

М. В. Маменко, І. М. Прудніков,
академік НАН України О. О. Кришталь

Пригнічення опіоїдами струмів, опосередкованих P2X3 рецепторами, в сенсорних нейронах щурів

P2X3 рецептори, локалізовані на центральних та периферичних нервових закінченнях первинних сенсорних нейронів, опосередковують больову сигналізацію. Активація опіоїдних рецепторів при локальному введенні опіоїдних агоністів викликає потужний знеболювальний ефект у дослідженнях, проведених на тваринах та людині. Нами виявлено, що P2X3-опосередковані відповіді пригнічувалися опіоїдами в сенсорних нейронах щурів. АТФ-активовані струми пригнічувалися приблизно на 50% при прикладанні насичувальних концентрацій опіоїдних пептидів: морфіну, Лей-енкефаліну та D-Лей-енкефаліну. Коли Лей-енкефалін прикладався в присутності 50 мкМ налоксону, АТФ-індуковані струми пригнічувалися не більше ніж на 10%. Сам по собі налоксон не впливав на АТФ-активовані відповіді. Ефекти, викликані опіоїдами, відтворювалися після прикладання форболового ефіру. Це може свідчити про те, що передача сигналу всередині клітини між опіоїдними та P2X3 рецепторами може опосередковуватись G-білками та протейніназою C.

P2X3 рецептори належать до родини іонотропних лігандкерованих P2X каналів, що активуються АТФ та її аналогами і проникні для катіонів Na^+ , K^+ , Ca^{2+} [1]. Цей підтип P2X рецепторів експресується субпопуляцією сенсорних нейронів задньокорінцевих спинномозкових гангліїв (ЗКГ), що відповідають за сприйняття та передачу болю [2–5]. Тому P2X3 рецептори є перспективними мішенями для створення знеболювальних препаратів. Їх подальше дослідження становить практичний інтерес ще й тому, що АТФ як ендогенний ліганд може вивільнятися з клітини за різних фізіологічних станів (як нормальних, так і патологічних), активуючи відповідні рецептори [6]. Сприйняття болю може відчутно змінюватися під впливом ліків, додаткових ноціцептивних чи неноціцептивних подразників. Було показано, що така “пластичність” болю обумовлюється існуванням у центральній нервовій системі спеціальних механізмів для модуляції больових відчуттів. До їх числа належить і так звана опіоїдна анальгетична система [7]. Опіоїдні пептиди викликають потужний знеболювальний ефект, що опосередковується цілим рядом як центральних, так і периферичних механізмів [8]. Усі основні підтипи опіоїдних рецепторів експресуються в первинних сенсорних нейронах [9]. Відомо також, що активація периферичних опіоїдних рецепторів після локального введення опіоїдних агоністів викликає потужний знеболювальний ефект [10, 11]. Вивчення зв'язку між P2X3 та опіоїдними рецепторами становить неабияку цінність для фундаментальної науки та медицини. Раніше нами було показано, що P2X3 та P2X2/3 рецептори можуть регулюватися опіоїдними рецепторами в сенсорних нейронах щурів [12]. У даній роботі детальніше охарактеризовано вплив опіоїдів на P2X3 рецептори нейронів ЗКГ щурів.

Матеріали та методи досліджень. Експерименти проводили на свіжоізолюваних нейронах ЗКГ щурів, діаметром 10–30 мкм. У дослідженнях використовували білих щу-

