

ЛАДАСТЕН ИНДУЦИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ БИОСИНТЕЗ ДОФАМИНА В РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУРАХ МОЗГА КРЫС

Ю. В. Вахитова^{1,2}, Р. С. Ямиданов², С. Б. Середенин¹

В экспериментах на крысах изучено влияние ладастена при введении внутрь в дозе 50 мг/кг на экспрессию генов тирозингидроксилазы и ДОФА-декарбоксилазы, содержание дофамина и L-ДОФА в клетках гипоталамуса и стриатума мозга крыс. Полученные данные показывают, что в первые часы действия препарата дофаминопозитивные эффекты обусловлены усилением высвобождения нейромедиатора. Установлена корреляция между накоплением L-ДОФА и ДА и предшествующим увеличением транскрипционной активности исследованных генов, что позволяет сделать заключение об индукции ладастеном *de novo* синтеза тирозингидроксилазы и ДОФА-декарбоксилазы. Отмечены различия во влиянии ладастена на исследованные параметры в гипоталамусе и стриатуме.

Ключевые слова: экспрессия генов, тирозингидроксилаза, ДОФА-декарбоксилаза, стриатум, гипоталамус, обратная транскрипция, полимеразная цепная реакция

ВВЕДЕНИЕ

Ладастен [(N-(2-адамантил)-N-п-бромфениламин)] синтезирован и фармакологически изучен в ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН. В спектре его действия выявлены психостимулирующие, анксиолитические и иммуномодулирующие свойства [2, 7]. Отмечено влияние ладастена на дофамин-, серотонин- и ГАМК-ергические нейромедиаторные системы [6]. Препарат предложен в качестве средства регуляции функциональных изменений организма, вызванных стрессорными факторами различной природы [4].

Анализ механизмов психостимулирующего действия ладастена показал его способность ингибировать обратный захват дофамина, норадреналина и серотонина синапсом *in vitro*, стимулировать высвобождение дофамина из пресинаптических терминалей стриатума в течение 8 ч после введения в дозе ED₅₀ [3, 1]. В условиях блокады ДОФА-декарбоксилазы 3-оксибензгидразином ладастен способствовал накоплению L-ДОФА в стриатуме и фронтальной коре [5], что может быть следствием его влияния на синтез и/или активность тирозингидроксилазы (ТГ, ЕС 1. 14. 16. 2.), ключевого фермента биосинтеза катехоламинов. Изменение активности ТГ может быть обусловлено как воздействием ряда эндогенных регуляторов в рамках физиологической нормы, так и при влиянии средовых факторов путем фосфорилирования различными классами протеинкиназ, либо модуляции транскрипционной активности гена ТГ [8].

Целью исследования явилось изучение временной зависимости влияния ладастена в дозе ED₅₀ на эксп-

рессию генов тирозингидроксилазы и ДОФА-декарбоксилазы, содержание дофамина и L-ДОФА в клетках гипоталамуса и стриатума головного мозга крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на белых беспородных крысах – самцах массой 200 – 250 г, содержащихся в стандартных условиях лабораторного вивария. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных”.

Ладастен (ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН) вводили внутрь в суспензии с твин-80 в дозе 50 мг/кг, контрольным животным — соответствующий объем дистиллированной воды с твин-80.

Нейрохимические параметры изучали в клетках стриатума и гипоталамуса головного мозга крыс. После декапитации указанные структуры быстро извлекали, помещали в жидкий азот, затем растирали до порошкообразного состояния.

Выделение суммарных РНК проводили с помощью реагента TRIzol в соответствии с протоколом фирмы – изготовителя (“Invitrogen”, США). Примеси ДНК удаляли обработкой ДНКазой (“Promega”, США) с последующей фенольно-хлороформной очисткой. Качество выделенных препаратов РНК контролировали спектрофотометрически и электрофорезом в 1,2 % агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл бромида этидия.

Экспрессию генов ТГ и ДОФА-декарбоксилазы изучали через 0,5, 1,5, 4, 6, 8, и 12 ч после введения ладастена методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР). Для синтеза одноцепочечной кДНК на матрице РНК 2 – 5 мкг суммарной РНК “отжигали” с 10 нг oligo(dT)₁₂₋₁₈-прайма (“Invitrogen”, США) при 65 °С

¹ ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

² Институт биохимии и генетики Уфимского Научного Центра РАН, Уфа, 450054, Пр. Октября, 69.

