

Н.М. Яценко, Т.Ш. Цінцадзе, Н.О. Лозова

Синтетичний аналог канабіноїдів WIN 55,212-2 збільшує амплітуду гліцинактивованих струмів

Большинство фармакологических эффектов каннабиноидов опосредуется активацией СВ1-рецепторов. Наши результаты показывают, что каннабиноиды могут непосредственно воздействовать на работу тормозных глициновых рецепторов. Мы обнаружили, что агонист каннабиноидных рецепторов WIN 55,212-2 вызывает значительное увеличение пиковой амплитуды глицинактивируемых токов в свежеизолированных пирамидальных нейронах гиппокампа, при этом не активируя каннабиноидные рецепторы. Наибольшую потенцию глицинактивируемых токов мы наблюдали при малых концентрациях глицина; с ее увеличением этот показатель значительно уменьшался. В данных условиях WIN 55,212-2 уменьшал время активации и десенситизации вызванных глицином хлорных токов. Такие эффекты продолжали наблюдаться в присутствии антагониста СВ1-рецепторов AM251. В использованных экспериментальных условиях действие каннабиноида на глициновые рецепторы является прямым, указывая на новые возможности применения этих веществ в антиноцицепции.

ВСТУП

У XIX сторіччі канабіноїди широко використовували як знеболювальний засіб. Вплив ендогенних канабіноїдів виявляють на різних етапах проходження больового сигналу: від периферичних сенсорних нейронів до спинного мозку та супраспінальних центрів.

Систематичне використання тетрагід-рочанабінолу (ТГК) і синтетичних канабіноїдів призводить до антиноцицепції та антигіперальгезії в різних експериментальних моделях гострого болю та запалення на тваринах. Було показано, що канабіноїди пригнічують електрофізіологічні відповіді нейронів спинного мозку на стимуляцію. Канабіноїди й анандамід також виявляють антиноцицептивну дію в моделях болю у тварин під час запалення при безпосередньому введенні їх у спинний мозок, стовбур головного мозку або таламус [23]. Дані вивчення поведінки дослідних тварин виявляють, що канабіноїди зменшують термічну та механічну алодинію в моделях нейропатичного болю у щурів [12].

Результати, отримані на генетично модифікованих мишах, нейрони мозку яких не мали СВ1-рецепторів, свідчать про те, що не всі антиноцицептивні ефекти канабіноїдів опосередковані ними. Так, було показано [6], що хоча антиноцицептивного впливу ТГК на мутантних тварин не було, анандамід продовжував діяти як анальгетик при дослідженні поведінки тварини у тесті на гарячу пластину. Тому пошук шляхів дії канабіноїдів без активації їхніх рецепторів може мати практичну значимість, оскільки терапевтична дія цих речовин не буде супроводжуватися небажаними наркотичними ефектами.

Дослідження в цьому напрямку показали, що прикладання ТГК викликає пригнічення функціонування серотонінових рецепторів типу 3 (5-НТ₃) незалежно від активації канабіноїдних рецепторів [2]. Аналогічно анандамід може пригнічувати функціонування щілинних з'єднань [24], потенціалкероаних кальцієвих каналів [22], різних типів калієвих каналів [20], 5-НТ₃-рецеп-

© Н.М. Яценко, Т.Ш. Цінцадзе, Н.О. Лозова

торів [9] і нікотинових ацетилхолінових рецепторів [21]. Нещодавно ми показали, що канабіноїди модулюють гліцинактивовані струми, які викликалися дією гліцину в концентрації 100 мкмоль/л і більше. Мета цієї роботи – дослідити вплив синтетичного аналога канабіноїдів на гліцинактивовані струми, котрі виникали при аплікації низьких концентрацій гліцину.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на білих щурах лінії Вістар віком 14–19 діб, яких утримували у віварії Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України на стандартній лабораторній дієті. Вибір тварин такого віку пояснюється тим, що до цього терміну диференціація пірамідальних нейронів гіпокампа практично закінчується, а розвиток елементів сполучної тканини не зашкоджує легкій ферментативній обробці, що використовувалась для ізоляції поодиноких нейронів.

