

ОПОЇДЕРГІЧНА РЕГУЛЯЦІЯ АКТИВНОСТІ P2X3-РЕЦЕПТОРІВ У НЕЙРОНАХ ДОРСАЛЬНИХ СПІНАЛЬНИХ ГАНГЛІЇВ

Надійшла 28.07.14

Традиційно вважається, що аналгетичний ефект опіоїдів зумовлений їх дією на механізми ЦНС. Останнім часом, проте, накопичуються докази того, що потужного знеболюючого ефекту можна досягти активацією опіоїдних рецепторів на периферії (особливо при запальних процесах). Ми вивчали впливи модуляції активності опіоїдних рецепторів у нейронах дорсальних спінальних гангліїв (ДСГ) шурів на P2X3-опосередковані струми та намагались окреслити можливі шляхи передачі внутрішньоклітинних сигналів між цими рецепторами. Іонні струми, викликані аплікацією α, β -Me-АТФ в нейронах ДСГ та опосередковані пуринергічними P2X3-рецепторами, оборотно інгібувались ендogenousним опіоїдним пептидом лейкенкефаліном (ЛЕК, 100 нМ) у середньому на 74 %. Селективний конкурентний антагоніст μ -опіоїдних рецепторів СТОР цілком усував ефект ЛЕК. Ми припустили, що в механізмі передачі внутрішньоклітинного сигналу між опіоїдними та P2X3-рецепторами задіяний шлях, опосередкований фосфоліпазою С (PLC), і ця гіпотеза отримала експериментальне підтвердження. Синтетичний активатор PLC викликав пригнічення P2X3-опосередкованих струмів, а інгібітор синтезу фосфатидилінозитол-4,5-дифосфату-2 (PIP₂) вортманін прискорював та посилював інгібуючий вплив ЛЕК на P2X3-струми. Таким чином, в основі інгібуючого впливу ЛЕК на P2X3-рецептори лежать активація PLC та гідроліз PIP₂.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: опіоїдні рецептори, лейкенкефалін, P2X3-рецептори, фосфоліпаза С, фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат.

ВСТУП

Результати численних досліджень свідчать про те, що на мембранах нейронів дорсальних спінальних гангліїв (ДСГ) із соматами малого та середнього діаметрів експресуються пуринергічні іонотропні рецептор-каналні комплекси як мінімум двох типів – P2X3 та P2X2/3 [1–4].

Активація цих рецепторів призводить до модуляції больової чутливості. Аплікація АТФ або інших агоністів P2X-рецепторів викликає больові поведінкові феномени у тварин, а також підвищує чутливість до ноцицептивної стимуляції у людини та тварин [2]. Селективний антагоніст P2X3-рецепторів А-317491 ефективно усуває гіпералгезію та алодинію в досліджах *in vivo* [5]. Водночас результати клінічних спостережень показали, що введення селективних антагоністів P2X3-рецепторів ефективно блокувало невротичний біль; блокувався також

біль, викликаний запаленням [4]. У мишей, нокаутних за P2X3-субодиницею, а також у шурів, яким вводили антисмислові олігонуклеотиди щодо мРНК даної субодиниці, чутливість до болю знижувалася внаслідок припинення або порушення експресії P2X3- та P2X2/3-рецепторів [2]. Згідно з результатами цих досліджень, як гомомерні (P2X3), так і гетеромерні (P2X2/3) P2X-рецептори широко залучені до больової сигналізації.

У ЦНС існують ціла низка спеціальних механізмів модуляції больових відчуттів. До їх числа входить і так звана опіоїдна аналгетична система. Діяльність такої системи базується на активації опіоїдних рецепторів трьох чітко визначених типів – μ , δ та κ [6]. Усі опіоїдні рецептори є метаботропними та лігандкерованими; вони спряжені з гетеротримерними G-білками, чутливими до кашлюково-го токсину (насамперед з G_i/G_o-білками). Активація цих рецепторів призводить до пригнічення активності аденілатциклази [7, 8]. Інгібування аденілатциклази внаслідок активації опіоїдних рецепторів морфіном забезпечує усунення потенціалізації TRPV1-

¹Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).
Ел. пошта: Kulyk@biph.kiev.ua (В. Б. Кулик).

