

МЕХАНІЗМ ПОЗИТИВНОЇ МОДУЛЯЦІЇ СТРУМУ ЧЕРЕЗ КАЛЬЦІЄВІ КАНАЛИ Р-ТИПУ В НЕЙРОНАХ ПУРКІН'Є АГОНІСТОМ ОПОЇДНИХ РЕЦЕПТОРІВ

Надійшла 21.12.14

В експериментах на ізольованих нейронах Пуркін'є щура з використанням методу петч-клемп у конфігурації «ціла клітина» додавання в омиваючий розчин 10 нМ агоніста μ -опіоїдних рецепторів (μ -ОР) DAMGO призводило до помірного, проте високопорогового посилення струму через високопорогові кальцієві канали Р-типу (інкремент 9–10 %). Встановлено, що цей ефект не залежав від того, який катіон (Ca^{2+} або Ba^{2+}) проникав через плазматичну мембрану. Даний ефект (позитивна модуляція струму) практично зберігався, якщо тест-імпульсу передувало преімпульс, зміщуючий мембранний потенціал до +50 мВ, тобто вплив був потенціалнезалежним. Згаданий ефект також майже не змінювався в умовах, коли внутрішньоклітинний розчин вміщував 0.5 мМ ГТФ β S (необоротного блокатора G-білків) або таку ж саму кількість ГТФ γ S (неспецифічного активатора цих білків) замість ГТФ. Додавання до внутрішньоклітинного розчину 0.5 мМ цАМФ також практично не впливало на позитивну модуляцію Р-струму під дією DAMGO. Попередня 10-хвилинна інкубація досліджуваних клітин у розчині, що вміщував 0.5 мкМ кальмідаозолу (антагоніста кальмодулінрегульованих ензимів), зумовлювала дворазове зменшення DAMGO-індукованого інкремента Р-струму. З урахуванням отриманих даних висунуто припущення, що в молекулі кальцієвого Р-каналу існує високоафінний алостеричний сайт зв'язування з агоністами μ -ОР, і потенціал-, кальцій- і G-білокнезалежна позитивна модуляція струмів через ці канали реалізується саме за подібним механізмом.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: кальцієві канали Р-типу, опіоїди, модуляція, вторинні посередники.

ВСТУП

Вхід кальцію через кальцієві канали плазматичної мембрани опосередковує величезну кількість клітинних відповідей – зміни процесів вивільнення медіаторів, експресії генів, морфологічної диференціації клітин, активації кальційзалежних ензимів тощо [1]. Теоретично, активація опіоїдних рецепторів (ОР) може модулювати активність кальцієвих каналів усіх типів [2, 3]. Опіоїди впливають на активність потенціалкерованих високопорогових кальцієвих каналів L-, N-, P/Q- та R-типів та низькопорогових каналів T-типу. Ці впливи опосередковані активацією μ -, κ -, δ - та ноцицептин/орфанін-FQ (N/OFQ-) ОР [2]. Модуляція активності нейронів та процесів синаптичної передачі під

дією агоністів ОР відбувається за допомогою залучення значної кількості різних молекулярних механізмів. На клітинному рівні опіоїди модулюють провідність потенціал- та хемокерованих іонних каналів, змінюють активність аденілатциклази (АЦ), протеїнкінази С (ПКС), фосфоліпази С (ФЛС), фосфоліпази D (ФЛД) та викликають мобілізацію кальцію з внутрішньоклітинних депо [4, 5]. Раніше ми встановили [6], що селективні агоністи μ -ОР у наномолярних концентраціях можуть зумовлювати помітне збільшення амплітуди трансмембранних струмів через кальцієві канали Р-типу. Для подальшого вивчення механізмів такої модуляції ми провели низку експериментів на ізольованих нейронах Пуркін'є щура, в яких досліджувалася можлива участь різних вторинних посередників у передачі сигналу від опіоїдного рецептора до кальцієвого каналу.

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

МЕТОДИКА

Виділення нейронів Пуркін'є шура для подальших електрофізіологічних досліджень проводили за допомогою стандартної м'якої ферментативної обробки тканин мозочка, описаної нами раніше [6]. Після декапітації тварини мозочок швидко ізолювали й переносили в охолоджений (0 °С) розчин наступного складу (тут і далі – у мілімолях на 1 л): NaCl – 137, KCl – 3.0, NaHCO₃ – 26, глюкоза – 30, MgCl₂ – 2.0, KH₂PO₄ – 1.5, Na₂HPO₄ – 6.3. Цей розчин постійно насичували карбогеном (95 % O₂ і 5 % CO₂), що дозволяло підтримувати рН на рівні 7.4. Далі під контролем бінокулярного мікроскопа за допомогою тонкого леза нарізали поперечні зрізи мозочка (300–400 мкм завтовшки) та витримували їх при кімнатній температурі (19–24 °С) протягом 30 хв у згаданому розчині. Ферментативну обробку проводили, додаючи у вказаний розчин 2.4 мг/мл протеїнази XXIII з *Aspergillus oryzae* (експозиція 25–30 хв при 22 °С). Після такої обробки зрізи ретельно (20 хв) відмивали від ферменту в чистому розчині. Ізольовані нейрони виділяли за допомогою багаторазового пропускання тканини зрізів через декілька скляних мікропіпеток з діаметром кінчика від 1.0 до 0.3 мм у розчині наступного складу: NaCl – 150, KCl – 5.0, CaCl₂ – 3.0, MgCl₂ – 1.0, NEPES – 20, глюкоза – 10 (рН доводили до 7.4, використовуючи NaOH). Описана процедура дозволяла отримувати в достатній кількості ізольовані нейрони Пуркін'є, що легко ідентифікувалися за характерною формою.