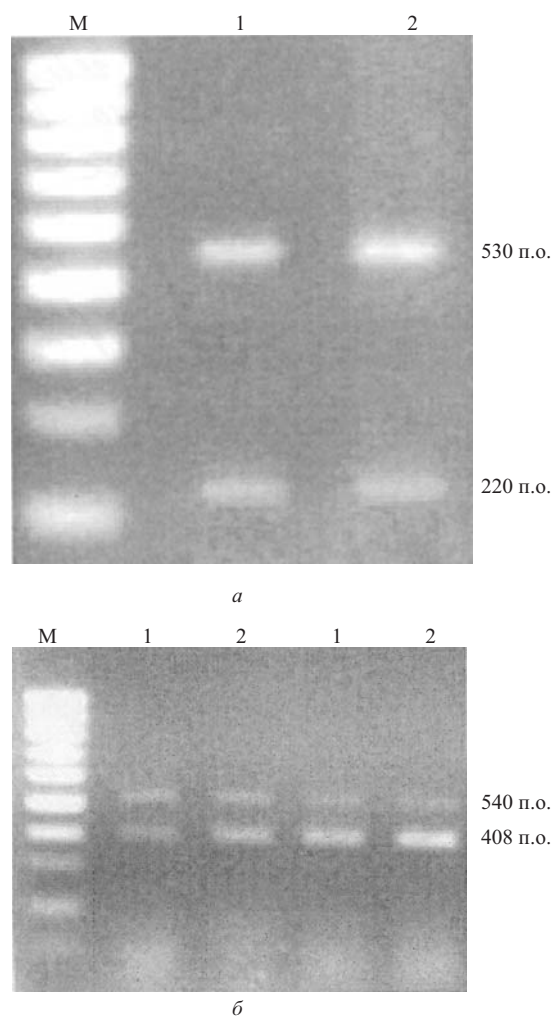


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации мультиплексной ПЦР фрагментов кДНК тирозингидроксилазы и протеолипидного белка (*а*) и ДОФА-декарбоксилазы и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*б*).

1 — контроль; 2 — опыт; М — 100 п.о. ДНК маркер.

5 мин, охлаждали и вносили в реакционную смесь, содержащую в 20 мкл 2 мМ $MgCl_2$, 1 мМ DTT, 20 мМ трис-НСl (рН 8,5), 100 мМ КСl, 0,5 мМ каждого dNTP, 5 ед. RNAsin (“МВI Fermentas”, Литва) и 0,5 ед. фермента обратной транскриптазы М-МуLV (“Сибэнзим”, Россия). Реакцию проводили при 37 °С в течение 1 ч. Обратную транскриптазу инактивировали в конце реакции нагреванием до 95 °С 5 мин. Полимеразную цепную реакцию проводили в 15 мкл среды, содержащей 20 мМ трис-НСl буфера (рН 8,5), 25 мМ КСl, 1,5 мМ $MgCl_2$, 10 мМ 2-меркаптоэтанола, 0,1 % тритона X-100, 0,2 мМ каждого dNTP, 1 ед. Taq-полимеразы (“Сибэнзим”, Россия), по 15 пмоль каждого праймера и 2 мкл смеси после обратной транскрипции. Для предотвращения испарения компонентов амплификационной смеси сверху настилали вазелиновое масло. Подбор и анализ праймеров осуществляли с помощью программ LaserGene (“DNASTAR”, США) и OLIGO,

используя базу данных Международного банка нуклеотидных последовательностей GenBank.

Режим термоциклирования совместной ПЦР ТГ и протеолипидного белка (ПЛБ): 94 °С — 2 мин; 94 °С — 45 с, 61 °С — 1 мин, 72 °С — 1 мин; 72 °С — 5 мин. Для ДОФА-декарбоксилазы и ГАФДГ: 94 °С — 2 мин; 94 °С — 45 с, 56 °С — 1 мин, 72 °С — 1 мин; 72 °С — 5 мин. Продукты амплификации анализировали электрофорезом в 1,5 % агарозном геле. В качестве маркера молекулярной массы использовали 100 п.о. ДНК маркер (“Сибэнзим”, Россия). После проведения электрофореза гель окрашивали водным раствором бромистого этидия. Продукты ПЦР визуализировали в ультрафиолетовом свете на фотодокументационной системе с помощью программы BIOTEST. Количественную оценку оптической плотности полос на электрофореграммах проводили с помощью программы TOTALab 2.0. (США). Оптическую плотность полосы ДНК исследуемого гена высчитывали по отношению к оптической плотности полос ДНК внутреннего контроля. Конечные числовые значения выражали в процентах от контроля, принимая уровень мРНК гена ТГ или ДОФА-декарбоксилазы в контрольных вариантах за 100 %. По результатам 5 – 7 повторных измерений для каждого экспериментального варианта высчитывалось среднее значение, а также доверительный интервал с вероятностью 0,95. Статистическую обработку данных выполняли с помощью программы Statistica 5.0.