рів лінії Вістар WAG/GSto (Москва, Росія) віком 9 діб, що утримувались на стандартній лабораторній дієті у віварії Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України. Для виділення нейронів ЗКГ тварину декапітували, розтинали спинномозковий канал та очищали його від залишків спинного мозку, після чого видаляли грудні та поперекові ЗКГ. Виділені ганглії вміщували у чашку Петрі із зовнішньоклітинним розчином такого складу, мМ: 130 NaCl; 5 KCl; 2 CaCl₂; 2 MgCl₂; 10 HEPES (рН доводили до 7,3 за допомогою NaOH). Після цього ганглії переносили в камеру з розчином для інкубування (до зовнішньоклітинного розчину додавали колагеназу (тип IV) у концентрації 1,3 мг/мл) та інкубували в термостаті протягом 15 хв при 34 °С. Після завершення ферментативної обробки ганглії відмивали в зовнішньоклітинному розчині при кімнатній температурі ((22 ± 2) °С). Після цього ЗКГ вміщували в холодильну камеру, де їх інкубували при 4 °С щонайменше протягом 1 год до моменту їх безпосереднього використання. Для одержання клітинної суспензії частину гангліїв (як правило, два) переносили в краплину зовнішньоклітинного розчину на дні експериментальної камери, де їх механічно руйнували за допомогою голочок. По завершенні цієї процедури всі крупні сполучнотканинні фрагменти гангліїв видаляли з краплини. Клітинну суспензію залишали в цілковитому спокої протягом 5–8 хв, аби клітини могли прикріпитися до дна камери, після чого об'єм розчину в камері доводили до 2,5–3 мл. Отримані в такий спосіб нейрони ЗКГ використовували для електрофізіологічних вимірювань протягом 1–2 год. При необхідності процедуру виділення клітин з гангліїв повторювали. Нейрони, що знаходилися в ферментативно оброблених ЗКГ у холодильній камері, зберігали свої основні електрофізіологічні характеристики принаймні протягом 24 год з моменту їх вилучення з організму тварини.

Реєстрацію струмів проводили із застосуванням методу фіксації потенціалу (“петч-клемп”) в режимі відведення від цілої клітини (конфігурація “whole cell”). Струми вимірювали при (22 ± 2) °С із застосуванням підсилювача Axopatch 200B (“Axon Instruments”, США), фільтрували при частоті зрізання 2 кГц за допомогою двополосного фільтра Бесселя та оцифровували за допомогою АЦП Digidata 1200B (“Axon Instruments”, США). Мікропіпетки для внутрішньоклітинної перфузії та відведення електричних сигналів виготовляли з капілярів з боросилікатного скла (зовнішній діаметр становив 1,5 мм; внутрішній — 0,86 мм). Кінчики мікропіпеток оплавляли під мікроскопом за допомогою платинової спіралі. Після оплавлення мікропіпетки мали діаметр кінчика 3–6 мкм та опір 2–4 МОм при заповненні стандартним внутрішньоклітинним розчином, що містив, мМ: 130 KCl, 10 Hepes, 10 EGTA, 0,5 ГТФ, 5 АТФ (рН доводили до 7,3 за допомогою КОН).

P2X₃-опосередковані струми характеризуються надзвичайно швидкою кінетикою десенситизації та повільним виходом з десенситизованого стану, що обумовлювало необхідність швидкого (у мілісекундному інтервалі) прикладання та відмивання агоністів. З цією метою використовували модифікований метод фіксації концентрації, що дозволяв протягом 10 мс повністю замінювати омиваючий досліджувану клітину розчин [13]. P2X₃-опосередковані струми викликали прикладанням 10 мкМ агоніста (АТФ чи α, β-Me-АТФ) протягом 250 мс кожні 7 хв. Це дозволяло отримувати відтворювані P2X₃-опосередковані відповіді протягом усього часу проведення експерименту. Підтримуваний потенціал становив –100 мВ.

Опіюїдні пептиди постійно прикладали до досліджуваної клітини в ході вивчення їх впливу на P2X₃-опосередковані відповіді, тобто додавали як до омиваючого клітину зовнішньоклітинного розчину, так і до розчину з агоністом. Опіюїди прикладали до досліджуваного нейрона, поки обумовлений ними ефект не досягав стаціонарного рівня. Ефекти перевірених опіюїдів виражали як відношення амплітуди струму за даної концентрації опіюїду (після

