

УДК 612.822+598.333

ЭЛЕКТРОГЕННЫЕ ОПИАТНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ НА ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫХ НЕЙРОНАХ ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ

Костюченко О.В., Евстафьева Е.В., Коренюк И.И.

Введение

Выяснение мембранных механизмов действия опиоидных пептидов является одной из актуальных проблем нейрофармакологии. Известно, что при действии опиоидов через опиатные рецепторы свойства нейронной мембраны изменяются. С одной стороны, эти пептиды могут влиять на проницаемость мембраны нейрона, изменяя мембранный потенциал (МП) клетки и тем самым ее возбудимость. С другой стороны, опиаты способны изменять ответы нейрона на нейромедитаторы, не оказывая прямого влияния на потенциал покоя и сопротивление мембраны [1].

Наличие в нервной системе моллюсков эндогенных опиоидов и опиатных рецепторов [2 – 5], позволяет говорить о том, что в нервной системе беспозвоночных существует эндогенная энкефалинергическая система, подобная опиоидной системе высших животных [6]. В настоящее время очевиден тот факт, что опиатные рецепторы играют большую роль в поведенческой и нейрональной пластичности [7]. Пластичность нервной системы и такие важные феномены, как обучение и память, связаны с медленными колебаниями МП, лежащих в основе ауторитмической активности нейронов. В связи с этим представляло интерес определить существование опиатных рецепторов на идентифицированных нейронах виноградной улитки, обладающих ритмоводящими свойствами.

Методика

Эксперименты были выполнены на идентифицированных нервных клетках ППа1, ППа2 и ППа7 виноградной улитки *Helix pomatia* [8]. Изолированное окологлоточное кольцо ганглиев прикрепляли иглами ко дну экспериментальной камеры. После удаления оболочки, покрывающей ганглии, последние в течение 50 минут обрабатывались 1%-ным раствором проназы Е (“Sigma”, США) при комнатной температуре; затем все оставшиеся тонкие оболочки удалялись, что позволяло осуществить успешное выделение клеток из ганглия.

Состав омывающего раствора Рингера для моллюсков был следующим (в миллимолях на 1 л): NaCl – 100, KCl – 4, CaCl₂ – 10, MgCl₂ – 4, трис-HCl – 10 (pH 7.5). Микроэлектродное отведение электрической активности выполняли с использованием

стандартных методических приемов. Перед изоляцией нейронов предварительно регистрировали их электрическую активность для точной идентификации исследуемых клеток. После этого отводящий микроэлектрод извлекали и перерезали коннективу между правым париетальным ганглием, где расположены сомы упомянутых идентифицированных нейронов, и висцеральным ганглием, куда направляются их главные отростки. Затем снова вводили микроэлектрод в одну из исследуемых клеток, и, непрерывно регистрируя ее электрическую активность, с помощью микроманипулятора механически изолировали сому с униполярным отростком данного нейрона и извлекали ее из ганглия.

Агонисты опиатных рецепторов и налоксон апплицировали на исследуемую клетку под давлением через микропипетку с диаметром отверстия около 50 мкм.

Эксперименты были проведены при температуре 18 – 22°C.

Результаты и обсуждение

В интактном ганглии было исследовано 12 нейронов ППа1, 10 – ППа2 и 10 – ППа7; и в изолированном состоянии 9 нейронов ППа1, 7 – ППа2, 5 – ППа7.

Чувствительность нейронов к опиоидам. Планируя исследовать наличие опиатных рецепторов на идентифицированных нейронах ППа1, ППа2 и ППа7 (идентификация по Коваль и Кононенко [8]), в экспериментальную камеру добавляли агонисты опиатных рецепторов (?- и ?- агонисты: Met- и Leu- энкефалины, соответственно, и ?-агонист: ?-эндорфин). Ни один из исследованных опиоидов (в концентрации 0.1 – 10 мкМ) не изменял МП нейронов и не влиял на параметры электрической активности исследованных нейронов.

Чувствительность нейронов к антагонисту опиатных рецепторов. Нейрон ППа1. Нейрон ППа1 в большинстве препаратов генерирует пейсмекероподобную пачечную активность. Электрическая активность нейрона имеет экзогенное происхождение, то есть связана с постоянной активацией его пептидергических входов нейропептидом, секретируемым терминально пресинаптического интернейрона [9, 10]. Кратковременная аппликация антагониста опиатных рецепторов – налоксона (50 мкМ) на интактный нейрон ППа1 приводила к усилению типичной пачечной активности, что выражалось в увеличении частоты генерации пачек потенциалов действия (ПД) (рис. 1А). Реакция клетки на антагониста начиналась в момент его аппликации в экспериментальную камеру и продолжалась 5 – 10 минут до полного отмывания вещества стандартным раствором Рингера.

