

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

На правах рукопису

Кулик В'ячеслав Борисович

УДК 612.815.1:612.822

**Опіоїдергічна регуляція активності P2X3-рецепторів у
нейронах спінальних гангліїв**

Спеціальність 03.00.13. – Фізіологія людини і тварин

Дисертація на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних таук

Науковий керівник:

акад. НАН України, д.б.н., професор

Кришталь Олег Олександрович

Київ – 2016

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	5
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ	13
1.1. Сучасні уявлення про пуринергічні рецептори	13
1.2. Експресія пуринових рецепторів P2X типу в сенсорних нейронах.....	16
1.3. Електрофізіологічні властивості P2X3-рецепторів	18
1.4. Фармакологічні властивості P2X3-рецепторів	20
1.5. Модуляція P2X3-рецепторів вторинними месенджерами	22
1.5.1. Вплив фосфоінозитидів на регуляцію активності P2X3- рецепторів.	22
1.5.2. Вплив протеїнкіназ на регуляцію активності P2X3- рецепторів	23
1.6. Фізіологічна роль P2X3-рецепторів в умовах патології	25
1.7. Опіюїдні рецептори периферичних сенсорних нейронів.....	28
1.8. Утворення опіюїдних пептидів в імунних клітинах та сенсорних нейронах	29
1.9. Значення ендогенної опіюїдної системи у механізмах антиноціцепції	31
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	34
2.1. Методичні підходи	34
2.2. Експериментальні розчини та середовища для культивування клітин	34
2.3. Об'єкти досліджень.....	35
2.3.1. Експериментальні тварини.	35
2.3.2. Виділення та ферментування нейронів спінальних гангліїв.....	37
2.3.3. Культивування нейронів СГ.	41
2.4. Електрофізіологічні вимірювання	49

2.4.1. Виготовлення скляних мікропіпеток.	50
2.4.2. Метод фіксації мембранного потенціалу та реєстрація трансмембранних струмів.	50
2.4.3. Метод швидкого прикладання агоністів до ізольованих нейронів....	52
2.5. Метод візуалізації кальцієвого сигналу	55
2.6. Обробка результатів експериментів та аналіз даних	56
2.7. Використані речовини	57
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	58
3.1. Пригнічення P2X3-рецепторів лейенкефаліном.....	58
3.2. Інгібуючий вплив лейенкефаліну на P2X3-рецептори опосередкований μ-опіоїдними рецепторами.	65
3.3. Посилення інгібуючого впливу ЛЕК на P2X3-рецептори, викликане попередньою інкубацією нейронів СГ з налоксоном.....	68
3.4. Високі дози антагоністів опіоїдних рецепторів тимчасово стимулюють P2X3-опосередковані струми	71
3.5. Стимулюючий вплив ЛЕК на P2X3-струми в умовах інкубації нейронів СГ з токсином кашлюку	74
3.6. Роль фосфоліпази С у регуляції активності P2X3-рецепторів ендогенним опіоїдом ЛЕК	77
3.7. Стимулюючий вплив лейенкефаліну на P2X3-струми опосередкований залученням РКС	86
3.8. Викликане опіоїдами вивільнення іонів Ca^{2+} залежить від Gi/o- та Gq- білок спряженого сигнального шляху	88
РОЗДІЛ 4 ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	91
4.1. Вплив опіоїдів на нативні P2X3-рецептори.....	91

4.2. Інгібуючий та стимулюючий вплив μ -опіоїдних рецепторів на P2X3-рецептори опосередкований PLC	95
4.3. Механізми залучення протейнінази С до стимулюючого впливу ЛЕК на P2X3-рецептори.....	97
ВИСНОВКИ	104
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	106

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АТФ – аденозинтрифосфорна кислота

μ,δ,κ – типи опіоїдних рецепторів

ЛЕК – лейенкефалін

Gi/o – чутливі до токсину кашлюку G-білки

Gq – нечутливі до токсину кашлюку G-білки

СГ – спінальні ганглії

АДФ – аденозиндифосфорна кислота

α,β-Me-АТФ – α,β-метилен-аденозинтрифосфорна кислота

БЗ-АТФ – бензоїл- аденозинтрифосфорна кислота

ІВ₄ – ізолектин В₄

АСОН – антизмістовий олігонуклеотид

2-метилтіо-АТФ – 2- метилтіо-аденозинтрифосфат

АрЗА – диаденозинтрифосфат

НЕРЕС – N-2-гідроксиетилпіперазин-N'-етансульфонова кислота

Ір₅І – диінозин пентафосфат

PPADS – піридоксальфосфат-6-азофеніл-2',4'-дисульфонова кислота

TRPV 1 – ванілоїдний рецептор першого типу

БЗ-АТФ – бензоїл-бензоїл аденозинтрифосфорна кислота

АТФ-γ-S – аденозин 5'-[γ-тіо]трифосфорна кислота

ГАМК – γ-аміномасляна кислота

EGTA – етиленглікольтетраоцтова кислота

EDTA – етилендіамінтетраоцтова кислота

MeSATФ – 2-метилтіо-аденозиндифосфорна кислота

ПАФ – повний ад'ювант Фрейнда

РКА – протеїнкіназа А

РКС – протеїнкіназа С

ТНФ-АТФ – 2',3'-О-тринітрофеніл-аденозинтрифосфорна кислота

ФМА – форбол-12-міристан-13-ацетат

ПОМК – проопіомеланокортин
ПЕНК – проенкефалін
мРНК – матрична рибонуклеїнова кислота
PIP₂ – фосфатидилінозитол 4,5-дифосфат
IP3 – інозитол-1,4,5-трифосфат
PI3K – фосфатидилінозитол 3-кіназа
PI4K – фосфатидилінозитол 4-кіназа
cAMP – циклічна аденозинмонофосфорна кислота
ЦНС – центральна нервова система
ПД – потенціал дії
MOR – μ -опіоїдні рецептори
PTX – токсин кашлюку (пертуситоксин)
АС – аденілатциклаза
PLC – фосфоліпаза С
DAG – диацилгліцерол
CGRP – кальцитонін ген-зв'язаний пептид

ВСТУП

Актуальність теми

Важливою ланкою у шляхах генерації, передачі та модуляції больового сигналу, являються P2X3 та P2X2/3 рецептори, які експресуються в первинних сенсорних нейронах і активуються АТФ та її аналогами. Активація P2X3, P2X2/3, рецепторів модулює больову чутливість. Наприклад, периферичне чи спінальне введення АТФ або інших агоністів P2X рецепторів викликає «больову» поведінку у тварин, а також підвищує чутливість до больових стимулів у людини та тварин [1]. Водночас, введення селективних антагоністів до рецепторів, що містять P2X3 субодиницю, повністю блокує невропатичний та викликаний запаленням біль у піддослідних тварин [2]. У мишей, нокаутних по гену, що кодує P2X3- субодиницю, а також у щурів, яким вводили антисмислові олігонуклеотиди до мРНК, що кодує P2X3-субодиницю, внаслідок припинення чи порушення експресії P2X3-рецепторів знижувалася чутливість до болю [1].

Нервовій системі ссавців належить цілий ряд спеціальних пристосувань спрямованих на модуляцію больових відчуттів. До їх числа належить ендогенна опіїдна аналгетична система. Фізіологічна функція останньої опосередковується активацією ендогенними опіїдними агоністами трьох чітко визначених типів опіїдних рецепторів – μ , δ та κ [3].

Відомо, що всі основні типи опіїдних рецепторів експресуються в первинних сенсорних нейронах та їх периферичних терміналях [4]. Довгий час вважали, що аналгетичний ефект опіїдів, обумовлений їх дією на центральну нервову систему, однак останнім часом накопичені очевидні докази про те, що потужного знеболюючого ефекту можна досягти активацією опіїдних рецепторів на периферії, особливо при запальних процесах [5–7].

Було також показано, що на периферичних закінченнях тонких мієлінізованих та немієлінізованих волокон шкірних нервів, які залучені до сприйняття болю, присутні опіюїдні рецептори. Вони синтезуються в тілах первинних сенсорних нейронів і з током аксоплазми переносяться у відростки, де й вбудовуються в плазматичну мембрану. Активація опіюїдних рецепторів призводить до зменшення збудливості ноціцепторів. Відомо, що опіюїди, активуючи відповідні рецептори, спряжені з G_i -білками, можуть знижувати активність тетродотоксин-нечутливих натрієвих каналів та ванілоїдних рецепторів, створюючи периферичний знеболюючий ефект [8].

Числені клінічні звіти свідчать, що непроникні через гематоенцефалічний бар'єр опіюїди володіють аналогічним із звичайними опіюїдами знеболюючим потенціалом. Периферична опіюїдна аналгезія може мати ряд переваг над центральною, оскільки вона позбавлена таких небажаних центральних ефектів опіюїдів, як пригнічення дихання, депресія, блювання, залежність та ін. До того ж кількість опіюїдних рецепторів на ноціцептивних терміналях та їх доступність для відповідних лігандів зростають в ході запалення, з яким пов'язана переважна кількість больових відчуттів у людини [8]. Спільна експресія P2X3-рецепторів та опіюїдних рецепторів на мембранах нейронів спінальних гангліїв обумовлює актуальність пошуку зв'язку між цими об'єктами. Дослідження взаємодії опіюїдних та P2X3-рецепторів на клітинному рівні набувають особливого значення, з урахуванням функціонального призначення двох типів рецепторів в організмі.

На даний час, опіюїдно – індукована аналгезія, широко застосовується в клінічній практиці, проте питання молекулярного механізму знеболення достеменно не з'ясовано. В рамках даної роботи, оцінено внесок активності P2X3-рецепторів до низки процесів, що задіяні під час знеболення опіюїдами у периферичній нервовій системі. Також окреслено роль біохімічних шляхів у взаємодії опіюїдних рецепторів, котрі

опосередковують аналгезію 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. Дисертаційна робота виконана відповідно до загального плану науково-дослідних робіт відділу фізико-хімічної біології клітинних мембран Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України в рамках науково-дослідних робіт: “Механізми внутрішньоклітинної та міжклітинної сигналізації; вивчення шляхів їх модуляції та пошук нових фармакологічних впливів”(номер державної реєстрації – 0107U010843), в ході виконання теми: “Ендогенна та фармакологічна регуляція внутрішньоклітинної та міжклітинної сигналізації в клітинах нервової системи в нормі та патології” (номер державної реєстрації – 0110U004750), в рамках науково-дослідних робіт: “Іонні канали клітинних мембран: функціональна роль в нормі та патології” (номер державної реєстрації - 0113U003964) та “Клітинні сигнальні системи в нормі та патології” (номер державної реєстрації -0113U007273). А також в рамках гранту для молодих вчених НАН України: “Дослідження молекулярних механізмів знеболання, викликаного опіоїдними анальгетиками” (номер державної реєстрації - 0115U003830).

Мета та завдання дослідження. Мета даної дисертаційної роботи полягала у вивченні впливу опіоїдних рецепторів на активність P2X3 пуринорецепторів нейронів спінальних гангліїв щурів.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

1. Дослідити вплив ендogenous опіюда – лейенкефаліну на P2X3-опосередковані струми у нейронах спінальних гангліїв.

2. Ідентифікувати тип опіюдного рецептора, активація якого задіяна до механізмів впливу опіюдного ліганду на P2X3-рецептори.

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

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

5. Встановити роль іонів Ca^{2+} у механізмах опіюдно-індукованої модуляції P2X3-рецепторів у нейронах спінальних гангліїв.

Об'єкт дослідження – регуляція P2X3-рецепторів у нейронах спінальних гангліїв ендogenous опіюдом – лейенкефаліном.

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

Методи дослідження – метод культивування первинних сенсорних нейронів, метод внутрішньоклітинної перфузії, 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 опіюдних рецепторів на струми, опосередковані P2X3-рецепторами у сенсорних нейронах спінальних гангліїв щурів. Встановлено, що вплив лейенкефаліну (ЛЕК) на P2X3-опосередковані струми в сенсорних нейронах, забезпечується низкою G-білок спряжених механізмів. Доведено, що ЛЕК 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 ЛЕК з μ -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 ЛЕК. Стимулюючий ефект ендogenousного опіюїда був прихований і проявлявся лише в умовах блокування Gi/o-білків токсином кашлюку.

Таким чином, нами вперше показано, що ендogenousний агоніст опіюїдних рецепторів викликає два протилежно спрямовані впливи на P2X3-рецептори нейронів спінальних гангліїв, обидва з яких опосередковані активацією фосфоліпази C.

Теоретичне та практичне значення одержаних результатів. Проведені дослідження дозволили виявити та охарактеризувати зв'язок між μ -опіюїдними та P2X3- рецепторами сенсорних нейронів спінальних гангліїв щурів, що проявляється в здатності ендogenousного опіюїда - лейенкефаліну модулювати струми, опосередковані P2X3-рецепторами у нейронах. Отримані дані розкривають нове функціональне призначення опіюїдів: вони беруть участь у регуляції первинних ноціцептивних нейронів. Одержані результати розширюють існуючі уявлення про низку механізмів, що обумовлюють знеболюючий ефект опіюїдів, викликаний їх локальним периферичним введенням. Крім того, результати експериментів свідчать про існування раніше не описаних шляхів регуляції активності P2X3-рецепторів у сенсорних нейронах.

Існування різноспрямованих ефектів, викликаних лейенкефаліном можна розглядати як молекулярну основу добре відомого переходу інгібуючої дії опіюїдів (аналгезії) до стимулюючої (гіпералгезія, алодинія). З'ясування біохімічних шляхів, що змінюють чутливість до опіюїдів є важливим завданням для майбутніх досліджень у галузі фізіології та фармакології болю.

Особистий внесок здобувача. Усі експериментальні дослідження виконувалися за безпосередньої участі здобувача. Статистичне опрацювання результатів, підбір та обробка літературних джерел, виділення та культивування нейронів СГ 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 д. б. н., проф., акад. НАН України 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 наставницьку діяльність під час оволодіння методами виділення та культивування нейронів сенсорних гангліїв 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 темою дисертації опубліковано 12 праць, з них 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 матеріалів і методів досліджень, експериментальної частини, аналізу і узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел, який охоплює 209 найменувань. Дисертацію викладено на 129 сторінках стандартного машинопису, вона містить 22 рисунки.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ

1.1. Сучасні уявлення про пуринергічні рецептори

Пуринергічні рецептори є одними з еволюційно найстаріших рецепторів [9]. Представників родини цих рецепторів можна знайти майже у всіх тканинах ссавців. Вперше пуринові рецептори були описані в клітинах гладкої мускулатури кишечника щурів у 1970-ті роки [10]. У 2014 році цей рецептор виявлено у рослинах [11].

Вище зазначені рецептори поділяються на кілька типів: P1, які активуються переважно аденозином і P2, що активуються АТФ та його похідними (рис. 1.1.). Останні поділяються на іонотропні – P2X та метаботропні, G-білок спряжені – P2Y рецептори [12]. Нещодавно були отримані дані про функціональну експресію рецепторів аденіну, позначаються як рецептори P0 (рис. 1.1.) [13].

P2X рецептори являють собою іонні канали, що опосередковують проникність до катіонів (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}). Ці рецептори представлені переважно на збудливих клітинах і активуються вивільненням АТФ, як у центральній, так і в периферичній нервовій системі [14]. Нині відомо, що АТФ вивільняється з синаптичних везикул разом з класичними лігандами такими як ацетилхолін, норадреналін, з катехоламінами хромафінних клітин, глутаматом та ін. Загальноприйнятою стала точка зору, що АТФ виступає ко-трансмідатором разом з класичними нейромедіаторами. Також пурини вивільняються внаслідок впливу деполяризуючих агентів, таких як K^+ , вератридин, оубаїн, при електричній стимуляції. Було показано, що реліз АТФ може здійснюватися з клітин ендотелію, та гаденьких м'язів [15].

Наразі з'ясовано, що P2X родина налічує 7 субодиниць, які взаємодіючи між собою формують гомо- або гетеротримери [16, 17].

Кожна субодиниця має два трансмембранних домени, зв'язані за допомогою зовнішньоклітинної петлі, що має кілька регуляторних N-глікозильованих сайтів [18]. N- та C- термінальні кінці знаходяться в середині клітини [19]. АДФ зв'язується із зовнішньоклітинною петлею; припускається що необхідно 3 молекули АДФ для того щоб відкрити канал [20, 21]. Результати досліджень фармакології P2X рецепторів піднімають цікаве питання стосовно сайту зв'язування агоніста. Якби сайтом зв'язування була «проста» кищення, можна було б припустити, що АДФ також буде у певній мірі афінний до цього сайту. Проте у випадку з P2X1 рецептором, АДФ не є ні агоністом, ні антагоністом [22, 23]. Такі результати вказують на те, що наявність фосфатних залишків відіграє важливу роль у визначенні афінності агоністів та модуляторів цього сайту зв'язування. Сполуки з довгими фосфатними «хвостами», наприклад аденозин тетрафосфат чи діаденозин поліфосфат Ap5A виступають в ролі агоністів P2X-рецепторів [24].

Як уже зазначалося, всі P2X рецептори проникні до іонів Na^+ , K^+ та Ca^{2+} , а їх активація призводить до деполяризації клітинної мембрани та зростання концентрації Ca^{2+} в цитоплазмі. Час спрацьовування рецептор-канальної системи надзвичайно малий, тому P2X-рецептори відіграють значну роль у швидкій міжнейронній сигналізації та регуляції скорочення м'язів [25]. На сьогоднішній день відомо, що P2X1-, P2X2-, P2X3-, P2X4-, P2X2/3- та P2X1/5-рецептори всі проникні для іонів кальцію [26].

Однією з важливих характеристик P2X-рецепторів є здатність десенситизуватися, що проявляється у втраті чутливості до агоніста в ході його прикладання до рецептора. При цьому рецептор не реагує на повторне прикладання агоніста протягом певного часу після останнього його прикладання. За цією ознакою P2X-рецептори можна розподілити на дві групи. До першої групи відносять рецептори, які десенситизуються швидко (в інтервалі 100-300 мс). Сюди входять рекомбінантні P2X1- та

P2X3- рецептори та їх ендogenous аналоги, головним чином, P2X1-подібні рецептори гладеньких м'язів, клітин промієлоцитів HL60 та тромбоцитів, а також P2X3-подібні рецептори неонатальних чутливих нейронів (спінальних та вузлуватих гангліїв). До складу другої групи входять P2X-рецептори, що десенситизуються повільно або ж взагалі не десенситизуються, зокрема P2X2/3-рецептори сенсорних гангліїв щурів та гангліїв черевної порожнини морських свинок. До другої групи також відносяться клоновані P2X2-, P2X4-, P2X5- та P2X6-рецептори та нативні P2X-рецептори більшості нейронів автономної нервової системи, зокрема верхнього шийного ганглія щурів, підслизові нейрони кишечника морських свинок, парасимпатичні серцеві ганглії щурів [25].

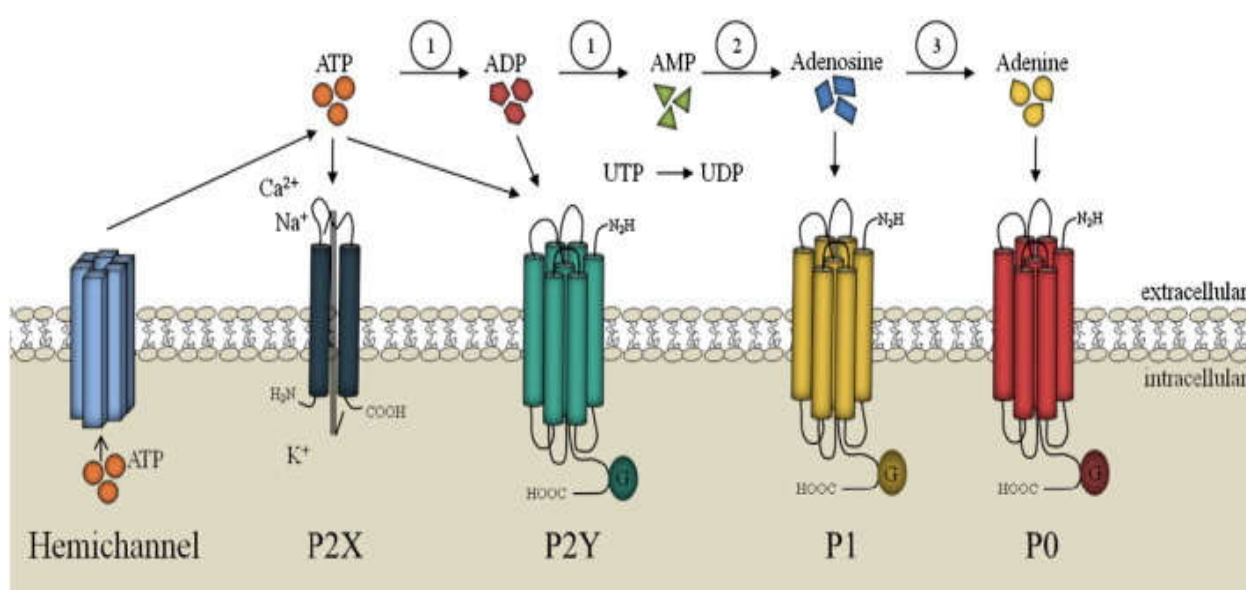


Рис.1.1. Пуринергічні рецептори та їх ендogenous ліганди.

P2X – іонотропні, рецептор-канальні комплекси, P2Y – метаботропні G-білкові рецептори, P1 – метаботропні рецептори, що активуються переважно аденозином, P0 – метаботропи, які активуються аденіном [27]

1.2. Експресія пуринових рецепторів P2X типу в сенсорних нейронах

Відомо, що периферичне введення агоністів P2X рецепторів викликає больові поведінкові реакції в експериментальних тварин та больові відчуття у людей. Так, одразу після введення α,β -Me-АТФ та БЗ-АТФ у підшву задньої лапи щура, у піддослідних тварин розвивалися характерні больові поведінкові реакції [28,29]. АТФ, прикладена до основи опікового пухиря у концентрації 0,2-0,6 нМ, викликала наростаючу біль із затримкою у часі, тривалістю до 100 с [30]. За іншими даними АТФ здатна викликати больові відчуття при інтрадермальному введенні лише у концентраціях, що перевищують 250 нМ [31]. У добровольців серед людей іонофоретичне прикладання АТФ на шкіру протягом перших 20 с викликало слабе відчуття болю, що посилювалося більше ніж удвічі у випадку запалення шкіри викликаного ультрафіолетовим опроміненням та при обробці шкіри капсаїцином [32]. Зазвичай, викликаний АТФ біль минав за кілька хвилин, незважаючи на те, що іонофоретичне прикладання агоніста продовжувалося. Це вказує на участь в цьому процесі P2X3-рецепторів, що швидко десенситизуються [33].

Із використанням імуногістохімічних методів було показано, що в нейронах вузлуватих гангліїв щурів експресуються білки P2X2- та P2X3-рецепторних субодиниць [34]. Імунореактивність до білка P2X2-субодиниці спостерігається у багатьох нейронах СГ різного діаметру, хоча рівень експресії P2X2-субодиниці нижчий, порівняно з P2X3 [23,34]. Деякі нейрони виявляють імунореактивність до обох субодиниць. Результати численних досліджень свідчать, що АТФ-індуковані відповіді у нейронах СГ опосередковуються швидко спадаючими струмами через P2X3-рецептори та повільно спадаючими струмами через P2X2/3-рецептори [35]. Також у нейронах СГ присутні м-РНК, що кодують P2X1 - 6 субодиниці, з найвищим рівнем експресії мРНК P2X3-субодиниці.

Причому, імунореактивність до P2X3-білка виявлено переважно у нейронах малого та середнього діаметра [35]. Білок P2X3-субодиниці експресується в непептидергічній субпопуляції ноціцептивних нейронів, що зв'язують IB₄. Нещодавно показано, що рівень експресії цієї субодиниці різко зменшується при обробці неонатальних нейронів капсаїцином [36]. Білок P2X3-субодиниці присутній приблизно в однаковій кількості в нейронах, що іннервують шкіру та вісцеральні органи, і в дуже незначній кількості в нейронах, що іннервують скелетні м'язи [37]. Ключова роль рецепторів підтипу P2X3 у передачі ноціцептивних сигналів була підтверджена за допомогою методу інтерференції малих молекул РНК [38] та із застосуванням ін'єкцій анти-сенсорних олігонуклеотидів (АСОН) [39]. Більш того, було показано, що експресія P2X3-рецепторів у нейронах СГ значно підвищується під час невропатичного чи запального болю [40], та больових синдромах пов'язаних із новоутвореннями [41]. У нокаутних мишей по P2X3-рецептору, нейрони вузлуватих гангліїв не відповідали на прикладання α, β -Me-АТФ у концентраціях до 100 мкмоль/л, водночас значно зменшувалися і АТФ-індуковані струми. Залишкові відповіді на АТФ, що практично не десенситизуються, мають усі властивості струмів, опосередкованих рекомбінантними гомомерними P2X2-рецепторами. Таким чином, поруч з P2X2/3- та P2X3- рецепторами в нейронах вузлуватих та дорсальних гангліїв присутні і P2X2-рецептори, хоча їх співвідношення може відрізнятися від клітини до клітини [42].

Отже, результати експериментальних досліджень свідчать про присутність нативних P2X3-рецепторів у сенсорних нейронах, зокрема у нейронах СГ, тригемінальних, вузлуватих та нижніх гангліях язико-глоткового нерва. Сенсорні нейрони СГ та тригемінальних гангліїв відповідають за ноціцептивну, механічну та пропріоцептивну чутливість. Представники P2X-рецепторів зазначених нейронів можуть бути

потенційними мішенями для медикаментозного впливу під час лікування різних больових станів [43].

1.3. Електрофізіологічні властивості P2X3-рецепторів

Результатами електрофізіологічних та імуногістохімічних експериментів показано, що P2X3- підтип рецептор-каналних комплексів експресується переважно периферичних та центральних закінченнях немієлінізованих C- та слабо мієлінізованих Аδ-сенсорних аферентів, де вони виконують роль сенсорної нейромодуляції та нейропередачі [18].

Усі типи субодиниць з родини пуринорецепторів мають схожу топологію. Кожна субодиниця має два трансмембранні домени, зовнішньоклітинну петлю значних розмірів та внутрішньоклітинні карбоксильний та амінний кінці.

Молекулярні дослідження дозволили встановити, що функціональний P2X3-рецептор-каналний комплекс являє собою тример, в якому три білкові субодиниці розташовані навколо іон-проникної пори [18].

P2X3-рецептор-каналні комплекси являють собою катіон-селективну пору [44]. Проникність кальцію відносно проникності натрію для цього каналу становить приблизно один до двох [45]. Слід зазначити, що АТФ-індуковані струми опосередковані P2X-рецепторами можуть модулюватися катіонами. Так амплітуди P2X3-струмів пригнічуються при високих концентраціях зовнішньоклітинного Ca^{2+} , [45]. Крім того, збільшення іонів Ca^{2+} (з 1 до 10 мМ) прискорює вихід P2X3-рецепторів з десенситизованого стану [46]. Іони Zn^{2+} , навпаки підвищують АТФ-індуковану катіонну проникність для більшості P2X-рецепторів і є алостеричними модуляторами P2X3-рецепторів, що підвищують ефективність зв'язування рецепторів з агоністом [47, 48].

Модуляція активності АТФ-зв'язуючого сайту може відбуватися і за рахунок зовнішньоклітинних протонів (H^+): кислий рН призводить до помітного зменшення амплітуд $P2X3$ -струмів, що було продемонстровано на ендогенних та рекомбінантних $P2X3$ -рецепторах людини та нейронах СГ та вузлуватих гангліїв щурів [48]. Це явище може бути особливо важливим для сигналізації, що опосередковується $P2X$ -рецепторами, за патологічних умов, коли внаслідок пошкодження чи запалення, локально, зовнішньоклітинний рН може різко змінюватися [48]. Також доведено, що амплітуда струмів опосередкована $P2X3$ -рецепторами залежить від температури [49]. Було показано, що розвиток процесу десенситизації $P2X3$ -рецептору не залежить від температури в діапазоні від 25 – 40 °С, в той час як відновлення після десенситизації значно прискорюється з підвищенням температури. Цікаво відмітити й про те, що чутливість високоафінного сайту зв'язування до низьких наномолярних концентрацій АТФ при температурі 35 °С значно нижча, ніж при 25 °С. Незвичне поєднання температурної чутливості/нечутливості $P2X3$ -рецепторів може бути пов'язано з їх ключовою роллю в обробці термічної сенсорики, що також показано в експериментах з нокаутом цих рецепторів [49].

Характерною особливістю струмів, опосередкованих $P2X3$ -рецептор-канальними комплексами є десенситизація, що проявляється у втраті чутливості до агоніста в ході його прикладання до рецептора. Десенситизація з'являється з часовою константою <100 мсек за концентрації агоніста 30 мкМ [44]. Вихід рецептора з десенситизованого стану сильно залежить від концентрації іонів кальцію у позаклітинному розчині. Так, при концентрації кальцію 1 мМ у зовнішньоклітинному розчині час виходу з десенситизації становить 7 хв, а при концентрації 10 мМ – всього лише 3,5 хв [46, 50].

На сьогодні відомий ряд агоністів $P2X3$ -рецептор-канальних комплексів: АТФ, α,β -ме-АТФ [17], 2-метилтіо-АТФ [44], β,γ -ме-АТФ

[51], діаденозин пентафосфат (Ap5A) [52] та інші. А також ряд антагоністів: сурамін, PPADS, ТНФ-АТФ, NF023 [45]. Жодна з перелічених сполук не є селективною по відношенню до P2X3-представника пуринергічної родини.

1.4. Фармакологічні властивості P2X3-рецепторів

Накопичені експериментальні дані свідчать, що АТФ-активовані струми у нейронах СГ та вузлуватих гангліїв опосередковуються, насамперед, P2X3- та P2X2/3-рецепторами. Ці рецептори подібні між собою за здатністю активуватися α,β -Me-АТФ та чутливістю до інших агоністів (2-MeS-АТФ, АТФ- γ -S, Ap3A). Водночас, зазначені рецептори відрізняються за кінетикою десенситизації та чутливістю до рН [53]. Так, амплітуди P2X2/3-опосередкованих струмів (подібно до P2X2-опосередкованих) відчутно зростають при закисленні середовища (у 2,5 рази при рН = 6,5) та істотно зменшуються в лужному середовищі (на 75% при рН = 8,0). Натомість амплітуди P2X3-опосередкованих струмів помітно зменшуються лише при значному закисленні середовища (до рН 5,5) [54]. Цибастрон блакитний [55], етанол [56] та іони Zn^{2+} [57] є алостеричними модуляторами P2X3-рецепторів, що підвищують ефективність зв'язування рецепторів з агоністом. Струми, опосередковані P2X3- та P2X2/3-рецепторами, можуть пригнічуватися ТНФ-АТФ у наномолярних концентраціях з селективністю принаймні у 1000 разів більшою, ніж для інших підтипів P2X рецепторів [47]. Наразі ТНФ-АТФ вважається конкурентним антагоністом P2X рецепторів [53]. Сурамін та PPADS також є антагоністами P2X3- та P2X2/3-рецепторів. Ip_5I , відомий як селективний антагоніст P2X1-рецепторів, виявляє активність в якості антагоніста нативних та рекомбінантних P2X3-рецепторів [58]. Результати експериментів вказують на те, що цей антагоніст пригнічує P2X3-опосередковані струми, стабілізуючи рецептори у

десенситизованому стані [59]. Високі концентрації зовнішньоклітинного кальцію пригнічують струми, опосередковані P2X3- та P2X2/3-рецепторами [45]. Крім того, підвищення концентрації зовнішньоклітинного Ca^{2+} (з 1 до 10 ммоль/л) прискорює вихід P2X3-рецепторів з десенситизованого стану [46]. Активація рекомбінантних та нативних P2X3- та P2X2/3-рецепторів пригнічується субмікромолярними концентраціями трикарбонової кислоти, відомої як A-317491. Ця речовина вважається конкурентним антагоністом рецепторів [60]. Іншим ефективним інгібітором P2X3- та P2X2/3-рецепторів, селективним відносно інших P2X-рецепторів є RO-3 - сполука подібна за структурою до антибактеріального препарату триметоприм [54]. Поівно з іншими антагоністами найбільш селективним для P2X є PPADS, який ефективно блокує P2X1- P2X3, P2X5 рецептори з величиною $\text{IC}_{50} = 1 - 2,6 \text{ мкМ}$ [61].

Нещодавно з отрути павука *Geolycosa sp.* було виділено пептид, який отримав назву пуротоксин – 1 (ПТ – 1). Він викликає інгібуючий вплив на P2X3-рецептори. [62]

Не зважаючи на значні успіхи у дослідженні фармакології P2X3-рецепторів, ця область досліджень все ще потерпає через відсутність потужних та селективних лігандів. Багато антагоністів, що були зазначені як селективні для P2X3-рецепторів, включаючи найбільш потужний сучасний пептидний антагоніст сіноρφін, який є також антагоністом для P2X2/3-рецепторів. Ця властивість сіноρφіну унеможливорює відокремлення ефектів, що пов'язані лише з P2X3-рецепторами. На сьогоднішній день жоден з антагоністів P2X-рецепторів не проходив клінічних досліджень і не застосовується у терапії болю.

1.5. Модуляція P2X3-рецепторів вторинними месенджерами

1.5.1. Вплив фосфоінозитидів на регуляцію активності P2X3-рецепторів.

Активність P2X-рецепторів може регулюватися низкою сигнальних шляхів та молекул. Важливими модуляторами активності P2X-рецепторів є фосфоінозитиди [63]. Хоча останні складають лише невелику частину клітинних фосфоліпідів, їх значення в регулюванні клітинних функцій викликає великий інтерес серед науковців [64].

