



КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.7+577.3+615.833

ИЗУЧЕНИЕ ОПИАТНОЙ РЕЦЕПТОРНОЙ СИСТЕМЫ В
ОБОГАЩЕННЫХ ФРАКЦИЯХ ГЛИИ И НЕЙРОНОВ

АБУТИДЗЕ К. Д., СОЛОМОНΙΑ Р. О., МИКЕЛАДЗЕ Д. Г.

Институт физиологии АН ГССР им. Н. С. Бериташвили, Тбилиси

В настоящее время при исследовании нервной ткани местом действия гормонов и многих гормональных веществ считают глиальные клетки [1]. Глиальные клетки *in vivo* и в культуре в значительной мере определяют развитие нейронов, влияют на их дифференциацию [2]. Имеется множество данных, свидетельствующих о присутствии рецепторных систем нейротрансмиттеров на глиальных клетках. В астроглии, выделенной из мозга быка [3], крыс [4], а также в культуре глиальных клеток [5] были обнаружены холинорецепторы мускаринового типа. Кроме того, в глиальных клетках головного мозга крыс был найден α -адренергический рецептор [6]. На основании ряда экспериментов было установлено, что важная роль в осуществлении нейронально-глиального взаимодействия принадлежит аденилатциклазной системе, сопряженной с β -адренергическим рецептором [7].

Наши исследования были направлены на изучение системы опиатных рецепторов головного мозга крыс. Как известно, опиоидным пептидам и соответствующим рецепторным системам отводится одно из ведущих мест в механизме анальгезии, интенсификации и стимуляции памяти, в возникновении эйфорических состояний, в эффектах консолидации и расслаблении воли [8]. Еще в 1969 г. Ройтбаком было высказано предположение, что нейроглия является мишенью для действия морфина и других анальгетиков, а также принимает участие в механизме возникновения болевых ощущений [9]. Целью настоящей работы явилось изучение системы опиатных рецепторов в нейрональных и глиальных клетках, выделенных из мозга крыс.

В опытах были использованы белые крысы массой 120—150 г. Выделение обогащенных фракций глии и нейронов осуществляли по методу Blomstrand, Hamberger [10] с некоторыми модификациями. Головной мозг крыс (без мозжечка) после механического размельчения в буфере, содержащем 20%-ный фикола, 20 мМ HEPES (рН 7,4) про-

пускали через сита с размерами пор 500, 100, 75, 50 микрон. Затем суспензию насаивали на линейный градиент фикола-сахарозы (10%-, 20%-, 30%-ный фикола, 2 М сахароза) и центрифугировали при 50000g в течение 90 мин. По данным световой микроскопии, обогащенная фракция глальных клеток концентрировалась на границе фаз 10—20% фикола, в то время как фракция нейронов находилась на границе фаз 30%-ного фикола—2 М сахарозы. Фракции глии и нейронов отмывали от высокой концентрации фикола и сахарозы 2-кратным центрифугированием в течение 40 мин при 50000g в буфере, содержащем 50 мМ HEPES (pH 7.4): 1 мМ л-метилсульфонилфторид (PMSF), 1 мМ ЭДТА. В зависимости от цели опыта использовали клеточную суспензию или гомогенат клеток в вышеуказанном буфере. Количество опиятных рецепторов определяли по разнице между общим и неспецифическим связыванием [^3H]налоксона с мембранами (43 К_д/мМ СЕА). Пробы в объеме 1 мл содержали 50 мМ HEPES (pH 7.4), 10 нМ [^3H]налоксона и приблизительно 1 мг белка. Для определения неспецифического связывания в пробы добавляли немеченый налоксон в концентрации 10 мМ. Инкубация продолжалась 60 мин при 4°. Пробы фильтровали на GF/B фильтрах и просчитывали на жидкостно-сцинтилляционном спектрометре (.Intertechnique" SL—4000, Франция). Белок определяли по Bradford [11]. Подтипы опиятных рецепторов определяли с помощью специфических лигандов: леворфанола—агониста μ -рецептора, D-Ala-Leu-энкефалина (DALA)—агониста δ -рецептора [12].

Для изучения вопроса взаимодействия лигандов с нервными клетками была определена временная зависимость специфического связывания. Из рисунка (а) видно, что продолжительная инкубация нейронов (до 60 мин) при 37° не приводила к повышению удельной радиоактивности в пересчете на мг белка. Максимального связывания [^3H]налоксона достигали при инкубации в течение 30 мин, и дальнейшее продолжение инкубирования не приводило к повышению включения. В отличие от этого связывание [^3H]налоксона с нейронами, инкубированными при 4°, постепенно возрастало и достигало максимума на 60-й мин. Следует отметить, что удельная радиоактивность при инкубации в течение 60 мин при 4° превышает связывание [^3H]налоксона с нейронами, инкубированными при 37°, почти в два раза. Это может свидетельствовать о том, что продолжительная инкубация нейронов при 37° приводит к деструкции белков рецепторного комплекса и изменению его надмолекулярной организации, в результате чего происходит переориентация мембранных белков и их частичная инактивация. Интересно отметить, что подобные температурные изменения не происходят в глальных клетках, что указывает на иную организацию глальных рецепторов. Кроме того, равновесие между свободным лигандом и лиганд-рецепторным комплексом в глальных клетках достигается быстрее, чем в нейронах, что свидетельствует о неидентичности организации опиятных рецепторов в этих клетках (рис. б).

