

**ВЗАИМООТНОШЕНИЯ АДЕНОЗИНЕРГИЧЕСКОЙ И ДОФАМИНЕРГИЧЕСКОЙ  
НЕЙРОМЕДИАТОРНЫХ СИСТЕМ И ПРОЦЕССЫ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНО-  
ГО ОКИСЛЕНИЯ**

Дагаев С.Г., Кубарская Л.Г., Соловьева Н.Е., Кашуро В.А., Ещенко Н.Д.\*,

Романов А.А.\*, Долго-Сабуров В.Б.

*ФГУН «ИНСТИТУТ ТОКСИКОЛОГИИ» ФМБА России, 192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1, тел./факс (812) 365-06-80, [institute@toxicology.ru](mailto:institute@toxicology.ru)*

*ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет»\*, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. д.7-9, тел.: 328-20-00*

Резюме: В эксперименте на крысах показано, что блокада  $D_2$  подтипа дофаминовых рецепторов стимулировала систему свободно-радикального окисления и индуцировала накопление липопероксидов и гидроперекисей в различных отделах головного мозга. Комбинированная блокада  $D_2$  рецепторов и  $A_{2a}$  аденозинергических рецепторов предотвращала развитие локомоторных расстройств (каталепсии), которые являются типичными при снижении регулирующего действия  $D_2$  рецепторов, и ожидаемого развития окислительного стресса. Обсуждается регулирующая роль функционального взаимодействия центральных аденозинергической и дофаминергической нейромедиаторных систем в регуляции реакций своднорадикального окисления.

Ключевые слова: дофаминовые рецепторы, аденозинергические рецепторы, своднорадикальное окисление.

**THE INTERRELATIONSHIPS BETWEEN ADENOSINERGIC AND DOPAMINERGIC  
NEUROMEDIATORY SYSTEMS AND THE PROCESSES OF FREE RADICALS OXID-  
ATIONS**

Dagaev S.G., Kubarskaya L.G., Solovjova N.E., Kashuro V.A.,

Eshenko N.D.\*, Romanov A.A.\*, Dolgo-Saburov V.B.

*The Federal State Institution of Science «Institute of Toxicology» Federal medico-biological Agency, 192019, Saint Petersburg, Bekhterev Street, 1, tel/fax(812) 365-06-80, [institute@toxicology.ru](mailto:institute@toxicology.ru)*

*The Federal State Budget Institution of the highest professional Education «Sankt-Peterburg» State University»\*199034, Saint Petersburg, Universitetskaya nab., 7-9, tel. 328-20-00*

Abstract. In the experiments with rats was shown that the blockade of D<sub>2</sub>-subtype of the dopamine receptors stimulated the system of free radicals oxidation and induced the accumulation of lipoperoxides and hydroperoxide in the brain compartments. The combined blockade of D<sub>2</sub>-receptors and A<sub>2a</sub>-adenosinergic receptors prevented the rise of locomotory disturbances (catalepsia), which are typical for the down regulated activity of D<sub>2</sub>-receptors, and anticipated the development of oxidative stress. The regulatory role of the functional interaction of the central adenosinergic and dopaminergic neuromediator systems in the attended reactions of free radicals oxidation is discussed.

Key words: dopamine receptors, adenosinergic receptors, free radicals oxidation

Введение.

Анализ взаимодействия центральных нейромедиаторных систем и роли рецепторных механизмов в реализации их модулирующих влияний на физиологические функции до сих пор остается в ряду актуальных проблем современной нейрофизиологии. В частности, не может считаться окончательно выясненным характер взаимодействия аденозинергических и дофаминергических систем. Известно, что селективные антагонисты аденозиновых рецепторов A<sub>2α</sub> подтипа, SCH 58261 и ST 1535, снижают выраженность экстрапирамидной симптоматики, вызванной различными нарушениями дофаминергической передачи под влиянием 6-гидроксидофамина, МФТП или антагонистов D<sub>2</sub> подтипа рецепторов [1, 2]. При нарушении дофаминергической передачи индуцируется экспрессия мРНК аденозиновых A<sub>2α</sub>-рецепторов стриатальных нейронов [3]. Особое внимание обращает на себя то обстоятельство, что были обнаружены нейроны стриатума, на которых локализованы A<sub>2α</sub>- и D<sub>2</sub>-рецепторы [4], и их колокализация сопровождается формированием рецепторных гетеродимеров, которые могут рассматриваться как одна из структурных основ взаимодействия этих медиаторных систем [5]. Антагонистический характер взаимодействия аденозин- и дофаминергических медиаторных систем был продемонстрирован в отношении A<sub>2α</sub>- и D<sub>2</sub>-подтипов рецепторов по изменению частотно-амплитудных характеристик возбуждающих постсинаптических потенциалов при различных вариантах возбуждения и блокады подтипов этих рецепторов [6, 7].

