Экспериментальная и клиническая фармакология *2015 Том 78 № 9 С. 3 – 7*

НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

ВКЛАД ДОФАМИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В РЕАКЦИЮ ТАРАКАНА *PERIPLANETA AMERICANA* НА ТЕПЛОВОЙ СТРЕСС

О. Б. Грицай, В. А. Дубынин[1]

Проведено исследование влияния дофамина, его предшественника L-DOPA, а также D_1/D_2 агониста апоморфина, D_1 антагониста SCH 23390 и D_2 антагониста клебоприда на этологическое проявление тепловой стресс-реакции, а именно, на время пребывания (ВП) таракана *P. americana* в горячей камере. Установлено, что инъекция этих лигандов в гемолимфу насекомого приводит к увеличению ВП, однако дофамин и клебоприд в зависимости от дозы оказывали разнонаправленное действие на значение этого показателя. Полученные данные доказывают важную роль D_1- и D_2-подобных рецепторов дофамина на формирование теплового стресса у насекомых.

Ключевые слова: дофамин; L-DOPA; апоморфин; SCH-23390; клебоприд; тепловой стресс; насекомые.

ВВЕДЕНИЕ

Стресс-синдром, как адаптационный ответ на действие экстремальных факторов, был впервые описан для позвоночных – животных, обладающих гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системой. У беспозвоночных и, в частности, у насекомых, также можно наблюдать проявления стресса. Они основаны на иной анатомической базе, но имеют порой весьма близкие молекулярные и клеточные механизмы. Важнейшую роль в формировании стресс-реакции у насекомых играют биогенные амины. Их содержание на фоне действия экстремальных факторов значительно изменяется, что, как правило, ведет к активации энергетического обмена [1, 5]. Одним из ключевых участников данного процесса является дофаминергическая система. Показано, что при повышенной температуре окружающей среды у насекомых развивается тепловой стресс, в ходе которого в гемолимфе и тканях значительно повышается содержание дофамина (ДА).

Дофаминергические нейроны широко представлены в ЦНС насекомых и вовлечены в регуляцию многих функций организма, таких как нейроэндокринные процессы, индивидуальное развитие, пищевое и половое поведение, агрессия, процессы обучения и т.д. [8, 12, 13]. На дрозофиле активно изучаются модели нарушений сна и паркинсонизма, связанные с ДА [14]. Исследования характеристик ДА-рецепторов, проведенные на тканях мозга *Periplaneta americana*, *Apis mellifera* и *Drosophila melanogaster*, показывают, что они фармакологически и генетически отличаются от ДА рецепторов позвоночных. Наиболее полно соответствующие белковые молекулы изучены у медоносной пчелы и дрозофилы. У *A. mellifera* ДА-рецептор $AmDOP_1$ в наибольшей степени соответствует D_1-подобным рецепторам позвоночных (D_1 и D_5), активирующим аденилатциклазу. Рецептор $AmDOP_2$ близок к адренорецепторам, стимуляция которых активирует аденилатциклазу. Рецептор $AmDOP_3$ имеет наибольшее сходство с D_2-подобными рецепторами позвоночных (D_2, D_3, D_4), активация которых вызывает торможение аденилатциклазы [7, 10, 11]. У *P. americana* обнаружен ДА-рецептор $PaeDOP_2$, фармакологический профиль которого позволяет отнести его к подсемейству D_1 [14].

