



УДК 578.858

**ВЛИЯНИЕ ЛИШЕНИЯ ПАРАДОКСАЛЬНОЙ ФАЗЫ СНА
НА СПЕЦИФИЧЕСКОЕ СВЯЗЫВАНИЕ [3 H]МОРФИНА И
[3 H]НАЛОКСОНА С СИНАПТИЧЕСКИМИ МЕМБРАНАМИ
ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС**

ТАРАНОВА Н. П., МАЛИКОВ У. М.

Институт физиологии им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград

Исследовали кинетические характеристики связывания [3 H]морфина и [3 H]налоксона с опиатными рецепторами синаптических мембран из мозга крыс в норме и после 24-часового лишения парадоксальной фазы сна. Установлено, что эти рецепторы имеют один тип центров связывания с высоким сродством к опиатам. Показано, что лишение парадоксальной фазы сна не изменяет числа мест связывания [3 H]морфина и сродства рецепторов к морфину и налоксону. Однако концентрация центров связывания [3 H]налоксона при этом заметно снижается. Предполагается, что это является следствием структурно-функциональной перестройки синаптических мембран при депривации парадоксальной фазы сна.

Для исследования биологической роли и функции сна, который является жизненно необходимым периодически развивающимся функциональным состоянием, весьма эффективен метод полного лишения сна или избирательного лишения различных его фаз [1]. Этими методами достигаются эффекты искусственного продления бодрствования с нарастанием всех тех явлений, которые и вызывают необходимость сна. Показано, что избирательное лишение парадоксальной фазы сна (ПФС) вызывает ряд биохимических изменений в синаптических мембранах—изменение их проницаемости к Ca^{2+} , повышение степени гидрофобности за счет снижения активности ПОЛ и повышение количества свободных SH-групп [2, 3]. Эти биохимические сдвиги не могут не отразиться на функциях синаптических мембран, в частности их рецепторного аппарата. Так, полное лишение сна вызывает снижение сродства к лиганду низкоаффинных центров связывания серотониновых рецепторов головного мозга крыс [4], а при избирательном лишении ПФС у них отмечено уменьшение общей концентрации β -адренорецепторов коры и дофаминовых рецепторов стриатума и повышение их сродства к лигандам [5, 6]. Поскольку в физиологических процессах возникновения и поддержания состояния сна предполагается участие и опиоидов [7], нашей задачей было исследование характеристик связывания агониста μ -рецепторов [3 H]морфина и антагониста опиатных рецепторов—[3 H]налоксона с синаптическими мембранами ствола головного мозга крыс при лишении их ПФС.

Опыты выполнены на крысах-самцах линии *Wistar* массой тела 200—220 г. Избирательное лишение ПФС в течение 24 ч вызывали по методу Жувэ, помещая животных на площадки размером 5×5 см, окруженные водой. Контрольную группу составляли животные, находящиеся в клетках в состоянии относительного физиологического покоя. Крыс декапитировали, на холоде быстро извлекали головной мозг, выделяли стволовую часть и готовили 10%-ный гомогенат в 0,32 М сахарозе (на 0,05 М трис-HCl буфере, pH 7,4) в гомогенизаторе тефлон-стекло. Синаптические мембраны получали методом дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы [8]. Осадок синаптических мембран суспендировали в инкубационном буфере следующего состава: 0,005 М HEPES, 5 мМ MgCl₂, pH 7,4 (для связывания [³H]морфина) или 0,05 М трис-HCl, 120 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 0,5 мМ NaH₂PO₄, pH 7,4 (для связывания [³H]налоксона). Содержание белков в суспензии синаптических мембран определяли по модифицированному методу Lowry [9]. Специфическое связывание [³H]морфина и [³H]налоксона с синаптическими мембранами ствола головного мозга исследовали методом равновесного рецепторного связывания [10] инкубируя при 37° суспензию синаптических мембран с [³H]морфином (в диапазоне концентраций от 0,18 до 6,92 нМ/л) или с [³H]налоксоном (в диапазоне концентраций от 0,1 до 12,8 нМ/л). Инкубацию проводили в параллельных пробах также в присутствии немеченого морфина и налоксона соответственно в конечной концентрации 10⁻⁶ М/л для оценки величины неспецифического связывания лигандов. Удаление несвязавшегося лиганда проводили методом вакуумной фильтрации через стекловолоконные фильтры GF/F («Whatman», Англия). Радиоактивность проб измеряли на счетчике «ISOCAP-300», используя диоксан-кислотную сцинтилляционную жидкость. При расчетах была использована динамическая модель кинетики связывания лиганда с мембраной, содержащей один центр связывания [11]. Стационарные значения такой модели позволяют вычислить характеристики центров (K_d и B_{max}). Для оценки этих параметров использовали метод перебора. В качестве оценок выбирали их значения, обеспечивающие наибольшую близость теоретических значений к экспериментальным. Кинетические характеристики центров связывания определяли на ЭВМ-3040. Полученные результаты статистически обрабатывали по Стьюденту-Фишеру.

