LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

RECEPTOR BINDING CHARACTERIZATION OF NOVEL D_1 AND D_2 DOPAMINERGIC DRUGS USING AUTORADIOGRAPHIC TECHNIQUES AND FUNCTIONAL MODEL

CHUTHAMANEE CHARUCHINDA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
(PHARMACOLOGY)

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1988

Copyright by Mahidol University

12236

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาคุณสมบัติของการจับกับตัวรับโดปามีน 1 และ 2 โดยใช้วิธีออโตเรดิโอกราฟฟีและการตอบสนองทางสรีรวิทยา
ผู้วิจัย นางสาวจุฑามณี จารุจินดา
ปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เภสัชวิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

รศ.ดร.นพ. กำพล	ศรีวัฒนกุล	ประธาน
ศ.นพ. อรรถสิทธิ์	เวชชาชีวะ	
ศ.ดร. อำนวย	ถิฐาพันธ์	
รศ.ดร. จุฑามาศ	สัตยวิวัฒน์	
ดร. พรทิพย์	ศุภวิไล	

วันที่สำเร็จการศึกษา 19 กันยายน 2531

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ได้ศึกษาถึงคุณสมบัติในการจับกับตัวรับโดปามีน โดยใช้วิธีออโตเรดิโอกราฟฟี และการตอบสนองทางสรีรวิทยา ผลการศึกษาวิจัยแสดงว่า ^{3}H-spiperone ซึ่งเป็นสารที่ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางเกี่ยวกับการศึกษาการจับกับตัวรับยามีข้อเสียที่สำคัญคือ จับกับ non-specific spirodecanone binding sites และ 5-HT_2 receptors ซึ่งสารชนิดใหม่ได้แก่ ^{3}H-SKF 38393 (D_1 agonist) และ ^{3}H-CV-205-502 (D_2 agonist) จะไม่มีข้อเสียเหล่านี้ ลักษณะของการกระจายของตำแหน่งที่สารนี้ไปจับมีความคล้ายคลึงกับสารชนิดอื่นๆ ที่มีผลต่อตัวรับโดปามีน และนอกจากนี้ยังสามารถจับกับตัวรับโดปามีนในสมองของหนูขาวซึ่งสารตัวอื่นๆไม่สามารถจะจับได้

การศึกษาโดยวิธีออโตเรดิโอกราฟฟี ใช้หลักการเดียวกันกับการศึกษาการจับกับตัวรับยาโดยทั่วไป แต่ในกรณีที่ใช้ ^{3}H-ligands จะทำให้เกิดปัญหาเรื่อง quenching ทั้งนี้เพราะเนื้อเยื่อแต่ละส่วนของสมองมีคุณสมบัติในการ quenching สารกัมมันตภาพรังสีไม่เท่ากัน การวิจัยนี้ได้ประสบความสำเร็จในการหาค่า correction factor สำหรับสาร ^{3}H-ligands โดยใช้วิธี Chloroform extraction และนำมาใช้ในการคำนวณปริมาณการจับตัวของ ligands กับบริเวณเนื้อเยื่อสมองส่วนต่างๆ

คุณสมบัติของการจับกับตัวรับของสาร ^{3}H-CV-205-502 ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีสูตรเคมีของ catechol และออกฤทธิ์เฉพาะเจาะจงกับตัวรับโดปามีน D_2 เป็นไปตามที่คาดคะเนไว้สำหรับยาในกลุ่มเดียวกัน โดยทั่วไปการจับของ ^{3}H-CV-205-502 จะถูกยับยั้งได้อย่างเฉพาะเจาะจงและมีลักษณะเป็น stereospecific ต่อสารพวก D_2 โดยที่สารพวก D_1 ไม่มีผล การระบุตำแหน่งของการจับตัวของ ^{3}H-CV-205-502 กับตำแหน่งรับโดยวิธีออโตเรดิโอกราฟฟีแสดงให้เห็นว่าปริมาณของตัวรับ D_2 มีความหนาแน่นมากในบริเวณต่อไปนี้คือ ชั้น glomerular ของ olfactory bulb, nucleus accumbens, caudate nucleus, lateral septum และ islands of Calleja

การศึกษาการกระจายของตัวรับ D_1 ในสมองหนูได้กระทำโดยใช้ ^{3}H-SKF 38393 การจับของ ^{3}H-SKF 38393 กับสมองส่วน striatum จะอิ่มตัวได้ และแสดงคุณสมบัติที่เป็น stereospecific บริเวณที่มีการจับของสารนี้สูงสุด ได้แก่ โครงสร้างสมองส่วน caudate nucleus, nucleus accumbens, olfactory tubercle, septum lateralis, central amygdaloid nucleus และ substantia nigra