Для відведення іонних струмів Р-типу був застосований метод “петч-клемп” у конфігурації “ціла клітина”. Зовнішньоклітинний розчин мав наступний склад: TEA-Cl – 140, холіну хлорид – 100, CaCl₂ – 2.0, MgCl₂ – 2.0, Tris-Cl – 20 (рН 7.4). Мікропіпетки заповнювали внутрішньоклітинним розчином, який вмщував Tris-PO₄ – 70, Tris-Cl – 30, EGTA – 5.0, TEA-Cl – 40, Mg-АТФ – 5.0, ГТФ – 0.5 (рН 7.2). Діаметр кінчика мікропіпетки дорівнював 2–4 мкм, а її електричний опір за умов використання вищенаведених розчинів становив близько 2–5 МОм.

Високопорогові кальцієві струми реєстрували при мембранному потенціалі, підтримуваному на рівні –70 мВ. Струми, які були зареєстровані в таких умовах, повністю пригнічувалися під дією ω-Aga-IVA-токсину в концентрації 100 нМ. На підставі цього подібні струми були ідентифіковані як струми через кальцієві канали Р-типу [7]. Наявність

у внутрішньоклітинному розчині 5 мМ АТФ і 0.5 мМ ГТФ дозволяла нам отримувати стабільні реєстрації Р-струму в одній клітині протягом 1–2 год.

Зовнішньоклітинну аплікацію розчинів проводили із застосуванням методу швидкої зміни омиваючого розчину за допомогою пристрою “Jumping Table™” («Pharma Robot», Україна). Всі експерименти виконували при кімнатній температурі 20–23 °С.

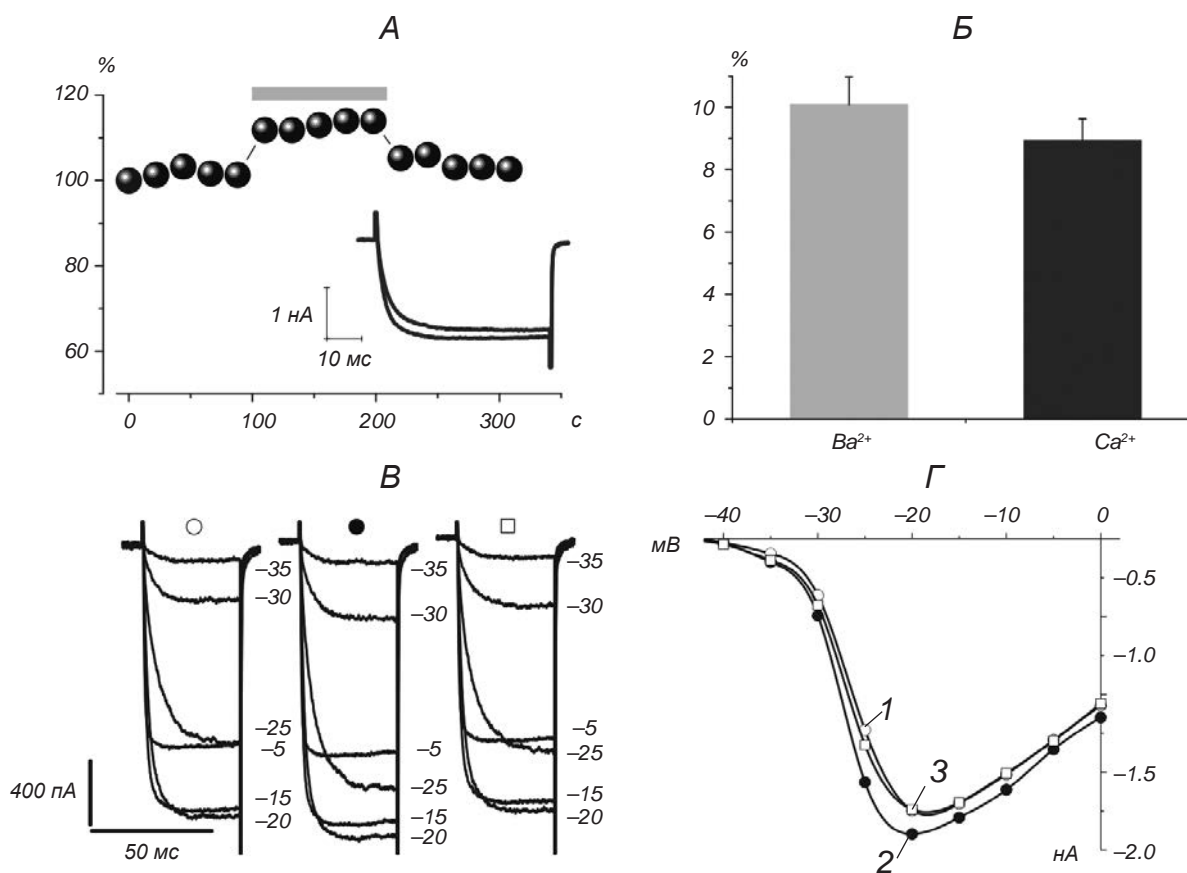
У наших експериментах ми використовували підсилювач А-М Systems 2400 («А-М Systems», США). Отримані дані аналізували із застосуванням аналітичних програмних засобів “Jumping Table™” («Pharma Robot», Україна) та Microcal Origin («OriginLab Corp.», США). Амплітуду кальцієвого струму вимірювали від базової лінії до його пікового значення. Крім окремо визначених випадків усі числові дані представлені у вигляді середніх арифметичних значень ± похибка середнього.

