

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

Єгорова Олена Володимирівна

УДК 577.352:612.822.3

**ВИСОКОАФІННА ПОЗИТИВНА МОДУЛЯЦІЯ КАЛЬЦІЄВИХ КАНАЛІВ
P-ТИПУ АГОНІСТАМИ μ -ОПІОЇДНИХ РЕЦЕПТОРІВ**

03.00.02 – біофізика

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2016

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

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

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор, академік АН ВШ України
Мірошніченко Микола Степанович
професор кафедри біофізики Навчально-наукового центру «Інститут біології»
Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

доктор медичних наук, професор
Соловйов Анатолій Іванович
завідувач відділу експериментальної терапії Інституту фармакології та токсикології НАМН України

Захист відбудеться «18» жовтня 2016 р. о ____ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: вул. Богомольця, 4, Київ, 01024.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: вул. Богомольця, 4, Київ, 01024 та на сайті інституту www.biph.kiev.ua

Автореферат розісланий «17» вересня 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук



Любанова О.П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Вхід кальцію крізь Ca^{2+} канали опосередковує велику кількість клітинних відповідей, таких як вивільнення медіаторів, експресія генів, морфологічна диференціація та активація кальцій-залежних ензимів (Tsien et al., 1990) (Bito et al., 1997) Теоретично, опіоїдні рецептори можуть модулювати усі типи Ca^{2+} каналів. Опіоїди впливають на активність високопорогових L-, N-, P/Q-, R- (Kim et al., 1997) та низькопорогових T-типів (Abdulla et al., 1997) потенціал-керованих кальцієвих каналів шляхом активації μ -, κ -, δ - та ноцицептин/орфанін FQ (N/OFQ) опіоїдних рецепторів. “Класичні” ефекти інгібування високопорогових кальцієвих каналів опіоїдами опосередковані шляхом активації РТХ-чутливих G_i та G_o білків (Kim et al., 1997). G-білок являє собою гетеротримерну структуру, що складається із трьох субодиниць: α , β та γ . У стані спокою G-білки зв’язані з гуанозиндифосфатом (ГДФ). Ліганд, зв’язуючись із метаботропним рецептором, викликає у ньому конформаційні зміни, котрі, у свою чергу, призводять до різкого збільшення спорідненості G-білка до гуанозинтрифосфату (ГТФ). В результаті цього, гетеротримерний комплекс розпадається на α (зв’язану з ГТФ) та $\beta\gamma$ димерну субодиниці. Вільні субодиниці G-білка регулюють велику кількість ефекторних білків, зокрема, кальцієві канали N- та P/Q-типу. Відомий приклад пов’язаний з активацією опіоїдних рецепторів, це зниження вивільнення кальцій-залежних трансмітерів шляхом інгібування N- та P/Q-типів кальцієвих каналів, яке опосередковується G-білками. (Carabelli et al., 1998).

Набагато менший, але швидко зростаючий обсяг уявлень, вказує на G-білок-незалежну модуляцію опіоїдами іонних каналів, безпосередньо шляхом активації μ -, κ -, δ - та ноцицептин/орфанін FQ (N/OFQ) опіоїдних рецепторів (Twitchell et al., 1994; Keren et al., 1997; Keren et al., 1999). Можна припустити, що у механізм виникнення ефекту не залучена активація гетеротримерних G_i/G_o -білків. Молекулярні механізми, завдяки яким опіоїди викликають цей ефект, лишаються незрозумілими.

Наша робота присвячена новому механізму регуляції високопорогових кальцієвих каналів агоністами опіоїдних рецепторів.

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), “Ендогенна та фармакологічна регуляція внутрішньоклітинної та міжклітинної сигналізації в клітинах нервової системи в нормі та патології” (номер державної реєстрації – 0110U004750), “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 знеболення, викликаного опіоїдними анальгетиками” (номер державної реєстрації - 0115U003830).

Мета дослідження. Основною метою даної роботи було дослідити дію ендогенних та екзогенних опіоїдів на електрофізіологічні характеристики високопорогових кальцієвих каналів Р-типу плазматичної мембрани нейронів мозочку, а також встановити можливі механізми, що беруть участь у модуляторній дії опіоїдів на ці струми.

Завдання дослідження:

1. Методом “петч-клемп” у конфігурації “ціла клітина” визначити вплив селективних ендогенних та екзогенних агоністів опіоїдних рецепторів на кальцієвий струм Р-типу в нейронах Пуркінє мозочку щурів.
2. Використовуючи фармакологічні та електрофізіологічні засоби визначити діапазон концентрацій агоністів опіоїдних рецепторів, які спричиняють зміни кальцієвого струму Р-типу.
3. Визначити тип рецептора, з яким взаємодіють агоністи опіоїдних рецепторів, що спричиняють зміни кальцієвого струму Р-типу.
4. Виявити можливі механізми, котрі беруть участь у модуляції агоністами опіоїдних рецепторів високопорогових кальцієвих каналів Р-типу нейронів Пуркінє ссавців.

Об’єкт дослідження. Гостроізолювані нейрони Пуркінє щурів.

Предмет дослідження. Модуляція високопорогових потенціал-залежних Ca^{2+} каналів Р-типу нейронів Пуркінє щурів опіоїдами ендогенного та екзогенного походження.

Методи дослідження. Для дослідження впливу опіоїдів на високопорогові потенціал-залежні Ca^{2+} канали нейронів головного мозку ссавців застосовувались такі методичні підходи:

1. Виділення гостроізолюваних клітин із зрізів мозочку щурів при використанні методу м’якої ферментативної обробки нервових тканин;
2. Методи внутрішньо- та зовнішньоклітинної перфузії;
3. Реєстрація трансмембранних іонних струмів з використанням методу “петч-клемп” у конфігурації “ціла клітина”.
4. Статистична обробка результатів.

Наукова новизна. У дисертаційній роботі вперше показана наявність позитивної високоафінної модуляції кальцієвих каналів Р-типу агоністами МОР (μ -опіоїдних рецепторів), що не є опосередкованою G-білками. У роботі показано, що механізми, які приймають участь у модуляції опіоїдами Р-струму, відмінні від добре відомих механізмів за участю G-білків, або процесів залежних від фосфорилування. Таким чином, вперше показано, що опіоїдні рецептори здатні чинити безпосередній вплив на Р-канали. Наші дані показують, що опіоїди можуть взаємодіяти як з μ - так і з іншими типами опіоїдних рецепторів в одній і тій же клітині, викликаючи протилежні ефекти на кальцієві струми Р-типу. Вищенаведене вказує на існування принципово нового механізму регуляції кальцієвих каналів.

Теоретичне та практичне значення одержаних результатів. Результати дисертаційної роботи насамперед мають фундаментальний інтерес, оскільки

отримані принципово нові дані щодо модуляції агоністами опіоїдних рецепторів високопорогових кальцієвих каналів. Ці дані є важливими для формування більш повних уявлень про механізми, що здійснюють регуляцію цих каналів, а також для пошуку нових шляхів спрямованого фармакологічного впливу на них. Описана модуляція опіоїдами кальцієвих каналів може виявитись зручним фармакологічним інструментом для специфічної регуляції мозкової діяльності.

Особистий внесок здобувача. Вибір методичних підходів, конструювання та налагодження експериментальної установки, електрофізіологічні дослідження кальцієвих струмів, обробка експериментального матеріалу, аналіз і узагальнення результатів дослідження виконувались особисто автором. Приготування зрізів мозочку також проводилося здобувачем. У розробці концепцій роботи, обговоренні і редагуванні її результатів, а також у формуванні висновків брали активну участь керівник та співавтори публікацій.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи були представлені для обговорення на:

IV конференція українського товариства нейронаук з міжнародною участю. Донецьк, Україна. 2008; International Conference «Molecular mechanisms of intracellular calcium signalling», Kiev, Ukraine, 2009; International Narcotics Research Conference. Malmo, Sweden, 2010; VIII Міжнародному симпозіумі "Актуальні проблеми біофізичної медицини", Київ, Україна 2014; VI Конгрес Українського товариства нейронаук. Київ, Україна, 2014; VII Міжнародна наукова конференція "Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології". Київ, Україна, 2014.

Публікації. За результатами роботи опубліковано 6 статей у фахових наукових журналах, затверджених ВАК України, тези 9 доповідей у відповідних виданнях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, викладення результатів дослідження, обговорення результатів, висновків та списку використаних джерел із 228 найменувань. Робота викладена на 133 сторінках та проілюстрована 42 рисунками та 2 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літературних даних складається з 6 розділів, в яких наведено інформацію про структуру та функції мозочку, висвітлені відомості про кальцієві канали плазматичної мембрани та їх регуляцію, описано типи та функції опіоїдних рецепторів. Значну цікавість викликають клітинні механізми модуляції кальцієві канали опіоїдами, не пов'язані з активацією G-білків. Необхідність вирішення окреслених наукових проблем стала передумовою вибору напрямку досліджень, описаних в дисертаційній роботі.

Матеріали та методи досліджень. В розділі обґрунтовано вибір об'єкту та предмету дослідження.

Для виділення ізольованих нейронів Пуркінє, придатних для дослідження методом фіксації потенціалу, був використаний спосіб м'якої ферментативної обробки тканин (Panchenko et al., 1993). Після декапітації тварини мозочок швидко витягався й переносився в розчин наступного складу (у мМ): NaCl 137, KCl

3, NaHCO_3 26, глюкоза 30, MgCl_2 2, KH_2PO_4 1.5, Na_2HPO_4 6.3 (pH 7.4, $T=0^\circ\text{C}$). За допомогою тонкого леза під контролем бінокулярного мікроскопа МБС-10 (ЛОМО, Санкт-Петербург, Росія) готувалися поперечні зрізи мозочка товщиною 300-400 мкм. Вони інкубувалися при кімнатній температурі (19–24 °C) протягом 30 хвилин у цьому ж розчині, насиченому карбогеном (95% O_2 і 5% CO_2). Ферментативна обробка проводилася шляхом додавання 2.4 мг/мл ферменту протеїнази XXIII *Aspergillus oryzae* у розчин 25-30 хвилин при 22 °C в умовах постійного насичення розчину карбогеном. Після ферментативної обробки зрізи ретельно (20 хвилин) відмивалися від ферменту в чистому розчині. Ізольовані нейрони виділялися шляхом багаторазового пропущення тканини зрізів через декілька скляних мікропіпеток (діаметр кінчика від 1.0-0.8 до 0.1-0.3 мм) у розчині Рінгера наступного складу (у мМ): 150 NaCl, 5 KCl, 3 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 20 HEPES, 10 глюкози; pH був доведений 1 М розчином NaOH до 7.4. Описана послідовність обробки зрізів мозочка дозволяла одержувати ізольовані нейрони Пуркінє, які можна було ідентифікувати по їхній характерній формі.