опосередкованих струмів при запальних процесах. Згадані рецептори задіяні до генерації больових сигналів [9]. Наразі відомо, що активація опіоїдних рецепторів призводить до активації низки мембранних каналів, зокрема G-білок-активованих калієвих каналів внутрішнього випрямлення, кальційактивованих калієвих каналів, дендротоксинчутливих калієвих каналів та калієвих каналів М-типу. Як і інші члени родини G_i/G_o -спряжених рецепторів, опіоїдні рецептори всіх типів здатні пригнічувати активацію високопорогових потенціалактивованих кальцієвих каналів [10].

Традиційно вважається, що аналгетичний ефект опіоїдів зумовлений їх дією в межах ЦНС. Проте, як вже було вказано, відомо, що опіоїдні рецептори всіх основних типів експресуються в первинних сенсорних нейронах та їх периферичних терміналях [11]. Останнім часом накопичуються очевидні докази того, що потужний ефект знеболювання може бути досягнутий активацією опіоїдних рецепторів не тільки в мозкових структурах, але й на периферії, особливо при запальних процесах [1, 12, 13].

Ми вивчали вплив опіоїдних рецепторів на P2X3-опосередковані струми в нейронах ДСГ щурів та намагалися окреслити можливі шляхи передачі внутрішньоклітинних сигналів між цими рецепторами.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили на культивованих протягом 24 год нейронах ДСГ щурів із сомами діаметром 10–30 мкм. У дослідженнях використовували білих щурів лінії Вістар WAG/GSto віком вісім діб. Для виділення нейронів ДСГ тварину декапітували, спинномозковий канал розтинали та виділяли грудні і поперекові ДСГ. Виділені ганглії вміщували в чашку Петрі із зовнішньоклітинним розчином (надалі нормальний розчин) такого складу (у мілімолях на 1 л): NaCl – 130, KCl – 5, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 2, HEPES – 10 (рН доводили до 7.3, користуючись NaOH). Після цього ганглії переносили в камеру з розчином для ферментативної обробки. Цей розчин на основі середовища MEM уміщував 1.3 мг/мл колагенази (тип IV) та 4 мг/мл трипсину. Ганглії інкубували в термостаті протягом 30 хв при 34 °С, після чого відмивали при кімнатній температурі (20–22 °С) середовищем для культивування нейронів MEM із доданням 10 мМ HEPES

та 10 % сироватки крові ембріонів телят. Для інгібування активності ферментів ганглії витримували в даному розчині протягом 5 хв. Для виділення ізольованих клітин оброблені ганглії пропускали через скляні піпетки Пастера різних діаметрів. Отриману клітинну суспензію висівали на покривні скельця, вміщені в стерильні чашки Петрі з 2 мл середовища MEM. Отримані в такий спосіб нейрони інкубували протягом 24 год при 37 °С в атмосфері повітря, збагаченого CO₂ до 5 %, після чого їх використовували для електрофізіологічних вимірювань протягом 1–2 год.

Реєстрацію іонних струмів проводили із застосуванням фіксації потенціалу (“петч-клемп”) у конфігурації “ціла клітина”. Струми вимірювали при 22 ± 2 °С із використанням підсилювача Axopatch 200B (“Axon Instruments”, США), фільтрували з частотою зрізу 2 кГц за допомогою двополюсного фільтра Бессела та оцифровували із застосуванням АЦП Digidata 1200B (“Axon Instruments”, США). Мікропіпетки для внутрішньоклітинної перфузії та відведення електричних сигналів виготовляли з боросилікатних скляних капілярів. Кінчики мікропіпеток оплавляли під мікроскопом, наближуючи їх до розпеченої платинової спіралі. Після оплавлення діаметр кінчика мікропіпетки складав 3–6 мкм, а опір при заповненні стандартним внутрішньоклітинним розчином – 2–4 МОм. Склад згаданого розчину був наступним (у мілімолях на 1 л): KCl – 130, HEPES – 10, EGTA – 10, ГТФ – 0.5, АТФ – 5 (рН доводили до 7.3, використовуючи KOH).

