



УДК 612.822.1:577.352.465

ВЛИЯНИЕ ОПИАТОВ НА ТРАНСПОРТ  $\text{Ca}^{2+}$  В СИНАПТОСОМЫ*Зайцев С. В., Породенко Н. В., Варфоломеев С. Д.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория  
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского*

Из процессов ионного транспорта в возбудимые клетки особый интерес представляет транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в терминали нейронов, так как он непосредственно связан с важнейшими функциями синапса, в частности с выбросом ряда медиаторов [1, 2]. Поэтому большое значение приобретает изучение влияния физиологически активных соединений на транспорт  $\text{Ca}^{2+}$ . Одним из наиболее изучаемых классов физиологически активных веществ являются опиаты — соединения группы морфина, оказывающие мощное анальгетическое действие. Имеющиеся сообщения о том, что опиаты снижают содержание кальция в нервных окончаниях [3], уменьшают  $\text{Ca}^{2+}$ -стимулируемый выброс медиатора [4] и что повышенные концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  «снимают» ингибирующие эффекты морфина [4, 5], позволяют предположить, что механизм действия опиатов на центральную нервную систему включает подавление ими транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в первые терминали. Настоящая работа посвящена изучению данного вопроса.

В качестве объекта исследования были выбраны изолированные нервные окончания — синаптосомы, полученные из головного мозга половозрелых крыс-самцов линии Вистар весом 150–200 г. Синаптосомы выделяли с использованием метода Хайоша [6], позволяющего получить фракции синаптосом с наименьшим содержанием примеси митохондрий. Полученные синаптосомы ресуспендировали в буфере А (5 мМ KCl, 140 мМ NaCl, 2 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 10 мМ глюкоза, 5 мМ HEPES, pH 7,4). Суспензии синаптосом далее преинкубировали при 37°С в течение 15 мин. Деполяризацию создавали, помещая преинкубированные в буфере А синаптосомы в буфер Б (70 мМ KCl, 75 мМ NaCl, 2 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 10 мМ глюкоза, 5 мМ HEPES, pH 7,4; 0,3 мг мембраносвязанного белка/мл), содержащий 0,1 мМ  $\text{CaCl}_2$  с изотопом  $^{45}\text{Ca}$  (0,5 мкКи/мл). Реакцию поглощения  $\text{Ca}^{2+}$  останавливали быстрым фильтрованием суспензии через мембранные фильтры Synpor № 6 (0,45 мкм, СССР) с последующей промывкой ледяным буфером А [7]. Включенный в синаптосомы  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  определяли на сцинтилляционном бета-счетежке ЛКВ. Морфин, налоксон (Endo Laboratories) и [*D*-Ala<sup>2</sup>, *D*-Leu<sup>5</sup>]энкефалин\* добавляли в суспензию синаптосом перед началом преинкубации. Все эксперименты проводили со свежеприготовленными препаратами синаптосом, у которых захват  $\text{Ca}^{2+}$  в буфере Б в 2,5–3 раза превышал захват в буфере А. Синаптосомы после выделения хранили при 0°С не более 3 ч.

Результаты изучения влияния морфина на кинетику  $\text{K}^+$ -стимулируемого транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в синаптосомы (рис. 1) позволяют сделать вывод, что морфин ингибирует  $\text{K}^+$ -стимулируемый транспорт  $\text{Ca}^{2+}$ . При этом ингибирующий эффект проявляется только при значительных временах протекания процесса (примерно 60 с — «медленная» фаза накопления  $\text{Ca}^{2+}$ ) и статистически незначим на его начальном этапе («быстрая» фаза накопления  $\text{Ca}^{2+}$ ). Ингибирующее действие морфина проявляется уже при его концентрации  $5 \cdot 10^{-8}$  М. Это позволяет предположить, что влияние агента опосредуется его комплексообразованием с высокоаффинными

\* [*D*-Ala<sup>2</sup>, *D*-Leu<sup>5</sup>]энкефалин был любезно предоставлен М. И. Титовым и Ж. Д. Беспаловой (Лаборатория синтеза пептидов ВКНЦ АМН СССР).

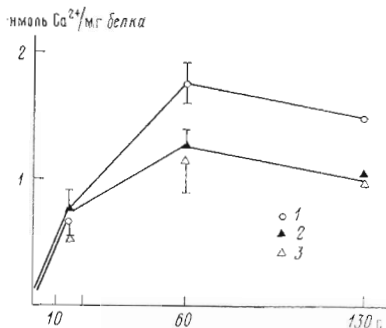


Рис. 1

Рис. 1. Включение  $\text{Ca}^{2+}$  в синапсомы в отсутствие (1) и в присутствии  $5 \cdot 10^{-8}$  (2) и  $10^{-5}$  М (3) морфина. Концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в среде инкубации 0,1 мМ ( $37^\circ\text{C}$ )

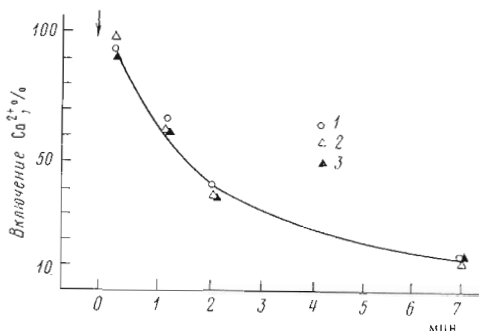


Рис. 2

Рис. 2. Выход  $\text{Ca}^{2+}$  из предварительно преинкубированных с 0,1 мМ  $\text{CaCl}_2$  синапсомом в отсутствие опиатов (1), в присутствии  $10^{-5}$  М морфина (2) и смеси  $10^{-6}$  М налоксона с  $10^{-5}$  морфином (3). Реакцию захвата  $\text{Ca}^{2+}$  синапсомы элиминировали добавлением 20-кратного избытка EGTA (указано стрелкой)

центрами связывания. Антагонист морфина налоксон не снимает эффект морфина на транспорт  $\text{Ca}^{2+}$ , подавляя этот транспорт в той же степени и при столь же низких концентрациях (см. таблицу). [ $D\text{-Ala}^2$ ,  $D\text{-Leu}^5$ ] энкефалин также ингибирует  $\text{K}^+$ -стимулируемый транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в синапсомы. Аналогичный результат был получен в работе [8] при исследовании  $\text{Leu}$ -энкефалина,  $\text{Met}$ -энкефалина и бета-эндорфина.