Майже всі реактиви, застосовані в цих дослідженнях, були придбані в компанії «Sigma-Aldrich» (США); виключення становив ω-Aga-IVA-токсин, придбаний у «Tocris» (Велика Британія).

РЕЗУЛЬТАТИ

Серед внутрішньоклітинних агентів, які можуть змінювати активність кальцієвих каналів, перш за все потрібно виділити самі іони кальцію, котрі здатні як безпосередньо впливати на вказані мембранні канали, так і активувати різні кальційзалежні білки. Для з'ясування ролі цих іонів у модуляції кальцієвих каналів Р-типу агоністами ОР ми провели серію експериментів, в яких було досліджено ефект аплікації селективного агоніста μОР DAMGO залежно від типу проникного катіона. Як показано на рис. 1, А, зовнішньоклітинна аплікація DAMGO в концентрації 10 нМ спричиняла швидке (менш ніж за 10 с) збільшення амплітуди Р-струму в середньому на $9 \pm 0.7\%$ ($n = 7$, $P < 0.001$ порівняно з контролем). Якщо основними проникними катіонами були іони Ba²⁺, інкремент струму через канали Р-типу під дією DAMGO складав у середньому $10 \pm 1.0\%$ ($n = 27$, $P < 0.001$). DAMGO також не впливав на кінетику активації та інактивації Р-струму, а також його вольт-амперну характеристику (В, Г), і його посилюючий ефект був повністю оборотним у разі відмивання від агоніста.

Як відомо, ОР належать до великої суперродини G-білокзв'язаних рецепторів (GPCR), які забез-



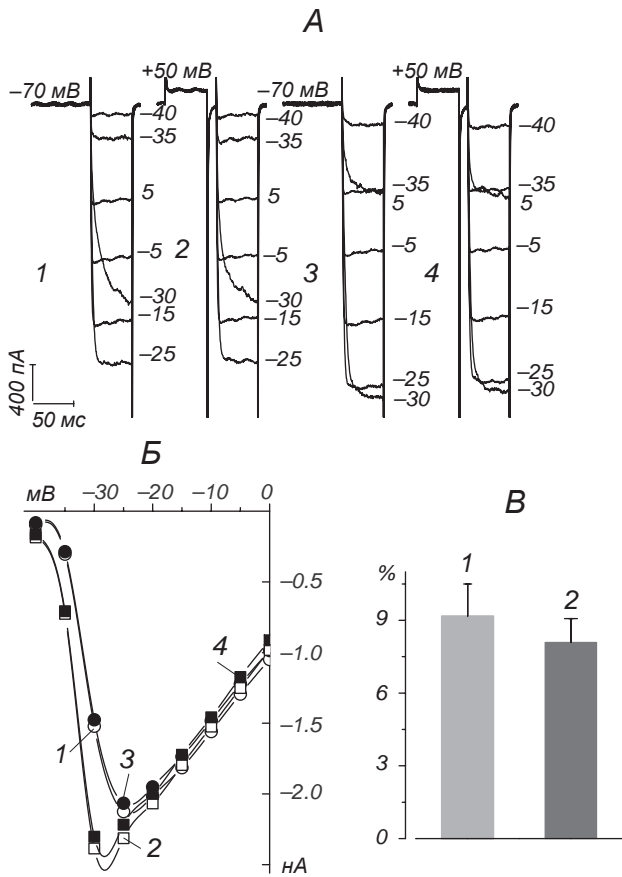
Р и с. 1. Модуляція провідності кальцієвих каналів P-типу в нейронах Пуркін'є під впливом DAMGO.

A – зміни нормованої амплітуди P-струму в умовах аплікації 10 нМ DAMGO; тривалість аплікації вказана широкою сірою лінією над графіком. За 100 % прийнята середня амплітуда P-струму в умовах контролю (перед аплікацією). На вставці – оригінальні записи струмів у контролі (1) та під час аплікації DAMGO (2). *Б* – середні значення нормованих інкрементів амплітуди барієвих (1) та кальцієвих (2) P-струмів (%) при аплікації DAMGO; різниця середньогрупових значень невірогідна ($P > 0.1$), що підтверджує незалежність величини змін струму від виду проникаючого катіона. *В* – оригінальні записи P-струмів у контролі (1), під час аплікації DAMGO (2) та після відмивання (3); струми викликали зміщенням мембранного потенціалу до рівнів, вказаних справа від записів (мВ). *Г* – вольт-амперні характеристики, побудовані на основі записів P-струмів, які показані на *В*. Позначення умов ті ж самі, що й на *В*.