Так, фосфатидилінозитол 4,5-дифосфат (PIP₂) і фосфатидилінозитол 3,4,5-трифосфату (PIP₃) беруть участь у функціональній модуляції декількох типів іонних каналів [65]. Існують докази того, що ці фосфоліпіди здатні модулювати функцію гомомерних P2X3- і гетеромерних P2X_{2/3}-пуриноцепторів, котрі виражені в спінальних гангліях (СГ). Інкубація дисоційованих нейронів СГ з інгібітором P13K/P14K - вортманіном в концентрації 35 мкМ викликало різке зниження амплітуди P2X3-струмів, індукованих АТФ чи α,β -Me-АТФ. В той час, як інкубація з 100 нМ вортманіну (селективне інгібування P13K) спричиняла не значний ефект. Внутрішньоклітинне додавання PIP₂ повністю усувало пригнічення P2X3-струмів, викликаного вортманіном. Застовуючи аналіз ліпідного зв'язування, було показано, що С-кінець P2X₂-субодиниці зв'язується безпосередньо з PIP₂, PIP₃ та з іншими фосфоінозитидами [65].

Деякі дослідники знайшли експериментальні підтвердження про те, що додавання до внутрішньоклітинного розчину PIP₂ призводить до активації P2X₁₋₅ та P2X₇-гомомерних рецепторів [66]. Повідомлялося також про те, що нативні P2X₃-рецептори у нейронах СГ чутливі до

концентрації фосфоінозитидів всередині клітини і активуються $PIIP_2$ та після активації $PI4K$ [63].

В останніх роботах було оцінено роль холестеролу ліпідних плотів у регуляції $P2X$ -рецепторів. Експериментально доведено, що $P2X3$ -рецептори нейронів СГ та головного мозку локалізуються в ліпідних плотах клітинних мембран і піддаються холестерол-залежному ендоцитозу [64].

Також описано, що агенти виснаження холестеролу призводять до зменшення амплітуд $P2X1$ -рецептор-опосередкованих струмів, проте не впливають на $P2X3$ -струми [64, 67].

1.5.2. Вплив протеїнкіназ на регуляцію активності $P2X3$ -рецепторів.

Перші роботи спрямовані на дослідження регуляторних механізмів нативних нейрональних $P2X$ -рецепторів, свідчать про те, що вони можуть модулюватися G-білок спряженими серотоніновими [68] та нікотиновими ацетилхоліновими рецепторами [61, [69]. Спільною ознакою вищезгаданих регуляторних взаємодій є те, що усі вони опосередковуються $G_{\alpha q}$ -спряженими білками, активація яких призводить насамперед до вивільнення кальцію з внутрішньоклітинних депо та активації протеїнкінази C (PKC). Тому зумовлена активацією G-білків модуляція $P2X$ -опосередкованих відповідей може відтворюватися шляхом прикладання форболового ефіру та блокуватися інгібіторами кіназ [70]. Внутрішньоклітинні ділянки різних типів $P2X$ -рецепторів істотно відрізняються за амінокислотним складом та довжиною C-кінцевого хвоста. Однак представники усієї родини мають консервативну ділянку в N-кінцевій частині, на яку може діяти PKC [70]. Внесення змін до консервативної ділянки PKC, призводило до зникнення функціональних відповідей $P2X3$ -рецепторів. Результати експериментів на $P2X2$ -

рецепторах, а також дані отримані на химерах з P2X2- та P2X3-рецепторів, свідчать про те, що регуляція P2X2-рецептора консервативною ділянкою РКС може модулюватися С-кінцевим доменом [71]. Було також показано, що активність P2X-рецептор-каналних комплексів може регулюватися і за рахунок фосфорилування по іншим ділянкам, відмінним від консервативного сайту РКС. Фосфорилуванню протеїнкіназами можуть підлягати і зовнішньоклітинні домени рецепторів: P2X3-рецептори можуть регулюватися екто-протеїнкіназою С [72].

Пізніше було запропоновано, що протеїнкіназа А задіяна до участі простагландин Е2-індукованої потенціації P2X3-опосередкованих струмів у нейронах СГ. Вчені також показують, що простагландин Е2 перемикається з РКА-залежним шляхом, у нормальних умовах, до РКА- та РКС-залежних шляхів, в умовах запалення. Окрім того, ключову роль у стимуляції P2X3-рецепторів зазначеними протеїнкіназами відіграє цАМФ-чутливий гуанін нуклеотидний фактор обміну-1 (Eras1) [73]. АТФ-індуковані P2X1- і P2X3-рецептор опосередковані струми потенціюються активатором РКС - форболовим ефіром (форбол 12-міристат 13-ацетат) [74, 75]. Інгібуючий вплив форболового ефіру на агоніст-індуковані P2X-струми спостерігався в окремих нейронах СГ дорослих щурів [76]. Пізніше було досліджено, що P2X3-рецептори пригнічуються шляхом фосфорилування двома кіказами: С-термінальною тирозиною протеїнкіназою та циклін-залежною кіназою-5 [77]. У нейронах трійчастого ганглія мишей, роль цієї кінази контролюється факторами росту нервів [64, 78].

На нейронах СГ було показано, що P2X3- та P2X2/3-рецептори функціонально пов'язані з ГАМК_A-рецепторами: при одночасній активації відбувається взаємне пригнічення опосередкованих цими рецепторами струмів [79]. За даними однієї з дослідницьких груп, таке пригнічення залежало від входу іонів кальцію та хлору [80]. Втім, пізніше було

показано, що міжрецепторна взаємодія не залежить від іонів хлору чи кальцію [79]. Такий зв'язок між рецепторами відбувається за участі внутрішньоклітинної ділянки з трьома амінокислотними залишками (QST) на С-кінці P2X₃- субодиниці, а також головної внутрішньоклітинної петлі β 3-субодиниці ГАМК_A-рецепторів [79].

Субодиниці P2X-рецепторів можуть взаємодіяти не лише з іншими ліганд-керованими каналами, а й з різними регуляторними білками та сигнальними молекулами [81].

Таким чином, регуляція активності P2X-рецепторів може відбуватися внаслідок активації G-білок спряжених рецепторів, взаємодії з іонотропними ліганд-керованими каналами та низкою інших сигнальних молекул. Отже, існує велика кількість механізмів, які можуть забезпечувати динамічну регуляцію активності P2X-рецептор-канальних комплексів у відповідь на різноманітні стимули.

1.6. Фізіологічна роль P2X₃-рецепторів в умовах патології

Дослідженнями останніх десятиліть накопичено чимало свідчень стосовно залучення P2X-рецепторів до сприйняття і передачі болю. У нормальних щурів ін'єкція α - β -меАТФ у задню кінцівку у концентрації близько 5 нМоль викликає больову поведінку у вигляді піднімання та облизування лапи [82]. Однак досліджено, що біль викликається прикладанням у 100 разів меншої концентрації α - β -меАТФ в умовах експериментального запалення (після ін'єкції карагінану або опромінення ультрафіолетовим світлом). Високої концентрації АТФ було зареєстровано у позаклітинному просторі у пацієнтів з гострим запаленням, а також у хворих на артрит [83, 84]. Джерелом АТФ є не лише пошкоджені клітини, але й нормальні ендотеліальні клітини, що здатні його секретувати [85]. Відомо, що в запаленій тканині рН може знижуватись до значення 5.5

[86, 87]. Отже, збільшення провідності деяких представників родини P2X-рецепторів за зниженого рівня рН [88] може бути прикладом механізму аллогенної дії АТФ.

Участь P2X3-рецепторів у сприйнятті гострого болю підтверджено спостереженнями на P2X3-нокаутних мишах [89, 90] та експериментами з тривалим інтратекальним введенням антисмислових олігонуклеотидів до мРНК, що кодує білок P2X3-субодиниці. Втім, результати кількох досліджень свідчать про те, що P2X3-рецептори не залучені до сприйняття механічних чи температурних больових стимулів [60, 90, 91].

На сьогодні існує значна кількість повідомлень про те, що антагоністи P2X3-рецепторів проявляють знеболювальні властивості в експериментах проведених на різних моделях болю *in vivo*, підтверджуючи тим самим залучення P2X3-рецепторів до процесів гострого, хронічного та запального болю. При спостереженні за больовою поведінкою щурів було встановлено, що інтенсивність больових проявів дещо знижувалась за умов закапування тваринам неселективних P2-антагоністів таких як сурамін, синій Евансаб трипановий синій, але не після введення PPADS [92].

Відомо, що підвищення активності P2X рецепторів під час запалення може бути наслідком посиленої експресії білків цих рецепторів. На модельних тваринах, у яких біль викликався повним адьювантом Фройнда (ПАФ) було показано, що збільшення амплітуди іонних струмів у відповідь на АТФ на ізольованих нейронах СГ пов'язане саме з підвищеною експресією білків P2X2- та P2X3-рецептор-канальних комплексів [93]. Так само у нейронах тригемінальних гангліїв спостерігалось підвищення експресії білків P2X3-рецепторів вже через добу після індукції м'язового запалення за допомогою ПАФ [93]. На відміну від СГ нейронів, у нейронах тригемінальних гангліїв експресія P2X3-рецепторів не обмежується клітинами малого діаметру (м'язові

аференти), а спостерігається також у клітинах середнього діаметру (шкірні аференти) [93].

Нині існує чимало доказів на користь того, що запальний процес супроводжується вивільненням прозапальних факторів, які можуть підсилювати ноціцептивні відповіді. Так, поведінкові відповіді у щурів на інтраплантарне введення АТФ чи α, β -Me-АТФ були виражені значно краще після попереднього введення простагландину E_2 [82]. Субстанція Р та брадикінін значно підсилювали відповіді нейронів СГ малого діаметру на прикладання АТФ [94]. Окрім того було встановлено, що нейрони тригемінальних гангліїв коекспресують P2X3-рецептори разом з генкальцитоніновим пептидом (ГКП) або із субстанцією Р; в експериментах із запаленням рівень експресії P2X3-рецепторів збільшувався в обох популяціях нейронів [93]. Нещодавно було також показано, що в аналогічних експериментальних умовах рівні експресії ГКП та субстанції Р також підвищуються [95]. Ці результати є вкрай важливими, оскільки було показано, що у хворих на мігрень у нейронах тригемінальних гангліїв ГКП може підвищувати рівень мРНК білків P2X3 рецепторів [96].

Чисельні дослідження свідчать про ефективність застосування антагоністів P2-рецепторів чи антисмислових олігонуклеотидів до мРНК P2X3-рецепторів для послаблення невропатичного болю. Доведено, що PPADS та ТНФ-АТФ послаблювали алодинію та викликані введенням α, β -Me-АТФ больові поведінкові реакції [97]. Блокатор P2X-рецепторів А-317491 зменшував збудливість нейронів дорсального рогу спинного мозку [98], а інтратекальне введення антисмислових олігонуклеотидів до мРНК P2X3-рецептора іпсилатерально послаблювало гіпералгезію та алодинію після пошкодження нерву [91, 99].

1.7. Опіюїдні рецептори периферичних сенсорних нейронів

Периферичні антиноціцептивні ефекти опіюїдів було виявлено близько 30 років тому [100]. Вчені помітили, що ці ефекти опосередковані опіюїдними рецепторами, котрі локалізуються в периферичних сенсорних нейронах. Пізніше експериментальні дослідження показали, що опіюїдні рецептори експресуються в різних за діаметром нейронах СГ і транспортуються до їх нервових закінчень [101]. Нині існують три чітко визначені або «класичні» типи опіюїдних рецепторів – μ , δ та κ , а також опіюїдоподібний рецептор (ORL1), що вважається членом родини опіюїдних рецепторів. Клоновані гени, що кодують ці типи рецепторів [102]. Вже давно постульовано, що опіюїдні рецептори належать до родини семи трансмембранних G-білок спряжених рецепторів, гени яких гомологічні на 50-70%. Поліпептидний ланцюг опіюїдних рецепторів утворює зовнішньоклітинну N-кінцеву ділянку, 7 трансмембранних доменів, з'єднаних між собою зовнішньоклітинними та внутрішньоклітинними петлями і внутрішньоклітинний C-кінцевий хвіст [103]. N-кінець, зовнішньоклітинні петлі та верхівка четвертого трансмембранного домену є ділянками зв'язування агоністів та антагоністів. Однак для кожного рецептора сайти зв'язування лігандів виявилися різними. Так для δ -рецепторів це третя зовнішньоклітинна петля, для μ -рецепторів – перша і третя зовнішньоклітинні петлі, а для κ -рецепторів – друга та верхівка четвертого трансмембранного домена. Додаткові фармакологічні підтипи цих рецепторів можуть виникати в результаті альтернативного сплайсингу, посттрансляційної модифікації або рецепторної олігомеризації [103]. Ідентифікація та аналіз послідовності кДНК і вибіркоче видалення генів опіюїдних рецепторів дозволили детальніше охарактеризувати їх окремі типи, а саме:

фармакологічні властивості, внутрішньоклітинні механізми, анатомічний розподіл і регулювання експресії [104].

З'ясовано, що зв'язування лігандів з опіоїдними рецепторами призводить до модуляції активності різних типів іонних каналів та іонотропних рецепторів, викликаючи пригнічення \ноціцептивних стимулів. Відомо, що опіоїди інгібують Ca^{2+} канали [105], пригнічують аденілатциклазу [106]. Активація периферичних опіоїдних рецепторів також пригнічує ТТХ-не чутливі Na^{2+} канали [107], пуринарні P2X2 -рецептори [108], TRPV1-опосередковані струми, залучаючи протеїнкіназу А [108]. Показано, що збільшення амплітуди K^{+} струмів та гіперполяризація, викликана активацією μ -опіоїдних рецепторів, призводить до зменшення частоти потенціалів дії в нейронах неонатальних щурів [109]. Таким чином, агоністи опіоїдних рецепторів можуть пригнічувати збудливість первинних аферентних нейронів і блокувати вивільнення прозапальних нейропептидів з центральних та периферичних терміналей, особливо в пошкоджених тканинах [110]. Вплив ендогенних опіоїдів на мембранні рецептори та іонні канали описаний численною кількістю робіт, проте питання стосовно механізмів утворення та вивільнення опіоїдів у периферичних тканинах все ще потребує роз'яснень.

1.8. Утворення опіоїдних пептидів в імунних клітинах та сенсорних нейронах

Ендогенні ліганди опіоїдних рецепторів являються похідними від трьох незалежних генів, котрі дають початок трьом прекурсорам відомих як проопіомеланокортин (ПОМК), проенкефалін (ПЕНК) та продинорфін. З останніх синтезуються опіоїдні пептиди β -ендорфін (ЕНД), лейенкефалін (ЛЕК), метенкефалін (МЕТ) та динорфін А відповідно. Ці пептиди і їх похідні різняться між собою спорідненістю та селективністю до опіоїдних

рецепторів: для μ - (β -ендорфін, МЕТ та ЛЕК), δ - (ЛЕК), κ - (динорфін) [111]. Два додаткові ендogenous опіоїди були виділені із мозку великої рогатої худоби: ендоморфін-1, -2. Обидва пептиди вважаються досить селективними лігандами для μ - рецепторів [112].

Дані про експресію енкефалінів та динорфінів у спінальних гангліях (СГ) і периферичних сенсорних нервах почали накопичуватись з 1980 р. Було показано, що ці пептиди транспортуються до центральної та периферичних нейронних терміналей, а також були виявлені в шкірних та синовіальних нервових закінченнях [113]. Досліджуючи наслідки пошкодження тканин, незначна кількість робіт вказує на відсутність мРНК до ПЕНК та продинорфіну в СГ щурів у нормі та з поліартритом [114]. Проте інші вчені не однократно доводять про те, що мРНК до ПОМК, ПЕНК та продинорфіну успішно візуалізується у СГ нормальних щурів [115]. Окрім того, було виявлено тимчасове зниження рівня мРНК до ПЕНК у момент запалення задньої лапи щурів, в той час як мРНК ПОМК і продинорфіну залишались сталими [116]

У моделі ревматоїдного артрити щурів, індукованого ад'ювантом поліартрити, відбувається ерозійне запалення суглобів та активація кісткової проліферації, що супроводжується хронічним болем. Ці порушення впливають на зміни пластичності аферентних нейронів, особливо тих, що містять опіоїди, наприклад енкефаліни, які утворюються з білка попередника проенкефаліна А (ПЕНК А) [117]. Введення рекомбінантного вірусу герпесу в задню лапу щурів, ДНК якого містить ген ПЕНК А, призводило до збільшення числа нейронів СГ, що експресують ПЕНК мРНК і до підвищення в них рівня метенкефаліну. Це сприяло поліпшенню пересування тварин та зниженню термальної гіпералгезії у щурів з поліартритом [117]. Наявність лейенкефаліну, динорфіну, та ендоморфіну було продемонстровано у різних типах імунних клітин [118]. Ендogenous опіоїдні пептиди ідентифіковано і в

периферичних субпопуляціях клітин, включаючи гранулоцити, моноцити/макрофаги та лімфоцити [119].

1.9. Значення ендогенної опіоїдної системи у механізмах антиноціцепції

Сучасні погляди вчених та результати досліджень останніх десятиліть дають всі підстави стверджувати, що в основі інгібування болю ендогенними опіоїдами лежать механізми нейро-імунної взаємодії. Адже відомо, що пригнічення ноціцептивних імпульсів частково досягається вивільненням ендогенних опіоїдних пептидів з імунних клітин, які мігрують та локалізуються у вогнищі запалення [101]. Вивчення молекулярних механізмів впливу опіоїдів на нервову систему започаткувало два нових напрямки досліджень стосовно дії опіоїдів на запалення та загоєння ран. Не однократно описано, що крім периферичних сенсорних нейронів, опіоїдні рецептори та їх ліганди виражаються в імунних клітинах, фібробластах, меланоцитах, кератиноцитах [120]. Опіоїди периферичної дії інгібують нейрогенне запалення, зменшуючи вивільнення субстанції Р та CGRP з периферичних терміналей сенсорних нейронів [121]. Також, опіоїди можуть інгібувати процеси вивільнення прозапальних цитокінів і молекул адгезії клітин [122], зменшувати набряк та екстравазацію плазми [123]. Показано, що інтраартикулярне введення морфіну сприяло зменшенню кількості лейкоцитів у синовіальній рідині пацієнтів з хронічним артритом [124] призводило до зменшення набряку суглобів, вмісту білка та сироваткових показників у синовіальній рідині коней при експериментальному синовіїті *in vivo* [125]. Окрім того, опіоїди володіють мітогенними властивостями і прискорюють регенерацію слизової оболонки [126], сприяють реепітелізації та міграції кератиноцитів [127], стимулюють синтез цитокератинів і трансформуючого ростового фактора- β , котрі є важливими компонентами

у проліферації клітин і загоєнні ран [128]. Місцеве застосування опіоїдів на ішемічно пошкоджені тканини, прискорює закриття уражених ділянок грануляційною тканиною, стимуляції утворення колагену, поліпшення епідермальної та дермальної організації, підвищує ангиогенез [129]. Опіоїди також позитивно впливають на регуляцію вивільнення фактору росту ендотелію судин та оксиду азоту у щурів [129]. Введення відносно нових периферично-діючих κ-агоністів пацієнтам з невропатичним болем [130], синдромом подразненого кишечника та після абдомінальної хірургії [131] викликало пригнічення болю без центральних побічних ефектів. Знеболююча дія морфін-6-глюкуроніду – похідного морфіну, не проникного крізь гематоенцефалічний бар'єр, була еквіефективною звичайному морфіну і не викликала седації та пригнічення дихання [132].

Однією з перспективних стратегій для посилення знеболюючого ефекту ендогенними опіоїдами є інгібування пептидаз. Найбільш відомими є ендопептидази та амінопептидази N, які локалізовані на поверхні нейронів та імунних клітин. Вони являються протеолітичними ферментами, які каталізують гідроліз різних пептидів, у тому числі і опіоїдних [133]. Раніше було показано, що внутрішньовенні ін'єкції тваринам інгібіторів обох пептидаз, посилюють антиноціцепцію, викликану периферичними опіоїдами [134]. Цікавими є результати досліджень із спільним застосуванням ендогенних канабіноїдів та морфіну у тварин з невропатією [135]. Автори стверджують, що ін'єкції морфіну та підвищення рівня ендогенного канабіноїда - 2-арахідоніл-гліцеролу, шляхом селективного інгібування гідролітичного ензиму – ліпази моноацил-гліцеролу, призводить до спареного антиалодинічного ефекту. Причому описане знеболення не супроводжувалось пригніченням моторики кишечника, що є основним побічним впливом опіоїдів на периферичну нервову систему [135].

Також нещодавні дослідження показали, що у тварин з цукровим діабетом, порушення периферичної опіоїдної аналгезії пов'язане зі зниженням функціонального зв'язку μ -опіоїдних рецепторів з G-білками [136]. Крім того, фосфорилювання та десенситизація μ -опіоїдних рецепторів у сенсорних нейронах залежали від активації рецепторів кінцевих продуктів глікозилювання (RAGE) і опосередковувались протеїнкіназою C (PKC). Блокування PKC та RAGE усувало десенситизацію опіоїдних рецепторів і відновлювало аналгетичний ефект *in vivo*. Отримані результати дозволять запропонувати можливі стратегії профілактики порушення опіоїдного знеболення при цукровому діабеті [136].

Останнім часом з'являються роботи, які стосуються скринінгу білків у продуктах харчування з метою виявлення опіоїдних пептидів та розуміння їх потенціалу в управлінні болем. Ці дослідження відкривають нові можливості у розробці лікарських дієт, які доповнюватимуть основні терапевтичні ефекти викликані опіоїдами [137, 138]

Опіати вже давно розглядаються як найбільш ефективні препарати для лікування важких форм гострого і хронічного болю. Однак їх терапевтична ефективність та клінічна користь обмежена центральними побічними ефектами. Створення екзогенних опіоїдів периферичної дії та детальне вивчення механізмів функціонування ендогенної опіоїдної системи сприятиме впровадженню нових молекулярних інструментів для боротьби з болем.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Методичні підходи

Для дослідження впливу опіоїдів на струми, опосередковані P2X3 рецепторами, у первинних сенсорних нейронах щурів застосовувались такі методичні підходи:

- виділення СГ щурів;
- ферментування СГ;
- культивування нейронів СГ;

в) реєстрація струмів, опосередкованих P2X3-рецепторами у нейронах СГ, методом фіксації потенціалу («петч-клемп») в режимі відведення від цілої клітини.

2.2. Експериментальні розчини та середовища для культивування клітин

Під час проведення електрофізіологічних експериментів, а також в ході виділення нейронів та приготування культур клітин використовувалися такі розчини та середовища для культивування:

- Зовнішньоклітинний розчин 1 – водний розчин, що містив (у ммоль/л): 130 NaCl; 5 KCl; 2 CaCl₂; 2 MgCl₂; 10 HEPES. рН розчину доводили до 7,3-7,35 за допомогою NaOH. Цей розчин використовували для зберігання СГ після їх ферментативної обробки, а також як базовий зовнішньоклітинний розчин під час проведення електрофізіологічних експериментів на усіх типах нейронів. В разі потреби агоністи P2X, опіоїдних рецепторів та інші діючі речовини розчинялися саме в зовнішньоклітинному розчині 1.

- Зовнішньоклітинний розчин 2 – водний розчин на фосфатному буфері такого складу (концентрації – у ммоль/л): 137 NaCl, 2,7 KCl, 10 Na₂HPO₄, 2 KH₂PO₄. pH розчину доводили до 7,4 за допомогою NaOH. У цьому розчині проводилася ферментативна обробка дорсальних гангліїв.
- Внутрішньоклітинний розчин – водний розчин такого складу (у ммоль/л): 130 KCl, 10 Hepes, 10 EGTA, 0,5 ГТФ, 5 АТФ. pH розчину доводили до 7,3 за допомогою КОН. Розчин використовувався для заповнення скляних мікропіпеток для відведення трансмембранних струмів від усіх типів досліджуваних нейронів.
- Середовище для культивування – містило 90% рідкого середовища MEM (Sigma, США) та 10% інактивованої ембріональної сироватки телят. До отриманого розчину додавали інсулін 25 мкл на 50 мл середовища MEM, L-глутамін та гентаміцин у концентраціях 2 ммоль/л та 20 мкг/мл, відповідно. Середовище використовувалося для культивування нейронів дорсальних гангліїв.

2.3. Об'єкти досліджень

2.3.1. Експериментальні тварини.

В експериментах використовувались білі щури лінії Вістар WAG\GSto (Москва, Росія) віком 8-10 днів, вага яких становила 15-20 г. Тварини утримувались на стандартній лабораторній дієті в умовах віварію Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України. Вибір тварин такого віку пояснюється передусім тим, що їх сенсорні ганглії містять значно менше сполучнотканинних елементів. На стадії виділення клітин це дозволяє уникнути застосування підвищених концентрацій ферментів, які могли б спричинити пошкодження мембранних структур нейронів, зокрема й рецепторів. Крім того, при використанні молодих тварин зводиться до мінімуму вплив травми на виділення клітин та подальшу реєстрацію їх електрофізіологічної активності. Вибір тварин молодого віку пояснюється

також відносною легкістю формування гігаомних контактів між мікропіпеткою та мембраною виділених нейронів. Експерименти над тваринами проводились згідно з існуючими міжнародними та національними нормативними актами щодо використання піддослідних тварин, зокрема: Конвенції Ради Європи від 18.03.1986 та Закону України від 21.02.2006 № 3447-IV.

На даний час відомо, що популяція одомашнених білих щурів (*Rattus norvegicus*) була представлена в університеті Кларка як модель для досліджень у галузі дієтології та фізіології. Протягом багатьох років щури використовувались у експериментальних дослідженнях, які розширили розуміння в галузі генетики, патогенезу хвороб, ефектів медикаментів на організм та інших темах медицини та фізіології. Лабораторні щури також виявились надзвичайно важлими у дослідженнях фізіології навчання та інших ментальних процесів. Одомашнені щурі відрізняються від диких за багатьма аспектами. Вони спокійніші, менш агресивні, здатні уживатись у більших скупченнях тварин, раніше досягають статевої зрілості, дають більше нащадків, їхні мозок, печінка, нирки, наднирники та серце менші за розмірами. Нині відомо багато ліній лабораторних щурів. Більшість із них походять від щурів-альбіносів лінії Wistar. Зазвичай, щури певної лінії не є трансгенними або генетично модифікованими, оскільки прості процедури генетичної трансформації, які працюють на мишах не працюють на щурах.

Лінія Wistar є аутбредною лінією щурів-альбіносів, що належать до виду *Rattus norvegicus*. Цю лінію було виведено в інституті Вістар (Філадельфія) для наукових потреб. Це була перша лінія, яку використовували в якості об'єкта лабораторних досліджень. До того в лабораторіях використовували переважно представників роду *Mus musculus*, або ж хатню мишу. Більшість лабораторних ліній щурів походять з колонії Вістарського інституту, виведеної у 1906 році фізіологом Генрі Доналдсоном, науковим адміністратором Мілтоном Гренманом та

генетиком-ембріологом Неленою Кінг. Наразі щури лінії Wistar є найбільш популярним об'єктом досліджень.

2.3.2. Виділення та ферментування нейронів спінальних гангліїв.

Вплив опіоїдів на P2X3-рецептори було досліджено на культивованих протягом 24 годин нейронах СГ щурів. Нейрони СГ відносяться до первинних сенсорних нейронів і являють собою псевдоуніполярні клітини. Відростки цих клітин забезпечують рецепцію зовнішніх та внутрішніх подразників та передачу збудження до вторинних сенсорних нейронів ЦНС, що знаходяться в задніх рогах спинного мозку і ядрах Голля та Бурдаха довгастого мозку. Сенсорні нейрони СГ мають спільне походження з нейронами симпатичних, парасимпатичних та черевних гангліїв, а також хромафінними клітинами наднирників. В ході ембріонального розвитку ці структури формуються з клітин нервового гребеня [35]. До складу СГ теплокровних тварин входить щонайменше два типи нейронів, що забезпечують ноціцептивну та неноціцептивну чутливість. Існує кілька класичних підходів щодо класифікації нейронів СГ. Вони засновуються на тому, що цілий ряд анатомічних та функціональних властивостей цих клітин корелюють з їх розмірами та формою потенціалу дії, який вони генерують [139–141].

Харпер та Лоусон виділили дві групи нейронів у щурів віком 5-8 тижнів: високопровідні (від яких відходять А α - чи А β -волокна із швидкістю проведення ПД понад 14 м/с) та низькопровідні (від яких відходять А δ - або С-волокна із швидкістю проведення збудження меншою, ніж 8 м/с). Виявилося, що сенсорна модальність нейронів СГ тісно пов'язана із швидкістю розповсюдження ПД по їх аксонах. Так високопровідні А α - та А β -волокна, що йдуть від шкіри та м'язів передають переважно тактильну та пропріорецептивну інформацію, тоді як низькопровідні А δ - та С-волокна забезпечують переважно больову та

температурну чутливість. Було також показано, що існує кореляція між швидкістю поширення потенціалу дії по аксону та розмірами соми нейронів ДГ [142]. Швидкість проведення ПД для нейронів СГ кішки, діаметром понад 50 мкм, перевищує 2,5 м/с; тоді як для нейронів, що мають діаметр менший, ніж 35 мкм, вона виявилася нижчою 2,5 м/с.

Для нейронів СГ існує також кореляція між формою ПД соми та типом сенсорної інформації, яку вони сприймають. Виділяють два основних типи ПД, що генеруються мембраною соми первинних сенсорних нейронів щурів. Перший тип має платоподібний «горб» у низхідній фазі, більше значення овершута та меншу амплітуду слідової гіперполяризації. Такий тип ПД характерний для низькопровідних нейронів. Інший тип ПД характеризується тим, що «горб» на фазі реполяризації відсутній, амплітуда спайку менша, а слідова гіперполяризація виражена краще. Такий тип ПД реєструється в основному у клітинах з відростками А α - чи А β -типу (високопровідних нейронах). Величина потенціалу спокою практично не відрізняється для обох типів нейронів. Максимальна швидкість наростання та спаду ПД практично в 2 рази більша в високопровідних клітинах, порівняно з низькопровідними, що також корелює з швидкістю розповсюдження збудження по аксонах [140]. Численні дослідження, виконані на інтактних задньокорінцевих спинномозкових гангліях із застосуванням мікроелектродної техніки, привели до висновку, що висхідна фаза ПД низькопровідних нейронів обумовлюється входом у клітину іонів Na⁺ та Ca²⁺, тоді як у високопровідних клітинах має місце лише натрієвий вхідний струм. Але в останні роки на ізольованих клітинах з використанням методу петч-клемп було показано, що всі нейрони СГ здатні генерувати потенціалзалежні кальцієві струми. Отже, відмінності у формі ПД нейронів різних груп не можуть бути пояснені лише за рахунок наявності чи відсутності якихось типів каналів.

Дещо інший підхід для класифікації нейронів ДГ застосували Скрогс та Фокс. В залежності від розміру соми вони розподілили нейрони СГ на три групи: великі (з діаметром соми 45-60 мкм), середні (з діаметром соми 33-38 мкм) та малі (діаметр соми яких становить 15-33 мкм) [143]. Співвідношення між кількістю малих, середніх та великих нейронів змінюється в процесі онтогенезу. Так у щурів віком один місяць великі клітини складають 45% від загальної кількості нейронів у гангліях, а в щурів віком два місяці – 35%. У переважної більшості малих нейронів (понад 97%) капсаїцин у концентрації 1 мкмоль/л зумовлює зсув струму (у вхідному напрямку), що пов'язують із збільшенням мембранної провідності. Зумовлений капсаїцином ефект був зворотним, тобто повністю зникав після відмивання речовини. Інші клітини, діаметр соми яких коливався в межах від 33 до 52,5 мкм, виявилися нечутливими до капсаїцину (також у концентрації 1 мкмоль/л). Капсаїцин-чутливі клітини характеризувалися, в середньому, значно тривалішим потенціалом дії та слабко вираженим I_H струмом (вхідний струм, що активується гіперполяризацією клітини) у порівнянні з капсаїцин-нечутливими клітинами. Відносно велика тривалість потенціалу дії, незначний I_H струм та малий діаметр соми у більшості капсаїцин-чутливих нейронів корелюють з тим, що від них відходять Аδ- та С-волокна, які відповідають за сприйняття/передачу болю [139]. Таким чином, розмір соми сенсорного нейрона, форма ПД, що генерується сомою, чутливість до певних речовин, а також тип волокон, що відходять від тіла нейрона можуть слугувати критеріями для його ідентифікації як ноціцептивного чи неноціцептивного.

Подальші дослідження у цьому напрямку вказують на те, що популяція нейронів СГ є ще більш гетерогенною. Окремі дослідники виділяють до 25 функціонально різних підтипів нейронів СГ, що забезпечують цілий ряд сенсорних модальностей, зокрема: пропріорецептивну, тактильну, теплову, холодovu і больову чутливість

[141]. Останнім часом зроблено кілька спроб класифікувати нейрони СГ, використовуючи, так званий, профіль струмів (“current signature”) [141,144]. Підтипи клітин, виділені із застосуванням такого підходу, виявилися досить гомогенними, що свідчить про його перспективність.

Під час вимірювань у даній роботі використовувались виключно нейрони малого діаметру. Це дозволило зменшити розкид отриманих даних та полегшило їх подальшу інтерпретацію, оскільки нейрони, на яких проводилися вимірювання належали до однієї чи споріднених функціональних груп.

