



УДК 612.815.1:612.822

## РОЛЬ ФОСФОЛПАЗИ С У РЕГУЛЯЦІЇ АКТИВНОСТІ P2X3-РЕЦЕПТОРІВ СЕНСОРНИХ НЕЙРОНІВ ЩУРІВ ЕНДОГЕННИМ ОПІОЇДОМ ЛЕЙ-ЕНКЕФАЛІНОМ

Студ. І.Л. Семенкова<sup>1</sup>, гр. БХФ -13  
н.с. О.В. Єгорова<sup>2</sup>

Науковий керівник асист. 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** - з'ясувати молекулярні механізми, що залучені до інгібуючого впливу опіоїдів на P2X3-рецептори в первинних сенсорних нейронах.

**Завдання** - встановити роль внутрішньоклітинних біохімічних каскадів у процесі взаємодії опіоїдних- та P2X3-рецепторів у сенсорних нейронах щурів; окреслити значення фосфоліпази С та активності P2X3-рецепторів у опіоїд-індукованому знеболенні.

**Об'єкт дослідження:** молекулярні внутрішньоклітинні механізми в первинних сенсорних нейронах під час впливу ендogenous опіоїда лей-енкефаліну (ЛЕЙ) на P2X3-рецептори.

**Методи та засоби дослідження:** фіксація потенціалу на мембрані в режимі відведення від цілої клітини, внутрішньоклітинна перфузія, культивування первинних сенсорних нейронів, застосування активаторів та блокаторів вторинних клітинних посередників, статистичні методи.

**Наукова новизна та практичне значення отриманих результатів** - вперше встановлено, що інгібуючий вплив ендogenous опіоїда ЛЕЙ на P2X3-рецептори у сенсорних нейронах щурів опосередковується фосфоліпазою С; активація фосфоліпази С у первинних сенсорних нейронах може сприяти поліпшенню ефективності знеболюючої дії опіоїдних препаратів.

**Результати дослідження** Літературні джерела свідчать, що P2X3-рецептори беруть участь у генерації больового відчуття, а активація опіоїдних рецепторів призводить до знеболення. Окрім того, обидва типи рецепторів експресується у первинних сенсорних нейронах. Тож ми вирішили перевірити існування зв'язку між цими двома типами рецепторів та з'ясувати можливі молекулярні механізми такого зв'язку.

Добре відомо, що активація метаботропних опіоїдних рецепторів може залучати два найбільш поширені внутрішньоклітинні сигнальні шляхи: інгібування активності аденілатциклази (АС), та активацію фосфоліпази С (ФЛС). Відомо, що ліпідний компонент плазматичної мембрани - фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат (ФІФ<sub>2</sub>) справляє регуляторний вплив на мембранні протеїни та іонні канали, в тому числі і P2X<sub>3</sub>-рецептори. Виснаження пулу ФІФ<sub>2</sub> призводить до інгібування активності останніх, а додавання його до цитозолу чинить зворотний ефект. Тому, опіоїд – індукована активація ФЛС і в свою чергу гідроліз ФІФ<sub>2</sub> може лежати в основі інгібування P2X<sub>3</sub>-струмів.

Активація ФЛС призводить до гідролізу мембранного фосфоліпиду – фосфоінозитолдифосфату (ФІФ<sub>2</sub>) на дві сигнальні молекули: інозитолтрифосфат (ІФ<sub>3</sub>), який мобілізує іони Ca<sup>2+</sup> з внутрішньоклітинних депо і диацилгліцерол (ДАГ), який активує протеїнкіназу С (ПКС). Беручи це до уваги, було цікаво перевірити, який з цих шляхів є посередником інгібуючого впливу ЛЕЙ на P2X3-струми в сенсорних нейронах. Для цього блокатор ФЛС – U-73122 у концентрації 1 мкМ прикладали до нейронів спінальних гангліїв (СГ) на тлі інгібуючої дії ЛЕЙ, після того, коли P2X3-



струми були повністю заблоковані високими дозами зазначеного опіюду (1 мкМ). Прикладання U-73122 призводило до відновлення амплітуд P2X3-струмів у середньому на  $87 \pm 11\%$  ( $n = 4$ ), порівняно з контролем. Це спостереження дало змогу припустити, що викликане опіюдом інгібування P2X3-струмів може опосередковуватись ФЛС.

