

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ**

**Кулик В'ячеслав Борисович**

УДК 612.815.1:612.822

**ОПІОЇДЕРГІЧНА РЕГУЛЯЦІЯ АКТИВНОСТІ P2X3-РЕЦЕПТОРІВ  
У НЕЙРОНАХ СПІНАЛЬНИХ ГАНГЛІЇВ**

**03.00.13 – фізіологія людини і тварин**

**Автореферат**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

**Київ – 2016**

## Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі фізико-хімічної біології клітинних мембран Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця Національної Академії Наук України

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук, професор, академік НАН України **Кришталь Олег Олександрович**, Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, зав. відділом фізико-хімічної біології клітинних мембран

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор **Макарчук Микола Юхимович**, ННЦ “Інститут біології” КНУ імені Тараса Шевченка, завідувач кафедри фізіології людини та тварин

доктор біологічних наук, професор **Філоненко Валерій Вікторович**, Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, завідувач відділу сигнальних систем клітини

Захист відбудеться «\_\_»\_\_\_\_\_ р. о\_\_ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, Київ, вул. Богомольця, 4.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: вул. Богомольця, 4, Київ 01024.

Автореферат розіслано \_\_\_ \_\_\_\_\_ 2016 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради,  
кандидат біологічних наук

Любанова О.П.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Традиційно вважається, що аналгетичний ефект опіоїдів зумовлений їх дією на механізми ЦНС. Проте, останнім часом накопичуються докази того, що потужного знеболюючого ефекту можна досягти активацією опіоїдних рецепторів на периферії (особливо при запальних процесах). Відомо, що P2X3-рецептори, які експресуються в первинних сенсорних нейронах і активуються АТФ та її аналогами, задіяні у модуляцію больової чутливості. Наприклад, периферичне чи інтраспінальне введення АТФ або інших агоністів P2X-рецепторів викликає «больову» поведінку у тварин, а також підвищує чутливість до больових стимулів у людини та тварин (G. Burnstock., 1972). Водночас, введення селективних антагоністів рецепторів, що містять P2X3-субодиницю, повністю блокує невропатичний та викликаний запаленням біль у піддослідних тварин (K. Alexander *et.al.*, 1999).

Наявність опіоїдних рецепторів була показана у периферичних закінченнях тонких мієлінізованих та немієлінізованих волокон шкірних нервів, які залучені до сприйняття болю. Спряжені з G<sub>i</sub>-білками опіоїдні рецептори синтезуються в сомах первинних сенсорних нейронів і з током аксоплазми переносяться у відростки, де й вбудовуються в плазматичну мембрану. Активація опіоїдних рецепторів призводить до зменшення збудливості ноціцепторів. Відомо, що опіоїди здатні пригнічувати активність тетродотоксин-нечутливих натрієвих каналів та ванілоїдних рецепторів, створюючи периферичний ефект знеболення (Y. Cao *et.al.*, 2014). Численні клінічні звіти свідчать про те, що опіоїди, котрі не проникають через гемато-енцефалічний бар'єр, мають знеболюючий потенціал аналогічний звичайним опіоїдам. Периферична опіоїдна аналгезія може мати ряд переваг над центральною, оскільки цей ефект позбавлений небажаних центральних наслідків впливу опіоїдів - пригнічення дихання, депресії, індукції рефлексу блювання, формування залежності та ін. До того ж кількість опіоїдних рецепторів на ноціцептивних терміналях та їх доступність для відповідних лігандів зростають в ході запалення, з яким пов'язана переважна кількість больових відчуттів у людини (Y. Cao *et.al.*, 2014). Спільна експресія опіоїдних та P2X3-рецепторів на мембранах нейронів спінальних гангліїв (СГ) обумовлює актуальність пошуку зв'язку між цими об'єктами. Беручи до уваги функціональне призначення цих двох типів рецепторів у організмі, дослідження взаємодії опіоїдних та P2X3-рецепторів на клітинному рівні набувають особливого значення.

Опіоїд-індукована аналгезія широко застосовується в клінічній практиці, проте питання молекулярних механізмів такого знеболення достеменно не з'ясовано. В рамках даної роботи вперше оцінено внесок активності P2X3-рецепторів до низки процесів, що залучаються у знеболення, викликане опіоїдами на рівні периферичної нервової системи. Також вперше окреслено роль первинних біохімічних шляхів у взаємодії опіоїдних рецепторів, котрі опосередковують ефект аналгезії, з P2X3-рецепторами, що відповідають за ноціцепцію.

Пошук фармакологічних інструментів для контролю механізмів, що впливають на функціональний взаємозв'язок між опіоїдними та P2X3-рецепторами, є одним з важливих завдань на шляху вирішення проблем, пов'язаних з терапією болю.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Роботу виконано відповідно загальному плану наукових досліджень у відділі фізико-хімічної біології клітинних мембран Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України: "Механізми внутрішньоклітинної та міжклітинної сигналізації; вивчення

шляхів їх модуляції та пошук нових фармакологічних впливів”(№ державної реєстрації – 0107U010843), в ході виконання теми: “Ендогенна та фармакологічна регуляція внутрішньоклітинної та міжклітинної сигналізації в клітинах нервової системи в нормі та патології” (№ державної реєстрації – 0110U004750), у рамках науково-дослідних робіт: “Іонні канали клітинних мембран: функціональна роль в нормі та патології” (№ державної реєстрації - 0113U003964) та “Клітинні сигнальні системи в нормі та патології” (№ державної реєстрації - 0113U007273), а також у рамках гранту для молодих вчених НАН України: “Дослідження молекулярних механізмів знеболення, викликаного опіоїдними анальгетиками” (№ державної реєстрації - 0115U003830)

**Мета дослідження.** Мета даної роботи - визначення впливу опіоїдних рецепторів на активність P2X3-пуринорецепторів у первинних соматосенсорних нейронах СГ щурів.

**Завдання дослідження:**

1. Охарактеризувати вплив ендogenous опіоїда – лей-енкефаліну (ЛЕК) на P2X3-опосередковані струми у нейронах СГ.

2. Ідентифікувати тип опіоїдних рецепторів, активація яких впливає на P2X3-рецептори.

3. Визначити роль G-білків у передачі внутрішньоклітинного сигналу від опіоїдних до P2X3-рецепторів у первинних сенсорних нейронах.

4. З'ясувати молекулярні механізми, котрі залучені до взаємодії опіоїдних та P2X3-рецепторів.

5. Встановити роль іонів  $Ca^{2+}$  у механізмах опіоїд-індукованої модуляції активності P2X3-рецепторів у нейронах СГ.

*Об'єкт дослідження:* регуляція функції P2X3-рецепторів у нейронах СГ ендogenous опіоїдом, ЛЕК.

*Предмет дослідження:* вплив ЛЕК на P2X3-опосередковані струми сенсорних нейронів щурів та ідентифікація механізмів, що лежать в основі такого впливу.

*Методи дослідження:* культивування первинних соматосенсорних нейронів, внутрішньоклітинна перфузія, метод фіксації потенціалу в режимі відведення від цілої клітини, метод візуалізації змін внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію.

**Наукова новизна одержаних результатів.** В дисертаційній роботі вперше показано та досліджено подвійний вплив ендogenous агоніста опіоїдних рецепторів лей-енкефаліну (ЛЕК) на струми, опосередковані P2X3-рецепторами у соматосенсорних нейронах спінальних гангліїв щурів. Встановлено, що вплив ЛЕК на P2X3-опосередковані струми в сенсорних нейронах забезпечується низкою G-білок-спряжених процесів. Доведено, що ЛЕК не впливає на десенситизацію P2X3-рецепторів, а амбівалентна дія опіоїда на зазначені рецептори може опосередковуватися активацією G-білків, чутливих до токсину кашлюку  $G_{i/o}$ - та нечутливих до цього токсину  $G_q$ -білків. Зокрема, вперше показано, що зв'язування ЛЕК з  $\mu$ -опіоїдними рецепторами призводить до одночасної активації G-білків обох типів, які мали б справляти подвійний вплив на P2X3-рецептори. Однак в контрольних умовах ми реєстрували лише інгібуючий вплив ЛЕК. Стимулюючий ефект ендogenous опіоїда був прихований і проявлявся лише в умовах блокування  $G_{i/o}$ -білків токсином кашлюку.

Таким чином, нами вперше показано, що ендogenous агоніст опіоїдних рецепторів викликає два протилежно спрямовані впливи на P2X3-рецептори нейронів СГ, причому обидва ефекти опосередковані активацією фосфоліпази С.

**Теоретичне та практичне значення одержаних результатів.** Проведені дослідження дозволили виявити та охарактеризувати зв'язок між  $\mu$ -опіоїдними та P2X3-рецепторами первинних соматосенсорних нейронів СГ щурів, що проявляється в здатності ендogenous опіоїда ЛЕК модулювати струми, опосередковані P2X3-рецепторами у цих нейронах. Результати експериментів розкривають нову функціональну роль опіоїдів, котрі беруть участь у регуляції активності первинних ноціцептивних нейронів. Отримані результати розширюють існуючі уявлення про низку механізмів, що обумовлюють знеболюючий ефект опіоїдів, викликаний їх локальним периферичним застосуванням. Крім того, результати досліджень свідчать про існування раніше не описаних шляхів регуляції активності P2X3-рецепторів у сенсорних нейронах.

Існування різноспрямованих ефектів, викликаних ЛЕК, мають істотне практичне значення для розуміння проблем, пов'язаних з добре відомим переходом інгібуючої дії опіоїдів (аналгезії) до стимулюючих ефектів (розвиток гіпералгезії та/або алодинії в умовах хронічного застосування опіоїдів). З'ясування біохімічних шляхів, що змінюють чутливість до опіоїдів, є важливим завданням для майбутніх досліджень у галузі фізіології та фармакології болю.

**Особистий внесок здобувача.** Усі експериментальні дослідження виконувалися за безпосередньої участі здобувача. Підбір та опрацювання літературних джерел, виділення та культивування нейронів СГ, кількісна обробка результатів також здійснювалися особисто автором роботи. Здобувач брав активну участь у плануванні напрямків досліджень, обговоренні та аналізі отриманих результатів. Розробка стратегії досліджень, аналіз та узагальнення результатів здійснювалися спільно з керівником роботи акад. НАН України, д. б. н., проф., О. О. Кришталем та к. б. н. І. В. Чижмаковим, з якими автор має спільні публікації. Автор щиро вдячний старшому науковому співробітнику, к. б. н. І. В. Чижмакову за корисні поради і зауваження під час проведення експериментів та при обговоренні результатів роботи, а також н.с. Т.М. Волковій за активну керівну допомогу під час оволодіння методами виділення та культивування нейронів СГ щурів.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертаційної роботи були представлені для обговорення на Спільному з'їзді Турецького товариства фізіологічної науки.(Стамбул, Туреччина, 2011 р.), у двох публікаціях на VIII Міжнародному симпозіумі "Актуальные проблемы биофизической медицины". (Київ, 2014), у двох публікаціях на VI Конгресі Українського товариства нейронаук. (Київ, 2014), у двох публікаціях на VII Міжнародній науковій конференції "Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології" (Київ 2014) та на щорічних школах-семінарах «Біофізичні методи дослідження» для студентів, які проводяться з 2008 р. в Києві на базі Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

**Публікації.** За результатами роботи опубліковано 5 статей у фахових наукових журналах, затверджених ВАК України, та тези 7 доповідей у збірках матеріалів наукових конференцій та з'їздів.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, викладення результатів дослідження, обговорення результатів, висновків та списку використаних джерел (209 найменувань). Робота викладена на 128 сторінках та проілюстрована 24 рисунками.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Огляд літературних даних** складається з дев'яти підрозділів, в яких наведено інформацію про структуру та основні характеристики рецепторів P2X-типу та опіоїдних

рецепторів, висвітлені відомості стосовно експресії P2X3-рецепторів у первинних сенсорних нейронах, описано електрофізіологічні та фармакологічні властивості P2X3-рецепторів, зазначено фізіологічну роль P2X3-рецепторів та ендogenous опіоїдної системи в механізмах болю та антиноціцепції.