Механизмы поведенческого ответа насекомых на тепловой стресс и участие в этих процессах дофаминергической системы мало изучены. В нашей работе впервые детально проанализировано влияние ДА, его предшественника L-DOPA, а также D_1/D_2 агониста апоморфина, D_1-антагониста SCH 23390 и D_2-антагониста клебоприда на этологические проявления тепловой стресс-реакции у таракана *P. americana*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах на насекомых, в частности, на *P. americana*, удобно использовать “горячую камеру” (ГК), которая является модификацией метода “горячая пластина”, применяемого для оценки болевой чувствительности грызунов [3]. ГК представляет собой цилиндр длиной 120 мм, имеющий наружный и внутренний диаметры 40 и 20 мм, соответственно. Одна половина цилиндра расположена внутри пластикового бокса, в котором циркулирует подогретая до 50 °С вода, а другая его часть находится вне бокса. Эксперименты проводили на 15 – 30 дневных тараканах *P. americana* из лабораторной культуры при температуре 22 – 23 °С и сумеречной освещенности. Всего было использова-

[1] Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12.

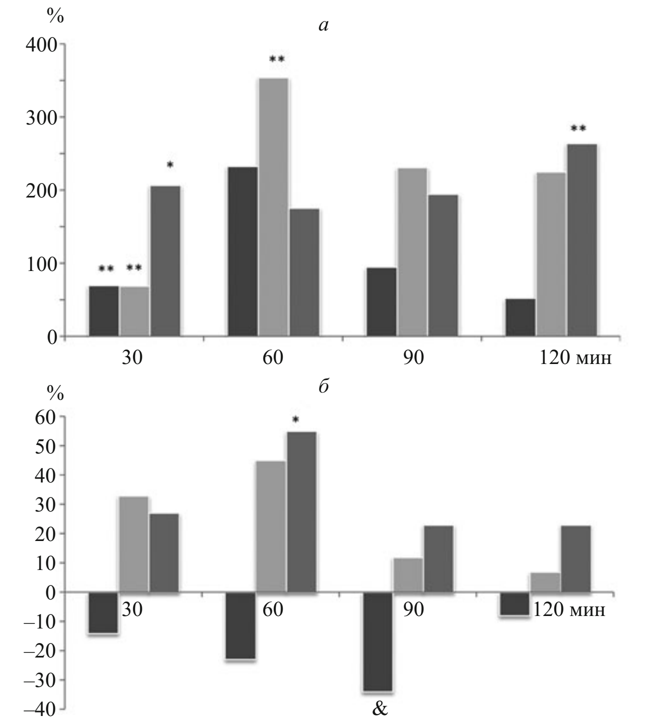

Рис. 1. Изменение времени пребывания (ВП) тараканов *Periplaneta americana* в “горячей камере” в зависимости от доз вводимых катехоламинов, выраженное в процентах от контроля (контрольным значениям соответствует нулевой уровень): *а*) L-DOPA; *б*) дофамин в дозах 50, 100, 200 мкг/г.

По оси абсцисс – время после введения лигандов, мин; по оси ординат – ВП насекомых. Дозы препаратов: черный — 50, светло-серый — 100 и темно-серый — 200 мкг/г. * — значимые различия между опытной и контрольной группами по критерию Стьюдента: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; & — различия по критерию χ^2. Средняя величина групп 15 насекомых.