Для реєстрації іонних струмів Р-типу був застосований метод “петч-клемп” у конфігурації “ціла клітина”. Зовнішньоклітинний розчин був обраним наступного складу (в мМ): TEA-Cl, 140, Choline-Cl, 100, BaCl_2 , 2, MgCl_2 , 2, та Tris-Cl, 20; pH 7.4. Мікропіпетки заповнювалися внутрішньоклітинним розчином (у мМ): Tris- PO_4 , 70, EGTA, 5, TEA-Cl-40, Tris-Cl, 30, Mg-ATP, 5, GTP, 0.5; pH 7.2. Діаметр кінчика мікропіпетки дорівнював 2-4 мкм, а її електричний опір за умов використання вищенаведених розчинів, становив близько 2-5 МОм.

Високопорогові кальцієві реєструвалися при мембранному потенціалі, що підтримувався на рівні -70 мВ. Струми, які були зареєстровані за таких умов, повністю пригнічувалися ω -Aga-IVA токсином у концентрації 100 нМ., і на підставі цього, були нами ідентифіковані як струми через кальцієві канали Р-типу (Mintz et al., 1992). Наявність у внутрішньоклітинному розчині 5 мМ АТФ і 0,5 мМ ГТФ дозволяла нам отримувати стабільні реєстрації Р-струму з одної клітини протягом 1-2 годин.

Зовнішньоклітинна аплікація розчинів, виконувалась методом швидкої зміни омиваючого розчину за допомогою пристрою “Jumping Table™” (Pharma Robot, Київ, Україна). Всі експерименти проводилися при кімнатній температурі 20-23°C.

Трансмембранні струми реєструвалися за допомогою підсилювача А-М Systems 2400 (А-М Systems 2400, Карлсборг, США). Аналіз отриманих даних проводився на комп'ютері з використанням аналітичних програмних засобів “Jumping Table™” (Pharma Robot, Київ, Україна) та Microcal Origin (OriginLab Corporation, Нортгемптон, США). Амплітуда кальцієвого струму визначалася від базової лінії до його пікового значення. Крім окремо визначених випадків, усі експериментальні дані представлені у вигляді середніх арифметичних значень \pm стандартна похибка середнього арифметичного значення.

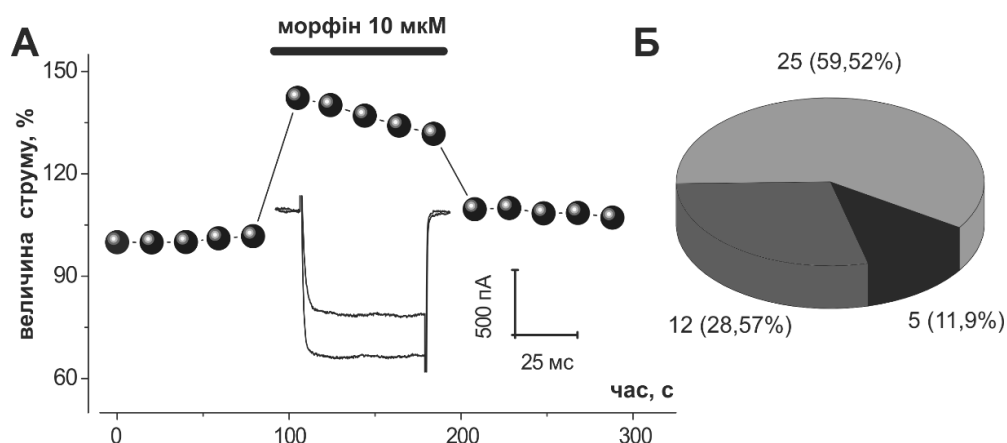
Всі реактиви, що застосовувалися у цих дослідженнях були придбані у компанії Sigma-Aldrich (Сент-Луїс, США), окрім ω -Aga-IVA, що був придбаний у Tocris (Бристоль, Великобританія).

Результати досліджень

1. Модулюча дія агоністів опіоїдних рецепторів на Р-струм.

1.1. Вплив морфіну на ВПКС Р-типу у нейронах Пуркінє щурів.

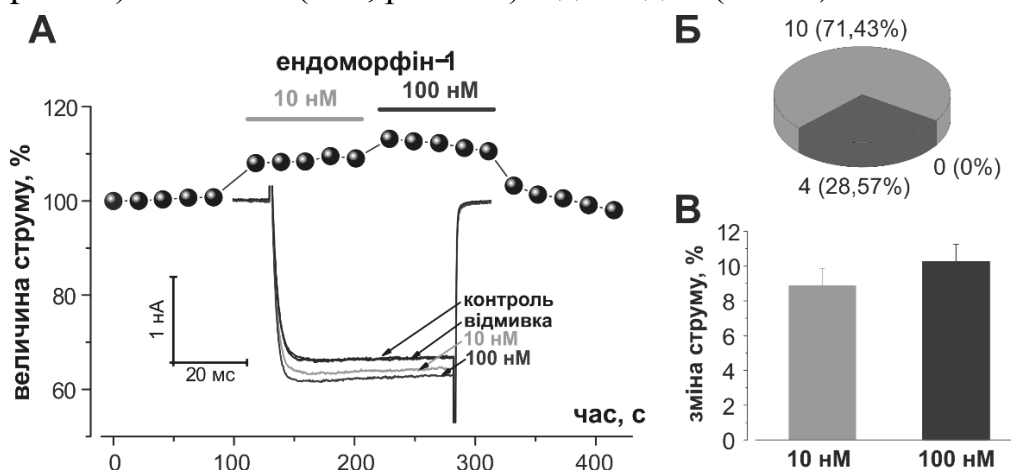
Прикладання неселективного алкалоїдного агоніста опіоїдних рецепторів широкого спектру морфіну на високопороговий кальцієвий струм (ВПКС) Р-типу у нейронах Пуркінє щурів в концентрації від 10 мкМ викликав збільшення амплітуди Р-струму (Рис. 1А) на 15% у 59% клітин ($n=25$), у 12% ($n=12$) клітин викликав пригнічення амплітуди Р-струму на 9%, а у 29% не спостерігалось ефекту (Рис. 1Б). На Рис. 1А подані дані експерименту, в якому вивчався ефект посилення амплітуди Р-струму. Як можна побачити на рисунку, зовнішньоклітинна аплікація морфіну в концентрації 10 мкМ призводила до швидкого (менше 10 с.) збільшення амплітуди відносно контрольного рівня. За відсутності морфіну у зовнішньоклітинному розчині відбувалось швидке повернення амплітуди до контрольного рівня.



Р-струм та оригінальні записи реєстрацій струмів в контролі та після аплікації морфіну. (Б) Діаграма розподілу чутливості Va^{2+} струму крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркінє мозочку щурів до морфіну.

1.2. Вплив ендогенного агоніста МОР Ендоморфін-1 на ВПКС Р-типу у нейронах Пуркінє мозочку щурів.

Селективний ендогенний агоніст МОР Ендоморфін-1 у наномолярних концентраціях викликав збільшення амплітуди Р-струму у 71% нейронів ($n=10$), в той час як у 29% нейронів ($n=4$) ефект не спостерігався. Ефект посилення цього струму під дією Ендоморфін-1 для концентрацій 10 нМ та 100 нМ становив $8 \pm 1\%$, ($n=6$, $p < 0.01$) та $10 \pm 1\%$ ($n=8$, $p < 0.001$) відповідно (Рис. 2).

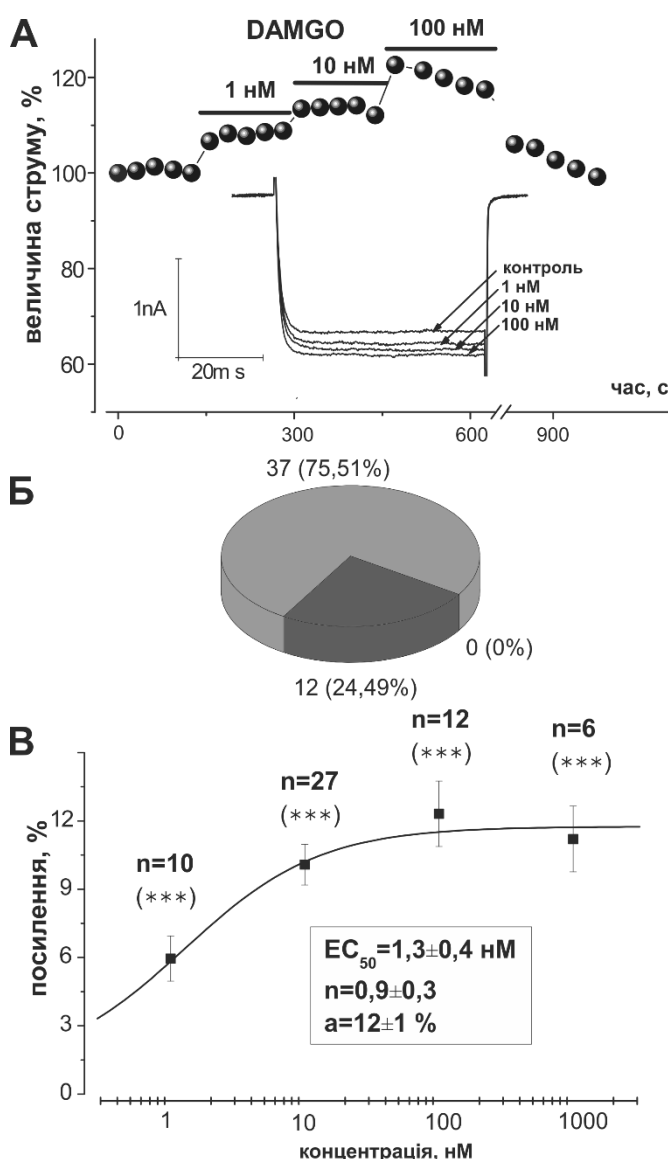


нальні записи реєстрацій струмів в контролі та після аплікації Ендоморфін-1. (Б) Діаграма розподілу зміни амплітуди Р-струму крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркінє мозочку щурів до Ендоморфін-1.

Статистичні дані впливу різних концентрацій Ендоморфін-1 на амплітуду Р-струму. $P < 0,001$ – порівняно з контролем. (В) Діаграма розподілу чутливості Ba^{2+} струму крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркін'є мозочку щурів до Ендоморфін-1.

