

С.К. Судаков¹, Т.В. Проскуракова², В.А.Шохонова², В.Г.Башкатова¹
ВОЗДЕЙСТВИЕ НА ПЕРИФЕРИЧЕСКИЕ МЮ-ОПИОИДНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ
ИЗМЕНЯЕТ АКТИВНОСТЬ ЭТИХ РЕЦЕПТОРОВ В МОЗГЕ КРЫС

¹ФБГНУ НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАМН, Москва,

²ФБГУ «Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии»
им. В.П. Сербского» Минздрава РФ, Москва

Резюме. Целью работы было исследование характеристик центральных мю-опиоидных рецепторов, при периферическом введении не проникающих через гематоэнцефалический барьер лигандов этих рецепторов. Изучение связывающей активности мю-опиоидных рецепторов проводили методом радиолигандного анализа. В результате работы было выявлено разнонаправленное воздействие лоперамида и налоксона метиодида на плотность мю-опиоидных рецепторов во фронтальной коре мозга крыс. Полученные данные подтверждают выдвинутую ранее гипотезу о реципрокном взаимодействии центрального и периферического звеньев эндогенной опиоидной системы.

Ключевые слова: центральные и периферические мю-опиоидные рецепторы, радиолигандное связывание; налоксон метиоди; лоперамид, гематоэнцефалический барьер.

Актуальность. К настоящему времени известно, что эндогенная опиоидная система мозга является одной из важнейших систем регуляции гомеостаза. Она играет важную роль в механизмах различных физиологических процессах, в том числе таких, как болевая чувствительность, эмоциональный стресс, пищевое поведение, процессы терморегуляции и другие [Gein, 2014; Ide et al., 2010; Morley et al., 1983; Rance et al. 2013;]. Эндогенная опиоидная система состоит из центрального и периферического отделов, разделенных гематоэнцефалическим барьером (ГЭБ). Установлено, что структура опиоидных рецепторов и эндогенных опиоидных пептидов в ЦНС и на периферии одинакова, однако центральные и периферические функции эндогенной опиоидной системы различны, что достигается непроницаемостью ГЭБ для большинства опиоидных пептидов [Egleton et al., 1998]. В связи с этим, центральные и периферические функции эндогенной опиоидной системы исследуются раздельно. В наших недавних экспериментах показано, что центральное и периферическое звенья эндогенной опиоидной системы функционируют как единое целое, взаимодействуя между собой на принципе реципрокности. Это положение базируется на разнонаправленном действии агонистов и антагонистов мю-опиоидных рецепторов, не проникающих через ГЭБ, на болевую чувствительность, пищевое поведение и на центральные механизмы опиатной зависимости [Судаков и др., 2009; Судаков и др., 2010; Chumakova et al, 2011]. Однако, нейрохимические механизмы этих эффектов остаются до сих пор неясными. Целью работы явилось изучение характеристик центральных мю-опиоидных рецепторов при периферическом введении лигандов этих рецепторов, не проникающих через ГЭБ.

Материал и методы исследования. Работа была выполнена на 24 крысах самцах линии Вистар с начальной массой 140-180 г. Эксперименты проводились в соответствии с требованиями приказа № 267 МЗ РФ (19.06.2003 г.), а также в

соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (ФБГНУ НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАМН, протокол №1 от 3.09.2005 г). Животные были разделены на три группы (по 8 животных в каждой группе). Первой группе животных внутрибрюшинно (в/б) вводили лоперамид (Sigma) в дозе 5мг/кг. Второй группе крыс в/б вводили налоксона метиодид (Sigma) в дозе 5мг/кг. Третьей группе животных в/б вводили эквивалентный объём 0,9% раствора хлорида натрия. Через 30 минут после введения вышеперечисленных веществ животных декапитировали, извлекали головной мозг, помещали его дорзальной поверхностью на чашку Петри во льду и проводили выделение структур мозга: среднего мозга и фронтальной коры.

С целью проведения радиолигандного анализа мю-рецепторов исследуемую структуру мозга гомогенизировали в 25 мл 50 мМ трис-НСl буфера рН 7,7 (40С) в гомогенизаторе типа Даунса. Полученную суспензию центрифугировали при 30000g 15 минут при 4°С. Надосадочную жидкость удаляли, осадок ресуспендировали в первоначальном объеме 50 мМ трис-НСl буфера рН 7,7 при 25°С. Затем суспензию в течение 40 минут инкубировали при 37°С, а затем вновь центрифугировали. Полученный осадок ресуспендировали в 25 мл 50 мМ трис-НСl буфера рН 7,7 при 25°С.

