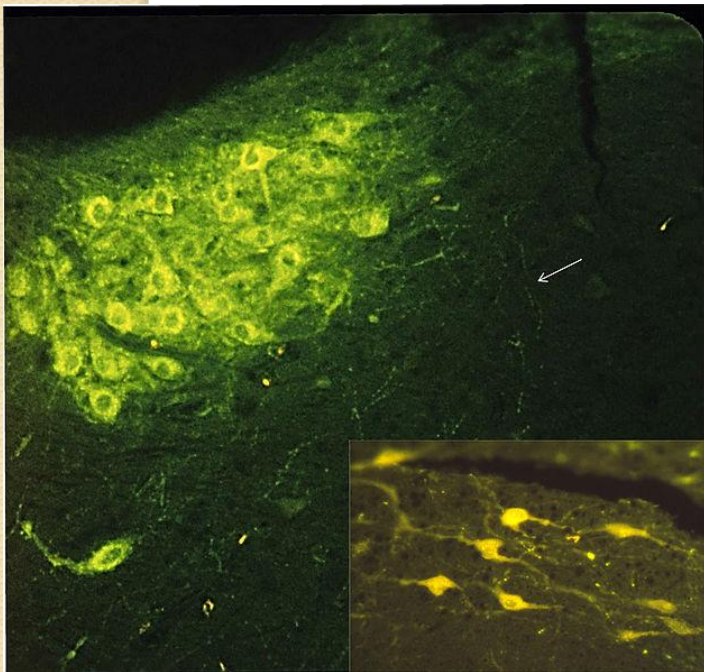
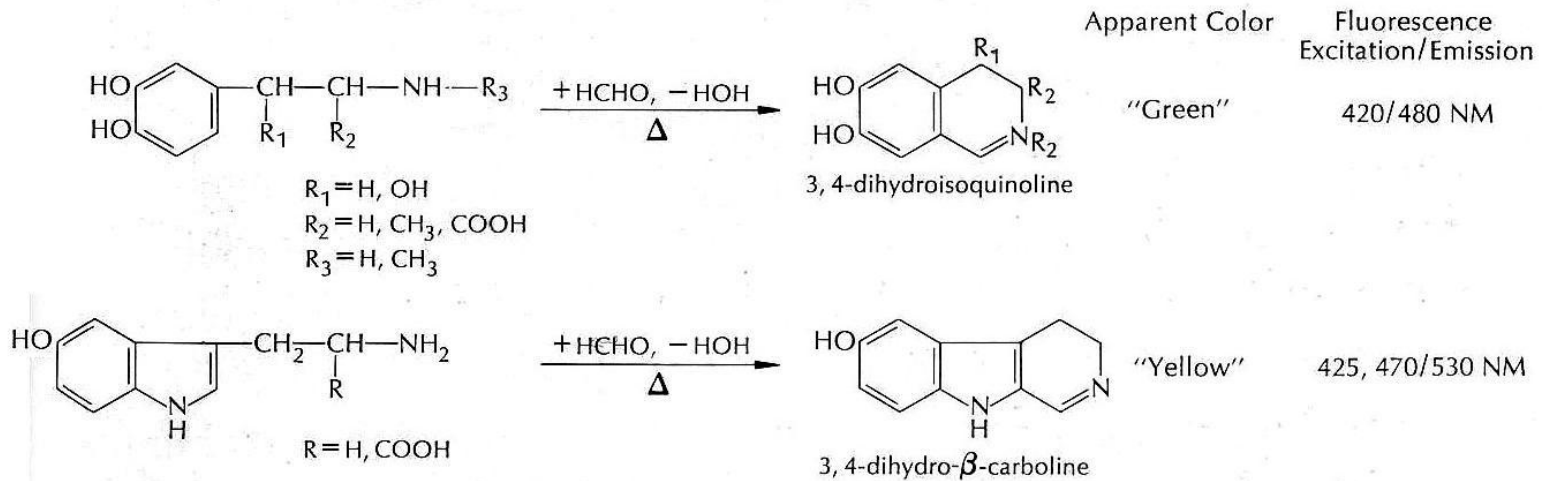


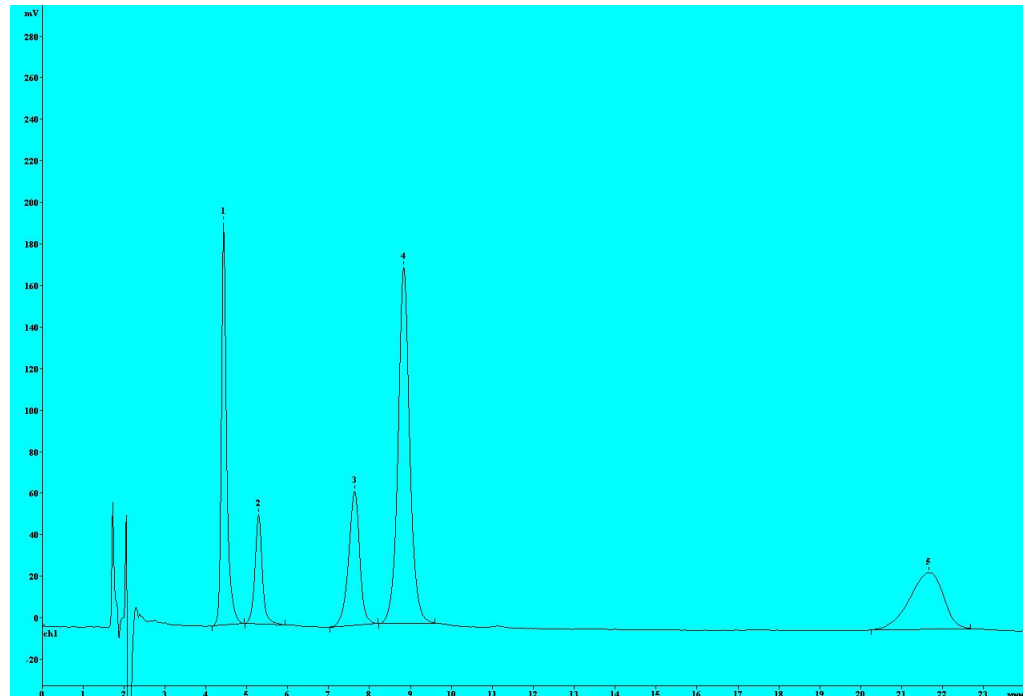
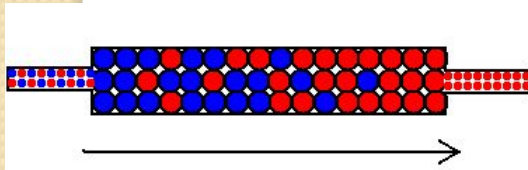
Молекулярные механизмы
регуляции поведения
Лекция 5
Катехоламины

Гистохимия моноаминов



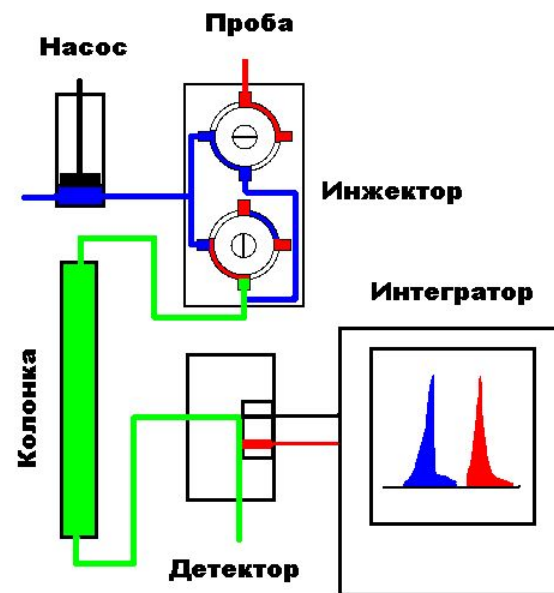
- Картирование моноаминовых нейронов и их проекций в мозге in situ осуществляется с помощью реакции Фалька (1961) –Хилларпа (1955).
- Моноамины на фиксированных срезах мозга при конденсации с парами формальдегида дают ярко флуоресцирующие продукты: зеленый – для катехоламинов (норадреналиновые нейроны синего пятна) и желтый – для серотонина (серотониновые нейроны nucleus raphe obscurus).

Принцип высокоэффективной жидкостной хроматографии



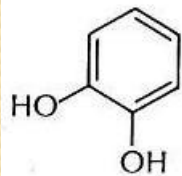
- Самый специфический, чувствительный и универсальный метод.
- Существуют варианты ионообменной, фильтрационной и хроматографии с обращенной фазой.
- Хроматография с обращенной фазой основана на разнице в растворимости соединения в воде и органическом растворителе.
- Соединение связывается с гранулами силикагеля, на которые пришиты группы $C_{18}H_{37}$ или C_8H_{17} , затем постепенно смывается мобильной фазой (забуференный водный раствор метанола или ацетонитрила). Измеряют время удержания (индивидуальная характеристика соединения) и площадь пика – количество соединения.

