

На правах рукописи

**БУКИНИЧ  
АННА АЛЕКСАНДРОВНА**

**МОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ДОФАМИНА НА ПОТЕНЦИАЛ-  
АКТИВИРУЕМЫЕ И ХЕМОУПРАВЛЯЕМЫЕ ТОКИ МУЛЬТИПОЛЯРНЫХ  
НЕЙРОНОВ СПИННОГО МОЗГА ПЕСКОРОЙКИ**

**03.00.13. – Физиология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**Диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

---

**САНКТ-ПЕТЕРБУРГ 2009**

Работа выполнена в лаборатории эволюции межнейронного взаимодействия (заведующий лабораторией – доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН Н. П. Веселкин)  
Учреждения Российской академии наук Института эволюционной физиологии и биохимии имени И. М. Сеченова РАН.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН,  
заведующий лабораторией эволюции  
межнейронного взаимодействия

Н. П. ВЕСЕЛКИН

Официальные оппоненты:

доктор медиц. наук, профессор

Н. П. ЕРОФЕЕВ

кандидат медицинский наук

Г.Б. ВАЙНШТЕЙН

Ведущая организация:

Учреждение Российской академии наук Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН  
(Санкт-Петербург)

Защита состоится «10» февраля 2009 г. в «\_» часов на заседании кандидатского совета Д 002.127.01 Учреждения Российской академии наук Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН по адресу: 194223, г. Санкт-Петербург, пр. М. Тореза, 44.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН.

Автореферат разослан «\_» \_\_\_\_\_ 2008 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук

М. Н. Маслова

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. Дофамин является важнейшим нейромедиатором и нейромодулятором в центральной нервной системе позвоночных животных (Nicola et al., 2000; Carlsson, 2001; Seamans and Yang, 2004), а также гормоном, вырабатываемым мозговым веществом надпочечников и другими тканями (например, почками) (Missale et al., 1998). У млекопитающих и у человека с его участием связывают контроль двигательной активности (Furmidge et al., 1991; Lynch, 1991), эмоций (Weiner et al., 1989; Nieoullon, 2002, 2003; Salgado-Pineda et al., 2005), мышления (Nieoullon, 2002, 2003; Nieoullon and Coquerel, 2003), положительного подкрепления, потребления пищи (Шабанов и соавт., 2000, 2002), эндокринных функций (Missale et al., 1998). Кроме того дофамин участвует в патогенезе и этиологии некоторых неврологических и психиатрических заболеваниях, таких как болезнь Паркинсона, хорея Гентингтона, синдром Туретта, (Meltzer, 1980), шизофрения (Snyder et al., 1974), анорексический невроз (Barry and Klawans, 1976), гиперреактивное дефективное расстройство у детей, лекарственная зависимость к кокаину и амфетаминам (Greengard et al., 1999).

Дофамин и дофамин-иммунореактивные клетки показаны в спинном мозге и гипоталамусе у представителей разных классов позвоночных животных, включая млекопитающих, рептилий, амфибий и рыб (McGeer and McGeer, 1962; Commissiong and Sedgwick, 1974, 1975; Commissiong and Neff, 1979; Константинова, 1979; Bennis et al., 1990; Roberts et al., 1989).

В немногочисленных исследованиях на круглоротых было показано модулирующее действие дофамина на спинальные нейроны миноги (Kemnitz, 1997), и модулирующее действие дофамина на  $Ca^{2+}$ -токи нейронов спинного мозга (Wikstrom et al., 1999). В то же время исследование роли дофамина в механизмах регуляции межнейронного взаимодействия на самых ранних этапах филогенеза позвоночных представляет существенный интерес в плане изучения становления его роли. Принимая во внимание тот факт, что эффекты дофамина исследуются в основном в неостриатуме и прилежащем ядре млекопитающих, о механизмах модулирующего действия дофамина на нейроны спинного мозга позвоночных известно немного. Исследование функциональной роли дофамина в спинном мозгу личинки миноги может выявить особенности становления его роли в онтогенезе, а также позволит получить сведения о формировании механизмов регуляции двигательной активности.

Мультиполярные нейроны спинного мозга пескоройки, являющиеся в функциональном отношении в основном мотонейронами и интернейронами, участвуют во всех функциях спинного мозга. Изучение модулирующего действия дофамина на потенциал-активируемые и хемоуправляемые токи на мембранах мультиполярных

нейронов является адекватным подходом в плане изучения формирования функций дофамина в онтогенезе у низших позвоночных.

Таким образом, учитывая все вышесказанное, мы поставили ЦЕЛЬЮ НАСТОЯЩЕЙ РАБОТЫ исследование механизмов модулирующего действия дофамина на потенциал-активируемые  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ -токи, а также на хемоправляемые токи, вызванные ГАМК и глицином, на мембранах мультиполярных нейронов спинного мозга пескоройки.

Для достижения указанной выше цели были поставлены следующие ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ЗАДАЧИ:

1) Исследовать потенциал-активируемые  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ -токи, а также ГАМК- и глицин-активируемые токи на мембранах изолированных мультиполярных нейронов спинного мозга пескоройки.

2) Исследовать влияние агонистов и антагонистов дофаминовых рецепторов на потенциал-активируемые  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ -токи, а также на хемоправляемые токи, вызванные ГАМК и глицином.