Изучение распределения опиатных рецепторов выявило наличие в обогащенных фракциях глии μ -рецепторов, на долю которых приходилось 73—75% связывания от всего меченого [^3H]налоксона, тогда как содержание κ -рецепторов составляло 23—25%. В нейрональной фракции количество μ -рецепторов было равно 48—50%, а κ -рецепторов 46—48%. Использование специфического лиганда DALA выявило практически полное отсутствие δ -рецепторов. Так как в процессе получения клеточной фракции из-за механического разрушения полностью теряются отростки клеток, можно предположить, что этот подтип опиатных рецепторов локализован на мембранах нервных окончаний.

В экспериментах по связыванию при различных концентрациях меченого налоксона (0,5—20 нМ) в координатах Скэтчарда была получена двуфазная кривая. Этот факт объясняется присутствием двух мест связывания с низкой и высокой степенью сродства.

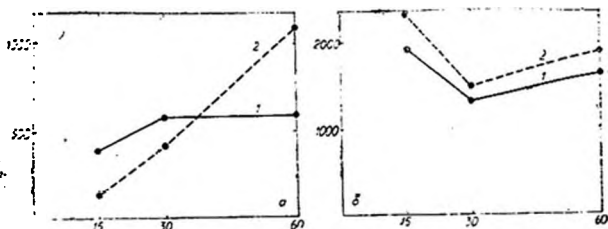


Рис. Распределение связывания [^3H]налоксона в нейрональной (а) и глиальной (б) фракциях: 1—при 37°, 2—при 4°

Кинетические константы для глии в случае рецептора с высоким сродством к лиганду равны $B_{\text{max}}=47$ фмоль/мг, $K_d=0,57$ нМ. Во фракции нейронов соответствующие константы равны $B_{\text{max}}=43$ фмоль/мг, $K_d=0,63$ нМ. Таким образом, полученные нами данные указывают на наличие высокоспецифической системы опиатных рецепторов как в нейрональных, так и в глиальных клетках.

Обнаружение опиатной системы рецепторов в глиальных клетках указывает на возможность участия глиальной системы в процессах, опосредованных опиоидными пептидами, и может служить отправной точкой для дальнейшего изучения их функционального значения. В настоящее время предполагается, что опиатные рецепторы сопряжены с GTP-связывающим Gi-белком, подавляющим активность аденилатциклазы [13]. Поскольку метаболическая активность глиальных клеток зависит от внутриклеточного уровня cAMP, ингибирование аденилатциклазы этих клеток может привести к определенным биохимическим сдвигам. Из 300 фосфорилирующихся в глиальных клетках белков 7 являются чувствительными к колебаниям cAMP [14]. Эти белки расположены в плазматических мембранах, цитоплазме, митохондриях и ядре и их

cAMP-зависимое фосфорилирование может играть ключевую роль в метаболизме глияльных клеток.

Таким образом, вышеприведенные данные показывают, что глияльные клетки содержат в большом количестве опиатные рецепторы. Эти рецепторы проявляют максимальную связывающую активность к лигандам μ - и κ -типов. Временная и температурная зависимость связывания [^3H]налоксона указывает на различные свойства опиатных рецепторов в глияльных и нейрональных клетках.

Авторы выражают благодарность член-корр. АН ГССР, проф. А. И. Ройтбаку за предложенную тему и ценные указания, а также проф. И. К. Сванидзе за консультации и обсуждение в проведении морфологических экспериментов.

STUDY OF OPIOID RECEPTOR SYSTEM IN ENRICHED GLIAL & NEURONAL FRACTIONS

ABUTIDZE K. D., SOLOMONIA R. O., MIKELADZE D. G.

I. S. Beritashvili Institute of Physiology, Georgian Academy of Sciences, Tbilisi, USSR

A high number of opioid receptors is present in glial cells. These receptors reveal specific binding activity for ligands of μ - and κ types. Temporary and temperature $^3\text{H}^+$ -naloxone binding-dependence shows different properties of opioid receptors in glial and neuronal cells.

ЛИТЕРАТУРА

1. Henn F. A., Oderfeld-Nowak B., Roskoski R. *Neurosci. Abstr.*, v. 5, № 1, p. 590, 1979.
2. Sensenbrenner M., Mandel P. *Exp. Cell. Res.*, v. 87, № 1, p. 159—167, 1974.
3. Hurko O. *Arch. Biochem. and Biophys.*, v. 190, № 2, p. 434—440, 1978.
4. Kayaalp S. O., Neff N. H. *Brain Res.*, v. 196, № 2, p. 429—436, 1980.
5. Repke H., Maderpack K. *Brain Res.*, v. 232, № 1, p. 205—212, 1982.
6. Levitzki A. *Cellular Receptors for Hormones and Neurotransmitters* J., N. Y., Wiley & Sons, Chichester, 1980.
7. Maderpack K., Fajszl C. *Develop. Brain Res.*, v. 252, № 3, p. 251—257, 1983.
8. Simon E. J. *Handbook of Neurochemistry* (ed. A. Lajtha), chapter 12, p. 331—352, N. Y., Plenum Press, 1984.
9. Rottbak A. I. *Acta Biol. Exp.*, v. 29, № 1, p. 125—134, 1969.
10. Blomstrand C., Hamberger A. J. *J. Neurochem.*, v. 16, № 1, p. 1401—1407, 1969.
11. Bradford M. M. *Anal. Biochem.*, v. 72, № 1, p. 243—254, 1976.
12. Simon J., Benyhe S., Abutidze K., Borsodi A., Szucs M., Toth G., Wollemann M. *J. Neurochem.*, v. 46, № 3, p. 695—701, 1986.
13. Enomoto, Asakawa T. *FEBS Lett.*, v. 7, № 2, p. 233—239, 1984.
14. Ehrlich Y. H. *Handbook of Neurochemistry* (ed. A. Lajtha), chapter 20, p. 541—574, N. Y., Plenum Press, 1984.

Поступила 5. I 1987