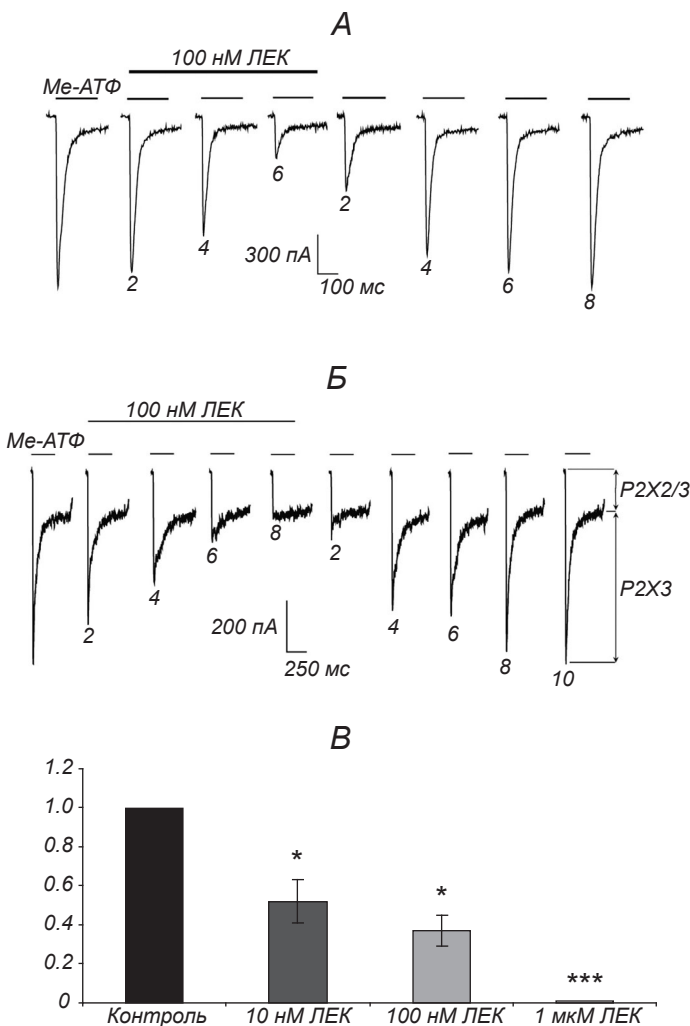
P2X3-опосередковані струми (P2X3-струми) характеризуються надзвичайно швидкою кінетикою десенситизації та повільним виходом із десенситизованого стану. Це зумовлювало необхідність максимально швидкого прикладання та відмивання агоністів. Ми використовували модифікований метод фіксації концентрації, що дозволяло протягом 10 мс повністю замінювати розчин, омиваючий досліджувану клітину. P2X3-струми викликали прикладанням розчину, що вміщував 30 мкМ агоніста відповідних рецепторів α, β -Me-АТФ, протягом 250 мс з інтервалами 2 хв. Це давало змогу отримувати добре відтворювані P2X3-струми протягом усього часу проведення експерименту. Підтримуваний потенціал становив –80 мВ. Діючі речовини (агоністи P2X3-рецепторів, агоністи опіоїдних рецепторів, антагоніст μ -опіоїдних рецепторів STOP) розчиняли в нормальному розчині. Всі хімікати були вироблені компанією

“Sigma” (США).