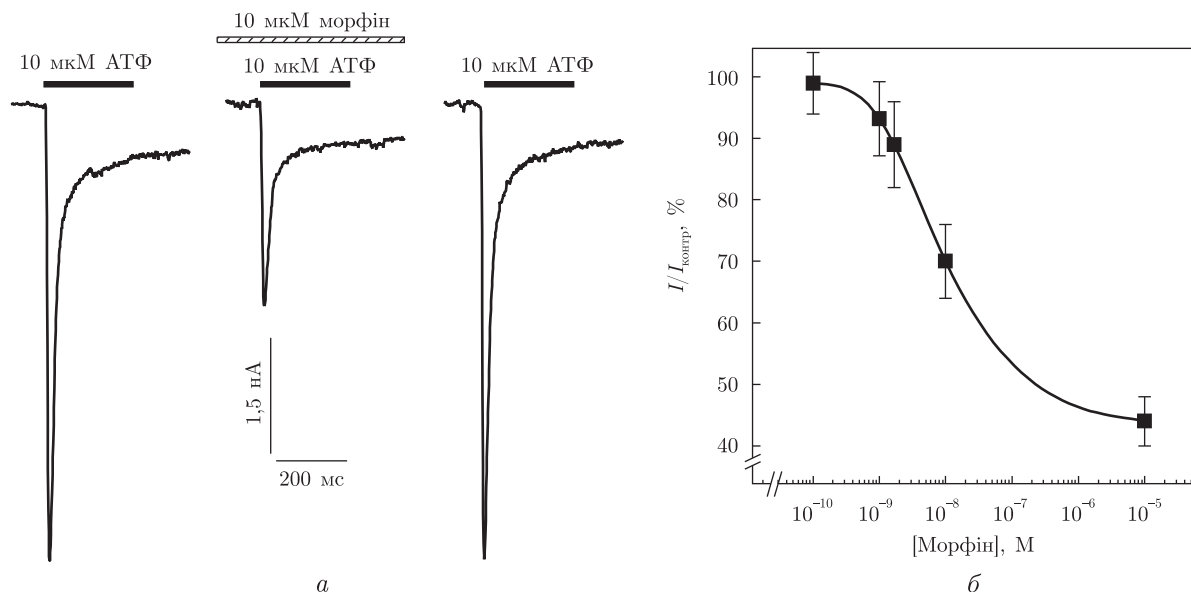


Рис. 1. Вплив морфіну на АТФ-активовані струми, опосередковані P2X3 рецепторами. *a* — вплив насичувальної концентрації морфіну (10 мкМ) на АТФ-індуковані струми. *б* — залежність ефекту, викликаного морфіном, від його концентрації

досягнення стаціонарного рівня) до амплітуди контрольного струму. Отримані значення подані як середнє значення \pm стандартне відхилення. Статистичний аналіз проводили за допомогою *t*-тесту Стьюдента. Різницю вважали значущою при $P < 0,05$. Статистичну обробку одержаних результатів проводили в програмному пакеті Origin 8.0 (OriginLab Corporation, США).

Діючі речовини (агоністи P2X3 та опіоїдних рецепторів, налоксон, форболовий ефір) розчиняли у зовнішньоклітинному розчині. Усі хімічні сполуки, що використовувалися під час проведення експериментів, вироблені компанією “Sigma” (США), за винятком морфіну (“Hungarian Alkaloids”, Угорщина).

Результати досліджень та їх обговорення. Для перевірки гіпотези про існування зв’язку між опіоїдними та P2X3 рецепторами на першому етапі досліджень використали екзогенний ліганд опіоїдних рецепторів — морфін, що є основним опіумним алкалоїдом. У концентрації 10 мкМ морфін пригнічував АТФ-індуковані струми, опосередковані P2X3 рецепторами, у середньому на $(55 \pm 5)\%$ (кількість перевірених клітин $n = 6$, $P < 0,01$, рис. 1, *a*). Причому таке пригнічення було зворотним, тобто амплітуда P2X3-опосередкованих струмів відновлювалася після відмивання опіоїдного пептиду з омиваючого клітину розчину. За такої концентрації морфін був здатен активувати всі підтипи опіоїдних рецепторів.