1.3. Вплив селективного агоніста MOR DAMGO на ВПКС Р-типу у нейронах Пуркін'є щурів

Наступна серія експериментів була проведена із застосуванням синтетичного селективного агоніста MOR DAMGO. Зовнішньоклітинна аплікація DAMGO в концентраціях від 1 нМ до 1000 нМ викликала статистично достовірне збільшення амплітуди Р-струму в 76% нейронів ($n=37$), в той час як в 24% нейронів ($n=12$) речовина не викликала ефекту в жодній концентрації. Ефект посилення Р-струму залежав від концентрації агоніста. На Рис. 3А показаний хід експерименту, в якому



послідовно на одну і ту саму клітину (на максимуму ВАХ) прикладались різні концентрації агоніста 1 нМ (6 ± 1 %, $n=10$, $p < 0.001$), 10 нМ (10 ± 1 %, $n=27$, $p < 0.001$), 100 нМ (12 ± 1 %, $n=12$, $p < 0.001$), 1000 нМ (11 ± 1 %, $n=4$, $p < 0.001$). Ефект посилення амплітуди Р-струму спостерігається вже при прикладанні DAMGO в концентрації 1 нМ і виходить на насичення в концентрації 100 нМ. $EC_{50} = 1.3 \pm 0.4$ нМ (Рис. 3В).

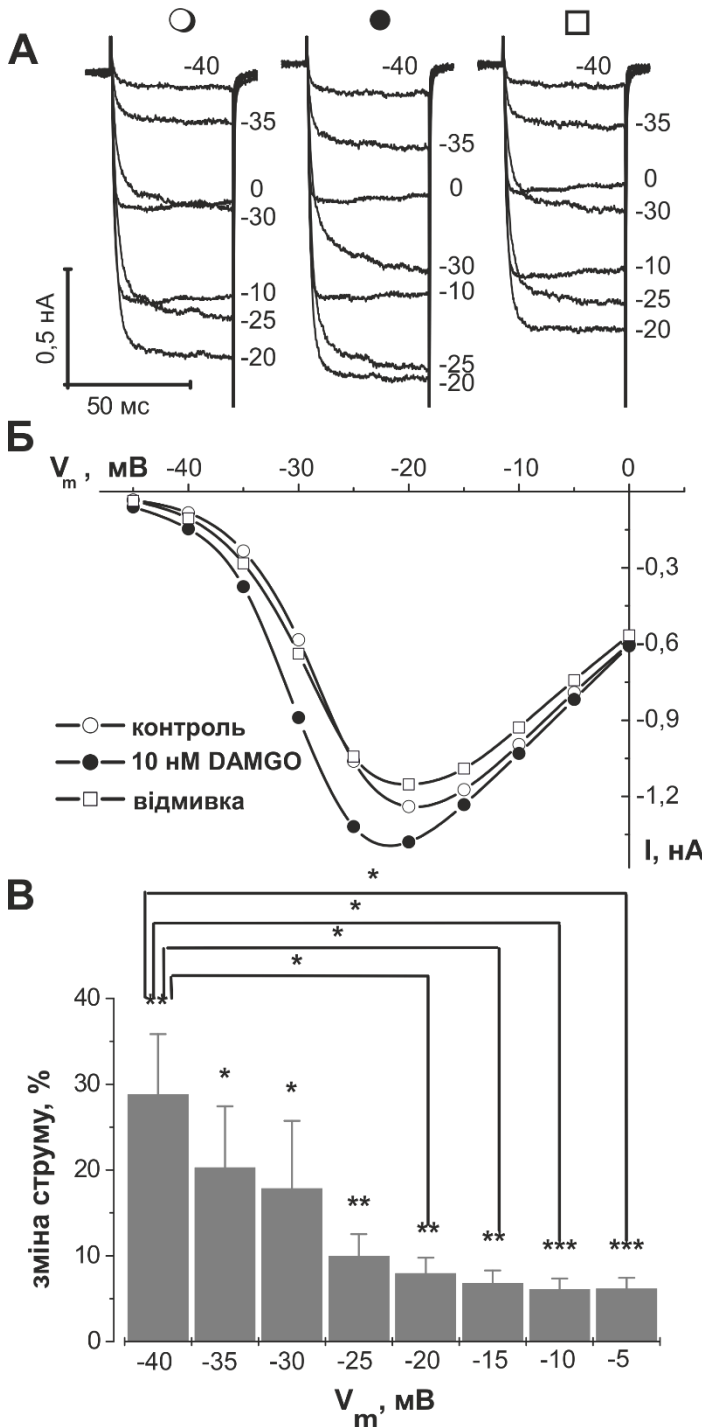
Рис. 3. Модуляція DAMGO Ba^{2+} струму крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркін'є мозочку щурів. (А) Часовий перебіг експерименту впливу 1 нМ, 10 нМ та 100 нМ DAMGO на Р-струм та оригінальні записи реєстрацій струмів в контролі та після аплікації DAMGO. (Б) Діаграма розподілу чутливості Ba^{2+} струму крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркін'є мозочку щурів до DAMGO. (В) Крива концентраційної залежності впливу DAMGO на Ba^{2+} струм крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркін'є мозочку щурів. $P < 0,001$ – порівняно з контролем.

Як на кінетику активації, так і кінетику інактивації Р-струму дана речовина не впливала.

Добре відомо, що фосфорилування опіоїдних рецепторів певним видом кіназ, наприклад, G-білок зв'язана рецепторна кіназа (GRK) призводить до десенситизації рецептора і його подальшої інтерналізації. Цей процес відбувається навіть в тому випадку якщо агоніст був прикладений на короткий час. Після інтерналізації.

рецептор знову може стати функціонально активним і повернутися на мембрану (цей процес називається ресенситизацією). При аплікації агоніста на тривалий час також може відбуватися фосфорилування рецептора і його подальша десенситизація, проте в цьому випадку фосфорилування здійснюється іншими протеїн кіназами: такими як протеїн кіназа А (ПКА) та протеїн кіназа С (ПКС), а наступна інтерналізація рецептора відбуватися значно повільніше.

Як було зазначено вище, прикладання 10 нМ DAMGO викликало швидке



збільшення амплітуди струму на $10 \pm 1\%$, ($n=27$, $p<0.001$). При відмиванні агоніста амплітуда струму знову поверталася до контрольних значень. Повторна аплікація DAMGO в тій же концентрації призводила до того ж ефекту ($9 \pm 3\%$, $n=6$, $p<0.05$), що вказує на відсутність десенситизації ефекту.

В наступній серії експериментів показано, що модуляція Р-струму DAMGO проявляється в широкому діапазоні напруг. Як видно, ефект був найбільш виражений на лівій гілці ВАХ. Однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) виявив, що криві ВАХ суттєво відрізняються в межах -40 мВ до -20 мВ ($29 \pm 7\%$), до -20 мВ ($8 \pm 2\%$) (Рис. 4).

Рис. 4. Вплив аплікації 10 нМ DAMGO на Ca^{2+} струм крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркін'є мозочку щурів. (А) Оригінальні записи реєстрацій струмів в контролі та після аплікації DAMGO. Записи струмів були зроблені з інтервалом у 5 с при зміщенні мембранного потенціалу до рівня, вказаного біля кожного запису. (Б) ВАХ побудовані по записах Р-струмів наведених на (А). (В) Зведені дані, що показують потенціалзалежність ефекту DAMGO на Ca^{2+} струм крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркін'є мозочку щурів.

2. Вплив іонів Ca^{2+} на модуляцію

DAMGO кальцієвого Р-струму.

Серед внутрішньоклітинних агентів, які можуть змінювати активність кальцієвих каналів, перш за все потрібно виділити самі іони Ca^{2+} , котрі здатні як безпосередньо впливати на мембранні канали, так і активувати різні кальцій-залежні

білки. Для з'ясування ролі іонів кальцію у модуляції кальцієвих каналів Р-типу агоністами MOR ми провели серію експериментів в яких було досліджено ефект DAMGO в залежності від типу проникаючого катіону. Як показано, на Рис. 5 зовнішньоклітинна аплікація DAMGO, селективного агоніста MOR, в концентрації 10 нМ спричиняла таке ж саме швидке (менш ніж за 10 с) збільшення амплітуди Р-струму ($9 \pm 0.7\%$, $n=7$, $p<0.001$), як і в наших попередніх експериментах, у яких основним проникаючим катіоном були іони Ba^{2+} ($10 \pm 1\%$, $n=27$, $p<0.001$). DAMGO також не впливав на кінетику активації та інактивації Р-струму і викликаний ним ефект був повністю зворотнім після відмивання від агоніста.

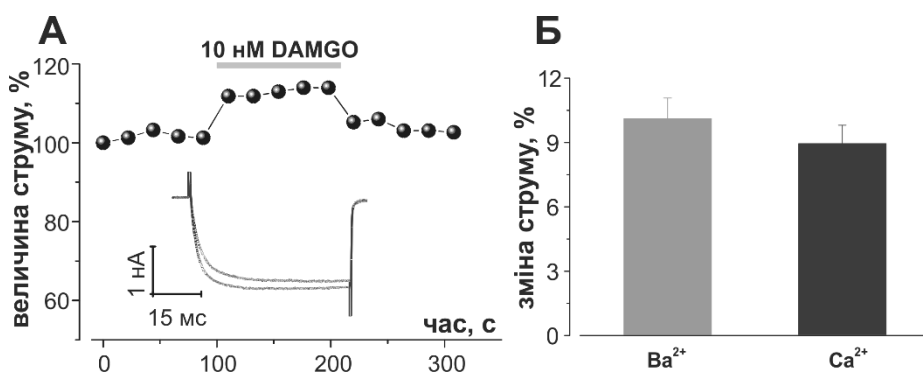


Рис. 5. Модуляція DAMGO струму крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркінє мозочку щурів не залежить від проникаючого катіону. (А) Часовий перебіг експерименту впливу 10 нМ DAMGO на Р-струм та

оригінальні записи реєстрацій струмів в контролі та після аплікації DAMGO. (Б) Статистичні дані впливу 10 нМ DAMGO на амплітуду Р-струму при різних проникаючих катіонах. $P<0,001$ – порівняно з контролем.

3. Антагоністи опіоїдних рецепторів.

3.1. Усунення налоксоном посилюючого ефекту DAMGO.

Для з'ясування можливої участі опіоїдних рецепторів у модуляції Р-струму опіоїдами, ми провели серію експериментів із використанням найбільш поширеного антагоніста цих рецепторів налоксону. Налоксон - антагоніст опіоїдних рецепторів з високою спорідненістю до μ -, помірною спорідненістю до κ - і відносно низькою спорідненістю до δ -опіоїдних рецепторів (Minami et al., 1995). Встановлено (Wang et al., 2001), 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 (Wang et al., 2001). Подібний вплив налоксону як агоніста μ - та κ -опіоїдних рецепторів також було виявлено у клітинах яєчника китайського хом'яка (Fukuda et al., 1998). Таким чином, налоксон є багатограним (різнобічним) агоністом MOR (Wang et al., 2001).