**Матеріали та методи досліджень.** В розділі обґрунтовано вибір об'єкту дослідження – культури дисоційованих нейронів спінальних гангліїв – як адекватної дослідницької моделі.

*Приготування культури дисоційованих нейронів спінальних гангліїв.* Після видалення дорсальних СГ щурів та ферментної обробки їх у розчині трипсину (4 мг/мл, Sigma, США) та колагенази (2 мг/мл, Sigma) отримана суспензія клітин переносилася на покривні скельця, розміщені у стерильних чашках Петрі. Краплину розчину з суспензією нейронів на покривному скельці залишали в спокої протягом 20 хв, аби клітини могли прикріпитися до дна скельця. Після цього чашки Петрі заповнювали 2-3 мл середовища для культивування (середовище MEM, з додаванням інсуліну, 10% фетальної телячої сироватки крові та пеніцилін/стрептоміцину; усі використані речовини фірми Sigma, США) та вміщували у CO<sub>2</sub> інкубатор. Нейрони перебували в інкубаторі протягом 24 год за температури 37 °С. Отримані в такий спосіб нейрони СГ використовувалися для електрофізіологічних вимірювань.

*Електрофізіологія.* Реєстрацію струмів, опосередкованих P2X3- та P2X2/3-рецепторами, проводили методом фіксації потенціалу (петч-клемп) в режимі відведення від цілої клітини (конфігурація “whole cell”). Під час проведення експериментів використовувався стандартний позаклітинний розчин такого складу (у ммоль/л): 130 NaCl; 5 KCl; 2 CaCl<sub>2</sub>; 2 MgCl<sub>2</sub>; 10 HEPES. рН розчину доводили до 7,3-7,35 за допомогою NaOH. Реєструючі мікропіпетки заповнювалися внутрішньоклітинним розчином, що містив (у ммоль/л): 130 KCl, 10 Hepes, 10 EGTA, 0,5 ГТФ, 5 АТФ. рН розчину доводили до 7,3 за допомогою КОН. Мікропіпетки для відведення P2X3-опосередкованих струмів в нейронах СГ мали опір 6 – 9 МОм.

*Аналіз даних.* Ступінь пригнічення P2X3-опосередкованих струмів опіоїдами визначався співвідношенням  $I/I_k$ , де  $I_k$  – усереднене значення амплітуди контрольного струму (після проведення кількох вимірювань), а  $I$  – амплітуда струму, відведеного від нейрона після того, як пригнічуючий ефект опіоїду досяг стаціонарного рівня. Амплітуду струму вимірювали від базової лінії до його пікового значення.

Концентраційну залежність для викликаного ефекту ЛЕК-індукованого пригнічення амплітуди АТФ-активованих струмів у нейронах СГ апроксимували

рівнянням Хілла: 
$$A = A_{\max} - \frac{A_{\max} - A_{\min}}{1 + 10^{(\log EK_{50} - X) \cdot h}}$$
, де  $A$  – нормована амплітуда АТФ-індукованого струму, відведеного за досліджуваної концентрації ЛЕК  $X$ ,  $A_{\max}$  – асимптотичне значення максимальної нормованої амплітуди струму (за мінімальної концентрації та впливу ЛЕК),  $A_{\min}$  – мінімальна нормована амплітуда струму (за насичуючої концентрації ЛЕК, коли пригнічуючий ефект опіоїду є максимальним),  $EK_{50}$  – концентрація морфіну, за якої пригнічення амплітуди струму складає половину максимального,  $h$  – коефіцієнт Хілла. Експериментальні дані представлені у вигляді середніх арифметичних значень вимірів із стандартним відхиленням. Статистична вірогідність відмінності при міжгрупових порівняннях із контролем оцінювалася за допомогою t-тесту Стьюдента; відмінність вважалася значущою за  $P < 0,05$ . Статистична обробка одержаних результатів проводилася у програмному пакеті Origin 8.0 (OriginLab Corp. США).

## Результати досліджень.

### 1. Пригнічення P2X3-рецепторів при дії ЛЕК.

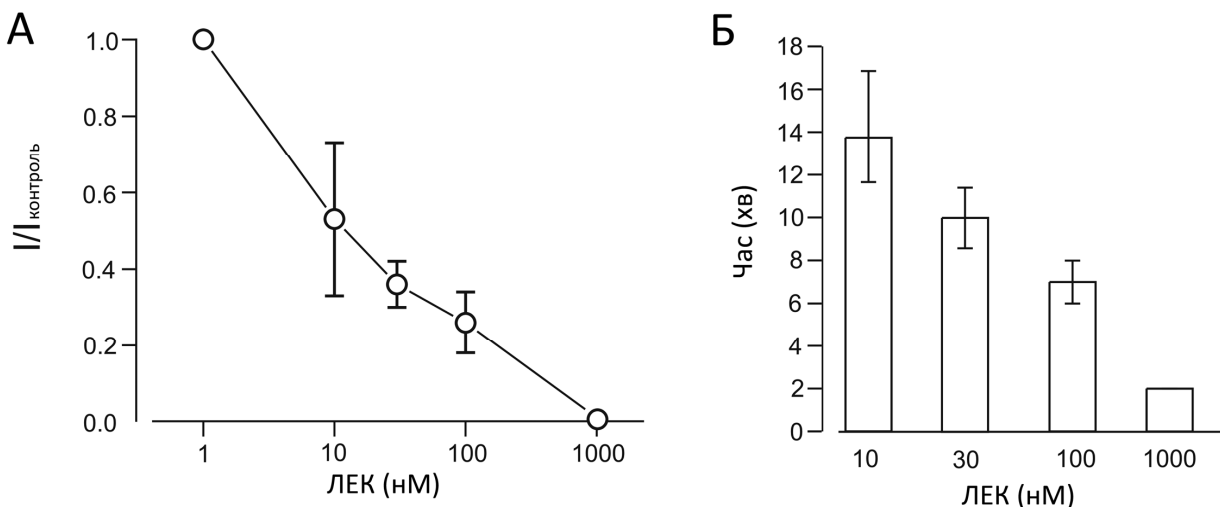
Для дослідження були відібрані нейрони СГ в яких проявлялася активність P2X3-рецепторів. P2X3-опосередковані струми реєстрували у відповідь на прикладання 30 мкМ  $\alpha, \beta$ -Me-ATФ до тестованих нейронів протягом 0,5 с з інтервалом 2-3 хв. Вказана концентрація агоніста близька до насичуючої для активації P2X3-рецепторів. Раніше було показано, що при інтервалі 2-3 хв між прикладаннями  $\alpha, \beta$ -Me-ATФ відбувається вихід P2X3-рецепторів із десенситизації з відновленням їх амплітуд до більш ніж 90% (E.Pratt *et.al.*, 2005). У всіх експериментах застосуванню ендogenous опіюїда - ЛЕК передували два – три послідовних прикладань  $\alpha, \beta$ -Me-ATФ для досягнення струмом стаціонарних значень. Контрольні прикладання агоністу P2X-рецепторів також здійснювали для того, щоб впевнитися у відсутності неспецифічного незворотного зменшення амплітуд струмів (run-down). Амплітуди  $\alpha, \beta$ -Me-ATФ-активованих струмів, отриманих під час такої серії, не повинні були розрізнятися більше ніж на 10%.

Під час вивчення впливу опіюїдів на P2X3-рецептори нейронів СГ опіюїдні агоністи додавали до розчину, що омивав клітину. Таким чином, опіюїди безперервно прикладали до клітини в перебігу дослідження їх впливу на P2X3-опосередковані струми. Розчин з опіюїдним агоністом прикладався до досліджуваного нейрона, допоки викликане опіюїдом пригнічення P2X3-опосередкованого струму не досягало стаціонарного значення.

Прикладання ЛЕК до нейронів СГ призводило до двох можливих результатів. Або даний агент не справляв ніякого ефекту, або він викликав залежне від концентрації та часу прикладання інгібування P2X3-опосередкованих струмів (25,8% нейронів від загальної кількості).

Виявилось, що ендogenous агоніст опіюїдних рецепторів – ЛЕК здатний відчутно пригнічувати активність P2X3-рецепторів нейронів СГ (рис.1.).

Аплікація ЛЕК у концентраціях 10, 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 перебіг інгібуючої дії прискорювався при збільшенні концентрації ЛЕК; він досягав стаціонарного рівня за 12, 8 і менше ніж за 2 хв при концентраціях 10, 100 нМ і 1 мкМ відповідно (рис. 1.).



**Рис. 1. Узагальнені дані щодо концентраційної залежності впливу ЛЕК на P2X3-рецептори нейронів СГ**

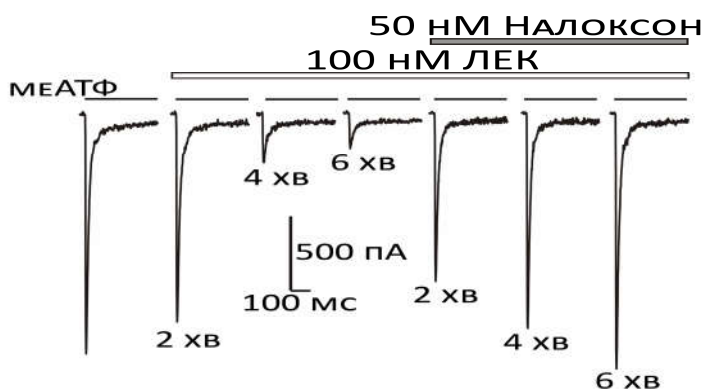
*А – крива доза-ефект для впливу ендogenous опіюїда на P2X3-струми, Б – статистична оцінка інгібуючої дії ЛЕК на P2X3-струми в залежності від часу та*

коцентрації. Тут і надалі кожен стовпчик відображає усереднені дані (середні значення  $\pm$  стандартна похибка вимірювання) щонайменше для трьох клітин. Ефекти, що спостерігалися оцінювалися з використанням співвідношення  $I/I$  контроль. Де  $I$  – амплітуда струму, відведена після того, як інгібуючий ефект опіюїду в досліджуваній концентрації досяг стаціонарного стану, а  $I$  контр. – усереднена амплітуда мeATФ-індукованого струму в контролі.

Інгібуючий ефект ЛЕК був оборотним: амплітуда струмів повністю відновлювалась протягом 6-8 хв після відмивання ЛЕК від клітини при всіх концентраціях (рис. 1,Б.) Слід зазначити, що у всіх опіюїдчутливих нейронів, застосування 1 нМ ЛЕК не викликало помітних змін параметрів P2X3-струмів, проте подальше прикладання 1 мкМ ЛЕК до тієї ж клітини завжди призводило до повного інгібування P2X3-рецепторів. Як вже було зазначено, прикладання 1 мкМ ЛЕК спричиняло блокування P2X3-рецептор-опосередкованих струмів на  $99 \pm 1\%$  ( $n = 6$ ). Аналогічним чином селективний для  $\mu$ -опіюїдних рецепторів агоніст ендоморфін-1 у концентрації 100 нМ майже повністю (на  $97 \pm 2\%$ ,  $n = 3$ ) блокував P2X3-опосередковані струми.