печують контроль активності іонних каналів через залучення G-білків [8]. Тому в наших наступних експериментах досліджувалася можливість залучення таких білків у модуляцію P-струмів агоністами μ ОР. Існують два типи G-білокопосередкованої модуляції провідності кальцієвих каналів. Така модуляція може бути потенціалзалежною, зумовленою взаємодією $G_{\beta\gamma}$ -субодиниці з кальцієвим каналом [9], та потенціалнезалежною, реалізованою за участі G_{α} -субодиниці [10]. Потенціалзалежна модуляція кальцієвих каналів може бути усунена в умовах сильної деполяризації клітинної мембрани [11]. Позаклітинна аплікація DAMGO викликала в даній серії збільшення амплітуди P-струму в серед-

ньому на $9 \pm 1.3\%$ ($n = 5$, $P < 0.01$). Модулююча дія 10 нМ DAMGO на P-струм зберігалась і в тому випадку, коли тест-імпульсу передувала преімпульс тривалістю 50 мс, змінюючий потенціал на мембрані до +50 мВ. У цьому разі відбувалося збільшення амплітуди P-струму порівняно з контрольним, майже ідентичне до спостережуваного раніше ($8 \pm 1.0\%$, $n = 5$, $P < 0.01$). Видалення DAMGO з позаклітинного розчину призводило до повного усунення ефекту збільшення амплітуди P-струму. Отже, модуляція агоністами μ ОР P-струму не зумовлена потенціалзалежною взаємодією $G_{\beta\gamma}$ -субодиниць із кальцієвими каналами.

У наступній серії тестів для дослідження



Р и с. 2. Незалежність ефектів прикладання DAMGO від попередніх деполяризаційних впливів на досліджувані нейрони.

A – оригінальні записи Р-струмів перед апликацією 10 нМ DAMGO (1, 2) та під час такої апликації (3, 4). Серії записів 2 і 4 отримані в умовах прикладання тривалих преімпульсів, котрі деполяризували мембрану до +50 мВ. Решта позначень аналогічні таким на рис. 1, *B*. *B* – вольт-амперні характеристики, побудовані на основі записів Р-струмів, які показані на *A*. Позначення умов ті ж самі, що й на *A*. *B* – середні значення нормованих інкрементів амплітуди Р-струмів (%) у контрольних умовах (1) та після прикладання тривалих деполяризуючих преімпульсів (2). Різниця міжгрупових значень статистично невірогідна ($P > 0.1$).

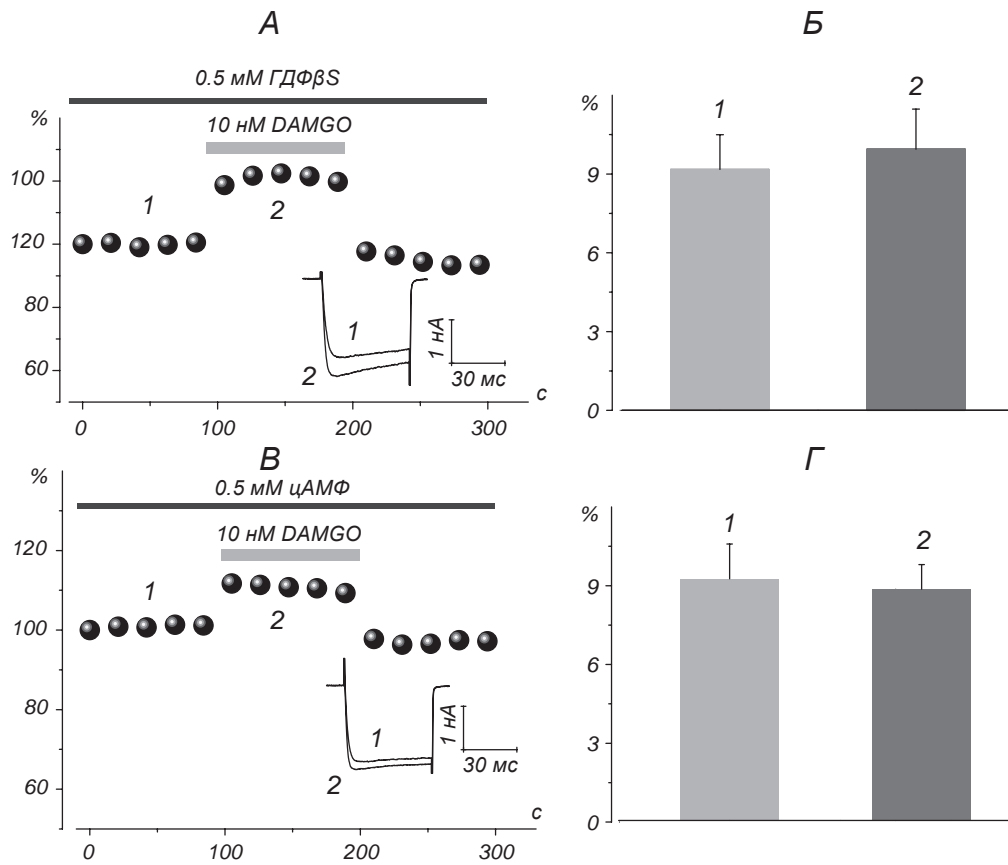
потенціалнезалежного впливу G-білків на модуляцію Р-струму під дією DAMGO ми використали заміну ГТФ у внутрішньоклітинному розчині на ГДФβS, який є необоротним блокаторм G-білків. На рис. 3, *A*, *B* представлені результати експерименту, в якому через 20 хв після початку перфузії нейрона Пуркін’є внутрішньоклітинним розчином із вмістом ГДФβS 0.5 мМ апликація 10 нМ DAMGO викликала збільшення амплітуди Р-струму в середньому на $10 \pm 1.5 \%$ ($n = 9$,