จากผลของการศึกษาการจับของ ^{3}H-CV-205-502 โดยวิธีออโตเรดิโอกราฟฟี พบว่าการกระจายของตัวรับโดปามีน D_2 ในสมองบางส่วนไม่สอดคล้องกับผลการศึกษาทาง immuno-cytochemistry ในแง่ที่ว่าสมองบางตำแหน่งมีตัวรับโดปามีนในขณะที่ไม่พบว่ามีเส้นประสาทในระบบ

โดปามีนมาหล่อเลี้ยง และในทางตรง กันข้าม ส่วนของสมองที่มีเส้นประสาทในระบบโดปามีนมาเลี้ยงก็ไม่พบว่ามีตัวรับโดปามีน D_2 ในบริเวณนั้น ซึ่งปัญหานี้จะรวมเรียกว่า mismatch

การศึกษาผลของสาร guanine nucleotide และ N-ethylmaleimide (NEM) ต่อคุณสมบัติในการจับกับตัวรับโดปามีนพบว่า สาร Gpp(NH)p จะสามารถลด affinity ของสารที่เป็น agonist โดยที่ไม่มีผลต่อสารที่เป็น antagonist และขบวนการ alkylation ของ sulfhydryl group โดยใช้ NEM ไม่มีผลต่อการจับของ antagonist อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามดูเหมือนว่า sulfhydryl group จะมีหน้าที่สำคัญในการจับตัวของ agonist

การออกฤทธิ์ของสารกระตุ้นโดปามีนเชื่อว่าจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ second messenger ผลการวิจัยนี้ไม่แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของ phosphatidylinositol (PI) metabolism ในสมองส่วน striatum ของหนูขาว แม้ว่าจะมีผู้เคยรายงานไว้ก่อนหน้านี้ว่า การกระตุ้นตัวรับโดปามีน D_2 ในต่อม pituitary ของหนูขาว ทำให้ PI turnover ลดน้อยลง ทั้งนี้อาจจะเป็นผลเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของ PI turnover เมื่อตัวรับโดปามีน D_2 ถูกกระตุ้นในสมองส่วน striatum ของหนูขาวเกิดขึ้นน้อยและรวดเร็วเกินกว่าที่จะทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นชัดเจนได้

ผลการทดลองที่สำคัญของวิทยานิพนธ์นี้แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติที่ดีเด่นของ SKF 38393 และ CV 205-502 ซึ่งสามารถจับกับตัวรับโดปามีนได้ดีกว่าสารชนิดอื่นๆที่มีใช้ในปัจจุบัน สารทั้งสองชนิดนี้สามารถจับกับตัวรับโดปามีนในตำแหน่งของสมอง บริเวณที่ทราบโดยแน่ชัดแล้วว่ามีระบบประสาทโดปามีนมาหล่อเลี้ยงและบริเวณที่มีตัวรับโดปามีนอยู่โดยที่ไม่มีระบบประสาทมาหล่อเลี้ยง ในการศึกษาโดยใช้วิธีออโตเรดิโอกราฟพีพบว่ามีตัวรับทั้ง โดปามีน D_1 และ D_2 ในสมองส่วน mesolimbic ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง เนื่องจากสมองส่วน mesolimbic เป็นที่รู้กันโดยทั่วไปว่า เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของอารมณ์และพฤติกรรม งานวิจัยชิ้นนี้เป็นการทดลองครั้งแรกที่แสดงให้เห็นว่าตัวรับ D_2 มีบทบาทสำคัญในภาวะที่เกิดความเครียด อย่างน้อยที่สุดภาวะเครียดจากการถูกรบกวนโดยเสียงและการใช้ noise-induced stress model เป็นวิธีการทดลองที่ง่าย ซึ่งจะสามารถนำมาใช้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างในการตอบสนองของตัวรับโดปามีน D_1 และ D_2 ได้

Copyright by Mahidol University

Thesis Title RECEPTOR BINDING CHARACTERIZATION OF NOVEL D_1 AND D_2 DOPAMINERGIC DRUGS USING AUTORADIOGRAPHIC TECHNIQUES AND FUNCTIONAL MODEL

Name CHUTHAMANEE CHARUCHINDA

Degree Doctor of Philosophy (Pharmacology)

Thesis Supervisory Committee

Kampon Sriwatanakul, M.D., Ph.D. Chairman

Athasit Vejjajiva , F.R.C.P.