Після декапітації тварини гіпокамп швидко переносили до чашки Петрі з охолодженням (+5°C) розчином такого складу (ммоль/л): NaCl – 150, NaHCO₃ – 26, KCl – 5, NaH₂PO₄ – 1,25, MgCl₂ – 2, глюкоза – 10. Розчин постійно насичували газовою сумішшю O₂ (95 %) та CO₂ (5 %); рН підтримували на рівні 7,35–7,4. Після охолодження в умовах постійного зволоження поверхні гіпокампа виготовляли його зрізи завтовшки 300–400 мкм, використовуючи тонке лезо. Після приготування та відокремлення зрізи переносили до інкубаційної камери, де їх витримували протягом 30–60 хв при 31°C. Життєздатні зрізи отримували за умови, що весь час описаної процедури не перевищував 15 хв.

Для ферментативної обробки зрізи інкубували 10–20 хв при 31°C у розчині з карбонатним буфером такого складу (ммоль/л): NaCl – 130, KCl – 2,7, MgCl₂ – 1,5, CaCl₂ – 2, NaHCO₃ – 26, NaH₂PO₄ – 1,

глюкоза – 10, а також 0,5 мг/мл протеази XXIII (“Sigma”, США); рН 7,4. Розчин насичували газовою сумішшю, що складалася з 95 % O₂ та 5 % CO₂. Після ензимної обробки зрізи при кімнатній температурі відмивали у розчині, котрий не містив ферменту. Ізолювання нейронів з пірамідного шару гіпокампа проводили за допомогою вібродисоціації.

Ізольовані нейрони мали невелику кількість проксимальних ділянок апікальних і базальних дендритів; соми таких клітин мали діаметр 15–20 мкм. У період дослідження нейрони зберігали стабільність іонних струмів і були здатні відповідати на аплікацію сполук протягом 30–90 хв. Реєстрацію струмів проводили методом patch-clamp у конфігурації “ціла клітина”, застосовуючи скляні мікропіпетки.

Для отримання гліцинактивованих відповідей використовували розчин Рінгера (ммоль/л): NaCl – 130, CaCl₂ – 3, KCl – 5, MgCl₂ – 2, HEPES-NaOH – 10 (рН 7,4), до якого додавали 0,1 мкмоль/л тетродотоксину (рН 7,4), а також гліцин із його базового розчину безпосередньо перед початком досліду. Гліцинактивовані струми індукували аплікацією гліцину в різних концентраціях. Внутрішньоклітинний розчин мав наступний склад (ммоль/л): трісPO₄ – 70, EGTA – 5, тетраетиламонію хлорид – 40, трісCl – 30, MgATФ – 5, ГТФ – 0,5; рН 7,2. Для запобігання активації ГАМК_A-рецепторів гліцином у розчин Рінгера всюди додавали бікукулін (10 мкмоль/л). Досліди проведено при кімнатній температурі (19–24 °C).

Усі результати подано як значення ± стандартне відхилення. Статистичний аналіз було здійснено з використанням програмного пакета Microcal Origin 6.0 (“Microcal Software”, США).

РЕЗУЛЬТАТИ

Прикладання гліцину на ізольовані пірамідальні нейрони ділянок CA1 і CA3 гіпо-

кампа за наявності бікукуліну викликало появу хлорних трансмембранних струмів. Амплітуда, час активації та десенситизації гліцинактивованих струмів залежали від концентрації гліцину (рис.1). Досліджувані струми повністю та зворотно блокувалися селективними антагоністами гліцинових рецепторів стрихніном (1 мкмоль/л) і гінголідом В (2–10 мкмоль/л).

Значення половинної дії гліцину в умовах наших дослідів становило 91 мкмоль/л \pm 5 мкмоль/л (n=4), а коефіцієнт Хілла був у середньому $2,2 \pm 0,2$ (рис.1), що узгоджуються з літературними даними [1,14].

Ми вивчали дію канабіноїдів на гліцин-активовані струми, що виникали у відповідь на прикладання 40, 100 та 300 мкмоль/л гліцину (рис.2). Було виявлено, що вплив синтетичного аналога WIN 55,212-2 призводив до суттєвого збільшення максимальної амплітуди хлорного струму, який викликався аплікацією низьких концентрацій гліцину (20–40 мкмоль/л, див. рис.2, а). Хлорний струм, що виникав у відповідь на прикладання більших концентрацій гліцину, практично не змінювався (див. рис. 2, б, в).