## 2. Інгібуючий вплив ЛЕК на P2X3-рецептори є опосередкованим $\mu$ -опіюїдними рецепторами.

Відомо, що налоксон, широко використовуваний антагоніст опіюїдів (конкурентний антагоніст), запобігає взаємодії опіюїдів з їх рецепторами і блокує опіюїдну сигналізацію. Перед застосуванням вищезазначеного антагоністу необхідно було переконатися в тому, що він сам по собі не впливає на P2X3-рецептори, а також визначити можливі конкурентні взаємовідносини між налоксоном і ЛЕК. Як виявилось, ізольовані аплікації налоксону у концентраціях від 50 нМ до 1 мкМ не чинили помітного впливу на P2X3-опосередковані струми в контрольних умовах. Проте, якщо P2X3-струми пригнічувалися під дією 100 нМ ЛЕК та їх амплітуди досягали стаціонарних значень, налоксон (50 нМ), прикладений на тлі дії ЛЕК, оборотно і ефективно усував інгібуючий вплив даного опіюїда у досліджених нейронах СГ (рис. 2.). Після інгібуючої дії ЛЕК на P2X3-струми налоксон додавався до зовнішньоклітинного розчину разом з ЛЕК.



**Рис. 2. Налоксон усуває інгібуючу дію ЛЕК на P2X3-опосередковані струми у нейронах СГ**

Оригінальні записи струмів, відведені від одної клітини. Протокол прикладання мeATФ вказано рисками над записами струмів, прикладання ЛЕК та налоксону – широкими лініями; зазначено концентрації речовин. Час аплікації того чи іншого розчину вказано під записами струмів.

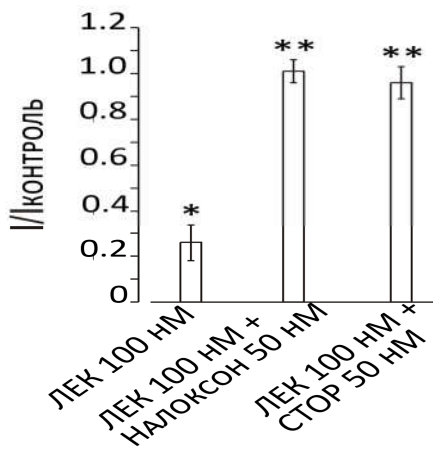
В даних умовах антагоніст викликав майже повне на  $97 \pm 5\%$  відновлення P2X3-опосередкованого струму протягом 6 – 8 хв, ( $n = 4$ ), (рис. 3.). Базуючись на результатах цього експерименту, ми переконались, що опіюїдіндуковане пригнічення P2X3-струмів у нейронах СГ опосередковується активацією саме опіюїдних рецепторів.

Літературні дані останніх десятиліть свідчать про те, що ефекти, викликані ендогенними та екзогенними опіюїдами, опосередковані опіюїдними G-білок-



спряженими рецепторами трьох типів ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ ), котрі локалізовані на мембранах периферичних сенсорних нейронів і нервових закінчень (C. Stein *et. al.*, 1990; C. Stein *et. al.*, 1995). Як вже було зазначено, ефекти застосування ендogenous опіоїдного агоніста ендоморфіну-1, вказували на специфічну участь  $\mu$ -опіоїдних рецепторів у інгібуванні P2X3-рецепторів.

Для подальшої ідентифікації типу опіоїдних рецепторів, що задіяні до вищезазначеного впливу ЛЕК на P2X3-струми, ми використовували СТОР (D-PheCys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH<sub>2</sub>) – один з найселективніших антагоністів MOR. Ми виявили, що застосування 50-100 нМ СТОР на тлі дії ЛЕК у концентрації 100 нМ практично повністю на  $95 \pm 7\%$  відмінняє інгібуючий ефект опіоїда ( $n = 3$ ), аналогічно дії налоксону (рис. 3.).



**Рис. 3. Відновлення P2X3-струмів під дією антагоністів опіоїдних рецепторів після впливу ЛЕК**

Селективний антагоніст  $\mu$ -опіоїдних рецепторів СТОР зумовлював ефект аналогічний налоксону. Кожен стовпчик відображає усереднені дані (середні значення  $\pm$  стандартна похибка вимірювання) для налоксону ( $n=4$ ), та для СТОР ( $n=3$ ). Амплітуди струмів, що реєструвалися в ході експерименту ( $I$ ) нормувалися на амплітуди першого контрольного струму ( $I_{\text{контр.}}$ ).

Таким чином, ми з'ясували, що опіоїдіндуковане інгібування P2X3-струмів у нейронах СГ опосередковано активацією  $\mu$ -опіоїдних рецепторів.

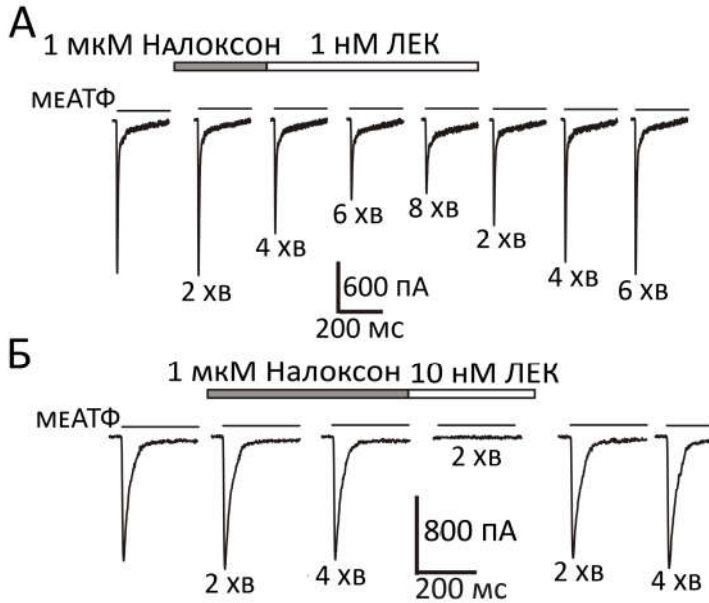
3. *Посилення інгібуючого впливу ЛЕК на P2X3-рецептори, зумовлене попередньою інкубацією нейронів СГ у присутності налоксону.*

У численних дослідженнях *in vivo* було показано, що хронічне застосування опіоїдних антагоністів (налоксону, налтрексону) збільшує ефективність дії агоністів опіоїдних рецепторів (S.Sirohi *et.al.*, 2007;. В.Yoburn *et.al.*,1988;. В.Yoburn *et.al.*,1995). Прояви такої функціональної надчутливості були пояснені здатністю антагоністів інгібувати базальну активність опіоїдних рецепторів. У наших експериментах інкубація нейронів з налоксоном (50 нМ – 1 мкМ) протягом 2 - 6 хв практично не викликала змін амплітуди P2X3-опосередкованих струмів ( $I/I_{\text{контр.}} = 95 \pm 6\%$ ,  $n = 5$ ). Таким чином (принаймні в умовах експерименту), агоністнезалежна (базальна) активність опіоїдних рецепторів не впливає на P2X3-опосередковані струми. Однак попередня інкубація нейронів СГ у присутності налоксону призводила до збільшення чутливості P2X3-рецепторів до дії ЛЕК.

Ми виявили, що за таких умов налоксон дуже сильно підвищував ефективність інгібуючої дії ЛЕК на P2X3-струми. Як правило, ЛЕК у низькій концентрації (10 нМ) забезпечував інгібування P2X3-струму приблизно на 50% протягом 10-12 хв (рис. 3. А, Б). Після попередньої інкубації з налоксоном у концентрації 1мкМ, прикладений до клітини ЛЕК у тій самій дозі (10 нМ) викликав майже повне блокування P2X3-опосередкованого струму протягом 2 хв (рис. 4.Б.). У нормальних умовах (без інкубації з налоксоном) такий швидкий інгібуючий ефект відмічається лише в разі дії ЛЕК у значно вищих концентраціях (1 мкМ) (рис. 3. А, Б). Посилення інгібуючого ефекту ЛЕК під впливом попередньої інкубації нейронів

з налоксоном (1 мкМ) спостерігалось при всіх протестованих концентраціях опіоїдів (1 – 100 нМ).

Результати численних досліджень доводять, що опіоїдні рецептори, як і інші G-білокспряжені рецептори, здатні у разі зв'язку з певними типами G-білків набувати декількох активних конформацій (P.Sanchez-Blazquez *et.al.*, 2001).

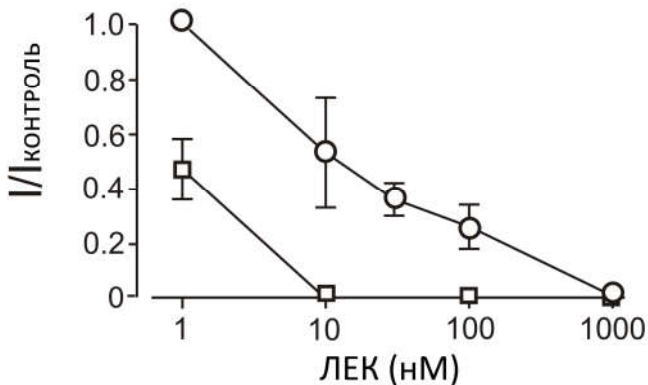


**Рис. 4. Посилення інгібуючого впливу ЛЕК на P2X3-струми після попередньої інкубації нейронів СГ з налоксоном.**

Оригінальні записи P2X3-опосередкованих струмів в умовах контролю, преапликації налоксона (1 мкМ) та після прикладання низьких концентрацій ЛЕК (А - 1 нМ, Б - 10 нМ). Струми, зображені на А та Б відведені від різних клітин.

Конформаційні стани гетерогенних комплексів з інгібуючими (Gi/o) та стимулюючими (Gq/s) G-білками є посередниками активації різних внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, що забезпечують

протилежні ефекти (J.Hudson *et.al.*, 2010). Антагоністи опіоїдних рецепторів (налоксон, налтрексон) підвищують ефективність знеболення морфіном завдяки прямому конкурентному антагонізму Gq/s-зв'язаної конформації (S.Crain *et. al.*, 2000). Ці дані узгоджуються з нашими результатами і свідчать про вплив налоксона на стабілізацію значної частини комплексів опіоїдних рецепторів та G-білків, що знаходяться в інгібуючій конформації.



**Рис. 5. Порівняльна характеристика впливу ЛЕК на P2X3-струми залежно від концентрації опіоїду.**

○ – крива доза-ефект впливу ЛЕК на P2X3-струми в нормі; □ – аналогічна крива в умовах преінкубації нейронів СГ з налоксоном (1 мкМ).

Крива доза-ефект, отримана з використанням аналогічного експериментального протоколу в умовах преінкубації з налоксоном (1 мкМ), вказує на зменшення значення IC<sub>50</sub> для

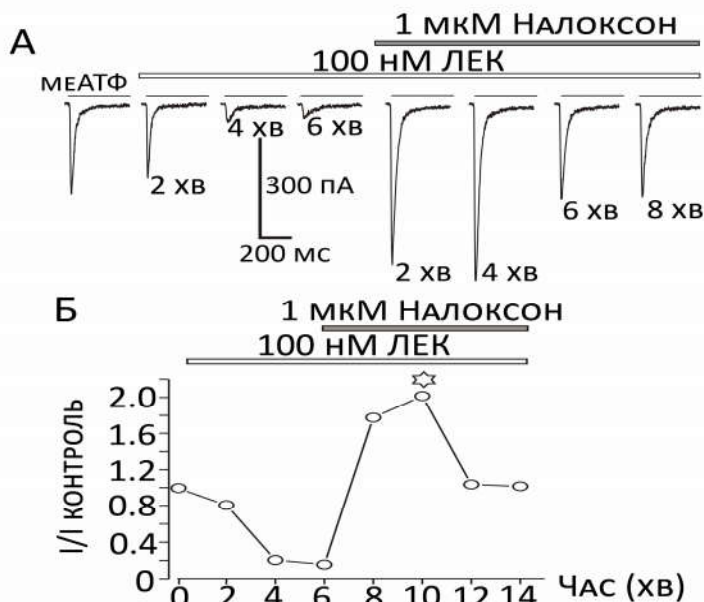
інгібуючої дії ЛЕК від 10 до 1 нМ (рис. 5.).