Содержание дофамина и L-ДОФА в гипоталамусе и стриатуме анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). ВЭЖХ проводили в системе, включающей насос высокого давления HPLC (Model 572P, “Gasukuro Kogyo”, Япония), ультрафиолетовый детектор “Du Pont” (США). Образцы гомогенизировали в 300 – 500 мкл 0,4 н. $HCIO_4$ и центрифугировали при 13 000 g в течение 15 мин. Надосадочную жидкость вновь центрифугировали и 10 мкл фильтрата наносили на аналитическую колонку с помощью инжектора (Model 7125, “Rheodyne”, США) с петлей объемом 10 мкл. Для разделения использовали аналитическую колонку из нержавеющей стали Zorbax-ODS (250 × 4,6 мм, “Shimadzu”, Япония) с сорбентом (размер зерна 5 мкм). Разделение происходило при комнатной температуре при скорости подвижной фазы 0,7 мл/мин, $P = 130$ Bar. В качестве элюента использовали фосфатный буфер (рН 3,5), содержащий 10 % метанола. Регистрацию пиков проводили по УФ-поглощению при 280 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как отмечалось выше, уровень экспрессии генов тирозингидроксилазы и ДОФА-декарбоксилазы исследовали методом ОТ-ПЦР в модификации, предложенной Wong через 0,5; 1,5; 4; 6; 8 и 12 ч после введения ладастена [9]. Данный метод, обладающий высокой чувствительностью и специфичностью, что важно при работе с ограниченным количеством исходного мате-

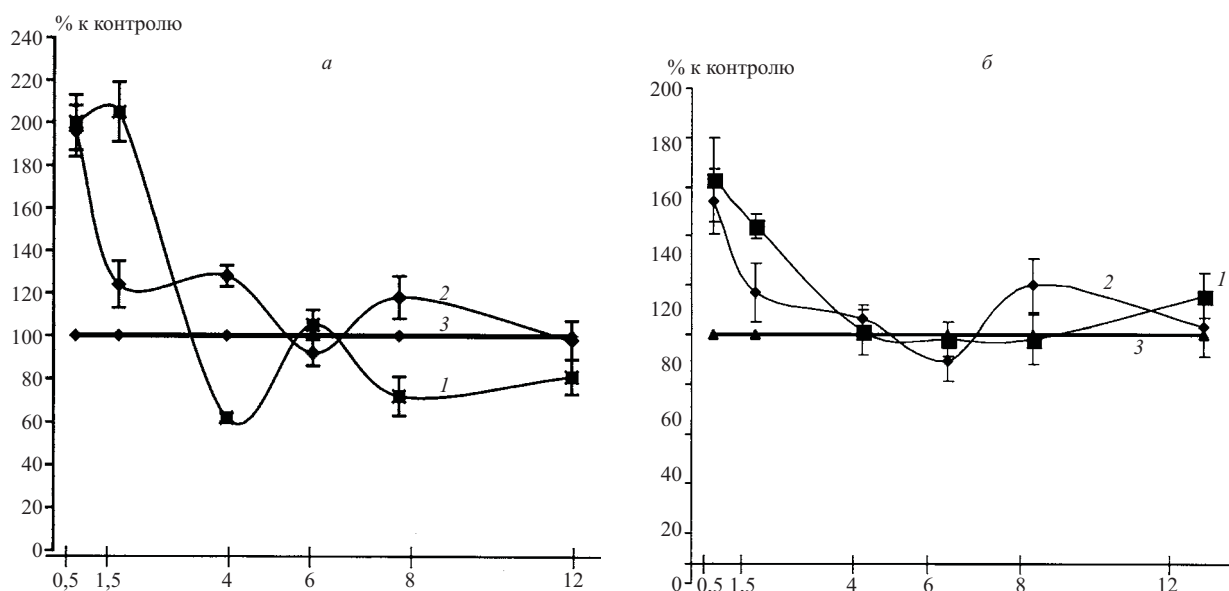


Рис. 2. Динамика транскрипционной активности генов ТГ и ДОФА-декарбоксилазы в гипоталамусе (а) и стриатуме (б) мозга крыс через 0,5; 1,5; 4, 6, 8 и 12 ч после однократного введения внутрь ладастена в дозе 50 мг/кг (в % к контролю; * $p < 0,05$).