3) Получить данные о механизмах модуляции дофамином потенциал-активируемые  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ -токов, а также ГАМК- и глицин-активируемых токов на мембранах мультиполярных нейронов спинного мозга пескоройки.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА ИССЛЕДОВАНИЙ. На изолированных мультиполярных нейронах спинного мозга пескоройки были впервые исследованы кинетические и фармакологические свойства потенциал-активируемых  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ -токов, а также хемоправляемых токов, вызванных ГАМК и глицином. Впервые было высказано предположение о наличии на мембранах мультиполярных нейронов спинного мозга пескоройки гетерогенных дофаминовых рецепторов. Результаты исследований показали, что дофамин не изменяет порог активации потенциал-активируемого натриевого тока и сопротивление клеточной мембраны мультиполярных нейронов спинного мозга пескоройки. Впервые было показано, что агонисты  $\text{D}_1$  и  $\text{D}_2$ -рецепторов на мембранах мультиполярных нейронов спинного мозга пескоройки уменьшают амплитуду потенциал-активируемых  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ -токов, и ГАМК- и глицин-активируемых токов, а агонисты  $\text{D}_3$ -рецепторов — увеличивают амплитуду потенциал-активируемых  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ -токов, и ГАМК- и глицин-активируемых токов. Частичная блокада антагонистом  $\text{D}_1$ -рецепторов (+)-SCH-23390 действия агониста  $\text{D}_1$ -рецепторов (+)-SKF-38393 была показана при изучении потенциал-активируемых  $\text{Na}^+$ -токов. Также было показано, что антагонист  $\text{D}_2$ -

рецепторов – сульпирид полностью блокирует эффекты агониста D1-рецепторов (+)-SKF-38393 на потенциал-активируемых  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ -токах и полностью блокирует эффекты дофамина на потенциал-активируемых  $\text{K}^+$  токах. Феномен частичной блокады антагонистом D1-рецепторов (+)-SCH-23390 эффектов, вызванных дофамином и агонистом D2-рецепторов квинпиролом, нами был получен при изучении эффектов дофамина на ГАМК- и глицин-активируемые токи. Таким образом, были впервые получены данные о модулирующем действии дофамина на потенциал-активируемые  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ -токи и хемоправляемые токи, вызванные ГАМК и глицином на мембранах мультиполярных нейронов спинного мозга пескоройки.

#### ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ.

Дофамин оказывает модулирующее действие на потенциал-активируемые и хемоправляемые токи на мембране мультиполярных нейронов спинного мозга пескоройки.

Модуляция дофамином потенциал-активируемых и хемоправляемых токов осуществляется за счет разных подтипов дофаминовых рецепторов, которые в разном количественном соотношении экспрессируются на мембране мультиполярных нейронов спинного мозга пескоройки.

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ РАБОТЫ. Результаты проведенного исследования представляют интерес для общей нейрофизиологии, нейробиологии, физиологии нервной клетки и медицины. Они вносят вклад в понимание механизмов модулирующего действия дофамина на потенциал-активируемые  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ -токи, а также на хемоправляемые токи, вызванные ГАМК и глицином, на мембранах мультиполярных нейронов спинного мозга пескоройки и расширяют уже имеющиеся представления о механизмах модуляции дофамином  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  и ГАМК-активируемых токов в центральной нервной системе позвоночных. Механизмы модуляции дофамином глицин-активируемых токов на нейронах спинного мозга были изучены впервые. Полученные результаты имеют существенное значение для понимания осуществления актов движения у круглоротых. Результаты настоящей работы могут быть использованы для дополнения и уточнения уже имеющихся данных о модулирующем действии дофамина у позвоночных животных.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ. Материалы диссертации были доложены и обсуждены на следующих научных собраниях: на Седьмой Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей (С-Петербург, 18 апреля 2004); на XIII

Международном совещании по эволюционной физиологии, посвященных памяти академика Л.А. Орбели (Санкт-Петербург, 2006 г.); на XX Съезде Физиологического общества им. И. П. Павлова (Москва, 4-8 июня 2007).

ПУБЛИКАЦИИ. Основные результаты диссертации отражены в пяти публикациях.

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ РАБОТЫ: Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов и списка литературы. Изложена на 119 страницах машинописного текста, иллюстрирована 23 рисунками и 3 таблицами. Библиография включает 237 наименований.

### МЕТОДИКА И ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве модельного препарата в настоящем исследовании использовался спинной мозг пескоройки - личинки миноги *Lampetra planeri*. Эксперименты выполнены на отдельных мультиполярных нейронах спинного мозга пескоройки, изолированных ферментативно-механическим способом. Для опытов отбирали крупные особи размером 15-18 см. До использования в эксперименте животные содержались в больших резервуарах с аэрированной водой при температуре зимой не выше 0-4 °С, летом — не выше 18-20°С.

### МЕТОДЫ, ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ МОДУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ДОФАМИНА НА ПОТЕНЦИАЛ- АКТИВИРУЕМЫЕ И ХЕМОУПРАВЛЯЕМЫЕ ТОКИ МУЛЬТИПОЛЯРНЫХ НЕЙРОНОВ СПИННОГО МОЗГА ПЕСКОРОЙКИ.

*Изоляцию клеток* осуществляли ферментативно-механическим способом, который включал в себя обработку изолированных фрагментов протеолитическим ферментами (1) и последующую механическую диссоциацию ткани путем пипетирования через пипетки Пастера (2).

1) Ферментативная обработка мозга проводилась в два этапа. На первом этапе фрагменты изолированного мозга, длиной около 1 см, инкубировались в течение 20 мин. в растворе с коллагеназой (1.6 мг/мл, Collagenase Type IA, Sigma, USA, раствор для коллагеназы № 3), после чего (второй этап) снимали мягкую мозговую оболочку, изготавливали фронтальные срезы толщиной 1.5 мм и помещали их на 1 час 15 мин. в раствор с проназой (0.5 мг/мл, Pronase E, Sigma, USA, раствор для проназы № 4). После ферментативной обработки срезы мозга промывались в четырех сменах физиологического

раствора № 1 (10 мл) с добавлением 0.03 мг/10мл стрихнина по 10, 5, 5 и 10 мин. В первый промывочный раствор добавляли бычий сывороточный альбумин (8мг/10мл); (BSA, Sigma, USA.). Инкубирование проводилось в условиях помешивания на шейкере при постоянной аэрации растворов смесью 98 % O<sub>2</sub>+2 % CO<sub>2</sub>; температура поддерживалась на уровне 18-20°C.