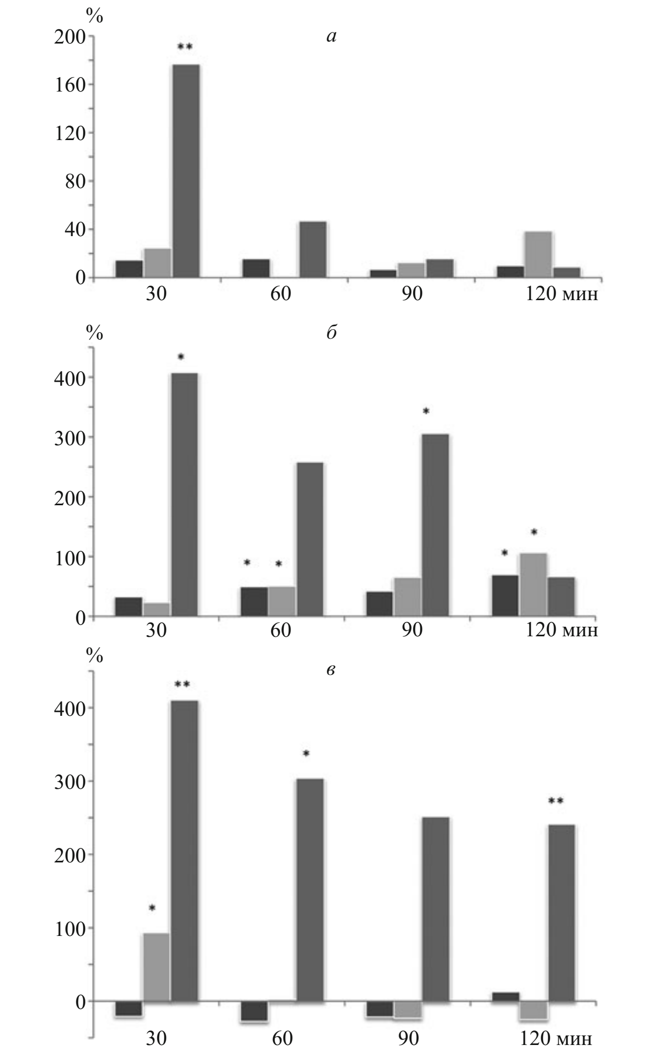

Рис. 2. Изменение времени пребывания (ВП) тараканов *Periplaneta americana* в “горячей камере” в зависимости от доз, вводимых лигандов выраженное в процентах от контроля (контрольным значениям соответствует нулевой уровень): *а*) апоморфин; *б*) SCH 23390; *в*) клебоприд в дозах 25, 50 и 100 мкг/г.

Дозы препаратов: черный — 25, светло-серый — 50 и темно-серый — 100 мкг/; * значимые различия между опытными и контрольными группами по критерию Стьюдента. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Средняя величина групп 15 насекомых. Остальные обозначения как на рис. 1.

но 300 особей массой (0,96 ± 0,08) г. Каждого таракана помещали внутрь той части цилиндра, которая находится вне подогреваемого бокса; шторка изначально преграждала насекомому путь в горячую часть цилиндра. Спустя 15 с, необходимых для адаптации насекомого, одновременно открывали шторку и касались поршнем церок таракана, в результате чего он устремлялся в ГК. Некоторое время (в контроле не более 10 с) таракан находился в ГК, а затем покидал ее; при этом фиксировали время пребывания (ВП) насекомого в ней.

В опытах были использованы следующие соединения: дофамин (50, 100 и 200 мкг/г), L-DOPA (50, 100 и 200 мкг/г), апоморфин (25, 50 и 100 мкг/г), клебоприд (25, 50 и 100 мкг/г), SCH 29390 (25, 50 и 100 мкг/г), все производства Sigma, США. При помощи микроинъектора препарат в объеме 10 мкл вводили в грудь насекомого, в контроле использовали физиологический раствор. Через 30, 60, 90 и 120 мин после инъекции таракана помещали в ГК и регистрировали показатель ВП, выраженный в секундах. Действие лигандов ДА рецепторов на протекание тепловой стресс-реакции оценивали как параметр, связанный с ВП — его увеличение свидетельствовало об уменьшении стресс-реакции. Средняя величина контрольных и подопытных групп составляла 10 – 15 насекомых.

Статистическую обработку и представление результатов проводили с использованием стандартных пакетов программ EXCEL и STATISTICA; вычисляли средние (AM) и ошибки средних (SEM); применяли параметрический критерий Стьюдента, непараметрические критерии точный Фишера и χ^2, а также однофакторный ANOVA для повторных измерений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Все исследованные препараты (L-DOPA, ДА, апоморфин, SCH 23390 и клебоприд) оказали существенное влияние на протекание стресс-реакции у *P. ameri-*

cana, что проявлялось в изменении значения ВП. В контроле при повторном помещении насекомого в ГК этот показатель оставался стабильным, либо демонстрировал незначительную тенденцию к возрастанию.