Опіюідні пептиди прикладали до досліджуваної клітини, додаючи їх або до нормального розчину, або до розчину з агоністом. Аплікація тривала, поки її ефект не досягав стаціонарного рівня. Впливи опіюіда на амплітуду P2X3-струмів виражали як відношення стаціонарної амплітуди струму за даної концентрації опіюіда до амплітуди контрольного струму. Числові значення подані нижче як середні ± стандартне відхилення. Аналіз міжгрупових розбіжностей проводили з використанням *t*-тесту Ст’юдента; відмінності вважали значущими при *P* < 0.05 (програмний пакет „Origin 8.0”, „OriginLab Corp.”, США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Прикладання α,β-Ме-АТФ викликало струми, опосередковані гомомерними P2X3-рецепторами та



рецепторами P2X3+P2X2/3. Струми, що опосередковувалися лише гомомерними P2X3-рецепторами, складеними з відповідних субодиниць, швидко (за 5–7 мс) наростали та досить швидко (протягом 100 мс) входили в десенситизацію. Внаслідок коекспресії на мембрані пуринаргічних рецептор-канальних комплексів кількох типів (гомомерних та P2X3+P2X2/3) інтегральний струм, що спостережувався, демонструє змішану кінетику. Характерною особливістю такого струму є наявність двох фаз кінетики його десенситизації – швидкої (100 мс) та повільної (500 мс). Кінетичні параметри таких «змішаних» струмів розрізняються залежно від внеску рецептор-канального комплексу того або іншого типу [1]. Враховуючи це, внесок P2X3-струму визначали як різницю амплітуд інтегрального струму і струму з повільною кінетикою десенситизації (рис. 1, Б). Амплітуди струмів у перебігу двох-трьох послідовних аплікацій агоніста були стабільними. Оскільки відомо, що майже повний вихід P2X3-рецепторів, активованих α,β-Ме-АТФ, із десенситизованого стану відбувається протягом 2–3 хв (струм наближується до 90 % вихідного значення) [14], інтервал між аплікаціями агоніста звичайно становив 2 хв.

Застосування ендogenous агоніста опіюідних рецепторів лейенкефаліну (ЛЕК) призводило до пригнічення P2X3-струмів. Цей агоніст у концентрації 100 нМ пригнічував дані струми в середньому на 74 ± 8 % (*n* = 6). Величина інгібуючого впливу залежала від часу та концентрації ЛЕК. Часовий перебіг такого впливу прискорювався зі збільшенням концентрації ЛЕК до 1 мкМ; за 2 хв P2X3-струми пригнічувалися практично повністю (в середньому на 99 ± 1 %) (рис. 1, В). Подібні результати вказують на те, що саме кінетика зв’язування ЛЕК з опіюідними рецепторами, а не процес передачі сигналу від опіюідних до P2X3-рецепторів є лімітуючим фактором в інгібуванні P2X3-струмів. Інгібуючий ефект був повністю оборотним; незалежно від концентрації опіюіда амплітуда струмів відновлювалася повною мірою при заміні розчину з опіюідом на нормальний че-

Р и с. 1. Інгібування лейенкефаліном (ЛЕК) P2X3-опосередкованих струмів (P2X3-струмів).

A – записи P2X3-струмів у контролі, під час і після прикладання опіюіда; *B* – записи струмів, опосередкованих P2X3+P2X2/3-рецепторами; *B* – залежність ефекту впливу опіюіда від його концентрації. Тут і надалі протокол прикладання речовин вказаний рисками над записами струмів, час прикладання того або іншого розчину (хв) зазначено під записами струмів. **P* < 0.05; *** *P* < 0.001 (порівняно з контролем).

рез 6–8 хв.