Хроматограф

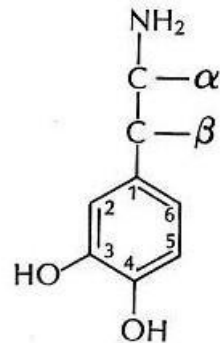


- Состоит из насоса, обеспечивающего равномерный ток жидкости через колонку под давлением до 600 атм;
- инжектора, обеспечивающего точное введение пробы под атмосферным давлением в колонку с высоким давлением;
- хроматографической колонки, наполненной мелкими сферами силикагеля С18, имеющими огромную поверхность;
- электрохимического детектора;
- интегратора, определяющего время удержания вещества, высоту и площадь пика сигнала от детектора.

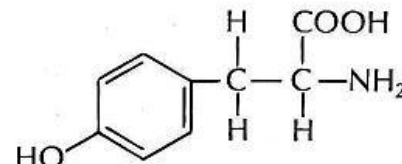
Структура катехоламинов



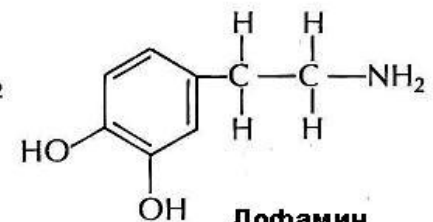
Катехол



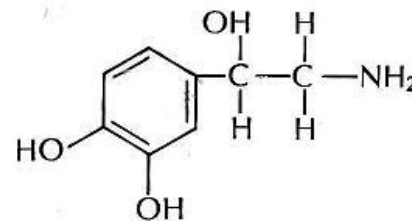
Катехоламин



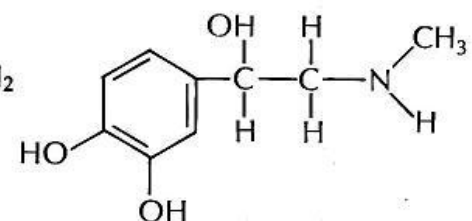
Тирозин



Дофамин



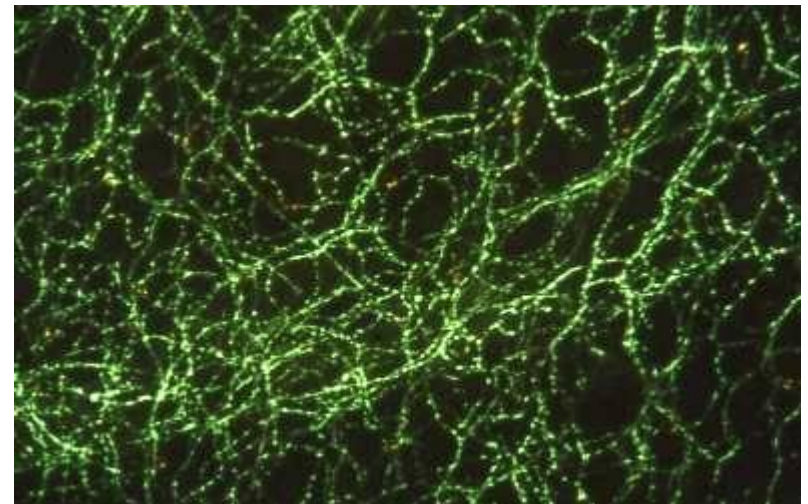
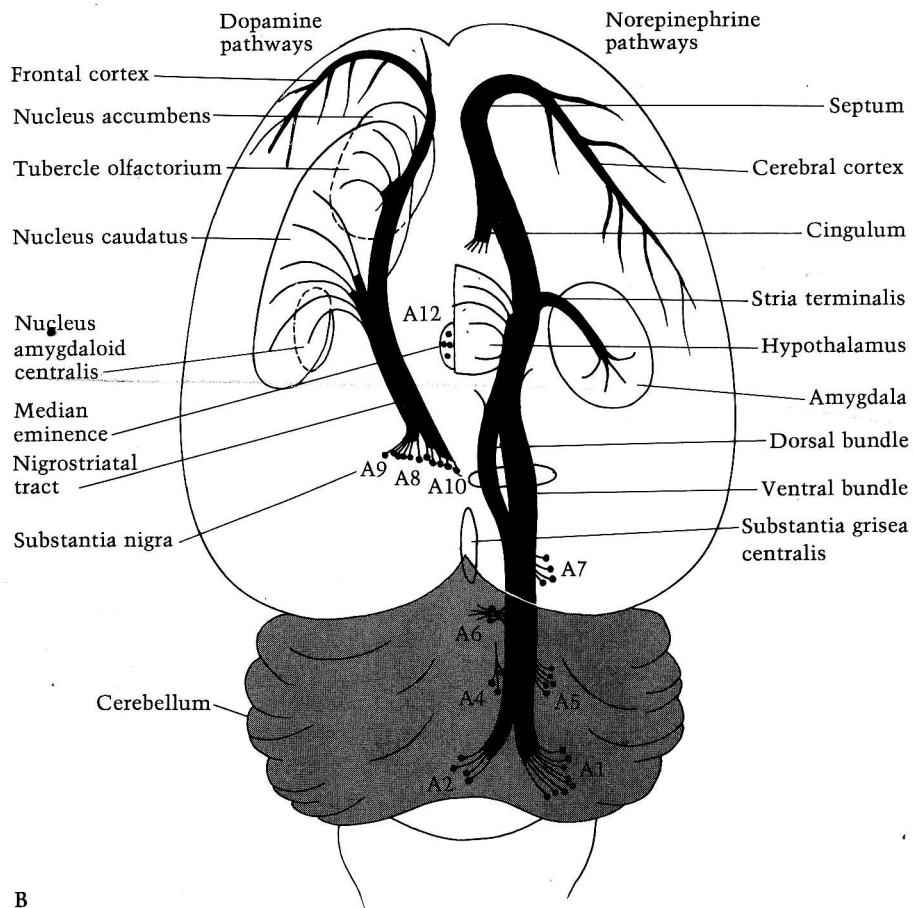
Норадреналин



Адреналин

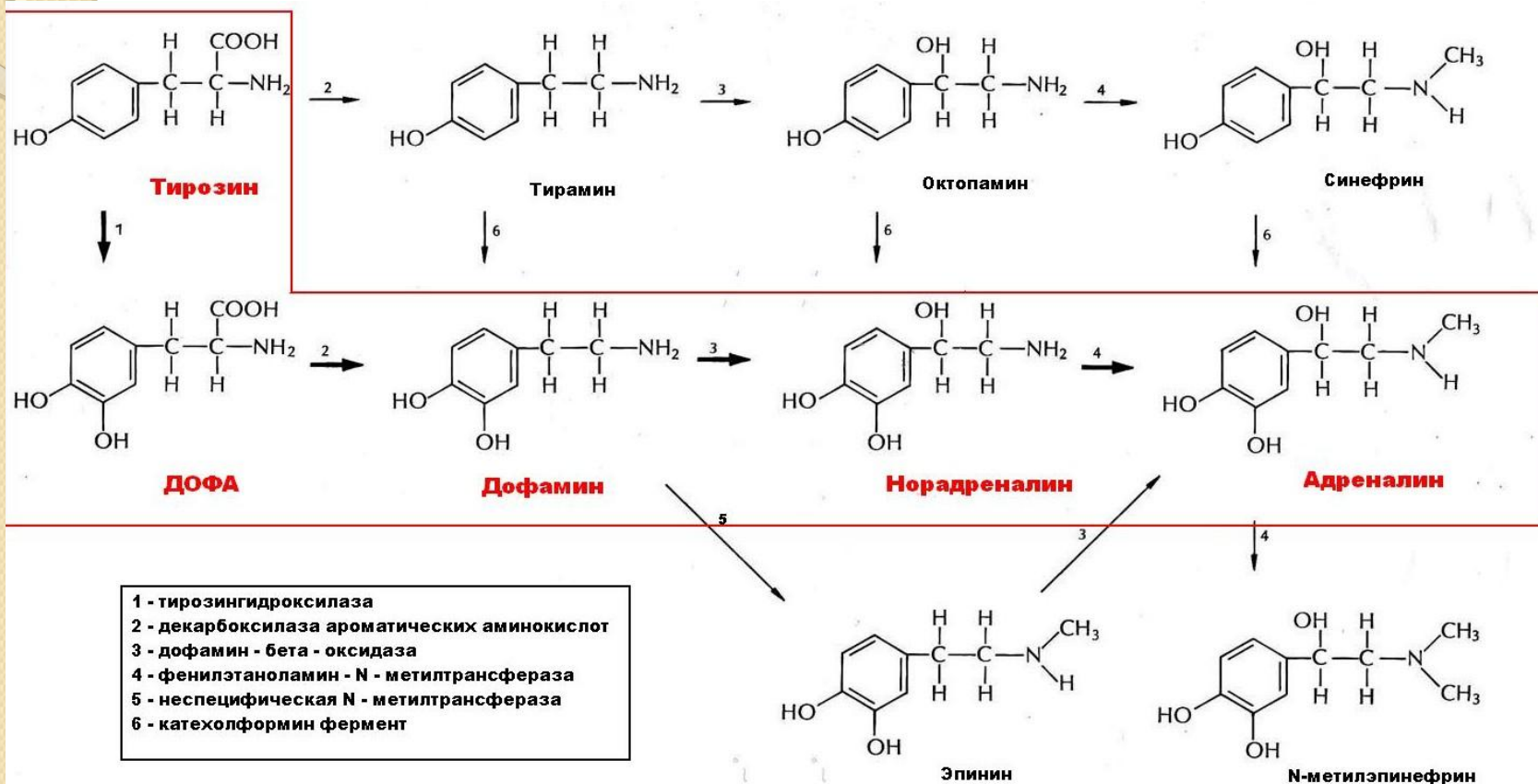
- Катехоламины, дофамин, норадреналин и адреналин являются производными дифенола – катехола.
- Предшественником катехоламинов является незаменимая аминокислота L-тирозин.