**2) Механическую диссоциацию спинномозговой ткани** осуществляли путем многократного пропускания срезов через пипетки Пастера с диаметром кончиков от 150 мкм до 600 мкм. Через 10-15 минут мозг полностью распадался на отдельные клетки, и клетки переносили в экспериментальную камеру для проведения электрофизиологических тестов.

**Экспериментальная камера** состояла из одного отсека, в котором производили выбор клетки для тестирования и путем приложения отрицательного давления в пипетке добивались контакта внутривнутрипипеточного раствора с цитоплазмой клетки (конфигурация «целая клетка»).

**Изготовление пипеток.** Для обеспечения контакта с клеткой применялись микропипетки, изготовленные из микрогематокритных капиллярных трубок (Fischer Sci. brand, USA). Пипетки вытягивались в две стадии на кузнице МЭ-3 (Киев, Украина) в модификации Батуевой И. В. Кончик пипетки оплавливали, после чего его внутренний диаметр составлял 1.5-2.5 мкм. Оплавленные микропипетки покрывались изоляционным воском, заполнялись пипеточным раствором, приведенным в табл. № 1, и закреплялись в держателе установки. Держатель, в свою очередь, крепился на микроманипуляторе, с помощью которого кончик пипетки подводился к клетке в экспериментальной камере.

**Регистрация токов.** Токи регистрировались монополярно относительно индифферентного электрода в условиях фиксации потенциала на целой клетке (метод пэтч-кламп в конфигурации «whole-cell» - «целая клетка»). Емкостной ток и ток утечки компенсировали с помощью метода, описанного в литературе (Сигворс и соавт., 1987). В работе был использован усилитель АХОРАТСН-1D с головкой CV-4 (Axon Instruments, USA). Во входной головке применялось сопротивление обратной связи 5 ГОм. Регистрируемые токи оцифровывались аналого-цифровым преобразователем DigiData-1200 (Axon Instruments, USA) и сохранялись на твердом диске компьютера (IBM PC-486, USA) программой CLAMPЕХ пакета рCLAMP 6.2. Высокочастотные шумы до ввода в ЭВМ удалялись фильтром Бесселя второго порядка с полосой пропускания 3 кГц. Программа CLAMPЕХ позволяет фиксировать потенциал или ток на мембране на заданном уровне и смещать их в соответствии с задачей эксперимента. Анализ данных проводился программой CLAMPFIT 6.2, CLAMPFIT 8.1, Microsoft Excel, Sigma Plot.

Документальная запись осуществлялась струйным принтером DeskJet 500C (Hewlett Packard, USA).

***Растворы, используемые в экспериментах.*** Растворы, использованные в экспериментах, представлены в табл. № 1. Каждый раствор использовался согласно задачам конкретного эксперимента. Смена суперфузирующих растворов в экспериментальной камере осуществлялась путем переключения протока.

Средние величины параметров, представленных в главе "Результаты и их обсуждение", приведены со средней квадратичной ошибкой и рассчитывались по общепринятой методике, описанной в литературе (Лакин, 1980). Достоверность различий оценивалась по критерию Стьюдента.



**Таблица № 1. Растворы, используемые в опытах на изолированных клетках.**

	Номера растворов и концентрации солей (мМ/л)				
	Наружные растворы				Внутренний раствор
	Физ. р-р (№ 1)	Препар. р-р (№ 2)	Р-р для коллагена-зы. (№ 3)	Р-р для проназы. (№ 4)	
NaCl	120,0	130,0	130,0	130,0	-
KCl	4,0	2,50	3,50	3,50	-
MgCl <sub>2</sub>	2,0	0,90	1,0	2,40	-
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	2,50	1,50	1,0	-	-
HEPES Na	20,0	-	20,0	20,0	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	0,65	0,75	0,60	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	0,2	0,25	0,25	-
NaHCO <sub>3</sub>	-	8,0	3,00	3,0	-
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	30,0	22,5	-	9,0	-
EGTA	-	-	0,30	1,50	380,4
BSA	-	-	-	-	-
KF	-	-	-	-	120,0
Tris base	-	-	-	-	121,1
HCl	-	-	-	-	30,0
pH	7,4		7,4	7,4	7,2
Осмолярность	330				310

Сокращения: ЭГТА - Этиленгликоль тетрауксусная кислота; ТЭА – тетраэтиламмоний.

Использованные растворы:

Физ. р-р № 1 - физиологический раствор для изолированных клеток;

препар. р-р № 2 - раствор для препаровки спинного мозга;

р-р для коллагеназы № 3 - раствор для ферментативной обработки мозга после добавления коллагеназы;

р-р для проназы № 4 - раствор для ферментативной обработки мозга после добавления проназы; пипеточный раствор № 5.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

### **Исследование основных свойств потенциал-активируемых и хемоуправляемых токов, вызванных ГАМК и глицином, изолированных мультиполярных нейронов методом пэтч-кламп.**

Исследование трансмембранных ионных токов мультиполярных нейронов проводили в режиме фиксации мембранного потенциала (МП) на целой клетке. Диапазон МП находился в пределах от -120 до 30 мВ. В большинстве тестов данной экспериментальной серии МП мультиполярных нейронов поддерживали на уровне -100 мВ. Выбор этого значения был определен двумя причинами. Во-первых, при таком уровне МП удастся снизить до минимума инактивацию потенциал-зависимых каналов мембраны. Во-вторых, амплитуда исследуемых токов при данном значении МП была оптимальна.

Проведенные тесты показали, что при фиксации мембранного потенциала (МП) на уровне -100 мВ поляризация мембраны от -120 до 30 мВ импульсом тока длительностью 50 – 100 мс вызывала появление интегрального трансмембранного тока, который помимо емкостного тока и тока утечки включал в себя ионный компонент, состоящий из  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ -тока ( $n=32$ ). Сопротивление клеточной мембраны мультиполярных нейронов спинного мозга пескоройки составило  $124.58 \pm 21.36$  МОм ( $n=32$ ), среднее значение емкости мембраны -  $302 \pm 34$  пФ ( $n=10$ ).