Для отримання ізольованих нейронів СГ тварину декапітували, розтинали спинномозковий канал та очищали його від залишків спинного мозку, після чого за допомогою спеціального пінцету видаляли грудні та поперекові СГ. Видалені в такий спосіб ганглії вміщували у зовнішньоклітинний розчин 1. Тут їх переглядали під біноклем та, якщо виникала така необхідність, додатково очищали від залишків крові та сполучнотканинних елементів. Після цього їх переносили у скляний пеніциліновий флакон з 4-5 мл підігрітого до +34 С зовнішньоклітинного розчину 2, до якого додавали колагеназу (тип IV, Sigma, США) в концентрації 2 мг/мл та трипсин 4 мг/мл. Флакон вміщувався у термостат, де свіжоізольовані ганглії інкубувалися протягом 30 – 45 хв за температури +34 С. Після завершення ферментативної обробки ганглії послідовно відмивали у 2 стадії за кімнатної температури (+22 – 25 С). Для цього їх вміщували у пеніцилінові флакони, заповнені зовнішньоклітинним розчином 1, до якого додавали сироватковий альбумін бика (Sigma, США) у концентрації 1,3 мг/мл, як конкурентний субстрат для колагенази. Це дозволило практично повністю виключити подальшу обробку гангліїв залишками ферменту та зменшити тривалість відмивання. Тривалість першої стадії відмивки становила 5 хв, другої – близько 10 хв. Після цього ганглії вміщували в пеніциліновий флакон, заповнений середовищем для культивування. Для того щоб одержати

клітинну суспензію, ганглії за допомогою піпетки переносили з пеніцилінового флакона у краплину середовища для культивування, де вони механічно руйнувались за допомогою гнучких сталевих голок або ж піпетками Пастера різних діаметрів. Ізольовані нейрони виділялися з гангліїв за рахунок вібрацій, створюваних голками чи шляхом піпетування розчину з ферментованими гангліями. По завершенні цієї процедури всі крупні сполучнотканинні фрагменти гангліїв видалялися з краплини. Решту гангліїв, які залишилися в пеніциліновому флаконі, відбирали піпетками Пастера та підтримували їх життєдіяльність в культуральному середовищі.

2.3.3. Культивування нейронів СГ.

Отримана суспензія клітин переносилася на покривні скельця, розміщені у стерильних чашках Петрі. Краплину розчину з суспензією нейронів на покривному скельці залишали в цілковитому спокої протягом 20 хв, аби клітини могли прикріпитися до дна скельця. Після цього чашки Петрі заповнювали 2-3 мл середовища для культивування та вміщували у CO_2 інкубатор. Нейрони перебували в інкубаторі протягом 24 годин за температури 37°C . Протягом усього часу культивування в інкубаторі, розчин, в якому перебували нейрони, насичувався газовою сумішшю, що містила O_2 (95%) та CO_2 (5%) для підтримання рН на рівні 7,35-7,4. В разі потреби, після адгезії нейронів до покривного скла до середовища, в якому культивувалися нейрони, додавали 150-200 нг/мл кашлюкового токсину (зазначено окремо).

Отримані в такий спосіб нейрони СГ використовувалися для електрофізіологічних вимірювань протягом 1-2 год, після чого скло з культурою нейронів замінювали на інше. Контрольні експерименти показали, що нейрони, які знаходилися в ферментативно оброблених та культивованих СГ, зберігали свої основні електрофізіологічні

характеристики принаймні протягом 24 год з моменту їх вилучення з організму тварини.

Основна перевага первинних культур спеціалізованих клітин – їх доступність для морфологічних, електрофізіологічних та фармакологічних досліджень. Основний їх недолік – обмежена тривалість життя в культурі, високий ступінь гетерогенності та відносно незначні кількості гомогенних клітин при використанні їх для проведення біохімічного аналізу. Крім того, в експерименті буває складно контролювати багато властивостей диференційованих клітин, так що простота первинних культур порівняно з іншими системами *in vitro* та *in vivo* лише видима. Так, наприклад, нервові клітини у первинній культурі формують густу неупорядковану сітку відростків та синаптичних контактів, тому навіть у такій простій системі вивчення механізмів та регуляції синаптогенезу досить ускладнене.

В ідеальному випадку первинна культура спеціалізованих клітин, таких, як нервові, м'язові, ендокринні та гліальні, має являти собою чисту популяцію нетрансформованих клітин, здатних до росту та термінального диференціювання в контрольованих умовах. Практично ж, техніка культивування не може поки забезпечити це повністю.

Більшість первинних клітинних культур, що мають вагоме значення для нейробіології, отримують з ембріональних тканин птахів та щурів. Це пояснюється перш за все тим, що курячі ембріони, як і ембріони щурів, недорогі та зручні як джерело матеріалу для культур нервових, гліальних та м'язових клітин. В кожному конкретному випадку тканину розділяють на клітини, зазвичай, комбінуючи механічні та хімічні методи. Вибір методу та хімічних реагентів залежить від типу тканини, але в процесі виділення клітин існують, як правило, традиційні етапи. Тканини ембріона або постнатальні тканини подрібнюють механічно та розпушують піпетуванням або інкубують в розчині відповідного фермента, перемішуючи, для кращого проникнення фермента у тканину. Найбільш ефективні для дисоціації тканин, так само як і для пасажування клітин

жорстко діючі ферменти, такі як трипсин, проназа або панкреатин. Для запобігання формування гелі до суміші зазвичай додають ДНКазу. Потім клітини фільтрують, збирають, об'єднують, промивають збалансованими сольовими розчинами та, нарешті, розводять культуральним середовищем.

Тканини дорослої тварини слід спочатку ретельно промити збалансованим сольовим розчином, що містить антибіотики у високій концентрації (з метою запобігання забруднення), а потім обробити ферментами, які діють на фіброзні тканини і полегшують наступну дисоціацію, наприклад, колагеназою, або колагеназою в різноманітних комбінаціях з трипсином. Оскільки мета процедури дисоціації – відтворюване отримання великих кількостей життєздатних клітин для пасажу, очевидно, що без уваги не мають лишатись навіть найдрібніші деталі. Наприклад, умови ферментативної обробки не завжди оптимальні для конкретного фермента. Так, трипсин, який найбільш часто розчиняють у збалансованому сольовому розчині без вмісту іонів кальцію та магнію, забуференому до рН – 7,2-7,8 має оптимум рН між 8 і 9 та стабілізується іонами кальцію. Подібним чином, колагеназа, вимагає для нормального функціонування присутності іонів кальцію, часто використовується в розчинах вільних від іонів кальцію та магнію. Ефективна дисоціація тканин за таких умов чітко вказує на те, що такі ефекти можуть бути опосередковані наявністю в суміші інших ферментів.

Вибір тканини та методів її дисоціації визначається необхідністю отримання суспензії життєздатних клітин. Однак, у такій суспензії наявні клітини різних типів, що може призвести до гетерогенності культури, якщо не вжити відповідних заходів при пасажуванні. Наступний крок у приготуванні первинних клітинних культур – збагачення їх клітинами бажаного типу та усунення або зменшення кількості фібробластоподібних клітин, що прикріплюються до субстрату швидше ніж клітини інших типів, і які мають високу здатність до проліферації. Це слід робити як перед початком, так і під час культивування. Найбільше значення при виборі

конкретного методу має співвідношення між клітинами, які необхідні досліднику, та клітинами інших типів у тканині, що піддаються дисоціації. В деяких типах тканин, наприклад, у скелетних м'язах, спостерігається сприятливе співвідношення міогенних та неміогенних клітин, тож при акуратному виділенні можна отримати культури, що містять високі концентрації міогенних клітин. За допомогою різноманітних маніпуляцій концентрацію міогенних клітин в культурі можна підвищити. Інші тканини, головним чином нервова, характеризуються в переважній більшості випадків високим співвідношенням нервових клітин до нервових. В таких випадках для збагачення культури клітинами певного типу або підтипу застосовують ретельно розроблені процедури.

Процедури, що зазвичай використовуються для сортування клітин перед культивуванням, ґрунтуються на таких їх властивостях, як розміри та плавуча густина. Сортування здійснюється або за допомогою седиментації клітин, або за допомогою центрифугування їх у градієнті густини. Більш складні та тривалі методи базуються на різниці в таких властивостях клітинних мембран як поверхневий заряд або специфічні місця зв'язування. При цьому використовують сортування за допомогою клітинного сортувальника або мічення клітин різноманітними маркерами [145]

Під час первинного культивування можна провести часткову селекцію клітин за ступенем прикріплення їх до субстрату, за чутливістю до цитотоксичної дії і за ступенем виживання в одних і тих самих умовах [145]. Наприклад, використовуючи властивість малодиференційованих клітин – легко прикріплюватись до скла, можна суттєво зменшити їх кількість в культурі. Для цього суспензію клітин попередньо висівають на скляну поверхню, і після кількох годин інкубації неприкріплені клітини переносять у новий культуральний флакон. Крім того, однією з властивостей нервових, м'язових та ендокринних клітин є їх сповільнене прикріплення до будь-якої поверхні, порівняно з клітинами будь-якого

іншого типу. Цю властивість можна використовувати для багаторазових переносів цих клітин в нові культуральні флакони після короткотривалих (15-ти хвилинних) інкубацій. В культурах, що містять клітинни, нездатні до поділу (постмітотичні клітини), також можна контролювати проліферацію інших клітин, використовуючи антиметаболіт (наприклад, аміноптерин, цитозинарабінозид, 5-фтордезоксидуридин), що вибірково руйнуватиме проліферуючі клітини. Аналогічного ефекту у контролі проліферації клітин можна досягти введенням до складу середовища біологічно активних речовин, які перешкоджатимуть розмноженню клітин. Для звільнення культур від небажаних клітин можуть бути використані також цитотоксичні сироватки, специфічні по відношенню до даних типів клітин [146]. В той же час, при видаленні із культурального середовища ростових факторів, необхідних для виживання певних типів клітин, можна вибірково зберігати нечутливі до них клітини.

Заключний та критичний етап в отриманні первинних культур – вибір культурального середовища. Для первинних клітинних культур цей етап не настільки важливий, але при роботі з клітинними лініями він ставить багато проблем перед дослідниками. В обох випадках вибір культурального середовища визнається необхідністю забезпечити *in vitro* умови, оптимальні для виживання, росту та розвитку клітин. Однак, багато досить важливих питань, в тому числі пов'язаних з вибором субстрату, ростових середовищ з різноманітними добавками, режиму культивування, все ще лишаються недосконалими. Тому стандартні умови культивування, установлені для окремих класів спеціалізованих клітин, в більшості випадків досить довільні, навіть якщо ці умови цілком адекватні. Вони забезпечують порівняно успішне прикріплення, ріст та виживання клітин. В деяких випадках вони забезпечують утворення моношару або контрольовану зміну форми клітин, їх росту та розвитку, але непридатні для розмноження.

Розробка методів культивування тканин великою мірою пов'язана зі спробами ідентифікувати компоненти культуральних середовищ, необхідні для росту та довготривалого підтримання клітин, створити середовища певного хімічного складу, специфічні для клітин різноманітних типів [147]. До середини 20 століття з'явилися синтетичні поживні середовища, що використовуються для культивування і донині. Ці середовища створювалися на основі стандартних сольових розчинів, до яких додавали різні кількості амінокислот, вітамінів, мікроелементів та інших поживних компонентів. Втім, їх не можна було використовувати без ряду біологічних інгредієнтів, таких як сироватка, плазма або тканинні екстракти. Введення ж цих речовин в культуральні середовища створювало непевність та варіабельність по відношенню до їх специфічної ролі у підтриманні клітин в культурі. Пізніше дослідники зконцентрували увагу на з'ясуванні ролі таких інгредієнтів культурального середовища, як сироватка, тканинні екстракти, а також на фактори, що синтезуються клітинами. Останні здатні діяти як мітогени, забезпечувати виживання та диференціювання клітин або змінювати їх функціональний стан. Мета таких досліджень – створення повністю синтетичних середовищ, специфічних для певних типів клітин, що допоможе з'ясувати, які саме фактори регулюють їх нормальний ріст та розвиток.

Потенційно такі синтетичні середовища можуть мати суттєве значення для вивчення регуляції нормального росту та розвитку: вони дозволять також відтворювати та уніфікувати умови культивування. Втім, для електрофізіологічних досліджень склад середовища не має настільки критичного значення.

Нервові клітини та клітини деяких інших спеціалізованих типів не можуть ділитися в первинній культурі за стандартних умов; для їх виживання та розвитку, зазвичай, окрім сироватки необхідна наявність в культуральному середовищі тканинних екстрактів та(або) специфічних ростових факторів, а також поживної підкладки. Ми можемо впливати на

виживання та розвиток клітин, змінюючи або склад ростового середовища, або деякі властивості самих клітин в результаті використання відповідних кондиційованих середовищ, або вносячи інші зміни в їх мікрооточення; втім, клітини досить вимогливі до поживних речовин та, знаходячись в культурі, не дозволяють в широких межах маніпулювати часом їх виживання, здатністю до диференціювання та функціонування.

Разом з тим вже встановлені клітинні лінії легко ростуть та потребують досить простих культуральних середовищ, з ними легко працювати. Проте при посіві вихідної культури та при вивченні якоїсь конкретної функції, слід приділяти особливу увагу режиму культивування. В клітинних лініях, як і у трансформованих клітин, спостерігається безконтрольна проліферація, тобто необмежений клітинний поділ. Оскільки стандартні умови культивування сприяють безконтрольній проліферації, досить важливо проводити повторне субкультивування. Хоча при багаторазовому пасажуванні клітини можуть піддатись випадковій селекції. Тому за тривалого ведення ліній необхідно постійно порівнювати клітинні параметри, а також заморожувати клітини на низьких пасажах для подальшого використання. В деяких випадках, навпаки, рекомендується проводити селекцію клітин. Наприклад, якщо для клітин характерні низькі адгезивні властивості, більшу їх частину видаляють, сильно струшуючи культуральний флакон, піпетуючи або інкубуючи клітини у забуференому сольовому розчині без кальцію та магнію. Потім при додаванні свіжого ростового середовища, клітини, що залишились відновлюють ріст і їх знову можна клонувати.

До найбільш важливих властивостей спеціалізованих клітинних ліній належить їх здатність проявляти характерні для даного типу клітин функції. Ця здатність проявляється навіть в період активних поділів, але вона зазвичай посилюється при формуванні конфлюентного моношару. Для досягнення максимально диференційованого стану клітин режим їх культивування слід змінити таким чином, щоб повністю зупинити або

сповільнити клітинний поділ. Втім, кінцевий диференційований стан значно варіює в залежності від типу клітин, а в межах однієї лінії клітин – в залежності від характеру впливу. Відповідно, при вивченні якоїсь конкретної клітинної функції важливо використовувати відповідні клітинні лінії та відповідний режим культивування. Крім того, три різні форми диференціювання (морфологічна, електрофізіологічна та біохімічна) можуть проявлятися в клітинах незалежно одна від одної. Так, вміщуючи клітини нейробластами в умови, що сприяють підвищенню концентрації внутрішньоклітинного цАМФ (наприклад при додаванні в середовище дибутирил-цАМФ або простагландину E_1 та теофіліну). можна прискорити їх морфологічне, біохімічне та електрофізіологічне диференціювання. Разом з тим інші впливи (наприклад, усунення сироватки або додавання диметилсульфоксиду - DMSO) викликають відповідно лише морфологічне або морфологічне та диференціювання. Змінюючи концентрації речовин у культуральному середовищі можна також змінювати прояви конкретних властивостей клітин.

Взаємодія між окремими клітинами, а також між клітинами та субстратом відіграють важливу роль в контролі міграції, проліферації та морфогенезу *in vivo*. Прикріплення до субстрату клітин *in vitro* є обов'язковим і може бути досягнений різними способами. Клітини деяких типів (наприклад, фібробласти) виділяють речовини, що сприяють адгезії (адгезивні фактори), і ці клітини можна культивувати на скляній або пластиковій поверхні. Клітини інших типів (наприклад, нейрони) не синтезують адгезивні фактори ні *in vivo*, ні *in vitro*, тому їм необхідний тісний контакт з клітинами, що виділяють ці фактори, або спеціальним чином оброблена культуральна поверхня. В багатьох загальноприйнятих методах обробки поверхні, до якої мають прикріпитись клітини, використовуються поверхневі компоненти клітинних оболонок або речовини, що входять до складу зовнішньоклітинного матриксу. До числа таких речовин належать колаген, ламінін та фібронектин. Інші методи

основані на використанні амінокислот, таких, як полілізин та поліорнітин. Усі ці субстрати поліпшують видимість клітин та дозволяють вивчати чисті популяції конкретних клітин. Проте вони зазвичай вимагають введення до складу культурального середовища додаткових компонентів і є не дуже ефективними для тривалого виживання клітин в культурі. Життєздатність клітин значно підвищується, якщо їх культивують на чашках, попередньо покритих шаром фібробластоподібних клітин, що не розмножуються, або матеріалом, отриманим при лізисі таких клітин [148], чи безпосередньо матеріалом позаклітинного матриксу, який виділяється клітинами-продуцентами позаклітинного матриксу [149].

2.4. Електрофізіологічні вимірювання

Реєстрацію струмів, опосередкованих P2X3- та P2X2/3-рецепторами, проводили методом фіксації потенціалу (петч-клемп) в режимі відведення від цілої клітини (конфігурація “whole cell”). Струми вимірювалися за температури 22 ± 2 °C із застосуванням підсилювача Axopatch 200B (Axon Instruments, США), фільтрувалися при частоті зрізання 2 кГц за допомогою двохполюсного фільтра Бесселя, оцифровувалися при частоті зрізання 5 кГц та передавалися для подальшої обробки на персональний комп'ютер. Збір та обробка сигналів від клітини, генерація командних імпульсів, керування роботою електромагнітних клапанів, а також збереження результатів вимірювань в оперативній пам'яті чи на жорсткому диску комп'ютера здійснювались за допомогою програмного пакету PClamp 8.0 (Axon Instruments, США). Оцифровування аналогового сигналу з операційного підсилювача та перетворення цифрових командних сигналів з персонального комп'ютера на аналогові для підсилювача та електромагнітних клапанів здійснювалося за допомогою плати АЦП/ЦАП Digidata 1200B (Axon Instruments, США).

2.4.1. Виготовлення скляних мікропіпеток.

Для реєстрації іонних струмів через мембрану досліджуваних нейронів було застосовано метод внутрішньоклітинного діалізу, що дозволяв використовувати скляні мікропіпетки [150]. Мікропіпетки виготовляли з капілярів із боросилікатного скла (зовнішній діаметр становив 1,5 мм; внутрішній – 0,86 мм), у дві стадії, за описаною методикою [151, 152]. Для того, щоб мікропіпетки було зручніше заповнювати розчином, використовувалися капіляри з скляним філаментом всередині. Після витягування кінчики мікропіпеток оплавляли під мікроскопом за допомогою платинової спіралі. Мікропіпетки, що використовувалися для відведення P2X3-опосередкованих струмів, після занурення у зовнішньоклітинний розчин 1 та заповнення внутрішньоклітинним розчином мали опір 6-9 МОм

2.4.2. Метод фіксації мембранного потенціалу та реєстрація трансмембранних струмів.

Фіксацію мембранного потенціалу здійснювали поданням заданої напруги на два хлор-срібних електроди. Один з них занурювався у зовнішньоклітинний, а інший – у внутрішньоклітинний розчин, яким заповнювалися мікропіпетки для перфузії та відведення електричних сигналів. Обидва електроди підключалися до перетворювача «струм-напруга», підсилювача трансмембранних струмів Axopatch 200B.

P2X-рецептори нейронів СГ (головним чином P2X3-, а також P2X2/3-, зрідка P2X2-) відрізняються за кінетикою активації/десенситизації та швидкістю виходу з десенситизованого стану. Тому нейрони, котрі генерували P2X2/3- та P2X2-опосередковані струми, вилучалися з експерименту.

В ході проведення вимірювань експериментальну камеру, заповнену зовнішньоклітинним розчином 1 з прикріпленими до її дна нейронами

встановлювали на предметному столику інвертованого мікроскопа. Мікропіпетку, заповнену внутрішньоклітинним розчином, закріплювали в полікарбонатному холдері, прикріпленому до вхідної голівки підсилювача. За допомогою мікроманіпулятора піпетку занурювали у розчин, що заповнював експериментальну камеру, та компенсували так званий потенціал піпетки. Після цього мікропіпетку підводили безпосередньо до обраної для вимірювань клітини. При цьому в мікропіпетці підтримували невеликий позитивний тиск, щоб запобігти забиванню її кінчика фрагментами ушкоджених клітин. При досягненні необхідної дистанції між піпеткою та нейроном клітинна мембрана прогиналася під напором розчину, який витікав з кінчика піпетки. Високоомний контакт між мембраною клітини та петч-піпеткою утворювали, притискаючи піпетку з прикладеним до неї незначним позитивним тиском до поверхні клітини, а потім скидаючи цей тиск до атмосферного. Потенціал піпетки змінювали до від'ємних значень (-100 мВ). Слід зазначити, що потенціал спокою для сенсорних нейронів становить близько -70 мВ, однак зниження мембранного потенціалу до -100 мВ призводить до збільшення амплітуди АТФ-індукованих струмів. Після утворення високоомного контакту фрагмент мембрани, що опинилася під кінчиком мікропіпетки, руйнували шляхом подачі до піпетки імпульсів негативного тиску (нижчого за атмосферний, за рахунок підсмоктування повітря). При руйнуванні фрагменту мембрани під кінчиком мікропіпетки, після утворення високоомного контакту з'явилися ємнісні перехідні процеси. Ці зміни проявлялися зростанням амплітуди ємнісного струму та уповільненням його кінетики. Такі зміни зумовлювалися внеском клітинної мембрани у вхідну ємність. Крім того, в режимі відведення від цілої клітини, у відповідь на деполяризуючий зсув мембранного потенціалу від -100 мВ до -20 мВ можна було спостерігати вхідний натрієвий струм, що з'являвся внаслідок активації потенціал-керованих натрієвих каналів.

Після проривання мембрани встановлюється прямий електричний контакт між тестуючим електродом мікропіпетки та внутрішнім вмістом нейрона. Опір такого контакту (послідовний опір) залежить від геометрії кінчика піпетки, площі зруйнованого фрагменту мембрани та форми клітини. Якщо досліджуваний нейрон має відростки, то послідовний опір між вмістом соми та нервовим закінченням стає досить значним, досягаючи в окремих випадках кількох десятків мегаом. За таких умов може з'явитися відчутна похибка у фіксації потенціалу на нервовому закінченні. Зменшити її можна використовуючи нейрони без відростків або клітини, в яких відростки практично відсутні. Такі клітини стабільно присутні в переживаючій культурі нейронів дорсальних гангліїв. У проведених експериментах послідовний опір складав 2-3 МОм. Порівняно невелике значення послідовного опору дозволяло фіксувати потенціал на мембрані нейрона з мінімальною похибкою. В залежності від величини струму похибка фіксації підтримуваного потенціалу становила в середньому 3-5 мВ. Опір витоку становив близько 100-200 МОм одразу після проривання клітинної мембрани, однак через 1-3 хв після початку перфузії клітини внутрішньоклітинним розчином цей опір зростав до 0,5-2 ГОм.

2.4.3. Метод швидкого прикладання агоністів до ізольованих нейронів.

P2X3-опосередковані струми нейронів СГ характеризуються надзвичайно швидкою кінетикою активації та десенситизації, а також повільним виходом з десенситизованого стану, що обумовлювало необхідність швидкого (у мілісекундному інтервалі) прикладання та відмивання агоністів. Тому для дослідження струмів, опосередкованих P2X3- рецепторами, було застосовано систему прикладання розчинів з використанням U-подібної трубки, розроблена Кришталем та Підоплічком [153], з деякими модифікаціями. U-подібна трубка вигиналася над

розжареною ніхромовою спіраллю з пластикової трубки, що мала внутрішній діаметр близько 1 мм та товщину стінок близько 0,2 мм. У місці перегину на кінчику трубки було зроблено круглий отвір, діаметром 50-80 мкм. U-подібна трубка приєднувалася до мікроманіпулятора, що дозволяло точно позиціонувати її у камері з досліджуваними клітинами. Кінчик трубки з отвором на ньому розміщувався на відстані 50-150 мкм від досліджуваної клітини, що прикріплювалася до дна експериментальної камери (чи покривного скельця) в ході культивування. За допомогою пластикових трубочок-капілярів один кінець U-подібної трубки приєднувався до резервуару з розчином агоніста, а через інший рідина стікала у спеціальний резервуар, на шляху до якого розміщувався електромагнітний клапан. Резервуар з розчином агоніста знаходився над U-подібною трубкою, а «стічний» резервуар – під нею, тому подавання та відсмоктування розчину з трубки відбувалося за рахунок гідростатичного тиску рідини в системі. При відкритому клапані швидкість відсмоктування рідини з трубки перевищувала швидкість подачі розчину в неї (рис. 2.3). За рахунок цього розчин постійно підсмоктувався з експериментальної камери через отвір на кінчику U-трубки. Це дозволяло запобігти самодовільній дифузії чи витіканню розчину з U-подібної трубки. При закриванні клапана рідина починала витікати через отвір на кінчику U-трубки, швидко змінюючи склад розчину в безпосередній близькості від отвору, а отже й навколо досліджуваної клітини. Повторне відкривання електромагнітного клапана припиняло подачу розчину на клітину через U-подібну трубку і повертало систему у вихідний стан.

Модифікація системи прикладання розчинів, запропонованої Кришталем та Підоплічком, полягала в тому, що відмивання клітини від розчину з агоністом та/або преаплікація інших досліджуваних речовин здійснювалися за допомогою ще однієї пластикової трубки. Ця трубка (надалі «відмиваюча») була прямою (не U-подібною), її внутрішній діаметр звужувався від 1 мм на одному з кінців до 0,3-0,5 мм на іншому.

Верхнім (ширшим) кінцем за допомогою пластикових капілярів «відмиваюча» трубка під'єднувалася до резервуару з зовнішньоклітинним розчином. Через вузький нижній кінець, що розміщувався на відстані 50-150 мкм від клітини під кутом близько 90° відносно кінчика U-подібної трубки, розчин прикладався до клітини (рис. 2.3).

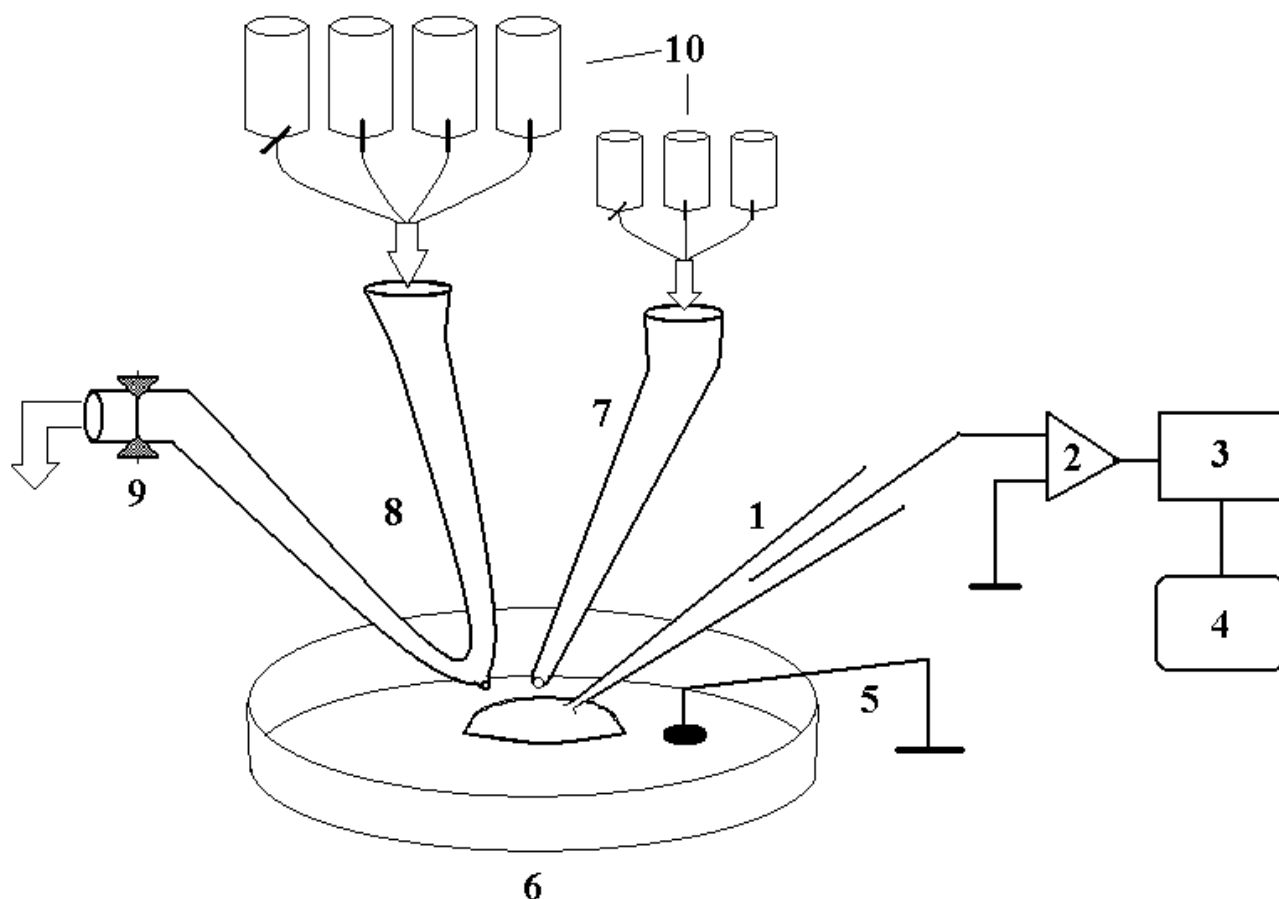


Рис. 2.1. Схема вимірювальної установки, що використовувалась для реєстрації R2X3-опосередкованих струмів в нейронах дорсальних гангліїв. 1 – петч-піпетка з тестуючим електродом, 2 – підсилювач, 3 – блок ЦАП/АЦП, 4 – комп'ютер, 5 – індиферентний електрод, 6 – експериментальна камера, з прикріпленою до її дна клітиною, 7 – відмиваюча трубка, 8 – U-подібна трубка, 9 – електромагнітний клапан, 10 – резервуари з досліджуваними розчинами.

Подача розчину через «відмиваючу» трубку також забезпечувалася за рахунок гідростатичного тиску рідини у резервуарі. Діаметр кінчика трубки та висота резервуара з розчином підбиралися таким чином, щоб потік розчину через цю трубку завжди був слабшим, ніж через отвір U-подібної трубки, при закритому електромагнітному клапані. Тому під час прикладання агоніста розчин, що витікав з U-подібної трубки, «змивав» потік рідини з трубки для відмивання. Коли аплікація агоніста припинялася, клітина одразу ж починала омиватися розчином що надходив через «відмиваючу» трубку.

Преаплікацію речовини можна було забезпечити, додавши її до розчину, який подавався на клітину через «відмиваючу» трубку перед прикладанням агоніста. Описана система забезпечувала прикладання розчинів до досліджуваної клітини в інтервалі 20-30 мс та їх подальше відмивання протягом 100-150 мс. Кожна з трубок з'єднувалася з кількома резервуарами за допомогою системи пластикових капілярів та краників. Це дозволяло змінювати розчини, що прикладалися до клітини, безпосередньо в ході експерименту.

Слід також додати, що реєстрацію в режимі відведення від цілої клітини можна проводити принаймні протягом години без візуальних чи електричних ознак пошкодження клітини.

2.5. Метод візуалізації кальцієвого сигналу

Зміни внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} в ізольованих нейронах СГ реєстрували з використанням високоспорідненого флюоресцентного індикатора Fluo-4 до іонів Ca^{2+} , описаного раніше (27). Барвник був завантажений до культивованих нейронів шляхом інкубації їх з Fluo-4 ацетоксиметил ефіром (Fluo-4 AM) у концентрації 3 мкМ, протягом 1 год. Цей барвник додавали до розчину диметилсульфоксиду, що містить 2 мМ Fluo-3 AM і 0.025 (w/v) Pluronic F-127. Після проникнення зазначених барвників до клітин, нейрони відмивали витримуючи в розчині

Рінгера протягом 1 год. Нейрони візуалізували за допомогою лазерного скануючоїго конфокального мікроскопа LSM 5 PASCAL (Carl Zeiss, Jena, Germany).

2.6. Обробка результатів експериментів та аналіз даних

Ступінь пригнічення P2X3-опосередкованих струмів опіюдами визначався співвідношенням I/I_k , де I_k – усереднене значення контрольного струму (після проведення кількох вимірювань), I – амплітуда струму, відведеного від нейрона, після того як ефект опіюду досяг свого стаціонарного стану. Амплітуда струму визначалася від базової лінії до його пікового значення.

Концентраційна залежність для викликаного ЛЕК ефекту пригнічення амплітуди АТФ-активованих струмів у нейронах СГ апроксимувалася 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 опіюду максимальний), EK_{50} – концентрація ЛЕК, за якої пригнічення амплітуди струму складає половину від максимального, h – коефіцієнт Хілла. Нормована амплітуда струму обчислювалася як, де I – амплітуда струму, відведеного після того як пригнічуючий ефект досліджуваної концентрації опіюду досяг свого стаціонарного стану, I_k – усереднена амплітуда контрольних АТФ-індукованих струмів, відведених до прикладання ЛЕК.

Експериментальні дані представлені у вигляді середніх арифметичних значень вимірів із стандартним відхиленням. Статистична вірогідність відмінності від контрольних умов оцінювалася за допомогою t-тесту Стюдента. Відмінність вважалася значущою за $P < 0,05$. Аналіз

кривих струмів здійснювався за допомогою аналітичних програмних продуктів AnDatRa 3.3 та AnDatRa 4.1 (Я. Бойчук, Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця, Україна). Статистична обробка одержаних результатів проводилася у програмному пакеті Origin 8.0 (OriginLab Corporation, США).