Катехоламинэргическая иннервация

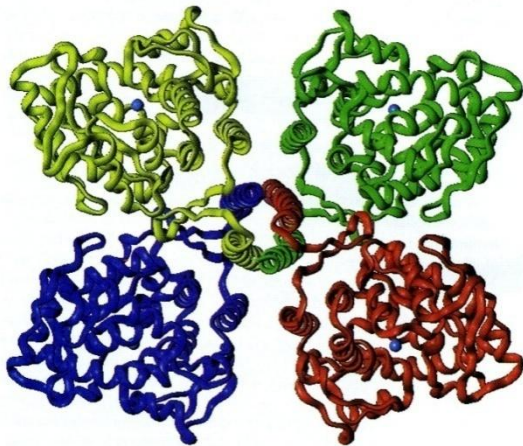
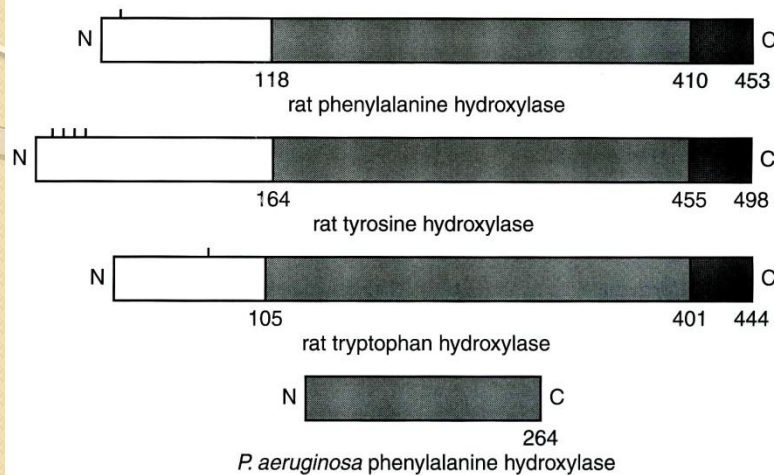


«Грубые» и «тонкие» аксоны
норадренергических
нейронов с местами секреции медиатора

Биосинтез катехоламинов в организме

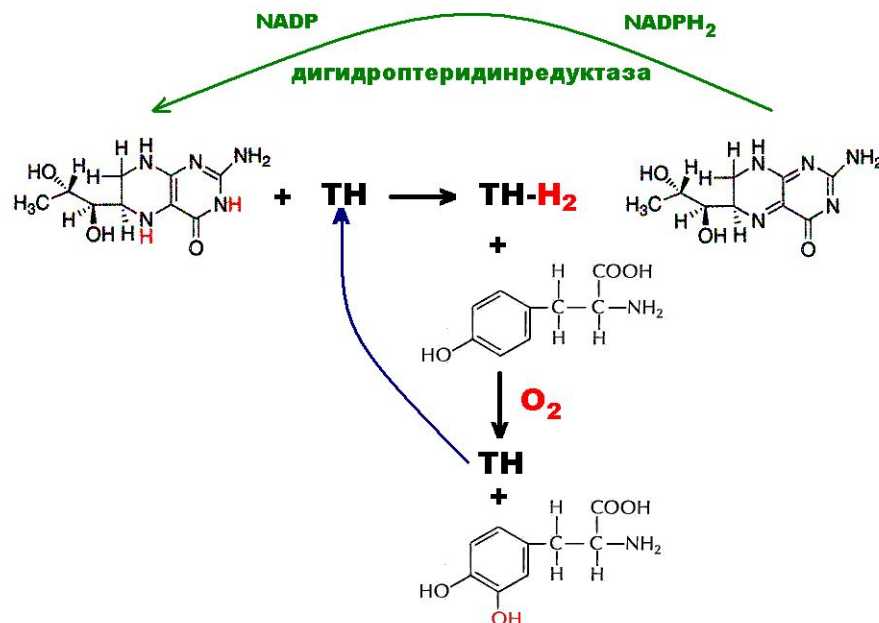


Тирозингидроксилаза, структура



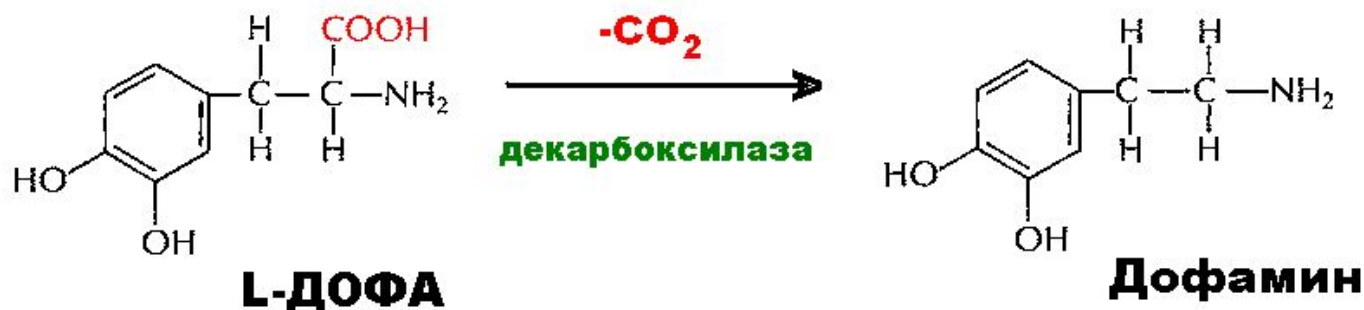
- Тирозингидроксилаза (ТГ, КФ.1.14.16.2) катализирует гидроксилирование L-тирозина до L-3,4-диоксифенилаланина (ДОФА) - первую и ключевую реакцию синтеза катехоламинов.
- Принадлежит к семейству монооксигеназ, которое включает также фенилаланингидроксилазу и две триптофангидроксилазы.
- Ген ТГ локализован на 11 и 7 хромосомах человека и мыши
- Ген кодирует белок около 60 кД, включающий регуляторный, каталитический и тетрамеризационный домены.
- Четыре молекулы связываются тетрамеризационными доменами с образованием четвертичной структуры.

Тирозингидроксилаза, функция



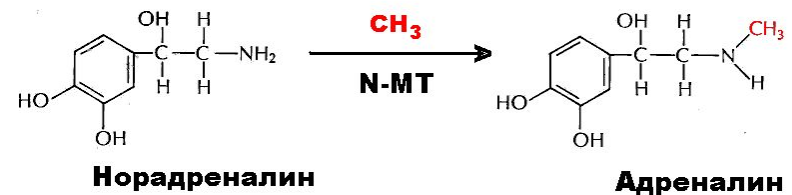
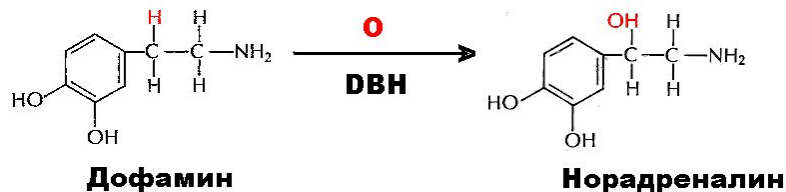
- Реакция гидроксилирования L-тирозина происходит в присутствии ионов Fe^{+2} , тетрагидробиоптеридина (кофактора – донора протонов) и кислорода воздуха.
- Вначале к ферменту присоединяется кофактор, отдает ему два атома водорода и восстанавливает его. Затем присоединяется тирозин и, наконец, комплекс окисляется кислородом с образованием L-ДОФА, окисленной (квиноидной) формы кофактора и воды.
- Окисленный кофактор восстанавливается ферментом дигидроптеридинредуктазой в присутствии НАДФН₂ и цикл повторяется.
- ТГ активируется с помощью обратимого фосфорилирования, катализируемого цАМФ-зависимой протеинкиназой и ПК-II, в присутствии цАМФ и Ca^{+2} .
- Ингибитор α -метил-p-тирозин.
- Нокаут по гену ТГ летален.