Результаты исследования

В предварительных опытах были определены оптимальные условия для исследования специфического связывания [³H]морфина и [³H]налоксона с синаптическими мембранами. Количество белка в пробе было подобрано по результатам анализа кривой связывания лиганда в зависимости от концентрации белка в пробе (рис. 1, б) и соответствовало участку прямолинейной зависимости. В дальнейших опытах использовали 150 мкг белка в пробе с [³H]морфином и 100 мкг белка в пробе с [³H]налоксоном. Время инкубации было подобрано по установлению равновесия в реакционной среде и составляло 20 мин (рис. 1, а). Исследование связывания различных концентраций меченого лиганда в этих условиях синаптическими мембранами контрольных животных показало, что связывание как [³H]мор-

фина, так и $[^3\text{H}]$ налоксона с синаптическими мембранами ствола головного мозга крыс является специфическим и насыщаемым (рис. 2, а; 3, а). Добавление в среду инкубации помеченных лигандов в концентрации 10^{-6} М через 30 мин после меченых лигандов с последующей инкубацией в течение 20 мин уменьшало количество специфически связанного $[^3\text{H}]$ морфина и $[^3\text{H}]$ налоксона до уровня.

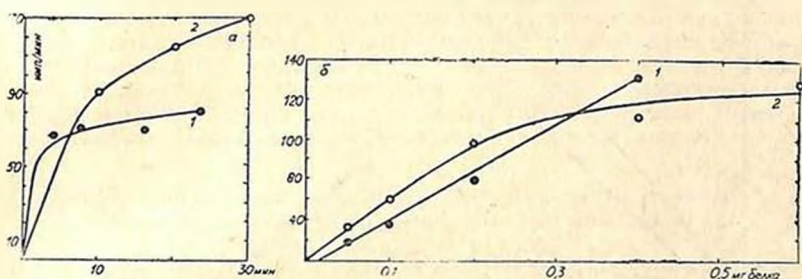


Рис. 1. Специфическое связывание $[^3\text{H}]$ морфина и $[^3\text{H}]$ налоксона с синаптическими мембранами ствола головного мозга крыс (1— $[^3\text{H}]$ морфин, 2— $[^3\text{H}]$ налоксон); а—при инкубации в течение 20 мин $1,37 \text{ нМ/л}$ $[^3\text{H}]$ морфина и $0,05 \text{ нМ/л}$ $[^3\text{H}]$ налоксона с различными концентрациями белка синаптических мембран; б—при различных сроках инкубации 100 мкг белка с $1,37 \text{ нМ/л}$ $[^3\text{H}]$ морфина и $0,05 \text{ нМ/л}$ $[^3\text{H}]$ налоксона.

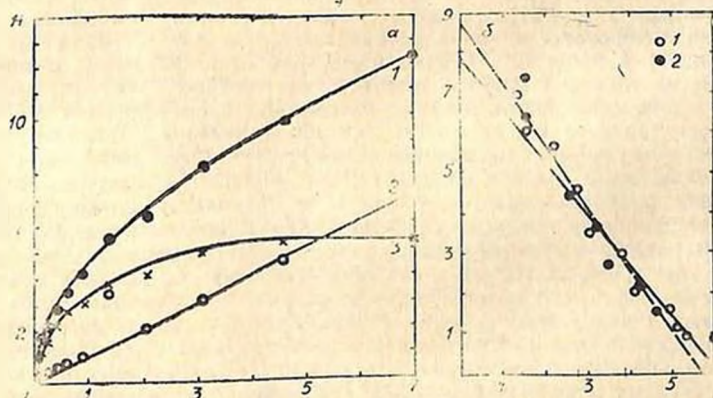


Рис. 2. Специфическое связывание $[^3\text{H}]$ морфина (в диапазоне концентраций от $0,19$ до $6,92 \text{ нМ/л}$) с синаптическими мембранами ствола головного мозга крыс (каждая точка—среднее из 5–6 экспериментов): а—график кинетики насыщения (1—общее связывание, 2—неспецифическое связывание, 3—специфическое связывание); б—специфическое связывание в координатах Скэтчарда (1—контрольных крыс, 2—после лишения пикаротоксиновой фазы сна)

соответствующего неспецифическому связыванию, наблюдаемому при одновременном внесении меченого и немеченого лиганда. Это свидетельствует о том, что связывание этих лигандов с опиатными рецепторами синаптических мембран является обратимым.

