

ПРИГНІЧЕННЯ АКТИВНОСТІ НОЦИЦЕПТОРІВ У НЕЙРОНАХ ДОРСАЛЬНИХ ГАНГЛІЇВ ЩУРІВ ЛЕЙЕНКЕФАЛІНОМ

Чубун А.Ю.¹, Смузевич Ю.О.¹, Єгорова О.В.², Кулик В.Б.^{1,2}

¹Київський національний університет технологій та дизайну, кафедра промислової фармації, м Київ, Україна, e-mail: allachubun95@gmail.com

²Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, м Київ, Україна, e-mail: Kulyk@biph.kiev.ua

В рамках даної роботи оцінено внесок активності P2X3-рецепторів до низки процесів, що задіяні під час знеболення опіоїдами у периферичній нервовій системі. Також окреслено роль біохімічних шляхів у взаємодії опіоїдних рецепторів, котрі опосередковують анальгезію з P2X3 -рецепторами, що відповідають за ноцицепцію.

Встановлено, що вплив ендogenous опіоїда лейенкефаліну (ЛЕК) на P2X3-опосередковані струми в сенсорних нейронах, забезпечується низкою G-білок спряжених механізмів. Інгібуюча дія ЛЕК на P2X3-рецептори залежить від концентрації опіоїда та часу прикладання останнього до нейронів дорсальних гангліїв щурів. Визначено, що вплив ЛЕК на P2X3-рецептори опосередкований активацією опіоїдних рецепторів μ -типу.

Ключові слова: опіоїдні рецептори, P2X3-рецептори, нейрони дорсальних гангліїв, G-білки, лейенкефалін, налоксон.

INHIBITION OF NOCICEPTORS ACTIVITY IN DORSAL ROOT GANGLION NEURONS BY LEUENKEPHALIN

Chubun A.Y.¹, Smuzhevych Y.O.¹, Iegorova E.V.², Kulyk V.B.^{1,2}

¹Kyiv National University of Technologies and Design, Department of Industrial Pharmacy, Kyiv, Ukraine, e-mail: allachubun95@gmail.com

²Bogomoletz Institute of Physiology, Kyiv, Ukraine, e-mail: Kulyk@biph.kiev.ua

In the article discusses the contribution of the activity of P2X3 receptors to a number of processes involved in opioid analgesia in the peripheral nervous system is estimated. Also outlined the role of biochemical pathways in the interaction of opioid receptors that mediate analgesia with P2X3 receptors responsible for the nociception.

It is established that the influence of endogenous opioid leuencephalin (LEK) on P2X3-mediated currents in sensory neurons is provided by a number of G-protein conjugate mechanisms. The inhibitory effect of LEK on P2X3 receptors depends on the concentration of the opioid and on the time when the latter is applied to the neurons of the dorsal ganglia of the rats. The effect of LEK on P2X3 receptors is mediated by the activation of opioid μ -type receptors.

Key words: opioid receptors, P2X3-receptors, dorsal ganglion neurons, G-proteins, leuencephalin, naloxone.

Мета дослідження – з'ясувати функціональні особливості взаємодії опіоїдних та P2X3-рецепторів (ноцицепторів) у нейронах дорсальних гангліїв щурів; – дослідити вплив ендogenous опіоїда – ЛЕК на активність вище зазначених ноцицепторів в умовах застосування різних концентрацій опіоїда; - виявити ефективність дії опіоїда на P2X3-

рецептори залежно від часу прикладання ЛЕК, встановити тип опіоїдного рецептора, яким опосередковується вплив ЛЕК на ноцицептори.

Матеріал і методи дослідження – ЛЕК, налоксон, розчин Рінгера, культивовані нейрони дорсальних гангліїв щурів, середовище для культивування нейронів, протеолітичні ферменти, метод внутрішньоклітинної перфузії, метод фіксації потенціалу в режимі відведення від цілої клітини, метод фіксації концентрації, статистичні методи.