$P < 0.001$). У контрольних же експериментах із застосуванням внутрішньоклітинного розчину, що вміщував 0.5 мМ ГТФ, спостерігався майже аналогічний ефект (збільшення на $9 \pm 1.2 \%$, $n = 8$, $P < 0.001$). Отже, інактивація G-білків, спричинена ГДФβS, практично не впливає на модуляцію Р-струму під дією використаного агоніста μOP.

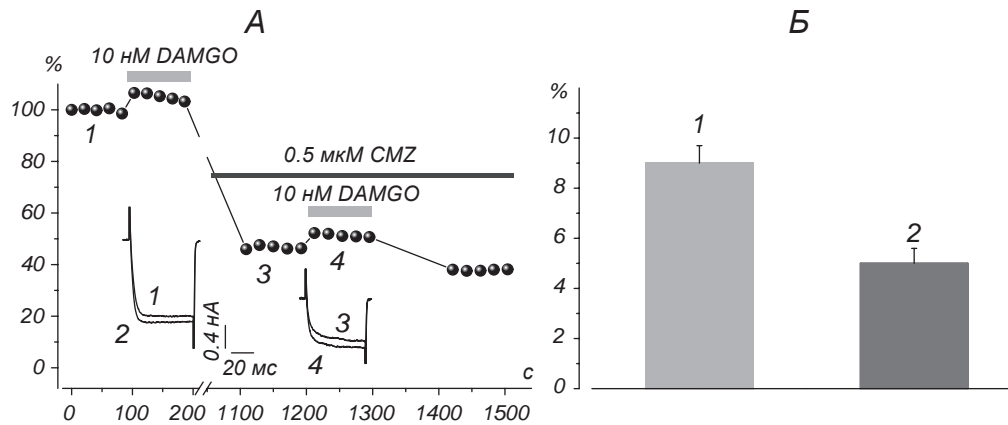
Аналогічні дані були отримані й у серії експериментів, коли внутрішньоклітинний розчин вміщував інше похідне ГТФ – ГТФγS; це похідне є не інгібітором, а необоротним активатором G-білків. У згаданих тестах внутрішньоклітинна перфузія клітини протягом 15–20 хв розчином, що вміщував 0.5 мМ ГТФγS, призводила до потенціалзалежного сповільнення кінетики активації та зменшення амплітуди Р-струму. Цей факт свідчить про наявність функціонально активних G-білків, які здатні модулювати роботу Р-каналів [11]. Проте подальша зовнішньоклітинна апликація 10 нМ DAMGO викликала, як і раніше, практично ідентичне збільшення амплітуди Р-струму (на $9 \pm 1.2 \%$, $n = 8$, $P < 0.001$). Таким чином, отримані нами дані вказують на те, що модуляція Р-струму під дією DAMGO, вірогідно, відбувається без участі G-білків.

Як відомо, цАМФ є важливим вторинним посередником, який бере участь у внутрішньоклітинній передачі сигналів, регулюючих виділення низки гормонів, нейромедіаторів та інших первинних посередників. ЦАМФ також задіяний в активацію протеїнкіназ. Крім того, цей агент зв’язується з іонними каналами та безпосередньо регулює їх функцію [12]. Тому в наступних експериментах, присвячених дослідженню можливої участі цАМФ у модуляції Р-струму під впливом DAMGO, ми використовували внутрішньоклітинний розчин, що вміщував 0.5 мМ цАМФ. На рис. 3, *B*, *Г* представлені результати цих дослідів, у яких через 20 хв після початку перфузії нейрона Пуркін’є внутрішньоклітинним розчином із 0.5 мМ цАМФ апликація 10 нМ DAMGO викликала збільшення амплітуди Р-струму в середньому на $9 \pm 1.2 \%$ ($n = 8$, $P < 0.001$). У контрольній групі нейронів, що були перфузовані розчином без цАМФ, спостерігався практично ідентичний ефект після прикладення DAMGO у вказаній концентрації ($9 \pm 1.0 \%$, $n = 6$, $P < 0.01$).

Кальмодулін (CaM) є одним із внутрішньоклітинних агентів, який може істотно змінювати активність кальцієвих каналів [13, 14]. Для встановлення можливої участі CaM у модуляції проникності кальцієвих каналів Р-типу агоністами μOP ми провели серію дослідів із використанням кальмідазолу



Р и с. 3. Модуляція провідності кальцієвих каналів Р-типу в нейронах Пуркін'є під впливом DAMGO в умовах перфузії клітин внутрішньоклітинними розчинами, що вміщують ГДФβS (А, Б) та цАМФ (В, Г). А, Б – зміни нормованої амплітуди Р-струму під впливом 10 нМ DAMGO при наявності у внутрішньоклітинному розчині 0.5 мМ ГДФβS (А) та 0.5 мМ цАМФ (В). Позначення аналогічні таким на рис. 1. А, Б, Г – середні значення нормованих інкрементів амплітуди Р-струмів (%) в умовах перфузії нейронів у контролі (Б, 1, Г, 1) та при перфузії нейронів розчинами, що вміщували ГДФβS (Б, 2) та цАМФ (Г, 2). Різниці міжгрупових значень невірогідні ($P > 0.1$).