После введения L-DOPA в дозе 200 мкг/г значимый рост ВП был зарегистрирован в течение всего времени наблюдения — 120 мин; при этом величины показателя достигали 280 – 360 % относительно контроля, принятого за 100 %, ($p < 0{,}05 – 0{,}01$). Максимальное значение ВП было зафиксировано через 60 мин после инъекции: (18,3 ± 4,0) с в подопытной группе против (6,2 ± 0,9) с в контрольной. ANOVA-метод подтвердил значимость действия L-DOPA: $F_{1,18} = 22{,}01$ ($p < 0{,}001$). В дозе 100 мкг/г наибольший эффект был достигнут на 60 – 90 мин эксперимента 330 – 450 % относительно контрольного уровня, показатель ВП был равен (24,0 ± 7,5) с в опыте и (7,5 ± 2,3) с в контроле; $F_{1,18} = 6{,}46$ ($p < 0{,}01$). После инъекции в дозе 50 мкг/г максимальные отличия от контроля проявились через 60 мин, что составляло 330 % ($p < 0{,}01$). Значения ВП были равны (16,8 ± 4,2) с в подопытной группе против (4,8 ± 0,7) с в контрольной; $F_{1,18} = 18{,}4$ ($p < 0{,}01$). На 30 мин лиганд в дозах 50 и 100 мкг/г вызывал достоверные, но меньшие по величине изменения (150 – 170 %); через 120 мин отличия от контроля становились незначимыми ($p = 0{,}06 – 0{,}08$). В целом четкая зависимость эффекта от дозы отсутствовала.

Действие ДА на показатель ВП носило существенно менее выраженный характер в сравнении с L-DOPA. После инъекции в высокой дозе (200 мкг/г) ВП достигло лишь 155 % относительно контроля ($p < 0{,}01 – 0{,}05$). Это произошло через 60 мин после его введения величина параметра составила (8,7 ± 0,7) с в подопытной группе против (5,6 ± 0,9) с; $F_{1,24} = 2{,}76$ ($p < 0{,}01$). Применение ДА в дозе 100 мкг/г не вызывало появления значимых отличий от контроля $F_{1,24} = 1{,}89$ ($p = 0{,}18$). Введение в минимальной дозе 50 мкг/г привело даже к некоторому усилению стресс-реакции, значения показателя были ниже уровня контроля и составили через 60 мин после инъекции в опыте (5,8 ± 1,0) с против (7,5 ± 2,1) с в контроле ($p = 0{,}06$ по критерию χ^2); $F_{1,20} = 2{,}18$ ($p = 0{,}11$).

Смешанный D_1/D_2 агонист апоморфин (100 мкг/г) оказал достоверное влияние на развитие стресс-реакции только в первой временной точке, затем его действие становилось незначимо. Через 30 мин после инъекции лигада значение ВП в подопытной группе равнялось (17,0 ± 4,5) с против (6,1 ± 1,1) с в контроле (280 % от контрольного уровня; $p < 0{,}05$); $F_{1,37} = 3{,}09$ ($p < 0{,}05$). Препарат в дозах 25 и 50 мкг/г был практически не эффективен.

Инъекция D_1 антагониста SCH 23390 (100 мкг/г) уже через 30 мин сопровождалась возрастанием ВП до 509 % по отношению к контролю ($p < 0{,}05$); значение параметра в подопытной группе составило (29,0 ± 8,5) с против (5,7 ± 0,7) с в контрольной. В дальнейшем значение показателя ВП у тараканов из экспериментальной группы несколько снизилось и через 90 мин составляло 406 % от контроля; $F_{1,20} = 8{,}25$ ($p < 0{,}001$). При уменьшении дозы SCH 23390 до 50 мкг/г величина показателя проявляла тенденцию к росту через 60 мин после инъекции; через 90 мин увеличение становилось достоверным ($p < 0{,}05$). Максимальные изменения ВП происходили на 120 мин эксперимента; 207 % от уровня контроля (8,1 ± 1,8) с в подопытной группе по сравнению с (3,9 ± 0,6) с в контрольной; $F_{1,20} = 5{,}07$ ($p < 0{,}05$). Антагонист (25 мкг/г) также был активен в период 60 – 120 мин после инъекции, увеличивая ВП ($p < 0{,}05 – 0{,}01$). Максимальные значения параметра составили (7,9 ± 1,8) с в опыте против (4,6 ± 0,5) с в контроле (170 %; через 120 мин); $F_{1,21} = 15{,}05$ ($p < 0{,}01$).