2.7. Використані речовини

В роботі використані такі речовини: α, β -Me-АТФ, налоксон, кашлюковий токсин (виробництва TOCRIS, Ellisville, MO, USA). ЛЕК, СТОР, ембріональна сироватка крові телят, середовище для культивування нейронів (MEM), вортманін, антибіотики, інсулін та інші речовини, що використовувалися в ході культивування нейронів СГ та проведення електрофізіологічних досліджень, були виготовлені фірмою Sigma (St. Louis, MO, USA).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Пригнічення P2X3-рецепторів лейенкефаліном

Відомо, що АТФ є агоністом усіх P2-рецепторів і може активувати як іонотропні P2X-, так і метаботропні P2Y-рецептори. Активація P2Y-рецепторів призводить до пригнічення P2X3-опосередкованих струмів у сенсорних нейронах щурів [154,155]. Тому не виключено, що P2X3-опосередковані струми в нейронах спінальних гангліїв можуть принаймні частково пригнічуватися внаслідок АТФ-індукованої активації P2Y-рецепторів. У цьому випадку прикладання опіюїдних агоністів до нейронів спінальних гангліїв призводило б до підсилення інгібуючого впливу, зумовленого активацією P2Y-рецепторів. З метою усунення ефекту можливого впливу інших типів P2-рецепторів на P2X-опосередковані струми, останні викликалися прикладанням α,β -Me-АТФ, який не активує P2Y-рецептори. Усі вищеописані ефекти опіюїдів відтворювалися для P2X3-опосередкованих струмів, активованих α,β -Me-АТФ. Отже, P2Y-рецептори не впливали на модуляцію P2X3-рецепторів опіюїдами.

Прикладання α,β -Me-АТФ до культивованих нейронів дорсальних гангліїв (15-25 мкм в діаметрі), викликало струми опосередковані гомомерними P2X3-, P2X3+P2X2/3- та зрідка P2X2-рецепторами. Іонні струми, опосередковані лише P2X3-субодиницями, швидко (за 5-7 мсек) нарастають та швидко, протягом 100 мсек, входять в десенситизацію. Наслідком коекспресії кількох типів (P2X3+P2X2/3) пуринаргічних рецептор-канальних комплексів на мембрані нейронів є інтегральний струм змішаної кінетики десенситизації. Характерною особливістю такого струму є дві фази кінетики його десенситизації – швидка (100 мсек) та повільна (500 мсек). Кінетичні параметри таких «змішаних» струмів

відрізняються в залежності від пропорційного вкладу того чи іншого типу рецептор-канального комплексу [156]. P2X2-опосередковані струми також швидко наростали у відповідь на α,β -Me-АТФ, проте не десенситизувалися протягом кількох десятків секунд прикладання агоніста. Характеристика кінетики десенситизації струмів покладена у основу моделі ідентифікації різних типів P2X-рецепторів [17]. Як правило, нейрони які демонструють активність P2X3-рецепторів були відібрані для дослідження.

P2X3-опосередковані струми реєструють у відповідь на застосування α,β -Me-АТФ у концентрації 30 мкМ протягом 0,5 с з інтервалом між прикладаннями 2-3 хв. Ця концентрація агоніста близька до насичуючої для активації P2X3-рецепторів. Раніше було показано, що при 2-3 хв інтервалі між прикладаннями α,β -Me-АТФ, вихід P2X3-рецепторів з десенситизації та відновлення їх амплітуд наближається до більш ніж 90% [157]. У всіх експериментах застосування ендogenousного опіюїда – ЛЕК передували 2 - 3 наступних прикладань α,β -Me-АТФ, для досягнення струмом стаціонарних значень. Контрольні прикладання агоністу P2X-рецепторів також здійснювали для пересвідчення у відсутності неспецифічного незворотного спадання струмів (run-down). Амплітуди α,β -Me-АТФ-активованих струмів, отриманих під час такої серії, не повинні були відрізнятися більше ніж на 10%. Якщо, в ході контрольних вимірювань спостерігалось неспецифічне спадання P2X3-опосередкованого струму, нейрон не використовувався для проведення подальших досліджень.

Під час вивчення впливу опіюїдів на P2X3-рецептори нейронів дорсальних гангліїв, опіюїдні агоністи додавалися до омиваючого клітину розчину. Таким чином, опіюїди неперервно прикладалися до клітини в ході 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 спінальних гангліїв призводило до двох можливих результатів: або він не справляв ніякого ефекту, або викликав інгібування P2X3-опосередкованих струмів залежно від концентрації ЛЕК та часу прикладання (25,8% нейронів від загальної кількості).

Виявилося, що ендogenousний агоніст опіюїдних рецепторів – ЛЕК відчутно пригнічує активність P2X3-рецепторів у нейронах СГ (рис.3.1; 3.3. А).

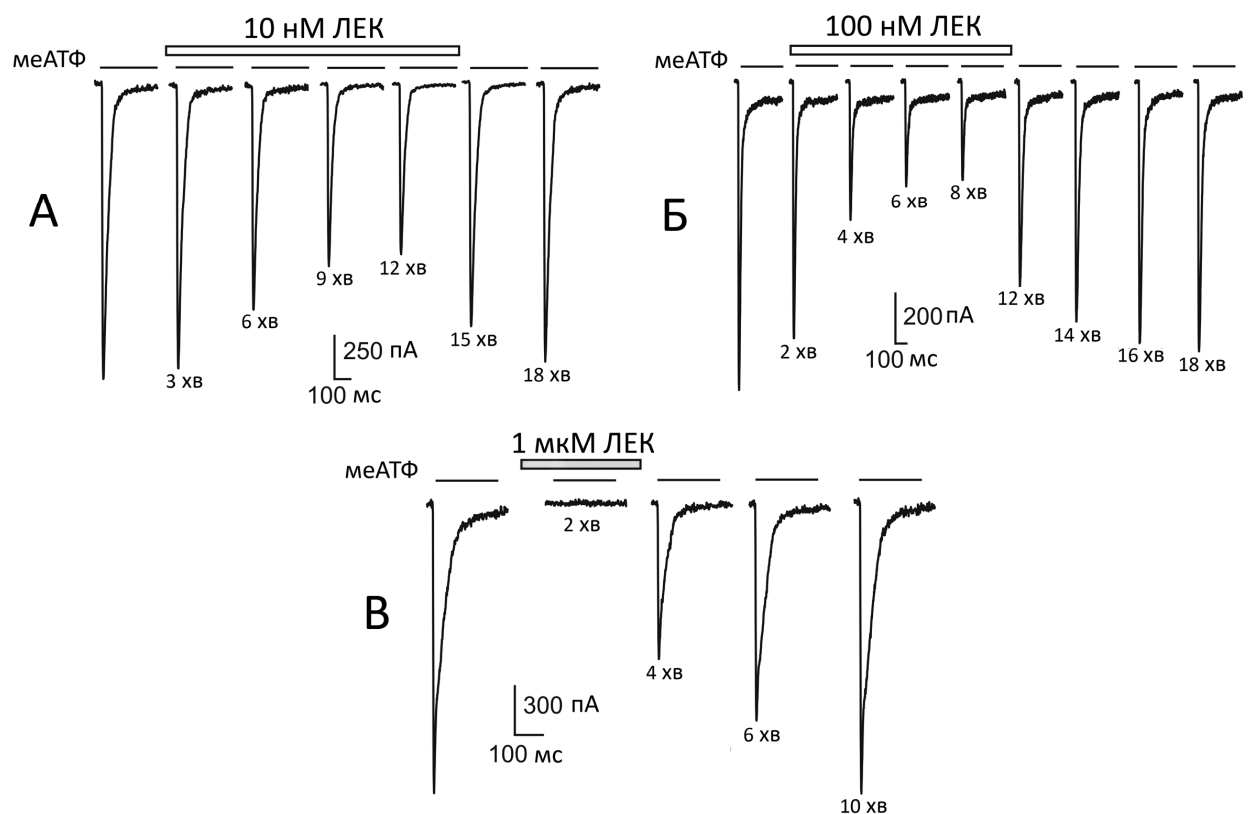


Рис. 3.1. Інгібуючий вплив лейенкефаліну (ЛЕК) на P2X3-опосередковані струми нейронів СГ

Оригінальні записи P2X3-струмів, відведені від різних клітин у контролі, під час і після прикладання опіюїду. А, Б, В – залежність ефекту, викликаного ЛЕК від його концентрації. Тут і надалі протокол прикладання меАТФ вказано рисками над записами струмів,

прикладання ЛЕК та інших речовин – широкими лініями. Концентрації речовин зазначено над відповідними лініями. Час аплікації того чи іншого розчину зазначено під записами струмів. Тут і надалі підтримуваний потенціал становив – 80 мВ.

Аплікація ЛЕК 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 ЛЕК і досягав стаціонарного рівня за 12, 8 і менше 2 хв при концентрації 10 нМ, 100 нМ і 1 мкМ відповідно (рис. 3.2; 3.3.Б).

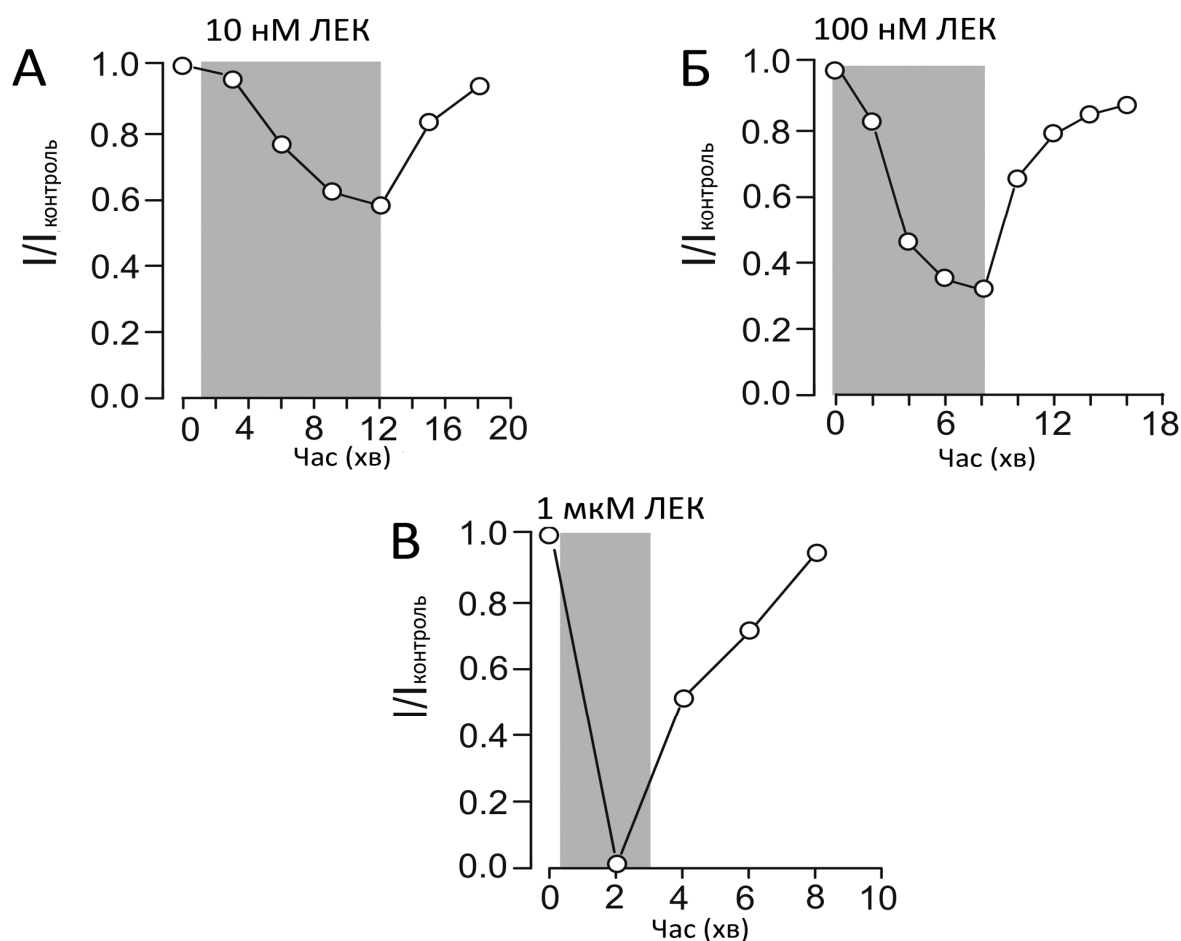


Рис. 3.2. Зміни кінетики інгібуючої дії ЛЕК на P2X3-струми залежно від часу

Час прикладання ЛЕК у різних концентраціях (А, Б, В) зазначено сірими смугами. Криві кожного графіку відповідають окремим клітинам, що на рис. 3.1.

Ці результати вказують на те, що саме кінетика зв'язування ЛЕК з опіоїдними рецепторами, а не швидкість передачі внутрішньоклітинного сигналу є лімітуючим фактором в інгібуванні P2X3-рецепторів. Інгібуючий ефект ЛЕК був оборотним: амплітуда струмів повністю відновлювалась протягом 6-8 хв після вимивання ЛЕК від клітини, при всіх концентраціях (рис. 3.2.) Слід зауважити, що у всіх опіоїдно-чутливих нейронів, застосування 1 нМ ЛЕК не викликало змін параметрів P2X3-струмів, проте подальше прикладання 1мкМ ЛЕК до тієї ж клітини завжди призводило до повного інгібування P2X3-рецепторів. Як вже зазначено, прикладання 1мкМ ЛЕК спричиняло блокування P2X3-рецептор-опосередкованих струмів на $99 \pm 1\%$ ($n = 6$). Аналогічним чином селективний для μ -опіоїдних рецепторів агоніст ендоморфін-1 у концентрації 100 нМ майже повністю (на $97 \pm 2\%$, $n = 3$) блокував P2X3-опосередковані струми.

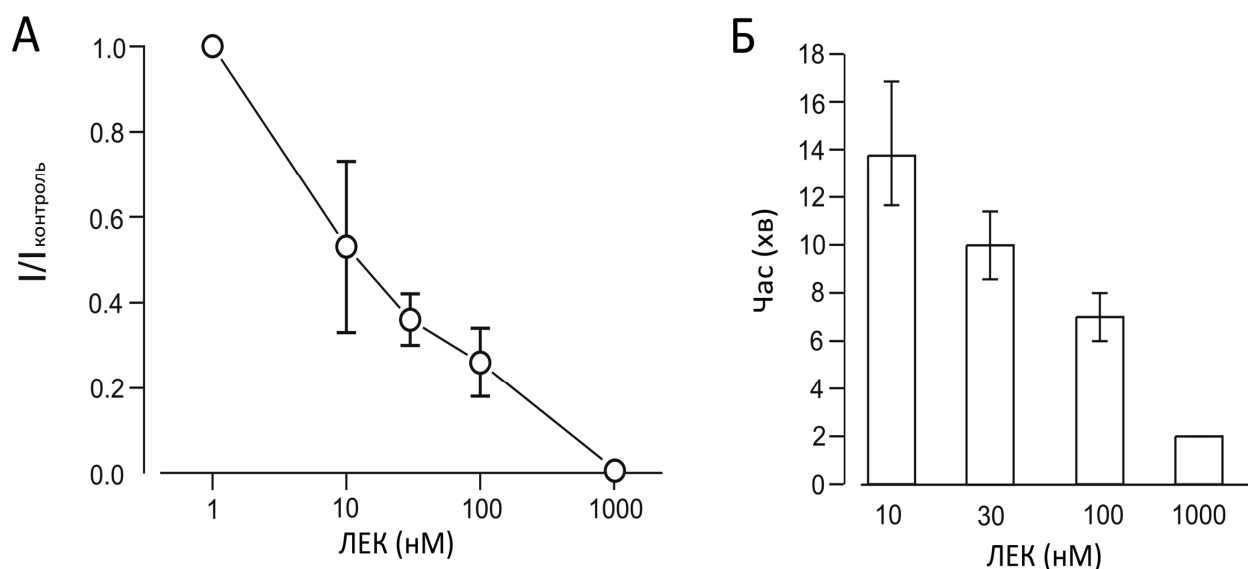


Рис. 3.3. Узагальнення даних стосовно концентраційної залежності впливу ЛЕК на P2X3-рецептори нейронів СГ

А – крива доза-ефект впливу ендogenousного 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 від 3 клітин. Ефекти, що спостерігалися, оцінювалися з використанням співвідношення I/I контроль. Де I – амплітуда струму, відведена після того як ефект опіюїду у досліджуваній коцентрації досяг стаціонарного стану, I контроль – усереднена амплітуда мeАТФ-індукованого струму в контролі.

Повільне відновлення від десенситизації є унікальною властивістю P2X3- рецепторів, його швидкість залежить від агоніста (найповільніше при використанні АТФ) [157] та температури [49]. Відомо також, що відновлення P2X3-рецепторів після десенситизації гальмується пуротоксином-1, який було виділено з отрути павука [62].

Для того, щоб виявити можливий вплив ЛЕК на відновлення P2X3-рецепторів після десенситизації, протокол прикладання зазначеного ендogenousного опіюїда було змінено. Спочатку клітини стимулювали прикладанням α,β -Me-АТФ кожні 3 хв, після записів контрольних P2X3-струмів, застосовували аплікацію ЛЕК 100 нМ. Після того, коли інгібуюча дія ЛЕК досягла стаціонарного значення (інгібування близько 74%), інтервал між прикладанням α,β -Me-АТФ був збільшений з 3 до 9 хв (рис.3.4.).

Таким чином збільшення проміжку часу між аплікаціями агоніста P2X3-рецепторів сприяло виходу з десенситизованого стану більшої кількості рецепторів, а постійне прикладання ЛЕК сприяло тривалій активації опіюїдних рецепторів. Однак амплітуда частково інгібованого P2X3-струму лишалась не змінною.

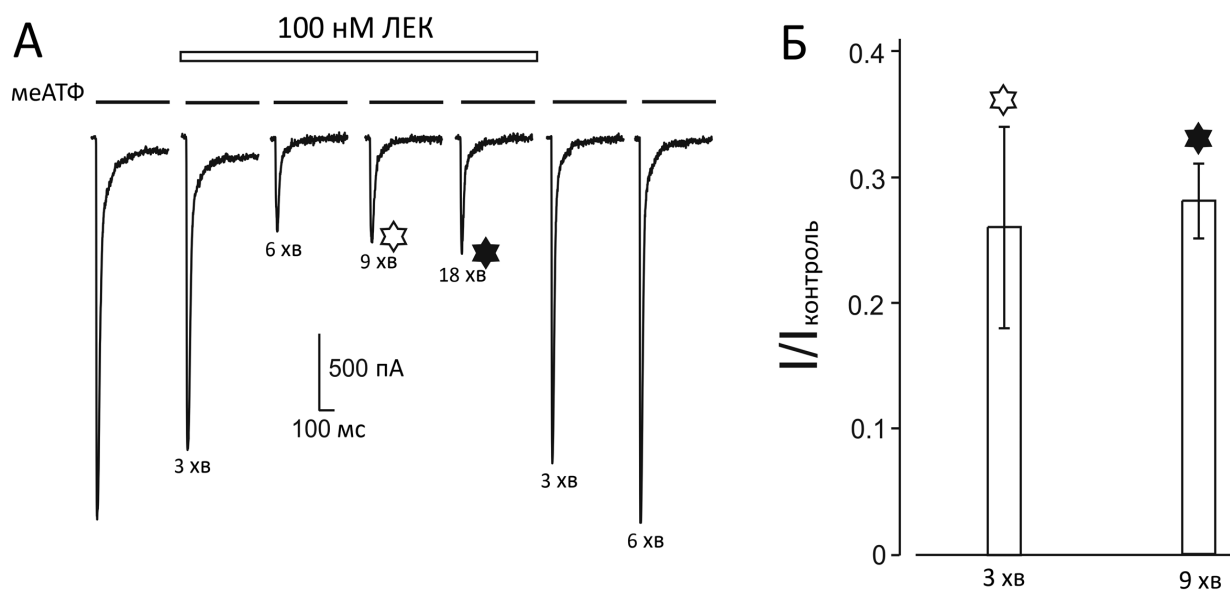


Рис. 3.4. Інhibуючий ефект ЛЕК не пов'язаний з десенситизацією P2X3-рецепторів

Збільшення інтервалу між аплікаціями ЛЕК від 3 хв (☆) до 9 хв (★) не впливає на амплітуду частково інгібованих опіюдом P2X3-струмів. А – оригінальні записи P2X3-опосередкованих струмів. Б – усереднені дані (середні значення ± стандартна похибка вимірювання), щонайменше від 4 клітин.

Тривале прикладання ЛЕК (9 хв, як показано на рис. 3.4., та збільшення часу до 20 хв, в іншому експерименті) не впливає на десенситизацію P2X3-рецепторів: амплітуда пригнічених P2X3-струмів не відновлюється в умовах присутності ЛЕК.

Тому ми прийшли до висновку, що ЛЕК-опосередковане інгібування P2X3-струмів не пов'язане з модуляцією відновлення рецепторів з десенситизованого стану.

3.2. Інhibуючий вплив лейенкефаліну на P2X3-рецептори опосередкований μ -опіоїдними рецепторами.

Відомо, що налоксон є широко використовуваним опіоїдним антагоністом (конкурентний антагоніст), який запобігає взаємодії опіоїдів з їх рецепторами і блокує опіоїдну сигналізацію.[158]. Цей агент характеризується високою спорідненістю до μ - та κ - ,і відносно низькою спорідненістю до δ -опіоїдних рецепторів [164]. Встановлено, що ця речовина може виступати в якості нейтрального антагоніста в клітинах, які попередньо не перебували під дією агоніста. У клітинах, що були проінкубовані з морфіном, налоксон проявляє себе як зворотній агоніст, який пригнічує базальну активність μ -опіоїдних рецепторів [168].

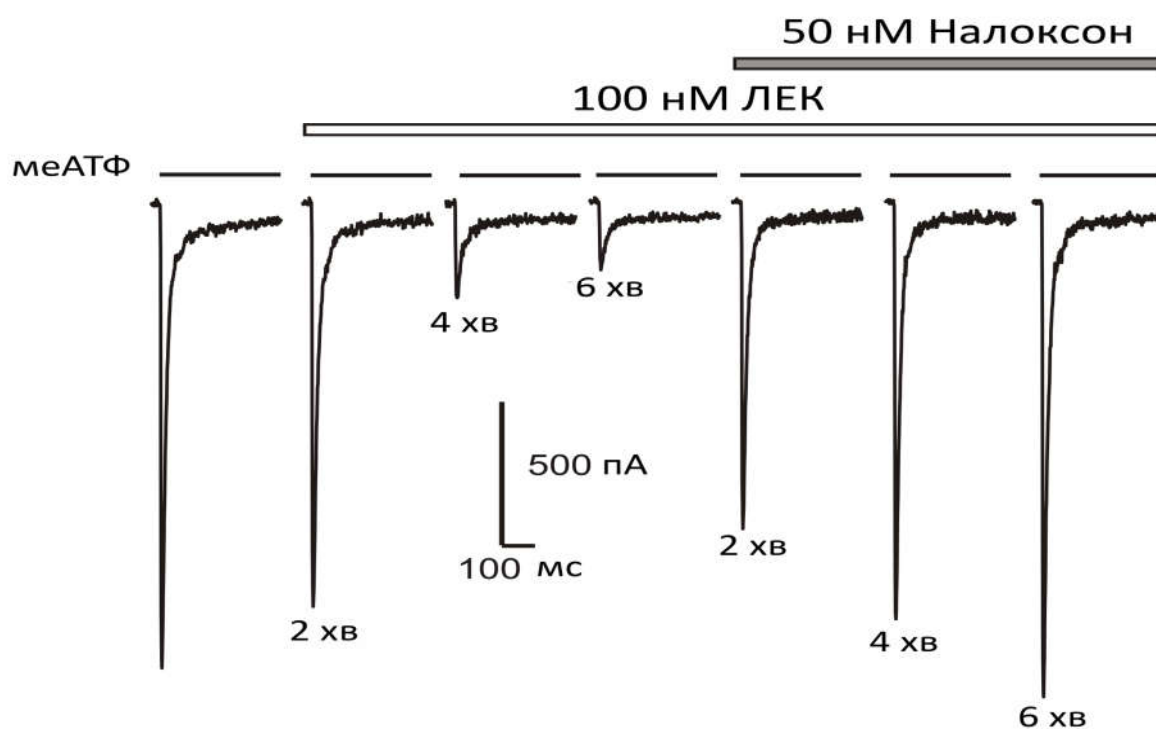


Рис. 3.5. Налоксон усуває інгібуючу дію ЛЕК на P2X3-опосередковані струми у нейронах СГ

Оригінальні записи струмів відведені від одної клітини. Протокол прикладання меАТФ вказано рисками над записами струмів, прикладання ЛЕК та налоксону – широкими лініями.

Концентрації речовин зазначено над відповідними лініями. Час аплікації того чи іншого розчину зазначено під записами струмів.

Перед застосуванням вище зазначеного антагоністу, необхідно було переконатися в тому, що він сам по собі не впливає на P2X3-рецептори, а також визначити конкурентні взаємовідносини між налоксоном і ЛЕК. Як виявилось, окремі аплікації налоксону у концентраціях від 50 нМ до 1 мкМ не чинили помітного впливу на P2X3-опосередковані струми в контрольних умовах. Проте, коли P2X3-струми пригнічувалися під дією 100 нМ ЛЕК та їх амплітуди досягали стаціонарних значень, налоксон прикладений у концентрації 50 нМ на тлі дії ЛЕК оборотно і ефективно усував інгібуючий вплив даного опіоїда у нейронах СГ (рис. 3.5.).

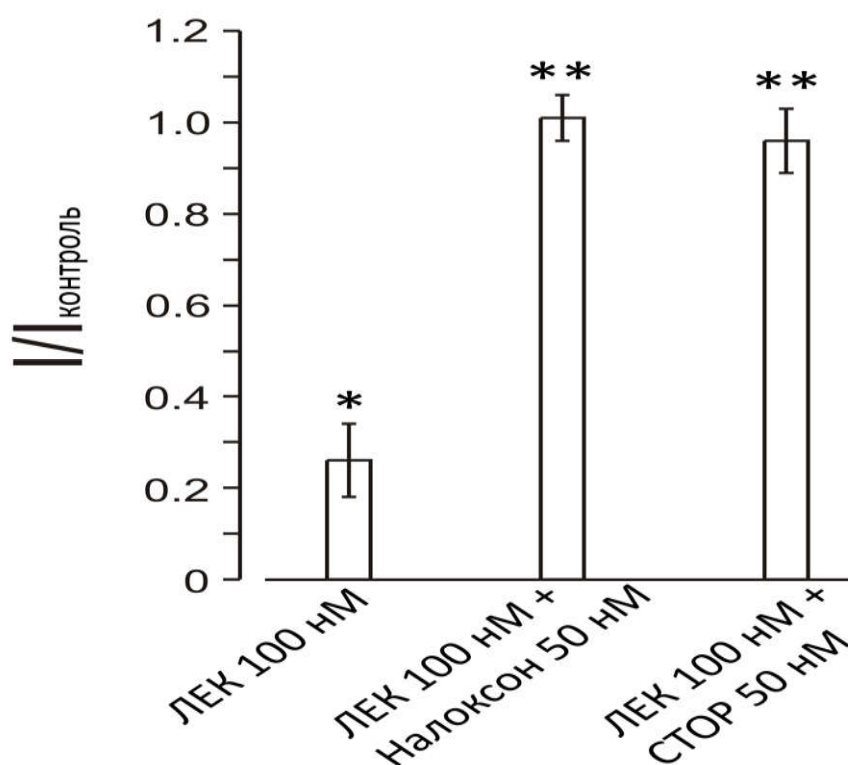


Рис. 3.6. Узагальнені дані щодо відновлення амплітуд P2X3-струмів антагоністами опіоїдних рецепторів, після впливу ЛЕК

Селективний антагоніст μ -опіоїдних рецепторів - СТОП справляв ефект аналогічний налоксону. Кожен стовпчик відображає усереднені дані (середні значення \pm стандартна похибка вимірювання) для налоксону ($n=4$), для СТОП ($n=3$). Амплітуди струмів, що реєструвалися в ході експерименту (I) нормувалися на амплітуду першого контрольного струму ($I_{\text{контроль}}$). * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$.

Після інгібуючої дії ЛЕК на P2X3-струми, налоксон додавався до зовнішньоклітинного розчину разом з ЛЕК. В даних умовах антагоніст викликав майже повне відновлення P2X3-опосередкованого струму протягом 6 – 8 хв у середньому на $95 \pm 5 \%$ ($n = 3$), (рис.3.6.).

Базуючись результатами цього експерименту ми переконались, що опіоїдіндуковане пригнічення P2X3-струмів у нейронах СГ опосередковується активацією опіоїдних рецепторів.

Літературні джерела останніх десятиліть свідчать про те, що ефекти, викликані ендогенними та екзогенними опіоїдами опосередковані трьома типами опіоїдних G-білок спряжених рецепторів (μ , δ , κ), котрі локалізовані на мембранах периферичних сенсорних нейронів і нервових закінчень [159,160]. Як вже було зазначено вище, застосування ендогенного опіоїдного агоніста – ендоморфіну-1, викликало специфічну участь μ - опіоїдних рецепторів у інгібуванні P2X3-рецепторів.

Для подальшої ідентифікації типу опіоїдних рецепторів, що задіяні до вище зазначеного ефекту ЛЕК на P2X3-струми, ми використовували D-PheCys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂(СТОП) – один з найбільш селективних антагоністів MOR. Ми виявили, що застосування СТОП у концентрації 50-100 нМ, на тлі дії ЛЕК у концентрації 100 нМ, повністю відмінняє інгібуючий ефект опіоїда у середньому на $97 \pm 7 \%$, $n = 3$, аналогічно налоксону (рис. 3.6.).

Таким чином, ми з'ясували, що опіїдно-кероване інгібування P2X3-струмів у нейронах СГ опосередковано активацією MOR.

3.3. Посилення інгібуючого впливу ЛЕК на P2X3-рецептори, викликане попередньою інкубацією нейронів СГ з налоксоном

У перебігу численних досліджень *in vivo*, було показано, що хронічне застосування опіїдних антагоністів (налоксону, налтрексону) збільшує ефективність агоністів опіїдних рецепторів [161–163]. Прояви такої функціональної надчутливості були пояснені здатністю антагоністів інгібувати базальну активність опіїдних рецепторів. У наших експериментах інкубація нейронів з налоксоном (50 нМ – 1 мкМ) протягом 2 - 6 хв практично не викликала змін амплітуди P2X3-опосередкованих струмів ($I/I_{\text{контроль}} = 95 \pm 6 \%$, $n = 5$).

Таким чином, принаймні в умовах експерименту, агоністнезалежна (базальна) активність опіїдних рецепторів не впливає на P2X3-опосередковані струми. Однак попередня інкубація нейронів СГ з налоксоном призводила до збільшення чутливості P2X3-рецепторів до ЛЕК.

Ми виявили, що за таких умов налоксон драматично 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.3.3. А, Б). Після попередньої інкубації з налоксоном у концентрації 1мкМ, прикладений до клітини ЛЕК у тій самій дозі (10 нМ), викликав повне блокування P2X3-опосередкованого струму протягом 2 хв (рис.3.7.).

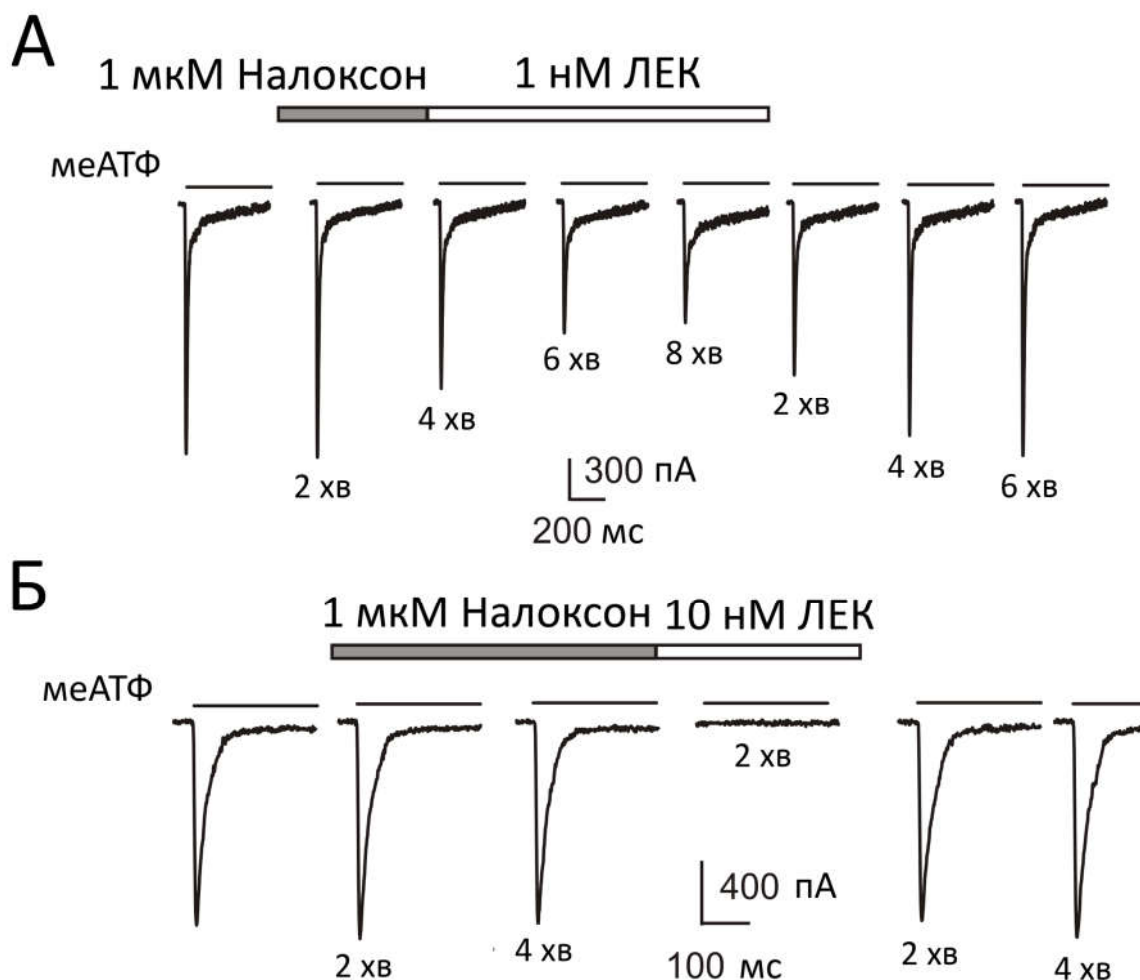


Рис. 3.7. Посилення інгібуючого впливу ЛЕК на P2X3-струми після попередньої інкубації нейронів СГ з налоксоном.