Отже, попередня інкубація нейронів СГ з антагоністом опіоїдних рецепторів налоксоном, призводить до посилення інгібуючої дії ЛЕК на P2X3-рецептори. Цей ефект пов'язаний із специфічним впливом налоксона на G-білки опіоїдних рецепторів.

#### 4. Антагоністи опіоїдних рецепторів у високих дозах стимулюють P2X3-опосередковані струми

Визначаючи мінімальну концентрацію налоксону, за якої останній міг би конкурентно замінити молекули ЛЕК у центрі зв'язування опіоїдного рецептора, ми дійшли висновку, що концентрація налоксону 50 нМ достатня для повного "витіснення" 100 нМ ЛЕК (рис. 2.). Як зазначено в пункті 2, застосування налоксону в такій концентрації на тлі дії ЛЕК призводило до відновлення амплітуд P2X3-струмів до контрольних значень. Проте, застосування високих концентрацій налоксону (1 мкМ) разом з ЛЕК (100 нМ) в аналогічних експериментах зумовлювало двофазність впливу на P2X3-опосередковані струми. На рисунку 6. показано, що після досягнення P2X3-опосередкованими струмами стаціонарних значень амплітуд у контролі, прикладання 100 нМ ЛЕК викликає інгібуючий ефект. Однак, після аплікації неселективного конкурентного антагоніста опіоїдних рецепторів налоксону амплітуда P2X3-струмів тимчасово (протягом 2 – 4 хв) підвищувалася більше ніж у два рази, ( $I/I_{\text{контр.}} = 210 \pm 30 \%$ ,  $n = 4$ ) перед тим, як досягала контрольного значення.

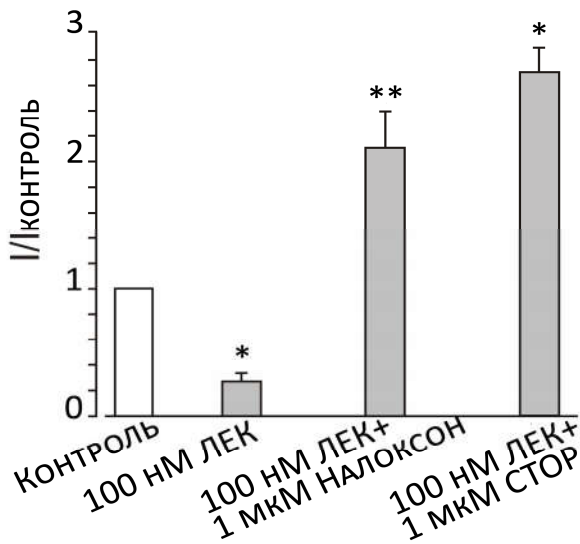
Загалом наші спостереження вказують на те, що у нормальних умовах опіоїдні агоністи справляють переважно пригнічуючий вплив на P2X3-рецептори. В той же час стимулюючий ефект є прихованим або відсутнім. У біохімічних дослідженнях було доведено, що  $\mu$ -опіоїдні рецептори, як і багато інших G-білок-спряжених рецепторів, здатні набувати декількох активних конформаційних станів залежно від зв'язку з певними типами G-білків (D. Cosskaune *et al.*, 2005). Подібна особливість  $\mu$ -рецептор-опосередкованої сигналізації зумовлюється подвійним впливом опіоїдів на аденілатциклазу (A. Ford *et al.*, 2013). Тому ми можемо припустити, що подвійний ефект опіоїдіндукованої стимуляції/інгібування P2X3-рецепторів опосередкований різними внутрішньоклітинними шляхами, котрі активуються G-білками певних типів.



**Рис. 6. Посилення активності P2X3-струмів у нейронах СТГ, індуковане антагоністом опіоїдних рецепторів в умовах дії ЛЕК.**

А – оригінальні записи струмів в умовах аплікації на клітину ЛЕК та налоксону у високій концентрації на тлі дії ЛЕК. Б – часовий перебіг ефекту, викликаного прикладанням агоністу та антагоністу опіоїдних рецепторів на P2X3-струми. ☆ – максимальне значення амплітуди P2X3-струму під впливом налоксону.

Зображений на рис. 6 ефект налоксону не пов'язаний з його властивістю оборотного агоніста. У двох аналогічних експериментах ми використовували селективний антагоніст  $\mu$ -опіоїдних рецепторів СТОР замість налоксону і отримали ідентичні результати (рис. 7.). Аплікація СТОР у ідентичній налоксону концентрації викликало стимуляцію P2X3-струмів на  $270 \pm 20 \%$ , ( $n = 4$ ).



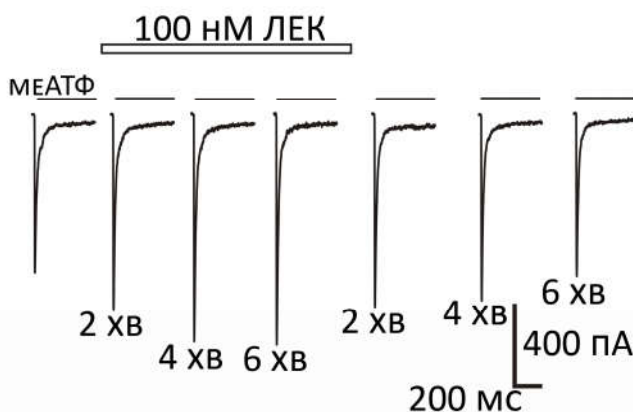
**Рис. 7. Стимулюючий вплив антагоністів опіюїдних рецепторів на P2X3-рецептори, після їх часткового пригнічення під дією ЛЕК.**

Кожен стовпчик представляє усереднені дані для подібних експериментів з використанням 1 мкМ налоксону ( $n = 4$ ) і 1 мкМ СТОР ( $n = 4$ ).

Таким чином, обмін агоніста опіюїдних рецепторів на антагоніст у високій концентрації дозволяє викрити замаскований стимулюючий ефект опіюїдів.

##### 5. Стимулюючий вплив ЛЕК на P2X3-струми в умовах інкубації нейронів СГ з токсином кашлюку

Відомо, що токсин кашлюку – пертуситоксин (РТХ), вибірково блокує інгібуючі (Gi/o) G-білки, залишаючи стимулюючі Gq/s білки в активному стані. Було показано, що РТХ вибірково усуває інгібуючу дію опіюїдів. (Z. Li *et.al.*, 2006) За аналогією ми припустили, що подібна ситуація можлива і у випадку P2X3-рецепторів. Для перевірки цього припущення нейрони СГ інкубували з РТХ у концентрації 100 нг/мл протягом 17-24 годин. Після інкубації аплікація ЛЕК до нейронів СГ у концентрації від 10 нМ до 1 мкМ призводить виключно до потенціації P2X3-струму в усіх тестованих опіюїдчутливих клітинах ( $n = 11$ ). Як і в не оброблених РТХ нейронах, для 21,5% клітин була характерна опіюїдна чутливість. Однак, на відміну від нейронів не інкубованих з РТХ, стимулюючий ефект при даній концентрації ЛЕК значно варіював від клітини до клітини. Наприклад, аплікація 100 нМ ЛЕК викликала підвищення амплітуд P2X3-струмів (від 11 до 65%, протягом 4 – 6 хв) порівняно з контрольними значеннями ( $n = 4$ ), (рис. 8.).

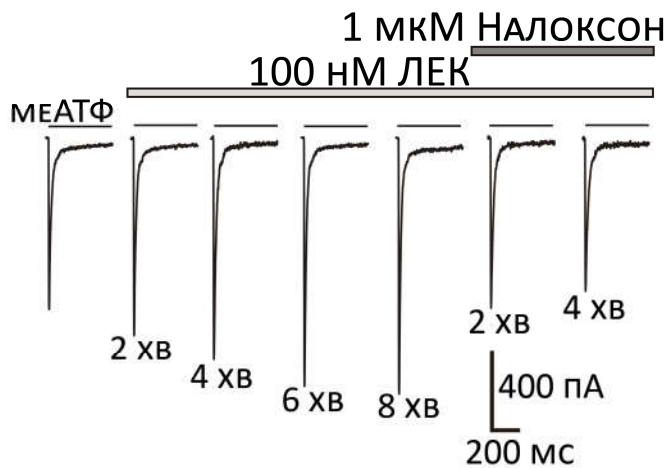


**Рис. 8. Стимулююча дія ЛЕК на P2X3-опосередковані струми в умовах попередньої інкубації нейронів СГ з токсином кашлюку**

Оригінальні записи струмів, відведених від одної клітини. Позначення ті ж, що на рис. 2.

Крім того, на відміну від ефектів у не інкубованих з РТХ нейронів, прикладання ЛЕК у тій же концентрації в інших експериментах сприяло значно сильнішій потенціації P2X3-струмів. При цьому часовий перебіг змін помітно відрізнявся. Рис. 8 ілюструє результати такого експерименту. Перше прикладання опіюїда призвело до потенціації зазначених струмів на 44%, а наступні прикладання ЛЕК призводили до посилення P2X3-струмів на 66%, (рис. 9.). Таким чином, можливість отримати залежність доза-реакція для стимулюючого впливу ЛЕК на P2X3-струми за умов інкубації нейронів з РТХ виявляється складною. На Рис. 9 також показано, що

потенціація P2X3-струму повністю пригнічується налоксоном ( $n = 3$ ). Налоксон додавали до зовнішньоклітинного розчину, на тлі дії ЛЕК.



**Рис. 9.** Усунення стимулюючої дії ЛЕК на P2X3-струми налоксоном в умовах попередньої інкубації нейронів СГ з токсином кашлюку. Позначення ті ж, що на рис. 2.