В зависимости от применяемой дозы D_2 антагонист клебоприд оказывал разнонаправленное действие на ВП. Эффекты были более выражены в случае применения в дозе 100 мкг/г, когда лиганд в начале и конце регистрации достоверно изменял стресс-реакцию насекомых. Показатель ВП при этом возрастал до 604 – 922 % по отношению к контролю ($p < 0{,}05 – 0{,}01$). Его значения в точке максимального проявления эффекта (30 мин) составили (41,5 ± 11,7) с в подопытной группе против (4,5 ± 0,7) с в контрольной; $F_{1,10} = 6{,}35$ ($p < 0{,}05$). При снижении дозы антагониста до 50 мкг/г его активность носила двухфазный характер. Через 30 мин после инъекции клебоприд увеличил ВП до 287 % по отношению к контролю ($p < 0{,}05$); (21,1 ± 6,8) с против (7,3 ± 1,0) с. Между 60 – 90 мин его действие меняло направленность и на 120 мин демонстрировало снижение показателя до 50 % от контроля ($p < 0{,}05$). Лиганд в дозе 25 мкг/г через 30 – 90 мин также провоцировал уменьшение значения ВП ниже контрольного уровня до 46 – 60 % ($p < 0{,}05$). Значения показателя ВП через 60 мин после инъекции были равны (1,9 ± 0,5) с в опыте против (4,1 ± 0,9) с в контроле.

Формирование стресс-реакции в условиях нашего эксперимента является результатом взаимодействия по крайней мере 2 центров мозга насекомого, ответственных, с одной стороны, за локомоцию, с другой — за термическую чувствительность. Находящиеся на антеннах терморецепторы направляют свои аксоны в гломерулы антеннальных долей, где образуются связи с высшими ассоциативными структурами мозга — центральным комплексом, грибовидными телами и оптическими долями [6]. Важно, что именно в этих структурах мозга некоторых насекомых локализуются ДА-рецепторы $AmDOP_1$, $AmDOP_2$ и $AmDOP_3$ [7, 10]. В случае *P. americana* обнаружено присутствие рецепторов $PeaDOP_2$ на нейронах, находящихся в передней области протоцеребрума и в его оптических долях [12]. Иммунореактивные тела ДА нейронов локализованы также в центральном теле протоцеребрума. В перечисленных отделах мозга происходит интеграция всех видов чувствительности, формируются сложные акты поведения: локомоторные реакции, ориентировка в пространстве, оцепенение и т.д. [6, 9]. Можно предположить, что здесь же при участии дофаминергической системы происходит запуск стресс-реакций насекомого в ответ на повышенную температуру, которые реализуются посредством изменения локомоции.

Введение L-DOPA, предшественника ДА (50 – 200 мкг/г), приводило к стабильному значимому увеличению ВП. Проникая в нейроны, препарат, очевидно, активировал синтез ДА, что вызывало дополнительное возрастание формирования последнего и, как следствие, мощное ослабление стресс-реакции. Интересно, что эффекты L-DOPA существенно более выражены, чем действие ДА, введение которого не повлекло за собой серьезных изменений ВП. Препарат значимо действовал только в максимальной дозе через 60 мин после введения. Также интересна тенденция к обращению эффекта препарата в дозе 50 мкг/г. Ранее, при анализе поведения тараканов в тесте “открытое поле”, было установлено, что ДА (100 мкг/г) длительно тормозил локомоторную активность, а в дозах 25 и 50 мкг/г менял ход реакции на противоположный, увеличивая пробег [2, 4]. Из экспериментов на позвоночных известно, что аналогичная двухфазность реакций часто обусловлена конкурентным взаимодействием эффектов D_1 и D_2 рецепторов, а также пре- и постсинаптических путей действия дофамина. На нейронах грибовидных тел *A. mellifera* также обнаружено совместное расположение и взаимодействие D_1- и D_2-подобных рецепторов [7].

