплитуду ГАМК-активируемых токов 2 мМ.

а — гистограмма, показывающая нормированную амплитуду ГАМК-активируемых токов (2 мМ); ($n=8$, $p<0.004$): 1 — при перфузии нейрона физиологическим раствором; 2 — при действии 5 мкМ дофамина; 3 — при отмыве.

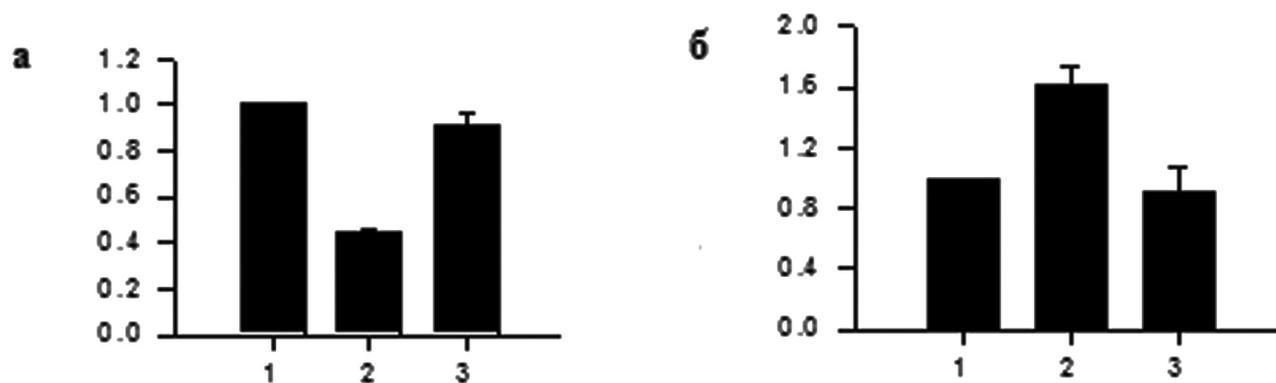
б — гистограмма, показывающая нормированную амплитуду ГАМК-активируемых токов (2 мМ); ($n=5$, $p<0.007$): 1 — при перфузии нейрона физиологическим раствором; 2 — при действии 5 мкМ дофамина; 3 — после 2 минут отмыва.

в — гистограмма, показывающая нормированную амплитуду ГАМК-активируемых токов (2 мМ); ($n=8$, $p<0.01$): 1 — при перфузии нейрона физиологическим раствором; 2 — при действии 5 мкМ (+)-SKF-38393; 3 — после 2 минут отмыва.

В результате экспериментов было показано, что аппликация дофамина вызывает разнонаправленное действие на амплитуду ГАМК-активируемого тока на разных исследуемых нейронах. А именно, на 8 исследованных нейронах отмечалось уменьшение амплитуды ГАМК-активируемого тока в среднем на $33,3 \pm 8,7\%$ ($p<0,004$) (рис. 1, а). На 5 исследованных нейронах происходило увеличение амплитуды, в среднем, на $37,3 \pm 11,8\%$ ($p<0,007$) (рис. 1, б). Восстановление амплитуды ГАМК-активируемого тока после отмыва дофamina составило $98,7 \pm 14,4\%$ в случае уменьшения амплитуды ГАМК-активируемого тока, и $100,0 \pm 0,9\%$ — в случае увеличения амплитуды. В контрольных тестах, когда вместо дофамина подавали физиологический раствор, подобные эффекты не наблюдали: уменьшение амплитуды ГАМК-активируемого тока составило в среднем $4,44 \pm 1,91\%$ ($n=9$, $p=0,04$), а увеличение — $4,24 \pm 1,39\%$ ($n=8$, $p=0,02$). Простое взвешенное отклонение или размах вариации при действии дофамина на амплитуду ГАМК-активируемого тока составил $10,0 \pm 4,2\%$, а в контроле (при действии физиологического раствора на амплитуду ГАМК-активируемого тока) — $0,1 \pm 0,06\%$. Таким образом, доказано, что дофамин оказывает действие на амплитуду ГАМК-активируемого тока.