В наших експериментах прикладання самого налоксону в концентрації 100 нМ також викликало збільшення амплітуди Р-струму на $5 \pm 1\%$ ($n=5$, $p<0.01$) у 62.5% нейронів, тоді як у 37.5% нейронів ($n=3$) жодного ефекту не спостерігалось. В наступній серії експериментів клітини, в яких спостерігався ефект посилення Р-струму в присутності 10 нМ DAMGO ($10 \pm 2.5\%$, $n=5$, $p<0.05$), були проінкубовані в розчині, що містив 100 нМ налоксону. Як видно з Рис. 6, при подальшій аплікації 10 нМ DAMGO на фоні 100 нМ налоксону не було виявлено жодного додаткового ефекту $4.9 \pm 0.5\%$ ($n=5$, $p<0.001$) в порівнянні з попереднім ефектом власне налоксону.

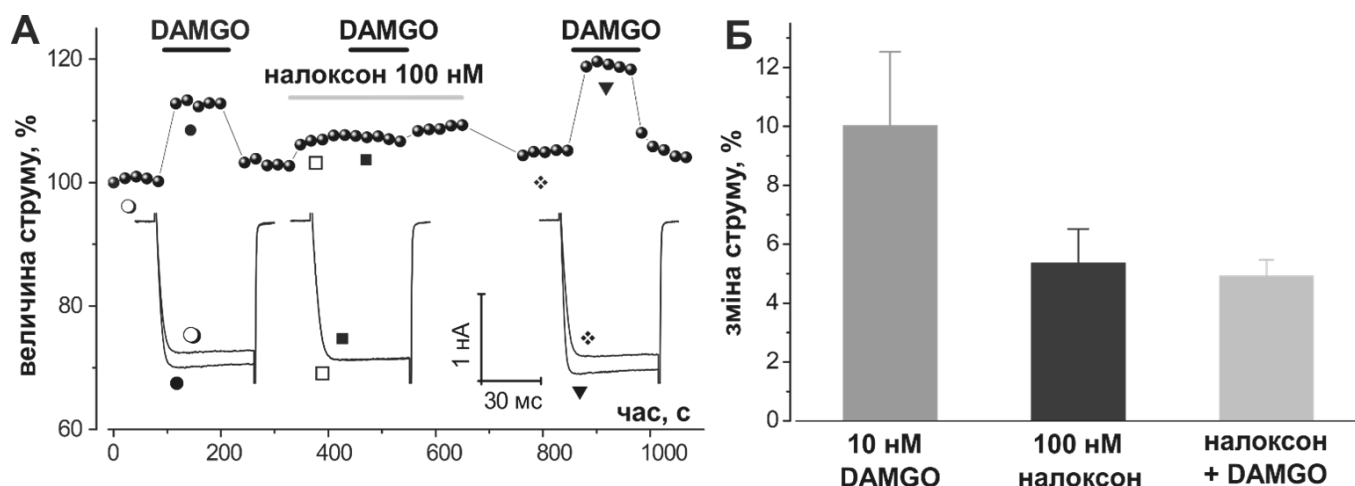


Рис. 6. Усунення налоксоном посилюючого ефекту DAMGO на Ba^{2+} струм крізь кальцієві канали P-типу в нейронах Пуркін'є мозочку щурів. (А) Часовий хід дії 100 нМ налоксону на збільшення амплітуди Р-струму під дією DAMGO 10 нМ та оригінальні записи реєстрацій струмів. Записи струмів : ○-контрольний розчин, ●-аплікація 10 нМ DAMGO, □-аплікація налоксону 100 нМ, ■-прикладання 10 нМ DAMGO на фоні 100 нМ налоксону, ✧-відмивання від налоксону, ▼-прикладання 10 нМ DAMGO. (Б) Сукупні дані для експериментів, що представлені у блоці А.

3.2. STOP усуває потенціацію, що викликана DAMGO.

Високоафінний селективний антагоніст MOR STOP, повністю усунув ефект DAMGO. Як показано, STOP сам по собі не викликав змін на Р-струмі ($0.9 \pm 1.2\%$, $n=6$, $p>0.4$). Прикладання 10 нМ DAMGO в присутності 100 нМ STOP не викликало зростання амплітуди Р-струму $-0.8 \pm 1.4\%$, ($n=6$, $p>0.6$) в порівнянні з контрольним прикладанням 10 нМ DAMGO $9 \pm 1.5\%$ ($n=6$, $p<0.01$) (Рис. 7).

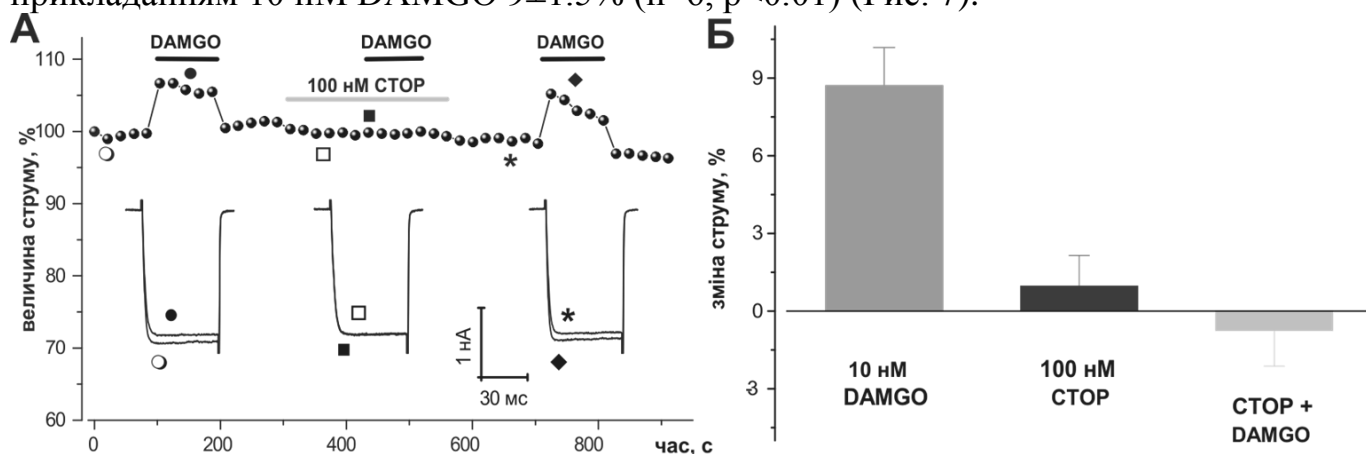


Рис. 7. Усунення STOP ефекту DAMGO на Ba^{2+} струм крізь кальцієві канали P-типу в нейронах Пуркін'є мозочку щурів. (А) Часовий хід дії 100 нМ STOP на збільшення амплітуди Р-струму під дією 10 нМ DAMGO та оригінальні записи реєстрацій струмів. Записи струмів : ○-контрольний розчин, ●-аплікація 10 нМ DAMGO, □-аплікація 100 нМ STOP, ■-прикладання 10 нМ DAMGO на фоні 100 нМ STOP, ✧-відмивання від STOP, ◆-прикладання DAMGO (10 нМ). (Б) Сукупні дані для експериментів, що представлені у блоці А.

4. Вплив кальмодуліна на модуляцію Р-каналів агоністами MOR.

Як відомо, кальмодулін (CaM) є одним з внутрішньоклітинних агентів, який може змінювати активність кальцієвих каналів. Для встановлення можливої участі в модуляції кальцієвих каналів Р-типу агоністами МОР рецепторів, нами було проведено серію дослідів з використанням антагоніста кальмодулін-регульованих ензимів кальмідазолу (CMZ).

Відповідно до наших попередніх даних зовнішньоклітинна аплікація CMZ у концентрації 0,5 мкМ викликала часткове пригнічення амплітуди кальцієвого струму Р-типу. Збільшення концентрації CMZ до 1 мкМ призводило до практично повного пригнічення струму протягом декількох хвилин.

У цій серії експериментів нами досліджувався можливий вплив CMZ на ефект посилення струму під дією 10 нМ DAMGO (Рис. 8). У контрольних умовах, аплікація DAMGO призводила до збільшення струму на $9 \pm 0.7\%$ ($n=7$, $p<0.001$), після усунення DAMGO з зовнішньоклітинного розчину, досліджуваний нейрон інкубували протягом 10 хвилин у зовнішньоклітинному розчині, що містив 0,5 мкМ CMZ, що призводило до двократного зменшення амплітуди струму у порівнянні з контрольними значеннями. Подальше прикладання DAMGO на фоні CMZ спричиняло статистично достовірне збільшення амплітуди струму на $5 \pm 0,6\%$ ($n=5$, $p<0,05$).

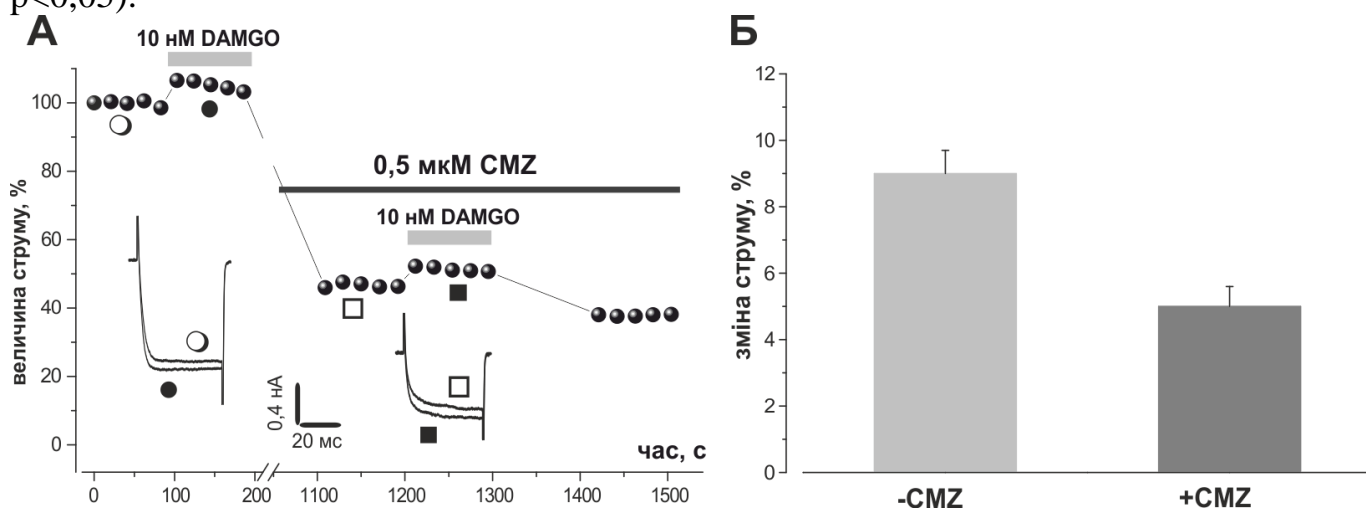


Рис. 8. Кальмідазол викликає пригнічення амплітуди Ca^{2+} струму крізь кальцієві канали Р-типу та частково усуває потенціацію струму, спричинену 10 нМ DAMGO. (А) Часовий хід дії кальмідазолу 500 нМ на збільшення амплітуди Р-струму під дією 10 нМ DAMGO та оригінальні записи реєстрацій струмів. Записи струмів : ○ - контрольний розчин, ● - аплікація 10 нМ DAMGO, □ - аплікація 500 нМ кальмідазолу, ■ - прикладання 10 нМ DAMGO на фоні 500 нМ кальмідазолу. (Б) Сукупні дані для експериментів, що представлені в блоці А.