Amnuay Thithapandha, Ph.D.

Jutamaad Satayavivad, Ph.D.

Porntip Supavilai, Ph.D.

Date of Graduation September 19, 1988

ABSTRACT

The dopaminergic receptor binding in rat brain was characterized by using autoradiography and functional model. The major disadvantages of ^{3}H-spiperone, a widely used labeled ligand in receptor binding studies, were demonstrated. The most important drawback was that it bound non-specifically not only to "spirodecanone" binding site and also bound to 5-HT_2 receptors. The novel ligands ^{3}H-SKF 38393 (a selective D_1 agonist) and ^{3}H-CV-205-502 (a selective D_2 agonist) did not exhibit these characteristics of binding. The use of these two ligands in receptor autoradiography has revealed the presence of dopamine receptors in significant densities in areas where other dopaminergic ligands including spiperone did not exhibit relevant binding as well as in other well-characterized brain areas for which agreement already exists about the presence of dopamine receptors.

The receptor autoradiography was shown to have a certain disadvantage in that the tissue itself may quench some of the signals from the (^{3}H) ligands, altering grain densities in the autoradiography image. The quenching problem was successfully corrected in this study by determining correction factor. This factor was obtained by using the chloroform extraction method.

The non-catechol, ^{3}H-CV-205-502, was used to localize dopamine D_2 receptors by autoradiography after *in vitro* labeling of rat brain sections. The characteristics of the binding of this ligand to tissue sections were those expected from the labeling of dopamine D_2 receptors. The binding of ^{3}H-CV-205-502 was inhibited selectively and stereospecifically by dopamine D_2 agents but not by dopamine D_1 compounds. The autoradiographic localization of ^{3}H-CV-205-502 binding sites showed high densities of dopamine D_2 receptors in areas such as the glomerular layer of the olfactory bulb, the nucleus accumbens, caudate putamen, the lateral septum, and the islands of Calleja. The distribution pattern showed similarities and differences

with previously reported distributions of dopamine D_2 receptors visualized autoradiographically using ^3H-labeled agonists and antagonists.

^3H-SKF 38393 was used to study the regional distribution of dopamine D_1 receptor in the rat brain. The binding of ^3H-SKF 38393 to striatal sections was saturable and stereospecific. The highest levels of ^3H-SKF 38393 binding sites were found in cerebral structures such as caudate putamen, nucleus accumbens, olfactory tubercle, septum lateralis, central amygdaloid nucleus and substantia nigra.

A remarkable observation in this autoradiographic study was that the distribution of receptors did not precisely parallel or match with the distribution of related neurotransmitters. The lack of matching may be either due to the fact that a neurotransmitter is present where there is no receptor or a receptor exists without the presence of neurotransmitters.

The studies of the effects of guanine nucleotide and N-ethylmaleimide (NEM) on dopamine receptor binding characteristics in whole calf brains confirmed the finding that the effect of Gpp(NH)p, a stable GTP analog, was to lower agonist receptor affinity without affecting antagonist receptor affinity. The results also suggested that alkylation of sulfhydryl groups by NEM did not appear to significantly affect antagonist binding, while sulfhydryl groups appeared to be functionally important in the regulation of high affinity binding sites.

Stimulation of dopamine receptors can also lead to changes in the levels of second messengers. Significant changes in phosphatidylinositol (PI) turnover were not demonstrated when rat striatum slices were being stimulated by LY 141865, a D_2 agonist, despite the fact that activation of D_2 receptors has been previously shown to inhibit PI turnover in rat anterior pituitary gland. It is possible that the changes of PI turnover by activation of D_2 receptor in rat striatum are relatively small and rapid.

The main results of this thesis demonstrated the superior advantages of two novel ligands, SKF 38393 and CV 205-502, over other currently available radiolabeled compounds. They can be used to localize specific brain regions known to be innervated by dopaminergic neurons and also in areas that the innervation seemed to be absent or not well established.Dopaminergic receptors have been shown to be present in significant amount in mesolimbic brain areas as being labeled by ^3H-SKF 38393 and ^3H-CV-205-502 in the autoradiographic studies. The mesolimbic brain regions are also widely known to be associated with emotion and behaviours. This is the first study to suggest that D_2 receptor plays an important role in stressful situation at least in noise-induced stress model. Although quite simple to perform, this model was shown to be useful in differentiating the physiological role of D_1 and D_2 receptors

Copyright by Mahidol University