1 — ТГ, 2 — ДОФА-декарбоксилаза, 3 — контроль.

риала, позволяет выявлять небольшие изменения уровня мРНК, а также проводить сравнительную полуколичественную оценку содержания мРНК нескольких образцов одновременно. На первом этапе с мРНК с помощью фермента обратной транскриптазы синтезируется одноцепочечная кДНК (реакция обратной транскрипции), которая в дальнейшем используется в качестве матрицы в ПЦР. Затем проводится мультиплексная ПЦР, в ходе которой совместно используется 2 пары праймеров: одна пара праймеров амплифицирует фрагмент гена, экспрессия которого должна быть оценена (целевой продукт), другая — фрагмент гена, выбранного в качестве внутреннего контроля, который позволяет нормализовать количественное содержание целевого продукта. Внутренним контролем обычно является любой конститутивно экспрессирующийся ген, относящийся к классу генов “домашнего хозяйства”. Следует отметить, что в использованной нами модификации метода каждая пара праймеров добавляется в амплификационную смесь не одновременно, как это обычно делается при проведении ПЦР, а последовательно, что позволяет варьировать количество циклов для каждой пары выбранных праймеров. Количество циклов термочиклирования подбирали таким образом, чтобы остановить реакцию через 2 цикла после выхода на плато. Первоначально проводили 6 циклов с парой праймеров, специфичных к гену тирозингидроксилазы, либо 8 циклов с праймерами к гену ДОФА-декарбоксилазы, затем добавляли праймеры, специфичные для гена ПЛБ и ГАФДГ (внутренние контроли) и амплифицировали еще 32 и 30 циклов соответственно.

В работе были использованы олигонуклеотидные праймеры представленные в табл. 1.

Как видно из рис. 1, а и б, в процессе амплификации с указанными выше парами праймеров, синтезируются фрагменты исследуемых генов, соответствующие по протяженности расчетным параметрам.

Ладастен при введении крысам внутрь в дозе 50 мг/кг через 0,5 ч (табл. 2) достоверно снижал уровень ДА и в большей степени L-ДОФА в гипоталамусе и стриатуме. Через 1,5 ч после введения ладастен увеличивал содержание и L-ДОФА (138 %) и ДА (139 %) в гипоталамусе, тогда как в стриатуме уровень предшественника и медиатора был существенно ниже контрольных значений (9 и 31 % соответственно). Через 2,5 ч содержание L-ДОФА как в гипоталамусе, так и в стриатуме резко увеличивалось, достигая уровня 184–186 % от контроля. Содержание дофамина в данный промежуток времени в обеих структурах находилось в пределах контрольных значений. Снижение со-

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры

мРНК	Размер продукта ПЦР, п.н.	Праймеры
1. Тирозингидроксилаза	530	5'- act gtg gaa ttc ggg ctat gt -3' 5'-gtt gag aag cag tgt tgg gag g -3'
2. ДОФА-декарбоксилаза	410	5'- agg ggc tgc agg ctt aca tt -3' 5'- gac gga ggg gtg gtt att ttt ct -3'
3. Протеолипидный белок	220	5'- gca atc atg aag gtg agc agg -3' 5'- cat ccc gac aag ttt gtg gg -3'
4. Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	540	5'- tta gca ccc ctg gcc aag g -3' 5'- ctt act cct tgg agg cca tg -3'

держания L-ДОФА и ДА в гипоталамусе и стриатуме происходит через 4 ч после введения ладастена. Тенденция к снижению содержания L-ДОФА сохранялась в гипоталамусе и стриатуме через 5 ч после введения препарата, тогда как уровень ДА в гипоталамусе увеличился и превышал показатели контроля на 31 %.

Как следует из рис. 2, а, однократное введение ладастена крысам в дозе 50 мг/кг оказывает определенное влияние на экспрессию генов тирозингидроксилазы и ДОФА-декарбоксилазы в клетках гипоталамуса. Двух кратное увеличение экспрессии генов ТГ и ДОФА-декарбоксилазы отмечается через 0,5 ч после введения ладастена. Экспрессия гена ТГ сохраняется на том же уровне и через 1,5 ч после введения препарата, а гена ДОФА-декарбоксилазы в данный промежуток времени — несколько снижается. К 4-му ч отмечается снижение уровня мРНК ТГ до 62 %, и увеличение уровня мРНК ДОФА-декарбоксилазы до 128 %. Через 6 ч после воздействия ладастена экспрессия обоих исследованных генов находится в пределах контрольных значений и сохраняется на том же уровне в течении последующих 6 ч наблюдений. Таким образом, ладастен модулирует экспрессию генов тирозингидроксилазы и ДОФА-декарбоксилазы в клетках гипоталамуса мозга крыс, причем максимумы активирующих эффектов препарата приходятся на 0,5 и 1,5 ч после введения.