Декарбоксилаза-L-ароматических аминокислот (КФ.4.1.1.28)



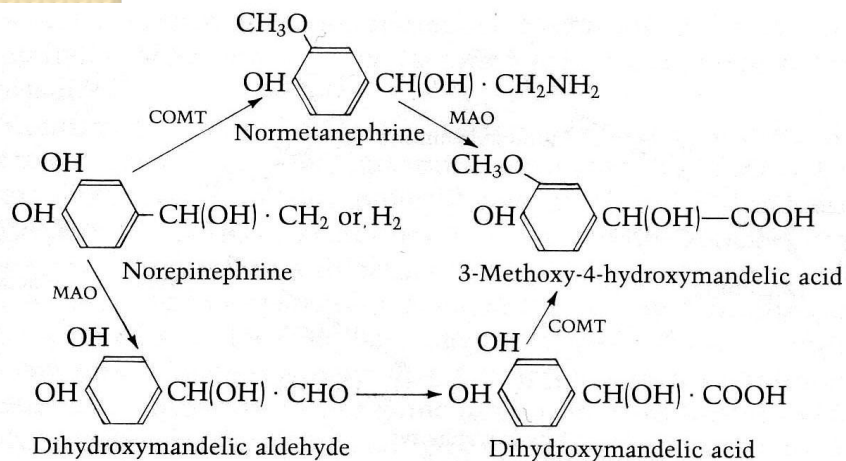
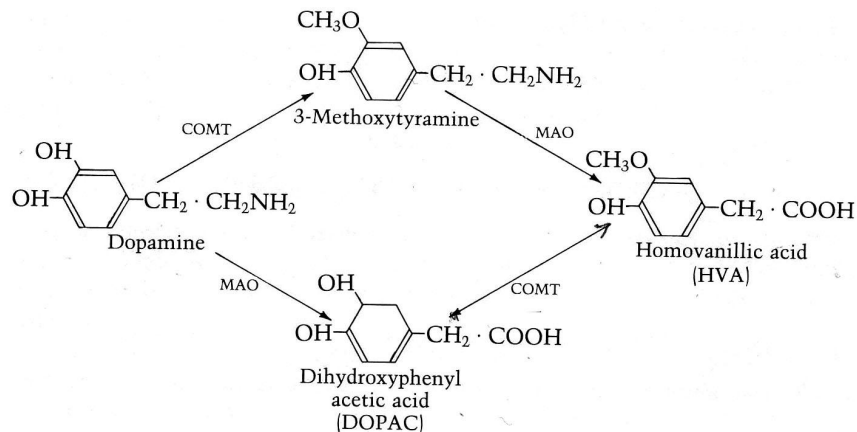
- Катализирует декарбоксилирование ДОФА до дофамина. Кофактор – пиридоксаль-5-фосфат.
- Не обладает субстратной специфичностью и декарбоксилирует также 5-окситриптофан до серотонина. Способна декарбоксилировать тирозин и триптофан, но в 1000 раз медленней.
- Кодировается одним геном, локализованным на 7 хромосоме. Экспрессируется во всех моноаминовых нейронах.
- Ингибитор - α-метилдофа.

Дофамин-β-гидроксилаза и фенилэтаноламин-N-метилтрансфераза



- Дофамин-β-гидроксилаза (КФ.1.14.17.1) гидроксилирует дофамин до норадреналина в присутствии аскобиновой кислоты (кофактора), кислорода и Cu^{+2} . Экспрессируется в адренергическом нейроне. У человека локализован в 9 хромосоме. Нокауты у мыши летальны, а у человека – слабые изменения в ЦНС. Ингибиторы – дисульфурам и дитиокарбонат. Встроен в мембрану везикул.
- Фенилэтаноламин-N-метилтрансфераза (КФ.2.1.1.28) метилирует норадреналин до адреналина в присутствии S-аденозинметионина (донора метильной группы). Экспрессируется в хромафинных клетках мозгового слоя надпочечников.

Разрушение катехоламинов

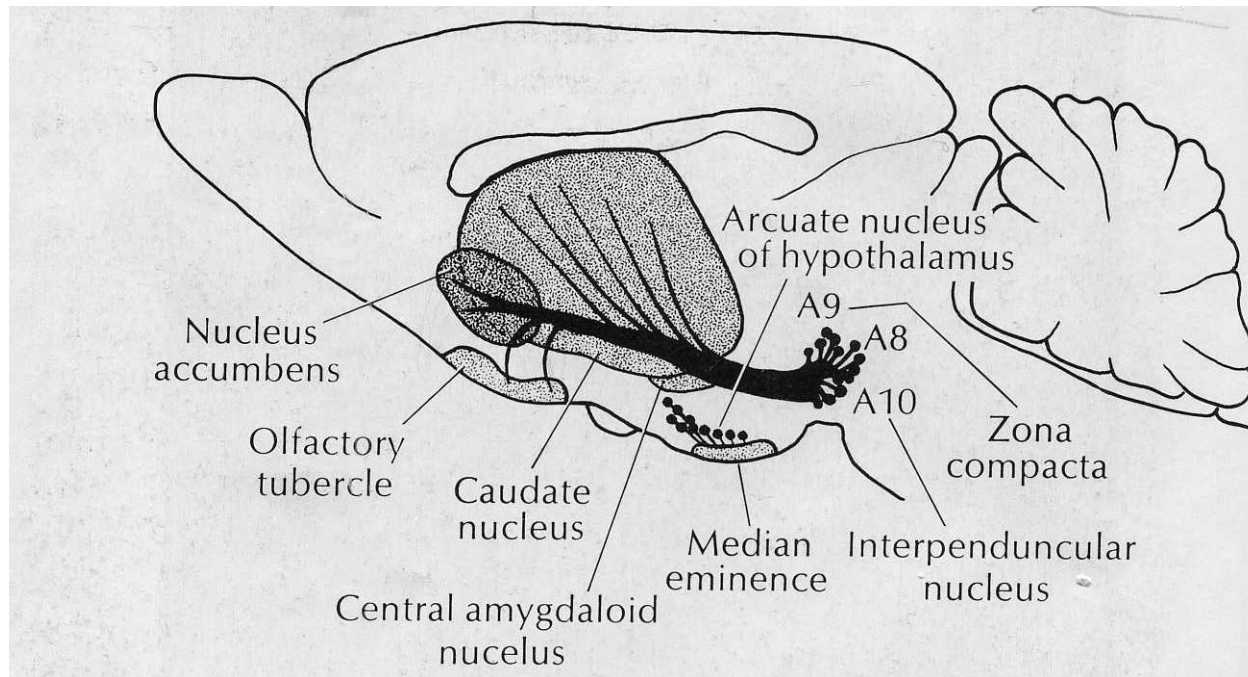


- Катехоламины разрушаются с помощью о-метилирования и окислительного дезаминирования.
- о-Метилирование катализируется катехол-о-метилтрансферазой (КФ.2.1.1.6). Молекулярный вес фермента 24 кД. Кофактор – S-аденозинметионин.
- Окислительное дезаминирование катализируется ферментами моноаминоксидазами (КФ.1.4.3.4). Дофамин – до дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК), норадреналин – до дигидроксиманделовой кислоты.
- Дезаминирует ДОФУК до гомованилиновой кислоты, а дигидроксиманделовую кислоту до 3-метокси-4-гидроксиманделовой кислоты.

Моноаминоксидазы

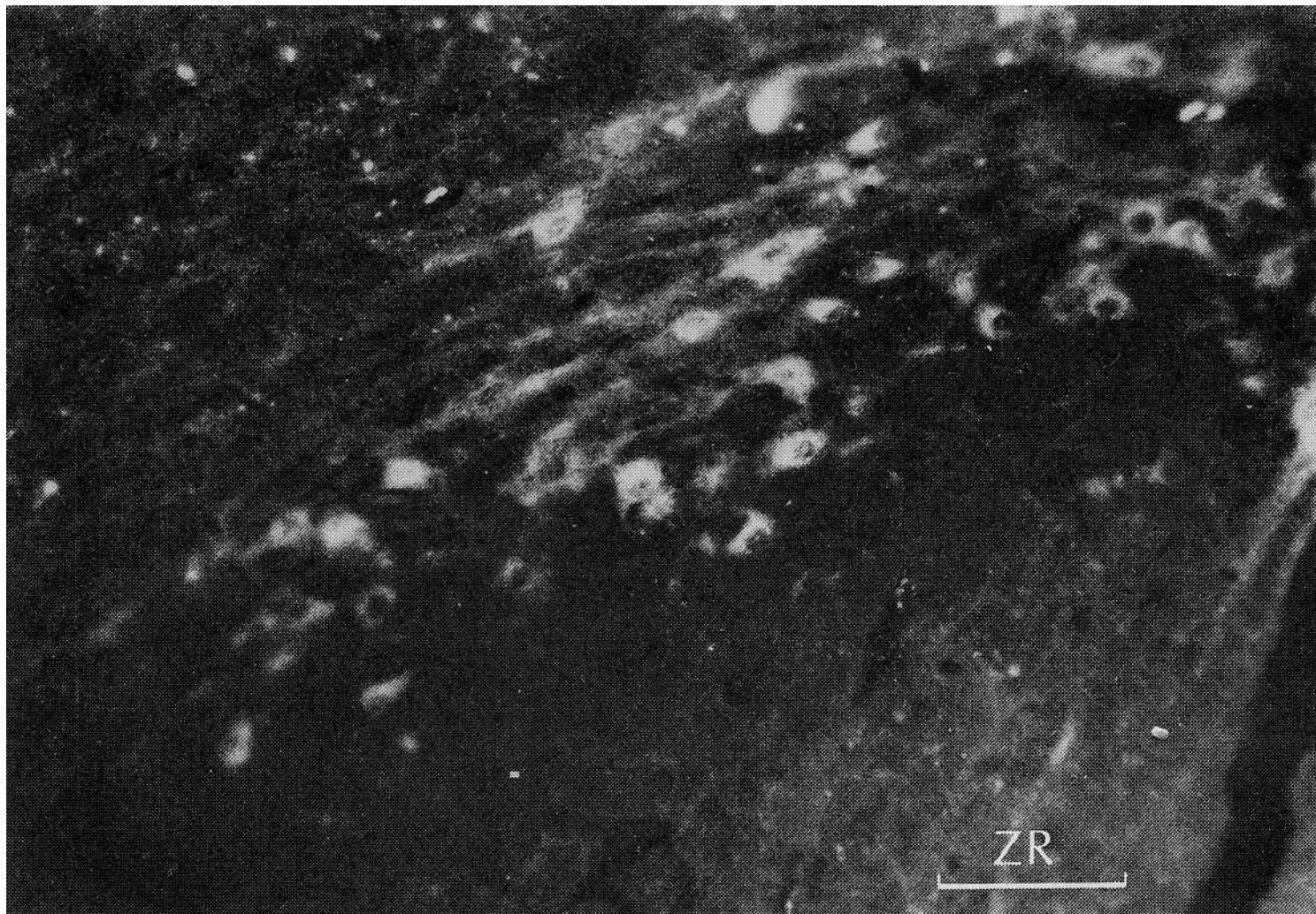
- Два фермента МАО-А и МАО-В, кодируются генами, в X-хромосоме человека и мыши.
- Это белки 102 кД, встроенные во внешнюю мембрану митохондрий.
- Окисляют многие первичные амины до альдегидов.
- Кофактор – ФАД.
- Основным субстратом МАО-А является серотонин и тирамин, ингибитор – хлоргилин.
- Основными субстратами МАО-В являются катехоламины и бензиамин. Не ингибируется хлоргилином.
- Оба фермента ингибируются паргилином и депринилом.
- Ингибиторы МАО – мощные антидепрессанты.
- Brunner et al. (1993) и Case et al. (1995) обнаружили нокауты по МАО-А у людей (голландское семейство) и мышей (Tg8).
- Мыши и люди с нокаутом по МАО-А характеризуются повышенной агрессивностью.

