

О.В. Костюченко, О.В. Євстаф'єва

## Налоксонзалежні відповіді ідентифікованих нейронів виноградного слимака

*Исследовано влияние налоксона на импульсную активность идентифицированных нейронов виноградной улитки, обладающих ритмоводящими свойствами. Обнаружено, что реакции клеток на аппликацию налоксона (10 – 100 мкмоль/л) зависят от типа нейрона. Высказано предположение, что действие налоксона на нейроны осуществляется через специфические ионотропные опиоидные рецепторы, которые находятся под определенным контролем эндогенных опиоидов.*

### ВСТУП

Наявність у нервовій системі моллюсків ендогенних опіоїдів та опіоїдних рецепторів [4, 7, 10, 12], дозволяє говорити про те, що в нервовій тканині безхребетних існує ендогенна енкефалінергічна система, подібна до опіоїдної системи вищих тварин [11]. Відомо, що опіоїдні рецептори відіграють значну роль у поведінковій і нейрональній пластичності [8]. Пластичність нервової системи і такі важливі феномени, як навчання та пам'ять, пов'язані з повільними коливаннями мембранного потенціалу (МП), які лежать в основі пейсмеркерної активності нейронів. У зв'язку з цим метою нашої роботи було дослідити існування опіоїдних рецепторів на ідентифікованих нейронах виноградного слимака, що проявляють пейсмеркерну активність.

### МЕТОДИКА

Експерименти було проведено на ідентифікованих нейронах виноградного слимака *Helix pomatia*. Ізольоване навколوجلоткове кільце гангліїв фіксували вольфрамовими голками на дні експерименталь-

ної камери. Після видалення зовнішньої оболонки, підглотковий ганглії обробляли ферментом Pronasa E ("Sigma", США) при кімнатній температурі протягом 45 хв і промивали зовнішнім розчином Рінгера. Стандартний розчин Рінгера містив (ммоль/л): NaCl – 100, KCl – 4, CaCl<sub>2</sub> – 10, MgCl<sub>2</sub> – 4, тріс-НCl – 10 (рН 7,5). Для внутрішньоклітинного відведення біопотенціалів скляні мікроелектроди заповнювали 2,5 моль/л KCl. Опір мікроелектродів становив 10 – 30 МОм. Нейрони ППа1, ППа2 та ППа7 ідентифікували за даними Коваль та Кононенка [6]. Техніка ізоляції нейронів була наступною. Спочатку для точної ідентифікації нейронів реєстрували їх фонову електричну активність, а потім витягали мікроелектрод і перерізували конективу між правим парієтальним ганглієм (ППаГ), де розташовані клітини, і вісцеральним ганглієм (ВГ), куди спрямовані їхні головні відростки. Потім знову вводили мікроелектрод в одну з досліджуваних клітин і, безперервно реєструючи електричну активність, за допомогою мікроманіпулятора витягали клітину з ганглія з залишком аксодендритного дерева, розташованого в ППаГ.

© О.В. Костюченко, О.В. Євстаф'єва

Аплікацію налоксону здійснювали додаванням речовини на досліджувану клітину під тиском через мікропіпетку з діаметром отвору близько 50 мкм.

Експерименти проводили при 18 – 22°C.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В інтактному ганглії було досліджено 12 нейронів ППа1, 10 – ППа2 та 10 – ППа7; і в ізольованому стані – 9 нейронів ППа1, 7 – ППа2 та 5 – ППа7.

Нейрон ППа1 у більшості препаратів генерує пейсмейкероподібну пачкову активність. Електрична активність нейрона має екзогенне походження, тобто пов'язана з постійною активацією його пептидергічних входів нейропептидом, який секретується пресинаптичним інтернейроном [1, 5]. Короткочасна аплікація антагоніста опіоїдних рецепторів – налоксону (50 мкмоль/л) на інтактний нейрон ППа1 призводила до посилення типової пачкової активності, що виражалось у збільшенні частоти генерації пачок потенціалів дії (ПД) (рис. 1, а). Реакція клітини на антагоніст починалася в момент його апліка-

ції в експериментальну камеру і продовжувалася 5 – 10 хв до повного відмивання речовини зовнішнім розчином.