При изучении действия агонистов D1 и D2-рецепторов на амплитуду хемоправляемых токов было показано, что агонист D1-рецепторов (+)-SKF-38393 уменьшает амплитуду ГАМК-активируемого тока, в среднем, на $63,1 \pm 11,7\%$ ($n=8$, $p<0,01$) (рис. 1, в). После отмыва амплитуда ГАМК-активируемого тока составила $78,7 \pm 15,0\%$ от амплитуды токов, регистрируемых при перфузии нейронов физиологическим раствором. Агонист D2-рецепторов (–)-квинпиrol вызывает в разных клетках эффекты подобные дофамину: увеличение амплитуды ГАМК-активируемого тока, в среднем, на $61,0 \pm 13,8\%$ ($n=8$, $p<0,002$) (рис. 2, б), и уменьшение амплитуды, в среднем, на $55,7 \pm 2,0\%$ ($n=6$, $p<0,001$) (рис. 2, а). Восстановление ГАМК-активируемого тока после отмыва (–)-квинпиrolа в случае уменьшения амплитуды составило $90,6 \pm 6,1\%$, в случае увеличения амплитуды — $91,3 \pm 15,1\%$.

Дальнейшее исследование было направлено на изучение действия антагониста D1-рецепторов (+)-SCH-23390 на эффекты вызванные агонистами дофаминовых рецепторов на амплитуду ГАМК-активируемого тока. Так как исследования действия самого (+)-SCH-23390 на амплитуду ГАМК-активируемого тока не проводилось, нами вначале была проведена данная серия опытов. В результате было показано, что амплитуда ГАМК-активируемого тока уменьшалась, в среднем, на $4,9 \pm 1,4\%$ ($n=7$, $p=0,04$) и увеличивалась, в среднем, на $4,5 \pm 1,1\%$ ($n=6$, $p=0,02$). (Для сравнения, когда вместо (–)-сульпирида подавался физиологический рас-



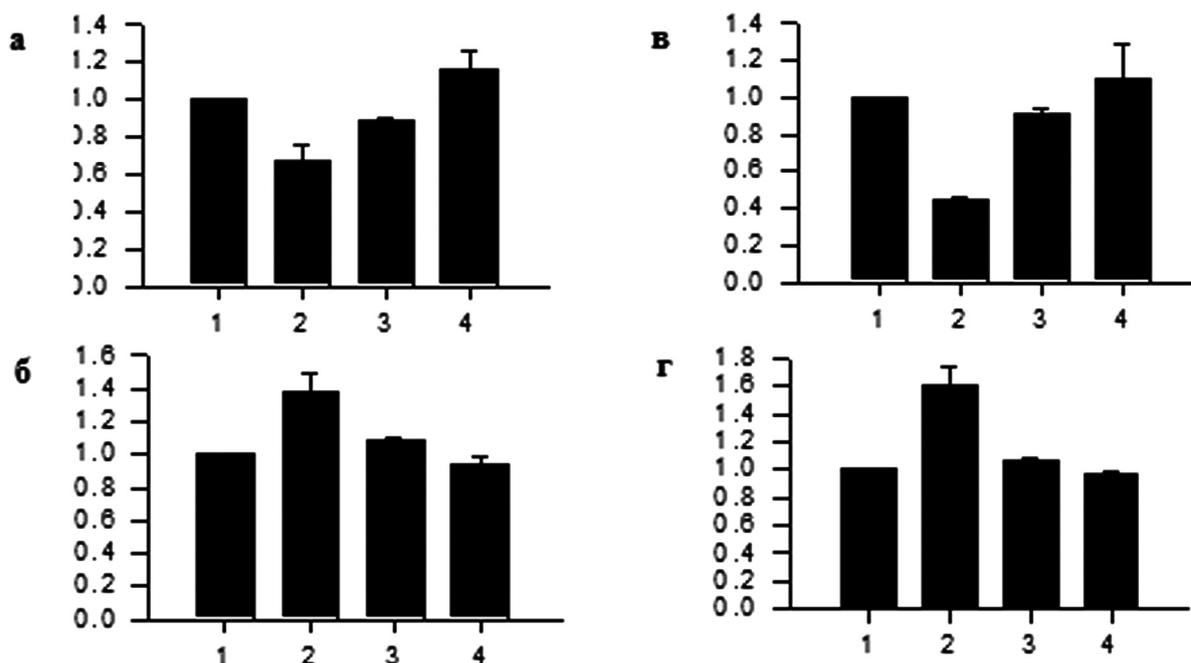
■ **Рисунок 2.** Действие агониста D2-рецепторов (-)-квинпиrolа 5 мкМ на амплитуду ГАМК-активируемых токов 2 мМ.