Дофаминовая система мозга

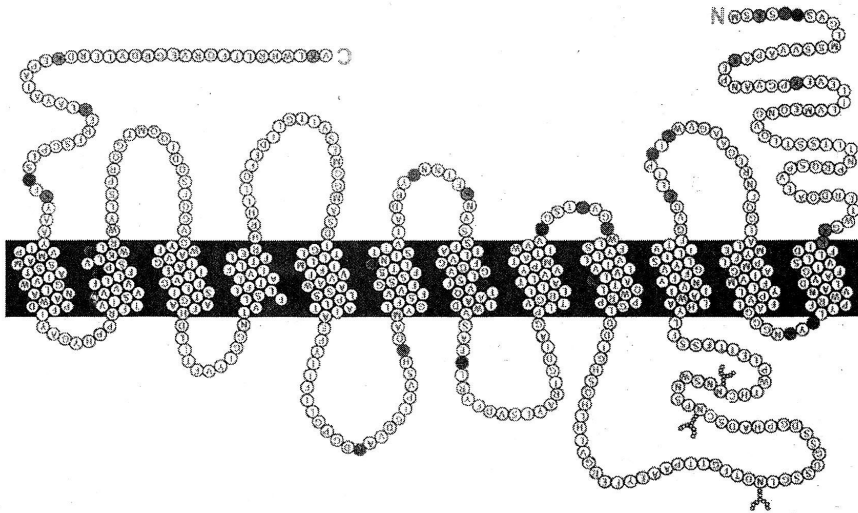


- Дофаминовые нейроны – самая многочисленная группа моноаминовых нейронов в мозге.
- В то же время, дофаминовая система самая компактная.
- Выделяют две основные системы: nigrostriарную и мезолимбическую.
- Тела ДА-нейронов nigrostriарной системы локализованы в черном веществе (A9). Они иннервируют в основном полосатое тело.
- Мезолимбическая системы берет начало из скоплений нейронов в A8 и A10 и иннервирует лимбическую систему мозга, прилежащее ядро, миндалины, перегородку, обонятельную кору.
- ДА нейроны характеризуются спонтанной активностью 1-9 спайк/с.
- Аксоны ДА-нейронов имеют утолщения по всей длине – места секреции медиатора.

Тела дофаминовых нейронов в черном веществе



Транспортер дофамина



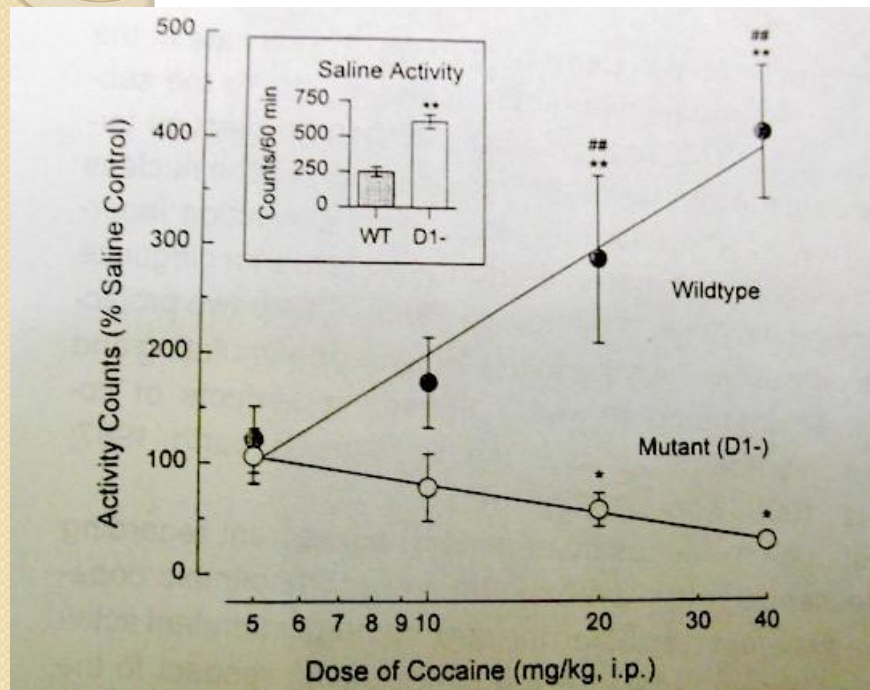
Каталепсия у мышей *Dat*^{-/-} после блокады синтеза

- Секреция ДА регулируется пресинаптическими D_2 . дофамина α -метил-р-тирозином.
- Секретированный медиатор удаляется из синаптической щели с помощью трансмембранного белка-транспортера (ДАТ). мРНК ДАТ экспрессируется только в ДА нейронах.
- ДАТ включает 12 трансмембранных доменов. Механизм работы ДАТ является разновидностью электрогенного транспорта, посредством последовательного связывания и котранспортировки Na^+ , Cl^- и ДА. ДАТ является мишенью кокаина, антидепрессантов и нейротоксинов (6-гидроксидофамина).
- Мыши с нокаутом по ДАТ характеризуются замедленным ростом. Нокаутные самки не способны вырабатывать молоко. В 5-6 раз более подвижны, чем животные дикого типа. Ни кокаин, ни амфетамин не способны усилить эту подвижность.

Рецепторы дофамина, классификация

- Существует 5 типов ДА рецепторов, $D_1 - D_5$, которые разделяются на две фармакологически трудно различимые группы – D_1 и D_2 .
- Рецепторы D_1 - группы D_1 и D_5 сопряжены с G_s белком и имеют наибольшее сродство с агонистами ДА апоморфину и флупентиксолу.
- Рецепторы D_2 – группы $D_2 - D_4$ сопряжены с G_i белком и характеризуются высоким сродством к антагонистам ДА галоперидолу и спироперидолу.
- D_2 рецепторы часто выполняют функцию пресинаптических ауторецепторов и регулируют секрецию ДА и спайковую активность ДА нейронов по принципу отрицательной обратной связи.

Дофаминовые рецепторы. Функция



- Активация D_1 рецепторов усиливает двигательную активность. Однако спонтанная активность выше у мышей с нокаутом D_1 рецепторов.
- Психостимулирующий эффект кокаина и амфетамина – через D_1 рецепторы. Он не проявляется у нокауты.
- D_2 рецепторы также участвуют в механизме психостимуляторов.
- Типичные нейролептики, галоперидол и раклопайд, являются ингибиторами D_2 рецепторов. Ингибирование этих рецепторов вызывает каталепсию.
- D_4 рецепторы являются мишенью атипичных нейролептиков. Их ингибирование не вызывает каталепсию.