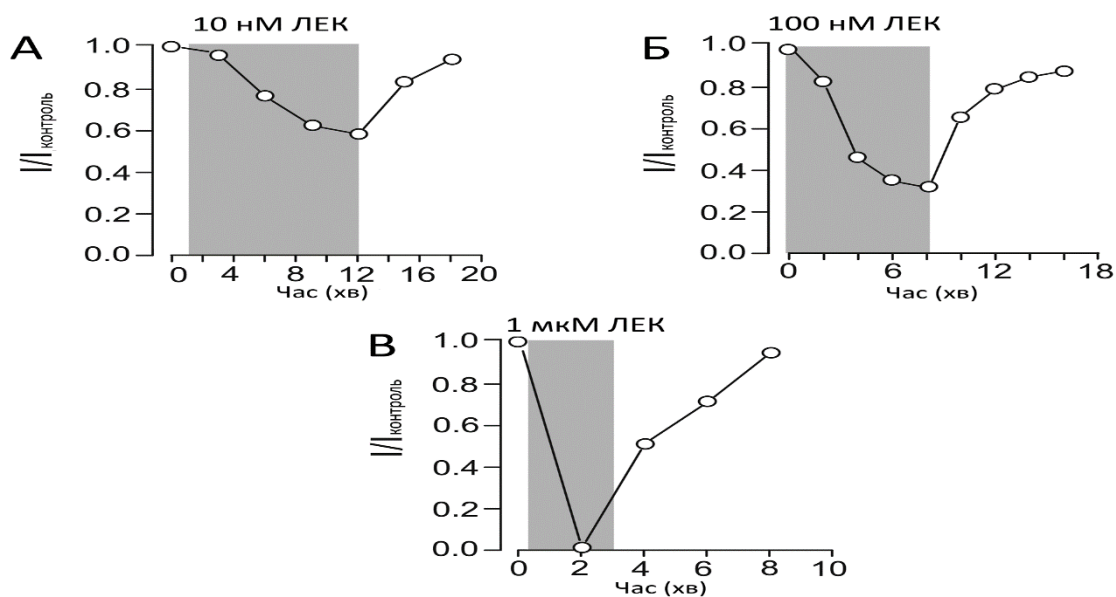
Результати дослідження

P2X3-опосередковані струми реєструють у відповідь на застосування α, β -Me-ATФ у концентрації 30 мкМ протягом 0,5 с з інтервалом між прикладаннями 2-3 хв. Ця концентрація агоніста близька до насичуючої для активації P2X3-рецепторів. Раніше було показано, що при 2-3 хв інтервалі між прикладаннями α, β -Me-ATФ, вихід P2X3-рецепторів з десенситизації та відновлення їх амплітуд наближається до більш ніж 90% [1,5,8]. У всіх експериментах застосування ендogenous опіоїда – ЛЕК передували 2 - 3 наступних прикладань α, β -Me-ATФ, для досягнення струмом стаціонарних значень. Контрольні прикладання агоністу P2X3-рецепторів також здійснювали для пересвідчення у відсутності неспецифічного незворотного спадання струмів (run-down). Амплітуди α, β -Me-ATФ-активованих струмів, отриманих під час такої серії, не повинні були відрізнятися більше ніж на 10%. Якщо, в ході контрольних вимірювань спостерігалось неспецифічне спадання P2X3-опосередкованого струму, нейрон не використовувався для проведення подальших досліджень.

Під час вивчення впливу опіоїдів на P2X3-рецептори нейронів дорсальних гангліїв (ДГ), опіоїдні агоністи додавалися до омиваючого клітину розчину. Таким чином, опіоїди неперервно прикладалися до клітини в ході дослідження їх впливу на P2X3-опосередковані струми. Розчин з опіоїдним агоністом прикладався до досліджуваного нейрона, допоки викликане опіоїдом пригнічення P2X3-опосередкованого струму не досягало стаціонарного значення.

Прикладання ЛЕК до нейронів спінальних гангліїв призводило до двох можливих результатів: або він не справляв ніякого ефекту, або викликав інгібування P2X3-опосередкованих струмів залежно від концентрації ЛЕК та часу прикладання (25,8% нейронів від загальної кількості).

Виявилось, що ендogenous агоніст опіоїдних рецепторів – ЛЕК відчутно пригнічує активність P2X3-рецепторів у нейронах ДГ (рис.1).