Оригінальні записи P2X3-опосередкованих струмів зафіксовані в контролі, в умовах преаплікації високих доз налоксону і після прикладання низьких концентрацій ЛЕК (А - 1 нМ, Б – 10 нМ). Струми зображені на верхній та нижній панелі відведені від різних клітин.

У нормальних умовах (без інкубації з налоксоном) такий швидкий інгібуючий ефект відмічається лише в разі значно вищих концентрацій ЛЕК (1 мкМ), (рис. 3.1. В). Посилення інгібуючого ефекту ЛЕК під впливом попередньої інкубації нейронів з налоксоном (1 мкМ) спостерігалось при всіх протестованих концентраціях опіоїдів (1 – 100 нМ). Крива доза-ефект, отримана з використанням аналогічного

експериментального протоколу, вказує на зменшення IC_{50} інгібуючої дії ЛЕК від 10 до 1 нМ (рис. 3.8.).

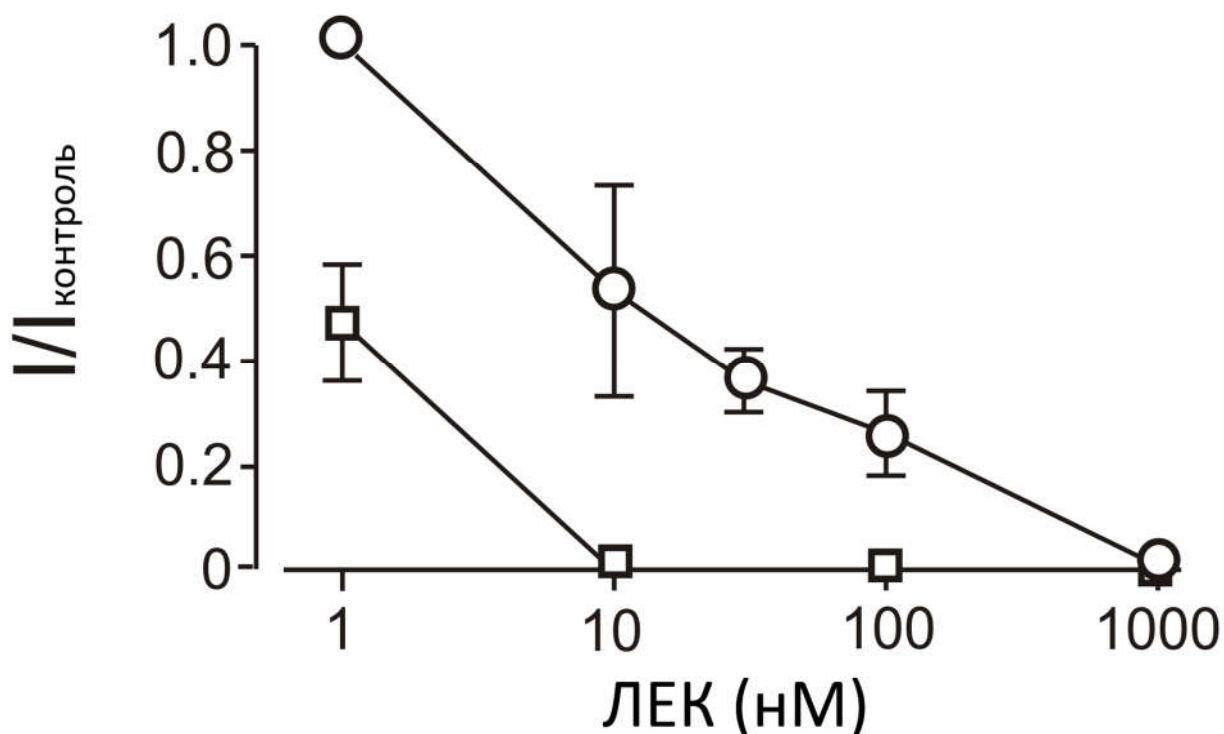


Рис. 3.8. Порівняльна характеристика впливу ЛЕК на Р2Х3-струми залежно від концентрації опіюїду.

\circ — крива доза-ефект впливу ЛЕК на Р2Х3-струми в нормі; \square - доза-ефект в умовах преінкубації нейронів СГ з налоксоном (1мкМ).

Результати численних досліджень доводять, що опіюїдні рецептори, як і інші G-білокспряжені рецептори, здатні у разі зв'язку з певними типами G-білків набувати декількох активних конформацій [164]. Конформаційні стани гетерогенних комплексів з інгібуючими (G_i/o) та стимулюючими (G_q/s) G-білками є посередниками активації різних внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, що забезпечують протилежні ефекти [165]. Антагоністи опіюїдних рецепторів (налоксон, налтрексон) підвищують ефективність знеболення морфіном через прямий конкурентний антагонізм G_q/s -зв'язаної конформації [166]. Ці дані узгоджуються з нашими результатами і свідчать про вплив налоксону на

стабілізацію значної частини комплексів опіоїдних рецепторів з G-білками, що знаходяться в інгібуючій конформації.

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 налоксону на G-білки опіоїдних рецепторів.

3.4. Високі дози антагоністів опіоїдних рецепторів тимчасово 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 до висновку, що налоксоном у концентрації 50 нМ достатньо для повного витіснення 100 нМ ЛЕК (рис. 3.5.). Як зазначено в пункті 3.2. застосування такої концентрації налоксону на тлі дії ЛЕК, призводило до відновлення амплітуд P2X3-струмів до контрольних значень. Проте в аналогічних експериментах, застосування високих концентрацій налоксону (1 мкМ) разом з ЛЕК (100 нМ) призводило до двофазного впливу на P2X3-опосередковані струми.

На рисунку рис. 3.9. 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, ($I/I_{\text{контроль}} = 210 \pm 30 \%$, $n = 4$), перед тим, як досягала контрольного значення (рис. 3.9.)

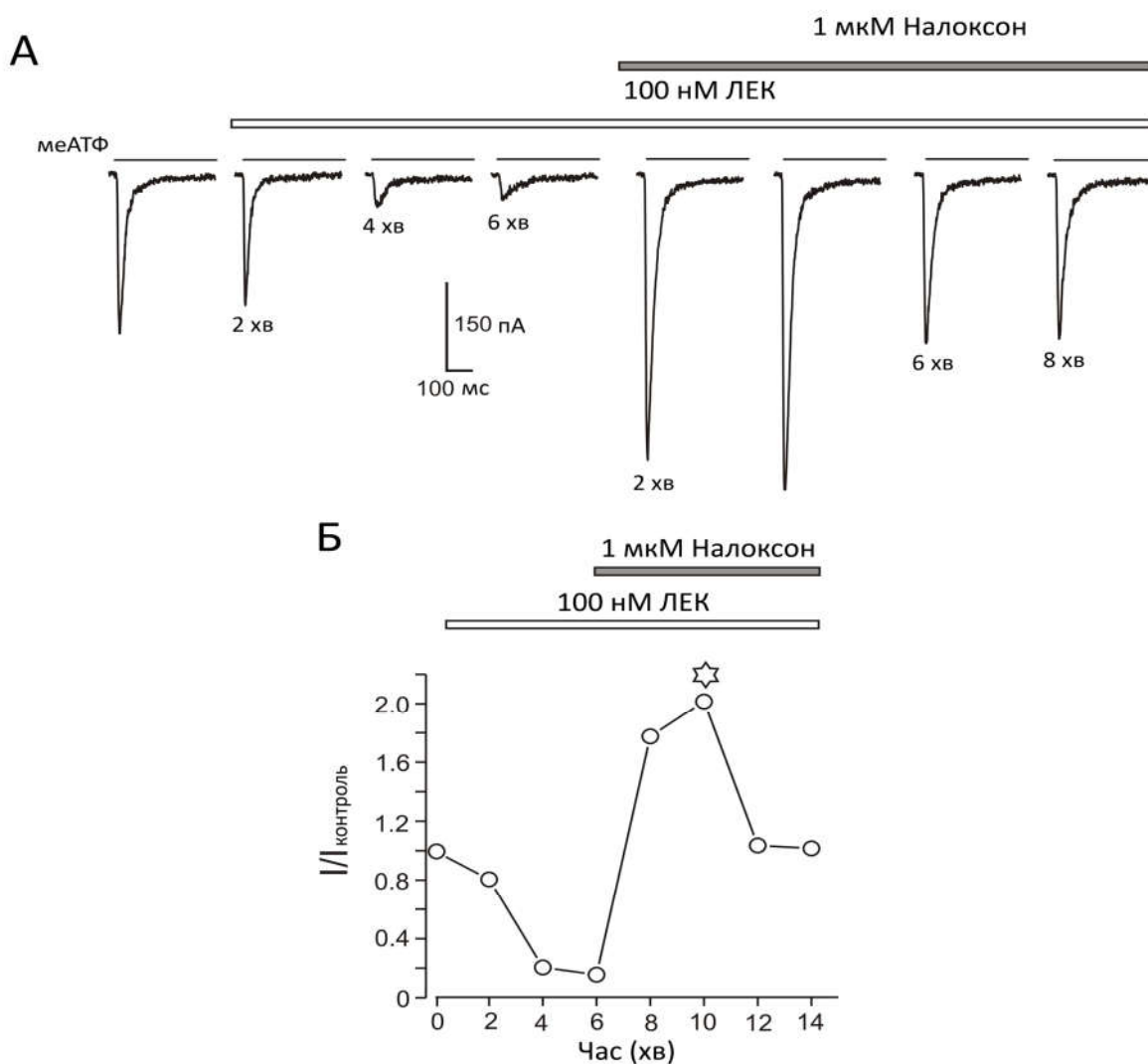


Рис. 3.9. Посилення активності P2X3-струмів у нейронах СГ, індуковане антагоністом опіоїдних рецепторів в умовах дії ЛЕК.

А – оригінальні записи струмів в умовах аплікації на клітину ЛЕК та високої концентрації налоксону на тлі дії ЛЕК. **Б** – розвиток у часі ефекту, викликаного прикладанням агоністу та антагоністу опіоїдних рецепторів на P2X3-струми. (☆) – показано пікове значення амплітуди P2X3-струму під впливом налоксону.

Слід також зауважити, що зображений на рис. 3.9. ефект налоксону не пов'язаний з його оборотно-агоністичною властивістю: у двох аналогічних експериментах ми використовували селективний антагоніст μ -опіоїдних рецепторів – СТОР замість налоксону і отримали ідентичні

результати (рис. 3.10.). Аплікація СТОП у ідентичній налоксону концентрації викликала стимуляцію P2X3-струмів у середньому на $270 \pm 20 \%$, ($n = 4$).

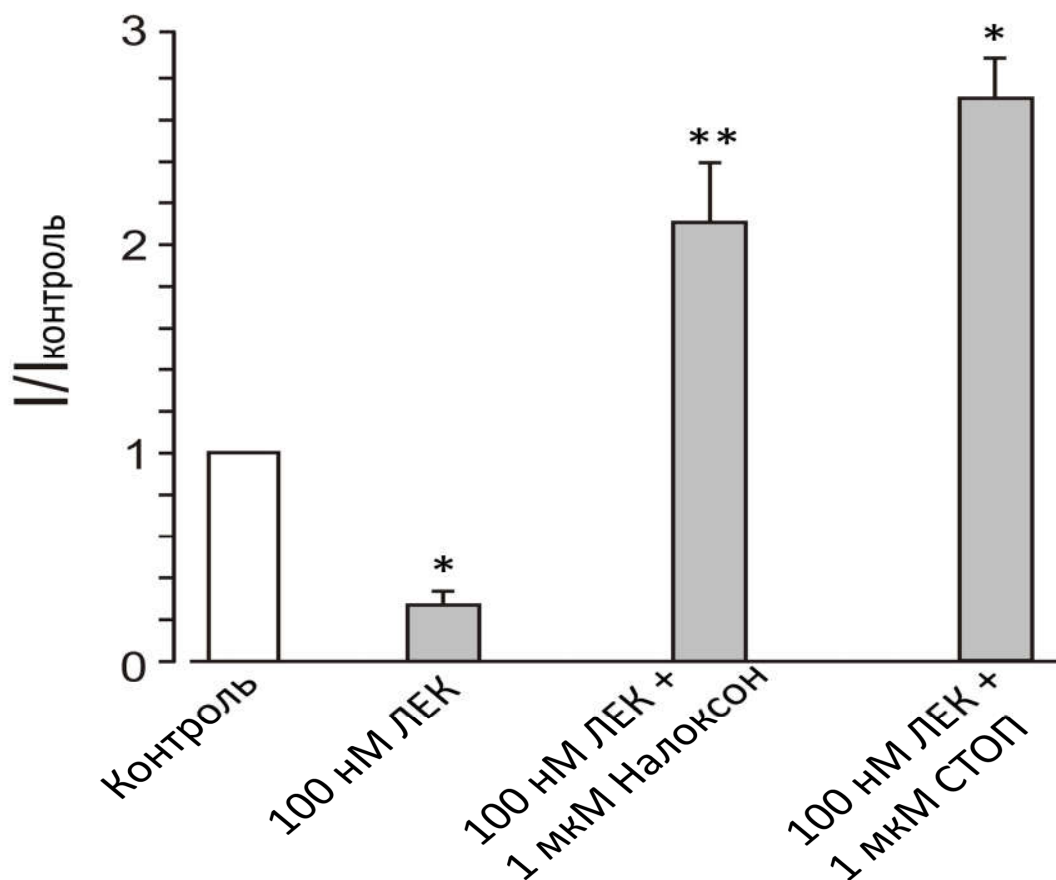


Рис. 3.10. Стимулюючий вплив антагоністів опіоїдних рецепторів на P2X3-рецептори після часткового пригнічення під дією ЛЕК.

Кожен стовпчик представляє усереднені дані для подібних експериментів з використанням налоксону 1мкМ ($n = 4$) і СТОП 1мкМ ($n = 4$). * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$.

Таким чином, зворотний обмін агоніста опіоїдних рецепторів на антагоніст у високій концентрації, викриває замаскований стимулюючий ефект опіоїдів.

Загалом, наші спостереження вказують на те, що у нормальних умовах опіоїдні агоністи справляють переважно інгібуючий вплив на

P2X3-рецептори, в той час як стимулюючий ефект є прихованим або відсутній. Біохімічними дослідженнями було доведено, що MOR, як і багато інших G-білок спряжених рецепторів, здатні набувати кількох активних конформаційних станів, залежно від зв'язку з певними типами G-білків [164]. Подібна особливість MOR-опосередкованої сигналізації, лежить в основі подвійного впливу опіоїдів на аденілатциклазу [167]. Тому, ми можемо припустити, що опіоїдіндукована стимуляція/інгібування P2X3-рецепторів опосередкована різними внутрішньоклітинними шляхами, котрі активуються певними типами G-білків.

3.5. 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 []. За аналогією, ми припустили, що подібна ситуація можлива 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 опіоїдно-чутливих клітин (n = 11), (рис. 3.11).

Як і в РТХ необроблених нейронах, опіоїдну чутливість показали 21,5% клітин. 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 стимуляцію амплітуд P2X3-струмів від 11 до 45%, протягом 4 – 6 хв, порівняно з контрольними значеннями (n = 4), (рис. 3.11).

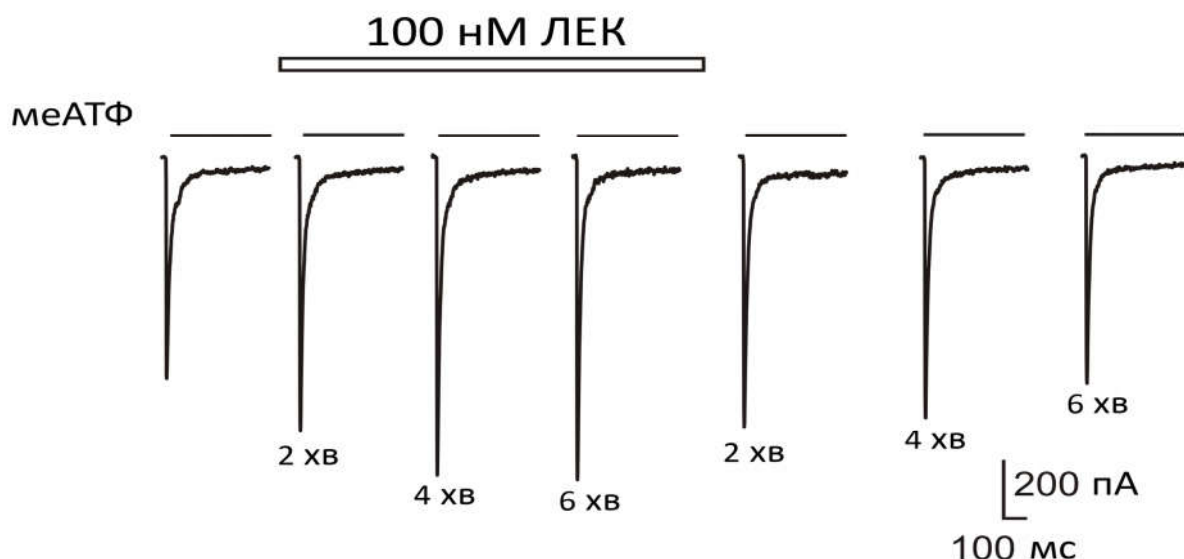


Рис. 3.11. Стимулююча дія ЛЕК на P2X3-опосередковані струми в умовах попередньої інкубації нейронів СГ з токсином кашлюку

Оригінальні записи струмів відведені від одної клітини. Позначення ті ж, що й на рис. 3.1.

Крім того, на відміну від не інкубованих з РТХ нейронів, прикладання тієї ж концентрації ЛЕК у інших експериментах сприяло значно вищій потенціації амплітуд P2X3-струмів. Причому помітно відрізнявся хід розвитку подій у часі. На рис. 3.11. показує приклад такого експерименту: у першому випадку, прикладання опіюїда призвело до потенціації амплітуд зазначених струмів на 44%, в той час як у іншому - прикладання ЛЕК призводили до стимуляції P2X3-струмів на 66%, (рис. 3.12.).

Таким чином, можливість отримати залежність доза-реакція для стимулюючого впливу ЛЕК на P2X3-струми за умов інкубації нейронів з РТХ, виявляється складною. На Рис. 3.12. також показано, що потенціація P2X3-струму повністю пригнічується налоксоном ($n = 3$). Налоксон додавали до омиваючого клітину розчину на тлі дії ЛЕК. Це також свідчить про те, що активація μ -опіюїдних рецепторів, викликана прикладанням ЛЕК може викликати 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 [108].

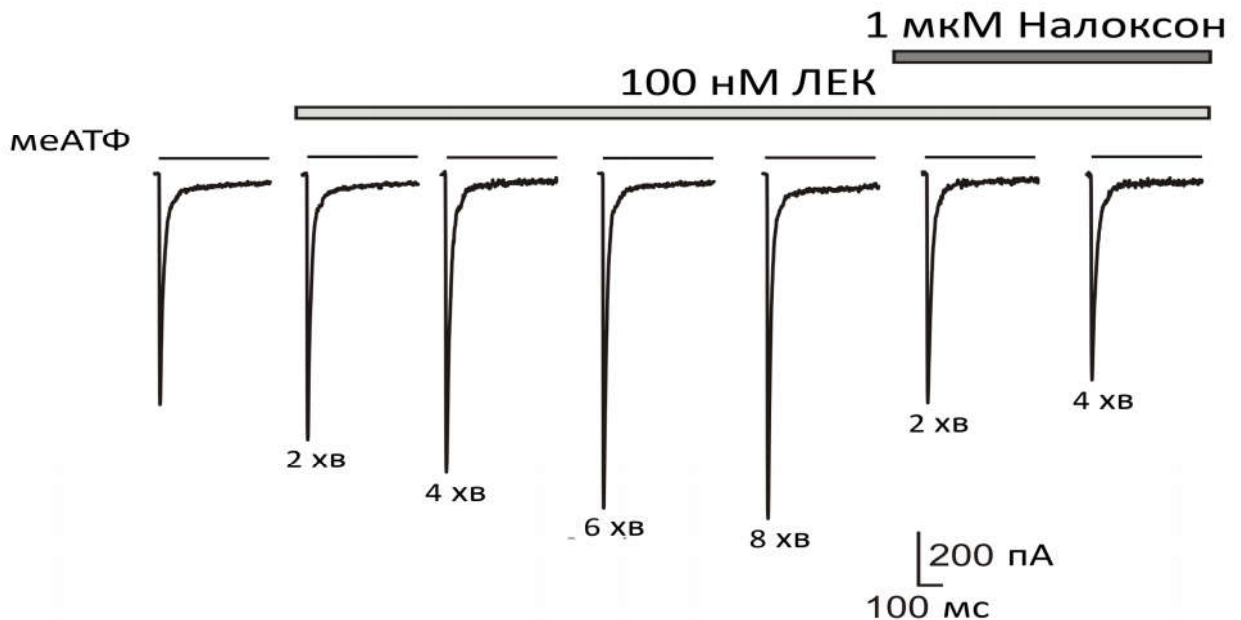


Рис. 3.12. Усування стимулюючої дії ЛЕК на P2X3-струми налоксоном в умовах попередньої інкубації нейронів дорсальних гангліїв з токсином кашлюку. Позначення ті ж.

Тим не менше, у цьому випадку обидва ефекти опіоїдів, були більш розгорнуті в часі: стимулюючий ефект передував остаточному інгібуючому впливі ЛЕК та інших ендогенних опіоїдів на P2X2/3-струми. Автори стверджують, що ефект стимуляції P2X2/3-струмів у вузлуватих нейронах виникав у нормальних умовах (без інкубації нейронів з RTX) [108]. Спочатку аплікація ендогенних опіоїдів призводила до збільшення амплітуди АТФ-активованих струмів, що розпочиналося вже за 20-30 с після прикладання опіоїдних агоністів та сягало максимуму за 2-3 хв [108]. На відміну від цих спостережень, у наших дослідженнях стимульовані амплітуди P2X3-струмів сягали максимуму протягом 6 – 8 хв, після прикладання ЛЕК. Співробітники нашої лабораторії раніше показали, що після потенціації P2X2/3-струмів, викликаного прикладанням ЛЕК у

подальшому АТФ-індуковані струми починали спадати, пригнічення досягало свого стаціонарного рівня протягом наступних 8-10 хв. За високих концентрацій ЛЕК (1 мкМ) на першому етапі амплітуда АТФ-індукованих струмів зростала на 51 %. Подальше прикладання ЛЕК у зазначених концентраціях призводило до пригнічення АТФ-активованих струмів у середньому на 39 % [108]. 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 100% - го блокування зазначених струмів.

Порівнюючи ці результати, можна зробити висновок, що ендogenous опіоїди можуть справляти подвійний вплив на АТФ-чутливі рецептори. Проте, така амбівалентна взаємодія опіоїдних рецепторів з різними підтипами P2X-рецепторів визначається активністю різних типів G-білків та молекулярних шляхів, які вони запускають.

3.6. Роль фосфоліпази C у регуляції активності P2X₃-рецепторів ендogenous опіоїдом ЛЕК

Добре відомо, що активація метаботропних опіоїдних рецепторів може залучати два найбільш поширені внутрішньоклітинні сигнальні шляхи: інгібування активності аденілатциклази (AC) [168], та активацію фосфоліпази C (PLC) [169]. Відомо, що ліпідний компонент плазматичної мембрани - фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат (PIP₂) справляє регуляторний вплив на мембранні протеїни та іонні канали, в тому числі і P2X₃-рецептори. Виснаження пулу PIP₂ призводить до інгібування активності останніх, а додавання його до цитозолу чинить зворотний ефект [65]. Тому, опіоїд –індукована активація фосфоліпази C [169] і в свою чергу гідроліз PIP₂ може лежати в основі інгібування P2X₃-струмів. Активація PLC призводить до гідролізу мембранного фосфоліпіду – фосфоінозитолдифосфату (PIP₂) на дві сигнальні молекули:

інозитолтрифосфат (IP_3), який мобілізує іони Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо і диацилгліцерол (DAG), який активує протеїнкіназу С (PKC) [170]. Беручи це до уваги, було цікаво перевірити, який з цих шляхів є посередником стимулюючого та інгібуючого впливу 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 призводило до відновлення амплітуд P2X3-струмів у середньому на $87 \pm 11\%$ ($n = 4$), (рис. 3.13.).

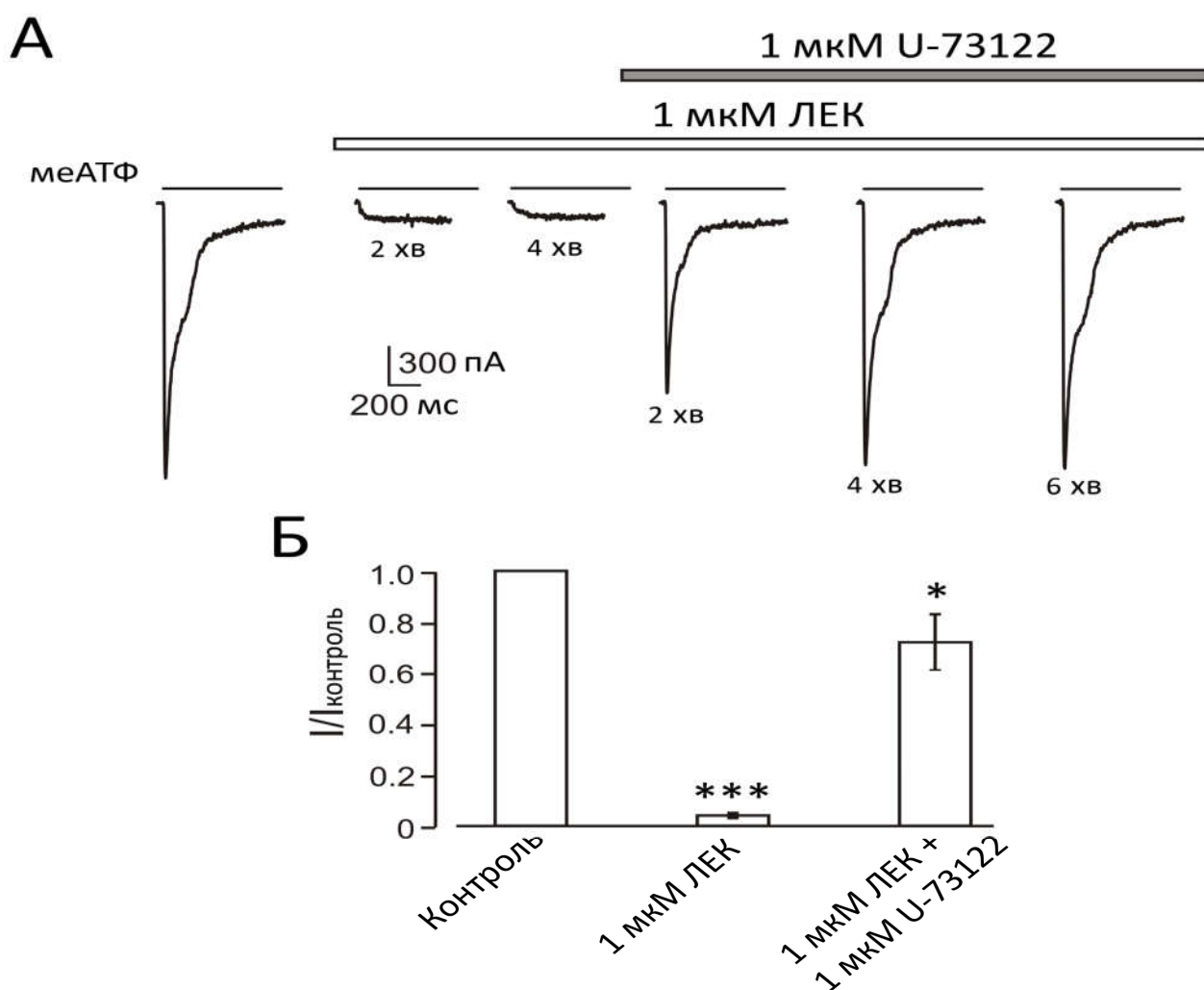


Рис. 3.13. Усунення інгібуючого впливу ЛЕК на P2X3-струми блокатором PLC на тлі дії опіюїда.

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 (1мкМ). Б – усереднені дані відповідних експериментів (n=5). * - $P < 0,05$; * - $P < 0,001$.**

Якщо припустити, що опіоїдно-опосередковані 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 з застосуванням високої концентрації налоксону (як на рис. 3.9., пункт 3.4.). Проте U-73122 відновлював амплітуди P2X3-струмів, інгібовані ЛЕК, лише до контрольного рівня (рис. 3.13; 3.15.). Це спостереження дало змогу припустити, що викликані опіоїдом інгібування та стимулювання P2X3-струмів можуть опосередковуватись PLC. Причому, відновлення амплітуд P2X3-струмів, викликане блокатором PLC, відбувається протягом 6 – 8 хв і повністю співпадає з аналогічним, під час відмивання ЛЕК у тій же концентрації зовнішньоклітинним розчином (як на рис. 3.1.). Цей факт вкотре доводить про те, що швидкість зв'язування опіоїда з рецептором, а не швидкість реакцій молекулярних механізмів, є ключовим фактором у процесі взаємодії опіоїдних рецепторів з P2X3-рецепторами.

Для з'ясування ролі PLC у стимулюючому впливі ЛЕК на P2X3-опосередкований струм, ми провели серію аналогічних експериментів, проте використовували нейрони інкубовані з РТХ протягом 17 – 24 годин. Як зазначено вище (рис. 3.11.), вплив інкубації з РТХ на нейрони СГ сприяє досягненню ефекту стимуляції P2X3-струмів, викликаних опіоїдами, шляхом інгібування Gi/o-білків.

Нами було вирішено повторити такий експеримент, проте після досягнення стимулюючого впливу ЛЕК, у концентрації 100 нМ, на P2X3-

струми, ми приклали блокатор PLC - U-73122 разом з опіюїдом до клітин, інкубованих з РТХ. Такі експериментальні умови викликали відновлення амплітуд Р2Х3-струмів після стимулюючої дії ЛЕК у середньому на $78 \pm 14\%$ ($n = 3$), порівняно з контролем (рис. 3.14; 3.15.).

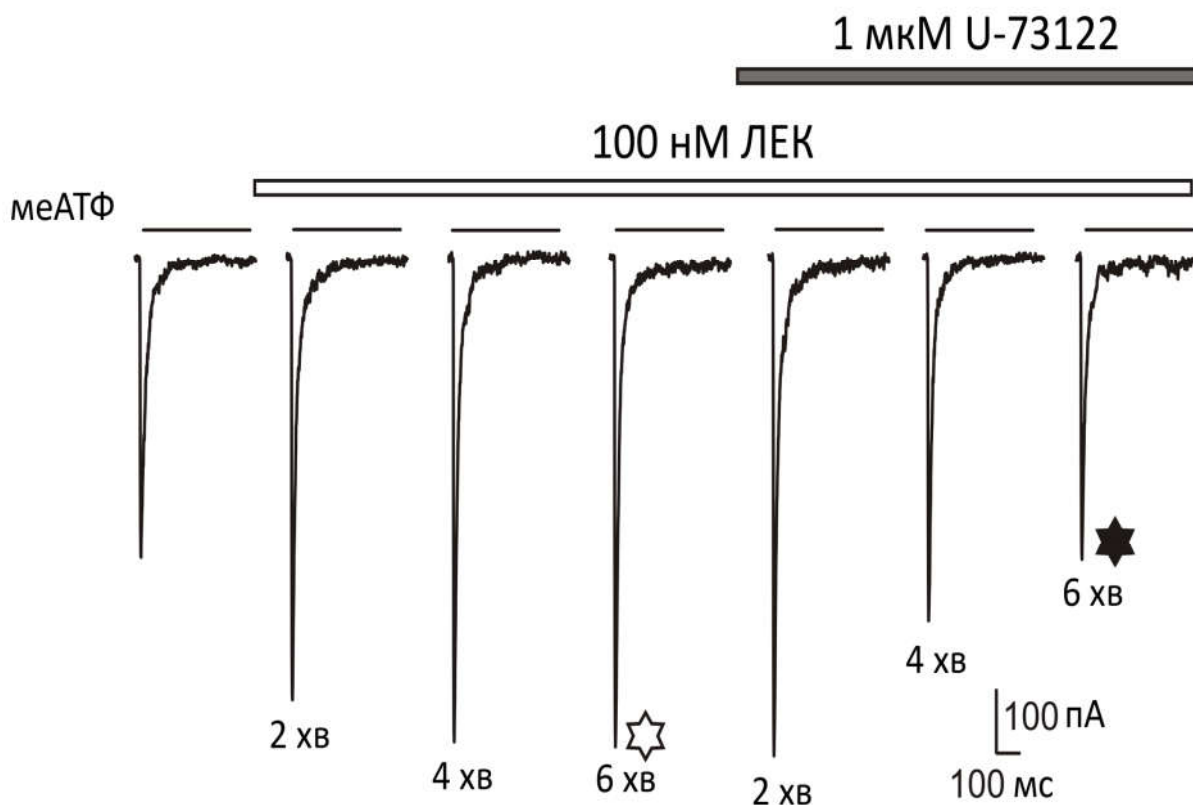


Рис. 3.14. Блокатор PLC усуває стимулюючий вплив ЛЕК на Р2Х3-струми в умовах інкубації нейронів СГ з токсином кашлюку.