Р и с. 4. Часткове послаблення DAMGO-індукованої позитивної модуляції Р-струмів під впливом кальмідазолу. А – зміни нормованої амплітуди Р-струму під впливом 10 нМ DAMGO в контролі та на тлі аплікації 0.5 мкМ кальмідазолу – FMZ (тривалість аплікації вказана чорною лінією). Наведені також оригінальні записи струмів. Позначення аналогічні таким на рис. 1. А, Б – середні значення нормованих інкрементів амплітуди Р-струмів (%) перед аплікацією FMZ (1) та під час такої аплікації (2). Міжгрупова різниця вірогідна ($P < 0.01$).

(CMZ) – антагоніста кальмодулінрегульованих ензимів. Подібно до того, що спостерігалось у наших попередніх дослідках [15], зовнішньоклітинна аплікація 0.5 мкМ CMZ викликала помітне, але не повне зниження амплітуди кальцієвого струму Р-типу. Збільшення концентрації CMZ до 1.0 мкМ забезпечувало практично повну супресію цього струму протягом декількох хвилин.

В описаній нижче серії експериментів ми досліджували можливий вплив CMZ на позитивну модуляцію кальцієвого Р-струму під дією DAMGO. В даній серії в контрольних умовах аплікація 10 нМ вказаного агоніста μ ОР призводила до збільшення струму на $9 \pm 0.7\%$ ($n = 7$, $P < 0.001$). Після усунення DAMGO зі зовнішньоклітинного розчину досліджуваній нейрон інкубували протягом 10 хв у подібному розчині, котрий вміщував 0.5 мкМ CMZ. Це зумовлювало дворазове зменшення амплітуди струму порівняно з контрольними значеннями. Подальше прикладання DAMGO на тлі дії CMZ спричинювало статистично вірогідне збільшення амплітуди досліджуваного струму в середньому на $5 \pm 0.6\%$ ($n = 5$, $P < 0.05$). Отже, CMZ істотно зменшував величину спостережуваного ефекту DAMGO. Проте на відміну від модуляції, зумовленої дією гіперфорину [15], повного усунення інкременту Р-струму не відбувалося.

ОБГОВОРЕННЯ

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^{2+} , тим самим виступаючи в ролі регуляторів таких важливих кальційзалежних процесів та характеристик, як експресія генів, секреція гормонів, збудливість мембрани, синаптична передача та ін. [16–18]. У зв'язку з тим, що функції кальцієвих каналів є життєво необхідними, їх активність модулюється досить широким набором внутрішньоклітинних сигнальних механізмів. Останні, кінець-кінцем контролюючи вхід кальцію в клітину, забезпечують регуляцію важливих інтегральних біологічних функцій.

Як ми встановили, передача сигналу від μ ОР до кальцієвих каналів Р-типу в мембрані нейронів Пуркін'є мозочка шурів не опосередковується G-білками. Посилюючий вплив DAMGO на Р-кальцієвий струм зберігається приблизно на

сталому рівні в умовах, коли внутрішньоклітинний розчин вміщує необоротний блокатор G-білків (ГДФ β S) або активатор цих білків (ГТФ γ S). Те саме можна сказати щодо участі в позитивній модуляції кальцієвих Р-струмів таких вторинних посередників, як іони кальцію самі по собі, цАМФ та СаМ. Слід також згадати, що вплив DAMGO на Р-струм зберігається в умовах парної стимуляції клітини. Отже, результати наших експериментів недвозначно вказують на те, що механізм посилення активності кальцієвих каналів Р-типу під дією DAMGO кардинально відрізняється від “класичного” G-білокопосередкованого механізму модуляції цих каналів під дією агоністів κ -ОР та δ -ОР, проаналізованого Мінамі та співавт. [19].

Підстави вважати, що активація μ -, κ -, δ - та N/OFQ-ОР може ініціювати G-білокнезалежну “некласичну” модуляцію метаболічних іонних каналів, були отримані досить давно [3, 20–22]. Було встановлено, що ноцицептин (агоніст N/OFQ-ОР) у концентрації 100 нМ інгібує кальцієві канали Т-типу і цей ефект є G-білокнезалежним [3]. В іншій роботі було показано, що DAMGO може збільшувати величину кальційзалежного калієвого струму і даний ефект не опосередковується G-білками, протеїнкіназами та фосфатазами [22]. Відомо, що опіоїди здатні істотно регулювати активність різних протеїнкіназ, зокрема протеїнкінази С (ПКС), циклічної АМФ-залежної протеїнкінази А (ПКА), кальцій/СаМ-залежної протеїнкінази II (СаМКII) і протеїнкінази G (ПКГ) [4, 5]. Активація ПКА або ПКС може полегшити діяльність кальцієвих каналів Р-типу. Такий вторинний посередник, як цАМФ, є істотно задіяним у внутрішньоклітинній передачі сигналів. Цей агент є необхідним 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 у них зростає, і за рахунок підвищення активності ПКА збільшується вивільнення нейромедіаторів [8, 12]. У цих умовах супресія активності аденілатциклази опіоїдами має призводити до послаблення вказаного вище вивільнення, виклика-

ного активацією ПКА. ЦАМФ є універсальним регулятором активності кальцієвих каналів, проте в наших експериментах його присутність у внутрішньоклітинному розчині не впливала на величину ефекта DAMGO (інтенсивність позитивної модуляції кальцієвих Р-струмів).