Характеристики  $\text{Na}^+$ -тока исследовались в условиях блокады калиевого тока тетраэтиламмонием (ТЭА) (физиологический раствор № 1 с добавлением от 15 до 45 мМ ТЭА). Было показано, что этот ток однороден и полностью блокируется 1 мкМ тетродотоксином (ТТХ). При стимуляции клетки импульсами длительностью 50 – 100 мс, последовательно поляризующим мембрану потенциалами от -120 до 30 мВ, входящий натриевый ток возникал и был максимальным при подаваемом потенциале около -50 мВ, и далее при увеличении потенциала амплитуда тока уменьшалась.

$\text{K}^+$ -ток исследовался в условиях блокады натриевой проводимости ТТХ (физиологический раствор № 1 с добавлением 1 мкМ ТТХ). Этот ток активировался при потенциале около -50 мВ и далее линейно возрастал пропорционально МП. В условиях ТТХ-блока выходящий ток достигал своего максимального значения за 5-10 мсек и по достижении своего пикового значения удерживался на плато в течение 50 мс и более, не обнаруживая отчетливой инактивации. Длительность фазы нарастания тока зависела от уровня деполяризации мембраны.

При исследовании хемоправляемых токов, вызванных ГАМК (n=32) и глицином (n=35) было показано, что амплитуда и полуширина токов насыщения при фиксации потенциала на -100 мВ составили в среднем  $2.17 \pm 0.45$  нА и  $742 \pm 110$  мсек для ГАМК, и  $5.09 \pm 0.42$  нА и  $525 \pm 114$  мсек для глицина. Потенциал реверсии, вычисленный согласно соотношению:  $V_{rev} = -b/a$ , составил -35 мВ для ГАМК- и -30 мВ для глицин-активируемых токов. Полученные значения близки к потенциалу реверсии хлорного тока, вычисленному по уравнению Нернста для используемых в тестах концентраций ионов хлора (-37.0 мВ, исходя из внеклеточной и внутрипипеточной концентрации ионов  $Cl^-$ , равных соответственно 133 и 30 мМ). Последнее свидетельствует в пользу того, что токи, вызываемые аппликацией ГАМК и глицина, связаны с активацией хлорной проводимости.

**Исследование влияния дофамина, агонистов и антагонистов D1 и D2-рецепторов на потенциал-активируемые  $Na^+$  и  $K^+$ -токи, и хемоправляемые токи, вызванные ГАМК и глицином, изолированных мультиполярных нейронов спинного мозга пескороек.**

При аппликации 10 мкМ дофамина (n=29) в условиях фиксации потенциала на уровне -100 мВ было установлено, что дофамин не вызывает изменений порога активации потенциал-активируемого натриевого тока: при регистрации натриевых токов в физиологическом растворе этот параметр составил, в среднем,  $-52 \pm 14.76$  мВ, при действии дофамина -  $53 \pm 15.67$  мВ.

В этой же серии экспериментов регистрировали и сопротивление клеточной мембраны исследуемых нейронов. В нормальном физиологическом растворе этот параметр составил в среднем  $124.58 \pm 21.36$  МОм. При аппликации 10 мкМ дофамина сопротивление клеточной мембраны не изменялось и составило в среднем  $124.49 \pm 21.35$  МОм.

Однако было показано, что дофамин (10 мкМ) статистически достоверно увеличивал в среднем на  $8.6 \pm 6.1\%$  (n=5), и уменьшал, в среднем,  $13.5 \pm 2.2\%$  (n=24) пиковую амплитуду натриевого тока на разных клетках. В контрольной серии экспериментов, когда вместо дофамина подавали физиологический раствор, подобные эффекты не наблюдали: уменьшение амплитуды  $Na^+$ -тока составило, в среднем,  $0.17 \pm 0.06\%$  (n=9, p=0.04), а увеличение —  $0.42 \pm 0.14\%$  (n=6, p=0.02). Сопоставление величин изменения пиковой амплитуды натриевого тока при действии дофамина и в контрольной серии экспериментов позволяет нам делать вывод о наличии эффектов дофамина на пиковую амплитуду натриевого тока. Тот факт, что, дофамин действует на

пиковую амплитуду натриевого тока, был доказан и при сравнении размаха вариации. Простое взвешенное отклонение или размах вариации при действии дофамина на амплитуду потенциал-активируемых  $\text{Na}^+$ -токов составил  $9.9 \pm 2.5\%$ , а в контроле (при действии физиологического раствора на амплитуду потенциал-активируемых  $\text{Na}^+$ -токов) —  $0.2 \pm 0.5\%$ .

Для исследования механизма действия дофамина была проведена серия экспериментов с применением специфических агонистов Д1 и Д2-рецепторов. Тесты показали, что специфический агонист Д1-рецепторов (+)-SKF-38393 (10 мкМ) уменьшал пиковую амплитуду  $\text{Na}^+$ -тока в среднем на  $31.1 \pm 10.6\%$  ( $n=5$ ;  $p<0.01$ ), в то время как специфический агонист Д2-рецепторов квинпирол (10 мкМ) одних случаях уменьшал амплитуду  $\text{Na}^+$ -тока, в среднем, на  $13.2 \pm 3.1\%$  ( $n=4$ ;  $p<0.01$ ), а в других - увеличивал в среднем на  $30.7 \pm 17.0\%$  ( $n=4$ ;  $p<0.01$ ) на разных клетках.