5. Вплив антагоністів вторинних посередників на ефект DAMGO.

Відомо, що потенціал-залежна модуляція кальцієвих каналів може бути усунена прикладанням деполяризуючого імпульсу до високих позитивних значень мембранного потенціалу.

Для того, щоб з'ясувати чи відбувається така G-білок опосередкована потенціал-залежна модуляція Р-струму агоністами МОР, ми провели серію експериментів в котрих перед основним тестуючим зміщенням мембранного потенціалу подавався деполяризуючий імпульс тривалістю 50 мс до значень

мембранного потенціалу +50 мВ. Як видно з рисунка модулююча дія DAMGO на кальцієві канали Р-типу зберігалась в умовах парної стимуляції клітини.

В наступних наших експериментах для дослідження потенціал незалежного впливу G-білків на модуляцію Р-струму DAMGO, ГТФ у внутрішньоклітинному розчині замінили на ГТФ γ S (незворотній активатор G-білків). Прикладання 10 нМ DAMGO після внутрішньоклітинної перфузії нейрону 0.5 мМ ГТФ γ S протягом 15-20 хв. призводило до збільшення струму ($9 \pm 1.2\%$, $n=8$, $p<0.001$). Подібні результати були отримані, коли ГТФ був замінений на ГДФ β S (незворотній блокатор G-білків) у внутрішньоклітинному розчині для пригнічення активності G-білків. В цих експериментах внутрішньоклітинна перфузія нейрона Пуркінє 0.5 мМ ГДФ β S протягом 15-20 хв. не усуває ефект, викликаний 10 нМ DAMGO ($10 \pm 1.5\%$, $n=9$, $p<0.001$). G-білки повністю інактивуються при гідролізі ГТФ до ГДФ. Тому в наступних наших експериментах для дослідження потенціал незалежного впливу G-білків на модуляцію Р-струму під дією DAMGO клітину протягом 15-20 хв. перед прикладанням агоніста перфузували внутрішньоклітинним розчином, що містив 0.5 мМ ГДФ. 10 нМ DAMGO ($7 \pm 1\%$, $n=5$, $p<0.01$). Опіоїди регулюють діяльність різних видів протеїнкіназ, як наприклад протеїнкіназу С (ПКС), протеїнкіназу А (ПКА), кальцій/кальмодулінзалежну протеїнкіназу II (CaMKII) і протеїнкіназу G (ПКГ). Активація ПКА або ПКС може полегшити діяльність кальцієвих каналів Р-типу. Щоб дослідити чи ПКА або ПКС були залучені в модуляцію Р-струму DAMGO, були використані неспецифічні блокатори кіназ, Н7 та Н89. Внутрішньоклітинна перфузія клітини з 10 мкМ Н7 та 10 мкМ Н89 протягом 20 хв. не усувала ефект DAMGO на Р-струм $7 \pm 0.5\%$ ($n=7$, $p<0.001$) та $8 \pm 0.5\%$ ($n=3$, $p<0.01$) відповідно. цАМФ є вторинним месенджером, який приймає участь у внутрішньоклітинній передачі сигналу та необхідний для реалізації дії багатьох гідрофільних гормонів, таких як глюкагон і адреналін, які не можуть проходити через плазматичну мембрану, нейромедіаторів та інших первинних посередників, а також бере участь в активації протеїнкіназ, та регуляції функцій іонних каналів. Присутність 0,5 мМ цАМФ у піпетці не усувала ефект 10 нМ DAMGO ($9 \pm 0,9\%$, $n=6$, $p<0.01$).

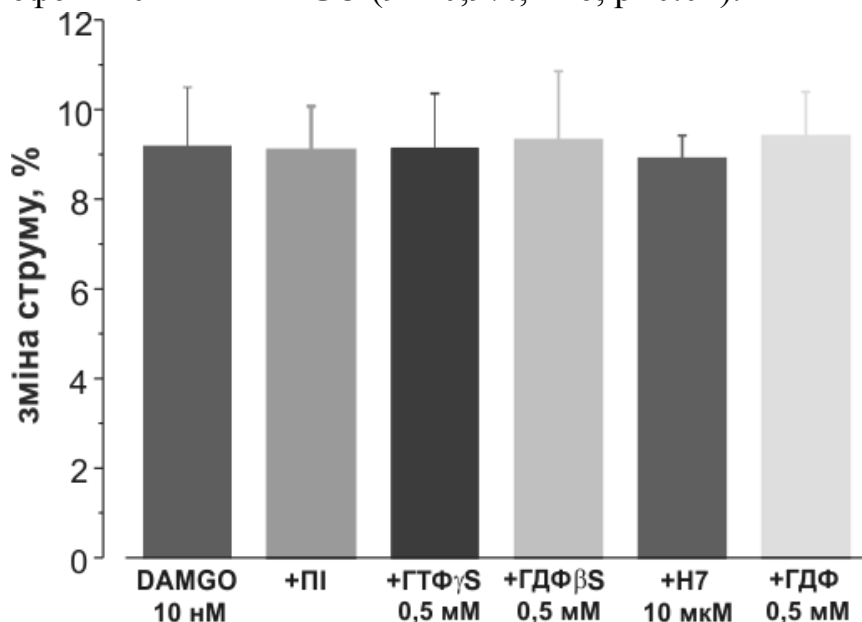


Рис. 9. Узагальнюючі результати експериментів дослідження впливу антагоністів вторинних посередників на ефект 10 нМ DAMGO на Ba^{2+} струм крізь кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркінє мозочку щурів. Модуляція 10 нМ DAMGO Р-струму зберігається в умовах: парної стимуляції клітини (+PP); внутрішньоклітинної перфузії нейрона Пуркінє розчином, що містить ГТФ- γ -S у концентрації 0,5 мМ

(+ГТФγS), внутрішньоклітинної перфузії нейрона Пуркінє розчином, що містить ГДФ-β-S у концентрації 0,5 мМ (+ГДФβS), внутрішньоклітинної перфузії нейрону Пуркінє розчином, що містить Н7 у концентрації 0,5 мМ (+Н7), внутрішньоклітинної перфузії нейрону Пуркінє розчином, що містить ГДФ у концентрації 0,5 мМ (+ГДФ).

ОБГОВОРЕННЯ

Високопорогові кальцієві канали (N-, L-, P/Q- і R-типу) присутні як у центральних так і у периферичних нейронах нервової системи ссавців. Вони регулюють вхід кальцію в клітину, тим самим виступаючи у ролі посередників та регуляторів таких важливих Ca^{2+} -залежних процесів як експресія генів, секреція гормонів, збудливість мембрани та синаптична передача (Wu et al., 1999; Tsien et al., 1990; Bito et al., 1997). У зв'язку з їхньою життєво необхідною функцією у клітинній регуляції, кальцієві канали модулюються набором внутрішньоклітинних сигнальних механізмів, що забезпечують для регуляцію біологічних функцій шляхом контролю входу кальцію в клітину. У даній роботі було встановлено, що механізм передачі сигналу від μ-опіоїдного рецептора до кальцієвого каналу Р-типу в мембрані нейронів Пуркінє мозочка щурів не опосередковується G-білками і відбувається без участі систем внутрішньоклітинної сигналізації, що пов'язані з іонами кальцію, ПКА, ПКС, та СаМ.

Агоністи опіоїдних рецепторів впливаючи на одні й ті ж препарати призводять до протилежних ефектів, як до збудження так і до пригнічення, в залежності від таких параметрів як концентрація агоніста, тривалість преінкубації агоніста, типу рецептора, типу G-білку з яким взаємодіє рецептор, та активації різних внутрішньоклітинних шляхів. Зокрема показано, що агоністи опіоїдних рецепторів можуть викликати збільшення або зменшення амплітуди калієвого і кальцієвого струму в залежності від типу рецептора і від типу внутрішньоклітинного шляху (Minami et al., 1995). У наших експериментах агоністи опіоїдних рецепторів також викликали протилежні ефекти.

Алкалоїдний агоніст МОР морфін у мікромольних концентраціях взаємодіє як з μ-, κ- так і з δ-опіоїдними рецепторами (Minami et al., 1995; Raynor et al., 1994). Аплікація морфіну в концентрації від 10 мкМ у 59% клітин (n=25) викликала збільшення амплітуди Р-струму на 15 %, у 12% клітин (n=5) спостерігалася пригнічення амплітуди Р-струму на 9%, тоді як у 29% клітин (n=12) жодного ефекту не спостерігалася. Можливо ці протилежні ефекти опосередковані взаємодією з різними типами рецепторів. Пригнічення амплітуди Р-струму під впливом морфіну, швидше за все, було спричинене активацією ДОР (Kanemasa et al., 1995), тоді як збільшення амплітуди Р-струму могло бути зумовлено взаємодією цього агоніста з МОР. Поясненням випадків, коли дія морфіну не спостерігалася, може бути взаємна компенсація протилежних ефектів (потенціація та інгібування амплітуди Р-струму). Таким чином, ці дані вказують на те, що морфін у мікромольному діапазоні концентрацій не є селективним агоністом МОР і, можливо, регулює кальцієві канали

P-типу різними шляхами, в залежності від того, який тип рецепторів переважно ним активований. (Kanemasa et al., 1995).

Відомо, що Ендоморфін-1 у наномолярних концентраціях ($EC_{50}=7.7$ nM) може спричиняти модуляцію потенціал активованих кальцієвих каналів (Higashida et al., 1998). В наших експериментах Ендоморфін-1 у наномолярних концентраціях викликав збільшення амплітуди P-струму. Ефект посилення цього струму під дією Ендоморфін-1 для концентрацій 10 nM та 100 nM був слабшим ($8\pm1\%$, $n=6$, $p<0.01$ та $10\pm1\%$ $n=8$, $p<0.001$), у порівнянні з ефектом DAMGO $10\pm1\%$ ($n=27$, $p<0.001$) та $12\pm1\%$ ($n=12$, $p<0.001$) для тих самих концентрацій та розвивався більш повільно (близько 50 с), ніж ефект, спричинений DAMGO (до 10 с). Отримані нами дані вказують на те, що селективні агоністи MOR при взаємодії в наномолярних концентраціях з високоафінним центром зв'язування MOR можуть викликати потенціацію P-струму, в той самий час як неселективна активація опіоїдних рецепторів призводить до протилежних ефектів, представлених вище.