D_1/D_2 агонист апоморфин действовал только в максимальной дозе в первые 30 мин после введения, что сопровождалось ростом ВП. Локомоторную активность апоморфин (100 и 50 мкг/г) подавлял в течение всего периода наблюдений (120 мин). В целом на основании экспериментов с дофамином и апоморфином можно заключить, что локомоторые центры мозга *P. americana* несколько более восприимчивы в отношении воздействий на дофаминергическую систему, чем области, контролирующие термическое чувство; в первом случае реакции более длительны и развиваются при меньших дозах препаратов.

D_1 антагонист SCH 23390 оказал негативное влияние на развитие стресс-реакции не только в дозе 100 мкг/г, но и в меньших дозах. В “открытом поле” соединение было эффективно только в дозе 100 мкг/г [2]. D_2 антагонист клебоприд в зависимости от применяемой дозы оказывал разнонаправленное действие на развитие тепловой стресс-реакции. Введение в дозе 100 мкг/г вызывало относительно стабильное увеличение ВП, а при дозе 50 мкг/г происходило сначала увеличение, а затем снижение показателя относительно контроля. В минимальной дозе (25 мкг/г) препарат обеспечивал только рост термической чувствительности. В случае “открытого поля” соединение в максимальной дозе почти полностью блокировало локомоторную активность ($p < 0{,}01 – 0{,}001$). Вместе с тем клебоприд (50 мкг/г) активировал локомоторную активность тараканов через 60 – 120 мин, а в дозе 25 мкг/г — через 30 – 90 мин после введения [2, 4].

Можно предположить, что феномен обращения эффекта, выявленный нами для ДА, опосредуется преимущественно D_2-подобными рецепторами (на которые действует клебоприд). Кроме того, вклад D_2 рецепторов, по-видимому, более значим в случае контроля за локомоторной функцией, а D_1 рецепторов — в случае регуляции термочувствительности (эффекты SCH 23390).

Опираясь на полученные данные о влиянии лигандов ДА рецепторов на формирование стресс-реакции у *P. americana* в условиях ГК, можно заключить, что кроме D_1-подобного рецептора $PeaDOP_2$, еще по крайней мере один D_2-подобный рецептор, имеющий сходство с $AmDOP_3$ пчелы, включены в регуляцию поведения тараканов. Полученные результаты доказывают не только важную роль D_1 и D_2 рецепторов дофамина в формировании этологического проявления теплового стресса у насекомых. Их также можно рассматривать в рамках этической биологии, позволяющих использовать тараканов в качестве хорошо зарекомендовавших себя объектов, предназначенных для фундаментальных исследований в области нейробиологии, физиологии, а также в качестве фармакологических моделей развития стресса в ходе эволюции.

ВЫВОДЫ

1. Стимуляция дофаминовых рецепторов путем введения L-DOPA в дозах 50, 100 и 200 мкг/г сопровождалась значимым увеличением ВП тараканов в “горячей камере” до 280 – 450 % ($p = 0{,}003 – 0{,}043$) по отношению к контролю, что свидетельствует о снижении стресс-реакции.

2. Дофамин в дозе 200 мкг/г вызывал ослабление параметра ВП до 150 %, ($p = 0{,}004 – 0{,}028$), что демонстрирует уменьшение интенсивности стресс-реакции; использование дозы 50 мкг/г приводило к обратному эффекту — происходило ее усиление (ВП было равно 77 %, $p = 0{,}06$ по критерию χ^2).