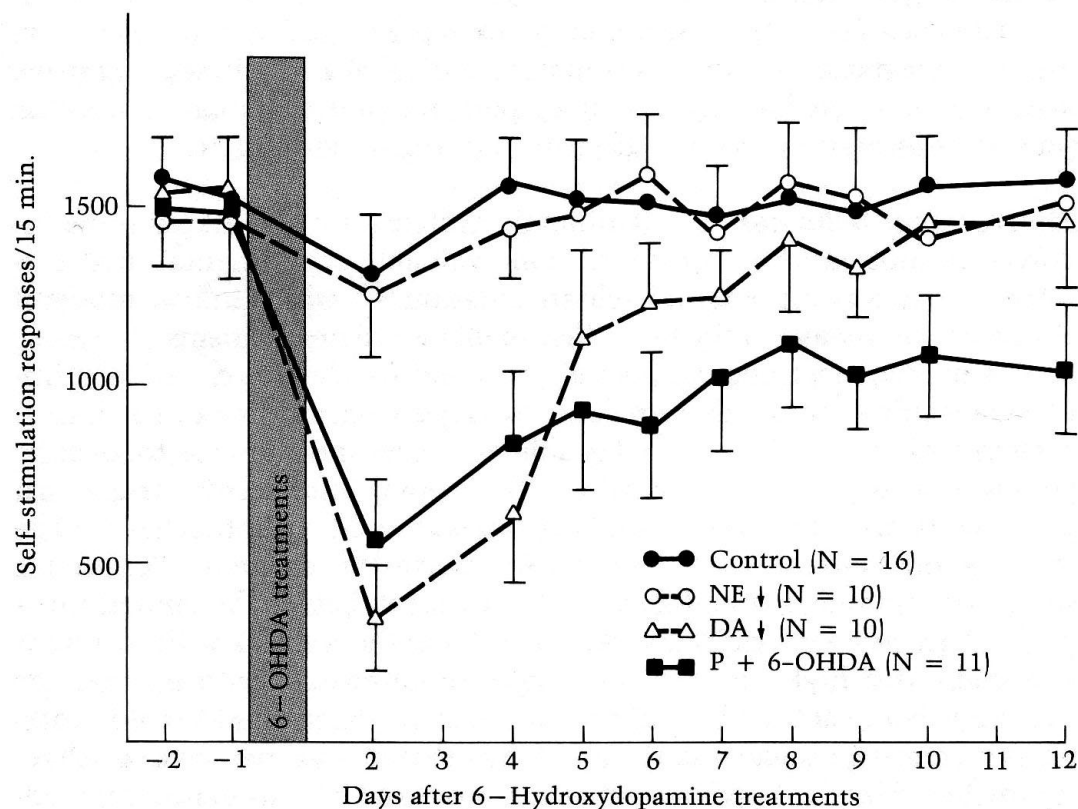
Функция nigrostriарной системы

- Nigrostriарная ДА система регулирует двигательную активность. Стимулятор секреции ДА d-амфетамин в слабых дозах вызывает общее возбуждение и эйфорию, а в больших дозах – стереотипию (принюхивание, грызение).
- Агонист D_1 рецепторов апоморфин вызывает увеличение двигательной активности.
- Разрушение ДА проекций и/или нейронов приводит к снижению двигательной активности и акинезии паркинсоноподобного типа.
- ДА стриатума в норме тормозит холинергические и ГАМК нейроны бледного шара. Блокада секреции ДА с помощью антагонистов D_2 рецепторов вызывает каталепсию.

Функции мезолимбической системы

- ДА мезолимбической системы играет ключевую роль в механизме внутреннего вознаграждения и поощрения.
- Моделями для изучения положительного подкрепления служат самостимуляция и самовведение.
- Самостимуляция – животному вживляют электрод в некоторые структуры мозга, раздражение которых вызывает чувство удовольствия, и оно быстро обучается нажимать рычаг для получения удовольствия.
- Агонист D_1 рецепторов, апоморфин – усиливает самостимуляцию.
- Антагонисты D_2 рецепторов, галоперидол и спироперидол подавляет самостимуляцию медианного пучка, прилежащего ядра и гиппокампа.

Разрушение дофаминовых, но не норадреналиновых, окончаний снижает интенсивность самостимуляции



- Электрод вживлен в латеральный гипоталамус

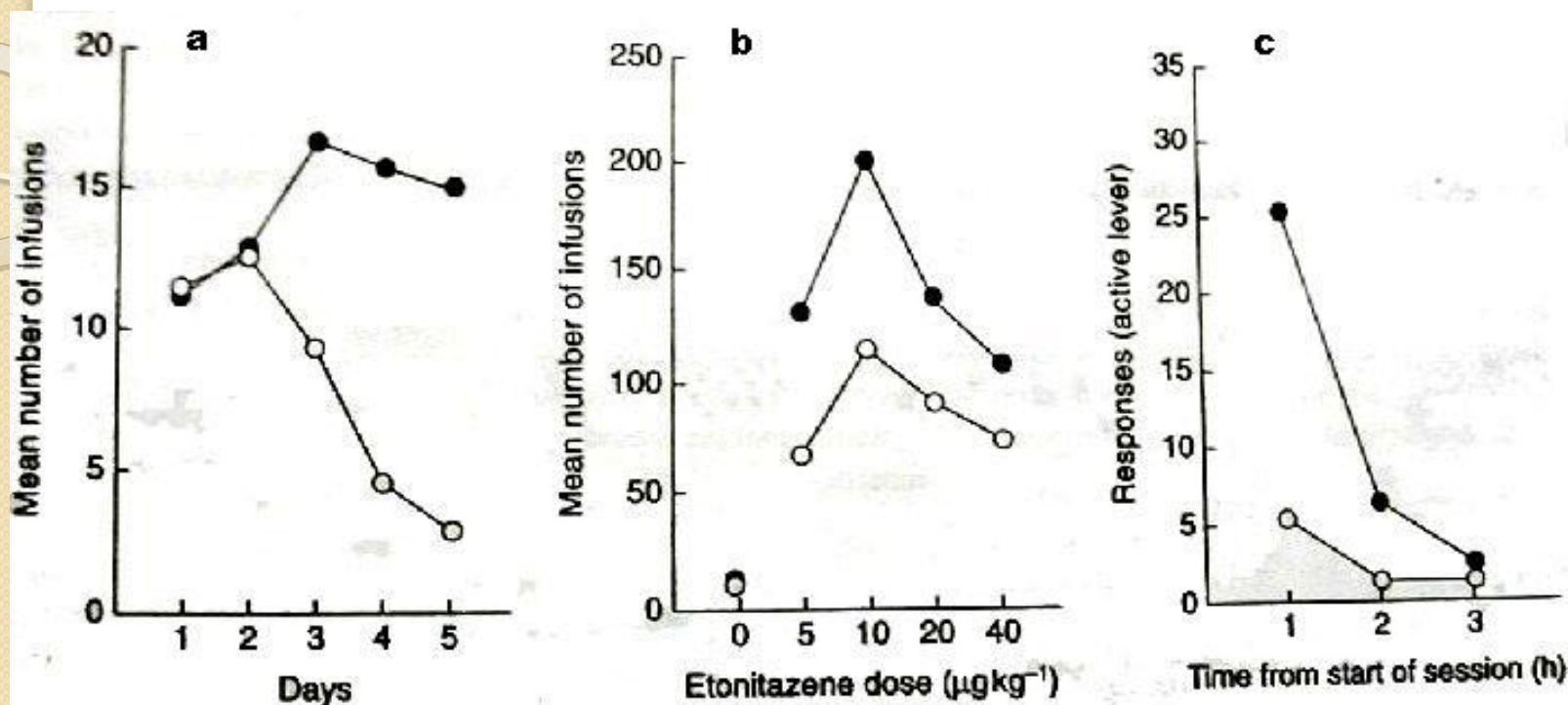
Самовведение

- Широко распространенная модель изучения нейрохимических механизмов наркотической зависимости.
- Животному в вену вводят канюлю, через которую оно может ввести себе препарат нажатием на рычаг.
- Животное быстро обучается вводить себе агонисты дофамина, такие как амфетамин и кокаин, или наркотические вещества морфинового ряда.
- Блокаторы ДА рецепторов снижают интенсивность самовведения.
- Крысы не вводят себе LSD-25 и Δ -9-тетрагидроканнабинола.

Дофамин и наркотическая зависимость

- ДА система мозга играет ключевую роль в развитии наркотической зависимости.
- Длительное введение психостимулянтов и наркотиков наряду с позитивными (эйфория, общее возбуждение) вызывает негативные явления – усиливает тревогу, страх, галлюцинации и параноидальные явления.
- Обычно негативные ощущения подавляются позитивными.
- Феномен сенситизации – усиление негативных явлений при длительном употреблении наркотиков. Для их подавления необходимо увеличивать дозу.
- Негативные явления обостряются при прекращении потребления наркотиков – наступает ломка.
- Две фазы сенситизации: инициация и экспрессия.
- ДА нейроны мезолимбической системы вовлечены в механизм инициации и запуска процесса сенситизации.
- В механизм экспрессии, напротив, вовлечены глутаматэргические и ГАМК нейроны.