На наступному етапі досліджень вивчали вплив різних концентрацій морфіну на АТФ-активовані струми. Виявилось, що морфін призводив до зменшення амплітуди P2X3-опосередкованих струмів у широкому концентраційному інтервалі і відчутно пригнічував P2X3-опосередковані струми вже за наномолярних концентрацій. За даними проведених вимірювань побудовано дозову залежність для ефекту, зумовленого морфіном (див. рис. 1, *б*). Відповідно до дозової залежності, IC_{50} морфіну становить $(8,5 \pm 1,3)$ нМ. Порівняння отриманих результатів з існуючими даними про активацію морфіном μ , δ та κ

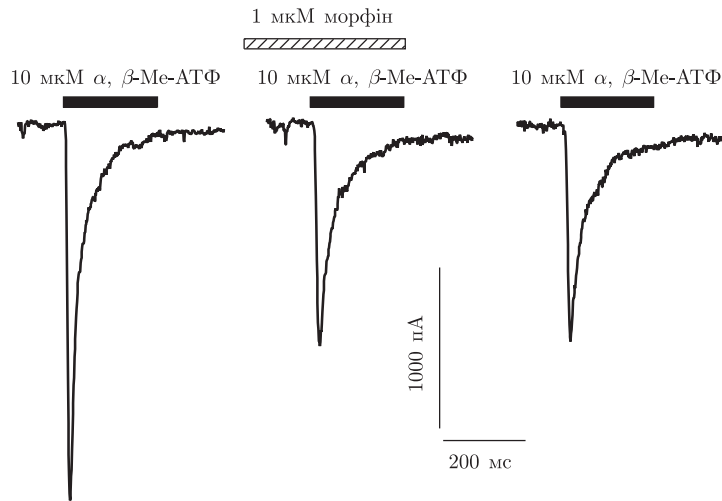


Рис. 2. Вплив насичувальної концентрації морфіну (10 мкМ) на P2X3-опосередковані струми, активовані α, β -Me-ATФ

підтипів опіоїдних рецепторів свідчить про те, що вплив морфіну на P2X3 рецептори опосередковується μ -опіоїдними рецепторами.

ATФ є неселективним агоністом P2 рецепторів, а отже, може активувати метаботропні P2Y рецептори, що, як відомо, здатні пригнічувати P2X рецептори [14, 15]. Аби виключити можливість пригнічення P2X3-опосередкованих струмів внаслідок активації P2Y рецепторів, було використано α, β -Me-ATФ, що не активує P2Y рецептори. Концентрація α, β -Me-ATФ відповідала концентрації ATФ у попередніх експериментах і становила 10 мкМ. У цьому випадку морфін у концентрації 1 мкМ зумовлював зменшення амплітуди струму в середньому на $(45 \pm 5)\%$ ($n = 3$, $P < 0,01$), однак такий ефект виявився незворотним (рис. 2).

Вивчення модуляції P2X3 рецепторів опіоїдами після прикладання ендogenous опіоїдного пептиду Лей-енкефаліну в концентрації 10 мкМ також показало відчутне пригнічення P2X3-опосередкованого струму. Зменшення амплітуди струму в цьому випадку сягало $(36 \pm 9)\%$ ($n = 5$, $P < 0,01$), однак викликаний Лей-енкефаліном ефект виявився незворотним принаймні протягом наступних 30 хв (рис. 3).

Для того щоб переконатися, що викликане опіоїдами зменшення амплітуди ATФ-індукованих струмів зумовлюється активацією опіоїдних рецепторів, Лей-енкефалін прикладали до нейронів ЗКГ разом з інверсним агоністом опіоїдних рецепторів — налоксоном. Під час таких експериментів налоксон у концентрації 50 мкМ прикладали за 45 с до Лей-енкефаліну, а потім і одночасно з ним. Використання підвищеної (порівняно з опіатами) концентрації налоксону та тривалість його преаплікації обумовлювались відносно низькою спорідненістю опіоїдних рецепторів до цього ліганду. Інгібуючий ефект Лей-енкефаліну на фоні прикладання налоксону значно послаблювався (до $(6 \pm 4)\%$, $n = 6$, $P > 0,5$). Подальше прикладання Лей-енкефаліну без налоксону викликало навіть потужніший пригнічувальний ефект, при цьому зменшення амплітуди ATФ-індукованого струму сягало $(46 \pm 5,4)\%$ ($n = 5$, $P < 0,01$; див. рис. 3). Сам по собі налоксон жодним чином не впливав на P2X3-опосередковані струми.