Применение специфических антагонистов Д1 и Д2-рецепторов (при изучении  $\text{Na}^+$ -токов) показало, что антагонист Д2-рецепторов сульпирид (10 мкМ) полностью блокирует как эффекты агониста Д1-рецепторов (+)-SKF-38393 (10 мкМ) ( $n=6$ ,  $p>0.05$ ), так и агониста Д2-рецепторов квинпирила (10 мкМ) ( $n=5$ ,  $p>0.05$ ). Эффект агониста Д1-рецепторов (+)-SKF-38393 (10 мкМ) на амплитуду  $\text{Na}^+$ -тока был заблокирован антагонистом Д1-рецепторов (+)-SCH-23390 (10 мкМ) (при учете, что эффект (+)-SKF-38393 на амплитуду  $\text{Na}^+$ -тока был принят за сто процентов) на  $58.5 \pm 12.7\%$  ( $n=6$ ,  $p<0.01$ ). Эффект агониста Д2-рецепторов квинпирила (10 мкМ) (уменьшение амплитуды  $\text{Na}^+$ -тока) не был заблокирован антагонистом Д1-рецепторов (+)-SCH-23390 (10 мкМ) ( $n=5$ ,  $p<0.01$ ).

В результате экспериментов было показано, что при аппликации агониста Д1-рецепторов (+)-SKF-38393 (10 мкМ) происходит уменьшение амплитуды  $\text{K}^+$ -токов в среднем на  $14.3 \pm 4.3\%$  ( $n=6$ ,  $p<0.01$ ). Агонист Д2-рецепторов квинпирол (10 мкМ) уменьшал амплитуду  $\text{K}^+$ -токов, в среднем, на  $5.5 \pm 2.5\%$ , ( $n=6$ ,  $p<0.01$ ), и увеличивал амплитуду  $\text{K}^+$ -токов в среднем на  $13.2 \pm 3.0\%$  ( $n=6$ ,  $p<0.01$ ) на разных клетках. В контрольных тестах, когда вместо квинпирила подавали физиологический раствор, подобные эффекты не наблюдали: уменьшение амплитуды  $\text{K}^+$ -тока составило, в среднем,  $0.49 \pm 0.07\%$  ( $n=15$ ,  $p=0.003$ ), а увеличение —  $0.65 \pm 0.19\%$  ( $n=7$ ,  $p=0.01$ ). Простое взвешенное отклонение или размах вариации при действии квинпирила на амплитуду потенциал-активируемых  $\text{K}^+$ -токов составил  $8.4 \pm 1.0\%$ , а в контроле при регистрации в физиологическом растворе на амплитуду потенциал-активируемых  $\text{K}^+$ -токов —  $0.1 \pm 0.6\%$ . Таким образом, доказано, что квинпирол оказывает действие на амплитуду потенциал-активируемых  $\text{K}^+$ -токов.

Применение специфических антагонистов D1 и D2-рецепторов (при изучении K<sup>+</sup>-токов) показало, что антагонист D2-рецепторов сульпирид (10 мкМ) полностью блокирует как эффекты агониста D1-рецепторов (+)-SKF-38393 (10 мкМ) (n=5, p=0.2), так и агониста D2-рецепторов квинпиrolа (10 мкМ) (n=5, p>0.05). Антагонист D1-рецепторов (+)-SCH-23390 (10 мкМ) на эффект, вызванный агонистом D2-рецепторов квинпиrolом (10 мкМ) (уменьшение амплитуды K<sup>+</sup>-тока) никакого действия не оказал (n=7, p<0.01), и не заблокировал действие агониста D1-рецепторов (+)-SKF-38393 (10 мкМ) на амплитуду K<sup>+</sup>-тока (n=11, p<0.01). Эффекты дофамина (10 мкМ) на амплитуду K<sup>+</sup>-тока были полностью заблокированы антагонистом D2-рецепторов сульпиридом (10 мкМ) (n=6, p>0.05).

Изучение модулирующего действия дофамина было продолжено на хемоправляемых токах, вызванных ГАМК и глицином, на мембране мультиполярных нейронов спинного мозга пескоройки.

Тесты показали, что аппликация дофамина (5 мкМ) уменьшает амплитуду ГАМК-активируемого тока (2 мМ), в среднем, на 33.3±8.7% (n=8, p<0.01), и увеличивает амплитуду, в среднем, на 37.3±11.8% (n=5, p<0.01) на разных клетках. В контрольных тестах, когда вместо дофамина подавали физиологический раствор, подобные эффекты не наблюдали: уменьшение амплитуды ГАМК-активируемого тока (2 мМ) составило, в среднем, 4.44±1.91% (n=9, p=0.04), а увеличение — 4.24±1.39% (n=8, p=0.02). Простое взвешенное отклонение или размах вариации при действии дофамина (5 мкМ) на амплитуду ГАМК-активируемого тока (2 мМ) составил 10.0±4.2%, а в контроле (при действии физиологического раствора на амплитуду ГАМК-активируемого тока (2 мМ)) — 0.01±0.6%.

При изучении действия агонистов D1 и D2-рецепторов на амплитуду хемоправляемых токов было показано, что агонист D1-рецепторов (+)-SKF-38393 (5 мкМ) уменьшает амплитуду ГАМК-активируемого тока (2 мМ), в среднем, на 63.1±11.7% (n=8, p<0.01). Агонист D2-рецепторов квинпиrol (5 мкМ) вызывает в разных клетках эффекты подобные дофамину: увеличение амплитуды ГАМК-активируемого тока на 61.0±13.8% (n=8, p<0.01), и уменьшение амплитуды на 55.7±2.0% (n=6, p<0.01). Концентрация ГАМК составляла 2 мМ.