а — гистограмма, показывающая нормированную амплитуду ГАМК-активируемых токов (2 мМ); ($n=6, p<0,001$): 1 — при перфузии нейрона физиологическим раствором; 2 — при действии 5 мкМ (-)-квинпиrolа; 3 — после 2 минут отмыва.

б — гистограмма, показывающая нормированную амплитуду ГАМК-активируемых токов (2 мМ); ($n=8, p<0,002$): 1 — при перфузии нейрона физиологическим раствором; 2 — при действии 5 мкМ (-)-квинпиrolа; 3 — после 2 минут отмыва

твор, уменьшение амплитуды ГАМК-активируемого тока составило, в среднем $4,44 \pm 1,91\%$, а увеличение — $4,24 \pm 1,39\%$). Таким образом, было показано, что (+)-SCH-23390 не оказывает действия на амплитуду ГАМК-активируемого тока.

Эффекты дофамина были частично заблокированы антагонистом D1-рецепторов (+)-SCH-23390: уменьшение амплитуды ГАМК-активируемых токов составило в среднем, $11,7 \pm 1,8\%$ ($n=7, p<0,001$) (рис. 3, а), увеличение амплитуды — $8,3 \pm 2,0\%$ ($n=5$,



■ **Рисунок 3.** Амплитуды ГАМК-активируемых токов (2 мМ) в условиях инкубации с антагонистом D1-рецепторов (+)-SCH-23390 (5 мкМ) и с дофамином (5 мкМ) и/или с (-)-квинпиrolом (5 мкМ)

а — гистограмма, показывающая нормированную амплитуду ГАМК-активируемых токов (2 мМ); ($n=7, p<0,001$): 1 — при перфузии нейрона физиологическим раствором; 2 — при действии 5 мкМ дофамина; 3 — в условиях инкубации в растворе с (+)-SCH-23390 (5 мкМ) и с дофамином (5 мкМ); 4 — после 2 минут отмыва.

б — гистограмма, показывающая нормированную амплитуду ГАМК-активируемых токов (2 мМ); ($n=5, p<0,01$): 1 — при перфузии нейрона физиологическим раствором; 2 — при действии 5 мкМ дофамина; 3 — в условиях инкубации в растворе с (+)-SCH-23390 (5 мкМ) и с дофамином (5 мкМ); 4 — после 2 минут отмыва.

в — гистограмма, показывающая нормированную амплитуду ГАМК-активируемых токов (2 мМ); ($n=6, p<0,01$): 1 — при перфузии нейрона физиологическим раствором; 2 — при действии 5 мкМ (-)-квинпиrolа; 3 — в условиях инкубации в растворе с (+)-SCH-23390 (5 мкМ) и с (-)-квинпиrolом (5 мкМ); 4 — после 2 минут отмыва.

