

УДК 612.815.1:612.822

## МОДУЛЯЦІЯ ІОННИХ СТРУМІВ КРІЗЬ КАЛЬЦІЄВІ КАНАЛИ R-ТИПУ АГОНІСТОМ ОПОЇДНИХ РЕЦЕПТОРІВ У НЕЙРОНАХ ПУРКІНЬЄ

Студ. Ю.Смужевич, гр.МгХФ17<sup>1</sup>

Студ. А.Чубун, гр.МгХФ17<sup>1</sup>

Науковий керівник доц. В.Б.Кулик<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Київський національний університет технологій та дизайну

<sup>2</sup>Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України

**Мета наукового дослідження:** дослідити дію ендогенних та екзогенних опіоїдів на електрофізіологічні характеристики високопорогових кальцієвих каналів R-типу плазматичної мембрани нейронів мозочку, а також встановити можливі механізми, що беруть участь у модуляторній дії опіоїдів на ці струми.

**Завдання:** з'ясувати особливості регулювання Ca<sup>2+</sup> каналів R-типу в мембрані нейронів Пуркінє мозочка шурів під впливом агоністів опіоїдних рецепторів.

**Об'єкт дослідження:** модуляція функцій кальцієвих каналів R-типу в мембрані нейронів Пуркінє мозочка шурів під впливом опіоїдів.

**Методи та засоби дослідження:** фіксація потенціалу на мембрані в режимі відведення від цілої клітини, внутрішньоклітинна перфузія, виділення нейронів Пуркінє мозочка шурів, статистичні методи.

**Наукова новизна та практичне значення отриманих результатів:** Наші дані показують, що опіоїди можуть одночасно активувати різні типи опіоїдних рецепторів в одній і тій же клітині, викликаючи протилежні ефекти на кальцієві струми R-типу. Вищенаведене вказує на існування принципово нового механізму регуляції кальцієвих каналів.

**Результати дослідження.** Високопорогові кальцієві канали плазматичної мембрани, що відносяться до N-, L-, P/Q- та R-типів, присутні як у центральних, так і в периферичних нейронах нервової системи ссавців. Вони регулюють вхід Ca<sup>2+</sup>, тим самим виступаючи в ролі регуляторів таких важливих кальційзалежних процесів та характеристик, як експресія генів, секреція гормонів, збудливість мембрани, синаптична передача та ін. У зв'язку з тим, що функції кальцієвих каналів є життєво необхідними, їх активність регулюється досить широким набором внутрішньоклітинних сигнальних механізмів. Останні контролюють вхід кальцію в клітину та забезпечують регуляцію важливих інтегральних біологічних функцій.

Як ми встановили, передача сигналу від  $\mu$ -ОР ( $\mu$ -опіоїдних рецепторів) до кальцієвих каналів R-типу в мембрані нейронів Пуркінє мозочка шурів не опосередковується G-білками. Посилюючий вплив DAMGO (агоніст  $\mu$ -ОР) на R-кальцієвий струм зберігається на сталому рівні в умовах, коли внутрішньоклітинний розчин вміщує необоротний блокатор G-білків (ГДФ $\beta$ S) або активатор цих білків (ГТФ $\gamma$ S). Те саме можна сказати щодо участі в позитивній модуляції кальцієвих R-струмів таких вторинних посередників, як іони кальцію самі по собі, цАМФ та кальмодулін. Слід також згадати, що вплив DAMGO на R-струм зберігається в умовах парної стимуляції клітини. Отже, результати наших експериментів недвозначно вказують на те, що механізм посилення активності кальцієвих каналів R-типу під дією DAMGO кардинально відрізняється від "класичного" G-білок-опосередкованого механізму модуляції цих каналів під дією агоністів  $\kappa$ -ОР та  $\delta$ -ОР, проаналізованого Мінамі та співавт.