Значення максимальної амплітуди гліцинактивованого струму (нормовано щодо контрольних значень у відсутності канабіноїду, прийнятих за 100 %) за умов дії 1 мкмоль/л WIN 55,212-2 становило $189 \% \pm 26 \%$ ($P < 0,05$, n=3) при концентрації гліцину 40 мкмоль/л, який викликав струм. У разі прикладання 100 і 300 мкмоль/л гліцину значення цього показника було 107 ± 2 (n=8) і $110 \% \pm 5\%$ (n=3; рис. 3, а). Крім того, час активації та десенситизації струму значно зменшувався при додаванні канабіноїду. Так, при наявності WIN 55,212-2 константа часу десенситизації гліцинактивованого струму, який виникав у відповідь на прикладання 40, 100 і 300 мкмоль/л гліцину, зменшувалася до 70 ± 17 , 59 ± 4 ($P < 0,0001$, n=11) і $64 \% \pm 6 \%$ ($P < 0,002$, n=3) відповідно (див. рис.3, б). Зміна значення константи десенситизації гліцин-активованих струмів при низьких концентраціях гліцину не є статистично вірогідною, але в наших умовах проведення дослідів струми, що викликалися 40 мкмоль/л гліцину, були невеликі відносно шумів для адекватного виявлення змін.

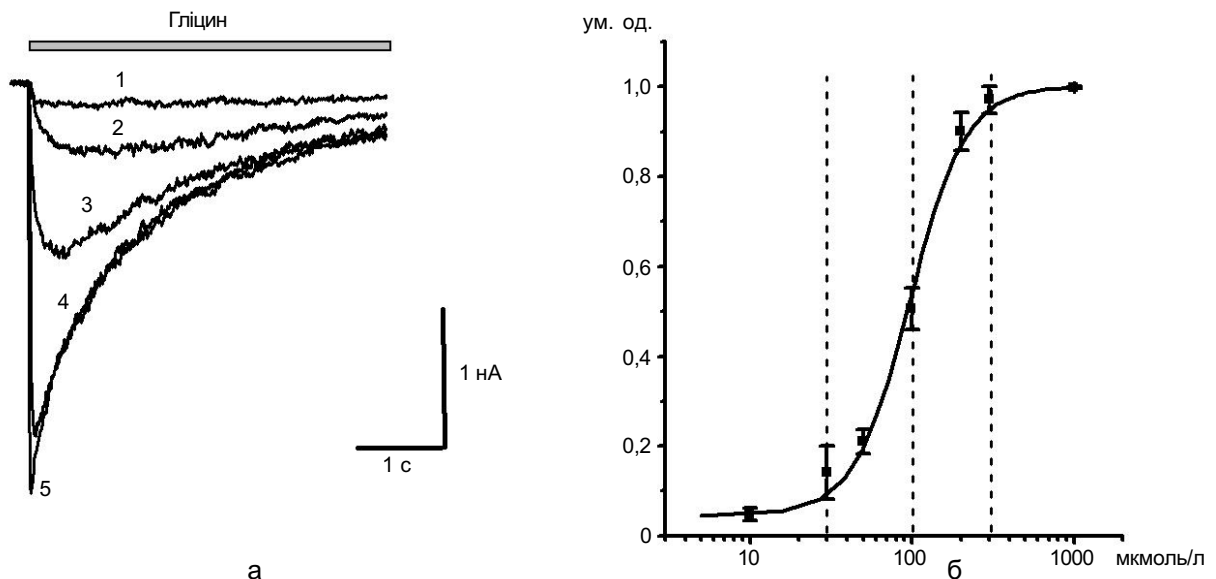


Рис. 1. Гліцинактивовані хлорні струми в ізолюваних нейронах гіпокампа, що виникали у відповідь на прикладання різних концентрацій гліцину. На а: 1 – 20 мкмоль/л, 2 – 50 мкмоль/л, 3 – 100 мкмоль/л, 4 – 200 мкмоль/л, 5 – 300 мкмоль/л; на б – залежність нормованої амплітуди гліцинактивованих струмів від концентрації гліцину