Ранее было показано, что одним из проявлений изменения функционального состояния центральной дофаминергической медиаторной системы, вызываемого

фармакологической блокадой D<sub>2</sub>-подобных рецепторов, является интенсификация свободнорадикального окисления [8]. Эти события являются следствием генерации ряда активных форм кислорода, некоторые из которых рассматриваются в качестве нейромодуляторов. Настоящее исследование было направлено на анализ показателей свободнорадикального окисления при взаимодействии дофамин- и аденозинергической медиаторных систем в условиях модели экспериментального паркинсонизма.

#### Материалы и методы

Исследование проводилось на самцах белых крыс, массой тела 190-200 г, разведения питомника РАН «Раполово». Животные находились в условиях 12 часовой смены светлого и темного периодов, без ограничения доступа к воде и пище.

Для проведения исследования использовали блокатор D<sub>2</sub>-подтипа дофаминовых рецепторов галоперидол, блокатор A<sub>2α</sub> аденозиновых рецепторов SCH 58261 и диметилсульфоксид (ДМСО), реактивы «Сигма-Алдрич». Препараты вводились внутривентриально.

Животные были разделены методом рандомизации на четыре группы. Контрольной вводили растворитель — ДМСО. Блокаду дофаминовых рецепторов осуществляли введением галоперидола с предварительным введением ДМСО. Аденозиновые рецепторы блокировали высокоселективным соединением SCH 58261, растворитель ДМСО. Четвертой группе вводили за 30 минут до галоперидола SCH 58261.

Наступление каталепсии оценивали по способности животного устойчиво сохранять неестественное вертикальное положение с опорой передних лап на бортик, так называемая «поза лектора», на протяжении 2 минут, при этом повторные пробы проводились с интервалом 15 минут, тестирование было трехкратным. В случае выявления каталепсии дальнейшее тестирование не производилось. Галоперидол вводили в дозе 1,0 мг/кг, которая была выбрана с расчетом получения максимально вероятного поведенческого ответа по критерию наступления каталепсии.

После проведения теста на каталепсию выделяли ткани стриатума, гиппокампа и фронтальной коры головного мозга, в гомогенатах которых определяли содержа-

ние пероксида водорода [9], продуктов свободнорадикального окисления липидов – диеновых и триеновых конъюгатов (ДК и ТК) [10], малонового диальдегида (МДА) [11,12], оснований Шиффа (ОШ) [13,14], а так же активность фермента глутатион-S-трансферазы (КФ:2.5.1.18) [15]. Экстракцию липидов из ткани производили методом Фолча [16], определение фосфолипидов (ФЛ) по неорганическому фосфору осуществляли методом Бартлетта [17], определение общего белка в гомогенатах ткани проводили по методу Лоури [18].

#### Результаты исследования

По результатам проведения теста на каталепсию в ходе исследования были получены следующие данные: в группе, которой вводился галоперидол (1,0 мг/кг), у всех 6 животных было отмечено развитие каталепсии. В группе, которой перед введением галоперидола в указанной дозе вводился блокатор аденозинового рецептора SCH 58261 (10,0 мг/кг), проявления каталепсии не наблюдалось. Поведенческих изменений в группе животных, которым вводился SCH 58261, отмечено не было.

Результаты биохимического исследования по каждой структуре мозга представлены в таблицах 1–3.

Из приведенных данных следует, что блокада дофаминовых рецепторов сопровождалась значимым увеличением содержания перекиси водорода в стриатуме. Содержание диеновых конъюгатов было увеличено в стриатуме и гиппокампе на 96 и 48%, соответственно. Во всех исследованных структурах было отмечено увеличение содержания триеновых конъюгатов: в стриатуме в 2,1 раза, в гиппокампе — на 83%, а в коре головного мозга — в 3,8 раза. Увеличение содержания МДА наблюдалось только в стриатуме и составляло 159%. В коре головного мозга было отмечено понижение оснований Шиффа на 27%.