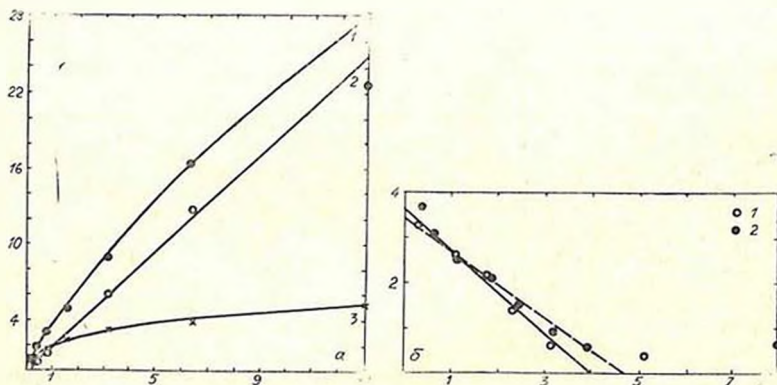


Рис. 3. Специфическое связывание $[^3\text{H}]$ налоксона (в диапазоне концентраций от 0,1 до 12,8 нМ/л) с синаптическими мембранами ствола головного мозга крыс (каждая точка—среднее из 4 экспериментов): а—график кинетики насыщения (1—общее связывание, 2—неспецифическое связывание, 3—специфическое связывание). б—специфическое связывание в координатах Скэтчарда (1—контрольных крыс, 2— после лишения парадоксальной фазы сна)

Результаты опытов по исследованию специфического связывания $[^3\text{H}]$ морфина и $[^3\text{H}]$ налоксона с синаптическими мембранами были проанализированы в координатах Скэтчарда (рис. 2, б; 3, б). Прямолинейный характер графика Скэтчарда свидетельствует о гомогенности центров связывания синаптических мембран как для агониста, так и для антагониста, а также о связывании $[^3\text{H}]$ морфина и $[^3\text{H}]$ налоксона лишь с одним типом центров связывания. Эта закономерность сохраняется у животных и после 24-часовой депривации ПФС. В то же время, в исследованиях, выполненных на тотальной мембранной фракции мозга, часто получали криволинейный характер графика Скэтчарда, указывающий на наличие двух центров связывания $[^3\text{H}]$ морфина и $[^3\text{H}]$ налоксона, что свидетельствует о гетерогенности этих центров [12—15]. По-видимому, это обусловлено присутствием мембран глиального происхождения, на которых могут быть опиатные рецепторы [16], отличающиеся по своим характеристикам от нейрональных и синаптических рецепторов. В пользу этого предположения говорит тот факт, что при исследовании кинетических характеристик опиатных рецепторов на препаратах исключительно нейронального происхождения (изолированные нейроны, синапсомы, синаптические мембраны), как правило, получают прямолинейный график Скэтчарда, подтверждающий гомогенность центров связывания опиатов на нейрональных мембранах и связывание этих лигандов лишь с одним типом рецепторов [17, 18].

Кинетические параметры связывания $[^3\text{H}]$ морфина и $[^3\text{H}]$ налоксона представлены в таблице и указывают на высокоаффинный харак-

тер связывания как [^3H]морфина ($K_d = 5,2 \pm 0,53$ нМ), так и [^3H]налоксона ($K_d = 0,98 \pm 0,08$ нМ) с рецепторами синаптических мембран, причем сродство рецепторов к налоксону оказалось значительно выше, чем к морфину. Но концентрация центров связывания агониста опиатных μ -рецепторов [^3H]морфина и антагониста этих рецепторов [^3H]налоксона в синаптических мембранах оказалась примерно одинаковой (таблица).

Лишение ПФС в течение 24 ч не вызывало заметных изменений ни числа мест связывания [^3H]морфина с синаптическими мембранами, ни сродства рецепторов к этому лиганду (таблица). В то же время депривация ПФС приводила к снижению общей концентрации центров связывания антагониста—[^3H]налоксона, хотя сродство опиатных рецепторов к этому лиганду при этом достоверно не изменялось (таблица). Поскольку было показано, что полное лишение крыс

Таблица

Кинетические характеристики связывания [^3H]морфина и [^3H]налоксона с синаптическими мембранами ствола головного мозга крыс в норме и при лишении их ПФС

Условия эксперимента	Количество экспериментов	B_{max} (фмоль/мг белка)	K_d (нМ)
Контроль 24 ч лишения ПФС	5	[^3H] морфин $4,90 \pm 0,21$	$5,20 \pm 0,53$
	6	$4,60 \pm 0,39$	$4,70 \pm 0,57$
Контроль 24 ч лишения ПФС	4	[^3H] налоксон $3,60 \pm 0,24$	$0,94 \pm 0,10$
	4	$2,67 \pm 0,69$ (—26%) $p < 0,05$	$0,75 \pm 0,10$ (—20%) $p > 0,05$

сна в течение 24 ч в цилиндрическом титре также не вызывало изменений сродства к [^3H]налоксону рецепторов и в тотальной мембранной фракции мозга [19], можно думать, что длительные нарушения сна способны изменить экспрессию опиатных μ -рецепторов, но не их сродство к лиганду.