Вплив енкефалінів на P2X3 опосередкований струм досліджували і на прикладі D-Лей-енкефаліну — стереоізомера Лей-енкефаліну, що не гідролізується енкефаліназами.

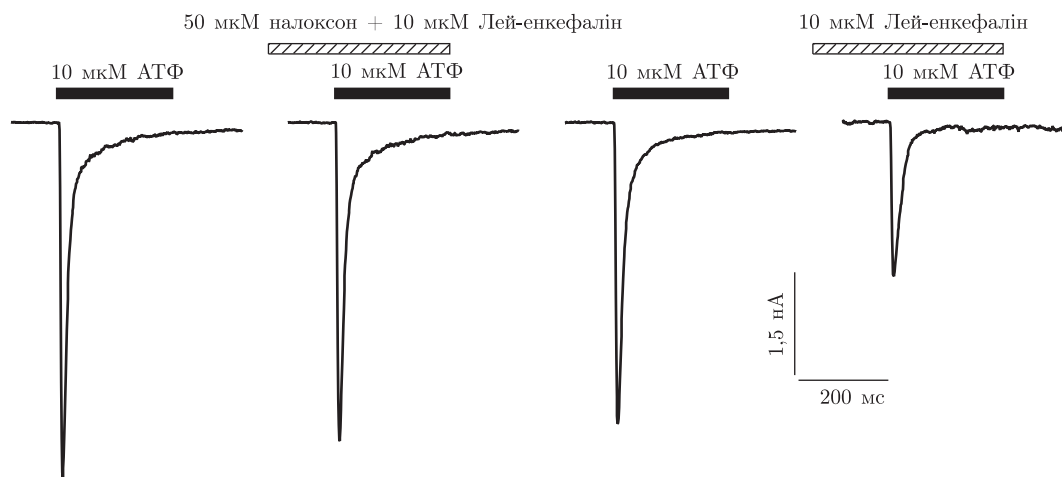


Рис. 3. Вплив Лей-енкефаліну (10 мкМ) на АТФ-активований струм на фоні налоксону (50 мкМ) та без нього

Ефект D-Лей-енкефаліну практично повністю відтворював такий для його стереоізомера. За концентрації D-Лей-енкефаліну 10 мкМ зменшення амплітуди АТФ-індукованих струмів становило $(36 \pm 5)\%$ ($n = 4$, $P < 0,01$), а пригнічувальний ефект також був незворотним.

Незворотність ефектів, викликаних енкефалінами та морфіном при використанні α, β -Me-АТФ як агоніста, може пояснюватися тим, що зв'язок між опіоїдними та P2X3 рецепторами опосередковується внутрішньоклітинними сигнальними системами. У цьому випадку відмивання агоніста від опіоїдного рецептора на мембрані не спричинить одномоментного вимкнення каскадів внутрішньоклітинних реакцій, що опосередковують викликаний дією опіоїду ефект. Однак механізми, що обумовлюють такий феномен, є неочевидними і потребують подальших досліджень.

Аби з'ясувати внутрішньоклітинні механізми, що можуть опосередковувати вплив опіоїдів на P2X3-опосередковані струми, було проведено серію експериментів з форболовим ефіром (РМА). У внутрішньоклітинному сигнальному ланцюжку опіоїдний рецептор — G_q -білок — фосфоліпаза С — трифосфоінозитид — діацилгліцерол — протеїнкіназа С — ефектор РМА виконує роль діацилгліцеролу, активуючи протеїнкіназу С, яка, у свою чергу, шляхом фосфорилляції може змінювати характеристики P2X3 рецептора. Виявилося, що РМА зумовлює потужний пригнічувальний ефект на АТФ-індуковані струми, подібний до ефектів, викликаних енкефалінами. Цей ефект також розвивався досить повільно (щонайменше протягом 20 хв) і був незворотним. Таким чином, отримані дані свідчать про те, що сигнал від опіоїдних до P2X3 рецепторів може передаватися за участю фосфоліпази С, діацилгліцеролу та протеїнкінази С.