Оригінальні записи струмів відведені від одної клітини у контролі, під час дії ЛЕК та в умовах аплікації блокатору PLC – U-73122 (1 мкМ) разом з ЛЕК (100 нМ). ☆ – пікове значення амплітуди Р2Х3-струму під впливом опіюїда, ★ – амплітуда Р2Х3-струму відновленого блокатором PLC.

Результат цього спостереження вказує на можливість участі PLC як в стимулюючому, так і в інгібуючому впливі опіюїдів на Р2Х3-струми. Цей ніби парадоксальний висновок добре узгоджується з даними [171], стосовно регуляції Р2Х3-рецепторів іншими метаботропними шляхами.

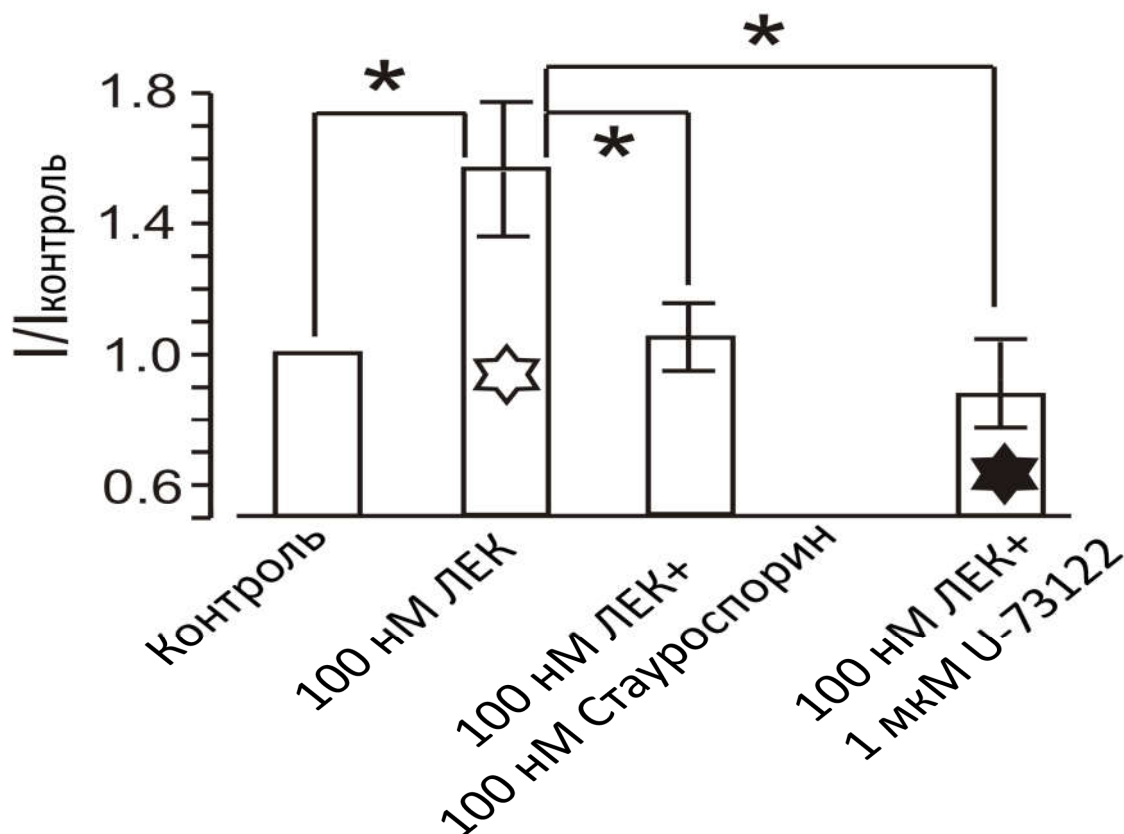


Рис. 3.15. Узагальнення даних експериментів по вивченню впливу блокаторів вторинних месенджерів на активність P2X3-рецепторів у нейронах СГ після інкубації з токсином кашлюку.

Кожен стовпчик відповідає усередненим значенням амплітуд P2X3-струмів у контролі, під час стимулюючого впливу ЛЕК та впливу стауреспорину і U-73122 на тлі дії ЛЕК. Позначення ті ж, що й на рис. 3.14. * - $P < 0,05$.

Наприклад, активація P2Y₂-рецепторів чинить інгібуючий вплив на P2X₃-рецептори через чутливі до токсину кашлюку G_{i/o}-білки та PLC [171]. З іншого боку, активація нечутливих до токсину кашлюку G_q-білків, сполучених з брадикініновими рецепторами та рецепторами субстанції P, лежить в основі стимулювання P2X₃-струмів через PLC/PIP₂/DAG/PKC каскад [71, 172].

Відомо, що активація G_{i/o}-білків призводить до зменшення вмісту внутрішньоклітинного циклічного аденозинмонофосфату [168], що може

впливати на активність P2X₃-рецепторів. У наших умовах внутрішньоклітинний розчин не містив cAMP. Окрім того, ми виявили, що додавання cAMP до внутрішньоклітинного розчину у високій концентрації (0,5 мМ) зберігає здатність ЛЕК інгібувати або стимулювати (у інкубованих нейронів з РТХ) P2X₃-струм. Тому малоймовірно, що пригнічення P2X₃-струмів пов'язане зі зниженням вмісту cAMP, внаслідок опіоїдіндукованого інгібування активності аденілатциклази (AC) [168].

Отже класичний внутрішньоклітинний шлях опіоїдної сигналізації, котрий пов'язаний з пригніченням AC гетеротримерними G-білками G_{i/o}-типу на разі не спостерігається.

Як вже зазначено вище, результатом зв'язування опіоїдів з MOR є активація двох сигнальних шляхів: інгібування AC [168] та стимуляція PLC [173]. Тому, щоб переконатися з іншого боку, що активація PLC може зумовлювати інгібуючий вплив ЛЕК на P2X₃-рецептори, ми застосовували m-3M3FBS – синтетичний активатор PLC, котрий здатен проникати через клітинну мембрану.

Прикладання цього активатора до нейронів СГ у концентрації 20 мкМ, призводило до пригнічення швидкої компоненти десенситизації інтегрального P2X₃/P2X_{2/3}-опосередкованого струму у середньому на $72 \pm 0,06 \%$, ($n = 5$) (рис. 3.16.). Ефект був повністю оборотнім, заміна розчину з m – 3M3FBS на нормальний, сприяла повільному (10 – 12 хв) та повному відновленню амплітуд P2X₃-струму до контрольних значень. Інгібування швидкої компоненти десенситизації інтегрального P2X₃/P2X_{2/3}-опосередкованого струму активатором PLC вказує на те, що саме P2X₃-субодиниці є найбільш чутливими до зменшення мембранного пулу PIP₂.

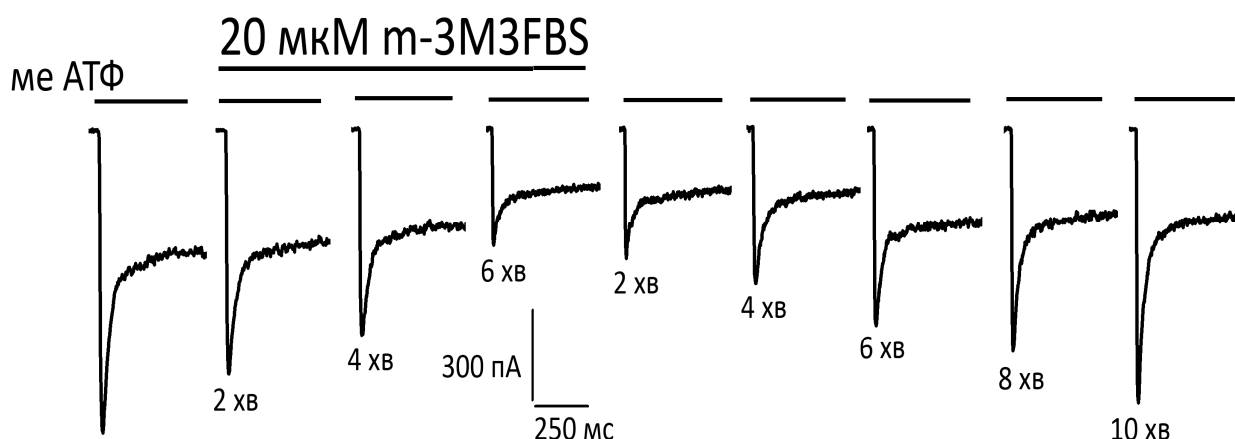


Рис. 3.16. Інгібування P2X3-опосередкованих струмів, викликане синтетичним активатором PLC (m – 3M3FBS)

Оскільки показано, що активація PLC призводить до гідролізу мембранного фосфоліпіда – фосфатидилінозитол 4, 5 – дифосфату (PIP_2) [170], а з іншого боку PIP_2 підтримує активність P2X3-рецепторів [75], результати наступного експерименту (рис. 3.17.) дозволяють припустити, що гідроліз PIP_2 залучений до механізму інгібування P2X3-струмів.

Відомо, що рівень концентрації мембранного, функціонально зв'язаного з P2X3-рецепторами PIP_2 , визначається двома факторами: базальною активністю PLC, яка гідролізує PIP_2 та активністю кіназ, що залучені до синтезу останнього [75]. Враховуючи те, що μ - опіюїдні агоністи, активують PLC [173], а з іншого боку, активація самої PLC призводить до інгібування P2X3-струму (рис. 3.16.), аналогічно із впливом ЛЕК, нам потрібно було переконатися у тому, що активність PLC та виснаження рівня мембранного PIP_2 , може контролюватись активацією MOR. Для цього ми використовували вортманін – інгібітор кіназ, що задіяні до синтезу PIP_2 у концентрації 35 мкМ. Зарубіжними колегами було показано, що порушуючи синтез PIP_3 або PIP_2 кіназ, шляхом інкубації з вортманіном – метаболітом грибів *Penicillium Funiculosum*, мембранні фосфоінозитиди можуть регулювати активність P2X3-опосередкованих

струмів [65].

У наших експериментах, після інкубації нейронів СГ з вортманіном (24 години), ЛЕК у низькій концентрації (10 нМ) спричиняв посилення та прискорення інгібуючого впливу на P2X3-струми (рис. 3.17.).



Рис. 3.17. Вортманін посилює інгібуючий вплив ЛЕК на P2X3-струми.

Прикладання ЛЕК (10 нМ) протягом 4 хвилин, інгібував швидку компоненту 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 у середньому на $53 \pm 11 \%$, ($n = 5$), (рис. 3.1. А). Цей ефект був частково оборотним, заміна розчину з ЛЕК на нормальний, не призводила до повного відновлення амплітуд P2X3-струмів, оскільки заблоковані кінази, не можуть швидко відновити пул PIP_2 до контрольного рівня. Прискорення інгібуючого ефекту, пояснюється швидким виснаженням мембранного PIP_2 , оскільки, опіюдно – індукована активація PLC, призводить до гідролізу PIP_2 , а вортманін – інгібітор кіназ, що залучені до синтезу PIP_2 . Таким чином,

рівень концентрації мембранного PIP_2 впливає на швидкість та ефективність пригнічення P2X_3 -рецепторів ЛЕК.

Отже, активація опіоїдних рецепторів ЛЕК, викликає два протилежно спрямовані ефекти на P2X_3 -рецептори, ці ефекти опосередковуються PLC.

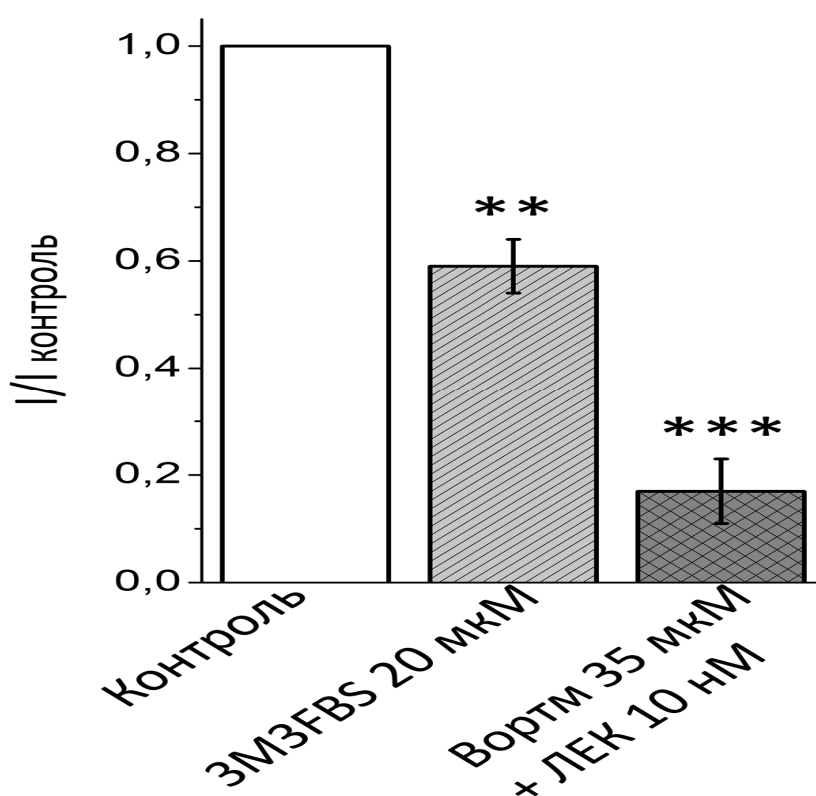


Рис. 3.18. Узагальнення щодо впливу активатора PLC та блокатора кіназ PIP_2 на активність P2X_3 -рецепторів

Кожен стовпчик відповідає усередненим значенням амплітуд P2X_3 -струмів у контролі, під час інгібуючого впливу m-3M3FBS та дії ЛЕК на P2X_3 -струми після інкубації нейронів з вортманіном. ** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,001$.

3.7. Стимулюючий вплив лейенкефаліну на P2X3-струми опосередкований залученням РКС

Літературні джерела свідчать, що активність P2X3-рецепторів може регулюватися РКС [75]. Як вже зазначено вище, активація PLC призводить до гідролізу мембранного фосфоліпіда PIP_2 на дві сигнальні молекули: IP_3 , котрий мобілізує іони Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо і DAG, який активує РКС [170]. З іншого боку відомо, що РКС може впливати на активність P2X₃-рецепторів [75]. Отже, PLC може бути залучена до модуляторного впливу лейенкефаліну на P2X3-струми через РКС у інкубованих і неінкубованих з РТХ нейронах СГ. Досліджуючи роль різних внутрішньоклітинних шляхів у подвійному впливі ЛЕК на P2X3-опосередковані струми, нам необхідно було перевірити вплив РКС на вище зазначені ефекти.

Ми виявили, що в ноціцептивних нейронах інкубованих з РТХ протягом 17 – 24 годин застосування інгібітору РКС – стауроспорину повністю усувало стимулюючий вплив ЛЕК на P2X3-опосередковані струми (рис. 3.19.). Прикладання ЛЕК в концентрації 100 нМ до інкубованих з РТХ нейронів СГ викликало збільшення амплітуд P2X3-струмів на $156 \pm 20 \%$, ($n = 7$; $P < 0,05$) порівняно з контролем, протягом 6 хв. Після досягнення досліджуваними струмами стаціонарних значень у стимульованому стані, до зовнішньоклітинного розчину додавали суміш ЛЕК та стауроспорину в концентрації 100 нМ. За даних умов, стауроспорин усував стимулюючий ефект ЛЕК на P2X3-струми протягом 6 – 8 хвилин. (рис. 3.19.).

На даний час відомо, що РКС може активуватися DAG або збільшенням Ca^{2+} у цитоплазмі [170]. Оскільки концентрація останнього

була стабільною в експериментальних умовах (внутрішньоклітинна концентрація EGTA 10 мМ), ймовірно, що PLC/PIP₂/DAG/РКС-шлях залучений до стимулюючого впливу опіоїдів на P2X3-струми.

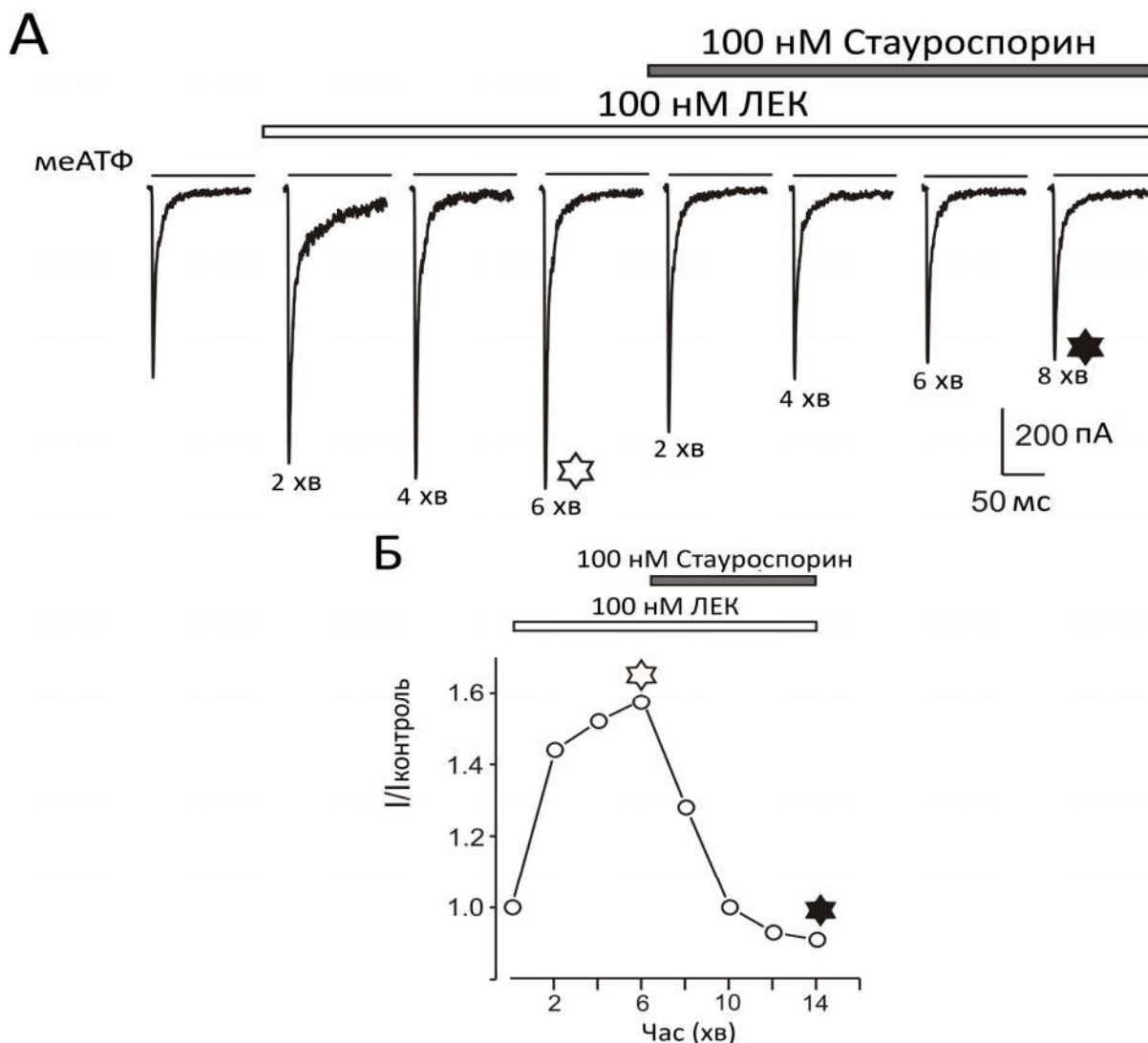


Рис. 3.19. Стауроспорин усуває стимулюючий вплив ЛЕК на P2X3-струми в умовах інкубації нейронів СГ з токсином кашлюку.

А- оригінальні записи струмів відведені 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 староспорину на тлі дії ЛЕК. ☆ – пікове значення амплітуди P2X3-струму під впливом опіоїду, ★ – амплітуда P2X3-струму, відновленого стауроспорином.

Результати цих експериментів вказують на те, що до ефекту стимуляції P2X3-струмів, викликаній активацією опіоїдних рецепторів ЛЕК, залучена РКС. Тобто, викликана опіоїдом активація PLC призводить як до інгібування, так і до стимуляції P2X3-рецепторів.

3.8. Викликане опіоїдами вивільнення іонів Ca^{2+} залежить від Gi/o - та Gq - білок спряженого сигнального шляху

Нині відомо, що активація опіоїдних рецепторів, як і багато інших метаботропних рецепторів, спржених із Gi/o – білками, може викликати підвищення концентрації внутрішньоклітинного кальцію [174]. Механізми, що лежать в основі цього явища на даний час не достатньо вивчені. Також повідомлялося про те, що в деяких випадках опіоїдіндуковане збільшення іонів Ca^{2+} в клітині викликається залученням Gq -білків, котрі самі по собі стимулюють вивільнення кальцію з внутрішньоклітинних депо через активацію інозитолтрифосфатного шляху [174].

З огляду на величезну кількість подій які може викликати активація опіоїдних рецепторів, у тому числі і вплив на кальцієві канали та іонні струми опосередковані ними, нами було вирішено з'ясувати роль Gi/o - та Gq -білків μ -опіоїдних рецепторів у змінах кальцієвої сигналізації, викликаній прикладанням ЛЕК до нейронів СГ.

Результати реєстрації динаміки змін внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} у культивованих нейронах СГ показали, що ЛЕК-індуковані кальцієві сигнали пов'язані з його внутрішньоклітинним вивільненням з ендоплазматичного ретикулуму. Реліз іонів Ca^{2+} , викликаний аплікацією ЛЕК до нейронів, не залежить від наявності кальцію у зовнішньоклітинному розчині. (рис. 3.20. А). Інкубація нейронів

з токсином кашлюку протягом 17 – 24 годин до експерименту призводить до зниження кальцієвого сигналу у відповідь на прикладання ЛЕК, проте повністю не скасовує його (рис. 3.20. Б). Початкова фаза ЛЕК індукованої швидкої зміни концентрації іонів Ca^{2+} була істотно зменшена внаслідок інкубації нейронів з РТХ. В той час, як стійкий компонент Ca^{2+} відповіді послаблявся меншою мірою, за умов видалення іонів Ca^{2+} з позаклітинного розчину. Це може вказувати на те, що іони кальцію вивільняються з ендоплазматичного ретикулула.

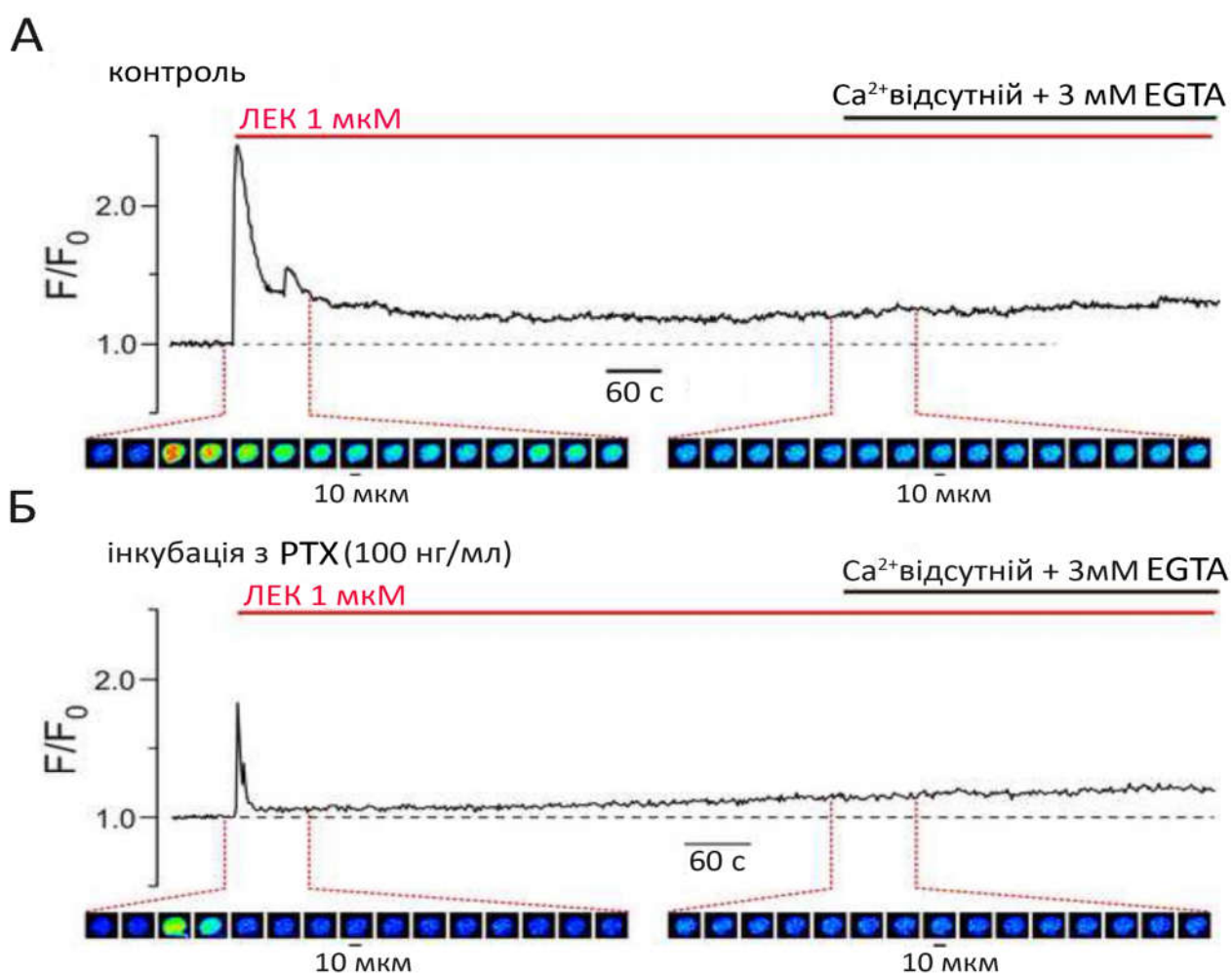


Рис. 3.20. ЛЕК індуковане вивільнення Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо нейронів СГ не залежить від активації G i/o- сигнального шляху.

Зміни інтенсивності Fluo – 4 флуоресценції Ca^{2+} транзисенту,

викликаного прикладанням 1 мкМ ЛЕК до нейронів СГ: А – в контролі, Б – попередньо інкубованих з РТХ. Де F0 – контрольне значення, F – значення інтенсивності флюоресценції Ca^{2+} транзйенту в момент прикладання ЛЕК. Зображені нижче ділянки з колірним кодом, були зареєстровані в періоди, що виділені на графіках пунктиром (показано кожне п'ять зображення).

Основним результатом цього експерименту є те, що ЛЕК-індукована активація обох, чутливих до РТХ $G_{i/o}$ -білків і нечутливих - G_q -білків μ -опіюїдних рецепторів призводить до різкого наростання Ca^{2+} транзйенту в контролі (рис. 3.20. А). Проте інкубація нейронів з РТХ та викликане ним блокування $G_{i/o}$ -білків зменшує інтенсивність вивільнення іонів Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо (рис. 3.20. Б).

Отже, викликане ЛЕК вивільнення іонів Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулума опосередковується активацією як $G_{i/o}$ -, так і G_q -білків опіюїдних рецепторів. Таким чином можна висунути припущення, що MOR-опосередкована сигналізація спрямовується на P2X3-рецептори шляхом активації як чутливих до РТХ ($G_{i/o}$)-білків, так і нечутливих - G_q -білків MOR. Саме ці два типи G-білків можуть виконувати роль посередників протилежних ефектів впливу ЛЕК на P2X3-рецептори.

РОЗДІЛ 4

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

4.1. Вплив опіоїдів на нативні P2X3-рецептори

Нині відомо, що АТФ, активуючи різні підтипи P2X-рецепторів на нейронах (P2X3 та P2X2/3) чи клітинах глії (P2X4 та P2X7), може безпосередньо або ж внаслідок нейро-гліальних взаємодій змінювати чутливість до больових стимулів [175].

Саме тому, чимало робіт присвячено регуляції P2X-рецепторів іншими типами іонотропних та метаботропних рецепторів і питанням міжрецепторних взаємодій. Зокрема, було показано, що нативні нейрональні P2X-рецептори можуть модулюватися G-білок спряженими серотоніновими рецепторами [68] та нікотиновими ацетилхоліновими рецепторами [69, 176]. В ході досліджень, проведених на рекомбінантних рецепторах, виявилось, що mGluR1a-, P2Y1-, P2Y2-[177] та 5-HT2A-рецептори [178] підвищують активність P2X1-рецепторів, а струми, опосередковані P2X3- та P2X2/3- рецепторами зростають після стимуляції субстанцією Р та брадикініном [71]. Крім того було виявлено, що P2X3-опосередковані струми в нейронах СГ пригнічуються агоністами ГАМК_B рецепторів [179]. Таким чином, активність P2X-рецепторів може регулюватися низкою сигнальних подій. Це створює значну кількість механізмів для динамічної регуляції P2X- рецептор-канальних комплексів у відповідь на різноманітні стимули. З іншого боку, відомо, що активація опіоїдних рецепторів може запускати у клітині цілий ряд процесів, які

здатні впливати на роботу чисельних ферментативних систем та іонних каналів. Зокрема, активація опіоїдних рецепторів призводить до пригнічення кальцієвих струмів у сенсорних та моторних нейронах гризунів [180–185], потенціалізації G-білок активованих калієвих струмів внутрішнього випрямлення у нейронах блакитного п'ятна (*locus caeruleus*) мишей [186] та пригнічення активності тетродотоксин-нечутливого натрієвого струму у нейронах СГ щурів [187]. Перелічені ефекти добре узгоджуються з усталеними уявленнями про антиноціцептивне призначення опіоїдної рецепторної системи в організмі. Оскільки P2X3-рецептори належать до родини ноцицепторів і коекспресуються з опіоїдними рецепторами у сенсорних нейронах, опосередковуючи знеболення на периферії [187–189], було висунуто гіпотезу про можливу взаємодію вище зазначених рецепторів.

У цьому дослідженні ми показали, що активація MOR проявляє подвійний вплив (інгібуючий та стимулюючий) на P2X3-опосередковані струми в нейронах СГ. Під час прикладання ЛЕК до нативних клітин даний ендогенний опіоїд відчутно пригнічує P2X3-струми (рис. 3.1.). На противагу цьому, коли опіоїд прикладався до нейронів попередньо інкубованих з РТХ, амплітуда P2X3-струмів помітно збільшувалася (рис. 3.11.). Тому ми не відхиляємо можливості того, що MOR-опосередкована сигналізація спрямовується на P2X3-рецептори через активацію як чутливих до РТХ (Gi/o)-білків, так і нечутливих - Gq-білків MOR. Ці два типи G-білків можуть виконувати роль посередників протилежних ефектів впливу ЛЕК на P2X3-рецептори. У нормальних умовах переважає інгібуючий опіоїд-індукований ефект, в той час як стимулюючий є або

прихованим, або ж відсутній. Функціональне вираження нечутливого до РТХ метаботропного шляху також підтверджується реєстрацією змін Ca^{2+} 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. 3.20.А, Б.). Однак блокування чутливих до РТХ Gi/o -білків повністю не скасовує ЛЕК-індукований кальцієвий сигнал (рис. 3.20. Б)

Біохімічні дослідження останніх років вказують на те, що MOR, як і багато інших G-білок спряжених рецепторів, здатні набувати кількох активних конформацій залежно від їх поєднання з певним типом G-білків [164]. Наприклад така особливість MOR-опосередкованої сигналізації, лежить в основі подвійного впливу на АС [167]. Тому ми можемо припустити, що подвійний вплив ендogenous опіюда – ЛЕК на P2X3-рецептори може аналогічно опосередковуватися різними конформаційними станами MOR. Ці конформації можуть виникати в залежності від зв'язування MOR або з чутливими до РТХ - Gi/o -, або з нечутливими - Gq -білками. Таким чином, опіюдно-індуковане інгібування/стимуляція P2X3-рецепторів пов'язані з різними внутрішньоклітинними шляхами, котрі активуються певними типами G-білків.

Проведені в рамках даної роботи експерименти вказують на те, що зв'язок між опіюдними та P2X3-рецепторами опосередковується G-білками. З літературних джерел відомо, що викликані активацією опіюдних рецепторів ефекти, опосередковуються насамперед Gi/o -білками

[190]. Однак виявилося, що прикладання опіоїдних агоністів до нейронів СГ, інкубованих з токсином кашлюку (РТХ) викликало стимуляцію P2X3-опосередкованих струмів (рис. 3.11.). Як відомо, РТХ інгібує $G_{i/o}$ -субодиниці, запобігаючи у такий спосіб пригніченню аденілатциклази [191].