Стресс и наркотическая зависимость

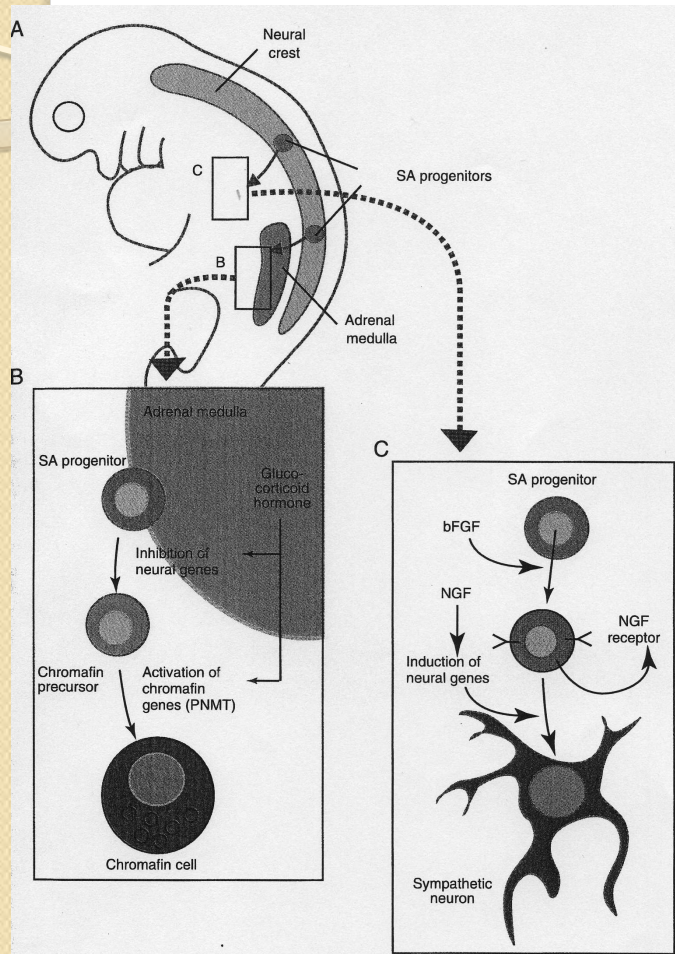


- Полагают, что причиной употребления наркотических веществ является стресс.
- Стресс (черные кружочки) увеличивает время (a) и дозу (b) психостимулянта.
- После замены препарата на физ. раствор единственный стресс резко усиливает самовведение (c).

Заключение

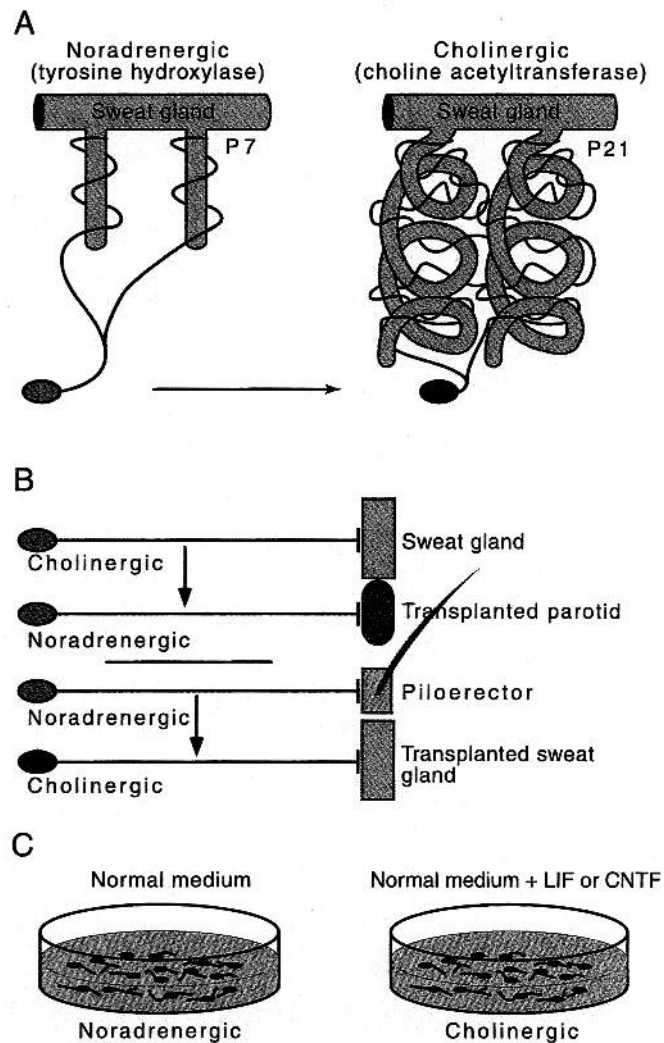
- Нигростриарная ДА система мозга вовлечена в регуляцию моторной функции, которая включает активацию движений и их координацию.
- Мезолимбическая ДА система вовлечена в механизм внутреннего подкрепления.
- ДА – это безусловное добро.
- ДА мезолимбической системы играет ключевую роль в инициации и запуске наркотической зависимости и тяги к наркотическим веществам.

Периферическая адренергическая система



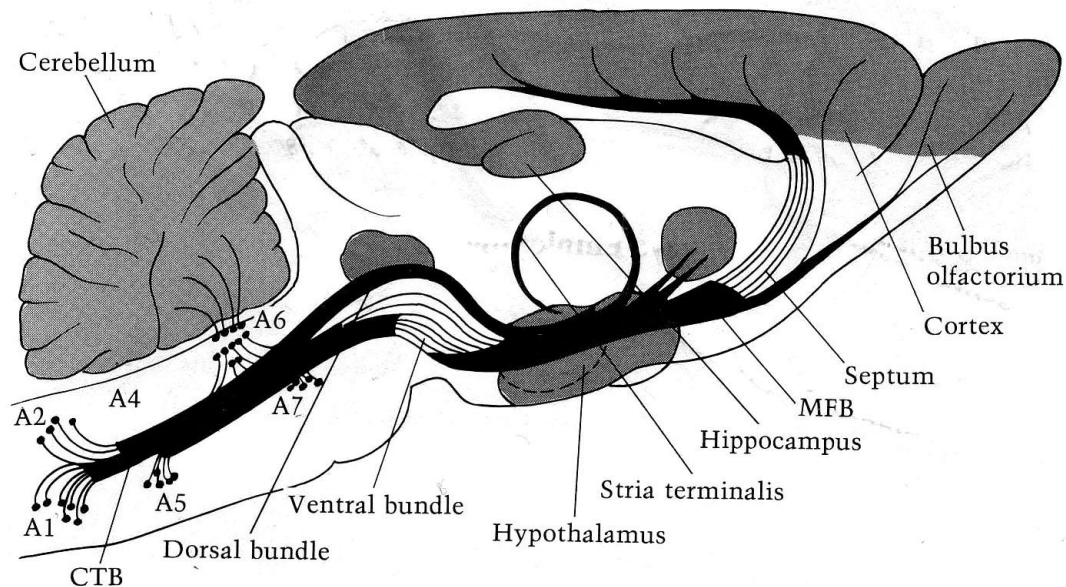
- Адреналин синтезируется хромафинными клетками мозгового слоя надпочечников и секретируется в кровь при стрессе.
- Норадреналин – медиатор нейронов симпатической системы.
- Симпатические нейроны и хромафинные клетки происходят от одного симптоадреналового предшественника.
- Глюкокортикоиды подавляют экспрессию нейрональных генов и активируют экспрессию хромафинных генов (N-метилтрансферазы). Фактор роста hFGF, напротив, стимулирует формирование симпатического нейрона.

Симпатические нейроны. Переопределение типа



- Симпатические нейроны развиваются как адренергические, но те которые иннервируют потовые железы, перестают экспрессировать ТГ и перерождаются в холинергические.
- Адренергический тип симпатического нейрона переопределяется в холинергический факторами роста LIF и CNTF

Норадреналиновая система мозга



- Основным медиатором адренергической системы мозга является норадреналин.
- Адренергическая система более экспансивна, чем ДА-эргическая.
- Основным источником норадреналина в мозге являются нейроны синего пятна.

Адренорецепторы. Классификация

- Существует 9 различных адренергических рецепторов, которые объединяются в три класса: α_1 , α_2 и β адренорецепторы. α рецепторы чувствительны к норадреналину, но слабо – к изопреналину, β рецепторы чувствительны к изопреналину.
- α_1 адренорецепторы включают α_{1A} , α_{1B} и α_{1D} рецепторы. Сопряжены с G_q белком. Расположены постсинаптически.
- α_2 адренорецепторы включают α_{2A} , α_{2B} и α_{2C} рецепторы. Сопряжены с G_i белком. Расположены как пре-, так и постсинаптически. α_{2A} – является основным ауторецептором, регулирующим секрецию норадреналина, ацетилхолина и ГАМК.
- β адренорецепторы включают β_1 , β_2 и β_3 рецепторы. Сопряжены с G_s белком. β_1 рецептор в равной степени чувствителен к норадреналину и адреналину. β_2 рецептор в 100 раз более чувствителен к норадреналину.