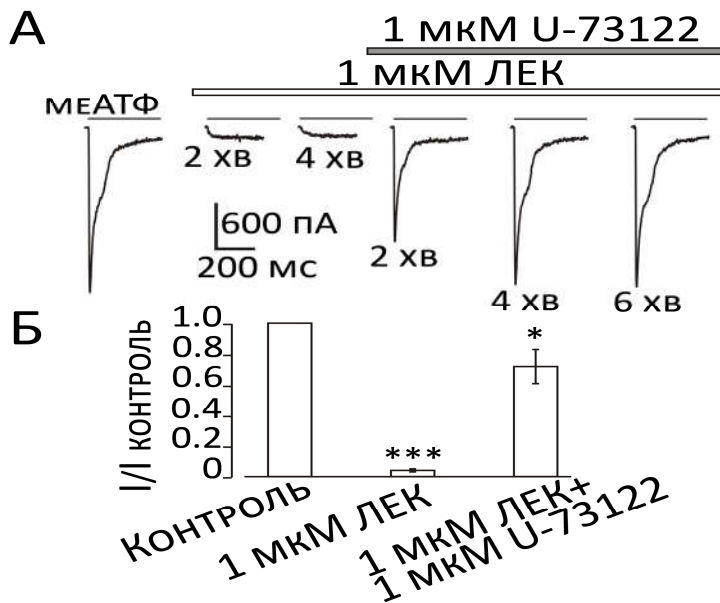
Результати наших експериментів доводять, що активація  $\mu$ -опіоїдних рецепторів, викликана прикладанням ЛЕК, може зумовлювати як інгібуючу, так і стимулюючу дію на P2X3-опосередковані струми. Аналогічний ефект було зафіксовано в більш ранніх

дослідженнях під час експериментів на P2X2/3-рецепторах у сенсорних нейронах вузлуватих гангліїв (I.Chizhnikov *et.al.*, 2005). Тим не менш, у цьому випадку обидва ефекти опіоїдів були більш розгорнуті в часі; стимулюючий ефект передував остаточному інгібуючому впливу ЛЕК та інших ендогенних опіоїдів на P2X2/3-струми. Автори стверджують, що ефект посилення P2X2/3-струмів у нейронах вузлуватого ганглію виникав у нормальних умовах (без інкубації нейронів з РТХ). (I.Chizhnikov *et.al.*, 2005). Тоді як наші дослідження вказують на повну відсутність стимулюючого впливу ЛЕК на P2X3-струми у нормальних умовах, а прикладання ЛЕК у концентрації 1 мкМ призводить до блокування зазначених струмів майже на 100%. Порівнюючи ці результати, можна зробити висновок, що ендогенні опіоїди справляють подвійний вплив на АТФ-чутливі рецептори. Така амбівалентна взаємодія опіоїдних рецепторів з P2X-рецепторами пов'язана з активністю G-білків різних типів та різних молекулярних шляхів, які вони запускають.

#### 6. Роль фосфоліпази С у регуляції активності P2X3-рецепторів ендогенним опіоїдом ЛЕК

Добре відомо, що при активації метаботропних опіоїдних рецепторів залучаються два найбільш поширені внутрішньоклітинні сигнальні шляхи - інгібування активності аденілатциклази (AC) (S.Sharma *et.al.*, 1977), та активація фосфоліпази С (PLC) (W.Xie *et.al.*, 1999). Відомо, що ліпідний компонент плазматичної мембрани фосфатиділінозитол-4,5-дифосфат (PIP<sub>2</sub>) справляє регуляторний вплив на мембранні протеїни та іонні канали, в тому числі і на P2X3-рецептори. Виснаження пулу PIP<sub>2</sub> призводить до інгібування активності цих рецепторів, а додавання його до цитозолу чинить зворотний ефект (G.Mo *et.al.*, 2009). Тому, опіоїдіндукована активація PLC (W.Xie *et.al.*, 1999) і, в свою чергу, гідроліз PIP<sub>2</sub> можуть лежати в основі інгібування P2X3-струмів. Активація PLC призводить до гідролізу мембранного фосфоліпиду - фосфоінозитолдифосфату (PIP<sub>2</sub>) і продукції двох сигнальних молекул - інозитолтрифосфату (IP<sub>3</sub>), який мобілізує іони Ca<sup>2+</sup> з внутрішньоклітинних депо і диацилгліцеролу (DAG), який активує протеїнкіназу С (PKC) (M.Rebecchi *et.al.*, 2000). Беручи ці відомості до уваги, було цікаво перевірити, який з цих шляхів є посередником стимулюючого та інгібуючого впливів ЛЕК на P2X3-струми в інкубованих і неінкубованих з РТХ нейронах СГ. Для цього блокатор PLC - U-73122 у концентрації 1 мкМ прикладали до нейронів СГ на тлі інгібуючої дії ЛЕК після того, коли P2X3-струми були

повністю заблоковані високими дозами зазначеного опіюїду (1 мкМ). Прикладання U-73122 призводить до відновлення амплітуд P2X3-струмів (у середньому на  $87 \pm 11 \%$ ,  $n = 4$ ), (рис. 10.). Якщо припустити, що опіюїдопосередковані ефекти пригнічення і стимуляція P2X3-струмів розвиваються одночасно і незалежно один від одного, можна було б очікувати, що блокування інгібуючої дії ЛЕК призведе до викриття замаскованої стимуляції, аналогічно експерименту із застосуванням налоксону у високій концентрації (як на рис. 6.). Проте дія U-73122 сприяла відновленню амплітуди P2X3-струмів, інгібованих ЛЕК, лише до контрольного рівня (рис. 10). Це спостереження дало змогу припустити, що викликані опіюїдом інгібування та стимулювання P2X3-струмів можуть опосередковуватись дією PLC. При цьому, відновлення амплітуд P2X3-струмів, викликане блокатором PLC, відбувається протягом 6 – 8 хв і цілком співпадає з аналогічним ефектом, під час відмивання ЛЕК у тій же концентрації зовнішньоклітинним розчином (як на рис. 1.). Цей факт вкотре доводить, що швидкість зв'язування опіюїда з рецептором, а не швидкість реакцій молекулярних механізмів, є ключовим фактором у процесі взаємодії опіюїдних рецепторів з P2X3-рецепторами.



**Рис. 10.** Усунення інгібуючого впливу ЛЕК на P2X3-струми блокатором PLC на тлі дії опіюїда.

*А* – оригінальні записи струмів, відведених від одної клітини у контролі, під час дії ЛЕК та в умовах аплікації блокатора PLC – U-73122 (1 мкМ) разом з ЛЕК (1 мкМ). *Б* – усереднені дані відповідних експериментів ( $n=5$ ).

Для з'ясування ролі PLC у стимулюючому впливі ЛЕК на P2X3-опосередкований струм ми провели серію аналогічних експериментів, при цьому використовували нейрони,

інкубовані з РТХ протягом 17 – 24 годин. Як зазначено вище, вплив інкубації з РТХ на нейрони СГ сприяє прояву ефекту стимуляції P2X3-струмів, викликаних опіюїдами, шляхом інгібування Gi/o-білків.

Блокатор PLC - U-7312 був прикладений разом з опіюїдом до клітин, інкубованих з РТХ після досягнення максимального впливу ЛЕК у концентрації 100 нМ на P2X3-струми. Результат експерименту довів, що прикладання U-73122 після стимулюючого впливу ендogenous опіюїда ЛЕК на P2X3-струми викликало відновлення амплітуд на  $78 \pm 14 \%$  ( $n = 3$ ) порівняно з контролем (рис. 11.).

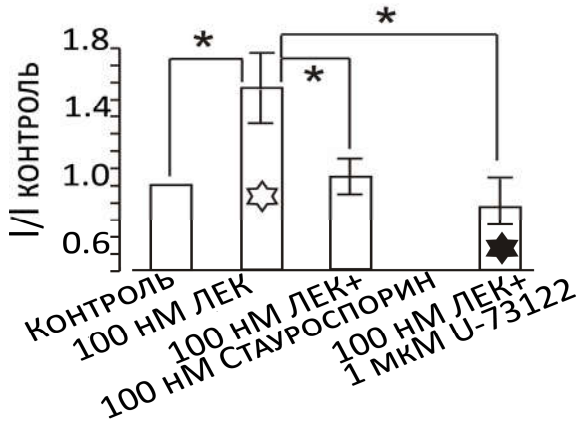


**Рис. 11.** Блокатор PLC усуває стимулюючий вплив ЛЕК на P2X3-струми в умовах інкубації нейронів СГ з токсином кашлюку.

*Оригінальні записи струмів, відведених від одної клітини у контролі, під час дії ЛЕК та в умовах аплікації блокатора PLC – U-73122 (1*

мкМ) разом з ЛЕК (100 нМ). ☆ – максимальна амплітуда P2X3-струму в умовах дії опіюїда, ★ – амплітуда P2X3-струму, відновлена під дією блокатора PLC.

Це спостереження вказує на можливість участі PLC як в стимулюючому, так і в інгібуючому впливі опіюїдів на P2X3-струми.



**Рис. 12.** Узагальнення даних експериментів по вивченню впливу блокаторів вторинних месенджерів на активність P2X3-рецепторів у нейронах СГ після інкубації з токсином кашлюку.

Кожен стовпчик відповідає усередненим значенням амплітуд P2X3-струмів у контролі, під час стимулюючого впливу ЛЕК та вплив стауроспорину і U-73122 на тлі дії ЛЕК. Позначення ті ж, що й на рис. 3.

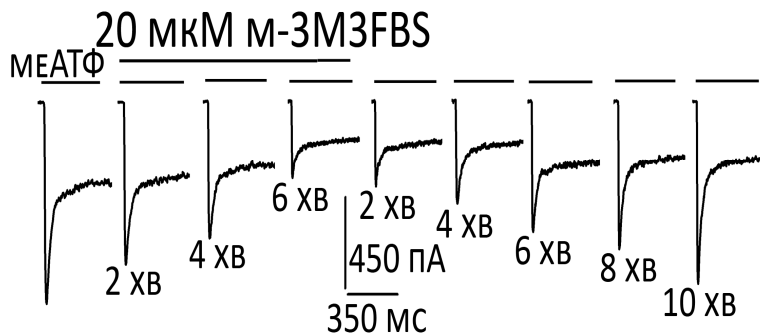
Цей парадоксальний висновок добре узгоджується з даними Мо та спіавт. (2013) стосовно регуляції P2X3-рецепторів іншими метаболічними шляхами. Наприклад, активація P2Y2-рецепторів чинить інгібуючий вплив на P2X3-рецептори через чутливі до токсину кашлюку Gi/o-білки та PLC (G. Mo *et al.*, 2013). З іншого боку, активація нечутливих до токсину кашлюку G<sub>q</sub>-білків, сполучених з брадикініновими рецепторами та рецепторами субстанції P, лежить в основі стимулювання P2X3-струмів через PLC/PIP<sub>2</sub>/DAG/PKC каскад (S. Park *et al.*, 2010; M. Paukert *et al.*, 2001).

Відомо, що активація G<sub>i/o</sub>-білків призводить до зменшення вмісту внутрішньоклітинного циклічного аденозинмонофосфату (сАМР), що може впливати на активність P2X3-рецепторів. У наших умовах внутрішньоклітинний розчин не вміщував сАМР. Окрім того, ми виявили, що додавання сАМР до внутрішньоклітинного розчину у досить високій концентрації (0,5 мМ) зберігає здатність ЛЕК інгібувати або стимулювати (останнє – у нейронів, інкубованих з РТХ) P2X3-струм. Тому малоймовірно, що пригнічення P2X3-струмів пов'язане зі зниженням вмісту сАМР, внаслідок опіюїдиндукованого інгібування активності АС (M. Paukert *et al.*, 2001). Отже, класичний внутрішньоклітинний шлях опіюїдної сигналізації, котрий пов'язаний з пригніченням АС гетеротримерними G-білками G<sub>i/o</sub>-типу, в даному випадку не спостерігається.

Як вже було зазначено вище, результатом зв'язування опіюїдів з μ-опіюїдними рецепторами, є активація двох сигнальних шляхів, відповідальних за інгібування АС (M. Paukert *et al.*, 2001) та стимуляцію PLC (V. Rubovitch *et al.*, 2003). Щоб в котре переконатися в тому, що активація PLC може зумовлювати інгібуючий вплив ЛЕК на P2X3-рецептори, ми застосовували m-3M3FBS – синтетичний активатор PLC, котрий здатний проникати через клітинну мембрану.

Прикладання цього активатора до нейронів СГ у концентрації 20 мкМ призводило до пригнічення швидкого компонента десенситизації інтегрального P2X3/P2X2/3-опосередкованого струму в середньому на 72 ± 0,06 %; n = 5 (Рис. 13.) 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. Інгібування швидкого компонента десенситизації інтегрального P2X3/P2X2/3-опосередкованого струму активатором PLC вказує на те,

що саме P2X3-субодиниці є найбільш чутливими до зменшення (виснаження) мембранного пулу PIP<sub>2</sub>.