Данные о влиянии однократного введения ладастена на экспрессию генов тирозингидроксилазы и ДОФА-декарбоксилазы в клетках стриатума приведены на рис. 2, б. Через 0,5 ч уровень мРНК генов ТГ и ДОФА-декарбоксилазы в стриатуме увеличивается на 63 и 54 % соответственно. Через 1,5 ч после введения препарата экспрессия гена ТГ также превышает показатели контроля (144 %), а гена ДОФА-декарбоксилазы снижается до уровня контрольных значений. С 4-го и далее до 12-го часа после введения ладастена экспрессия генов ТГ и ДОФА-декарбоксилазы находится в

пределах показателей контроля. Приведенные данные свидетельствуют о том, что ладастен оказывает влияние на экспрессию генов ТГ и ДОФА-декарбоксилазы в клетках стриатума, и это воздействие, также как и в клетках гипоталамуса, максимально в течении 1,5 ч.

Полученные данные показывают, что, через 0,5 ч после введения ладастена происходит снижение тканевого уровня ДА и в большей степени L-ДОФА, причем более выраженные их изменения отмечаются в клетках стриатума. Снижение содержания ДА на фоне ладастена, вероятно, является следствием усиления процессов высвобождения медиатора из пресинаптических терминалей. Ранее было показано, что ладастен вызывает повышение высвобождения дофамина в дорсальном стриатуме свободноподвижных крыс, наблюдаемое в течение 8 ч [1]. Выявлено также увеличение выхода эндогенного дофамина из перфузируемых фрагментов стриатума в присутствии ладастена [3]. Вероятно, наблюдаемая нами индукция экспрессии генов ТГ и ДОФА-декарбоксилазы в клетках гипоталамуса и стриатума через 0,5 ч после введения ладастена является следствием необходимости восстановления и пополнения внутриклеточных резервов нейромедиатора. В результате реализации механизма обратной связи через 1,5 ч после введения ладастена содержание L-ДОФА и ДА в гипоталамусе увеличивается на 38 и 39 % соответственно. К 2,5 ч содержание L-ДОФА в гипоталамусе и стриатуме достигает максимальных значений, возможно, как результат продолжающейся активации экспрессии гена ТГ. Однако содержание дофамина в обеих структурах в этот же промежуток времени находится практически на уровне контрольных значений, что, вероятно, связано со снижением эффективности конверсии L-ДОФА в ДА в результате ингибирования экспрессии гена ДОФА-декарбоксилазы. Ингибирование экспрессии гена ТГ, отмечаемое с 4 ч после введения ладастена, скорее всего сопряжено с реализацией механизма отрицательной обратной связи, осуществляемой избыточными количествами дофамина. Содержание L-ДОФА также снижается к 4 – 5 ч наблюдений. Обращает на себя внимание увеличение содержания ДА в гипоталамусе через 5 ч, чему предшествует индукция мРНК гена ДОФА-декарбоксилазы через 4 ч после введения препарата. Более длительное воздействие ладастена не оказывает значимого влияния на транскрипционную активность исследуемых генов в клетках гипоталамуса и стриатума.

Обобщая полученный нами экспериментальный материал, можно предположить, что увеличение транскрипционной активности генов ТГ и ДОФА-декарбоксилазы в клетках гипоталамуса и стриатума через 0,5 ч после однократного введения ладастена преимущественно сопряжено с реализацией механизмов субстратного регулирования. Активация экспрессии гена тирозингидроксилазы через 1,5 ч после введения препарата в исследованных структурах, вероятно, является

Таблица 2. Влияние однократного введения ладастена на содержание L-ДОФА и ДА в гипоталамусе и стриатуме мозга крыс (в % к контролю)

Структура мозга	Время после введения ладастена, ч	L-ДОФА	ДА
Гипоталамус	0,5	38 ± 4,5*	74 ± 4,9*
	1,5	138 ± 5,7*	139 ± 5,8*
	2,5	184 ± 6,2*	113 ± 5,3*
	4	69 ± 3,9	85 ± 5,0
	5	77 ± 5,1	131 ± 4,5
Стриатум	0,5	23 ± 4,7*	42 ± 3,8
	1,5	9 ± 2,6*	31 ± 4,2*
	2,5	186 ± 5,4*	98 ± 5,1
	4	40 ± 4,6	66 ± 5,3
	5	89 ± 6,1	88 ± 3,6

Примечание. * — различия достоверны при $p < 0,05$.