Час активації гліцинопосередкованих струмів оцінювали як 20–80 % їх часу наростання. При наявності WIN 55,212-2 цей параметр струму істотно зменшувався при аплікації 40 мкмоль/л гліцину до $53 \% \pm 10 \%$ ($P < 0,02$, $n=3$), при 100 мкмоль/л гліцину до $58 \% \pm 5 \%$ ($P < 0,02$, $n=11$), а для струмів, що виникали у відповідь на прикладання 300 мкмоль/л гліцину, значення становило лише $81 \% \pm 12 \%$ ($n=3$). Це може бути зумовлено тим, що 300 мкмоль/л гліцину є концентрацією, при якій більшість гліцинових рецепторів задіяні, тому

значних змін у часі активації гліцинопосередкованих струмів не відбувається.

Максимальна амплітуда, час активації та десенситизації хлорних струмів відновлювалися майже до контрольних значень після усунення синтетичного канабіноїду з розчину. Було встановлено, що за наявності AM-251, блокатора CB1-канабіноїдних рецепторів, вплив WIN 55,212-2 на максимальну амплітуду, час активації і десенситизації струмів, які викликалися 40 і 300 мкмоль/л гліцину, залишався.

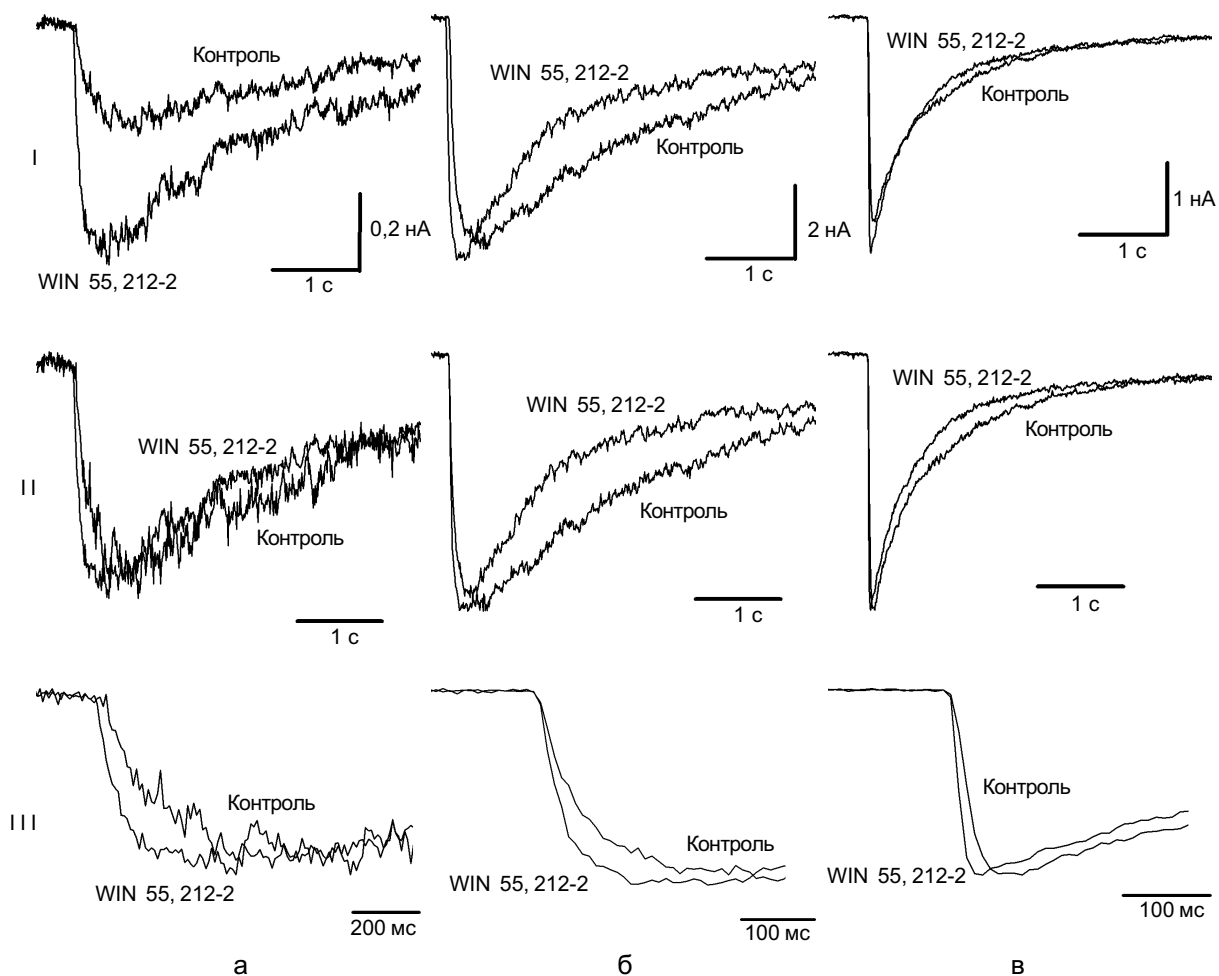


Рис. 2. Вплив синтетичного аналога канабіноїдів WIN 55,212-2 на гліцинактивовані струми, що виникали у відповідь на прикладання різних концентрацій гліцину: а – 40 мкмоль/л в умовах контролю та аплікації WIN 55,212-2, б – те саме для 100 мкмоль/л, в – для 300 мкмоль/л; I – нативні записи; II – записи, нормовані щодо максимальної амплітуди струмів, прийнятої за одиницю; III – фази наростання струмів при збільшенні розгортки