**Влияние опиатов на уровень  $\text{K}^+$ -стимулируемого захвата  $\text{Ca}^{2+}$  в синапсомы (нмоль  $\text{Ca}^{2+}$ /мг белка) при  $37^\circ\text{C}$  за 1 мин**  
Концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в среде инкубации 0,1 мМ

Контроль	Морфин		Налоксон		Морфин+налоксон	
	50 нМ	50 мкМ	50 нМ	50 мкМ	50 нМ	50 мкМ
2,78±0,06	2,09±0,32	2,05±0,15	2,01±0,07	2,38±0,31	2,05±0,03	1,96±0,25

Максимальный ингибирующий эффект опиатов проявляется на плато кинетической кривой накопления  $\text{Ca}^{2+}$ . Плато на кривой накопления обусловлено одновременным протеканием двух динамических процессов: транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в синапсомы и выхода  $\text{Ca}^{2+}$  из них. Представляло интерес выяснить, на какой из этих встречных процессов оказывает влияние морфин. С этой целью изучали выход  $\text{Ca}^{2+}$  из синапсом, предварительно преинкубированных с раствором, содержащим  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . Процесс захвата  $\text{Ca}^{2+}$  синапсомы элиминировали путем связывания  $\text{Ca}^{2+}$  в среде инкубации с 20-кратным избытком EGTA [9]. Из рис. 2 видно, что опиаты не влияют на процесс выхода  $\text{Ca}^{2+}$  из синапсом. Следовательно, можно предположить, что указанные агенты в основном действуют на «медленный»  $\text{K}^+$ -стимулируемый транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  из среды в синапсомы.

Таким образом, представленные в настоящем сообщении данные позволяют сделать следующие выводы. Во-первых, опиаты уменьшают  $\text{K}^+$ -стимулируемый захват  $\text{Ca}^{2+}$  синапсомы. При этом эффект ингибирования выражен явно за время порядка 1 мин и, по-видимому, связан со снижением скорости процесса «медленного» поступления  $\text{Ca}^{2+}$  в синапсомы. Во-вторых, налоксон не снимает эффект морфина на транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в синапсомы и сам действует аналогично морфину. Однонаправленный характер влияния и отсутствие антагонизма морфина и налоксона представляют особый интерес и требуют дальнейшего изучения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Karv B.* Нерв, мышца и синапс. М.: Наука, 1969, с. 119.
2. *Костюк П. Г., Крышаль О. А.* Механизмы электрической возбудимости нервной клетки. М.: Наука, 1981, с. 182.
3. *Yamamoto H., Harris R. A., Loh H. H., Way E. L.* J. Pharmacol. Exp. Ther., 1978, v. 205, № 2, p. 255–264.
4. *Göthert M., Wehking E.* Experientia, 1980, v. 36, № 2, p. 239–243.
5. *Harris R. A., Loh H. H., Way E. L.* J. Pharmacol. Exp. Ther., 1975, v. 195, № 3, p. 488–495.
6. *Hajos F.* Brain Res., 1975, v. 93, № 2, p. 485–489.
7. *Nachshen D. A., Blaustein M. P.* J. Gen. Physiol., 1980, v. 76, № 5, p. 709–728.
8. *Кравцов Г. М., Рязский Г. Г., Орлов С. Н.* В сб.: Перспективы биоорганической химии в создании новых лекарственных препаратов. Рига, 1982, с. 250.
9. *Blaunstein M. P., Ector C.* Biochim. et biophys. acta, 1976, v. 419, № 2, p. 295–308.

Поступило в редакцию  
29.XII.1982

## INFLUENCE OF OPIATES ON $\text{Ca}^{2+}$ TRANSPORT IN SYNAPTOSOMES

ZAITSEV S. V., PORODENKO N. V., VARFOLOMEEV S. D.

*A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic  
Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow*

Potassium-stimulated uptake of  $\text{Ca}^{2+}$  by nerve-ending fractions from rat brain (synaptosomes) is inhibited by morphine and [*D*-Ala<sup>2</sup>, *D*-Leu<sup>5</sup>]enkephaline. This effect develops significantly within 1 minute. The opiates do not affect the  $\text{Ca}^{2+}$  efflux from the synaptosomes. Naloxone, the opiate antagonist, does not reverse the effect of morphine on synaptosomal  $\text{Ca}^{2+}$  uptake, and in this respect itself acts similarly to morphine.

Технический редактор *Е. С. Кузьмишкина*

---

Сдано в набор 21.03.83 Подписано к печати 12.05.83 Т-07650 Формат бумаги 70×108<sup>1/4</sup>  
Высокая печать Усл. печ. л. 12,6+1 вкл. Усл. кр.-отт. 11,2 тыс. Уч.-изд. л. 13,7 Бум.л. 4,5  
Тираж 865 экз. Зак. 2617

---

Издательство «Наука», 103717, ГСП, Москва, К-62, Подсосенский пер., 21  
2-я типография издательства «Наука». 121099, Москва, Шубинский пер., 10