

УДК 612.815.1:612.822

## ЗАЛЕЖНІСТЬ ВПЛИВУ ОПІОЇДІВ НА P2X3-РЕЦЕПТОРИ В НЕЙРОНАХ ДОРСАЛЬНИХ ГАНГЛІЇВ ВІД КОНФОРМАЦІЙНОГО СТАНУ G-БІЛКІВ

Студ. К.О.Журавель<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:** - виявити можливі зміни у регуляції активності P2X3-рецепторів (ноціцепторів) ендogenous опіоїдом залежно від конформаційного стану G-білків.

**Завдання:** - визначити особливості впливу ендogenous опіоїда лей-енкефаліну (ЛЕЙ) на активність P2X3-рецепторів нейронів дорсальних гангліїв шурів залежно від концентрації зазначеного опіоїда; - з'ясувати роль G-білків опіоїдних рецепторів у молекулярних механізмах залучених до регуляції P2X3-рецепторів.

**Об'єкт дослідження:** модуляція функцій P2X3-рецепторів у нейронах дорсальних гангліїв шурів під впливом ендogenous опіоїда ЛЕЙ.

**Методи та засоби дослідження:** фіксація потенціалу на мембрані в режимі відведення від цілої клітини, внутрішньоклітинна перфузія, культивування нейронів дорсальних гангліїв, статистичні методи.

**Наукова новизна та практичне значення отриманих результатів:** - вперше досліджено подвійний вплив ендogenous опіоїда ЛЕЙ на P2X3-рецептори нейронів дорсальних гангліїв шурів; - встановлено роль активності G-білків опіоїдних рецепторів (Gi/o- та Gq-) у регуляції ноціцепторів.

**Результати дослідження:** Опіоїдно – індукована аналгезія, широко застосовується в клінічній практиці, проте питання молекулярного механізму знеболення достеменно не з'ясовано. Нині доведено, що опіоїдні рецептори експресуються за межами ЦНС і можуть стати цінним активом в індукції аналгетичного ефекту, позбавленого недоліків, характерних для активації їх центральних аналогів. Числені клінічні звіти свідчать, що непроникні через гематоенцефалічний бар'єр опіоїди, володіють аналогічним із звичайними опіоїдами знеболюючим потенціалом. Під час вивчення впливу опіоїдів на P2X3-рецептори нейронів дорсальних гангліїв, опіоїдний агоніст ЛЕЙ додавався до омиваючого клітину розчину. Таким чином, ЛЕЙ неперервно прикладався до клітини в ході дослідження його впливу на P2X3-опосередковані струми. Розчин з опіоїдним агоністом прикладався до досліджуваного нейрона, доки викликане опіоїдом пригнічення P2X3-опосередкованого струму не досягало стаціонарного значення. Прикладання ЛЕЙ до нейронів спінальних гангліїв у контролі, призводило до двох можливих результатів: або він не справляв ніякого ефекту, або викликав інгібування P2X3-опосередкованих струмів залежно від концентрації ЛЕЙ та часу прикладання (25,8% нейронів від загальної кількості протестованих). Виявилось, що ендogenous агоніст опіоїдних рецепторів – ЛЕЙ відчутно пригнічує активність P2X3-рецепторів у нейронах дорсальних гангліїв шурів. Аплікація ЛЕЙ у концентраціях 10 нМ, 100 нМ та 1 мкМ призводила до інгібування P2X3-струмів у середньому на  $53 \pm 11$  % (n = 5);  $74 \pm 8$  % (n = 6) та  $99 \pm 1$  % (n = 6), відповідно. Часовий хід інгібуючої дії був прискорений збільшенням концентрації ЛЕЙ і досягав стаціонарного рівня за 12, 8 і менше 2 хв при концентрації 10 нМ, 100 нМ і 1 мкМ відповідно. Ці результати вказують на те, що саме