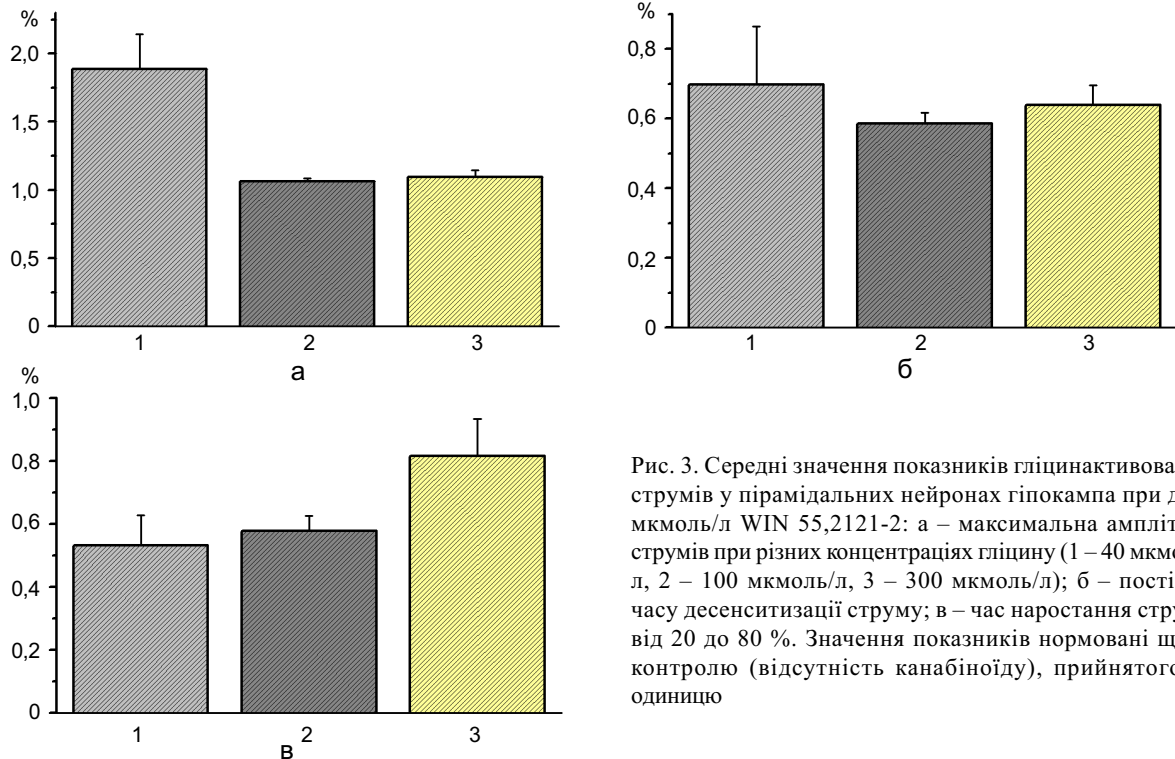


Рис. 3. Середні значення показників гліцинактивованих струмів у пірамідальних нейронах гіпокампа при дії 1 мкмоль/л WIN 55,212-2: а – максимальна амплітуда струмів при різних концентраціях гліцину (1 – 40 мкмоль/л, 2 – 100 мкмоль/л, 3 – 300 мкмоль/л); б – постійна часу десенситизації струму; в – час наростання струму від 20 до 80 %. Значення показників нормовані щодо контролю (відсутність канабіноїду), прийнятого за одиницю

ОБГОВОРЕННЯ

Гліцинові рецептори належать до надродини іонних каналів з Cys-петлею. До неї також входять рецептори ГАМК_A, нікотину, ацетилхоліну та 5-НТ₃. Структурно та функціонально гліцинові рецептори подібні до ГАМК_A-рецепторів. У мозку синтезуються як гомо-, так і гетеропентамерні рецепторні комплекси. За допомогою клонування геному було визначено чотири ізоформи α -субодиниці ($\alpha 1$ – $\alpha 4$) та одна β -субодиниця [17] гліцинових рецепторів. Переважно в дорослому віці у ссавців рецептор складається з $\alpha 1$ (або $\alpha 3$) та β -субодиниць, тоді як на ранніх етапах розвитку організму він має тільки $\alpha 2$ -субодиниці. N-кінцевий домен α -субодиниці має місця зв'язування з агоністом і стрихніном, які складаються з декількох дискретних амінокислотних ділянок. Включення β -субодиниці в пентамерний гліциновий рецептор зменшує провідність поодинокого каналу та змінює його фармако-

логічні властивості. Також β -субодиниця через взаємодію з білками цитоскелета прикріплює рецептор до синаптичної мембрани [13].