Час прикладання ЛЕК у різних концентраціях (А, Б, В) зазначено сірими смугами. Криві кожного графіку відповідають окремим клітинам ДГ.

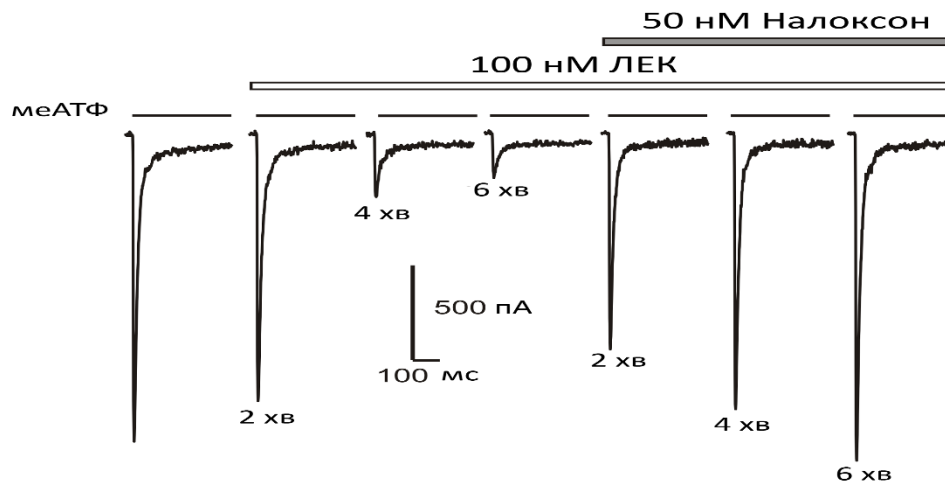
Рисунок 1. Зміни кінетики інгібуючої дії ЛЕК на P2X3-струми залежно від часу та концентрації

Ці результати вказують на те, що саме кінетика зв'язування ЛЕК з опіоїдними рецепторами, а не швидкість передачі внутрішньоклітинного сигналу є лімітуючим фактором в інгібуванні P2X3-рецепторів. Інгібуючий ефект ЛЕК був оборотним: амплітуда струмів повністю відновлювалась протягом 6-8 хв після вимивання ЛЕК від клітини, при всіх концентраціях. Слід зауважити, що у всіх опіоїдно-чутливих нейронів, застосування 1 нМ ЛЕК не викликало змін параметрів P2X3-струмів, проте подальше прикладання 1мкМ ЛЕК до тієї ж клітини завжди призводило до повного інгібування P2X3-рецепторів. Як вже зазначено, прикладання 1мкМ ЛЕК спричиняло блокування P2X3-рецептор-опосередкованих струмів на $99 \pm 1\%$ ($n = 6$), (рис.1). Аналогічним чином селективний для μ -опіоїдних рецепторів агоніст ендоморфін-1 у концентрації 100 нМ майже повністю (на $97 \pm 2\%$, $n = 3$) блокував P2X3-опосередковані струми.

Відомо, що налоксон є широко використовуваним опіоїдним антагоністом (конкурентний антагоніст), який запобігає взаємодії опіоїдів з їх рецепторами і блокує опіоїдну сигналізацію [2,7]. Цей агент характеризується високою спорідненістю до μ - та κ - , і відносно низькою спорідненістю до δ -опіоїдних рецепторів [3,6]. Встановлено, що ця речовина може виступати в якості нейтрального антагоніста в клітинах, які попередньо не

перебували під дією агоніста. У клітинах, що були проінкубовані з морфіном, налоксон проявляє себе як зворотній агоніст, який пригнічує базальну активність μ -опіоїдних рецепторів [4,7].