**Рис. 13. Інгибування P2X3-опосередкованих струмів, викликане синтетичним активатором PLC (m-3M3FBS)**

Відомо, що концентрація мембранного PIP<sub>2</sub>, функціонально зв'язаного з P2X3-рецепторами, визначається двома факторами

– базальною активністю PLC, яка гідролізує PIP<sub>2</sub>, та активністю кіназ, що залучені до синтезу останнього (D.Brown *et.al.*, 2007). Враховуючи те, що  $\mu$ -опіодні агоністи активують PLC (V.Rubovitch *et.al.*, 2003), а з іншого боку, активація самої PLC призводить до інгибування P2X3-струму (рис. 13.), аналогічно із впливом ЛЕК, нам потрібно було переконатися у тому, що активність PLC та виснаження рівня мембранного PIP<sub>2</sub> можуть контролюватись активацією  $\mu$ -опіодних рецепторів. Для цього ми використовували вортманін – інгібітор кіназ, що задіяні до синтезу PIP<sub>2</sub> (25 мкМ). Після інкубації нейронів СГ з вортманіном (24 год), ЛЕК у низькій концентрації (10 нМ) спричиняв посилення та прискорення інгибуючого впливу на P2X3-струми (рис. 14.).



**Рис. 14. Вортманін посилює інгибуючий вплив ЛЕК на P2X3-струми.**

Прикладання ЛЕК (10 нМ) протягом 4 хв, інгибувало швидкий компонент 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) ЛЕК (10 нМ), пригнічував P2X3-струми на  $53 \pm 11\%$  ( $n = 5$ ), (рис.1. А). Цей ефект був частково оборотним; заміна розчину з ЛЕК на нормальний не призводила до повного відновлення амплітуд P2X3-струмів. Очевидно, що заблоковані кінази не можуть швидко відновити PIP<sub>2</sub> до контрольного рівня. Певне прискорення ефекту інгибування пояснюється швидким виснаженням пулу мембранного PIP<sub>2</sub>, оскільки опіодіндукована активація PLC, призводить до гідролізу PIP<sub>2</sub>, а вортманін – інгібітор синтезу відповідних кіназ. Таким чином, концентрація мембранного PIP<sub>2</sub> впливає на швидкість та ефективність пригнічення P2X3-рецепторів під дією ЛЕК.

Отже, активація опіодних рецепторів ЛЕК викликає два протилежно спрямовані ефекти на P2X3-рецептори, ці ефекти опосередковуються PLC.

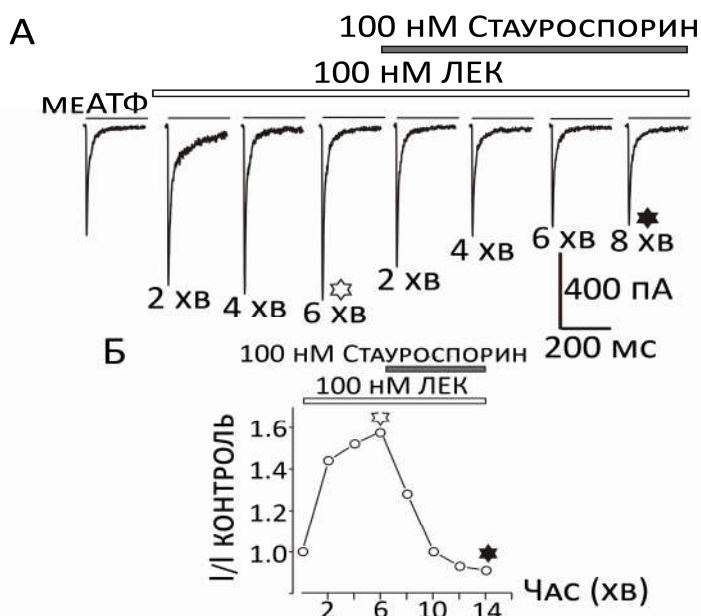


### 7. Стимулюючий вплив ЛЕК на P2X3-струми опосередкований залученням РКС

Досліджуючи роль різних внутрішньоклітинних сигнальних шляхів у амбівалентному впливі ЛЕК на P2X3-опосередковані струми, нам необхідно було перевірити вплив РКС на вищезазначені ефекти.

Ми виявили, що в ноціцептивних нейронах СГ, інкубованих з РТХ протягом 17 – 24 год, застосування інгібітору РКС – стауроспорину повністю усувало стимулюючий вплив ЛЕК на P2X3-опосередковані струми (рис. 15.).

Прикладання ЛЕК в концентрації 100 нМ до інкубованих з РТХ нейронів СГ викликало збільшення амплітуд P2X3-струмів на  $156 \pm 20 \%$ , ( $n = 7$ ;  $P < 0,05$ ) протягом 6 хв, порівняно з контролем. Після досягнення досліджуваними струмами стаціонарних значень у стимульованому стані до зовнішньоклітинного розчину додавали суміш ЛЕК та стауроспорину в концентрації 100 нМ. У даних умовах, стауроспорин усував стимулюючий ефект ЛЕК на P2X3-струми протягом 6 – 8 хв. (рис. 15.).



**Рис. 15.** Стауроспорин усуває стимулюючий вплив ЛЕК на P2X3-струми в умовах інкубації нейронів СГ з токсином кашлюку.

А- оригінальні записи струмів, відведених від одної клітини у контролі, під час дії ЛЕК та в умовах аплікації блокатора РКС – стауроспорину (100 нМ) разом з ЛЕК (100 нМ). Б – розвиток ефекту в часі, викликаного прикладанням ЛЕК та стауроспорину на тлі дії ЛЕК. ☆ – максимальне значення амплітуди P2X3-струму під впливом опіюїду, ★ – амплітуда P2X3-струму, відновленого під дією стауроспорину.

Результати цих експериментів переконливо вказують на те, що до ефекту стимуляції P2X3-струмів, викликані опіюїдними рецепторами ЛЕК, залучена РКС.

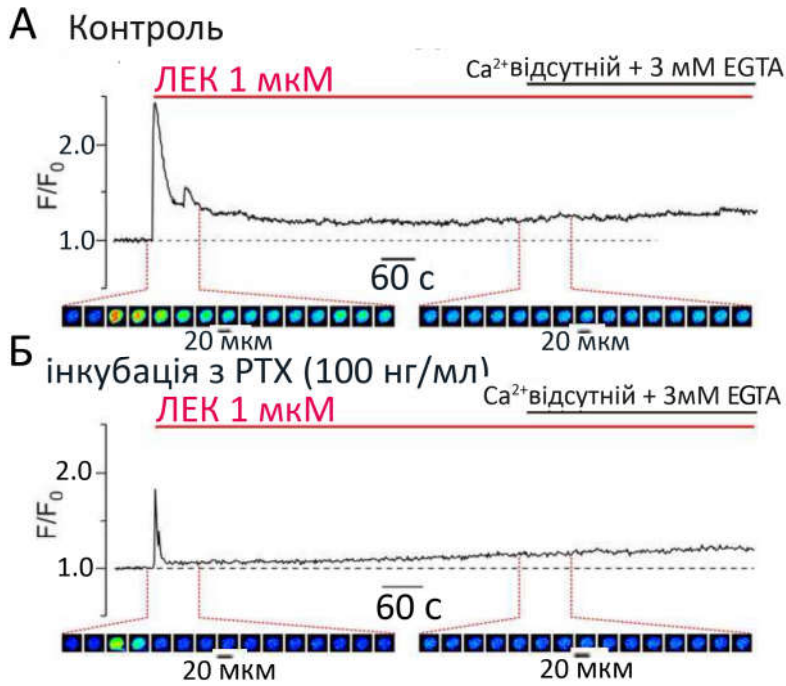
На даний час відомо, що РКС може активуватися DAG або збільшенням рівня  $Ca^{2+}$  у цитоплазмі (V.Rubovitch *et.al.*, 2003). Оскільки концентрація останнього в експериментальних умовах була стабільною (внутрішньоклітинна концентрація EGTA - 10 мМ), ймовірно, що PLC/PIP<sub>2</sub>/DAG/РКС – шлях залучений до стимулюючого впливу опіюїдів на P2X3-струми. Тобто викликана опіюїдом активація PLC призводить як до інгібування, так і до стимуляції P2X3-рецепторів.

### 8. Викликане опіюїдами вивільнення іонів $Ca^{2+}$ залежить від Gi/o- та Gq- білок спряженого сигнального шляху

Результати реєстрації динаміки змін внутрішньоклітинної концентрації  $Ca^{2+}$  в культивованих нейронах СГ показали, що ЛЕК-індуковані кальцієві сигнали пов'язані з його внутрішньоклітинним вивільненням з ендоплазматичного ретикулу. Реліз іонів  $Ca^{2+}$ , викликаний дією ЛЕК на нейрони СГ, не залежить від наявності  $Ca^{2+}$  у зовнішньоклітинному розчині. (рис. 16. А). Інкубація нейронів з токсином кашлюку протягом 17 – 24 год до експерименту призводить до зменшення

кальцієвого сигналу у відповідь на прикладання ЛЕК, проте повністю не скасовує такий сигнал (рис. 16. Б).

Початкова фаза ЛЕК-індукованої швидкої зміни концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$  була істотно зменшена внаслідок інкубації нейронів з РТХ. В той же час в умовах видалення іонів  $\text{Ca}^{2+}$  з позаклітинного розчину стійкий компонент кальцієвої відповіді послаблювався меншою мірою. Це може вказувати на те, що іони кальцію вивільняються з ендоплазматичного ретикулума.



**Рис. 16. ЛЕК-індуковане вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з внутрішньоклітинних депо нейронів СГ не залежить від активації  $\text{Gi/o}$ -сигнального шляху.**

Зміни інтенсивності  $F_{\text{fluor}} - 4$  флюоресценції  $\text{Ca}^{2+}$  транзйенту, викликаного прикладанням 1  $\mu\text{M}$  ЛЕК до нейронів СГ: А – в контролі, Б – у нейроні, попередньо інкубованому з РТХ. Де  $F_0$  – контрольне значення,  $F$  – значення інтенсивності флюоресценції  $\text{Ca}^{2+}$ -транзйенту в момент прикладання ЛЕК. Зображені нижче ділянки з кольорним кодом були зареєстровані в періоди, що

виділені на графіках пунктиром (показано кожне п'яте зображення).

Основним результатом цього експерименту є те, що ЛЕК-індукована активація обох чутливих до РТХ  $\text{Gi/o}$ -білків і нечутливих  $\text{Gq}$ -білків  $\mu$ -опіїдних рецепторів призводить до різкого наростання  $\text{Ca}^{2+}$ -транзйенту в контролі (рис. 16. А). Проте інкубація нейронів з РТХ та викликане цією процедурою блокування  $\text{Gi/o}$ -білків зменшує інтенсивність вивільнення іонів  $\text{Ca}^{2+}$  з внутрішньоклітинних депо (рис. 16. Б).

Отже, викликане ЛЕК вивільнення іонів  $\text{Ca}^{2+}$  опосередковується активацією як  $\text{Gi/o}$ -, так і  $\text{Gq}$ -білків опіїдних рецепторів.