Гальмівна нейропередача в ЦНС представлена головним чином амінокислотами ГАМК і гліцином, які активують іонотропні ГАМК_A- і гліцинові рецептори відповідно. Відомо, що речовини, які збільшують гальмівні струми, мають виявляти заспокійливий і анальгетичний ефекти, м'язове розслаблення. Наприклад, концентрації ароматичного спирту пропофолу, що викликають знеболення, збільшували гліцинактивовані струми в нейронах мозку і рекомбінантних клітинах [10, 15]. Більше того, анестезувальні концентрації трихлоретанолу, ефірів і таких летких галогенованих гідрокарбонатів, як галотан, енфлуран, ізофлуран, метоксифлуран і севофлуран були ефективніші при низьких концентраціях гліцину [16]. Прикладання алкоголю також призводило до збільшення струмів, опосередкованих ГАМК_A- і гліци-

новими рецепторами [18]. Вплив спиртів на гліцинактивовані відповіді був сильнішим при збільшенні довжини алкільного ланцюга до 12 атомів вуглецю [16]. Ці дані узгоджуються з тим фактом, що під час інтоксикації та наркозу збільшується гліцинопоередковане гальмування алкоголем і знеболювальними препаратами.

Модуляція гліцинових рецепторів спиртами може пояснювати поведінкові прояви цих речовин. Такі речовини, як толуол, трихлоретан, трихлоретилен, ксилол і гексан при вдиханні викликають короткочасне відчуття ейфорії [8]. Деякі автори вказують на подібність дії цих летких препаратів до етанолу та барбітуратів [3]. Наприклад, леткі препарати виявляють заспокійливі [4] та антиконвульсивні властивості [25], а також зменшують координацію рухів [19]. Отже, етанол, леткі анестетики та наркотичні препарати, що вдихаються, є депресантами ЦНС: вони впливають на гальмівні лігандкеровані іонні канали, тобто можуть мати спільну молекулярну мішень дії.