**Таблица 1- Содержание продуктов свободнорадикального окисления и активности глутатион-S-трансферазы в стриатуме при моделировании различных состояний у крыс**

(Обозначения столбцов таблицы: I — контрольная группа, DMSO; II — SCH 58261 + DMSO, III — DMSO, Галоперидол; IV — SCH 58261 + DMSO, Галоперидол)

Показатель	I	II	III	IV
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> мкмоль/мг ткани	7,6±0,1	7,9±0,5	8,2±0,2 <sup>1</sup>	8,5±0,8

ДК УЕ/мг ФЛ	0,464±0,133	0,291±0,047	0,909±0,087 <sup>I,II</sup>	0,415±0,055 <sup>III</sup>
ТК УЕ/мг ФЛ	0,225±0,030	0,168±0,058	0,477±0,194 <sup>I,II</sup>	0,158±0,008 <sup>I,III</sup>
МДА нмоль/г ткани	319,3±27,2	215,0±9,9 <sup>I</sup>	507,3±31,3 <sup>I,II</sup>	442,4±55,9 <sup>I,II</sup>
ОШ УЕ/мг ОЛ	80,5±12,2	87,7±24,8	70,5±6,6	76,7±17,0
глута- тион-S-трансфе- раза нмоль/мин мг белка	21,6±2,5	24,2±6,3	12,4±1,5 <sup>I,II</sup>	16,0±3,5 <sup>I</sup>
Надстрочными цифрами обозначены номера столбцов, в которых находятся значения показателей, имеющие значимые отличия на уровне P<0,05				

**Таблица 2 – Содержание продуктов свободнорадикального окисления и активности глутатион-S-трансферазы в гиппокампе при моделировании различных состояний у крыс**

(Обозначения столбцов таблицы: I — контрольная группа, DMSO; II — SCH 58261 + DMSO, III — DMSO, Галоперидол; IV — SCH 58261 + DMSO, Галоперидол)

Гиппокамп	I	II	III	IV
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> мкмоль/мг ткани	9,2±0,1	9,7±0,5	9,0±0,1	8,6±0,4
ДК УЕ/мг ФЛ	0,592±0,050	0,457±0,037 <sup>I</sup>	0,878±0,078 <sup>I,II</sup>	0,449±0,063 <sup>III</sup>
ТК УЕ/мг ФЛ	0,232±0,066	0,176±0,026	0,424±0,007 <sup>I,II</sup>	0,144±0,033 <sup>III</sup>
МДА нмоль/г ткани	365,1±7,3	377,5±98,5	372,9±23,0	408,5±94,2
ОШ УЕ/мг ОЛ	75,1±6,9	87,7±15,1	94,4±18,9	73,2±8,0
глута- тион-S-трансфе- раза нмоль/мин мг белка	30,5±5,4	34,6±3,5	14,7±3,8 <sup>I,II</sup>	26,2±**
Надстрочными цифрами обозначены номера столбцов, в которых находятся значения показателей имеющие, значимые отличия на уровне P<0,05 ** — оценка доверительного интервала не производилась, в связи некорректностью среднего значения, что было связано с наличием в выборке двух форм распределения				

**Таблица 3 – Содержание продуктов свободнорадикального окисления и активности глутатион-S-трансферазы в коре головного мозга при моделировании различных состояний у крыс**

(Обозначения столбцов таблицы: I — контрольная группа, DMSO; II — SCH 58261 + DMSO, III — DMSO, Галоперидол; IV — SCH 58261 + DMSO, Галоперидол)

Кора	I	II	III	IV
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	7,6±0,4	9,1±0,6 <sup>I</sup>	7,6±0,3 <sup>II</sup>	8,2±0,6

МКМОЛЬ/МГ ткани				
ДК УЕ/МГ ФЛ	0,977±0,230	0,574±0,131 <sup>I</sup>	1,039±0,106 <sup>II</sup>	0,461±0,013 <sup>I,III</sup>
ТК УЕ/МГ ФЛ	0,132±0,047	0,217±0,060	0,503±0,125 <sup>I,II</sup>	0,154±0,037 <sup>III</sup>
МДА нмоль/г ткани	545,4±30,1	316,3±89,9 <sup>I</sup>	599,7±70,0 <sup>II</sup>	372,0±57,4 <sup>I,III</sup>
ОШ УЕ/МГ ОЛ	78,1±9,0	119,0±12,0 <sup>I</sup>	56,7±7,1 <sup>I,II</sup>	66,2±7,5 <sup>II</sup>
глута- тион-S-трансфе- раза нмоль/мин мг белка	33,8±5,1	30,0±3,9	14,1±0,7 <sup>I,II</sup>	15,1±0,2 <sup>I,II</sup>
Надстрочными цифрами обозначены номера столбцов, в которых находятся значения показателей, имеющие значимые отличия на уровне P<0,05				

Введение блокатора аденозиновых рецепторов сопровождалось снижением содержания МДА в стриатуме на 33%, ДК в гиппокампе — на 23% и коре головного мозга — на 41%. В коре было отмечено снижение содержания МДА на 42% и увеличение ОШ на 52%. При анализе данных, полученных на модели блокады аденозиновых рецепторов, обращает внимание тенденция к снижению содержания в стриатуме и гиппокампе таких продуктов перекисного окисления липидов как диеновые и триеновые конъюгаты, а также в некоторых структурах и МДА.