При исследовании действия антагонистов на эффекты, вызванные дофамином (5 мкМ) на амплитуду ГАМК-активируемых токов (2 мМ) было показано, что антагонист D2-рецепторов сульпирид (5 мкМ) не блокирует эффекты, вызванные дофамином: уменьшение амплитуды составило 35.0±5.9% (n=6, p<0.01), увеличение амплитуды — 35.5±13.0% (n=5, p<0.01). (Для сравнения, дофамин вызывал уменьшение амплитуды ГАМК-активируемого тока, в среднем, на 33.3±8.7%, и увеличение амплитуды, в среднем,

на  $37.3 \pm 11.8\%$ ). В тоже время действие дофамина (5 мкМ) на ГАМК-активируемые токи было заблокировано антагонистом D1-рецепторов (+)-SCH-23390 (5 мкМ) (при учете, что эффекты дофамина на ГАМК-активируемые токи были приняты за сто процентов) на  $63.0 \pm 4.7\%$  в случае уменьшения амплитуды ГАМК-активируемых токов ( $n=7$ ,  $p<0.001$ ) и  $77.1 \pm 2.0\%$  в случае увеличения амплитуды ГАМК-активируемых токов ( $n=5$ ,  $p<0.01$ ). 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 ( $n=6$ ,  $p<0.01$ ) и на  $85.0 \pm 5.7\%$  в случае увеличения амплитуды ГАМК-активируемых токов ( $n=10$ ,  $p<0.01$ ).

При изучение модулирующего действия дофамина (5 мкМ) на амплитуду глицин-активируемого тока (0.2 мМ) было показано, что дофамин на разных клетках уменьшает на  $36.1 \pm 10.1\%$  ( $n=9$ ,  $p<0.01$ ) амплитуду глицин-активируемого тока и увеличивает его на  $31.4 \pm 7.5\%$  ( $n=6$ ,  $p<0.01$ ). В контрольных тестах, когда вместо дофамина подавали физиологический раствор, подобные эффекты не наблюдали: уменьшение амплитуды глицин-активируемого тока составило, в среднем,  $1.5 \pm 0.43\%$  ( $n=6$ ,  $p=0.02$ ), а увеличение —  $1.56 \pm 0.6\%$  ( $n=11$ ,  $p=0.03$ ). Простое взвешенное отклонение или размах вариации при действии дофамина (5 мкМ) на амплитуду глицин-активируемого тока (0.2 мМ) составил  $3.0 \pm 0.5\%$ , а в контроле (при действии физиологического раствора на амплитуду глицин-активируемого тока) —  $0.0 \pm 0.2\%$ .

Действие квинпиrolа (5 мкМ) — агониста D2-рецепторов тоже оказалось на разных клетках разнонаправленным: наблюдалось как уменьшение амплитуды глицин-активируемого тока (0.2 мМ) на  $31.2 \pm 6.8\%$  (0.2 мМ,  $n=10$ ,  $p<0.01$ ), так и увеличение амплитуды глицин-активируемого тока (0.2 мМ) на  $25.0 \pm 1.4\%$  ( $n=6$ ,  $p<0.01$ ). При аппликации (+)-SKF-38393 (5 мкМ) — агониста D1-рецепторов амплитуда глицин-активируемого тока (0.2 мМ) только уменьшалась – в среднем на  $39.4 \pm 14.9\%$  ( $n=6$ ,  $p<0.01$ ).

При исследовании действия сульпирида (5 мкМ) – антагониста D2-рецепторов на эффект дофамина (5 мкМ) на амплитуду глицин-активируемого тока (0.2 мМ), было показано, что эффекты дофамина не блокируются антагонистом D2-рецепторов сульпиридом: амплитуда глицин-активируемого тока уменьшалась в результате инкубации в растворе с дофамином и с сульпиридом на  $31.8 \pm 8.8\%$  ( $n=7$ ,  $p<0.002$ ) и увеличивалась на  $33.1 \pm 6.4\%$  ( $n=5$ ,  $p<0.008$ ). (Для сравнения, дофамин уменьшал амплитуду глицин-активируемого тока на  $36.1 \pm 10.1\%$  и увеличивал на  $31.4 \pm 7.5\%$ ).

Эффект дофамина (5 мкМ) был заблокирован антагонистом D1-рецепторов (+)-SCH-23390 (5 мкМ) (при учете, что эффекты дофамина на глицин-активируемые токи были приняты за сто процентов) на  $78.0 \pm 1.7\%$  в случае уменьшения амплитуды глицин-активируемых токов ( $n=7$ ,  $p<0.01$ ) и на  $72.2 \pm 3.4\%$  в случае увеличения амплитуды глицин-активируемых токов ( $n=5$ ,  $p<0.01$ ).

Антагонист D1-рецепторов (+)-SCH-23390 (5 мкМ) блокирует эффекты агониста D2-рецепторов квинпиrolа (5 мкМ) (при учете, что эффекты квинпиrolа на глицин-активируемые токи были приняты за сто процентов) на  $72.0 \pm 0.2\%$  в случае уменьшения ( $n=9$ ,  $p<0.01$ ) и на  $70.0 \pm 10.3\%$  амплитуды в случае увеличения амплитуды глицин-активируемых токов ( $n=6$ ,  $p<0.01$ ).

Таким образом, проведенные эксперименты свидетельствуют о том, что дофамин оказывает действие на потенциал-активируемые  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ -токи, и хемоправляемые токи, вызванные ГАМК и глицином, на мембране мультиполярных нейронов спинного мозга пескоройки. Это действие дофамина относится к модулирующему, так как в данном случае дофамин не вызывал каких-либо постсинаптических токов, а изменял функциональное состояние натриевых, калиевых и хлорных каналов.

Было показано, что эффект дофамина на потенциал-активируемые и хемоправляемые токи нельзя классифицировать просто как активирующий или ингибирующий, поскольку аппликация дофамина вызывала сложный комплексный эффект. В одних случаях этот эффект выражался в увеличении, а в других в уменьшении амплитуды изученных токов. В целом подобный результат хорошо согласуется с результатами других исследователей (Nicola et al., 2000). В частности, было показано неоднозначное действие дофамина на спайковую активность спинного мозга миноги (Kemnitz, 1997), клеток стриатума крыс (Calabresi et al., 1987; Cereda et al., 1995; Schiffmann et al., 1995).