Ще одним із внутрішньоклітинних агентів, який може змінювати активність кальцієвих каналів, є СаМ [13, 14]. У проведених нами експериментах полегшення Р-струму під дією DAMGO істотно зменшувалося після інкубування клітини протягом 10 хв у розчині, що вміщував 0.5 мкМ СМЗ. Останній є неспецифічним блокатором СаМ та низки інших білків і ферментів [23]. Отже, модуляція активності Р-каналів під дією агоністів μ -ОР може залежати від СаМ-регульованих ензимів. Підвищення внутрішньоклітинної концентрації EGTA до 10 мМ ніяк не впливало на ефект СМЗ (дані не ілюстровані). Цей факт вказує на незалежність даного ефекту від активності кальцій/СаМКП-залежних кіназ та фосфатаз. Відомо, що СМЗ сам по собі є здатним пригнічувати активність кальцієвих каналів [15, 24], і цей ефект так само не є опосередкованим кальцій/СаМКП-залежними шляхами. Навпаки, було показано, що СМЗ взаємодіє з кальцієвими каналами клітин гладеньких м'язів безпосередньо [24]. Підсумовуючи все наведене вище, можна запропонувати найбільш вірогідну гіпотезу щодо механізму дії агоністів μ -ОР на кальцієві канали. Скоріш за все, в макромолекулах цих каналів існують високоафінні алостеричні сайти зв'язування з агоністами μ -ОР. Ці сайти зв'язування з дещо нижчою афінністю здатні взаємодіяти із СМЗ.

Отже, вся сукупність отриманих нами даних свідчить на користь існування певного альтернативного механізму, за яким опіоїди можуть помітною мірою регулювати активність іонних каналів. Така модуляція є незалежною від G-протеїнів або процесів, залежних від фосфорилування. Останнім часом збільшується число робіт із вказівками на існування нового G-білокнезалежного механізму, завдяки якому певні мембранні рецептори, зокрема ОР, можуть забезпечувати ініціацію біохімічних сигналів і модуляцію збудливості нейронів [25]. Згідно з цими даними, впливи на ОР здатні активувати системи трансдукції, в які залучені скафолд-протеїни [26]. У нашому випадку видається можливим, що μ -ОР модулюють Р-струми саме через зв'язок зі скафолд-протеїнами. Останні можуть безпосередньо опосередковувати рецепторну сигналізацію або фізично пов'язувати ці рецептори з різноманіт-

ними ефекторними системами, зокрема через PDZ-домени [27]. Певною аналогією може слугувати механізм, що забезпечує стимуляцію натрій/водневого обміну в разі активації κ -ОР [28]. Проте вищезгадана гіпотеза, згідно з якою в модуляцію активності кальцієвих каналів Р-типу агоністами μ -ОР є задіяним високоафінний центр зв'язування, розташований у самому такому каналі, а опіоїди є високоафінними алостеричними модуляторами даного каналу, виглядає більш вірогідною (хоча можливо, що згадані гіпотези не виключають одна одну).

Автори статті вдячні за часткову підтримку даної експериментальної роботи Державним Фондом фундаментальних досліджень України (грант Ф64/22-2016) та грантом НАН України для молодих учених.

Усі стадії дослідження відповідали положенням Європейської Конвенції про захист тварин, котрі використовуються в наукових цілях (86/609/ЄЕС, 1986, Страсбург), і нормативам Комітету з біоетики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

Автори даної роботи – О. В. Єгорова, О. І. Фісюнов, О. П. Максимюк та О. О. Кришталь – наголошують на відсутності будь-яких конфліктів щодо комерційних або фінансових відносин, відносин з організаціями або особами, котрі будь-яким чином могли бути пов'язані з дослідженням, а також взаємовідносин співавторів статті.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. P. Kostyuk, *Calcium Ions in Nerve Cell Function* (Oxford Neuroscience Series, Vol. 1), Oxford Univ. Press, Oxford (1992).
2. C. J. Kim, J. S. Rhee, and N. Akaike, "Modulation of high-voltage activated Ca^{2+} channels in the rat periaqueductal gray neurons by μ -type opioid agonist eng," *J. Neurophysiol.*, **77**, No. 3, 1418-1424 (1997).
3. F. A. Abdulla and P. A. Smith, "Nociceptin inhibits T-type Ca^{2+} channel current in rat sensory neurons by a G-protein-independent mechanism eng," *J. Neurosci.*, **17**, No. 22, 8721-8728 (1997).
4. C. T. Tamse, Y. Xu, H. Song, et al., "Protein kinase A mediates voltage-dependent facilitation of Ca^{2+} current in presynaptic hair cells in *Hermissenda crassicornis* eng," *J. Neurophysiol.*, **89**, No. 3, 1718-1726 (2003).
5. F. Fournier, P. Charvet, E. Bourinet, et al., "Regulation by protein kinase-C of putative P-type Ca channels expressed in *Xenopus* oocytes from cerebellar mRNA eng," *FEBS Lett.*, **317**, Nos. 1/2, 118-124 (1993).
6. O. V. Egorova, O. I. Fisyunov, and O. A. Kryshchal, "Effects of agonists of μ -opioid receptors on P-type calcium channels in rat Purkinje neurons," *Neurophysiology*, **47**, No. 2, 102-107 (2015).
7. I. M. Mintz, V. J. Venema, K. M. Swiderek, et al., "P-type calcium channels blocked by the spider toxin ω -Aga-IVA," *Nature*, **355**, No. 6363, 827-829 (1992).