Введение блокатора дофаминовых рецепторов на фоне блокады аденозиновых рецепторов относительно группы животных с моделью двигательных нарушений в условиях блокады D<sub>2</sub> рецепторов, сопровождалось снижением в стриатуме ДК, ТК и МДА. При этом снижение уровня содержания ТК имело достоверное отличие от контрольной группы. В гиппокампе при совместной блокаде двух медиаторных систем отмечалось снижение уровня ДК и ТК относительно уровня группы с блокадой D<sub>2</sub>-подтипа рецепторов. При этом содержание ДК, ТК, МДА и ОШ не имели значимых отличий от уровня контрольной группы. Содержание в коре головного мозга ДК и ТК, продуктов свободнорадикального окисления, было сопоставимо со значениями контрольной группы и достоверно ниже, чем в группе с блокадой D<sub>2</sub> рецепторов.

Значимое угнетение активности глутатион-S-трансферазы было отмечено в результате блокады дофаминергической системы (введение галоперидола) в стриатуме. Во фронтальной коре значимое угнетение активности фермента наблюдалось

как при введении галоперидола, так и при совместной блокаде с аденозинергической системой, по сравнению с группами контроля и группой, которой вводился только блокатор аденозинергических рецепторов. Введение блокатора аденозиновых рецепторов сопровождалось тенденцией к увеличению активности этого фермента.

#### Обсуждение результатов

Полученные в настоящем исследовании данные свидетельствовали о фармакологическом антагонизме эффектов, вызываемых блокадой дофаминовых рецепторов  $D_2$  подтипа и аденозиновых рецепторов  $A_{2\alpha}$  подтипа. (Параметры фармакологической модели в настоящем исследовании были подобраны таким образом, чтобы блокада  $D_2$  подтипа рецепторов на поведенческом уровне проявлялась в максимальном числе наблюдений.) Двигательные нарушения в форме каталепсии были выявлены фактически у всех животных с блокадой дофаминовых рецепторов и отсутствовали у животных группы с предварительным введением блокатора аденозиновых рецепторов.

Результаты, характеризующие фармакологический антагонизм дофамин- и аденозинергической медиаторных систем, ранее обсуждались на симпозиуме, посвященном роли  $A_{2\alpha}$ -подтипа рецепторов [19].

Блокада аденозиновых  $A_{2\alpha}$  рецепторов в нашем исследовании сопровождалась тенденцией к снижению продуктов свободнорадикального окисления с наибольшей выраженностью во фронтальной коре головного мозга. Напротив, блокада  $D_2$  подтипа дофаминовых рецепторов характеризовалась повышением содержания этих продуктов. Максимальные изменения этих показателей были отмечены в области стриатума и сопровождалась выраженными двигательными нарушениями. В условиях предварительной блокады рецепторов аденозинергической системы выявлялся уровень показателей продуктов свободнорадикального окисления сопоставимый с уровнем контрольной группы. Таким образом, при оценке содержания продуктов свободнорадикального окисления был выявлен паттерн характерного их распределения в структурах мозга в зависимости от функционального состояния, а также выявлен антагонизм аденозиновой системы по отношению к дофаминовой медиаторной системе на уровне изученных биохимических показателей.



## Выводы

1. Получены данные, подтверждающие усиление процессов свободнорадикального окисления при блокаде  $D_2$  подтипа дофаминовых рецепторов, которое проявляется увеличением содержания продуктов перекисного окисления липидов и  $H_2O_2$ . Наибольшее число параметров и выраженность их изменений отмечена в области стриатума.
2. Выявлено связанное с блокадой  $D_2$  дофаминовых рецепторов снижение активности глутатион-S-трансферазы в ткани ЦНС, фермента, играющего ключевую роль в катаболизме ксенобиотиков и выполняющего функцию компонента ферментативного звена системы антиоксидантной защиты.
3. Сочетанная блокада аденозиновых  $A_{2\alpha}$  рецепторов и  $D_2$  подтипа дофаминовых рецепторов предупреждала развитие двигательных нарушений и характеризовалась уровнем содержания продуктов свободнорадикального окисления, сопоставимым со значениями контрольной группы.