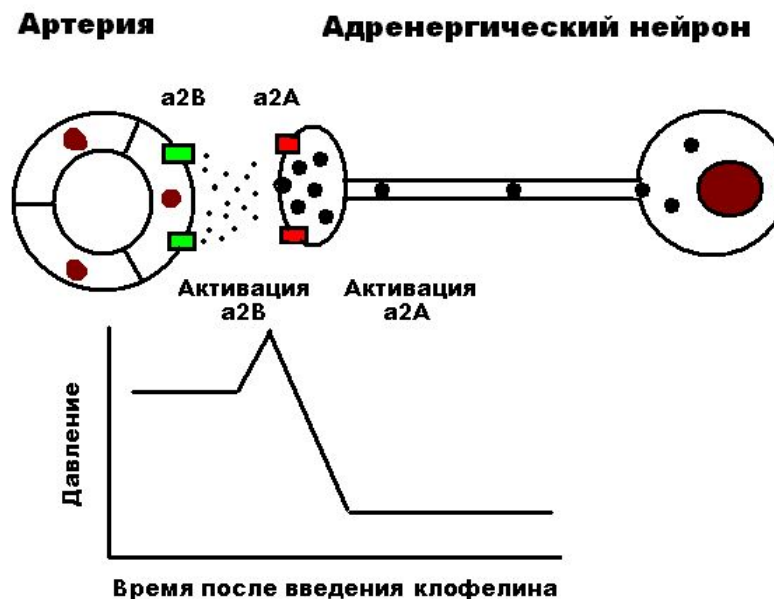
Адренорецепторы. Регуляция

- Показано участие обратимого фосфорилирования /дефосфорилирования в регуляции β рецепторов. Фосфорилирование рецепторов PKA или PK β рецепторов десенситизирует их.
- Фосфорилирование рецепторов PK β рецепторов вызывается агонистами через несколько минут после связывания (гомологическая).
- Down-регуляция α_2 рецепторов происходит на посттрансляционном уровне, а β рецепторов за счет разрушения их мРНК.
- Промоторы генов β и α_2 рецепторов содержат CRE бокс и их экспрессия может регулироваться цАМФ.
- В гене β_1 рецептора обнаружен сайт угнетения, а в гене β_2 рецептора – сайт активации экспрессии глюкокортикоидами.

Функция

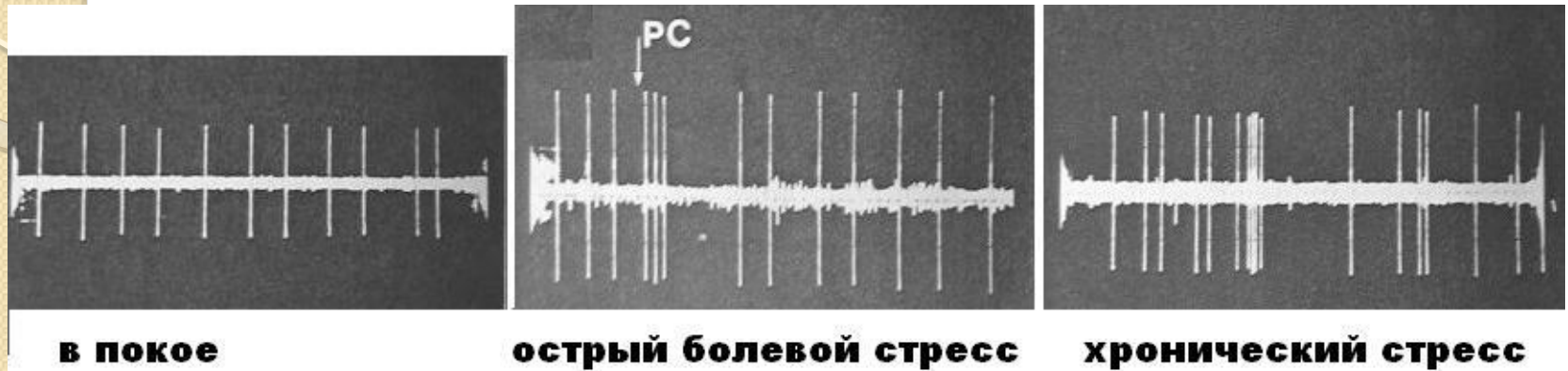
- Адреналин надпочечников секретируется при стрессе и является одним из гормонов стресса.
- Норадреналин является медиатором постганглионарных волокон симпатической системы.
- Норадреналин вовлечен в регуляцию артериального давления.

Регуляция артериального давления



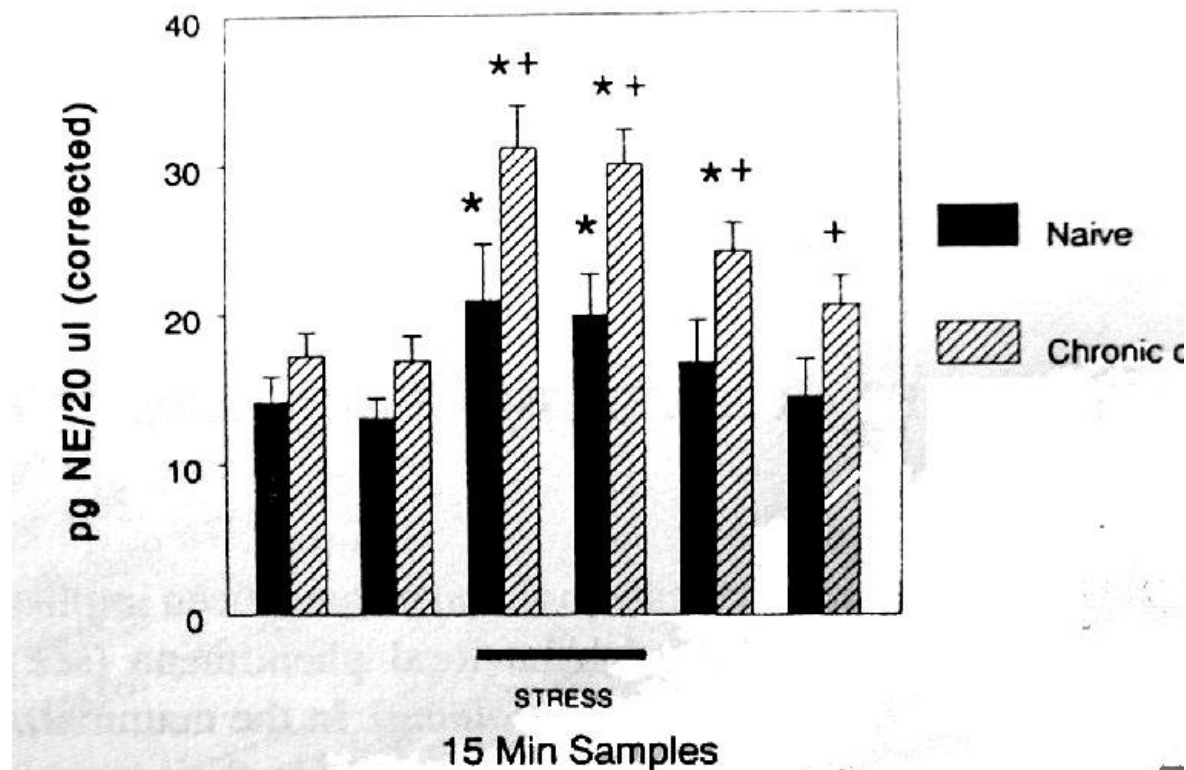
- Адренорецепторы играют ключевую роль в регуляции артериального давления. Агонисты α_2 рецепторов, такие как клофелин, наиболее мощные гипотензивные средства.
- Гипотензивный эффект клофелина обусловлен активацией пресинаптических α_{2A} адренорецепторов и блокадой секреции норадреналина.
- Однако клофелин вначале вызывает резкое повышение давления. Это повышение обусловлено активацией постсинаптических α_{2B} адренорецепторов мускулатуры сосуда, что вызывает их констрикцию и увеличивает давление.
- Гипертензивный эффект клофелина не наблюдается у мышей с нокаутом α_{2B} адренорецепторов.

Тревога и страх



- Острый болевой стресс или неизбежный стресс увеличивают частоту спайков адренергических нейронов синего пятна.
- Хронический неизбежный стресс приводит к возникновению нерегулярной активности.

Стресс и секреция норадреналина



- Болевой стресс усиливает секрецию НА (микродиализ).
- Секреция медиатора выше у животных, подвергнутых предварительному хроническому (холодовому) стрессу.

Норадреналин – медиатор страха

- Активация синего пятна происходит только в ответ на угрожающие стимулы. Пища или половой партнер не вызывают активации адренергических нейронов.
- Электрическая или фармакологическая стимуляция синего пятна вызывает поведение, связанное с тревогой и страхом. Разрушение синего пятна производит анксиолитический эффект.
- Стимуляция синего пятна у человека вызывает чувство страха и неминуемой смерти.
- При возбуждении синего пятна происходит синхронная активация симпатической системы – выброс адреналина, повышение давления и сердцебиение.
- Хронический неконтролируемый стресс вызывает сенситизацию нейронов синего пятна – снижение порога их возбудимости.

Роль катехоламинов в ЦНС

- Катехоламины участвуют в оценке стимула и выборе стратегии ответа.
- Они вовлечены в механизм внутреннего подкрепления (дофамин) и наказания (норадреналин). Дофамин ассоциирован с безусловным добром, а норадреналин – со злом.
- Другой связанной функцией является координация движений (дофамин) и гормональной и вегетативной реакции на стресс (норадреналин).