Ранее нами было высказано предположение, что в механизмах развития нарушений функций ЦНС при длительной депривации сна определенную роль играют изменения состояния опиоидной системы мозга, о чем свидетельствовали сдвиги в содержании Met-энкефалина [20] и β -эндорфина [21]. Полученные в данной работе результаты подтверждают это предположение и указывают на то, что в реакции опиоидной системы мозга на депривацию сна в какой-то мере участвует также и структурно-функциональная перестройка опиатных рецепторов, локализованных в синаптических мембранах.

THE EFFECT OF REM-SLEEP DEPRIVATION ON BINDING OF [^3H]MORPHINE AND [^3H]NALOXONE WITH SYNAPTIC MEMBRANES IN RAT BRAIN

TARANOVA N. P., MALIKOV U. M.

J. P. Pavlov Institute of Physiology, USSR Academy of Sciences, Leningrad

The specific binding of [^3H] morphine and [^3H] naloxone with synaptic membranes of the rat brain has been studied in the norm and after

REM-sleep deprivation. According to results obtained the opiate receptors of the synaptic membranes have only one high-affinity binding site for [3 H]morphine and [3 H]naloxone. After 24-hour REM-sleep deprivation the number of [3 H]morphine binding sites and its affinity as well as the affinity of the [3 H]naloxone binding sites were not altered. At the same time the number of [3 H]naloxone binding sites was shown to increase. These effects appear to originate by structural-functional reorganization of synaptic membranes during REM-sleep deprivation.

ЛИТЕРАТУРА

1. Демин Н. Н., Коган А. Б., Моисеева Н. Н. Нейрофизиология и нейрохимия сна, Л., Наука, 1978.
2. Демин Н. Н. Нейрохимия, т. 1, № 1, с. 720—727, 1982.
3. Таранова Н. П., Пилова Н. С. Физиол. журн. СССР, т. 72, № 8, с. 1065—1068, 1983.
4. Wesemann W., Welner N., Rotsch M., Schulz E. J. J. Neural Transmission, suppl 18, p. 287—294, 1983.
5. Mogilnicka E. Pharm. Biochem. Behav., v. 15, p. 149—151, 1981.
6. Zwicker A. P., Callil H. M. Pharm. Biochem. Behav., v. 24, p. 809—812, 1986.
7. Wilson L., Dorosz L. Med. Hypotheses, v. 14, p. 269—280, 1984.
8. Pert C. B., Snowman A. M., Snyder S. H. Brain Res., v. 70, p. 184—188, 1974.
9. Miller G. Z. Anal. Chem., v. 31, № 5, p. 964, 1959.
10. Bennet J. P. Neurotransmitter receptor binding, N. Y., Raven Press, 1978.
11. Варфоломеев С. Д., Зайцев С. В. Кинетические методы в биохимических исследованиях, М., МГУ, 1982.
12. Scics M., Benyhe S., Borsodi A., Woltemann M., Jancso G., Szecsi J., Medzihradsky K. Life Sci., v. 32, p. 2777—2784, 1983.
13. Зайцев С. В., Курочкин И. Н., Сергеева М. Г., Варфоломеев С. Д. Биохимия, т. 49, вып. 7, с. 1127—1133, 1984.
14. Blorton P. A., Broadhurst A. M., Wood M. D., Willie M. G. J. Receptor Res., v. 6, № 1, p. 85—93, 1986.
15. Балашов А. М., Петриченко О. Б., Алябьева Т. Н., Панченко Л. Ф. Биохимия, т. 53, вып. 9, с. 1527—1531, 1988.
16. Абутидзе К. Д., Соломония Р. О., Микеладзе Д. Г. Нейрохимия, т. 6, № 3, с. 418—421, 1987.
17. Rogers N. F., El-Fakahany E. E. Eur. J. Pharmacol., v. 124, p. 221—230, 1986.
18. Pollack A. E., Wooten G. F. Life Sci., v. 41, p. 385—390, 1987.
19. Wirz-Justice A., Tobler I., Kafka M. S., Naber D., Marangos F. J., Borbély A. A., Wehr T. A. Psychiatry Res., v. 5, p. 67—76, 1981.
20. Таранова Н. П., Глущенко Т. С., Маликов У. М. Тезисы 10 Всесоюз. конф. «Фундаментальные достижения нейрохимии—медицине», с. 86—87, Горький, 1987.
21. Przewlocka B., Mogilnicka E., Lason W., Lnytelaaar E. L. J. M., Coenen A. M. L. Neurosci. Lett., v. 70, № 1, p. 138—142, 1986.

Поступила 22.XII.1989