Наступна серія експериментів була проведена із застосуванням синтетичного селективного агоніста MOR DAMGO. Зовнішньоклітинна аплікація DAMGO в концентраціях від 1 nM до 1000 nM викликала статистично достовірне збільшення амплітуди P-струму в 76% нейронів ($n=37$), в той час як в 24% нейронів ($n=12$) речовина не викликала ефекту в жодній концентрації. В експериментах проведених з метою визначення залежності ефекту DAMGO від концентрації було показано, що збільшення амплітуди P-струму спостерігалось вже при прикладанні DAMGO в концентрації 1 nM і досягало насиченої дії в концентрації 100 nM. Згідно до результатів цих дослідів можна підсумувати, що напівмаксимальна ефективна концентрація (EC_{50}) ліганду знаходиться в межах від 1 до 10 nM. Ці значення EC_{50} близькі до тих, що були отримані Мінамі та іншими (Minami et al., 1995) (0.87 nM) і Райнором та іншими (Raynor et al., 1994) (2 nM) в експериментах по вивченню зв'язування DAMGO з MOR. Таким чином, отримані нами дані вказують на те, що центр зв'язування агоніста з рецептором має таку ж саму чутливість до агоніста, як і центр зв'язування класичного опіоїдного рецептора.

Нами вперше було показано, що аплікація 10 nM селективного агоніста MOR DAMGO призводила до швидкого (менше ніж 10 с) зростання амплітуди P-струму ($10\pm1\%$, $n=27$, $p<0.001$). Ефект був більш виражений за від'ємних значень мембранного потенціалу, не залежав від стимуляції клітини та був повністю зворотнім при усуненні агоніста із зовнішньоклітинного розчину. Дані цих експериментів відрізняються від даних, що були отримані Канемасою та його співавторами (Kanemasa et al., 1995) в роботі, де вони досліджували модулюючу дію агоністів κ-опіоїдних рецепторів на кальцієвий струм P-типу в нейронах Пуркін'є. Ці автори показали, що пригнічення цього струму селективним агоністом KOR U50488 відбувається значно повільніше (протягом хвилини) та залежить від частоти стимуляції клітини. Порівнюючи ці результати, можна припустити, що вплив на потенціал-активовані кальцієві канали P-типу може бути зумовленим взаємодією опіоїдів з різними типами власне опіоїдних рецепторів.

Добре відомо, що фосфорилування опіоїдних рецепторів певним видом кіназ, наприклад, G-білок зв'язана рецепторна кіназа (GRK) призводить до десенситизації рецептора і його подальшої інтерналізації. Цей процес відбувається навіть в тому

випадку якщо агоніст був прикладений на короткий час. Після інтерналізації, рецептор знову може стати функціонально активним і повернутися на мембрану (цей процес називається ресенситизацією). При аплікації агоніста на тривалий час також може відбуватися фосфорилування рецептора і його подальша десенситизація, проте в цьому випадку фосфорилування здійснюється іншими протеїн кіназами: такими як протеїн кіназа А (ПКА) та протеїн кіназа С (ПКС), а наступна інтерналізація рецептора відбуватися значно повільніше (Liu et al., 2001). У наших експериментах при прикладанні агоніста на 2-3 хвилини ніякої десенситизації і ендоцитозу не спостерігалось (можливо, це пов'язано з відсутністю фосфорилування рецептора PKG).

Налоксон - антагоніст опіоїдних рецепторів з високою спорідненістю до μ -, помірною спорідненістю до κ - і відносно низькою спорідненістю до δ -опіоїдних рецепторів (Minami et al., 1995). Встановлено (Wang et al., 2001), 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 (D. Wang et al., 2001). Подібний вплив налоксона як агоніста μ - та κ -опіоїдних рецепторів також було виявлено у клітинах яєчника китайського хом'яка (Fukuda et al., 1998). Таким чином, налоксон є багатограним (різнобічним) агоністом μ -опіоїдних рецепторів (Wang et al., 2001).

У наших експериментах аплікація 100 нМ налоксону спричиняла швидке та незначне збільшення амплітуди Р-струму і повністю усувала ефект 10 нМ DAMGO. Ці дані вказують на те, що DAMGO і налоксон модулюють Р-струм через взаємодію з одним і тим самим високо-афінним центром зв'язування, який має фармакологічні властивості подібні до μ -опіоїдного рецептора.

Сильнодіючий та високоселективний антагоніст μ -опіоїдних рецепторів CTOP, повністю усунув ефект DAMGO. CTOP сам по собі не викликав змін на Р-струмі. Повторне прикладання 10 нМ DAMGO в присутності 100 нМ CTOP не викликало зростання амплітуди Р-струму в порівнянні з контрольним прикладанням агоніста. Отримані дані вказують на те, що збільшення амплітуди струму відбувається шляхом активації MOR (Strimbu-Gozariuet al., 1994).

Іони Ca^{2+} здатні як безпосередньо впливати на мембранні канали, (Johnson et al., 1984), так і можуть активувати різноманітні внутрішньоклітинні кальцій- залежні ферменти та білки (Romanin et al., 1991). Щоб перевірити чи іони Ca^{2+} впливають на описану модуляцію, ми провели експерименти, використавши іони Ca^{2+} як носія Р-струму, замість Ba^{2+} (використовуваного в більшості експериментів). Зовнішньоклітинна аплікація DAMGO, селективного агоніста μ -опіоїдних рецепторів, в концентрації 10 нМ спричиняла таке ж саме збільшення амплітуди Р-струму, як і в наших попередніх експериментах, коли основним проникаючим катіоном були іони Ba^{2+} . DAMGO також не впливав на кінетику активації та інактивації Р-струму і був повністю зворотнім після відмивання від агоніста. Таким чином, вхід іонів кальцію не впливає на модуляцію опіоїдами Р-струму.

Ще одним з внутрішньоклітинних агентів, який може змінювати активність кальцієвих каналів є кальмодулін (Wang et al., 1999; Lee et al., 1999). У проведених нами експериментах модуляція Р-струму під дією DAMGO суттєво зменшувалась в

умовах інкубування клітини протягом 10 хвилин в розчині, що містив 0,5 мкМ кальмідазолу (неспецифічного блокатора CaM та інших білків і ферментів (James et al., 1995). Отже, модуляція P-каналів агоністами MOR може бути залежною від кальмодулін-регульованих ензимів. Підвищення внутрішньоклітинної концентрації EGTA до 10 мМ ніяк не вплинуло на ефект, що спричиняв кальмідазол (дані не представлені), що вказує на його незалежність від Ca^{2+} /CaMKII залежних кіназ та фосфатаз. Відомо, що кальмідазол самі по собі викликає пригнічення активності кальцієвих каналів (Fisyunov et al., 2001 Sunagawa et al., 1999), що так само не є опосередкованим Ca^{2+} /CaMKII-залежними шляхами. Навпаки, показано, що кальмідазол прямо взаємодіє з кальцієвим каналом гладеньких м'язів (Sunagawa et al., 1999). Вищенаведене вказує на те, що на кальцієвому каналі існує високоафінний алостеричний сайт зв'язування для агоністів MOR, який з більш низькою афінністю взаємодіє з кальмідазолом.

Опіїдні рецептори належать до великої суперсім'ї GPCRs. Як клас, GPCRs мають фундаментальну фізіологічну важливість, опосередковуючи ефекти більшості відомих медіаторів і гормонів. Відповідно до загальноприйнятої парадигми, першою ланкою в процесі трансдукції GPCRs є активація гетеротримерних G-білків. G-білок-опосередкована модуляція високопорогових кальцієвих каналів займає чільне місце у переліку шляхів модуляції входу кальцію в клітину. "Класичні" ефекти пригнічення високопорогових кальцієвих каналів опіїдами опосередковані шляхом активації РТХ-чутливих Gi/o білків. Ці G-білки являють собою гетеротримерні структури, що складаються з трьох субодиниць: α , β та γ . У стані спокою G-білки зв'язані з гуанозиндифосфатом. Ліганд, зв'язуючись із метаботропним рецептором, викликає у ньому конформаційні зміни, котрі, у свою чергу, призводять до різкого збільшення спорідненості G-білка до гуанозинтрифосфату. В результаті чого, гетеротримерний комплекс розпадається на α (зв'язану з ГТФ) та $\beta\gamma$ димерну субодиниці. Вільні субодиниці G-білка регулюють велику кількість ефекторних білків, зокрема, кальцієві канали N та P/Q типу.

Розрізняють два типи G-білок опосередкованої регуляції кальцієвих каналів: потенціал-залежну та потенціал-незалежну. Потенціалнезалежна регуляція носить повільний характер пов'язаний з тим, що воно опосередковується як правило дифундуючими в цитоплазмі вторинними посередниками. Потенціалзалежна - швидкий й опосередкована прямою взаємодією каналу з вільними $\text{G}\beta\gamma$ димерами.

Активація опіїдних рецепторів, призводить до зниження вивільнення кальцій-залежних трансмітерів шляхом G-білок опосередкованого пригнічення активності кальцієвих каналів N- та P/Q-типу. Проте, наразі успішно зростає обсяг новітніх даних що вказують на існування G-білок незалежної модуляції опіїдами іонних каналів, внаслідок активації μ -, κ -, δ - та ноцицептин/орфанін FQ (N/OFQ) опіїдних рецепторів (Brzostowski et al., 2001; Hall et al., 2002). Відповідно до цих даних, встановлено, що ноцицептин (агоніст N/OFQ опіїдних рецепторів) в концентрації 100 нМ спричиняє G-білок незалежне інгібування кальцієвих каналів T-типу. В іншій роботі Твітчел та Рейн (Twitchell et al., 1994) показали, що DAMGO може збільшувати активність Ca^{2+} -залежного K^+ струму за механізмом який не опосередковується G-білками, протеїнкіназами, або фосфатазами.

В експериментах проведених нами з метою визначення участі G-білків у механізмі збільшення амплітуди Р-струму під дією DAMGO було показано, що ефект DAMGO на Р-струм зберігався коли внутрішньоклітинний розчин містив незворотній блокатор (ГДФ β S) або активатор (ГТФ γ S) G-білків. G-білки повністю інактивуються при гідролізі ГТФ до ГДФ. Інактивація G-білків, що була спричинена дією ГДФ, не впливала на модуляцію Р-струму під дією DAMGO. Тобто модуляція ВПКС Р-типу агоністами μ -опіоїдних рецепторів не зумовлена потенціалнезалежною G-білок опосередкованою регуляцією.

Відомо, що потенціал-залежна модуляція кальцієвих каналів може бути усунена прикладанням деполяризуючого імпульсу до високих позитивних значень мембранного потенціалу. Для того, щоб з'ясувати чи відбувається така G-білок опосередкована потенціал-залежна модуляція Р-струму агоністами MOR, ми провели серію експериментів в котрих перед основним тестуючим зміщенням мембранного потенціалу подавався деполяризуючий імпульс тривалістю 50 мс до значень мембранного потенціалу +50 мВ. Модулююча дія DAMGO на кальцієві канали Р-типу зберігалась в умовах парної стимуляції клітини. Отже, модуляція агоністами μ -опіоїдних рецепторів Р-струму не зумовлена взаємодією G $\beta\gamma$ субодиниці з кальцієвим каналом.