### Обговорення.

У цьому дослідженні ми показали, що активація  $\mu$ -опіїдних рецепторів призводить до подвійного впливу (інгібуючого та стимулюючого) на  $\text{P2X3}$ -опосередковані струми в нейронах СГ. В умовах прикладання ЛЕК до нативних клітин даний ендogenous опіїд відчутно пригнічує  $\text{P2X3}$ -струми (рис.1.). На противагу цьому, коли опіїд прикладався до нейронів, попередньо інкубованих з РТХ, амплітуда  $\text{P2X3}$ -струмів помітно збільшувалася (рис. 8.). Тому ми можемо припустити, що опосередкована опіїдними рецепторами сигналізація спрямовується на  $\text{P2X3}$ -рецептори шляхом активації як чутливих до РТХ  $\text{Gi/o}$ -білків, так і нечутливих -  $\text{Gq}$ -білків. Саме  $\text{G}$ -білки цих двох типів можуть виконувати роль посередників протилежних ефектів впливу ЛЕК на  $\text{P2X3}$ -рецептори. У нормальних умовах переважає інгібуючий опіїдіндукований ефект, в той час як стимулюючий є або прихованим, або відсутній. Функціональне вираження нечутливого до РТХ

метаботропного шляху також підтверджується змінами кальцієвої провідності. Інкубація нейронів СГ з РТХ у концентрації 100 нг/мл протягом 17 – 24 годин до експерименту призводить до істотного зниження кальцієвого сигналу у відповідь на прикладання ЛЕК у концентрації 1 мкМ (порівняно з контролем), (рис. 16.А, Б.). Однак блокування чутливих до РТХ  $G_{i/o}$ -білків повністю не скасовує ЛЕК-індукований кальцієвий сигнал (рис. 16. Б)

Біохімічні дослідження останніх років вказують на те, що  $\mu$ -опіоїдні рецептори, як і багато інших G-білок-спряжених рецепторів, здатні набувати кількох активних конформацій залежно від поєднання цих рецепторів з певним типом G-білків (P.Sanchez-Blazquez *et.al.*, 2001). Наприклад, така особливість опосередкованої  $\mu$ -опіоїдними рецепторами сигналізації, лежить в основі подвійного впливу на АС (M.Szucs *et.al.*, 2005). Тому ми можемо припустити, що подвійний вплив ендogenous опіоїда ЛЕК на P2X<sub>3</sub>-рецептори може аналогічно опосередковуватися різними конформаційними станами  $\mu$ -опіоїдних рецепторів. Ці конформації можуть виникати в залежності від зв'язування зазначених рецепторів або з чутливими до РТХ -  $G_{i/o}$ -, або з нечутливими  $G_q$ -білками. Таким чином, опіоїдіндуковані інгібування/стимуляція P2X<sub>3</sub>-рецепторів пов'язані із залученням різних внутрішньоклітинних шляхів, котрі активуються G-білками певних типів.

Відомо, що ліпідний компонент плазматичної мембрани PIP<sub>2</sub> справляє регуляторний вплив на мембранні протеїни та іонні канали, в тому числі і на P2X<sub>3</sub>-рецептори. Виснаження пулу PIP<sub>2</sub> призводить до інгібування активності цих рецепторів, а додавання PIP<sub>2</sub> до цитозолу зумовлює протилежний ефект (G.Мо *et.al.*, 2009). Тому, опіоїдіндукована активація фосфоліпази С (W.Xie *et.al.*, 1999) і, в свою чергу, гідроліз PIP<sub>2</sub> можуть лежати в основі інгібування P2X<sub>3</sub>-струмів. Для перевірки цієї гіпотези, ми застосували селективний інгібітор PLC U-73122 у концентрації 1 мкМ. Останній усував інгібуючий ефект лейенкефаліну в середньому на  $87 \pm 11\%$ ;  $n = 4$ ;  $p < 0,05$  (рис. 10.). Цей феномен міг би демаскувати прихований фасилітуючий компонент подвійного впливу опіоїда на P2X<sub>3</sub>-струми. Проте U-73122 відновлював P2X<sub>3</sub>-струми, інгібовані лейенкефаліном, до контрольного рівня. Це спостереження дозволило припустити, що викликані опіоїдом інгібування та фасилітація P2X<sub>3</sub>-струмів опосередковані PLC. Результат експерименту проілюстрований на рис. 11, доводить, що фасилітуючий вплив ендogenous опіоїда на P2X<sub>3</sub>-струми у інкубованих з РТХ нейронах повністю інгібується U-73122.

Цей ніби парадоксальний висновок добре узгоджується з даними, щодо регуляції P2X<sub>3</sub>-рецепторів іншими метаботропними шляхами. Наприклад, активація P2Y<sub>2</sub>-рецепторів чинить інгібуючий вплив на P2X<sub>3</sub>-рецептори через чутливі до РТХ  $G_{i/o}$ -білки та PLC (G.Мо *et.al.*, 2013).

Результати досліджень попередніх років свідчать, що активація  $G_{i/o}$ -білків призводить до зменшення рівня внутрішньоклітинного циклічного аденозинмонофосфату (сАМР), що може впливати на активність P2X<sub>3</sub>-рецепторів. В наших умовах, внутрішньоклітинний розчин не містив сАМР. Більше того, додавання сАМР у високій концентрації (0,5 мМ) до внутрішньоклітинного розчину не запобігало пригніченню активності P2X<sub>3</sub>-струмів під дією ЛЕК. Тому малоймовірно, що ефект пригнічення P2X<sub>3</sub>-струмів ЛЕК пов'язаний зі зниженням рівня сАМР, внаслідок опіоїдіндукованого інгібування активності АС (S.Sharma *et.al.*, 1977). Отже класичний внутрішньоклітинний шлях опіоїдної сигналізації, котрий пов'язаний з активацією АС гетеротримерними G-білками  $G_{i/o}$  типу і відповідним підвищенням рівня сАМР не має місця в даному випадку.

Таким чином, активація метаботропних, G-білок спряжених рецепторів різних типів може викликати як інгібування, так і фасилітацію P2X<sub>3</sub>-рецепторів.

Дослідженнями останніх років було показано, що активація нечутливих до РТХ  $G_q$ -білків, спряжених з брадикініновими рецепторами та рецепторами субстанції Р, лежить в основі стимулювання Р2Х3-струмів через PLC/PIP<sub>2</sub>/DAG/PKC-каскад (С.Park *et.al.*, 2010). Взаємодія опіоїдних рецепторів з  $G_q$ -білками та активація PLC-опосередкованого шляху були продемонстровані в клітинах нейробластоми, що інкубувалися з РТХ (М.Paukert *et.al.*, 2001).

Активація PLC призводить до гідролізу мембранного фосфоліпіда PIP<sub>2</sub> та утворення двох сигнальних молекул - IP<sub>3</sub>, котрий мобілізує Ca<sup>2+</sup> з внутрішньоклітинних депо, і DAG, який активує PKC (V.Rubovitch *et.al.*, 2003). З іншого боку, відомо, що PKC може впливати на активність Р2Х3-рецепторів (D.Brown *et.al.*, 2007). Отже, як PLC, так і PKC можуть бути залучені до модуляторного впливу лейкенкефаліну на Р2Х3-струми в інкубованих і не інкубованих з РТХ нейронах СГ. Ми виявили, що інгібітор PKC стауроспорин повною мірою усуває опіоїдіндукований фасилітуючий вплив на Р2Х3-струми у нейронах СГ, інкубованих з РТХ (рис. 15.).

Показано, що PKC може активуватися DAG або в результаті збільшення концентрації іонів Ca<sup>2+</sup> у цитоплазмі (Z.Wu *et.al.*, 2004). Оскільки концентрація цих іонів була стабільною в даних експериментальних умовах (внутрішньоклітинний розчин містив 10 мМ EGTA), ймовірно, що PLC/PIP<sub>2</sub>/DAG/PKC-шлях залучений до фасилітуючого впливу опіоїдів на Р2Х3-струми. Тобто, викликана опіоїдом активація PLC призводить як до інгібування, так і до стимулювання Р2Х3-рецепторів. Парадокс дивергенції PIP<sub>2</sub>-сигналу в тих самих мембранних областях обговорювався у ранніх роботах. Було висловлено гіпотезу, що молекулярні компоненти G-білок/PLC-сигнальних шляхів і їх фінальні цілі можуть бути просторово відокремленими мікродоменами (P.Delmas *et.al.*, 2004), а окремі PIP<sub>2</sub>-пули були ідентифіковані в плазматичній мембрані за допомогою електронної мікроскопії (A.Fujita *et.al.*, 2004). Виснаження PIP<sub>2</sub>-пулу, асоційованого з Р2Х3-рецепторами, призводить до інгібування Р2Х3-струмів (G.Мо *et.al.*, 2009), а гідроліз іншого пулу PIP<sub>2</sub>, відокремленого від Р2Х3-рецепторів, викликає їх стимулювання через DAG/PKC шлях.

Залучення PKC до фасилітуючого впливу опіоїдних рецепторів на ноцицептори було показано *in vitro* та концептуально узгоджено з отриманими результатами *in vivo*. Згідно з останніми, опіоїдіндукований PLC/PKC-сигнал викликає у піддослідних тварин гіпералгезію. Наприклад, супраспінальний аналгетичний ефект морфіну в нокаутних по PKC гену мишей значно посилювався (P.Newton *et.al.*, 2007). В інших дослідженнях застосування морфіну в низьких концентраціях призводило до гіпералгезії в термоноціцептивному поведінковому тесті (N.Galeotti *et.al.*, 2006). Автори стверджують, що до цього ефекту залучений PLC/PKC- сигнальний шлях.

Таким чином, активація опіоїдних рецепторів під дією ендogenous опіоїда ЛЕК, викликає два протилежно спрямовані впливи на Р2Х3-рецептори. Ці ефекти реалізуються через різні G-білки ( $G_{i/o}$  або  $G_q$ ), проте обидва шляхи опосередковані активацією PLC. Існування цих "різноспрямованих" шляхів, можна розглядати як молекулярну основу добре відомого переходу інгібуючої дії опіоїдів (аналгезії) до стимулюючої (гіпералгезії). З'ясування молекулярних основ балансу інгібування/стимулювання опіоїдної чутливості є важливим завданням для майбутніх досліджень у галузі молекулярної фізіології та фармакології болю.