Подібних висновків дійшли і зарубіжні колеги в ході експериментів на ооцитах хом'яка. Було показано, що інактивація $G_{i/o}$ -білків, після прикладання кашлюкового токсину, виявляє здатність μ -опіоїдних рецепторів підвищувати індуковану форскаліном активність аденілатциклази через механізми, пов'язані з G_s -білками [167]. Введення гризунам кашлюкового токсину в експериментах *in vivo* призводило до зменшення ефективності опіоїдних агоністів, як знеболюючих агентів [192, 193]. Відомо, що тривале застосування опіоїдів для пригнічення болю у хворих чи в експериментах *in vivo* може спричинити розвиток гіпералгезії (підвищеної чутливості до больових стимулів) та, навіть, аллодинії (стан, за якого больові відчуття виникають у відповідь на не больовий стимул).

Вивчення процесів, що призводять до розвитку гіпералгезії чи алодинії, має неабияке значення для клінічної медицини, оскільки, як це не парадоксально, стан пацієнтів, які отримують опіоїдну терапію для купіювання больових відчуттів, може погіршуватися в ході використання опіоїдів [194, 195]. Однак у нашому випадку було цікаво перевірити, які ж саме біохімічні шляхи можуть активуватися $G_{i/o}$ - та G_q -білками MOR і модулювати активність P2X3-рецепторів.

4.2. Інгібуючий та стимулюючий вплив μ -опіїдних рецепторів на P2X₃-рецептори опосередкований PLC

Відомо, що ліпідний компонент плазматичної мембрани - фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат (PIP₂) справляє регуляторний вплив на мембранні протеїни та іонні канали, в тому числі і P2X₃-рецептори. Виснаження PIP₂ пулу призводить до інгібування активності останніх, а додавання PIP₂ до цитозолу чинить зворотній ефект [65]. Тому, опіїд-індукована активація фосфоліпази C [169] і в свою чергу гідроліз PIP₂ може лежати в основі інгібування P2X₃-струмів. Для перевірки цієї гіпотези, нами було застосовано селективний інгібітор PLC U-73122 у концентрації 1 мкМ. Останній усував інгібуючий ефект ЛЕК у середньому на $87 \pm 11\%$; ($n = 4$); $p < 0,05$ (рис. 3.13.). Цей феномен міг би викрити прихований стимулюючий компонент подвійного впливу опіїда на P2X₃-струми. Проте U-73122 відновлював амплітуди P2X₃-струмів інгібовані лейенкефаліном до контрольного рівня. Це спостереження дозволило припустити, що викликані опіїдом інгібування та стимулювання P2X₃-струмів опосередковані PLC. Результат експерименту представлений на рис. 3.14. доводить, що стимулюючий вплив ендogenous опіїда на P2X₃-струми у нейронах інкубованих з PTX, повністю усувається блокатором PLC – U-73122.

Цей парадоксальний висновок добре узгоджується з даними, стосовно регуляції P2X₃-рецепторів іншими метаболічними шляхами. Наприклад активація P2Y₂-рецепторів чинить інгібуючий вплив на P2X₃-рецептори через чутливі до PTX G_{i/o}-білки та PLC [171].

Результати досліджень попередніх років свідчать, що активація $G_{i/o}$ -білків призводить до зменшення рівня внутрішньоклітинного cAMP, що може впливати на активність P2X3-рецепторів. В даних умовах, внутрішньоклітинний розчин не містив cAMP. Більше того, додавання високої концентрації cAMP (0,5 мМ) до внутрішньоклітинного розчину, не запобігала пригніченню активності P2X3-струмів лейенкефаліном. Тому малоймовірно, що ефект пригнічення P2X3-струмів ЛЕК пов'язане зі зниженням рівня cAMP, у наслідок опіод-індукованого інгібування АС [168].

Отже класичний внутрішньоклітинний шлях опіоїдної сигналізації, котрий пов'язаний з активацією АС гетеротримерними G-білками $G_{i/o}$ типу, що призводить до підвищення концентрації внутрішньоклітинного cAMP, не має місця в даному випадку.

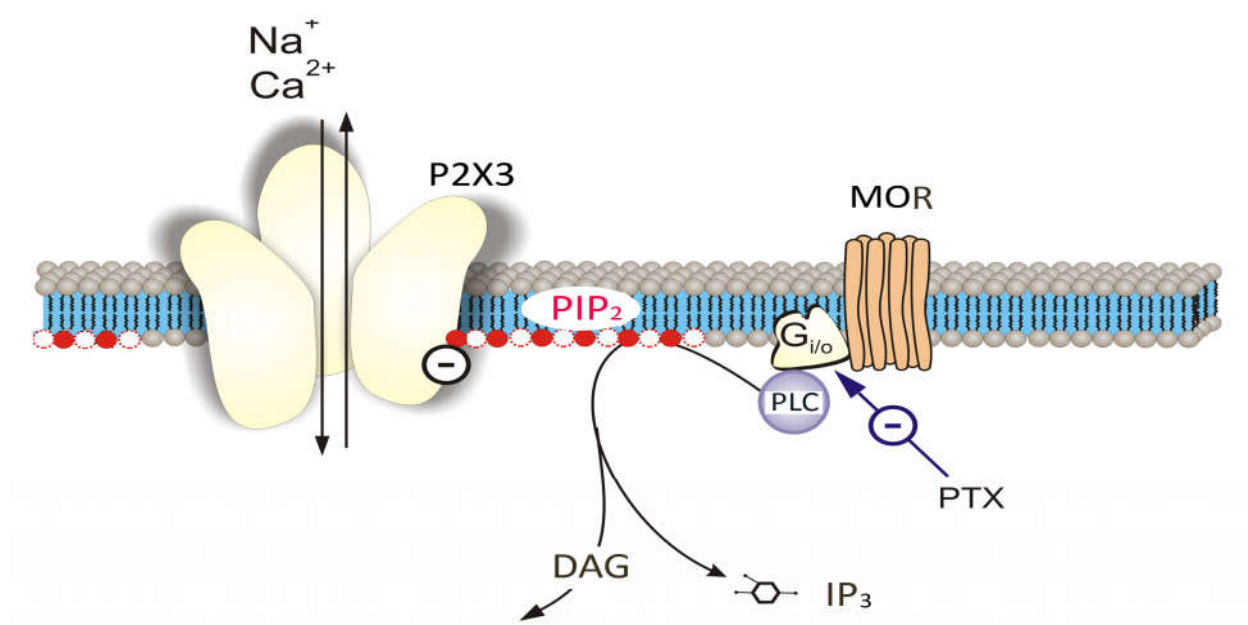


Рис. 3.21. Загальна схема внутрішньоклітинного сигнального шляху, яким опосередковується інгібуючий вплив ЛЕК на P2X3-рецептори у нейронах СГ.

P2X3 – рецептор-каналний комплекс; PIP₂ – мембранний ліпід фосфоінозитолдифосфат; MOR – μ опіоїдний рецептор; Gi/o – інгібуючий тип G – білків; PLC – фосфоліпаза C; DAG – діацилгліцерол; IP₃ – інозитолтрифосфат; PTX – пертуситоксин (токсин кашлюку); червоні та білі кружечки – просторово розділені пули PIP₂.

Таким чином, активація різних типів метаботропних, G-білок спряжених рецепторів може викликати як інгібування, так і стимуляцію P2X3-рецепторів.

4.3. Механізми залучення протеїнкінази C до стимулюючого впливу ЛЕК на P2X3-рецептори

Дослідженнями останніх років показано, що активація нечутливих до PTX G_q-білків спряжених з брадикініновими рецепторами та рецепторами субстанції P, лежить в основі стимулювання P2X3-струмів через PLC/PIP₂/DAG/PKC каскад [172]. Взаємодія опіоїдних рецепторів з G_q-білками та активація PLC-опосередкованого шляху, продемонстрована в клітинах нейробластоми, що були інкубовані з PTX [71].

Відомо, що активація PLC призводить до гідролізу мембранного фосфоліпіда PIP₂ на дві сигнальні молекули: IP₃, котрий мобілізує Ca²⁺ з внутрішньоклітинних депо і DAG, який активує протеїнкіназу C (PKC) [173]. З іншого боку відомо, що PKC може впливати на активність P2X3-рецепторів [75]. Отже, як PLC так і PKC можуть бути залучені до модуляторного впливу ЛЕК на P2X3-струми в інкубованих і не

інкубованих з РТХ нейронах СГ. Ми виявили, що інгібітор РКС – стауроспорин, повною мірою усуває опіоїд-індукований стимулюючий вплив на P2X3-струми у нейронах СГ, інкубованих з РТХ (рис. 3.16.).

Також показано, що РКС може активуватися DAG або збільшенням іонів Ca^{2+} у цитоплазмі [196]. Оскільки концентрація останнього була стабільною в даних експериментальних умовах (внутрішньоклітинний розчин містив EGTA – 10 мМ), ймовірно, що PLC/PIP₂/DAG/РКС шлях залучений до стимулюючого впливу опіоїдів на P2X3-струми. Тобто викликана опіоїдом активація PLC призводить як до інгібування, так і до стимулювання P2X3-рецепторів. Парадокс дивергенції PIP₂ сигналу в тих самих областях клітинної мембрани обговорювався в ранніх роботах. Було запропоновано, що молекулярні компоненти G-білок/PLC сигнальних шляхів і їх фінальні цілі можуть просторово відокремлюватися мікродоменами [197], а окремі пули PIP₂ були ідентифіковані в плазматичній мембрані за допомогою електронної мікроскопії [198]. Виснаження PIP₂-пулу, асоційованого з P2X3-рецепторами, призводить до інгібування P2X3-струмів [65], а гідроліз іншого PIP₂, відокремленого від P2X3-рецепторів, викликає їх стимулювання через DAG/РКС шлях (рис. 3.22.).

Залучення РКС до механізму стимулюючого впливу опіоїдних рецепторів на ноцицептори було показано *in vitro* та концептуально узгоджено з *in vivo* результатами, згідно з якими, опіоїд-індукований PLC/РКС сигнал викликає гіпералгезію у дослідних тварин. Наприклад супраспинальний аналгетичний ефект морфіну підсилювався в нокаутних мишей по РКС гену [199].

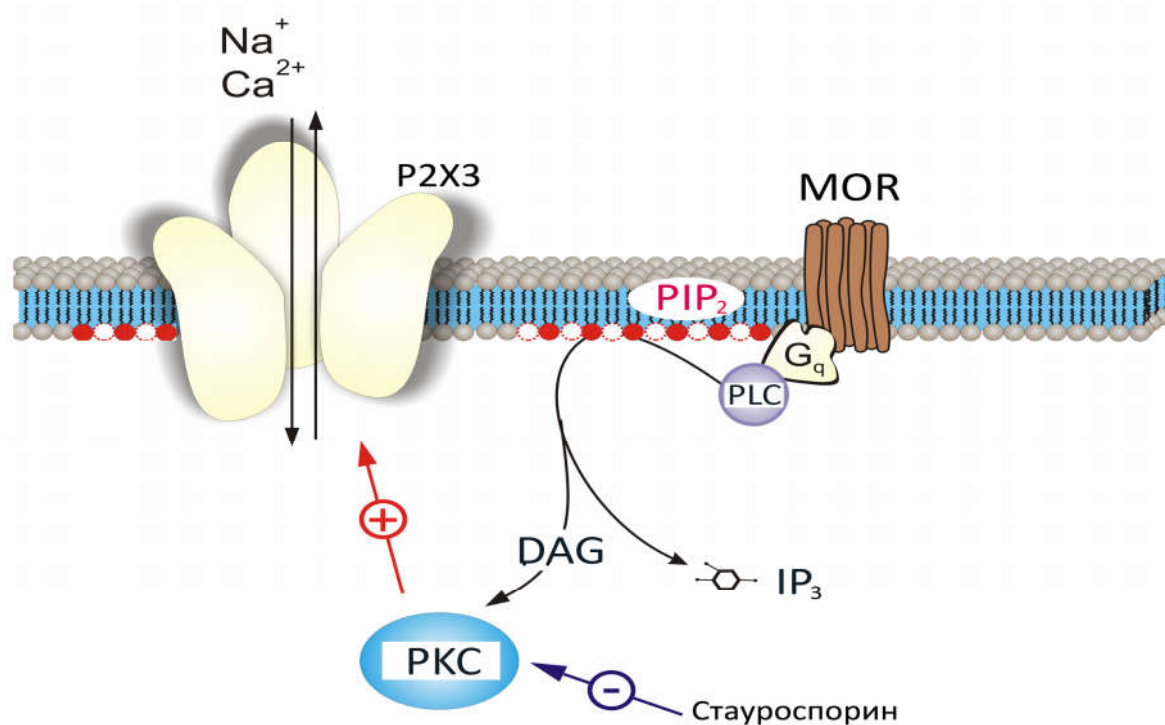


Рис. 3.22. Загальна схема внутрішньоклітинного сигнального шляху, яким опосередковується стимулюючий вплив ЛЕК на P2X3-рецептори у нейронах СГ.

Gq – стимулюючий тип G – білків; PKC – протеїнкіназа C. Всі інші позначення аналогічні таким на рис. 3.20.

В інших дослідженнях застосування морфіну в низьких концентраціях призводить до гіпералгезії в поведінковому тесті з нагрітою пластиною [200]. Автори стверджують, що до цього ефекту залучений PLC/PKC сигнальний шлях.

Таким чином, активація опіоїдних рецепторів ЛЕК, викликає два протилежно спрямовані ефекти на P2X3-рецептори. Ці ефекти реалізуються різними G-білками ($G_{i/o}$ або G_q), проте обидва опосередковані активацією PLC. Існування цих різноспрямованих шляхів, можна

розглядати як молекулярну основу добре відомого переходу інгібуючої дії опіоїдів (аналгезії) до стимулюючої (гіпералгезії).

Існування значної кількості сигнальних шляхів, що забезпечують регуляцію P2X-рецепторів, також підтверджується чисельними дослідженнями. Було показано, що активність P2X-рецепторів на нейрональній мембрані може регулюватися низкою механізмів, зокрема за рахунок фосфориляції протеїнкіназами, взаємодії з іншими ліганд-керованими іонними каналами чи G-білок спряженими рецепторами [70], а також за рахунок взаємодії з регуляторними білками [70] чи фосфоінозитидами [63]. З іншого боку, відомо, що опіоїдні рецептори можуть виступати активаторами відповідних сигнальних каскадів або ж партнерами у міжрецепторній взаємодії [102, 190, 201]. Таким чином, припущення про існування кількох шляхів, що опосередковують регуляцію P2X-рецепторів опіодними не суперечить наявним на сьогоднішній день експериментальним даним.

Загалом же отримані дані вказують на нове функціональне призначення опіоїдів в організмі. Вони беруть участь в регуляції активності первинних ноціцепторів. Чутливість первинних ноціцептивних нейронів до опіоїдів надає додаткового поштовху і особливої актуальності розробці опіоїдних агоністів, що не проходять гемато-енцефалічний бар'єр та, відповідно, позбавлені широковідомих побічних ефектів опіоїдів.

Втім, хоча активація опіоїдних рецепторів здатна викликати потужний знеболюючий ефект і послаблювати відповіді периферичних ноціцепторів на больові стимули [202–204], за певних умов застосування опіоїдів для боротьби з болем стає малоефективним. Зокрема відомо, що в ході

онкологічних захворювань нерідко розвиваються больові стани, повністю нечутливі або малочутливі до опіоїдної терапії [205]. До того ж в ході прогресування захворювання з'являється необхідність у постійному підвищенні дози опіоїдних агоністів, що, в свою чергу, супроводжується небажаними побічними ефектами [206,207]. Це суттєво обмежує використання опіоїдів у таких випадках. Особливо нестерпний біль відчують хворі або піддослідні тварини з пухлинами, що спричиняють руйнування кісток та інфільтрацію нервів. Біль, що виникає в ході розвитку онкологічних захворювань, опосередковується різними сигнальними механізмами та поєднує в собі характерні особливості невропатичного, гострого та хронічного болю. На жаль, навіть опіоїдні анагетика практично не полегшують страждання від невропатичного болю, викликаного ушкодженням нервів. Такі ушкодження є типовими для онкологічних захворювань, в ході яких розвиваються метастази в кістках та відбувається інфільтрація нервів [208]. Наприклад, в серії експериментів на мишах клітини остеолітичної фібросаркоми імплантувалися навколо та безпосередньо у п'яткову кістку задньої лапи. Після цього у піддослідних тварин розвивалися характерні больові поведінкові реакції та гіпералгезія, що посилювалися з часом [209]. Крім того підвищувалася чутливість ноціцепторів на С-волокнах шкіри над місцем розвитку пухлини [208]. Наразі достеменно невідомо, чому ефективність опіоїдів при боротьбі з болем в онкологічних хворих відчутно знижується. Одним з можливих пояснень цього феномена є те, що злоякісно перероджені клітини чи хімічні сполуки, які виділяються такими клітинами, впливають на опіоїдну сигналізацію в нейронах.

Підсумовуючи вищесказане, слід відзначити, що біль є одним з найважливіших компонентів захисної системи організму, який сигналізує про пошкодження тканин чи розвиток патологічного стану, а також постійно діючим регулятором гомеостатичних реакцій, включно з їх вищими поведінковими формами. Однак за певних умов, біль сам стає частиною патологічного процесу, нерідко небезпечнішого, ніж пошкодження, що викликало цей процес. Перебіг та прогресування численних хвороб та патофізіологічних станів супроводжується болем, що призводить до відчутного погіршення якості життя хворої людини чи тварини. АТФ та P2X-рецептори первинних сенсорних нейронів відіграють провідну роль у сприйнятті больових сигналів на периферії та їх передачі до ЦНС. З іншого боку, опіоїдна терапія залишається одним з основних засобів для боротьби з сильним болем, зокрема і в онкологічних хворих. Наразі медики та дослідники не мають чіткого системного уявлення про молекулярні та нейробиологічні механізми, що забезпечують регуляцію больової чутливості, а також розвиток больових станів, нечутливих до опіоїдів. Дослідження у цій царині відкривають шлях до розробки нових чи перегляду вже існуючих підходів та схем терапії болю.

У даній роботі показано, що опіоїди здійснюють регулюючий вплив на первинні ноціцептори, модулюючи активність P2X3-рецепторів на мембрані нейронів. Описані можливі механізми, що опосередковують опіоїдну регуляцію P2X3-рецепторів сенсорних нейронів на периферії.

Отримані дані можуть бути використані для розробки нових знеболюючих препаратів чи перегляду існуючих схем застосування вже відомих засобів. Це дозволить контролювати біль у людей та тварин з

різноманітними патологіями без негативних побічних ефектів, пов'язаних з впливом опіатів на центральні ланки нервової системи, та/або уникнути зниження ефективності опіоїдів при боротьбі з болем під час розвитку та прогресування злоякісних новоутворень.

З'ясування молекулярних основ балансу інгібування/стимулювання опіоїдної чутливості є важливим завданням для майбутніх досліджень у галузі молекулярної фізіології та фармакології болю.

ВИСНОВКИ

1. Прикладання ендogenousного агоністу опіоїдних рецепторів – ЛЕК до нейронів СГ призводить інгібування P2X3-опосередкованих струмів залежно від концентрації ЛЕК та часу прикладання. Це свідчить про те, що кінетика зв'язування ЛЕК з опіоїдними рецепторами, а не швидкість передачі внутрішньоклітинного сигналу є лімітуючим фактором у інгібуванні P2X3-рецепторів.
2. Збільшення часу між аплікаціями агоніста P2X3-рецепторів та тривале прикладання ЛЕК (від 9 до 20 хв) не впливає 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 відновлення рецепторів з десенситизованого стану.
3. Аплікація селективного антагоніста MOR – CTOP на тлі дії ЛЕК повністю усуває інгібуючий ефект опіоїда. Це вказує на те, що опіоїдно кероване інгібування P2X3-струмів у нейронах СГ опосередковано активацією MOR.
4. Попередня інкубація нейронів СГ з антагоністом опіоїдних рецепторів – налоксоном, призводить до посилення інгібуючої дії ЛЕК на P2X3-рецептори. Однак, зворотний обмін агоніста опіоїдних рецепторів на антагоніст у високій концентрації, викриває замаскований стимулюючий вплив опіоїдів на P2X3-струми. Цей ефект пов'язаний із специфічним впливом налоксону на G-білки опіоїдних рецепторів.
5. ЛЕК-індукована активація чутливих до RTX $G_{i/o}$ -білків і нечутливих G_q -білків μ - опіоїдних рецепторів призводить до різкого наростання Ca^{2+} транзйенту в контролі. Проте інкубація нейронів з RTX та викликане ним

блокування $G_{i/o}$ -білків зменшує інтенсивність вивільнення іонів Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо. Отже, викликаний ЛЕК реліз іонів Ca^{2+} опосередковується активацією як $G_{i/o}$ -, так і G_q -білками опіюїдних рецепторів.

6. Активація опіюїдних рецепторів ЛЕК, викликає два протилежно спрямовані ефекти на P2X3-рецептори. Ці ефекти реалізуються різними G-білками, проте обидва опосередковані активацією PLC.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Jarvis M. F. Contributions of P2X3 homomeric and heteromeric channels to acute and chronic pain / M. F. Jarvis // *Expert. Opin. Ther. Targets.* – 2003. – № 7 (4). – P. 513-522.
2. McGaraughty S. Antinociceptive properties of a non-nucleotide P2X3/P2X2/3 receptor antagonist / S. McGaraughty, M. F. Jarvis // *Drug News Perspect.* – 2005. – № 18 (8). – P. 501-507.
3. Свердлов Ю. Современные проблемы боли / Свердлов Ю. // *Медицинский научный и учебно-методический журнал.* — 2001. — Vol. 1. — P. 31—40.
4. Diverse immunocytochemical expression of opioid receptors in electrophysiologically defined cells of rat dorsal root ganglia / K.K. Rau, R.M. Caudle, B.Y. Cooper [et al.] // *J. Chem. Neuroanat.* – 2005. – № 29 (4). – P. 255-264.
5. Dunn P. M. P2X receptors in peripheral neurons / P.M. Dunn, Y Zhong, G. Burnstock // *Prog. Neurobiol.* – 2001. – № 65 (2). – P. 107-134.
6. Stein C. Opioid receptors on peripheral sensory neurons / C.Stein // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2003. – № 521. – P. 69-76.
7. Mu opioid receptors and analgesia at the site of a peripheral nerve injury / W.Truong, C.Cheng, Q.Xu [et al.] // *Ann. Neurol.* – 2003. – № 53 (3). – P. 366-375.
8. Свердлов Ю. Хроническая боль / Ю.Свердлов, М.Кушелин // *Медицинский научный и учебно-методический журнал.* — 2005. — Vol. 3. — P. 47—56.
9. Burnstock G. Evolutionary origins of the purinergic signalling system / G. Burnstock, A. Verkhratsky // *Acta Physiol (Oxf)* – 2009. – № 195 (4). – P. 415-447.

10. Burnstock G. Purinergic nerves / G. Burnstock // *Pharmacol. Rev.* – 1972. – № 24 (3). – P. 509-581.
11. Extracellular ATP is a central signaling molecule in plant stress responses / Y. Cao, K. Tanaka, C. T. Nguyen [et al.] // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2014. – № 20. – P. 82-87.
12. Overview of the P2 receptors / J. M. Boeynaems, D. Communi, N. S. Gonzalez [et al.] // *Semin. Thromb. Hemost.* – 2005. – № 31 (2). – P. 139-149.
13. The rat adenine receptor: pharmacological characterization and mutagenesis studies to investigate its putative ligand binding site / M. Knospe, C. E. Muller, P. Rosa [et al.] // *Purinergic. Signal.* – 2013. – № 9 (3). – P. 367-381.
14. Ralevic V. Receptors for purines and pyrimidines / V. Ralevic, G. Burnstock // *Pharmacol. Rev.* – 1998. – № 50 (3). – P. 413-492.
15. Purinergic regulation of acetylcholine release / J. A. Ribeiro, R. A. Cunha, P. Correia-de-Sa [et al.] // *Prog. Brain Res.* – 1996. – № 109. – P. 231-241.
16. Burnstock G. Historical review: ATP as a neurotransmitter / G. Burnstock // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2006. – № 27 (3). – P. 166-176.
17. North R. A. Molecular physiology of P2X receptors / R. A. North // *Physiol Rev.* – 2002. – № 82 (4). – P. 1013-1067.
18. P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels / A. Nicke, H. G. Baumert, J. Rettinger [et al.] // *EMBO J.* – 1998. – № 17 (11). – P. 3016-3028.
19. Egan T. M. Molecular structure of P2X receptors / T. M. Egan, J. A. Cox, M. M. Voigt // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2004. – № 4 (8). – P. 821-829.
20. Bean B. P. ATP-activated channels in rat and bullfrog sensory neurons: current-voltage relation and single-channel behavior / B. P. Bean, C. A. Williams, P. W. Ceelen // *J. Neurosci.* – 1990. – № 10 (1). – P. 11-19.

21. Ding S. Single channel properties of P2X2 purinoceptors / S. Ding, F. Sachs // J. Gen. Physiol – 1999. – № 113 (5). – P. 695-720.

22. ADP is not an agonist at P2X(1) receptors: evidence for separate receptors stimulated by ATP and ADP on human platelets / M. P. Mahaut-Smith, S. J. Ennion, M. G. Rolf [et al.] // Br. J. Pharmacol. – 2000. – № 131 (1). – P. 108-114.

23. Lack of evidence for functional ADP-activated human P2X1 receptors supports a role for ATP during hemostasis and thrombosis / C. Vial, S. J. Pitt, J. Roberts [et al.] // Blood – 2003. – № 102 (10). – P. 3646-3651.

24. Effects of diadenosine polyphosphates (Ap(n)As) and adenosine polyphospho guanosines (Ap(n)Gs) on rat mesenteric artery P2X receptor ion channels / C.J.Lewis, D.P.Gitterman, H.Schluter [et al.] // Br. J. Pharmacol. – 2000. – № 129 (1). – P. 124-130.

25. Ralevic V. Receptors for purines and pyrimidines / V. Ralevic, G. Burnstock // Pharmacol. Rev. – 1998. – № 50 (3). – P. 413-492.

26. International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits / B. S. Khakh, G. Burnstock, C. Kennedy [et al.] // Pharmacol. Rev. – 2001. – № 53 (1). – P. 107-118.

27. The role of purinergic receptors in stem cell differentiation / C. Kaebisch, D. Schipper, P. Babczyk [et al.] // Comput. Struct. Biotechnol. J. – 2015. – № 13. – P. 75-84.

28. Bland-Ward P.A. Acute nociception mediated by hindpaw P2X receptor activation in the rat / P. A. Bland-Ward, P. P. Humphrey // Br. J. Pharmacol. – 1997. – № 122 (2). – P. 365-371.

29. Modulation of BzATP and formalin induced nociception: attenuation by the P2X receptor antagonist, TNP-ATP and enhancement by the P2X(3) allosteric

modulator, cibacron blue / M. F. Jarvis, C. T. Wismer, E. Schweitzer [et al.] // Br. J. Pharmacol. – 2001. – № 132 (1). – P. 259-269.

30. Bleehen T. Observations on the algogenic actions of adenosine compounds on the human blister base preparation / T. Bleehen, C. A. Keele // Pain – 1977. – № 3 (4). – P. 367-377.

31. Adenosine triphosphate-evoked vascular changes in human skin: mechanism of action / A. A. Coutts, J. L. Jorizzo, R. A. Eady [et al.] // Eur. J. Pharmacol. – 1981. – № 76 (4). – P. 391-401.

32. ATP in human skin elicits a dose-related pain response which is potentiated under conditions of hyperalgesia / S. G. Hamilton, J. Warburton, A. Bhattacharjee [et al.] // Brain – 2000. – № 123 (Pt 6). – P. 1238-1246.

33. Wirkner K. P2X3 receptor involvement in pain states / K. Wirkner, B. Sperlagh, P. Illes // Mol. Neurobiol. – 2007. – № 36 (2). – P. 165-183.

34. Immunohistochemical study of the P2X2 and P2X3 receptor subunits in rat and monkey sensory neurons and their central terminals / L. Vulchanova, M. S. Riedl, S. J. Shuster [et al.] // Neuropharmacology – 1997. – № 36 (9). – P. 1229-1242.

35. Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission / G. Burnstock // Physiol Rev. – 2007. – № 87 (2). – P. 659-797.

36. P2X3 is expressed by DRG neurons that terminate in inner lamina II / L. Vulchanova, M. S. Riedl, S. J. Shuster [et al.] // Eur. J. Neurosci. – 1998. – № 10 (11). – P. 3470-3478.

37. Bradbury E. J. The expression of P2X3 purinoreceptors in sensory neurons: effects of axotomy and glial-derived neurotrophic factor / E. J. Bradbury, G. Burnstock, S. B. McMahon // Mol. Cell Neurosci. – 1998. – № 12 (4-5). – P. 256-268.

38. Dickenson A. H. Recent advances in the physiology and pharmacology of pain: plasticity and its implications for clinical analgesia / A. H. Dickenson // J. Psychopharmacol. – 1991. – № 5 (4). – P. 342-351.
39. Analgesic profile of intrathecal P2X(3) antisense oligonucleotide treatment in chronic inflammatory and neuropathic pain states in rats / P. Honore, K. Kage, J. Mikusa [et al.] // Pain – 2002. – № 99 (1-2). – P. 11-19.
40. Immunocytochemical localization of P2X3 purinoceptors in sensory neurons in naive rats and following neuropathic injury / S. D. Novakovic, L. C. Kassotakis, I. B. Oglesby [et al.] // Pain – 1999. – № 80 (1-2). – P. 273-282.
41. North R. A. P2X3 receptors and peripheral pain mechanisms / R. A. North // J. Physiol – 2004. – № 554 (Pt 2). – P. 301-308.
42. P2X2 knockout mice and P2X2/P2X3 double knockout mice reveal a role for the P2X2 receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP / D. A. Cockayne, P. M. Dunn, Y. Zhong [et al.] // J. Physiol – 2005. – № 567 (Pt 2). – P. 621-639.
43. Ford A. P. The therapeutic promise of ATP antagonism at P2X3 receptors in respiratory and urological disorders / A. P. Ford, B. J. Undem // Front Cell Neurosci. – 2013. – № 7. – P. P.267.
44. Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons / C. Lewis, S. Neidhart, C. Holy [et al.] // Nature – 1995. – № 377 (6548). – P. 432-435.
45. Virginio C. Calcium permeability and block at homomeric and heteromeric P2X2 and P2X3 receptors, and P2X receptors in rat nodose neurones / C. Virginio, R. A. North, A. Surprenant // J. Physiol – 1998. – № 510 (Pt 1). – P. 27-35.
46. Cook S. P. A memory for extracellular Ca²⁺ by speeding recovery of P2X receptors from desensitization / S. P. Cook, K. D. Rodland, E. W. McCleskey // J. Neurosci. – 1998. – № 18 (22). – P. 9238-9244.

47. Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X1, P2X3, and heteromeric P2X2/3 receptors / C. Virginio, G. Robertson, A. Surprenant [et al.] // *Mol. Pharmacol.* – 1998. – № 53 (6). – P. 969-973.
48. Regulation of the pH sensitivity of human P2X receptors by N-linked glycosylation / K. Wirkner, D. Stanchev, D. Milius [et al.] // *J. Neurochem.* – 2008. – № 107 (5). – P. 1216-1224.
49. P2X3 receptor gating near normal body temperature / V. Khmyz, O. Maximyuk, V. Teslenko [et al.] // *Pflugers Arch.* – 2008. – № 456 (2). – P. 339-347.
50. Cook S. P. Desensitization, recovery and Ca(2+)-dependent modulation of ATP-gated P2X receptors in nociceptors / S. P. Cook, E. W. McCleskey // *Neuropharmacology* – 1997. – № 36 (9). – P. 1303-1308.
51. A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons / C. C. Chen, A. N. Akopian, L. Sivilotti [et al.] // *Nature* – 1995. – № 377 (6548). – P. 428-431.
52. Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes / B. R. Bianchi, K. J. Lynch, E. Touma [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 1999. – № 376 (1-2). – P. 127-138.
53. Pharmacology of P2X channels / J. R. Gever, D. A. Cockayne, M. P. Dillon [et al.] // *Pflugers Arch.* – 2006. – № 452 (5). – P. 513-537.
54. Li C. Acid pH augments excitatory action of ATP on a dissociated mammalian sensory neuron / C. Li, R. W. Peoples, F. F. Weight // *Neuroreport* – 1996. – № 7 (13). – P. 2151-2154.
55. Allosteric modulation and accelerated resensitization of human P2X(3) receptors by cibacron blue / K. Alexander, W. Niforatos, B. Bianchi [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1999. – № 291 (3). – P. 1135-1142.

56. Ethanol differentially affects ATP-gated P2X(3) and P2X(4) receptor subtypes expressed in *Xenopus* oocytes / D. L. Davies, A. A. Kochegarov, S. T. Kuo [et al.] // *Neuropharmacology* – 2005. – № 49 (2). – P. 243-253.
57. Wildman S. S. Modulatory activity of extracellular H⁺ and Zn²⁺ on ATP-responses at rP2X1 and rP2X3 receptors / S. S. Wildman, B. F. King, G. Burnstock // *Br. J. Pharmacol.* – 1999. – № 128 (2). – P. 486-492.
58. Diinosine pentaphosphate: an antagonist which discriminates between recombinant P2X(3) and P2X(2/3) receptors and between two P2X receptors in rat sensory neurones / P. M. Dunn, M. Liu, Y. Zhong [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2000. – № 130 (6). – P. 1378-1384.
59. The P2X3 antagonist P1, P5-di[inosine-5'] pentaphosphate binds to the desensitized state of the receptor in rat dorsal root ganglion neurons / K. K. Ford, M. Matchett, J. E. Krause [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2005. – № 315 (1). – P. 405-413.
60. A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X3 and P2X2/3 receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat / M. F. Jarvis, E. C. Burgard, S. McGaraughty [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* – 2002. – № 99 (26). – P. 17179-17184.
61. PPADS, a novel functionally selective antagonist of P2 purinoceptor-mediated responses / G. Lambrecht, T. Friebe, U. Grimm [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 1992. – № 217 (2-3). – P. 217-219.
62. Novel peptide from spider venom inhibits P2X3 receptors and inflammatory pain / E. V. Grishin, G. A. Savchenko, A. A. Vassilevski [et al.] // *Ann. Neurol.* – 2010. – № 67 (5). – P. 680-683.
63. Zhao Q. Regulation of ATP-gated P2X receptors by phosphoinositides / Q. Zhao, D. E. Logothetis, P. Seguela // *Pflugers Arch.* – 2007. – № 455 (1). – P. 181-185.

64. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels / C. Coddou, Z. Yan, T. Obsil [et al.] // *Pharmacol. Rev.* – 2011. – № 63 (3). – P. 641-683.
65. Subtype-specific regulation of P2X3 and P2X2/3 receptors by phosphoinositides in peripheral nociceptors / G. Mo, L. P. Bernier, Q. Zhao [et al.] // *Mol. Pain* – 2009. – № 5. – P. P.47.
66. PIP(2) regulates the ionic current of P2X receptors and P2X(7) receptor-mediated cell death / Q. Zhao, M. Yang, A. T. Ting [et al.] // *Channels (Austin.)* – 2007. – № 1 (1). – P. 46-55.
67. Bernier L. P. Post-translational regulation of P2X receptor channels: modulation by phospholipids / L. P. Bernier, A. R. Ase, P. Seguela // *Front Cell Neurosci.* – 2013. – № 7. – P. P.226.
68. Facilitation by 5-hydroxytryptamine of ATP-activated current in rat pheochromocytoma cells / K. Nakazawa, K. Inoue, S. Koizumi [et al.] // *Pflugers Arch.* – 1994. – № 427 (5-6). – P. 492-499.
69. Nakazawa K. ATP-activated current and its interaction with acetylcholine-activated current in rat sympathetic neurons / K. Nakazawa // *J. Neurosci.* – 1994. – № 14 (2). – P. 740-750.
70. Molecular properties of P2X receptors / J. A. Roberts, C. Vial, H. R. Digby [et al.] // *Pflugers Arch.* – 2006. – № 452 (5). – P. 486-500.
71. Inflammatory mediators potentiate ATP-gated channels through the P2X(3) subunit / M. Paukert, R. Osteroth, H. S. Geisler [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – № 276 (24). – P. 21077-21082.
72. Regulation of human recombinant P2X3 receptors by ecto-protein kinase C / K. Wirkner, D. Stanchev, L. Koles [et al.] // *J. Neurosci.* – 2005. – № 25 (34). – P. 7734-7742.
73. A critical role of the cAMP sensor Epac in switching protein kinase signalling in prostaglandin E2-induced potentiation of P2X3 receptor currents in

inflamed rats / C. Wang, Y. Gu, G. W. Li [et al.] // J. Physiol – 2007. – № 584 (Pt 1). – P. 191-203.

74. Inflammatory mediators potentiate ATP-gated channels through the P2X(3) subunit / M. Paukert, R. Osteroth, H. S. Geisler [et al.] // J. Biol. Chem. – 2001. – № 276 (24). – P. 21077-21082.

75. Brown D. A. Protein kinase C regulation of P2X3 receptors is unlikely to involve direct receptor phosphorylation / D. A. Brown, D. I. Yule // Biochim. Biophys. Acta – 2007. – № 1773 (2). – P. 166-175.

76. Bie B. H. Inhibition of P2X receptor-mediated inward current by protein kinase C in small-diameter dorsal root ganglion neurons of adult rats / B. H. Bie, Y. H. Zhang, Z. Q. Zhao // Neurosci. Bull. – 2009. – № 25 (4). – P. 179-186.

77. The Cdk5 kinase downregulates ATP-gated ionotropic P2X3 receptor function via serine phosphorylation / A. Nair, M. Simonetti, E. Fabbretti [et al.] // Cell Mol. Neurobiol. – 2010. – № 30 (4). – P. 505-509.

78. Neutralization of nerve growth factor induces plasticity of ATP-sensitive P2X3 receptors of nociceptive trigeminal ganglion neurons / M. D'Arco, R. Giniatullin, M. Simonetti [et al.] // J. Neurosci. – 2007. – № 27 (31). – P. 8190-8201.

79. An intracellular motif of P2X(3) receptors is required for functional cross-talk with GABA(A) receptors in nociceptive DRG neurons / E. Toulme, D. Blais, C. Leger [et al.] // J. Neurochem. – 2007. – № 102 (4). – P. 1357-1368.

80. Sokolova E. Negative cross talk between anionic GABAA and cationic P2X ionotropic receptors of rat dorsal root ganglion neurons / E. Sokolova, A. Nistri, R. Giniatullin // J. Neurosci. – 2001. – № 21 (14). – P. 4958-4968.

81. Tyrosine phosphorylation of HSP90 within the P2X7 receptor complex negatively regulates P2X7 receptors / E. Adinolfi, M. Kim, M. T. Young [et al.] // J. Biol. Chem. – 2003. – № 278 (39). – P. 37344-37351.

82. Hamilton S. G. The effects of inflammation and inflammatory mediators on nociceptive behaviour induced by ATP analogues in the rat / S. G. Hamilton, A. Wade, S. B. McMahon // Br. J. Pharmacol. – 1999. – № 126 (1). – P. 326-332.
83. Gordon J. L. Extracellular ATP: effects, sources and fate / J. L. Gordon // Biochem. J. – 1986. – № 233 (2). – P. 309-319.
84. Inorganic pyrophosphate generation from adenosine triphosphate by cell-free human synovial fluid / W. Park, I. Masuda, A. Cardenal-Escarcena [et al.] // J. Rheumatol. – 1996. – № 23 (4). – P. 665-671.
85. Bodin P. Increased release of ATP from endothelial cells during acute inflammation / P. Bodin, G. Burnstock // Inflamm. Res. – 1998. – № 47 (8). – P. 351-354.
86. Reeh P. W. Tissue acidosis in nociception and pain / P. W. Reeh, K. H. Steen // Prog. Brain Res. – 1996. – № 113. – P. 143-151.
87. Zimmermann K. ATP can enhance the proton-induced CGRP release through P2Y receptors and secondary PGE(2) release in isolated rat dura mater / K. Zimmermann, P. W. Reeh, B. Averbeck // Pain – 2002. – № 97 (3). – P. 259-265.
88. Effects of extracellular pH on agonism and antagonism at a recombinant P2X2 receptor / B. F. King, S. S. Wildman, L. E. Ziganshina [et al.] // Br. J. Pharmacol. – 1997. – № 121 (7). – P. 1445-1453.
89. Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice / D. A. Cockayne, S. G. Hamilton, Q. M. Zhu [et al.] // Nature – 2000. – № 407 (6807). – P. 1011-1015.
90. Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X3 receptors / V. Souslova, P. Cesare, Y. Ding [et al.] // Nature – 2000. – № 407 (6807). – P. 1015-1017.
91. Functional downregulation of P2X3 receptor subunit in rat sensory neurons reveals a significant role in chronic neuropathic and inflammatory pain / J.

Barclay, S. Patel, G. Dorn [et al.] // J. Neurosci. – 2002. – № 22 (18). – P. 8139-8147.

92. Antinociceptive effect of intrathecally administered P2-purinoceptor antagonists in rats / B. Driessen, W. Reimann, N. Selve [et al.] // Brain Res. – 1994. – № 666 (2). – P. 182-188.

93. Ambalavanar R. Trigeminal P2X3 receptor expression differs from dorsal root ganglion and is modulated by deep tissue inflammation / R. Ambalavanar, M. Moritani, D. Dessem // Pain – 2005. – № 117 (3). – P. 280-291.

94. Hu H. Z. Substance P potentiates ATP-activated currents in rat primary sensory neurons / H. Z. Hu, Z. W. Li // Brain Res. – 1996. – № 739 (1-2). – P. 163-168.

95. Deep tissue inflammation upregulates neuropeptides and evokes nociceptive behaviors which are modulated by a neuropeptide antagonist / R. Ambalavanar, M. Moritani, A. Moutanni [et al.] // Pain – 2006. – № 120 (1-2). – P. 53-68.

96. Delayed upregulation of ATP P2X3 receptors of trigeminal sensory neurons by calcitonin gene-related peptide / E. Fabbretti, M. D'Arco, A. Fabbro [et al.] // J. Neurosci. – 2006. – № 26 (23). – P. 6163-6171.

97. Mechanisms underlying enhanced P2X receptor-mediated responses in the neuropathic pain state / Y. Chen, G. W. Li, C. Wang [et al.] // Pain – 2005. – № 119 (1-3). – P. 38-48.

98. Investigation into the role of P2X(3)/P2X(2/3) receptors in neuropathic pain following chronic constriction injury in the rat: an electrophysiological study / C. J. Sharp, A. J. Reeve, S. D. Collins [et al.] // Br. J. Pharmacol. – 2006. – № 148 (6). – P. 845-852.

99. Downregulation of P2X3 receptor-dependent sensory functions in A/J inbred mouse strain / M. Tsuda, Y. Shigemoto-Mogami, S. Ueno [et al.] // Eur. J. Neurosci. – 2002. – № 15 (9). – P. 1444-1450.

100. Stein C. Peripheral mechanisms of opioid analgesia / C. Stein // *Anesth. Analg.* – 1993. – № 76 (1). – P. 182-191.
101. Stein C. Modulation of peripheral sensory neurons by the immune system: implications for pain therapy / C. Stein, H. Machelska // *Pharmacol. Rev.* – 2011. – № 63 (4). – P. 860-881.
102. 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail / A. D. Corbett, G. Henderson, A. T. McKnight [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2006. – № 147 Suppl 1. – P. P.S153-S162.
103. van Rijn R. M. Opioid-receptor-heteromer-specific trafficking and pharmacology / R. M. van Rijn, J. L. Whistler, M. Waldhoer // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2010. – № 10 (1). – P. 73-79.
104. Kieffer B. L. Opioid receptors: from binding sites to visible molecules in vivo / B. L. Kieffer, C. J. Evans // *Neuropharmacology* – 2009. – № 56 Suppl 1. – P. 205-212.
105. Differential effects of CB1 and opioid agonists on two populations of adult rat dorsal root ganglion neurons / I. A. Khasabova, C. Harding-Rose, D. A. Simone [et al.] // *J. Neurosci.* – 2004. – № 24 (7). – P. 1744-1753.
106. Chronic morphine use does not induce peripheral tolerance in a rat model of inflammatory pain / C. Zollner, S. A. Mousa, O. Fischer [et al.] // *J. Clin. Invest* – 2008. – № 118 (3). – P. 1065-1073.
107. Gold M. S. DAMGO inhibits prostaglandin E2-induced potentiation of a TTX-resistant Na⁺ current in rat sensory neurons in vitro / M. S. Gold, J. D. Levine // *Neurosci. Lett.* – 1996. – № 212 (2). – P. 83-86.
108. Opioids inhibit purinergic nociceptors in the sensory neurons and fibres of rat via a G protein-dependent mechanism / I. Chizhnikov, Y. Yudin, N. Mamenko [et al.] // *Neuropharmacology* – 2005. – № 48 (5). – P. 639-647.

109. Opioidergic modulation of excitability of rat trigeminal root ganglion neuron projections to the superficial layer of cervical dorsal horn / M. Takeda, T. Tanimoto, M. Ikeda [et al.] // *Neuroscience* – 2004. – № 125 (4). – P. 995-1008.
110. Stein C. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids / C. Stein, M. Schafer, H. Machelska // *Nat. Med.* – 2003. – № 9 (8). – P. 1003-1008.
111. Zollner C. Opioids / C. Zollner, C. Stein // *Handb. Exp. Pharmacol.* – 2007. – № (177). – P. 31-63.
112. The endomorphin system and its evolving neurophysiological role / J. Fichna, A. Janecka, J. Costentin [et al.] // *Pharmacol. Rev.* – 2007. – № 59 (1). – P. 88-123.
113. Busch-Dienstfertig M. Opioid receptors and opioid peptide-producing leukocytes in inflammatory pain--basic and therapeutic aspects / M. Busch-Dienstfertig, C. Stein // *Brain Behav. Immun.* – 2010. – № 24 (5). – P. 683-694.
114. Peptide plasticity in primary sensory neurons and spinal cord during adjuvant-induced arthritis in the rat: an immunocytochemical and in situ hybridization study / L. Calza, M. Pozza, M. Zanni [et al.] // *Neuroscience* – 1998. – № 82 (2). – P. 575-589.
115. Expression of preproenkephalin A gene and presence of Met-enkephalin in dorsal root ganglia of the adult rat / M. Pohl, E. Collin, S. Bourgoin [et al.] // *J. Neurochem.* – 1994. – № 63 (4). – P. 1226-1234.
116. Local peripheral opioid effects and expression of opioid genes in the spinal cord and dorsal root ganglia in neuropathic and inflammatory pain / I. Obara, J. R. Parkitna, M. Korostynski [et al.] // *Pain* – 2009. – № 141 (3). – P. 283-291.
117. Therapeutic efficacy in experimental polyarthritis of viral-driven enkephalin overproduction in sensory neurons / J. Braz, C. Beaufour, A. Coutaux [et al.] // *J. Neurosci.* – 2001. – № 21 (20). – P. 7881-7888.

118. Methionine-enkephalin-and Dynorphin A-release from immune cells and control of inflammatory pain / P. J. Cabot, L. Carter, M. Schafer [et al.] // Pain – 2001. – № 93 (3). – P. 207-212.

119. Gene expression and localization of opioid peptides in immune cells of inflamed tissue: functional role in antinociception / R. Przewlocki, A. H. Hassan, W. Lason [et al.] // Neuroscience – 1992. – № 48 (2). – P. 491-500.

120. Peripheral mechanisms of pain and analgesia / C. Stein, J. D. Clark, U. Oh [et al.] // Brain Res. Rev. – 2009. – № 60 (1). – P. 90-113.

121. Yaksh T. L. Substance P release from knee joint afferent terminals: modulation by opioids / T. L. Yaksh // Brain Res. – 1988. – № 458 (2). – P. 319-324.

122. Anti-inflammatory properties of the mu opioid receptor support its use in the treatment of colon inflammation / D. Philippe, L. Dubuquoy, H. Groux [et al.] // J. Clin. Invest – 2003. – № 111 (9). – P. 1329-1338.

123. Inhibitory action of endomorphin-1 on sensory neuropeptide release and neurogenic inflammation in rats and mice / R. Borzsei, G. Pozsgai, T. Bagoly [et al.] // Neuroscience – 2008. – № 152 (1). – P. 82-88.

124. Intraarticular morphine versus dexamethasone in chronic arthritis / A. Stein, A. Yassouridis, C. Szopko [et al.] // Pain – 1999. – № 83 (3). – P. 525-532.

125. Pharmacokinetics of intra-articular morphine in horses with lipopolysaccharide-induced synovitis / C. Lindegaard, A. B. Frost, M. H. Thomsen [et al.] // Vet. Anaesth. Analg. – 2010. – № 37 (2). – P. 186-195.

126. Morphine as a drug for stress ulcer prevention and healing in the stomach / C. H. Cho, K. K. Wu, S. Wu [et al.] // Eur. J. Pharmacol. – 2003. – № 460 (2-3). – P. 177-182.

127. 3D-wound healing model: influence of morphine and solid lipid nanoparticles / S. Kuchler, N. B. Wolf, S. Heilmann [et al.] // J. Biotechnol. – 2010. – № 148 (1). – P. 24-30.

128. Opioids and the skin--where do we stand? / P. L. Bigliardi, D. J. Tobin, C. Gaveriaux-Ruff [et al.] // *Exp. Dermatol.* – 2009. – № 18 (5). – P. 424-430.

129. Opioids heal ischemic wounds in the rat / T. Poonawala, B. K. Levay-Young, R. P. Hebbel [et al.] // *Wound. Repair Regen.* – 2005. – № 13 (2). – P. 165-174.

130. A Phase II, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled crossover study of CJC-1008--a long-acting, parenteral opioid analgesic--in the treatment of postherpetic neuralgia / M. S. Wallace, D. Moulin, A. J. Clark [et al.] // *J. Opioid. Manag.* – 2006. – № 2 (3). – P. 167-173.

131. Clinical trial: asimadoline in the treatment of patients with irritable bowel syndrome / A. W. Mangel, J. D. Bornstein, L. R. Hamm [et al.] // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 2008. – № 28 (2). – P. 239-249.

132. Hanna M. H. Randomized, double-blind study of the analgesic efficacy of morphine-6-glucuronide versus morphine sulfate for postoperative pain in major surgery / M. H. Hanna, K. M. Elliott, M. Fung // *Anesthesiology* – 2005. – № 102 (4). – P. 815-821.

133. Roques B. P. Novel approaches to targeting neuropeptide systems / B. P. Roques // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2000. – № 21 (12). – P. 475-483.

134. Frithz G. Pindolol once daily in the treatment of hypertension / G. Frithz // *Ups. J. Med. Sci.* – 1976. – № 81 (3). – P. 151-154.

135. The Selective Monoacylglycerol Lipase Inhibitor MJN110 Produces Opioid-Sparing Effects in a Mouse Neuropathic Pain Model / J. L. Wilkerson, M. J. Niphakis, T. W. Grim [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2016. – № 357 (1). – P. 145-156.

136. Protein kinase C-mediated mu-opioid receptor phosphorylation and desensitization in rats, and its prevention during early diabetes / S. A. Mousa, M. Shaqura, J. Winkler [et al.] // *Pain* – 2016. – № 157 (4). – P. 910-921.

137. Garg S. Food Proteins as Source of Opioid Peptides-A Review / S. Garg, K. Nurgali, V. Mishra // Curr. Med. Chem. – 2016. – № . – P.
138. Park Y. W. Bioactive Peptides in Milk and Dairy Products: A Review / Y. W. Park, M. S. Nam // Korean J. Food Sci. Anim Resour. – 2015. – № 35 (6). – P. 831-840.
139. Del Mar L. P. Capsaicin preferentially affects small-diameter acutely isolated rat dorsal root ganglion cell bodies / L. P. Del Mar, C. G. Cardenas, R. S. Scroggs // Exp. Brain Res. – 1996. – № 111 (1). – P. 30-34.
140. Harper A. A. Electrical properties of rat dorsal root ganglion neurones with different peripheral nerve conduction velocities / A. A. Harper, S. N. Lawson // J. Physiol – 1985. – № 359. – P. 47-63.
141. Subclassified acutely dissociated cells of rat DRG: histochemistry and patterns of capsaicin-, proton-, and ATP-activated currents / J. C. Petruska, J. Napaporn, R. D. Johnson [et al.] // J. Neurophysiol. – 2000. – № 84 (5). – P. 2365-2379.
142. Harper A. A. Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones / A. A. Harper, S. N. Lawson // J. Physiol – 1985. – № 359. – P. 31-46.
143. Scroggs R. S. Calcium current variation between acutely isolated adult rat dorsal root ganglion neurons of different size / R. S. Scroggs, A. P. Fox // J. Physiol – 1992. – № 445. – P. 639-658.
144. Cardenas C. G. Variation in serotonergic inhibition of calcium channel currents in four types of rat sensory neurons differentiated by membrane properties / C. G. Cardenas, L. P. Del Mar, R. S. Scroggs // J. Neurophysiol. – 1995. – № 74 (5). – P. 1870-1879.
145. Varon.S. Neuronal cell isolation and identification / Tissue and organ cultures in neurobiology. / Varon.S. // – 1977. – № . – P. 237-261.

146. Bulloch K. The derivation and characterization of neuronal cell lines from rat and mouse brain / K. Bulloch, W. B. Stallcup, M. Cohn // Brain Res. – 1977. – № 135 (1). – P. 25-36.
147. Bulloch.K. The derivation and characterization of neuronal cell lines from rat and mouse brain / K.Bulloch, W.B Stallcup, M.Cohn // Brain Res. – 1977. – № 135, N1. – P. 25-36.
148. Nishi R. Two components from eye tissue that differentially stimulate the growth and development of ciliary ganglion neurons in cell culture / R. Nishi, D. K. Berg // J. Neurosci. – 1981. – № 1 (5). – P. 505-513.
149. Vlodavsky I. Morphological appearance, growth behavior and migratory activity of human tumor cells maintained on extracellular matrix versus plastic / I. Vlodavsky, G. M. Lui, D. Gospodarowicz // Cell – 1980. – № 19 (3). – P. 607-616.
150. Kostyuk P. G. Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons-I. Sodium currents / P. G. Kostyuk, N. S. Veselovsky, A. Y. Tsyndrenko // Neuroscience – 1981. – № 6 (12). – P. 2423-2430.
151. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches / O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher [et al.] // Pflugers Arch. – 1981. – № 391 (2). – P. 85-100.
152. Neher E. The patch clamp technique / E. Neher, B. Sakmann // Sci. Am. – 1992. – № 266 (3). – P. 44-51.
153. Krishtal O. A. A receptor for protons in the nerve cell membrane / O. A. Krishtal, V. I. Pidoplichko // Neuroscience – 1980. – № 5 (12). – P. 2325-2327.
154. Gerevich Z. Metabotropic P2Y1 receptors inhibit P2X3 receptor-channels in rat dorsal root ganglion neurons / Z. Gerevich, C. Muller, P. Illes // Eur. J. Pharmacol. – 2005. – № 521 (1-3). – P. 34-38.

155. Metabotropic P2Y receptors inhibit P2X3 receptor-channels via G protein-dependent facilitation of their desensitization / Z. Gerevich, Z. Zadori, C. Muller [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2007. – № 151 (2). – P. 226-236.
156. Dunn P. M. P2X receptors in peripheral neurons / P. M. Dunn, Y. Zhong, G. Burnstock // *Prog. Neurobiol.* – 2001. – № 65 (2). – P. 107-134.
157. Use-dependent inhibition of P2X3 receptors by nanomolar agonist / E. B. Pratt, T. S. Brink, P. Bergson [et al.] // *J. Neurosci.* – 2005. – № 25 (32). – P. 7359-7365.
158. Potassium channels and pain: present realities and future opportunities / M. Ocana, C. M. Cendan, E. J. Cobos [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2004. – № 500 (1-3). – P. 203-219.
159. Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation / C. Stein, A. H. Hassan, R. Przewlocki [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* – 1990. – № 87 (15). – P. 5935-5939.
160. Stein C. The control of pain in peripheral tissue by opioids / C. Stein // *N. Engl. J. Med.* – 1995. – № 332 (25). – P. 1685-1690.
161. Sirohi S. Mu-opioid receptor up-regulation and functional supersensitivity are independent of antagonist efficacy / S. Sirohi, P. Kumar, B. C. Yoburn // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2007. – № 323 (2). – P. 701-707.
162. Yoburn B. C. Modification of the response to opioid and nonopioid drugs by chronic opioid antagonist treatment / B. C. Yoburn, C. E. Inturrisi // *Life Sci.* – 1988. – № 42 (18). – P. 1689-1696.
163. Supersensitivity to opioid analgesics following chronic opioid antagonist treatment: relationship to receptor selectivity / B. C. Yoburn, S. Shah, K. Chan [et al.] // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 1995. – № 51 (2-3). – P. 535-539.

164. Agonists determine the pattern of G-protein activation in mu-opioid receptor-mediated supraspinal analgesia / P. Sanchez-Blazquez, P. Gomez-Serranillos, J. Garzon // *Brain Res. Bull.* – 2001. – № 54 (2). – P. 229-235.
165. Hudson B. D. Ligand- and heterodimer-directed signaling of the CB(1) cannabinoid receptor / B. D. Hudson, T. E. Hebert, M. E. Kelly // *Mol. Pharmacol.* – 2010. – № 77 (1). – P. 1-9.
166. Crain S. M. Antagonists of excitatory opioid receptor functions enhance morphine's analgesic potency and attenuate opioid tolerance/dependence liability / S. M. Crain, K. F. Shen // *Pain* – 2000. – № 84 (2-3). – P. 121-131.
167. Szucs M. Dual effects of DAMGO [D-Ala²,N-Me-Phe⁴,Gly⁵-ol]-enkephalin and CTAP (D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH₂) on adenylyl cyclase activity: implications for mu-opioid receptor Gs coupling / M. Szucs, K. Boda, A. R. Gintzler // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2004. – № 310 (1). – P. 256-262.
168. Sharma S. K. Opiate-dependent modulation of adenylate cyclase / S. K. Sharma, W. A. Klee, M. Nirenberg // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* – 1977. – № 74 (8). – P. 3365-3369.
169. Genetic alteration of phospholipase C beta3 expression modulates behavioral and cellular responses to mu opioids / W. Xie, G. M. Samoriski, J. P. McLaughlin [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* – 1999. – № 96 (18). – P. 10385-10390.
170. Rebecchi M. J. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C / M. J. Rebecchi, S. N. Pentyala // *Physiol Rev.* – 2000. – № 80 (4). – P. 1291-1335.
171. Control of P2X₃ channel function by metabotropic P2Y₂ utp receptors in primary sensory neurons / G. Mo, J. C. Peleshok, C. Q. Cao [et al.] // *Mol. Pharmacol.* – 2013. – № 83 (3). – P. 640-647.

172. Substance P sensitizes P2X3 in nociceptive trigeminal neurons / C. K. Park, J. H. Bae, H. Y. Kim [et al.] // J. Dent. Res. – 2010. – № 89 (10). – P. 1154-1159.

173. Rubovitch V. The mu opioid agonist DAMGO stimulates cAMP production in SK-N-SH cells through a PLC-PKC-Ca⁺⁺ pathway / V. Rubovitch, M. Gafni, Y. Sarne // Brain Res. Mol. Brain Res. – 2003. – № 110 (2). – P. 261-266.

174. Samways D. S. Opioid elevation of intracellular free calcium: possible mechanisms and physiological relevance / D. S. Samways, G. Henderson // Cell Signal. – 2006. – № 18 (2). – P. 151-161.

175. Painful purinergic receptors / D. Donnelly-Roberts, S. McGaraughty, C. C. Shieh [et al.] // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2008. – № 324 (2). – P. 409-415.

176. Comparison of adenosine triphosphate- and nicotine-activated inward currents in rat phaeochromocytoma cells / K. Nakazawa, K. Fujimori, A. Takanaka [et al.] // J. Physiol – 1991. – № 434. – P. 647-660.

177. Vial C. G-protein-coupled receptor regulation of P2X1 receptors does not involve direct channel phosphorylation / C. Vial, A. B. Tobin, R. J. Evans // Biochem. J. – 2004. – № 382 (Pt 1). – P. 101-110.

178. Potentiation of P2X1 ATP-gated currents by 5-hydroxytryptamine 2A receptors involves diacylglycerol-dependent kinases and intracellular calcium / A. R. Ase, R. Raouf, D. Belanger [et al.] // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2005. – № 315 (1). – P. 144-154.

179. The ATP-mediated fast current of rat dorsal root ganglion neurons is a novel effector for GABA(B) receptor activation / E. Sokolova, A. Nistri, R. Giniatullin // Neurosci. Lett. – 2003. – № 338 (3). – P. 181-184.

180. Akins P. T. Characterization of potassium currents in adult rat sensory neurons and modulation by opioids and cyclic AMP / P. T. Akins, E. W. McCleskey // Neuroscience – 1993. – № 56 (3). – P. 759-769.

181. Opioid agonists have different efficacy profiles for G protein activation, rapid desensitization, and endocytosis of mu-opioid receptors / S. L. Borgland, M. Connor, P. B. Osborne [et al.] // J. Biol. Chem. – 2003. – № 278 (21). – P. 18776-18784.

182. Mu-opioid receptors are located postsynaptically and endomorphin-1 inhibits voltage-gated calcium currents in premotor cardiac parasympathetic neurons in the rat nucleus ambiguus / M. Irnaten, S. A. Aicher, J. Wang [et al.] // Neuroscience – 2003. – № 116 (2). – P. 573-582.

183. Akins P. T. Characterization of potassium currents in adult rat sensory neurons and modulation by opioids and cyclic AMP / P. T. Akins, E. W. McCleskey // Neuroscience – 1993. – № 56 (3). – P. 759-769.

184. Opioid agonists have different efficacy profiles for G protein activation, rapid desensitization, and endocytosis of mu-opioid receptors / S.L.Borgland, M.Connor, P.B Osborne [et al.] // Biol. Chem. – 2003. – № 278 (21). – P. 18776-18784.

185. Mu-opioid receptors are located postsynaptically and endomorphin-1 inhibits voltage-gated calcium currents in premotor cardiac parasympathetic neurons in the rat nucleus ambiguus / M.Irnaten, S.A Aicher, J. Wang [et al.] // Neuroscience – 2003. – № 116 (2). – P. 573-582.

186. G-protein-gated potassium channels containing Kir3.2 and Kir3.3 subunits mediate the acute inhibitory effects of opioids on locus ceruleus neurons / M. Torrecilla, C. L. Marker, S. C. Cintora [et al.] // J. Neurosci. – 2002. – № 22 (11). – P. 4328-4334.

187. Morphine decreases the voltage sensitivity of slow sodium channels / B. V. Krylov, A. V. Derbenev, S. A. Podzorova [et al.] // Neurosci. Behav. Physiol – 2000. – № 30 (4). – P. 431-439.

188. Expression of mu-, delta-, and kappa-opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced

inflammation / R. R. Ji, Q. Zhang, P. Y. Law [et al.] // J. Neurosci. – 1995. – № 15 (12). – P. 8156-8166.

189. Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study / A. Mansour, C. A. Fox, S. Burke [et al.] // J. Comp Neurol. – 1994. – № 350 (3). – P. 412-438.

190. Corbett A. Opioid Receptors / A. Corbett, S. McKnight, G. Henderson – Bristol, UK: Tocris Cookson Inc, - 1999. № 3. – P. 1-9.

191. Ribeiro-Neto F. A. Pertussis toxin induces structural changes in G alpha proteins independently of ADP-ribosylation / F. A. Ribeiro-Neto, M. Rodbell // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A – 1989. – № 86 (8). – P. 2577-2581.

192. Time-dependent effects of in vivo pertussis toxin on morphine analgesia and G-proteins in mice / S. Shah, C. Breivogel, D. Selly [et al.] // Pharmacol. Biochem. Behav. – 1997. – № 56 (3). – P. 465-469.

193. Spinal and supraspinal effects of pertussis toxin on opioid analgesia / S. Shah, A. Duttaroy, T. Davis [et al.] // Pharmacol. Biochem. Behav. – 1994. – № 49 (3). – P. 773-776.

194. Chu L. F. Opioid-induced hyperalgesia in humans: molecular mechanisms and clinical considerations / L. F. Chu, M. S. Angst, D. Clark // Clin. J. Pain – 2008. – № 24 (6). – P. 479-496.

195. Angst M. S. Opioid-induced hyperalgesia: a qualitative systematic review / M. S. Angst, J. D. Clark // Anesthesiology – 2006. – № 104 (3). – P. 570-587.

196. Wu Z. Z. Differential sensitivity of N- and P/Q-type Ca²⁺ channel currents to a mu opioid in isolectin B4-positive and -negative dorsal root ganglion neurons / Z. Z. Wu, S. R. Chen, H. L. Pan // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2004. – № 311 (3). – P. 939-947.

197. Delmas P. Functional organization of PLC signaling microdomains in neurons / P. Delmas, M. Crest, D. A. Brown // Trends Neurosci. – 2004. – № 27 (1). – P. 41-47.
198. A distinct pool of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolae revealed by a nanoscale labeling technique / A. Fujita, J. Cheng, K. Tauchi-Sato [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A – 2009. – № 106 (23). – P. 9256-9261.
199. Increased response to morphine in mice lacking protein kinase C epsilon / P. M. Newton, J. A. Kim, A. J. McGeehan [et al.] // Genes Brain Behav. – 2007. – № 6 (4). – P. 329-338.
200. Signaling pathway of morphine induced acute thermal hyperalgesia in mice / N. Galeotti, G. B. Stefano, M. Guarna [et al.] // Pain – 2006. – № 123 (3). – P. 294-305.
201. 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail / A.D. Corbett, G. Henderson, A.T. McKnight // Br. J. Pharmacol. – 2006. – № 147 Suppl 1. – P. P.S153-S162.
202. Janson W. Peripheral opioid analgesia / W. Janson, C. Stein // Curr. Pharm. Biotechnol. – 2003. – № 4 (4). – P. 270-274.
203. Peripheral and preemptive opioid antinociception in a mouse visceral pain model / J. A. Reichert, R. S. Daughters, R. Rivard [et al.] // Pain – 2001. – № 89 (2-3). – P. 221-227.
204. Schafer M. Peripheral opioid analgesia: from experimental to clinical studies / M. Schafer // Curr. Opin. Anaesthesiol. – 1999. – № 12 (5). – P. 603-607.
205. Mercadante S. Opioid poorly-responsive cancer pain. Part 1: clinical considerations / S. Mercadante, R. K. Portenoy // J. Pain Symptom. Manage. – 2001. – № 21 (2). – P. 144-150.
206. Mercadante S. Malignant bone pain: pathophysiology and treatment / S. Mercadante // Pain – 1997. – № 69 (1-2). – P. 1-18.

207. Portenoy R. K. Management of cancer pain / R. K. Portenoy, P. Lesage // Lancet – 1999. – № 353 (9165). – P. 1695-1700.

208. Functional interactions between tumor and peripheral nerve in a model of cancer pain in the mouse / D. M. Cain, P. W. Wacnik, L. Eikmeier [et al.] // Pain Med. – 2001. – № 2 (1). – P. 15-23.

209. Functional interactions between tumor and peripheral nerve: morphology, algogen identification, and behavioral characterization of a new murine model of cancer pain / P. W. Wacnik, L. J. Eikmeier, T. R. Ruggles [et al.] // J. Neurosci. – 2001. – № 21 (23). – P. 9355-9366.