Таким чином, данні цих експериментів вказують на те, що механізм модуляції кальцієвих каналів Р-типу під дією DAMGO повністю відрізняється від «класичного» G-білок опосередкованого механізму, модуляції цього каналу під дією агоністів μ -опіоїдних рецепторів. Наші дані вказують, що викликана DAMGO модуляція Р-каналів не є опосередкованою G-білками.

Опіоїди регулюють діяльність різних видів протеїнкіназ, як наприклад протеїнкіназу С (ПКС), циклічну АМФ залежну протеїнкіназу А (ПКА), кальцій/кальмодулінзалежну протеїнкіназу II (CaMKII) і протеїнкіназу G (ПКГ). Активація ПКА або ПКС може полегшити діяльність кальцієвих каналів Р-типу. цАМФ є вторинним месенджером, який приймає участь у внутрішньоклітинній передачі сигналу та необхідний для реалізації дії багатьох гідрофільних гормонів, таких як глюкагон і адреналін, які не можуть проходити через плазматичну мембрану, нейромедіаторів та інших первинних посередників. Він також бере участь в активації протеїнкіназ. Крім того, цАМФ зв'язується і регулює функцію іонних каналів. Присутність цАМФ у піпетці під час експериментів не усувала ефект 10 нМ DAMGO. Опіоїдні рецептори, як і інші G $_i$ /G $_o$ -спряжені рецептори, здатні пригнічувати аденілатциклазу, що призводить до зниження внутрішньоклітинної концентрації цАМФ. У первинних сенсорних нейронах цАМФ регулює роботу катіонних каналів, що активуються гіперполяризацією (I $_h$). Знижуючи рівень цАМФ в клітині, опіоїди ефективно пригнічують I $_h$, послаблюючи пейсмейкерну активність та зменшуючи частоту потенціалів дії. У такий спосіб опіоїди скорочують потік ноціцептивної інформації до центральної нервової системи. Після припинення обробки клітин опіоїдами рівень цАМФ в нейронах зростає і за рахунок підвищення активності ПКА збільшується викид нейромедіаторів. За цих умов, пригнічення аденілатциклази опіоїдами призведе до зменшення викиду нейротрансмітерів, викликаного активацією ПКА.

У проведених нами експериментах, з використанням неспецифічних блокаторів кіназ H7, H89 та цАМФ, також не було виявлено ніякої участі ПКА, ПКС та цАМФ у механізмі збільшення амплітуди Р-струма під дією DAMGO.

Таким чином, усі отримані нами данні свідчать про те, що існує альтернативний механізм, яким опіоїди можуть регулювати активність іонних каналів незалежно від G-протеїнів, або процесів залежних від фосфорилування. Так, останнім часом збільшується число робіт, які вказують на новий, G-білок-незалежний механізм, завдяки якому GPCR можуть ініціювати біохімічні сигнали і модулювати нейрональну збудливість (Brzostowski et al., 2001). Згідно з цими даними, GPCR здатні активувати системи трансдукції в яких залучені скафолд протеїни (Hall et al., 2002). У нашому випадку, можливо, що MOR модулюють Р-струм через зв'язок зі скафолд протеїнами, які можуть безпосередньо опосередковувати рецепторну сигналізацію, або фізично пов'язувати рецептор з різноманітними ефекторними системами через PDZ домени (Doyle et al., 1996), аналогічно до того, як KOR стимулюють Na^+/H^+ обмін (Huang et al., 2004). Проте, найбільш імовірним є те, що в модуляції кальцієвих каналів Р-типу агоністами MOR задіяний високоафінний центр зв'язування розташований на самому каналі, і опіоїди виступають високоафінними алостеричними модуляторами цього каналу.

Нами показано існування принципово нового механізму регуляції кальцієвих каналів опіоїдами. Результати дисертаційної роботи насамперед мають фундаментальний інтерес, оскільки отримані принципово нові дані про модулюючу дію агоністів опіоїдних рецепторів на високопороговий кальцієвий струм Р-типу. Ці дані є важливими для формування більш повних уявлень про механізми, що здійснюють регуляцію високопорогових кальцієвих каналів, а також для пошуку нових шляхів спрямованого фармакологічного впливу на них. Характерна модуляція опіоїдами кальцієвих каналів може виявитись зручним фармакологічним інструментом для специфічної регуляції мозкової діяльності.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлені результати власного дослідження впливу ендогенних та екзогенних опіоїдів на електрофізіологічні характеристики високопорогових кальцієвих каналів Р-типу плазматичної мембрани нейронів мозочку, та окреслені можливі механізми, що беруть участь у модуляторній дії опіоїдів на ці струми.

1. Методом “петч-клемп” у конфігурації “ціла клітина” визначено, що агоністи опіоїдних рецепторів викликають зміни амплітуди кальцієвого струму Р-типу в нейронах Пуркінє мозочку щурів. Неселективні агоністи опіоїдних рецепторів викликають різнобічні ефекти на кальцієві канали Р-типу: посилення або пригнічення. В окремих випадках ці ефекти компенсують одне одного, в результаті чого спостерігається нечутливість Р-струму до дії опіоїдів.
2. Досліджено ефект посилення кальцієвого струму Р-типу, який спричиняють селективні ендогенні та екзогенні агоністи μ -опіоїдних рецепторів. Половинний ефект для найбільш селективного агоніста,

DAMGO, досягається при концентрації лише 1.7 нМ, що відповідає величині афінності центра зв'язування класичного μ -опіоїдного рецептора для цього агоніста. Посилення кальцієвого струму Р-типу агоністами μ -опіоїдних рецепторів має виражену залежність від потенціалу.

3. DAMGO, ендоморфін і налоксон модулюють Р-струм шляхом взаємодії з одним і тим самим високоафінним центром зв'язування, який має фармакологічні властивості, подібні до μ -опіоїдного рецептора.
4. Ефект посилення струмів Р-типу опіатами не є опосередкованим гетеротримерними G-білками на відміну від класичної негативної модуляції кальцієвих каналів μ -опіоїдними рецепторами. Окрім того, цей ефект не залежить від активності ПКА, ПКС, кальмодуліну та концентрації внутрішньоклітинного кальцію.
5. Досліджений механізм опіоїдної модуляції є принципово новим типом модуляції активності кальцієвих каналів Р-типу. Можливі три шляхи, яким опіоїди можуть регулювати діяльність іонних каналів незалежно від G-білків, або процесів залежних від фосфорилування. Найбільш імовірним є те, що в модуляції кальцієвих каналів Р-типу агоністами МОР задіяний високоафінний центр зв'язування, розташований на самому каналі, і опіоїди виступають високоафінними алостеричними модуляторами цього каналу. Проте, наразі, ми не можемо виключити, що ця модуляція опосередкована взаємодією зі скафолд протейнами або ж безпосередньою взаємодією МОР з кальцієвим каналом.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті:

1. **Iegorova O.** ω -Lsp-IA, a novel modulator of P-type Ca^{2+} channels / Pluzhnikov K., Vassilevski A., Korolkova Y., Fisyunov A., Iegorova O., Krishtal O., Grishin E. // *Toxicon*. – 2007. – 50. – № 7. – P. 993–1004. *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті)*
2. **Iegorova O.** G-protein independent modulation of P-type calcium channels by μ -opioids in Purkinje neurons of rat. / Iegorova O., Fisyunov A., Krishtal O. // *Neurosci. Lett.* – 2010. – VOL. 480. – № 2. – P. 106-111. *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті)*
3. **Iegorova O.** Non-classical effects of opioid neuropeptides / Krishtal O., Iegorova O., Fisyunov A., Maximyuk O., Khmyz O., Ievglevsky A., Bakalkin G. // Chapter in Book devoted to 9th “Gagra Talks” International Conference on Fundamental

Questions of Neuroscience. – Edited by N. Nachkebia. – Tbilisi. – Georgia. – 2010. – VOL. 9. – S. 8. – P. 282-289. *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті)*

4. **Єгорова О.В.** Вплив агоністів μ -опіоїдних рецепторів на кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркінє мозочка щурів. / О.В. Єгорова, О.І. Фісьюнов, О.О. Кришталь. // Нейрофізіологія/Neurophysiology. – 2015. – Т. 47. – № 2. – С. 123-128. *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті)*
5. **Єгорова О.В.** Потенціалкеровані кальцієві канали: класифікація та фармакологічні характеристики. Частина I / О.В. Єгорова, О.П. Максимюк, О.І. Фісьюнов, О.О. Кришталь // Фізіол. журн. – 2016. – Т. 64. – №4. – С. 84-94. *(Особистий внесок здобувача: участь у написанні тексту, підготовка ілюстративних матеріалів, робота з літературними джерелами)*
6. **Єгорова О.В.** Механізм позитивної модуляції струму через кальцієві канали Р-типу в нейронах Пуркінє агоністом опіоїдних рецепторів. // Нейрофізіологія/Neurophysiology. – 2016. – Т. 48. – № 4. – С. 251-257. *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті)*

Тези доповідей:

1. **Єгорова О.В.** Вплив агоністів μ - та κ -опіоїдних рецепторів на Р-струм у потенціал-керованих кальцієвих каналах в нейронах Пуркінє мозочка щура / О.В. Єгорова, О.І. Фісьюнов, О.О. Кришталь. // Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти: матеріали IV конференції Українського товариства нейронаук, присвяченій 100-річчю від дня нар. академіка НАНУ Ф.Н. Серкова. – 2008. – Т. 4. – № 1. – С. 22-23.
2. **Iegorova O.V.** Opioids facilitate P-type calcium current in Purkinje neurons of rat in G-protein independent manner / Iegorova O.V., Fisyunov A.I., Krishtal O.A. // Фізіол. журн.: матеріали International Conference «Molecular mechanisms of intracellular calcium signalling», Kiev, Ukraine, October 11-13, 2009. – 2009. – Т. 55. – № 6. – С. 124.
3. **Iegorova O.** P-type calcium channels in Purkinje neurons of rat are modulated by μ -opioid receptor in G-protein independent manner / O. Krishtal, O. Iegorova and A. Fisyunov // Abstract book of International Narcotics Research Conference. Malmo, Sweden, July 11-16, 2010. – 2010. – P. 96.
4. **Єгорова О.В.** Модуляція агоністами опіоїдних рецепторів кальцієвих каналів Р-типу в нейронах Пуркінє мозочку щурів / Єгорова О. В., Фісьюнов О. І., Кулик В. Б., Кришталь О. О. // Матеріали VIII Міжнародного симпозіуму "Актуальні проблеми біофізичної медицини", Київ, Україна, 14-17 травня 2014р. – 2014. – С. 45-46.