## ВИСНОВКИ

1. Дія ендogenous агоністу опіоїдних рецепторів ЛЕК на нейрони спінальних гангліїв полягає в інгібуванні P2X3-опосередкованих струмів залежно від концентрації ЛЕК та тривалості його прикладання.
2. Збільшення проміжку часу між аплікаціями агоніста P2X3-рецепторів та тривале прикладання ЛЕК (від 9 до 20 хв) не впливають на десенситизацію P2X3-рецепторів. Амплітуда пригнічених P2X3-струмів не відновлюється в умовах присутності ЛЕК. Тому ЛЕК-опосередковане інгібування P2X3-струмів не пов'язане з модуляцією кінетики виходу рецепторів із десенситизованого стану.
3. Аплікація селективного антагоніста  $\mu$ -опіоїдних рецепторів СТОР на тлі дії ЛЕК повністю усуває інгібуючий ефект опіоїда. Це вказує на те, що опіоїд-кероване інгібування P2X3-струмів у нейронах СГ опосередковане активацією  $\mu$ -опіоїдних рецепторів.
4. Попередня інкубація нейронів СГ з антагоністом опіоїдних рецепторів налоксоном призводить до посилення інгібуючої дії ЛЕК на P2X3-рецептори. Проте, зворотний обмін агоніста опіоїдних рецепторів на антагоніст у високій концентрації, викриває раніше замаскований стимулюючий вплив опіоїдів на P2X3-струми. Цей ефект пов'язаний із специфічним впливом налоксону на певні G-білки опіоїдних рецепторів.
5. ЛЕК-індукована активація чутливих до РТХ  $G_{i/o}$ -білків і нечутливих  $G_q$ -білків  $\mu$ -опіоїдних рецепторів призводить до різкого наростання кальцієвого транзйенту в контролі. Проте інкубація нейронів з РТХ та викликане цим блокування  $G_{i/o}$ -білків зменшують інтенсивність вивільнення іонів  $Ca^{2+}$  з внутрішньоклітинних депо. Отже, викликане ЛЕК вивільнення іонів  $Ca^{2+}$  опосередковується активацією як  $G_{i/o}$ -, так і  $G_q$ -білків опіоїдних рецепторів.
6. Активація опіоїдних рецепторів викликає два протилежно спрямовані ефекти на P2X3-рецептори. Як інгібуючий, так і стимулюючий вплив ЛЕК на досліджувані рецептори усуваються застосуванням блокатора PLC на тлі дії ендogenous опіоїда. Це призводить до відновлення амплітуд P2X3-опосередкованих струмів до контрольних значень.  
Таким чином, подвійний вплив ЛЕК на P2X3-рецептори в нейронах СГ реалізується через різні G-білки, проте обидва ефекти опосередковані активацією PLC.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Статті:

1. Chizhnikov I., Kulyk V., Khasabova I., Khasabov S., Simone D., Bakalkin G., Gordienko D., Verkhatsky A., Krishtal O. Molecular mechanism for opioid dichotomy: Bidirectional effects of  $\mu$ -opioid receptor currents in rat sensory neurons. *Purinergic Signal*. 2015 Jun;11(2):171-81. *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті).*
2. Кулик В.Б., Чижмаков І.В., Волкова Т.М., Кришталь О.О. Опіоїд-регульована регуляція активності P2X3-рецепторів у нейронах дорсальних спінальних гангліїв. *Нейрофізіологія*. Т 47, №1, 2015, 14-18. *(Особистий внесок здобувача: проведення)*

*електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті).*

3. **Кулик В.Б.**, Чижмаков І.В., Волкова Т.М., Максимюк О.П., Кришталь О.О. Роль фосфоінозитидного сигнального шляху в опіоїдному контролі P2X<sub>3</sub>-рецепторів первинних сенсорних нейронів. *Фізіологічний журнал. Т 61, № 4, 2015, 22-29.* (Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті).

4. **V. B. Kulyk**, I. V. Chyzhnikov, T. M. Volkova, and O. A. Kryshtal Ambivalent Effects on P2X<sub>3</sub> Receptors in Rat Sensory Neurons in the Presence of Opioid Receptor Antagonists *Neurophysiology*, Vol. 47, No. 3, June, 2015. (Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті).

5. **Кулик В.Б.**, Волкова Т.М., Кришталь О.О. Механізми експресії та вивільнення ендогенних опіоїдів у периферичних тканинах. *Нейрофізіологія. Т 48, № 2/3, 2016.* (Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті).

#### **Тези доповідей:**

1. Krishtal Oleg, Chizhnikov Igor, **Kulyk Vyacheslav**, Simone Donald, Bakalkin Georgy. INHIBITORY EFFECT OF  $\mu$ -OPIOIDS ON P2X<sub>3</sub> RECEPTORS IN DRG NEURONS OF RAT. Joint Congress of FEPS and Turkish Society of Physiological Sciences. Istanbul, Turkey. 03/09/2011-07/09/2011

2. Єгорова О. В., Фісюнов О. І., **Кулик В. Б.**, Кришталь О. О. Модуляція агоністами опіоїдних рецепторів кальцієвих каналів Р-типу в нейронах Пуркінє мозочку щурів. // VIII Міжнародний симпозиум “Актуальні проблеми біофізическої медицини”. Київ 2014, май 14-17; стр. 45-46.

3. Єгорова О. В., Фісюнов О. І., **Кулик В. Б.**, Кришталь О. О. Вплив опіоїдів на десенситизацію високоафінного центру зв'язування опіоїдних рецепторів. // VI Конгрес Українського товариства нейронаук. Київ 2014, червень 4-8; стр. 50.

4. Єгорова О. В., Фісюнов О.І., **Кулик В. Б.**, Кришталь О. О. Стимулююча дія агоністів  $\mu$ - опіоїдних рецепторів на кальцієву провідність в нейронах Пуркінє. // VII Міжнародна наукова конференція “Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології”. Київ 2014, жовтень 7-9; стр. 58.

5. **Кулик В. Б.**, Єгорова О. В., Волкова Т. М., Кришталь О. О. Пуринергічний аспект периферичної опіоїдної аналгезії. // VIII Міжнародний симпозиум “Актуальні проблеми біофізическої медицини”, Київ-2014. Матеріали міжнародного симпозиума 14-17 мая 2014, стор. 63-64.

6. **Кулик В. Б.**, Єгорова О. В., Волкова Т. М., Кришталь О. О. Ендогенні опіоїди – диригенти P2X<sub>3</sub> рецепторів дорсальних нейронів щурів. // VI Конгрес Українського товариства нейронаук. Київ, 4-8 червня, 2014, стор 78.

7. **Кулик В. Б.**, Єгорова О. В., Волкова Т. М., Кришталь О. О. Модуляція впливу опіоїдів на P2X<sub>3</sub> струми антагоністами  $\mu$ - опіоїдних рецепторів. // VII Міжнародна наукова конференція “Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології”. Київ, 7-9 жовтня, 2014, стор 91.

## АНОТАЦІЯ

**Кулик В. Б. «Опіодергічна регуляція активності P2X3-рецепторів у нейронах спінальних гангліїв». – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин – Інститут фізіології ім.О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2016.

В рамках даної роботи, оцінено вплив ендogenous опіюду лей-енкефаліну на активність P2X3-рецепторів у нейронах спінальних гангліїв. Також окреслено роль біохімічних шляхів у взаємодії опіюдних рецепторів, котрі опосередковують анальгезію, з P2X3-рецепторами, що відповідають за ноцицепцію. В дисертаційній роботі вперше показано та досліджено подвійний вплив ендogenous агоніста опіюдних рецепторів на струми, опосередковані P2X3-рецепторами у сенсорних нейронах спінальних гангліїв щурів. Встановлено, що вплив лей-енкефаліну на P2X3-опосередковані струми в сенсорних нейронах, забезпечується низкою G-білок спряжених механізмів. Доведено, що лей-енкефалін не впливає на десенситизацію P2X3-рецепторів, а протинаправлена дія опіюда на зазначені рецептори може опосередковуватися активацією чутливих до токсину кашлюку Gi/o- та нечутливих – Gq-білків. Зокрема показано, що зв'язування лей-енкефаліну з  $\mu$ -опіюдними рецепторами призводить до одночасної активації обох типів G-білків, які мали б справляти подвійний вплив на P2X3-рецептори. Однак в контрольних умовах нами реєструвався лише інгібуючий вплив опіюда. Стимулюючий ефект ендogenous опіюда був прихований і проявлявся лише в умовах блокування Gi/o-білків токсином кашлюку.

Таким чином, з використанням методу «петч-клемп» нами вперше показано, що ендogenous агоніст опіюдних рецепторів лей-енкефалін викликає два протилежно спрямовані впливи на P2X3-рецептори. Ці ефекти опосередковуються активацією щонайменше двох типів G-білків та PLC.

**Ключові слова:** нейрони спінальних гангліїв, лей-енкефалін, P2X3-рецептори,  $\mu$ -опіюдні рецептори, Gi/o-, Gq-білки, токсин кашлюку, PLC.

## АННОТАЦИЯ

**Кулик В. Б. «Опиодергическая регуляция активности P2X3-рецепторов в нейронах спинальных ганглиев». - Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.13 - физиология человека и животных - Институт физиологии им.О.О. Богомольца НАН Украины, Киев, 2016.

В рамках данной работы, оценено влияние эндогенного опиоида лей-энкефалина на активность P2X3-рецепторов в нейронах спинальных ганглиев. Также определена роль биохимических путей во взаимодействии опиоидных рецепторов, которые опосредствуют анальгезию, с P2X3-рецепторами, отвечающими за ноцицепцию. В диссертационной работе впервые показано и исследовано двойное воздействие эндогенного агониста опиоидных рецепторов на токи, опосредованные P2X3-рецепторами в сенсорных нейронах спинальных ганглиев крыс. Установлено, что влияние лей-энкефалина на P2X3-опосредованные токи в сенсорных нейронах, обеспечивается рядом G-белок сопряженных механизмов. Доказано, что лей-энкефалин не влияет на десенситизацию P2X3-

рецепторов, а противонаправленное действие опиоида на указанные рецепторы может быть вызвано активацией чувствительных к токсину коклюша  $G_{i/o}$ - и нечувствительных -  $G_q$ -белков. В частности показано, что связывание лей-энкефалина с  $\mu$ -опиоидными рецепторами приводит к одновременной активации обоих типов G-белков, которые должны оказывать двойное воздействие на P2X3-рецепторы. Однако в контрольных условиях мы регистрировали только ингибирующее влияние лей-энкефалина. Стимулирующий эффект эндогенного опиоида был скрыт и проявлялся только в условиях блокирования  $G_{i/o}$ -белков токсином коклюша.

Таким образом, с использованием метода «пэтч-клемп» нами впервые показано, что эндогенный агонист опиоидных рецепторов лей-энкефалин вызывает два противоположно направленные воздействия на P2X3-рецепторы. Эти эффекты опосредуются активацией как минимум двух типов G-белков и PLC.

**Ключевые слова:** нейроны спинальных ганглиев, лей-энкефалин, P2X3-рецепторы,  $\mu$ -опиоидные рецепторы,  $G_{i/o}$ -,  $G_q$ -белки, токсин коклюша, PLC.

#### ANNOTATION

**Kulyk V.B "Opioidergic regulation of P2X3-receptors in the neurons of the spinal ganglia." - Manuscript.**

Thesis for PhD degree by speciality 03.00.13 – human and animal physiology. – Bogomolets Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv, 2016.

As part of this work, we have assessed the impact of endogenous opioid – leu-enkephalin P2X3 on the activity of receptors in neurons of the spinal ganglia. Also we outlined the role of biochemical pathways in the interaction of opioid receptors, which mediate analgesia with P2X3 receptors responsible for nociception. The thesis shows for the first time the double effect of endogenous opioid receptor agonist on currents mediated by P2X3 receptors in sensory neurons of spinal ganglia of rats. It is established that effect of P2X3-mediated currents in sensory neurons is supported by a G-protein coupled mechanisms. We have demonstrated that leu-enkephalin does not affect desensitization of P2X3-receptor and oppositely directed action of opioid on the receptors may be mediate by activation of pertussis toxin-sensitive  $G_{i/o}$  and insensitive -  $G_q$ -protein. In particular it is shown that binding of leu-enkephalin to  $\mu$ -opioid receptors leads to the simultaneous activation of both types of G-proteins, which would exert a dual effect on P2X3-receptors. However, in control conditions, we have recorded only inhibitory effect of opioids. The stimulating effect of endogenous opioids was masked and could be seen only in presence of pertussis toxin.

Thus, using the method of "patch-clamp" we first show that endogenous opioid receptor agonist – leu-enkephalin causes two oppositely directed effects on P2X3-receptors. These effects are mediated by activation of at least two types of G-proteins and PLC.

**Key words:** neurons of the spinal ganglia, leu-enkephalin, P2X3-receptors,  $\mu$  -opioid receptors,  $G_{i/o}$ ,  $G_q$ -proteins, pertussis toxin, PLC