Для того, щоб виключити можливість безпосередньої взаємодії налоксону з нейропептидом, подальші експерименти було проведено на ізольованому нейроні ППа1. Після перерізання правої парієто-вісцеральної конективи та ізоляції нейрона з ганглія, МП клітини встановлювався на рівні  $-65 \dots -68$  мВ. Як видно з рис. 1, б, аплікація через мікропіпетку налоксону на ізольований нейрон ППа1 призводила до зміни МП на  $8 \text{ мВ} \pm 2 \text{ мВ}$  у бік деполіризації та тимчасового розвитку ПД. Перфузія налоксону через 5 – 7 хв від початку аплікації антагоніста в експериментальну камеру не викликала генерації ПД, а тільки змінювала значення МП у бік деполіризації. Подібні ефекти налоксону можуть бути зумовлені тим, що, зв'язуючись з опіоїдними рецепторами, він запобігає дії ендогенних опіоїдів, які, ймовірно, тонічно контролюють збудливість нейрона ППа1.

Для нейронів ППа2 і ППа7 типовою є ритмічна активність, що являє собою пос-

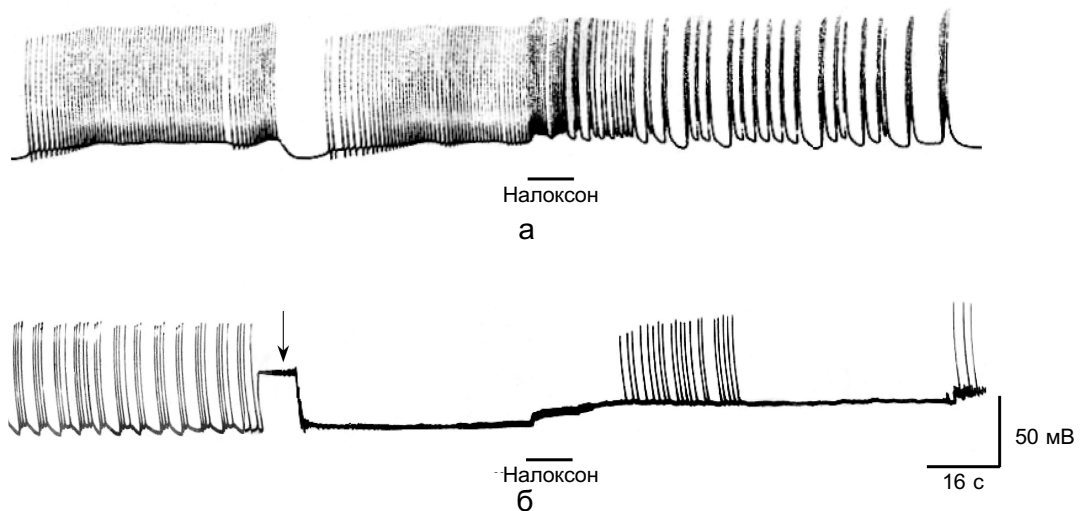


Рис. 1. Ефект аплікації налоксону на фонову активність нейрона ППа1: а – зміна імпульсної активності нейрона; б – електрична активність і мембранний потенціал нейрона до і після перерізання (позначено стрілкою) конективи між правим парієтальним і вісцеральним гангліями і при аплікації налоксону на ізольований нейрон ППа1.

лідовність поодиноких ПД з мономодальним розподілом міжімпульсних інтервалів. Показано [1], що активність нейронів ППа2 і ППа7 має пейсмеркерний характер, тобто вона ендogenous походження. Однак при одночасній реєстрації електричної активності нейронів ППа1, ППа2 та ППа7 спостерігали наступну картину [6]. Коли у нейрона ППа1 спонтанно виникало гальмування великої тривалості, а у нейрона ППа2 – збуджувально-гальмівний постсинаптичний потенціал, у нейрона ППа7 різко збільшувалася частота збуджувальних постсинаптичних потенціалів, що виникають, і спостерігався розряд генерації ПД. Таким чином, можна говорити, що пресинаптичний інтернейрон, секрет якого ініціює пачкову активність у неактивного нейрона ППа1, має аналогічний синаптичний вхід і на нейрони ППа2 та ППа7.

Вплив налоксону на нейрон ППа2 призводив до тимчасового різкого збільшення частоти генерації ПД (рис. 2). Як правило, ефект речовини виявлявся в середньому 30 – 60 с. У чотирьох (із усіх досліджених) випадках подібне посилення збудження нейрона змінювалося гальмуванням великої тривалості, а в іншому разі збільшувалася тривалість фази гіперполяризації між ПД. Через 15 – 20 хв після відмивання речовини спонтанна імпульсна активність нейрона поверталася до вихідного рівня.

У нейрона ППа7 прямих реакцій на налоксон не зареєстровано. Аплікація в експериментальну камеру налоксону в по-

рогових концентраціях (10 – 50 мкмоль/л) і більш високих (100 мкмоль/л) не змінювала значень МП і не впливала на параметри і частоту електричної активності нейрона ППа7 як в інтактному, так і в ізолюваному стані.