Як відомо, ЛЕК у концентраціях, більших за 10 нМ, є здатним активувати опіоїдні рецептори двох типів – μ та δ [15]. Щоб ідентифікувати тип опіоїдних рецепторів, задіяний до пригнічення P2X3-струмів, ми використовували СТОР – селективний конкурентний антагоніст μ -опіоїдних рецепторів. Як виявилось, аплікації СТОР у концентраціях 50 нМ та 1 мкМ не чинили помітного впливу на P2X3-струми в контрольних умовах. Проте коли P2X3-струми пригнічувалися під дією 100 нМ ЛЕК та їх амплітуди досягали стаціонарних значень, 50 нМ СТОР усували інгібуючу дію даного опіоїда. Як видно з рис. 2, пригнічені P2X3-струми в разі прикладання СТОР на тлі дії ЛЕК практично повністю відновлювалися (до $95 \pm 5\%$ вихідної величини; $n = 4$) протягом 6–8 хв. Отже, опіоїдіндуковане пригнічення P2X3-струмів у нейронах ДСГ опосередковується активацією виключно μ -опіоїдних рецепторів.

Добре відомо, що вказані опіоїдні рецептори діють через два сигнальні шляхи, інгібуючи аденілатциклазу [16] та активуючи фосфоліпазу С (PLC) [17]. Щоб виявити шлях, залучений до інгібуючого впливу ЛЕК на P2X3-рецептори, ми застосовували аплікацію *m*-3МЗФБС – синтетичного активатора PLC (рис. 3). Під дією 20 мкМ даного

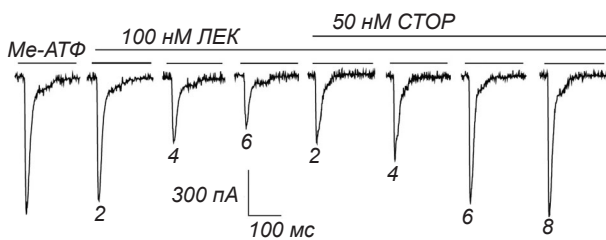


Рис. 2. Усування селективним конкурентним антагоністом μ -опіоїдних рецепторів СТОР інгібуючого впливу лейенкефаліну (ЛЕК) на P2X3-опосередковані струми. Позначення аналогічні таким на рис. 1, А, Б.

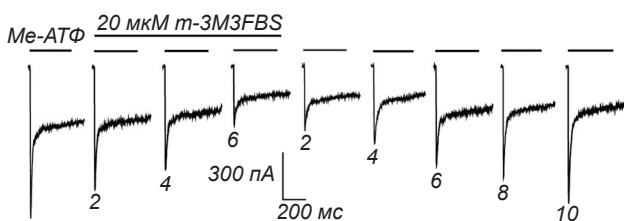


Рис. 3. Інгибування P2X3-опосередкованих струмів, викликане активацією фосфоліпази С (PLC) у результаті аплікації синтетичного активатора PLC *m*-3МЗФБС. Позначення аналогічні таким на рис. 1, А, Б.

агента P2X3-струми пригнічувались у середньому на $41 \pm 5\%$ ($n = 5$; рис. 3). Ефект був повністю оборотним; заміна розчину з *m*-3МЗФБС на нормальний сприяла повільному (10–12 хв), але повному відновленню амплітуди P2X3-струмів до контрольних значень.