Известно, что действие дофамина основано на активации двух основных классов дофаминовых рецепторов - D1 и D2 (Missale et al., 1998). Активация одного класса рецепторов приводит к уменьшению амплитуды тока, активация другого – к увеличению амплитуды тока (Nicola et al., 2000). Известно также, что дофаминовые D1 и D2 рецепторы колокализуются на мембране нейрона (Aizman et al., 2000; Fellous and Suri, 2002) и эффект дофамина зависит от их количественного распределения на мембране (Ding and Perkel, 2002). Поскольку действие дофамина выражалось как в уменьшении, так и в увеличении амплитуды изученных токов, а в отсутствие дофамина подобных изменений не наблюдалось и амплитуда оставалась стационарной то, можно предположить, что действие дофамина является суммой противоположно-направленных эффектов,

вызываемых активацией различных классов дофаминовых рецепторов. Для проверки этого предположения был проведен более детальный фармакологический анализ с применением специфических агонистов и антагонистов различных семейств дофаминовых рецепторов.

При исследовании действия специфического агониста D1-рецепторов (+)-SKF-38393 было показано, что амплитуда исследуемых токов уменьшалась. Этот результат соответствует данным литературы. В частности, уменьшение пиковой амплитуды  $\text{Na}^+$  токов при активации дофаминовых рецепторов группы D1 было получено на изолированных нейронах гиппокампа крыс. Было показано, что этот феномен связан с тем, что активация D1-рецепторов приводит к фосфорилированию альфа субъединиц натриевых каналов и это происходит с участием протеинкиназы A (Cantrell et al., 1997; Cantrell et al., 1999; 1999). Уменьшение амплитуды  $\text{Na}^+$ -токов при действии агонистов D1-рецепторов на срезах неостриатума и добавочных ядер крыс было показано и в других работах (Nicola et al., 2000; Surmeier et al., 1992; Surmeier and Kitai, 1993; Maurice et al., 2001). В шипиковых нейронах стриатума крыс (пэтч-кламп, срезы) активация D1-рецепторов агонистом D1-рецепторов приводит к уменьшению потенциал-независимых  $\text{K}^+$ -токов утечки и  $\text{K}^+$ -тока входящего выпрямления через увеличение входного сопротивления и деполяризацию синаптического входа в нейроны (Kitai and Surmeier, 1996; Gorelova et al., 2002). Активация D1-рецепторов уменьшает амплитуду ГАМК<sub>A</sub>-активируемых токов в изолированных нейронах неостриатума крыс через PKA/DARPP-32/PP1 (протеин киназа A/дофамин и циклический аденозин 3', 5'-монофосфат-регулирующий фосфопротеин, 32 кД/протеин фосфатаза-1) сигнальный каскад (Flores-Hernandez et al., 2000).

Действие квинпиrolа — агониста D2-рецепторов на амплитуду исследуемых токов оказалось неоднозначным: в одних случаях оно выражалось в уменьшении амплитуды токов, в других – в увеличении амплитуды. Динг и Персел показали (Ding and Percel, 2002), что активация D2-рецепторов квинпиrolом приводила и к уменьшению  $\text{Na}^+$  токов, и к увеличению  $\text{Na}^+$  токов в базальных ганглиях птиц. Сурмейер и соавт. (Surmeier et al., 1992) описали такой же эффект в стриатуме крыс. Подобный феномен был объяснен тем, квинпиrol активирует рецепторы D2-класса: D2 и D3-рецепторы, являющиеся разными подтипами D2-рецепторов (Missale et al., 1998). Активация D2-рецепторов квинпиrolом приводит к уменьшению  $\text{Na}^+$  токов, а активация D3-рецепторов квинпиrolом приводит к увеличению  $\text{Na}^+$  токов (Ding and Percel, 2002). Активация D2-рецепторов приводит и к уменьшению и к увеличению амплитуды  $\text{K}^+$ -токов входящего выпрямления через торможение аденилатциклазы и протеинкиназы A (Nicola et al., 2000). Активация D2-



рецепторов уменьшает амплитуду ГАМК<sub>A</sub>-активируемых токов в пирамидных нейронах крыс (Delgado et al., 2000; Seamans et al., 2001).

Таким образом, сопоставление полученных результатов с данными литературы дает возможность предположить, что на мембранах мультиполярных нейронов спинного мозга пескоройки присутствуют как минимум три типа дофаминовых рецепторов. Первый тип – рецептор из класса D<sub>1</sub>, активация которого уменьшает амплитуду изученных токов и два других типа рецепторов - из класса D<sub>2</sub> (D<sub>2</sub> и D<sub>3</sub>), активация которых приводит к уменьшению (D<sub>2</sub>) или к увеличению (D<sub>3</sub>) амплитуды изученных токов. Для более обоснованного вывода относительно типов рецепторов, представленных на мембранах исследуемых нейронов был проведен дальнейший фармакологический анализ с применением специфических антагонистов.

Этот анализ показал, что антагонист рецепторов группы D<sub>2</sub> – сульпирид, полностью блокирует эффекты не только квинпиrolа — агониста D<sub>2</sub>-рецепторов, но и (+)-SKF-38393 — агониста D<sub>1</sub>-рецепторов на амплитуду потенциал-активируемых Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup>-токов. Действие дофамина полностью блокировалось сульпиридом при изучении действия дофамина на амплитуду потенциал-активируемых K<sup>+</sup>-токов. Похожие данные были приведены у других исследователей. В частности, Грин и соавт. (Green et al., 1996) показали, что у брюхоногих моллюсков при исследовании изолированных париетальных нейронов методом пэтч-кламп антагонист D<sub>2</sub>-рецепторов сульпирид блокирует ионные токи, вызванные аппликацией дофамина. Подобное действие объяснялось авторами данной работы тем, что у брюхоногих моллюсков имеются дофаминовые рецепторы отличные от таковых у высших позвоночных животных.