3. D_1/D_2 агонист апоморфин (100 мкг/г) и D_1 антагонист SCH 23390 (25, 50 и 100 мкг/г) увеличивали ВП насекомых в ГК в среднем до 170 – 280 % ($p = 0{,}04$) в случае с апоморфином и до 150 – 500 % ($p = 0{,}003 – 0{,}05$) при использовании SCH 23390.

4. D_2 антагонист клебоприд в зависимости от дозы оказывал разнонаправленное действие на стресс-реакцию: в дозе 100 мкг/г увеличивал до 600 – 900 % ($p = 0{,}01$), а в дозе 25 мкг/г — уменьшал значение показателя ВП до 40 – 60 % ($p = 0{,}044$), что свидетельствует о двухфазном протекании стресс-реакции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Г. В. Беньковская, *Автореф. дис. д-ра биол. наук*, Новосибирск (2009).
2. О. Б. Грицай, В. А. Дубынин, *Труды научной конференции, посвященной 85-летию кафедры органической и биологической химии МПГУ*, Москва (2009), сс. 29 – 32.
3. О. Б. Грицай, В. А. Дубынин, Ж. Д. Беспалова и др., *Журн. эвол. биохим. и физиол.*, **45**(4), 391 – 396 (2009).
4. О. Б. Грицай, В. А. Дубынин, *Тезисы V Всероссийской конференции по поведению животных*, ноябрь 2012, Москва (2012), сс. 55.
5. И. Ю. Раушенбах, Е. К. Карпова, Н. Е. Грутенко и др., *Докл. РАН*, **413**(1), 135 – 137 (2007).
6. С. Ю. Чайка, *Нейроморфология насекомых*, Москва (2010).
7. K. T. Beggs, I. S. Hamilton, P. T. Kurshan, J. A. Mustarrd, et al., *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, **35**, 873 – 882 (2005).
8. K. Kume, S. Kume, S. K. Park, et al., *J. Neurosci.*, **25**(32), 7377 – 7384 (2005).
9. Y.-S. Li, N. J. Strausfeld, *Comp. Neurol.*, **387**, 631 – 665 (1997).
10. J. A. Mustard, W. Blenau, I. S. Hamilton, et al., *Mol. Brain Res.*, **113**, 67 – 77 (2003).
11. R. Scheiner, A. Baumann, W. Blenau, *Car. Neuropharmacol.*, **4**(4), 259 – 276 (2006).
12. B. Troppmann, S. Balfanz, C. Krach, et al., *J. Mol. Sci.*, **15**(1), 629 – 653 (2014).
13. T. Watanable, H. Sadamoto, H. Aonuma, *Invert Neurosci.*, **13**(2), 107 – 123 (2013).
14. A. Whitworth, *Adv. Genet.*, **73**(1), 1 – 50 (2011).

Поступила 18.05.15

CONTRIBUTION OF THE DOPAMINERGIC SYSTEM TO HEAT STRESS REACTION OF *PERIPLANETA AMERICANA* COCKROACH

O. B. Gritsai and V. A. Dubynin

Department of Biology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

The influence of dopamine, its precursor L-DOPA, and the D_1/D_2 agonist apomorphine, D_1 antagonist SCH 23390, and D_2 antagonist clebopride on the behavioral manifestation of heat stress reaction has been studied as expressed by the stay time (ST) of *Periplaneta Americana* cockroach in the hot chamber. It is established that the injection of these ligands into the hemolymph of insect causes increase in the ST. However, dopamine and clebopride produce opposite dose-dependent effects on the ST value. The data demonstrate an important role of D_1- and D_2-like dopamine receptors in heat stress reaction formation in insects.

Keywords: dopamine; L-DOPA; apomorphine; SCH 23390; clebopride; thermal stress; insects.