Щоб переконатися з іншого боку, що активація ФЛС може зумовлювати інгібуючий вплив ЛЕЙ на P2X3-рецептори, ми застосовували m-3M3FBS – синтетичний активатор ФЛС, котрий здатний проникати до клітини через мембрану. Прикладання цього активатора до нейронів СГ у концентрації 20 мкМ, призводило до пригнічення P2X3- струму у середньому на  $72 \pm 0,06\%$ , ( $n = 5$ ). Ефект був повністю оборотним, заміна розчину з m – 3M3FBS на нормальний, сприяла повільному (10–12 хв) та повному відновленню амплітуд P2X3-струму до контрольних значень. Оскільки показано, що активація ФЛС призводить до гідролізу мембранного фосфоліпіда – фосфатидилінозитол 4, 5 – дифосфату (ФІФ<sub>2</sub>), а з іншого боку ФІФ<sub>2</sub> підтримує активність P2X3-рецепторів, результати наступного експерименту дозволяють припустити, що гідроліз ФІФ<sub>2</sub> залучений до механізму інгібування P2X3-струмів.

Відомо, що рівень концентрації мембранного, функціонально зв'язаного з P2X3-рецепторами ФІФ<sub>2</sub>, визначається двома факторами: базальною активністю ФЛС, яка гідролізує ФІФ<sub>2</sub> та активністю кіназ, що залучені до синтезу останнього. Враховуючи те, що опіюдні агоністи, активують ФЛС, а з іншого боку, активація самої ФЛС призводить до інгібування P2X3-струму, аналогічно із впливом ЛЕЙ, нам потрібно було переконатися у тому, що активність ФЛС та виснаження рівня мембранного ФІФ<sub>2</sub>, може контролюватись активацією опіюдних рецепторів. Для цього ми використовували вортманін – інгібітор кіназ, що задіяні до синтезу ФІФ<sub>2</sub> у концентрації 35 мкМ. Зарубіжними колегами було показано, що порушуючи синтез ФІФ<sub>3</sub> або ФІФ<sub>2</sub> кіназ, шляхом інкубації з вортманіном – метаболітом гриба *Penicillium Funiculosum*, мембранні фосфоінозитиди можуть регулювати активність P2X3-опосередкованих струмів.

У наших експериментах, після інкубації нейронів СГ з вортманіном (24 години), ЛЕЙ у низькій концентрації (10 нМ) спричиняв посилення та прискорення інгібуючого впливу на P2X3-струми. Прикладання ЛЕЙ до нейронів СГ (10 нМ) протягом 4 хвилин, призводило до інгібування швидкої компоненти десенситизації інтегрального P2X3/P2X2/3-опосередкованого струму у середньому на  $83 \pm 7\%$ ; ( $n = 4$ ), у інкубованих з вортманіном нейронах. Тоді як в аналогічних експериментах (без інкубації з вортманіном) ЛЕЙ (10 нМ), пригнічував P2X3-струми у середньому на  $53 \pm 11\%$ , ( $n = 5$ ). Цей ефект був частково оборотним, заміна розчину з ЛЕЙ на нормальний, не призводила до повного відновлення амплітуд P2X3-струмів, оскільки заблоковані кінази, не можуть швидко відновити пул ФІФ<sub>2</sub> до контрольного рівня. Прискорення інгібуючого ефекту, пояснюється швидким виснаженням мембранного ФІФ<sub>2</sub>, оскільки, опіюдно-індукована активація ФЛС, призводить до гідролізу ФІФ<sub>2</sub>, а вортманін – інгібітор кіназ, що залучені до синтезу ФІФ<sub>2</sub>. Таким чином, рівень концентрації мембранного ФІФ<sub>2</sub> впливає на швидкість та ефективність пригнічення P2X3-рецепторів ЛЕЙ. Це вкотре доводить про те, що вплив ендogenous опіюда на P2X3-рецептори опосередкований активністю фосфоліпази С.

**Висновки** Активація опіюдних рецепторів ендogenous опіюдом ЛЕЙ призводить до інгібування P2X3-рецепторів у нейронах СГ. Цей ефект опосередкований активністю ФЛС, що підтверджується інгібуванням P2X3-рецепторів під час застосування активатора ФЛС та усуненням інгібуючої дії ЛЕЙ на P2X3-рецептори у момент аплікації блокатора ФЛС.

**Ключові слова:** фосфоліпаза С, опіюдні рецептори, лей-енкефалін, P2X3-рецептори.