Для того, чтобы исключить возможность непосредственного взаимодействия налоксона с нейропептидом, дальнейшие эксперименты были проведены на изолированном нейроне ППа1. После перерезки правой париетовисцеральной коннективы и изоляции нейрона из ганглия МП клетки устанавливался на уровне 65 – 68 мВ. Как видно из рис. 1Б, аппликация через микропипетку налоксона на

изолированный нейрон ППа1 приводила к деполяризационному сдвигу МП от 7 до 10 мВ и преходящему развитию ПД. Через 5 – 7 минут от начала введения антагониста в экспериментальную камеру последующие аппликации налоксона не вызвали генерации ПД, а только сдвигали значение МП в сторону деполяризации. Подобные эффекты налоксона могут быть обусловлены тем, что, связываясь с опиатными рецепторами, он предотвращает действие эндогенных опиоидов, которые, вероятно, тонически контролируют возбудимость нейрона ППа1.

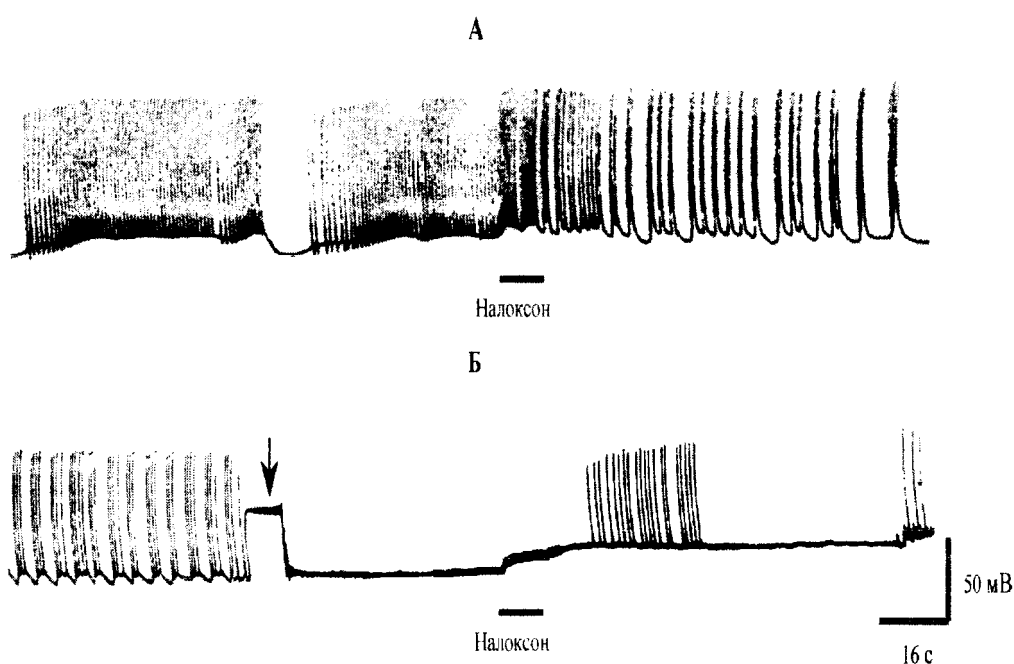


Рис. 1. Эффект аппликации налоксона на фоновую активность нейрона ППа1. А – изменение импульсной активности нейрона ППа1 под влиянием налоксона. Б – электрическая активность и мембранный потенциал нейрона ППа1 до и после перерезки (отмечено стрелкой) коннективы между правым париетальным и висцеральным ганглиями и при аппликации налоксона на изолированный нейрон ППа1.

Нейроны ППа2 и ППа7. Для данных нейронов типичной является ритмическая активность, представляющая собой последовательность одиночных ПД с мономодальным распределением межимпульсных интервалов. Показано [9], что активность нейронов ППа2 и ППа7 носит пейсмекерный характер, то есть имеет эндогенное происхождение. Однако, как показали исследования Коваль и Кононенко [8], при одновременной регистрации электрической активности нейронов ППа1, ППа2 и ППа7 наблюдалась следующая картина. Когда у нейрона ППа1 спонтанно возникало торможение большой длительности, а у нейрона ППа2 – возбуждающе-тормозный

постсинаптический потенциал, то у нейрона ППа7 резко увеличивалась частота возникающих возбуждающих постсинаптических потенциалов и наблюдался разряд генерации ПД. Таким образом, можно говорить, что пресинаптический интернейрон, секрет которого инициирует пачечную активность у неактивного нейрона ППа1, имеет аналогичный синаптический вход и на нейроны ППа2 и ППа7.

Влияние налоксона как на интактный, так и на изолированный нейрон ППа2 приводило к кратковременному резкому увеличению частоты генерации ПД (рис. 2). Как правило, эффект вещества проявлялся в среднем 30 – 60 секунд. В четырех (из всех исследованных) случаях подобное усиление возбуждения изолированного нейрона сменялось торможением большой длительности, а в остальных случаях увеличивалась продолжительность фазы гиперполяризации между ПД. После отмывания вещества спонтанная импульсная активность нейрона в течение 15 – 20 минут практически не возвращалась к исходной.