Частично поддержано грантом РФФИ № 09-04-1007

Федеральное государственное учреждение науки Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства Российской Федерации



## Литература

- 1 Tronci E., Simola N., Borsini F., Schintu N., Frau L., Carminati P., Morelli M. Characterization of the antiparkinsonian effects of the new adenosine A2A receptor antagonist ST1535: Acute and subchronic studies in rats// *European J. Pharmacol.*— 2007.—V. 566.— P. 94–102
- 2 Simola N., Fenu S., Baraldi P., Tabrizi M. A., Morelli M. Dopamine and adenosine receptor interaction as basis for the treatment of Parkinson's disease // *J. Neurological Sci.* — 2006.— V. 248.— P. 48–52
- 3 Pinna A., Corsi C., Carta A.R., et al., (2002) Modification of adenosine extracellular levels and adenosine A(2A) receptor mRNA by dopamine denervation // *Eur. J. Pharmacol.*— V. 446,— pp. 75–82
- 4 Ferre S., Von Euler G., Johansson B., et al., (1991) Stimulation of high affinity adenosine A-2 receptors decreases the affinity of dopamine D-2 receptors in rat striatal membranes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*— V. 88.— pp. 7237-7241
- 5 Agnati L. F., Ferre S., Lluis C., Franco R., Fuxe K. Molecular Mechanisms and Therapeutical Implications of Intramembrane Receptor/Receptor Interactions among Heptahelical Receptors with Examples from the Striatopallidal GABA// *Neurons Pharmacol Rev.* —2003.— Vol. 55, No. 3.— P. 509–550
- 6 Tozzi A., Tschertter A., Belcastro V., Tantucci M., Costa C., Picconi B., Centonze D., Calabresi P., Borsini F. Interaction of A2A adenosine and D2 dopamine receptors modulates corticostriatal glutamatergic transmission // *Neuropharmacology.*— 2007.— V. 53.— P. 783–789
- 7 Azdad K., Gall D., Woods A. S., Ledent C., Ferré S., Schiffmann S. N. Dopamine D2 and Adenosine A2A Receptors Regulate NMDA-Mediated Excitation in Accumbens Neurons Through A2A–D2 Receptor Heteromerization // *Neuropsychopharmacology.*— 2009.— V. 34.— P. 972–986
- 8 Долго-Сабуров В. Б., Дагаев С. Г., Кубарская Л.Г., Соловьева Н. Е., Филько О. А., Храброва А. В. Роль окислительного стресса в формировании паркинсоноподобных состояний // *Доклады академии наук.*—2010.—Т. 434, № 5.—С. 709–711
- 9 Beutler E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*, N.Y., S-Francisco:Grune and Stratton.— 1975.— p. 215

- 10 Dillard C.J., Tappel A.L. Lipid peroxidation in biological tissues // *J. Free Radic. Biol. Med.*— 1989.— Vol. 7.—P. 193–196.
- 11 Андреева Л.И., Кожемякин Л.А., Кишкун А.А. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с ТБК // *Лабораторное дело.*—1988.—№ 11.—С. 41–43.
- 12 Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Мажуль Л.М. Анализ методов определения продуктов ПОЛ в сыворотке крови по тесту с ТБК // *Вопр. мед. химии.*—1987.—Т. 33, №1.—С. 118 – 122.
- 13 Flercher B.L., Dillard C.J., Tappel A.Y. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues // *Analyt. Biochem.*—1973.—Vol.52.—P. 1–9
- 14 Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. // *Методические рекомендации.* – СПб.: ИКФ «Фолиант» 2000. –52с.
- 15 *Медицинские лабораторные технологии. Справочник / Под ред. А.И. Карпищенко.* - С.Пб: Интермедика.—1999.—Т. 2.—С. 23–24.
- 16 Folch J., Lees M., Sloane – Stanly G.M. A simple method for the isolation and purification total lipids from animal tissues // *J. Biol. Chem.*—1957.—V.193, №1.—P. 497–509
- 17 Bartlett G. Phosphorous assay in colomn chromatography // *J. Biol. Chem.*—1959.—Vol. 234.—P.466–473.
- 18 Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.*—1951.—V. 193.—P.265–275.
- 19 Targeting adenosine A<sub>2A</sub> receptors in Parkinson's disease and other CNS disorders / Edited by M. A. Schwarzschild // *Progress in Neurobiology.*— 2007.— Vol. 83, № 5.— P. 261-348