Слід зазначити, що канабіноїди викликають помірну ейфорію, зміни у сенсорному сприйнятті, антиноцицепцію, труднощі у координації рухів [23], поведінкові реакції деякою мірою схожі з дією анестетиків та етанолу. Таким чином, можна припустити, що посилення функціонування гліцинових рецепторів при дії усіх цих сполук відповідає за їх вплив на поведінку, а ендогенні канабіноїди є природними “анестетиками”, тобто сполуками, що посилюють гальмування.

Отже, синтетичний канабіноїд у наших дослідах викликав потенціацію функціонування гліцинових рецепторів у ізольованих пірамідальних нейронах CA1 і CA3 ділянок гіпокампа. Нещодавно також було показано, що такі канабіноїди, як ТГК та анандамід викликали збільшення амплітуди гліцинактивованих струмів в ооцитах *Xenopus* і у свіжоізолюваних нейронах вентрально-тегментальної зони [11], а в

умовах стимулювання кальційзалежного синтезу ендоканабіноїдів спостерігали потенціацію гліцинактивованих синаптичних струмів у під’язикових мотонейронах [7]. Крім того, показано, що анальгетичний вплив ТГК та анандаміду зберігається в деяких тестах у генетично модифікованих мишей, котрі не мають канабіноїдних CB1-рецепторів [5]. Можна припустити, що потенціація канабіноїдами гліцинактивованих струмів і є тим молекулярним механізмом анальгезії.

N.M. Yatsenko, T.S. Tsintsadze, N.A. Lozovaya

THE SYNTHETIC CANNABINOID AGONIST WIN 55,212-2 POTENTIATES THE AMPLITUDES OF GLYCINE-ACTIVATED CURRENTS.

Most of the pharmacological actions of cannabinoids are mediated by CB1 receptors. There is also evidence that these compounds can produce effects that are not mediated by the activation of identified cannabinoid receptors. Our data demonstrate that cannabinoids may directly affect the functioning of inhibitory glycine receptor (GlyR) channels. Here, we report that cannabinoid receptors agonist WIN 55,212-2, in a CB1 receptor independent manner, cause a significant potentiation of the amplitudes of glycine-activated currents (I_{Gly}) in acutely isolated hippocampal CA3 and CA1 pyramidal neurons. The maximal potentiation by this compound was observed at the lowest concentration of glycine; with increasing concentrations of glycine, the potentiation significantly decreased. Also WIN 55,212-2 significantly accelerated the desensitization of Gly-induced chloride current and significantly decreased the rise time. The effects of WIN 55,212-2 on I_{Gly} were not attenuated in the presence of CB1 receptor antagonist AM251, suggesting that CB1 receptor activation are not involved in action of cannabinoid on GlyRs. Altogether these data allow us to suggest the existence of a CB1R independent action of cannabinoids directly on glycine-activated currents, representing a novel antinociceptive mechanism of this compounds.

Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Science of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Akaike N., Kaneda M. Glycine-gated chloride current in acutely isolated rat hypothalamic neurons // *J. Neurophysiol.* – 1989. – **62**, №6. – P. 1400–1409.
2. Barann M., Molderings G., Bruss M. et al. Direct inhibition by cannabinoids of human 5-HT_{3A} receptors: probable involvement of an allosteric modulatory site // *Brit. J. Pharmacol.* – 2002. – **137**, №5. – P. 589–596.