1. *Ralevic V., Burnstock G.* Receptors for purines and pyrimidines // *Pharmacol. Revs.* – 1998. – **50**, No 3. – P. 413–492.
2. *Dunn P. M., Zhong Y., Burnstock G.* P2X receptors in peripheral neurons // *Progr. Neurobiol.* – 2001. – **65**, No 2. – P. 107–134.
3. *Jarvis M. F.* Contributions of P2X3 homomeric and heteromeric channels to acute and chronic pain // *Expert. Opin. Ther. Targets.* – 2003. – **7**, No 4. – P. 513–522.
4. *Krishtal O. A., Marchenko S. M., Pidoplichko V. I.* Receptor for ATP in the membrane of mammalian sensory neurones // *Neurosci. Lett.* – 1983. – **35**, No 1. – P. 41–45.
5. *McGaraughty S., Jarvis M. F.* Antinociceptive properties of a non-nucleotide P2X3/P2X2/3 receptor antagonist // *Drug News Perspect.* – 2005. – **18**, No 8. – P. 501–507.

6. Chizh B. A., Illes P. P2X receptors and nociception // Pharmacol. Revs. – 2001. – **53**, No 4. – P. 553–568.
7. Свердлов Ю. Современные проблемы боли // Мед. науч. и учеб.-методич. журн. – 2001. – **1**. – С. 31–40.
8. Janson W., Stein C. Peripheral opioid analgesia // Curr. Pharm. Biotechnol. – 2003. – **4**, No 4. – P. 270–274.
9. Rau K. K., Caudle R. M., Cooper B. Y., Johnson R. D. Diverse immunocytochemical expression of opioid receptors in electrophysiologically defined cells of rat dorsal root ganglia // J. Chem. Neuroanat. – 2005. – **29**, No 4. – P. 255–264.
10. Stein C. Opioid receptors on peripheral sensory neurons // Adv. Exp. Med. Biol. – 2003. – **521**. – P. 69–76.
11. Truong W., Cheng C., Xu Q. G. et al. Mu opioid receptors and analgesia at the site of a peripheral nerve injury // Ann. Neurol. – 2003. – **53**, No 3. – P. 366–375.
12. Chizhnikov I., Yudin Y., Mamenko N., Prudnikov I., Tamarova Z., Krishtal O. Opioids inhibit purinergic nociceptors in the sensory neurons and fibres of rat via a G protein-dependent mechanism // Neuropharmacology. – 2005. – **48**, No 5. – P. 639–647.
13. Pankratov Y., Lalo U. V., Dashkin A. N., Krishtal A. Heterogeneity of the functional expression of P2X3 and P2X2/3 receptors in the primary nociceptive neurons of rat // Neurochem. Res. – 2001. – **26**, No 8–9. – P. 993–1000.
14. Gerevich Z., Muller C., Illes P. Metabotropic P2Y1 receptors inhibit P2X3 receptor-channels in rat dorsal root ganglion neurons // Eur. J. Pharmacol. – 2005. – **521**, No 1–3. – P. 34–38.
15. Gerevich Z., Zadori Z., Muller C. et al. Metabotropic P2Y receptors inhibit P2X3 receptor-channels via G protein-dependent facilitation of their desensitization // Brit. J. Pharmacol. – 2007. – **151**, No 2. – P. 226–236.

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 30.03.2009

M. V. Mamenko, I. M. Prudnikov,
Academician of the NAS of Ukraine **O. O. Krishtal**

Opioids inhibit P2X3-mediated currents in rat sensory neurones

P2X3 receptors, localized on peripheral and central terminals of primary sensory neurones, are involved in persistent nociceptive signalling. Activation of peripheral opioid receptors by local administration of agonists produces potent analgesia in animals and humans. We have found that P2X3-mediated responses were inhibited by opioids in rat sensory neurones. ATP-activated currents were inhibited by approximately 50% by saturating concentrations of opioid peptides: morphine, Leu-enkephalin, D-Leu-enkephalin. When Leu-enkephalin was applied in the presence of 50 μ M of naloxone, ATP-evoked currents were not inhibited by more than 10%. Naloxone itself did not affect the responses. The effect of opioids was mimicked by phorbol ester (PMA), indicating that signal transduction between opioid and P2X3 receptors can be mediated by G-proteins and protein kinase C.