Можна припустити, що вибіркова дія антагоніста на збудливість нейронів залежить від їх функцій. Відомо [9] про селективний вплив опіоїдних пептидів і налоксону на збудливість і пластичність командних нейронів ЛПл1 і ППл1 виноградного слимака (ідентифікація за Сахаровом [3]), що беруть участь у захисній реакції скорочення головної частини тіла тварини.

Для досліджених ідентифікованих нейронів їхні функції не з'ясовано. Однак встановлено, що електрична активність нейронів моллюсків, що мають пейсмеркерні властивості, може змінюватися в часі і пов'язані вони з циркадними, місячними, сезонними ритмами [13]. З літературних даних [2] відомі функції нейрона R 15 аплізії, який є гомологічним до нейрона ППа1 виноградного слимака. В період розмноження посилюється виділення нейрогормона, який впливає на роботу серця, подих і водно-сольовий обмін. Можливо, що досліджені ідентифіковані нейрони мають подібні функції.

Отримані результати дозволяють припустити, що дія налоксону на нейрони ППа1 і ППа2 здійснюється через специфічні іонотропні опіоїдні рецептори, що знаходяться під гальмівним чи збуджувальним контролем ендogenous опіоїдів.

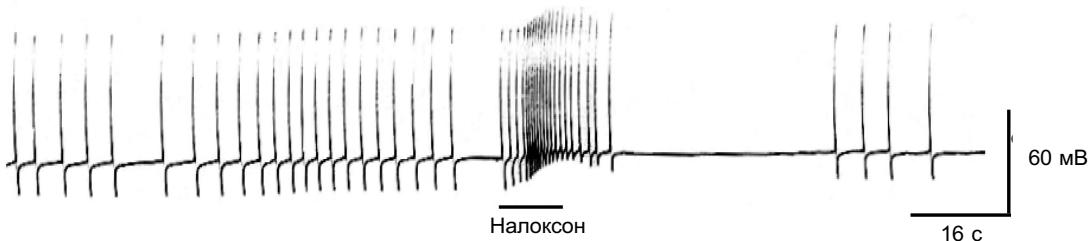


Рис. 2. Вплив налоксону (50 мкмоль/л) на спонтанну імпульсну активність нейрона ППа2 в інтактному ганглії.

## ВИСНОВКИ

1. Дія налоксону на досліджені нейрони призводила до зрушення значення МП у бік деполяризації та викликала зміну фоновної активності у нейронів ППа1 і ППа2.

2. Вплив налоксону на характер імпульсної активності ідентифікованих нейронів залежить від їх функцій.

Робота була виконана в лабораторії д.б.н. Н. І. Кононенка (Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАНУ, Київ), за що автори висловлюють щирю йому вдячність.

**O.V. Kostyuchenko, E.V. Evstafyeva**

### NALOXON-DEPENDENT RESPONSES OF IDENTIFIED SNAIL NEURONES

The effects of naloxone on rhythmic activity of the identified helix neurons possessing pacemaker properties were investigated. It has been found that the cellular responses on applications of naloxone (10 – 100 iM) depended on the type of a neuron. The effect of naloxone is likely to be mediated by the specific ionotropic opiate receptors which are under the control of endogenous opioids.

*S. I. Georgievskiy Crimean Medical University, Simferopol*

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кононенко Н.И., Костюченко О.В. Механизмы генерации ритмоводящей активности в идентифицированных нейронах виноградной улитки // *Нейрофизиология*. – 2001. – **33**, №1. – С. 46 – 54.
2. Кэндел Э. Клеточные основы поведения. – М.: Мир, 1980. – 598 с.
3. Сахаров Д.А. Генеалогия нейронов. – М.: Наука, 1974. – 184 с.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Leung M., Stefano G.B. Isolation of molluscan opioid peptides // *Life. Sci.* – 1983. – **33**, №1. – P. 77 – 80.
8. 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.
9. Nikitin V.P., Kozylev 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*. // *Russ. Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova* – 2002. – **88**(1). – P. 22 – 31.
10. 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.
11. Stefano G.B., Leung M. Purification of opioid peptides from molluscan ganglia // *Cell. Mol. Neurobiol.* – 1982. – **2**(4). – P. 347 – 352.
12. 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.
13. Strumwasser F. The demonstration and manipulation of a circadian rhythm in a single neuron. In: *Circadian Clocks*. – Amsterdam: North-Holland, 1965. – P. 442 – 462.

*Крим.мед.ун-т ім. С. І. Георгієвського*

*Матеріал надійшов до редакції 25.09.02*