кінетика зв'язування ЛЕЙ з опіоїдними рецепторами, а не швидкість передачі внутрішньоклітинного сигналу є лімітуючим фактором в інгібуванні P2X3-рецепторів. Інгібуючий ефект ЛЕЙ був оборотним: амплітуда струмів повністю відновлювалася протягом 6-8 хв після вимивання опіоїда від клітини, при всіх концентраціях. Слід зауважити, що у всіх опіоїдно-чутливих нейронів, застосування 1 нМ ЛЕЙ не викликало змін параметрів P2X3-струмів, проте подальше прикладання 1 мкМ ЛЕЙ до тієї ж клітини завжди призводило до повного інгібування P2X3-рецепторів. Як вже зазначено, прикладання 1 мкМ ЛЕЙ спричиняло блокування P2X3-рецептор-опосередкованих струмів на  $99 \pm 1\%$  ( $n = 6$ ). Аналогічним чином селективний для  $\mu$ -опіоїдних рецепторів агоніст ендоморфін-1 у концентрації 100 нМ майже повністю (на  $97 \pm 2\%$ ,  $n = 3$ ) блокував P2X3-опосередковані струми. Результати цього експерименту вказують на те, що викликана опіоїдами регуляція P2X3-рецепторів опосередковується активацією  $\mu$ -опіоїдних рецепторів. Відомо, що блокування  $G_{i/o}$ -білків, зв'язаних з опіоїдними рецепторами, токсином коклюшу (пертуситоксин), відчутно підсилює потенціацію P2X2/3-опосередкованих струмів у нейронах нижніх шийних гангліїв. P2X2/3- та P2X3-рецептори, експресуються субпопуляцією нейронів дорсальних гангліїв, що відповідають за сприйняття та передачу болю. Тому ці рецептори є перспективними мішенями для створення знеболювальних препаратів. В рамках даної роботи, оцінено внесок активності P2X3-рецепторів до низки процесів, що активуються під час знеболення опіоїдами у периферичній нервовій системі. Також, нами продемонстровано подвійний (інгібуючий та стимулюючий) вплив ЛЕЙ на P2X3-рецептори, котрі активувалися  $\alpha, \beta$ -Me-ATФ у дорсальних сенсорних нейронах щурів. ЛЕЙ в концентрації 10 нМ зворотно пригнічував на 53% P2X3-опосередковані струми (P2X3-струми). Конкурентний антагоніст опіоїдних рецепторів – налоксон, сприяв повному усуненню ефекту ЛЕЙ, що вказувало на залучення саме опіоїдних рецепторів до регуляції активності P2X3-рецепторів опіоїдом. У перебігу численних досліджень *in vivo*, було показано, що хронічне застосування опіоїдних антагоністів (налоксону, налтрексону) збільшує ефективність знеболюючого впливу опіоїдів. Створивши адекватну модель хронічного впливу опіоїдних антагоністів на нейрони дорсальних гангліїв (інкубація культивованих нейронів із налоксоном (1 мкМ)), ми виявили посилення інгібуючого впливу ЛЕЙ на P2X3-струми. Про це свідчило зменшення значення напівмаксимальної ефективної концентрації (EC50) для інгібуючої дії ЛЕК на P2X3-рецептори з 10 нМ (контроль) до 1 нМ (після інкубації з налоксоном).

Оскільки в літературі описано про те, що опіоїдні рецептори можуть набувати декількох конформаційних станів, тобто зв'язуватися з G-білками, що інгібують аденілатциклазу ( $G_{i/o}$ -типу) або з тими, що стимулюють останню ( $G_q$ -типу). Щоб з'ясувати роль обох типів G-білків опіоїдних рецепторів у регуляції активності P2X3-рецепторів, ми застосували селективний блокатор до інгібуючих G-білків ( $G_{i/o}$ -типу) – токсин коклюшу. Під час проведення такого експерименту ми фіксували лише стимулюючий вплив ЛЕЙ на P2X3-рецептори. Отже, стимулюючі  $G_q$ -білки опіоїдних рецепторів, які залишились в активному стані після блокування  $G_{i/o}$ -білків, викликали стимулюючий вплив ендогенного опіоїда ЛЕЙ на P2X3-рецептори.

**Висновки.** Таким чином, подвійний вплив опіоїдів на P2X3-рецептори опосередкований активністю двох типів G-білків опіоїдних рецепторів, представлених на мембранах нейронів дорсальних гангліїв. Розуміння молекулярних механізмів впливу опіоїдів на рецептори та іонні канали сприятиме створенню нових фармакологічних засобів для пригнічення болю.

**Ключові слова:** опіоїдні рецептори, P2X3-рецептори, нейрони дорсальних гангліїв.