Перед застосуванням вище зазначеного антагоністу, необхідно було переконатися в тому, що він сам по собі не впливає на P2X3-рецептори, а також визначити конкурентні взаємовідносини між налоксоном і ЛЕК. Як виявилось, окремі аплікації налоксона у концентраціях від 50 нМ до 1 мкМ не чинили помітного впливу на P2X3-опосередковані струми в контрольних умовах. Проте, коли P2X3-струми пригнічувалися під дією 100 нМ ЛЕК та їх амплітуди досягали стаціонарних значень, налоксон прикладений у концентрації 50 нМ на тлі дії ЛЕК оборотно і ефективно усував інгібуючий вплив даного опіоїда у нейронах ДГ (рис.2.).



Оригінальні записи струмів відведені від одної клітини. Протокол прикладання меАТФ вказано рисками над записами струмів, прикладання ЛЕК та налоксона – широкими лініями. Концентрації речовин зазначено над відповідними лініями. Час аплікації того чи іншого розчину зазначено під записами струмів.

Рисунок 2. Налоксон блокує інгібуючу дію ЛЕК на ноцицептори у нейронах ДГ

Базуючись на результатах цього експерименту ми переконались, що опіоїдіндуковане пригнічення P2X3-струмів у нейронах ДГ опосередковується активацією опіоїдних рецепторів.

Для подальшої ідентифікації типу опіоїдних рецепторів, що задіяні до вище зазначеного ефекту ЛЕК на P2X3-струми, ми використовували D-PheCys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂(STOP) – один з найбільш селективних антагоністів μ -опіоїдних рецепторів. Ми виявили, що застосування STOP у концентрації 50-100 нМ, на тлі дії ЛЕК

у концентрації 100 нМ, повністю відмінює інгібуючий ефект опіюда у середньому на $97 \pm 7 \%$, $n = 3$, аналогічно налоксону (рис. 2.).

Таким чином, ми з'ясували, що опіюдно-кероване інгібуння P2X3-струмів у нейронах ДГ опосередковано активацією виключно μ -опіюдних рецепторів.

Висновки:

1. Ендогенний опіюд – лейенкефалін інгібуює активність ноцицепторів у нейронах дорсальних гангліїв залежно від дози опіюда та часу прикладання останнього.

2. Пригнічення активності P2X3-рецепторів ЛЕК опосередковується активацією метаботропних G-білок спряжених опіюдних рецепторів.

3. Усунення інгібуючої дії ЛЕК на ноцицептори селективним антагоністом опіюдних рецепторів μ -типу (СТОР) вказує на залучення до даного процесу саме з μ -опіюдних рецепторів.

Подальше дослідження впливу опіюдів на периферичну нервову систему та детальне вивчення механізмів функціонування ендогенної опіюдної системи сприятиме впровадженню нових молекулярних інструментів для боротьби з болем.

Список літератури

1. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches / O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher [et al.] // *Pflugers Arch.* — 1981. — Vol. 391, № 2. — P. 85—100.
2. Neher E. The patch clamp technique / E. Neher, B. Sakmann // *Sci. Am.* — 1992. — Vol. 266, № 3. — P. 44—51.
3. Metabotropic P2Y receptors inhibit P2X3 receptor-channels via G protein-dependent facilitation of their desensitization / Z. Gerevich, Z. Zadori, C. Muller [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* — 2007. — Vol. 151, № 2. — P. 226—236.
4. Mignat C. Affinity profiles of morphine, codeine, dihydrocodeine and their glucuronides at opioid receptor subtypes / C. Mignat, U. Wille, A. Ziegler // *Life Sci.* — 1995. — Vol. 56, № 10. — P. 793—799.
5. Reichert JA, Daughters RS, Rivard R, Simone DA. Peripheral and preemptive opioid antinociception in a mouse visceral pain model. *Pain.* 2001;89(2-3): 221-227.

6. Shannon HE, Lutz EA. Comparison of the peripheral and central effects of the opioid agonists loperamide and morphine in the formalin test in rats. *Neuropharmacology*. 2002; 42(2):253-261.
7. Stein C, Lang LJ. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Curr.Opin.Pharmacol*. 2009; 9(1): 3-8.
8. Mo G, Peleshok JC, Cao CQ, Ribeiro-da-Silva A, Seguela P. Control of P2X3 channel function by metabotropic P2Y2 utp receptors in primary sensory neurons. *Mol.Pharmacol*. 2013; 83(3):640-647.