В надосадочной жидкости проводили изучение связывающей активности μ -опиоидных рецепторов методом радиорецепторного анализа, используя в качестве лиганда μ -опиоидных рецепторов [³H]-ДАГО (Amersham, Великобритания). Одновременно в супенантанте производили определение белка по методу Лоури с использованием предварительной обработки суспензии мембран дезоксихолатом натрия.

Для определения связывающей активности μ -опиоидных рецепторов была взята реакционная смесь общим объемом 0,5 мл, которая содержала 50 мкл раствора бацитрацина в конечной концентрации 50 мкг/мл; 50 мкл меченого лиганда; 150 мкл мембранной суспензии белка, конечная концентрация которого составляла от 0,6-0,8 мг/мл и 300 мкл 50 мМ трис-НСl буфера рН 7,4. Если реакционная смесь помимо 50 мкл меченого лиганда содержала 50 мкл немеченого лиганда, то объём 50 мМ трис-НСl буфера рН 7,4 составлял 250 мкл. Реакцию связывания проводили в течение 1 часа при 25°С при интенсивном перемешивании.

Специфическое взаимодействие меченого тритием ДАГО с μ -опиоидных рецепторов определяли как разницу количества связанной с мембранами радиоактивности при общем связывании (в отсутствии немеченого ДАГО) и при неспецифическом связывании (в присутствии 1000-кратного избытка немеченого ДАГО).

Реакцию останавливали быстрой фильтрацией проб через стекловолокнистые фильтры GF/B (Whatman, Великобритания) с использованием аппарата фирмы Millipore (Франция). Фильтры промывали 6 мл трис-НСl буфера рН 7,4, подсушивали на воздухе и помещали во флаконы для сцинтилляционного счета, а затем заливали

7мл стандартного диоксанового сцинтиллятора. Исследуемые показатели подсчитывали на сцинтилляционном спектрометре RackBeta 1219 (ЛКВ, Швеция) с эффективностью счета не ниже 30%.

В качестве критериев связывающей способности рецепторов использовали K_d (константу диссоциации) – величину, обратную сродству рецепторов к лиганду, и B_{max} , которое отражает число мест связывания лиганда.

Математическую обработку результатов радиорецепторного анализа проводили с помощью программы LIGAND. Статистическую обработку результатов проводили с использованием рангового теста Вилкоксона.

Полученные результаты и их обсуждение. Полученные данные представлены в таблице 1. В результате исследования установлено, что однократное введение агониста мю-опиоидных рецепторов лоперамида приводило к достоверному снижению числа рецепторов этого подтипа в среднем мозге и фронтальной коре (табл.1). В то же время при однократном введении антагониста этих рецепторов налоксона метиодида число мю-опиоидных рецепторов достоверно увеличивалось во фронтальной коре (табл.1). Следует отметить, что сродство рецепторов к лиганду ни при введении лоперамида, ни при введении налоксона метиодида не изменялось.

Таблица.

Влияние периферического введения лигандов мю-опиоидных рецепторов на характеристики радиоландного связывания в среднем мозге и фронтальной коре.

Группы исследования	Средний мозг		Фронтальная кора	
	K_d (нмоль)	B_{max} фмоль/мг/белка	K_d (нмоль)	B_{max} фмоль/мг/белка
Контроль (NaCl)	$7,2 \pm 1,9$	162 ± 42	$5,0 \pm 1,3$	272 ± 53
Лоперамид	$4,2 \pm 0,7$	$51 \pm 18^*$	$3,7 \pm 0,4$	$107 \pm 39^*$
Налоксона метиодид	$3,9 \pm 0,8$	180 ± 63	$6,1 \pm 1,1$	$421 \pm 90^*$

* - $p < 0,05$ по сравнению с крысами контрольной группы.

Выводы. Таким образом, полученные данные в очередной раз подтверждают гипотезу реципрокного взаимодействия центрального и периферического звена эндогенной опиоидной системы [Судаков & Тригуб, 2008]. Подавление активности периферического отдела антагонистом этой системы налоксона метиодидом вызывало увеличение плотности мю-опиоидных рецепторов в коре мозга, что по-видимому, и обуславливало наблюдаемый нами ранее анальгетический эффект [Судаков и др., 2009]. Полученные данные позволяют предположить, что активация периферических опиоидных рецепторов лоперамидом приводит к подавлению активности центрального звена, по видимому в основном за счет существенного снижения плотности опиоидных рецепторов в коре мозга. Таким образом, в данном исследовании впервые показано разнонаправленное воздействие периферического введения лоперамида и налоксона метиодид на подсистему мю опиоидных рецепторов коры мозга крыс, проявляющееся в изменении плотности рецепторов B_{max} в указанной структуре.