г — гистограмма, показывающая амплитуду ГАМК-активируемых токов (2 мМ); ($n=10, p<0,005$): 1 — при перфузии нейрона физиологическим раствором; 2 — при действии 5 мкМ (-)-квинпиrolа; 3 — в условиях инкубации в растворе с (+)-SCH-23390 (5 мкМ) и с (-)-квинпиrolом (5 мкМ); 4 — после 2 минут отмыва

$p < 0,01$) (рис. 3, б). (Для сравнения, дофамин вызывает уменьшение амплитуды ГАМК-активируемого тока в среднем на $33,3 \pm 8,7\%$, или увеличение амплитуды в среднем на $37,3 \pm 11,8\%$). После отмыва амплитуда ГАМК-активируемого тока восстановилась до $100,0 \pm 10,7\%$ от амплитуды токов, регистрируемых при перфузии нейронов физиологическим раствором, в случае уменьшения амплитуды ГАМК-активируемого тока, и до $93,2 \pm 4,9\%$ — в случае увеличения. Таким образом, эффекты дофамина были частично заблокированы антагонистом D1-рецепторов (+)-SCH-23390 (при учете, что эффекты дофамина на ГАМК-активируемые токи были приняты за сто процентов) на $63,0 \pm 4,7\%$ в случае уменьшения, и на $77,1 \pm 2,0\%$ — в случае увеличения амплитуды ГАМК-активируемых токов.

В качестве контрольного теста нами были проведены эксперименты, где действие агониста D2-рецепторов (-)-квинпиrolа на амплитуду ГАМК-активируемого тока блокировали антагонистом D1-рецепторов (+)-SCH-23390. Нами было протестировано 16 мультиполярных нейронов. На 6 нейронах было показано уменьшение амплитуды ГАМК-активируемых токов в условиях инкубации в растворе с (+)-SCH-23390 и с (-)-квинпиrolом, в среднем, на $9,2 \pm 3,4\%$ ($p < 0,01$) (рис. 3, в), на 10 нейронах — увеличение амплитуды ГАМК-активируемых токов на $6,3 \pm 1,8\%$ ($p < 0,005$) (рис. 3, г). (Для сравнения, (-)-квинпиrol уменьшал амплитуду ГАМК-активируемых токов на $55,7 \pm 2,0\%$ и увеличивал на $61,0 \pm 13,8\%$). После отмыва амплитуда исследуемого тока составила $100,0 \pm 19,4\%$ от амплитуды токов, регистрируемых при перфузии нейронов физиологическим раствором в случае уменьшения амплитуды ГАМК-активируемого тока, и $97,1 \pm 2,3\%$ — в случае увеличения. В данных сериях экспериментов эффекты агониста D2-рецепторов (-)-квинпиrolа 5 мкМ на амплитуду ГАМК-активируемых токов были заблокированы антагонистом D1-рецепторов (+)-SCH-23390 5 мкМ (при учете, что эффекты (-)-квинпиrolа на ГАМК-активируемые токи были приняты за сто процентов) на $78,8 \pm 0,4\%$ в случае уменьшения и на $85,0 \pm 5,7\%$ в случае увеличения амплитуды ГАМК-активируемых токов.

Таким образом, было показано, что антагонист D1-рецепторов (+)-SCH-23390 блокирует эффекты дофамина на амплитуду ГАМК-активируемых токов на $63,0 \pm 4,7\%$ и на $77,1 \pm 2,0\%$. Эффекты, вызванные агонистом D2-рецепторов (-)-квинпиrolом на амплитуду ГАМК-активируемых токов, были заблокированы на $78,8 \pm 0,4\%$ и на $85,0 \pm 5,7\%$ антагонистом D1-рецепторов (+)-SCH-23390.

Так как хемоуправляемые токи подчиняются градуальному закону, результаты по блокированию антагонистом D1-рецепторов (+)-SCH-23390 эффектов дофамина являются идеальными, что может быть основанием для рассмотрения вопро-