Показано, що активація PLC призводить до гідролізу мембранного фосфоліпиду фосфатидилінозитол-4,5-дифосфату (PIP₂) [18], а останній є необхідним для підтримки активності P2X3-рецепторів [19]. Отже, результати описаних вище експериментів (рис. 3) дозволяють припустити, що гідроліз PIP₂ залучений до механізму інгибування P2X3-струмів. Відомо, що рівень мембранного PIP₂, функціонально зв'язаного з P2X-рецепторами, визначається двома факторами – фоновою активністю PLC, яка гідролізує PIP₂, та активністю кіназ, котрі забезпечують синтез цієї сполуки [19]. Враховуючи те, що μ -опіоїдні агоністи активують PLC [17], а, з іншого боку, активація самої PLC призводить до інгибування P2X3-струмів подібно до дії ЛЕК, потрібно було переконатися в тому, що активність PLC та виснаження запасів мембранного PIP₂ можуть модулюватися в разі активації μ -опіоїдних рецепторів. Для цього ми використовували вортманін – інгібітор кіназ, що задіяні до синтезу PIP₂ (25 мкМ). Після інкубації ДСГ-нейронів у середовищі з даним агентом протягом 24 год ЛЕК у досить низькій концентрації (всього 10 нМ) посилював та прискорював свій інгібуючий вплив на P2X3-струми (рис. 4). Під дією 10 нМ ЛЕК впродовж 4 хв P2X3-струми в інкубованих із вортманіном нейронах пригнічувались у середньому на $83 \pm 6\%$ ($n = 4$), тоді як в аналогічних експериментах, але без інкубації із вказаним агентом ЛЕК у тій самій концентрації зменшував амплітуду даних струмів лише на до $48 \pm 11\%$ ($n = 3$) (рис. 1, Б). Цей ефект був оборотним лише частково. Заміна розчину з ЛЕК на нормальний не призводила до

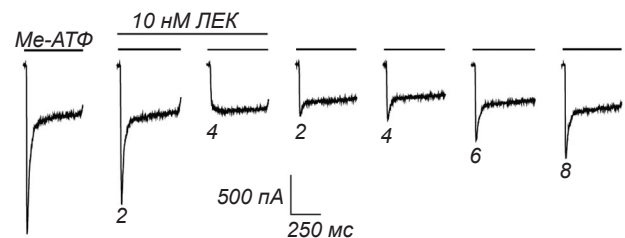


Рис. 4. Посилення інгібуючого впливу лейенкефаліну (ЛЕК) на P2X3-опосередковані струми після інкубації нейронів у розчині з інгібітором кіназ вортманіном (25 мкМ). Позначення аналогічні таким на рис. 1, А, Б.

повного відновлення амплітуд P2X3-струмів. Очевидно, заблоковані кінази не можуть швидко відновити рівень PIP₂ до контрольного. Прискорення інгібуючого ефекту, вірогідно, пояснюється швидким виснаженням запасів мембранного PIP₂. Опіоїдіндукована активація PLC призводить до інтенсивного гідролізу PIP₂, а вортманін є інгібітором синтезу кіназ, необхідних для утворення останнього. Отже, рівень мембранного PIP₂ істотно впливає на швидкість та ефективність пригнічення P2X3-рецепторів під дією ЛЕК.

Отримані нами експериментальні результати в основному зводяться до наступного. Активація μ -опіоїдних рецепторів в умовах аплікації ендogenous опіоїда ЛЕК зумовлює інтенсивне пригнічення P2X3-струмів у нейронах ДСГ із сомами невеликого діаметра (вірогідно, причетних до системи ноцицепції). Ефективність пригнічення залежить від часу та концентрації ЛЕК; інгібування характеризується повною оборотністю. Активація внутрішньоклітинного сигнального ланцюга PLC/PIP₂ є ключовою подією, що зумовлює інгібування P2X3-струмів у досліджених нейронах під дією ендogenous опіоїда.

Результати детального вивчення молекулярних механізмів функціонального зв'язку між опіоїдними та P2X-рецепторами можуть сприяти поліпшенню ефективності застосування опіоїдних препаратів у боротьбі з болем. Отримані нами дані певною мірою поглиблюють розуміння раніше виявленого феномену – опіоїдергічного контролю „периферичних” P2X-рецепторів, істотно залучених у механізми ноцицепції.