Підстави вважати, що активація  $\mu$ -,  $\kappa$ -,  $\delta$ - та N/OFQ-ОР може ініціювати G-білок-незалежну "некласичну" модуляцію метаболічних іонних каналів, були отримані досить давно. Було встановлено, що ноцицептин (агоніст N/OFQ-ОР) в концентрації

100 нМ інгібує кальцієві канали Т-типу, і цей ефект є G-білок-незалежним. В іншій роботі було показано, що DAMGO може збільшувати величину  $Ca^{2+}$ -залежного калієвого струму, і цей ефект не опосередковується G-білками, протеїнкіназами та фосфатазами. Відомо, що опіоїди здатні істотно регулювати активність різних протеїнкіназ, зокрема протеїнкінази С (PKC), циклічної АМФ-залежної протеїнкінази А (PKA), кальцій/СаМ-залежної протеїнкінази II (СаМКII) і протеїнкінази G (PKG). Активація PKA або PKC може полегшити діяльність кальцієвих каналів Р-типу. Такий вторинний посередник як цАМФ істотно залучений до внутрішньоклітинної передачі сигналів. Цей агент необхідний для функціонування багатьох клітинних систем, відповідальних за продукцію та вивільнення низки гормонів, таких як глюкагон і адреналін, інших нейромедіаторів та первинних посередників. Глюкагон та адреналін, будучи гідрофільними сполуками, не можуть проходити крізь плазматичну мембрану. ЦАМФ також бере участь в активації протеїнкінази А. Активація  $G_i/G_o$ -спряжених рецепторів здатна пригнічувати роботу аденілатциклази, що призводить до зниження внутрішньоклітинної концентрації цАМФ. Після припинення аплікації опіоїдів на нейрони рівень цАМФ в них зростає, і за рахунок підвищення активності PKA збільшується вивільнення нейромедіаторів. У цих умовах, супресія активності аденілатциклази опіоїдами має призвести до послаблення вказаного вище вивільнення, викликаного активацією PKA. ЦАМФ є універсальним регулятором активності кальцієвих каналів, проте у наших експериментах його присутність у внутрішньоклітинному розчині не впливала на ефект DAMGO (інтенсивність позитивної модуляції кальцієвих Р-струмів).

Ще одним з внутрішньоклітинних агентів, який може змінювати активність кальцієвих каналів, є кальмодулін. У проведених нами експериментах полегшення Р-струму під дією DAMGO істотно зменшувалася після інкубування клітини протягом 10 хв у розчині, що вміщував 0.5 мкМ кальмідазолу. Останній є неспецифічним блокатором кальмодулін та низки інших білків і ферментів. Отже, модуляція активності Р-каналів під дією агоністів  $\mu$ -ОР може бути залежною від кальмодулін-регульованих ензимів. Підвищення внутрішньоклітинної концентрації EGTA до 10 мМ ніяк не впливало на ефект кальмідазол. Цей факт вказує на незалежність даного ефекту від активності  $Ca^{2+}$ /СаМКII-залежних кіназ та фосфатаз. Відомо, що кальмідазол сам по собі здатний пригнічувати активність кальцієвих каналів, і цей ефект так само не є опосередкованим  $Ca^{2+}$ /СаМКII-залежними шляхами. Навпаки, було показано, що кальмідазол взаємодіє з кальцієвими каналами клітин гладеньких м'язів прямим чином. Підсумовуючи все наведене вище, можна запропонувати найбільш вірогідну гіпотезу щодо механізму дії агоністів  $\mu$ -ОР на кальцієві канали. Скоріш за все, в макромолекулах цих каналів існують високоафінні алостеричні сайти зв'язування з агоністами  $\mu$ -ОР. Ці сайти зв'язування з дещо нижчою афінністю здатні взаємодіяти з кальмідазолом.

**Висновки.** Отже, сукупність всіх отриманих нами даних свідчить на користь того, що існує певний альтернативний механізм, за яким опіоїди можуть помітною мірою регулювати активність іонних каналів. Така модуляція є незалежною від G-протеїнів або процесів, залежних від фосфорилування. В нашому випадку виглядає можливим, що  $\mu$ -ОР модулюють Р-струми через зв'язок зі скафолд-протеїнами. Останні можуть безпосередньо опосередковувати рецепторну сигналізацію або фізично пов'язувати ці рецептори з різноманітними ефекторними системами, зокрема через PDZ домени. Певною аналогією може слугувати механізм, що забезпечує стимуляцію  $Na^+/H^+$  обміну в разі активації  $\kappa$ -ОР. Проте вище згадана гіпотеза, згідно з якою в модуляцію активності кальцієвих каналів Р-типу агоністами  $\mu$ -ОР задіяний високоафінний центр зв'язування розташований в самому такому каналі, а опіоїди є високоафінними алостеричними модуляторами цього каналу, виглядає більш вірогідною (хоча, можливо, що згадані гіпотези не виключають одна одну).

**Ключові слова:** опіоїдні рецептори,  $Ca^{2+}$  канали Р-типу, нейрони Пуркінє, G-білки.