са о клинической апробации и возможности применения (+)-SCH-23390 и подобных соединений для лечения эпилепсии, невротических расстройств, депрессии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шабанов П. Д., Лебедев А. А. Участие ГАМК- и дофаминергических механизмов ядра ложа конечной полоски в подкрепляющих эффектах психотропных средств, реализуемых через латеральный гипоталамус // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. — 2011. — Т. 97, № 8. — С. 804–813.
2. Shabanov P. D., Lebedev A. A., Sheveleva M. V. Modulation of rewarding effects of psychotropic drugs by GABA and dopamine mechanisms from the bed nucleus of the stria terminalis // Eur. Neuropsychopharmacol. — 2011. — Vol. 21, Suppl. 2. — P. S161–S162.
3. Шабанов П. Д., Лебедев А. А. Модуляция подкрепляющих эффектов психотропных средств ГАМК- и дофаминергическими механизмами ядра ложа конечной полоски // Мед. академ. журн. — 2011. — Т. 11, № 4. — С. 71–77.
4. Шабанов П. Д., Лебедев А. А. Сопряженность работы ГАМК- и дофаминергических механизмов ядра ложа конечной полоски в обеспечении подкрепляющих эффектов психотропных средств // Вестник Смоленск. госуд. акад. наук. — 2012. — Т. 11, № 4. — С. 3–12.
5. Shabanov P. D., Lebedev A. A. Involvement of GABA and dopaminergic mechanisms of the bed nucleus of the stria terminalis in the reinforcing effects of psychotropic substances mediated via the lateral hypothalamus // Neurosci. Behav. Physiol. — 2013. — Vol. 43, N. 4. — P. 485–491.
6. Лебедев А. А., Роик Р. О., Шевелева М. В., Шумилов Е. Г., Смирнов А. А. Значение системы кортиколиберина, дофамина и ГАМК в структурах расширенной миндалины для подкрепляющих эффектов наркотиков // Обз. по клин. фармакол. и лек. терапии. — 2013. — Т. 11. Спецвып. — С. 92–94.
7. Дудко Н. Б., Цветков Е. А., Судеревская Е. И., Малкиель А. И., Веселкин Н. П. Потенциал активизируемые и хемочувствительные токи мембран изолированных спинальных нейронов пескоройки // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. — 2004. — Т. 90, № 8. — С. 370.
8. Батуева И. В., Судеревская Е. И., Цветков Е. А., Веселкин Н. П. Исследование влияния гамма-аминомасляной кислоты на дорсальные чувствительные клетки изолированного спинного мозга миноги // Журн. эволюц. биохим. и физиол. — 1995. — Т. 31. — С. 286–291.

PERSPECTIVES OF D1 DOPAMINE ANTAGONISTS USING IN TREATMENT OF NERVOUS AND PSYCHIC DISORDERS WITH (+)-SCH-23390 AS AN EXAMPLE

A. A. Bukinich

◆ **Summary:** The effect of dopamine (DA), its agonists and antagonists on the amplitude of GABA-activated currents of isolated multipolar spinal cord neurons (both motoneurons and interneurons) of larva of the lamprey *Lampetra planeri* by means of patch-clamp method in the whole cell configuration was studied. (+)-SCH-23390, a D1-DA receptors antagonist was shown to block dopamine effects on GABA-activated currents by $63,0 \pm 4,7\%$ and

by $77.1 \pm 2.0\%$. Effects of (-)-quinpirol, a D2-DA receptors agonist, on GABA-activated currents were blocked by means of (+)-SCH-23390 by $78.8 \pm 0.4\%$ and by $85.0 \pm 5.7\%$. Because of chemoactivated currents are in full accordance with a gradual scale, the results on blocking D1-DA receptors by (+)-SCH-23390 are ideal ones and that is the possible basis to further clinical aprobation of (+)-SCH-23390 for treatment of epilepsy, neurotic reactions and depression.

◆ **Key words:** dopamine; SCH-23390; quinpirol; GABA-ergic neurons; larva of the lamprey *Lampetra planeri*; patch-clamp.

◆ Информация об авторах

Букинич Анна Александровна — кандидат медицинских наук, научный сотрудник отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова. ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН. Санкт-Петербург 197376, ул. Акад. Павлова, 12. E-mail: bukinich@mail.ru

Bukinich Anna Alexandrovna — PhD, Researcher, Dept. of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine NWB RAMS, St.Petersburg 197376, Acad. Pavlov street, 12. E-mail: bukinich@mail.ru