Дослідження були проведені згідно з положеннями Міжнародної конвенції щодо захисту тварин, які використовуються в експериментах (Страсбург, 1985), а також відповідно до положень Комітету з біоетики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

Автори – В. Б. Кулик, І. В. Чижмаков, Т. М. Волкова та О. О. Кришталь – підтверджують, що при виконанні дослідження та публікації його результатів були відсутні будь-які конфлікти щодо комерційних або фінансових відносин, відносин з організаціями та/або особами, котрі могли бути пов'язані з дослідженням, та взаємовідносин авторів статті.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. P. M. Dunn, Y. Zhong, and G. Burnstock, "P2X receptors in peripheral neurons," *Prog. Neurobiol.*, **65**, 107-134 (2001).
2. M. F. Jarvis, "Contributions of P2X3 homomeric and heteromeric channels to acute and chronic pain," *Expert. Opin. Ther. Targets*, **7**, 513-522 (2003).
3. O. A. Krishtal, S. M. Marchenko, and V. I. Pidoplichko, "Receptor for ATP in the membrane of mammalian sensory neurones," *Neurosci. Lett.*, **35**, 41-45 (1983).
4. S. McGaraughty and M. F. Jarvis, "Antinociceptive properties of a non-nucleotide P2X3/P2X2/3 receptor antagonist," *Drug News Perspect.*, **18**, 501-507 (2005).
5. D. Donnelly-Roberts, S. McGaraughty, C. C. Shieh, et al., "Painful purinergic receptors," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **324**, 409-415 (2008).
6. Ю. Свєрдлов, "Современные проблемы боли", *Мед. науч. и учеб.-метод. журн.*, **2**, 31-40 (2001).
7. B. Jordan and L. A. Devi, "Molecular mechanisms of opioid receptor signal transduction," *Br. J. Anaesth.*, **81**, 12-19 (1998).
8. T. Reisine, S. F. Law, A. Blake, and M. Tallent, "Molecular mechanisms of opiate receptor coupling to G proteins and effector systems," *Ann. New York Acad. Sci.*, **780**, 168-175 (1996).
9. I. Vetter, B. D. Wyse, G. R. Monteith, et al., "The mu opioid agonist morphine modulates potentiation of capsaicin-evoked TRPV1 responses through a cyclic AMP-dependent protein kinase A pathway," *Mol. Pain*, **2**, 22-28 (2006).
10. A. D. Corbett, G. Henderson, A. T. McKnight, and S. J. Paterson, "75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail," *Br. J. Pharmacol.*, **147**, Suppl. 1, S153-S162 (2006).
11. K. K. Rau, R. M. Caudle, B. Y. Cooper, and R. D. Johnson, "Diverse immunocytochemical expression of opioid receptors in electrophysiologically defined cells of rat dorsal root ganglia," *J. Chem. Neuroanat.*, **29**, 255-264 (2005).
12. C. Stein, "Opioid receptors on peripheral sensory neurons," *Adv. Exp. Med. Biol.*, **521**, 69-76 (2003).
13. W. Truong, C. Cheng, Q. G. Xu, et al., "Mu opioid receptors and analgesia at the site of a peripheral nerve injury," *Ann. Neurol.*, **53**, 366-375 (2003).
14. E. B. Pratt, T. S. Brink, P. Bergson, et al., "Use-dependent inhibition of P2X3 receptors by nanomolar agonist," *J. Neurosci.*, **25**, 7359-7365 (2005).
15. K. Raynor, H. Kong, Y. Chen, et al., "Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors," *Mol. Pharmacol.*, **45**, 330-334 (1994).
16. S. K. Sharma, W. A. Klee, and M. Nirenberg, "Opiate-dependent modulation of adenylate cyclase," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3365-3369 (1977).
17. W. Xie, G. M. Samoriski, J. P. McLaughlin, et al., "Genetic alteration of phospholipase C beta3 expression modulates behavioral and cellular responses to mu opioids," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 10385-10390 (1999).
18. M. J. Rebecchi and S. N. Pentylala, "Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C," *Physiol. Rev.*, **80**, 1291-1335 (2000).
19. G. Mo, L. P. Bernier, Q. Zhao, et al., "Subtype-specific regulation of P2X3 and P2X2/3 receptors by phosphoinositides in peripheral nociceptors," *Mol. Pain*, **5**, 47-52 (2009).