следствием ряда событий, приводящих к индукции *de novo* синтеза фермента.

Следует отметить, что использованные в работе методические подходы позволяют выявить потенциальные гены-мишени, вовлеченные в ответ на действие данного лекарственного средства, а также частично обосновать отдельные механизмы реализации эффектов ладастена. Однако лишь дальнейшая работа, в том числе и по оценке влияния ладастена на транскрипционную активность других генов, регулирующих последующие этапы дофаминергической нейротрансмиссии, позволит более детально охарактеризовать действие препарата.

ВЫВОДЫ

1. Ладастен модулирует активность транскрипции генов тирозингидроксилазы и ДОФА-декарбоксилазы в клетках стриатума и гипоталамуса мозга крыс при однократном *per os* введении в дозе 50 мг/кг.

2. Ладастен индуцирует *de novo* биосинтез тирозингидроксилазы и ДОФА-декарбоксилазы, экспрессирующихся в клетках стриатума и гипоталамуса мозга крыс.

3. Зарегистрированы дифференциальные эффекты ладастена на динамику изменения транскрипционной активности генов тирозингидроксилазы и ДОФА-декарбоксилазы и накопления L-ДОФА и ДА в гипоталамусе и стриатуме.

Работа выполнена по программе “Физико-химическая биология” Президиума РАН, при частичной под-

держке гранта РФФИ № 02 – 04 – 97904 и Программы государственной поддержки ведущих научных школ РФ № 00 – 15 – 97810 и НШ 2217.2003.4.

Выражаем благодарность С. Четверикову за помощь при определении дофамина и его предшественника методом ВЭЖХ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. В. Грехова, Р. Р. Гайнетдинов, Т. Д. Сотникова и др., *Бюл. exper. биол.*, № 3, 302 – 304 (1995).
2. И. С. Морозов, Н. Г. Арцимович, Т. А. Фадеева и др., Патент СССР 1826906 (1993); *Бюл. изобр.*, № 25 (1993).
3. И. С. Морозов, Г. С. Пухова, И. А. Авдулов и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **62**(1), 11 – 14 (1999).
4. И. С. Морозов, Н. В. Климова, С. А. Сергеева и др., *Вестн. РАМН*, № 3, 28 – 32 (1999).
5. И. С. Морозов, В. И. Петров, С. А. Сергеева. *Фармакология адамантанов*, Волгоградская медицинская академия, Волгоград (2001).
6. С. А. Сергеева, *Автореф. дис. докт. биол. наук*, Москва (1993).
7. С. Б. Середенин, М. А. Яркова, Б. А. Бадыштов и др., Патент РФ 2175229 (2001), *Бюл. изобр.*, № 30 (2001).
8. S. C. Kumer and K. E. Vrana, *J. Neurochem.*, **67**(2), 443 – 462 (1996).
9. H. Wong, W. D. Anderson, T. Cheng, et al., *Anal. Biochem.*, **223**, 251 – 258 (1994).

Поступила 17.06.03

LADASTEN INDUCES THE EXPRESSION OF GENES REGULATING DOPAMINE BIOSYNTHESIS IN VARIOUS STRUCTURES OF RAT BRAIN

Yu. V. Vakhitova^{1,2}, R. S. Yamidanov², and S. B. Seredenin¹

¹ Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315 Russia;

² Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Bashkortostan, 450054 Russia

The effect of ladasten (50 mg/kg) on the activity of tyrosine hydroxylase (TH) and DOPA-decarboxylase (DDC) gene expression and on the content of dopamine and L-DOPA in the striatum and hypothalamus in rat brain was studied depending on the duration of drug action. In the initial stage (first hours) of the drug action, the dopaminergic effects are related to an increase in the dopamine release. The observed accumulation of L-DOPA and dopamine is correlated with the transcription activity of genes studied. This leads to a conclusion that the pharmacological activity of ladasten is related to activation of *de novo* synthesis of TH and DDC. There is a certain difference in the ladasten action upon the TH and DDC gene expression of the key enzymes in hypothalamus and striatum of rat brain.