3. Bowen S. E., Wiley J. L., Balster R. L. The effects of abused inhalants on mouse behavior in an elevated plus-maze // *Eur. J. Pharmacol.* – 1996. – **312**, №2. – P. 131–136.
4. Bowen S. E., Wiley J. L., Evans E. B. et al. Functional observational battery comparing effects of ethanol, 1,1,1-trichloroethane, ether, and flurothyl // *Neurotoxicol. Teratol.* – 1996. – **18**, №5. – P. 577–585.
5. Di Marzo V., Breivogel C. S., Tao Q. et al. Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB(1) cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB(1), non-CB(2) receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain // *J. Neurochem.* – 2000. – **75**, №6. – P. 2434–2444.
6. Di Marzo V., Bisogno T., De Petrocellis L. Endocannabinoids: new targets for drug development // *Curr. Pharm. Des.* – 2000. – **6**, №13. – P. 1361–1380.
7. Diana M. A., Bregestovski P. Calcium and endocannabinoids in the modulation of inhibitory synaptic transmission // *Cell Calcium.* – 2005. – **37**, №5. – P. 497–505.
8. Evans E. B., Balster R. L. CNS depressant effects of volatile organic solvents // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 1991. – **15**, №2. – P. 233–241.
9. Fan P. Cannabinoid agonists inhibit the activation of 5-HT₃ receptors in rat nodose ganglion neurons // *J. Neurophysiol.* – 1995. – **73**, №2. – P. 907–910.
10. Hales T. G., Lambert J. J. The actions of propofol on inhibitory amino acid receptors of bovine adrenomedullary chromaffin cells and rodent central neurones // *Brit. J. Pharmacol.* – 1991. – **104**, №3. – P. 619–628.
11. Hejazi N., Zhou C., Oz M. et al. Delta⁹-tetrahydrocannabinol and endogenous cannabinoid anandamide directly potentiate the function of glycine receptors // *Mol. Pharmacol.* – 2006. – **69**, №3. – P. 991–997.
12. Iversen L., Chapman V. Cannabinoids: a real prospect for pain relief? // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2002. – **2**, №1. – P. 50–55.
13. Kneussel M., Betz H. Clustering of inhibitory neurotransmitter receptors at developing postsynaptic sites: the membrane activation model // *Trends Neurosci.* – 2000. – **23**, №9. – P. 429–435.
14. Kondratskaya E. L., Lishko P. V., Chatterjee S. S. et al. BN52021, a platelet activating factor antagonist, is a selective blocker of glycine-gated chloride channel // *Neurochem. Int.* – 2002. – **40**, №7. – P. 647–653.
15. Mascia M. P., Machu T. K., Harris R. A. Enhancement of homomeric glycine receptor function by long-chain alcohols and anaesthetics // *Brit. J. Pharmacol.* – 1996. – **119**, №7. – P. 1331–1336.
16. Mascia M. P., Mihic S. J., Valenzuela C. F. et al. A single amino acid determines differences in ethanol actions on strychnine-sensitive glycine receptors // *Mol. Pharmacol.* – 1996. – **50**, №2. – P. 402–406.
17. Meier J. C., Henneberger C., Melnick I. et al. RNA editing produces glycine receptor alpha3(P185L), resulting in high agonist potency // *Nat. Neurosci.* – 2005. – **8**, №6. – P. 736–744.
18. Mihic S. J. Acute effects of ethanol on GABA_A and glycine receptor function // *Neurochem. Int.* – 1999. – **35**, №2. – P. 115–123.
19. Moser V. C., Balster R. L. Acute motor and lethal effects of inhaled toluene, 1,1,1-trichloroethane, halothane, and ethanol in mice: effects of exposure duration // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 1985. – **77**, №2. – P. 285–291.
20. Oliver D., Lien C. C., Soom M. et al. Functional conversion between A-type and delayed rectifier K⁺ channels by membrane lipids // *Science* – 2004. – **304**, №5668. – P. 265–270.
21. Oz M., Ravindran A., Diaz-Ruiz O. et al. The endogenous cannabinoid anandamide inhibits alpha₇ nicotinic acetylcholine receptor-mediated responses in *Xenopus* oocytes // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2003. – **306**, №3. – P. 1003–1010.
22. Oz M., Tchugunova Y. B., Dunn S. M. Endogenous cannabinoid anandamide directly inhibits voltage-dependent Ca²⁺ fluxes in rabbit T-tubule membranes // *Eur. J. Pharmacol.* – 2000. – **404**, №1–2. – P. 13–20.
23. Pertwee R. G. Cannabinoid receptors and pain // *Prog. Neurobiol.* – 2001. – **63**, №5. – P. 569–611.
24. Venance L., Piomelli D., Glowinski J. et al. Inhibition by anandamide of gap junctions and intercellular calcium signalling in striatal astrocytes // *Nature* – 1995. – **376**, №6541. – P. 590–594.
25. Wood R. W., Coleman J. B., Schuler R. et al. Anticonvulsant and antipunishment effects of toluene // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1984. – **230**, №2. – P. 407–412.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України,
Київ*

*Матеріал надійшов до
редакції 06.02.2007*