В наших исследованиях антагонист рецепторов группы D<sub>1</sub> – (+)-SCH-23390, частично блокирует эффекты, вызванные активацией рецепторов D<sub>1</sub> – (+)-SKF-38393, но не блокирует изменения амплитуды потенциал-активируемых Na<sup>+</sup>-токов, вызванные активацией рецепторов D<sub>2</sub> –квинпиrolом. Учитывая, что (+)-SKF-38393 (агонист D<sub>1</sub>-рецепторов) может активировать как D<sub>1</sub>, так и D<sub>5</sub> тип дофаминовых рецепторов, относящихся к одному D<sub>1</sub> классу дофаминовых рецепторов (Missale et al., 1998), мы можем предположить, что отсутствие полной блокады антагонистом D<sub>1</sub>-(+)-SCH-23390 действия агониста D<sub>1</sub>-рецепторов объясняется специфической химической чувствительностью D<sub>1</sub> и D<sub>5</sub> дофаминовых рецепторов к действию антагонистов у пескоройки или специфику дофаминовых рецепторов этого животного.

При сравнении полученных данных с данными литературы оказалось, что у высших позвоночных антагонисты одного дофаминового класса рецепторов (D<sub>1</sub> или D<sub>2</sub>) в большинстве случаев блокируют эффекты агонистов этого же класса дофаминовых

рецепторов и не влияют на активацию рецепторов другого класса дофаминовых рецепторов (Surmeier et al., 1992; Ibañez-Sandoval et al., 2006). В тоже время имеются данные, что на срезах неостриатума крыс *in vivo* антагонист D1-рецепторов (+)-SCH-23390 блокирует эффекты, вызванные агонистом D2-рецепторов (уменьшение калий-зависимого высвобождения ацетилхолина), и эффекты, вызванные D1-агонистом (увеличение высвобождения цАМФ) (Plantje et al., 1984; 1984). Таким образом оказалось, что как и в этих исследованиях на высших позвоночных животных у миноги (пескоройки) антагонист D1-рецепторов SCH-23390 блокирует эффекты, вызванные не только агонистом D1-рецепторов, но и D2-рецепторов на ГАМК и глицин-активируемых токах.

При изучении влияния антагонистов на действие агонистов дофамина на потенциал-активируемые и хемоправляемые токи нами были получены отличные друг от друга данные. В частности, при изучении действия дофамина на потенциал-активируемые токи было показано, что эффекты, вызванные агонистами блокируются антагонистом D2-рецепторов, а при изучении действия дофамина на хемоправляемые токи — антагонистом D1-рецепторов. Подобное расхождение может быть объяснено тем, что при действии дофамина на хемоправляемые токи показан другой возможный путь реализации данных процессов, в частности было показано прямое протеин-протеиновое быстрое связывание и функциональное взаимодействие между дофаминовыми и ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами (D5- ГАМК<sub>A</sub>) Лиу и соавт. (Liu et al., 2000). Таким образом, можно предположить, что различие в механизмах, через которые опосредуется вышеописанные процессы приводит к разным результатам при изучении действия антагонистов на потенциал-активируемые и хемоправляемые токи.

Таким образом, наши исследования свидетельствуют, что катехоламины, в частности дофамин, выполняют модулирующую функцию у представителей позвоночных, находящихся на низшей ступени эволюционного древа.

## ВЫВОДЫ:

- 1) Дофамин вызывает индивидуальное и разнонаправленное действие в разных нейронах спинного мозга пескоройки.
- 2) Фармакологический анализ с использованием специфических агонистов и антагонистов дофаминовых рецепторов показал, что в модуляции дофамином потенциал-активируемых и хемоуправляемых токов участвуют разные подтипы дофаминовых рецепторов - D1, D5, D2 и D3-рецепторы.
- 3) Направленность модулирующего действия дофамина на потенциал-активируемые и хемоуправляемые токи может определяться преобладанием определенного подтипа дофаминовых рецепторов на мембране данного нейрона.
- 4) Полученные данные указывают на отличия фармакологической чувствительности дофаминовых рецепторов пескоройки по сравнению с дофаминовыми рецепторами млекопитающих (высших позвоночных).

## **Список работ, опубликованных по теме диссертации:**

1. Букинич А.А. Модулирующее действие дофамина на  $Na^+$  - $K^+$  токи дорсальных чувствительных и мультиполярных клеток спинного мозга пескоройки, Мат. Седьмой Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей. С-Петербург, Россия, 18 апреля 2004, с. 41.
2. Букинич А.А., Цветков Е. А., Веселкин Н. П. Особенности дофаминовых рецепторов мультиполярных нейронов спинного мозга пескоройки, Сб. тезисов XIII Межд. совещ. по эвол. физиологии. С-Петербург, Россия, 2006, с. 37-38.
3. Букинич А.А., Цветков Е. А., Веселкин Н. П. Особенности дофаминовых рецепторов на мембране мультиполярных нейронов спинного мозга пескоройки, Ж. эвол. биох. и физиол. 2007. Т. 43, № 1, С. 39-45.
4. Букинич А. А., Веселкин Н. П. Антагонист D2-рецепторов блокирует эффект дофамина на мембранах мультиполярных нейронов спинного мозга пескоройки, Журнал эволюц. биохимии и физиологии. 2007. Т. 43. № 2. С. 206-209.
5. Букинич А.А., Цветков Е. А., Веселкин Н. П. Модулирующее действие дофамина на амплитуду токов, вызванных ГАМК и глицином, мультиполярных нейронов спинного мозга пескоройки, Сб. тезисов XX Съезда физиологического Общества, Москва, Россия, 2007, 4-8 июня, С. 163.

**Работа выполнена при финансовой поддержке** Российского фонда фундаментальных исследований (Россия, РФФИ, грант № 05-04-48296).

A handwritten signature in black ink, consisting of several stylized, overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right.