8. A. D. Corbett, G. Henderson, A. T. McKnight, et al., "75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail eng," *Br. J. Pharmacol.*, **147**, Suppl. 1, S153-S162 (2006).
9. S. Herlitze, D. E. Garcia, K. Mackie, et al., "Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein beta gamma subunits," *Nature*, **380**, No. 6571, 258-262 (1996).
10. S. Kaneko, A. Akaike, and M. Satoh, "Receptor-mediated modulation of voltage-dependent Ca²⁺ channels via heterotrimeric G-proteins in neurons," *Jpn. J. Pharmacol.*, **81**, No. 4, 324-331 (1999).
11. A. C. Dolphin, "Mechanisms of modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins," *J. Physiol.*, **506**, Part 1, 3-11 (1998).
12. R. Al-Hasani and M. R. Bruchas, "Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior," *Anesthesiology*, **115**, No. 6, 1363-1381 (2011).
13. D. Wang, W. Sadee, and J. M. Quillan, "Calmodulin binding to G protein-coupling domain of opioid receptors eng," *J. Biol. Chem.*, **274**, No. 31, 22081-22088 (1999).
14. A. Lee, S. T. Wong, D. Gallagher, et al., "Ca²⁺/calmodulin binds to and modulates P/Q-type calcium channels eng," *Nature*, **399**, No. 6732, 155-159 (1999).
15. A. I. Fisyunov, N. A. Lozovaya, T. S. Tsyntsadze, et al., "Modulating action of hyperforin on the P-type calcium channels in the membranes of rat cerebellar Purkinje neurons," *Neurophysiology*, **33**, No. 1, 5-10 (2001).
16. L. G. Wu, R. E. Westenbroek, J. G. Borst, et al., "Calcium channel types with distinct presynaptic localization couple differentially to transmitter release in single calyx-type synapses eng," *J. Neurosci.*, **19**, No. 2, 726-736 (1999).
17. R. W. Tsien and R. Y. Tsien, "Calcium channels, stores, and oscillations," *Annu. Rev. Cell Biol.*, **6**, 715-760 (1990).
18. H. Bito, K. Deisseroth, and R. W. Tsien, "Ca²⁺-dependent regulation in neuronal gene expression," *Current Opin. Neurobiol.*, **7**, No. 3, 419-429 (1997).
19. M. Minami and M. Satoh, "Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions eng," *Neurosci. Res.*, **23**, No. 2, 121-145 (1995).
20. O. Keren, M. Gafni, and Y. Sarne, "Opioids potentiate transmitter release from SK-N-SH human neuroblastoma cells by modulating N-type calcium channels eng," *Brain Res.*, **764**, Nos. 1/2, 277-282 (1997).
21. O. Keren, M. Gafni, and Y. Sarne, "Potentiation of transmitter release from NMB human neuroblastoma cells by kappa-opioids is mediated by N-type voltage-dependent calcium channels eng," *Brain Res.*, **843**, Nos. 1/2, 193-198 (1999).
22. W. A. Twitchell and S. G. Rane, "Nucleotide-independent modulation of Ca(2+)-dependent K⁺ channel current by a mu-type opioid receptor eng," *Mol. Pharmacol.*, **46**, No. 5, 793-798 (1994).
23. P. James, T. Vorherr, and E. Carafoli, "Calmodulin-binding domains: just two faced or multi-faceted?" *Trends Biochem. Sci.*, **20**, No. 1, 38-42 (1995).
24. M. Sunagawa, H. Yokoshiki, T. Seki, et al., "Direct block of Ca²⁺ channels by calmidazolium in cultured vascular smooth muscle cells," *J. Cardiovascul. Pharmacol.*, **34**, No. 4, 488-496 (1999).
25. J. A. Brzostowski and A. R. Kimmel, "Signaling at zero G: G-protein-independent functions for 7-TM receptors eng," *Trends Biochem. Sci.*, **26**, No. 5, 291-297 (2001).
26. R. A. Hall and R. J. Lefkowitz, "Regulation of G protein-coupled receptor signaling by scaffold proteins eng," *Circ. Res.*, **91**, No. 8, 672-680 (2002).
27. D. A. Doyle, A. Lee, J. Lewis, et al., "Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ eng," *Cell*, **85**, No. 7, 1067-1076 (1996).
28. P. Huang, D. Steplock, E. J. Weinman, et al., "Kappa opioid receptor interacts with Na(+)/H(+)-exchanger regulatory factor-1/Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein-50 (NHERF-1/EBP50) to stimulate Na(+)/H(+) exchange independent of G(i)/G(o) proteins eng," *J. Biol. Chem.*, **279**, No. 24, 25002-25009 (2004).