У нейрона ППа7 прямые реакции на налоксон не зарегистрированы. Введение в экспериментальную камеру налоксона в пороговых концентрациях (10 – 50 мкМ) и выше (100 мкМ) не изменяло значений МП и не влияло на развитие электрической активности нейрона ППа7 как в интактном, так и в изолированном состоянии.

Можно полагать, что избирательное влияние антагониста на возбудимость нейронов зависит от функций исследованных клеток. Так, например, показано [11] селективное влияние опиоидных пептидов и налоксона на возбудимость и пластичность командных нейронов ЛПл1 и ППл1 виноградной улитки (идентификация по Сахарову [12]), участвующих в оборонительной реакции сокращения головной части тела животного.

Для исследованных идентифицированных нейронов их функции не выяснены. Однако установлено, что электрическая активность нейронов моллюсков, обладающих ритмоводящими свойствами, может изменяться во времени и эти изменения связаны с циркадными, лунными, сезонными ритмами [13]. Из литературных данных [14] известны функции нейрона R 15 аплизии, который является гомологичным нейрону ППа1 виноградной улитки. В период размножения усиливается выделение нейрогормона, который влияет на работу сердца, дыхание и водно-солевой обмен. Возможно, что исследованные идентифицированные нейроны имеют подобные функции.



Рис. 2. Влияние налоксона (50 мкМ) на спонтанную импульсную активность изолированного нейрона ППа2.

Выводы

Полученные результаты позволяют предположить, что действие налоксона на нейроны ППа1 и ППа2 осуществляется через специфические ионотропные опиатные рецепторы, которые находятся под тормозящим или возбуждающим контролем эндогенных опиоидов.

Список литературы

1. Pivovarov A.S. The cholinoreceptors of the neurons in the edible snail: their identification and plasticity and its regulation by opioids and second messengers // Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. Im. I. P. Pavlova. – 1992. 42, №6. – P.1271 – 1286.
2. Kemenes G., Rozsa K.S., Stefano G.B., Carpenter D.O. Distinct receptors for Leu- and Met-enkephalin on the metacerebral giant cell of *Aplysia* // Cell. Mol. Neurobiol. – 1992. – 12, №2. – P. 107 – 119.
3. Leung M., Stefano G.B. Isolation of molluscan opioid peptides // Life. Sci. – 1983. – 33, №1. – P. 77 – 80.
4. Pivovarov A.S. Regulation of neuron cholinoreceptor plasticity of *Helix lucorum* by second messengers and opioids // Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. – 1995. – 110, №3. – P. 229 – 240.
5. Stefano G.B., Vadasz I., Hiripi L. Methionine enkephalin inhibits the bursting activity of the Br-type neuron in *Helix pomatia* L // Experientia. – 1980. – 36, №6. – P. 666 – 667.
6. Stefano G.B., Leung M. Purification of opioid peptides from molluscan ganglia // Cell. Mol. Neurobiol. – 1982. – 2, №4. – P. 347-352.
7. Martinez J.L. Jr., Schulteis G., Derrick B.E., Weinberger S.B., Patterson T.A., Bennett E.L., Rosenzweig M.R. Opioid delta receptor involvement in behavioral and neural plasticity // NIDA Res. Monogr. – 1989. – 95. – P. 174 – 179.
8. Koval L.M., Kononenko N.I. Newly identified nerve cells of the snail *Helix pomatia* associated with the generation of pacemaker activity // Neurosci. Behav. Physiol. – 1994. – 27, №1. – P. 41 – 46.
9. Кононенко Н.И., Костюченко О.В. Механизмы генерации ритмоводящей активности в идентифицированных нейронах виноградной улитки // Нейрофизиология. – 2001. – 33, №1. – С. 46 – 54.
10. Kononenko N.I. Mechanism of membrane potential oscillation in bursting neurons of the snail, *Helix pomatia* (With an Appendix by N.I. Kononenko and E.E. Saftenku) // Comp. Biochem. Physiol. – 1993. – 106A. – P. 135 – 147.
11. Nikitin V.P., Kozirev S.A., Shevelkin A.V. Selectivity of opioid peptide effects on excitability and various sensory inputs in LP11 and PP11 command neurons participating in defensive behavior of the snail *Helix lucorum* // Ross. Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova – 2002. – 88, №1. – P. 22-31.
12. Сахаров Д.А. Генеалогия нейронов. – М.: Наука, 1974. – 184 с.
13. Strumwasser F. The demonstration and manipulation of a circadian rhythm in a single neuron // Circadian Clocks. – Amsterdam: North-Holland. – 1965. – P. 442 – 462.
14. Кэндел Э. Клеточные основы поведения. – М.: Мир, 1980. – 598 с.

Поступила в редакцию 11.04.2003 г.