Литература.

- 1.Судаков С.К., Тригуб М.М. Гипотеза реципрокного взаимодействия центрального и периферического звеньев эндогенной опиоидной системы. //Бюлл. эксперим. биол. и медицины. 2008. Т. 146. № 12. С. 604-607.
- 2.Судаков С.К., Тригуб М.М., Башкатова В.Г. Воздействие на периферические опиоидные рецепторы изменяет морфиновую анальгезию, зависимость и толерантность. //Наркология. 2009. № 11. С. 38-42.
3. Судаков С.К., Башкатова В.Г., Колпаков А.А., Тригуб М.М. Периферическое введение лоперамида и метилналлоксона подавляет тревожность у крыс/ //Бюл. экспер. биол. мед. 2010. Т. 149. № 3. С. 244-246.
- 4.Chumakova Y.A., Bashkatova V.G., Sudakov S.K. Changes in feeding behavior after peripheral loperamide administration in rats // Bull Exp Biol Med. 2011. Vol. 150. № 4. P. 398-400.
- 5.Egleton R.D., Abbruscato T.J., Thomas S.A., Davis T.P. Transport of opioid peptides into the central nervous system. //J. Pharm. Sci. 1998. Vol. 87. № 11. P. 1433-1439.
- 6.Gein S.V. Dynorphins in regulation of immune system functions. //Biochemistry (Mosc). 2014. Vol. 79. № 5. P. 397-405
7. Ide S., Sora I., Ikeda K., Minami M., Uhl G.R., Ishihara K. Reduced emotional and corticosterone responses to stress in mu-opioid receptor knockout mice. //Neuropharmacology. 2010. Vol. 58. № 1. P. 241-247.
8. Morley J.E., Levine A.S., Yim G.K., Lowy M.T. Opioid modulation of appetite. //Neurosci Biobehav Rev. 1983. Vol. 7. № 2. P. 281-305.
- 9.Rance N.E., Dacks P.A., Mittelman-Smith M.A., Romanovsky A.A., Krajewski-Hall S.J.Modulation of body temperature and LH secretion by hypothalamic KNDy (kisspeptin, neurokinin B and dynorphin) neurons: a novel hypothesis on the mechanism of hot flushes. //Front Neuroendocrinol. 2013. Vol. 34. № 3. P. 211-227.

Abstract.

**Sudakov S.K. ¹, Proskuryakova T.V. ², Shokhonova V.A. ², Bashkatova V.G. ¹
AN INFLUENCE ON THE PERIPHERAL M-OPIOID RECEPTORS ALTERS
THE ACTIVITY OF THESE RECEPTORS IN RAT BRAIN**

¹FSS P.K. Anokhin Research Institute of Normal Physiology, Moscow,

²FBGU V.P.Serb'sky "Federal Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology" the
Ministry of Health, Moscow

The aim was to study the characteristics of central mu-opioid receptors under peripheral administration of these ligands which does not penetrate the blood-brain barrier. The study of the binding activity of the mu-opioid receptor was determined by radioligand binding assay. The opposite effect of loperamide and naloxone methiodide on density of mu-opioid receptors in the frontal cortex of rats was detected. These findings support the hypothesis on reciprocal interactions between the central and peripheral components of the endogenous opioid system.

Keywords: central and peripheral mu-opioid receptors, radioligand binding assay, naloxone methiodide, loperamide, blood-brain barrier

Сведения об авторах. Башкатова Валентина Германовна – д.б.н., вед.н.с. ФБГНУ НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАМН, Москва, v.bashkatova@nphys.ru; Судаков Сергей Константинович – д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, директор ФБГНУ НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАМН, Москва, s-sudakov@nphys.ru; Проскурякова Татьяна Васильевна – д.б.н., вед.н.с. ФБГУ «Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии» им. В.П. Сербского» Минздрава РФ, Москва; Шохонина Вера Алексеевна – к.б.н., ст.н.с., ФБГУ «Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии» им. В.П. Сербского» Минздрава РФ, Москва