5. **Єгорова О.В.** Пуринергічний аспект периферичної опіоїдної аналгезії / Кулик В. Б., Єгорова О. В., Волкова Т. М., Кришталь О. О. // Матеріали VIII Міжнародного симпозіуму "Актуальні проблеми біофізичної медицини", Київ, Україна, 14-17 травня 2014р. – 2014. – С. 63-64.
6. **Єгорова О.В.** Вплив опіоїдів на десенситизацію високоафінного центру зв'язування опіоїдних рецепторів / Єгорова О.В., Фіслюнов О.І., Кулик В.Б., Кришталь О.О. // Матеріали VI Конгресу Українського товариства нейронаук. Київ, Україна, 4-8 червня 2014р. – 2014. – С. 50.
7. **Єгорова О.В.** Ендогенні опіоїди – диригенти P2X2 рецепторів дорсальних нейронів щурів / Кулик В.Б., Єгорова О.В., Волкова Т.М., Кришталь О.О. // Матеріали VI Конгресу Українського товариства нейронаук. Київ, Україна, 4-8 червня 2014р. – 2014. – С. 78.
8. **Єгорова О.В.** Стимулююча дія агоністів μ - опіоїдних рецепторів на кальцієву провідність в нейронах Пуркінє / Єгорова О.В., Фіслюнов О.І., Кулик В.Б., Кришталь О.О. // Матеріали VII Міжнародної наукової конференції "Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології". Київ, Україна, 7-9 жовтня 2014р. . – 2014. – С. 58.
9. **Єгорова О.В.** Модуляція впливу опіоїдів на P2X3 струми антагоністами μ - опіоїдних рецепторів / Кулик В.Б., Єгорова О.В., Волкова Т.М., Кришталь О.О. // Матеріали VII Міжнародної наукової конференції "Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології". Київ, Україна, 7-9 жовтня 2014р. . – 2014. – С. 91.

АНОТАЦІЯ

Єгорова О. В. Високоафінна позитивна модуляція кальцієвих каналів Р-типу агоністами μ -опіоїдних рецепторів. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика. – Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2016.

У дисертаційній роботі вперше показано, що в модуляції кальцієвих каналів Р-типу агоністами μ -опіоїдних рецепторів (МОР) приймає участь високоафінний центр зв'язування, який або розташований на самому каналі, або алостерично взаємодіє з ним. Ми також не виключаємо, що агоністи опіоїдних рецепторів безпосередньо взаємодіють з модулюючим сайтом в межах Р-каналу.

Проведені дослідження на гостроізольованих нейронах Пуркінє мозочку шурів показали, що селективний агоніст МОР DAMGO (10 нМ) викликав невелику, але статистично достовірну потенціацію струму, який проходить через Р-тип кальцієвих каналів ($10 \pm 1\%$, $n=27$, $p<0.001$). Ефект був швидким (менше ніж 10 сек.) та повністю зворотнім, а також концентраційно- та потенціалозалежним. EC_{50} ефекту DAMGO становить 1.3 ± 0.4 нМ, насичуюча концентрація – 100 нМ. У наданій роботі було показано, що механізми, які приймають участь у модуляції опіоїдами Р-струму, відмінні від добре відомих механізмів за участю G-білків, або процесів залежних від фосфорилування. Разом, опіоїди викликають двосторонні ефекти на кальцієві канали Р-типу: блокування через G-білок опосередкований шлях, який активується μ -опіоїдними рецепторами або через безпосередній вплив на Р-канали. Наші дані не виключають, що опіоїди можуть взаємодіяти як з μ -, так і з іншими опіоїдними рецепторами в тій же самій клітині викликаючи конкуруючі ефекти на кальцієвих каналах Р-типу. Вищенаведене вказує на існування принципово нового механізму регуляції кальцієвих каналів

Результати дисертаційної роботи насамперед мають фундаментальний інтерес, оскільки отримані принципово нові дані про модулюючу дію агоністів опіоїдних рецепторів на високопороговий кальцієвий струм Р-типу. Ці дані є важливими для формування більш повних уявлень про механізми, що здійснюють регуляцію високопорогових кальцієвих каналів, а також для пошуку нових шляхів спрямованого фармакологічного впливу на них. Характерна модуляція опіоїдами кальцієвих каналів може виявитись зручним фармакологічним інструментом для специфічної регуляції мозкової діяльності.

Ключові слова: опіоїдні рецептори, потенціація, кальцієві канали Р-типу, нейрони Пуркінє, модуляція, G-білки.

АННОТАЦИЯ

Егорова Е. В. Высокоаффинная положительная модуляция кальциевых каналов Р-типа агонистами μ -опиоидных рецепторов. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.02 – биофизика. - Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев, 2016.

В диссертационной работе впервые показано, что в модуляции кальциевых каналов Р-типа агонистами МОР рецепторов принимает участие высокоаффинный центр связывания, который или расположен на самом канале, или аллостерически взаимодействует с ним. Мы также не исключаем, что агонисты опиоидных рецепторов непосредственно взаимодействуют с модулирующим сайтом в пределах Р-канала.

Проведенные исследования на свежеизолированных нейронах Пуркинье мозжечка крыс показали, что селективный агонист μ -опиоидных рецепторов (МОР) DAMGO (10 нМ) вызвал небольшую, но статистически достоверную потенциацию тока, который проходит через Р-тип кальциевых каналов ($10 \pm 1\%$, $n = 27$, $p < 0.001$). Эффект был быстрым (менее 10 сек.) и полностью обратным, а также концентрационно- и потенциалозависим. EC_{50} эффекта DAMGO составляет 1.3 ± 0.4 нМ, насыщающая концентрация-100 нМ. В предоставленной работе было показано, что механизмы, которые принимают участие в модуляции опиоидами Р-тока, отличные от хорошо известных механизмов с участием G-белков, или процессов, зависящих от фосфорилирования. Итого, опиоиды вызывают двусторонние эффекты на кальциевые каналы Р-типа: подавление амплитуды тока через G-белок опосредованный путь, который активируется μ -опиоидными рецепторами или через непосредственное влияние на Р-каналы. Наши данные не исключают возможность, что опиоиды могут взаимодействовать как с μ -, так и с другими опиоидными рецепторами в той же самой клетке, вызывая конкурирующие эффекты на кальциевых каналах Р-типа. Вышесказанное указывает на существование принципиально нового механизма регуляции кальциевых каналов

Результаты диссертационной работы прежде всего имеют фундаментальный интерес, поскольку получены принципиально новые данные о модулирующем действии агонистов опиоидных рецепторов на высокопороговый кальциевый ток Р-типа. Эти данные важны для формирования более полных представлений о механизмах, осуществляющих регуляцию высокопороговых кальциевых каналов, а также для поиска новых путей направленного фармакологического воздействия на них. Характерная модуляция опиоидами кальциевых каналов может оказаться удобным фармакологическим инструментом для специфической регуляции мозговой деятельности.

Ключевые слова: опиоидные рецепторы, потенциация, кальциевые каналы Р-типа, нейроны Пуркинье, модуляция, G-белки.

SUMMARY

Igorova O.V. High affinity positive modulation of P-type calcium channel by μ -opioid agonists. – Retaining manuscript rights.

Dissertation for the degree of Candidate of biological sciences, specialty 03.00.02 – Biophysics. – Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv, 2016.

Calcium influx through voltage-dependent calcium channels (VDCCs) mediates a plethora of cellular responses, such as transmitter release, gene expression, morphological differentiation and activation of calcium-dependent enzymes. Virtually, all types of calcium channels are subjects to modulatory actions of opioid receptors. Opioids regulate the activity of high-threshold L-, N-, P/Q-, R- and low-threshold T-type VDCCs through activation of μ -, κ -, δ - and nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) opioid receptors. The “classical” inhibitory effects of opioids on high-threshold VDCCs are mediated by activation of PTX-sensitive GTP-binding G_i and G_o proteins. Much smaller, but gradually increasing bulk of evidence indicates that opioids can produce G-protein-independent modulation of ion channels through activation of μ -, κ -, δ - and nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) opioid receptors. The molecular mechanism(s) by which opioids exert this effect remains unclear.

P-type calcium channels play a key role in the synaptic transmission between mammalian central neurons: major part of calcium entering pre-synaptic terminals delivered via these channels. Using standard whole-cell patch clamp techniques we have studied the effect of μ -opioids on P-type calcium channels in acutely isolated Purkinje neurons from rat cerebellum. Extracellular application of opioid receptors agonists in the concentrations between 1 nM and 1000 nM induced excitatory or inhibitory effects on high-threshold VGCCs. The alkaloid agonist morphine is fairly selective for μ -opioid receptor, although at micromolar concentrations it can interact also with κ - and δ -opioid receptors. In our experiments, facilitation of P-current by morphine was observed in 59% of the neurons, whereas in 12% of the neurons, this current was inhibited and in 29% of the neurons, no effect was observed. Inhibitory effect of morphine, which we observed in some cells, could be due to the previously described negative effect of κ - or δ -opioid receptors on VGCCs. It is also possible, that oppositely directed effects of morphine were masked in some cases. Selective μ -opioid agonist DAMGO in 10 nM produced a small, but consistent facilitation of current through P-type calcium channels ($10 \pm 1\%$, $n=27$, $p<0.001$). The effect of DAMGO was rapid (less than 10 sec) and fully reversible. This effect was both concentration and voltage-dependent. The EC_{50} for the effect of DAMGO was 1.3 ± 0.4 nM and the saturating concentration was 100 nM. Endogenous selective agonist of μ -opioid receptors, endomorphin-1 demonstrated similar action.

Naloxone is an opioid receptor antagonist with high affinity for μ -, moderate affinity for κ - and relatively low affinity for δ -opioid receptors. In our experiments, this drug produced rapid facilitation of P-current. The DAMGO-induced facilitation of P-current was completely abolished by 100 nM naloxone or by selective μ -opioid antagonist CTOP (100 nM). These data indicate that, in all probability, DAMGO and naloxone modulate P-current by interacting with the same high-affinity binding site, which has pharmacological properties similar with μ -opioid receptors.

Intracellular perfusion of Purkinje neurons with 0.5 mM GTP γ S, 0.5 mM GDP β S or GDP, as well as strong depolarizing pre-pulses to +50 mV, did not eliminate facilitatory action of DAMGO on P-channels indicating that this effect is not mediated by G-proteins. Furthermore, the effect of DAMGO was preserved in the presence of non-specific inhibitors of PKA and PKC H7 (10 μ M) and H89 (10 μ M) inside the cell.

The mechanisms that are involved in this modulation are different from the well-known mechanism involving G-proteins or processes dependent of phosphorylation. In

summary, opioids exert bi-directional effects on P-type calcium channels: inhibition - through G-protein dependent pathway activated by κ - or δ -opioid receptors or via direct action on the P-channels, and facilitation - via G-protein-independent pathway involving the interaction with high affinity binding site resembling μ -opioid receptor. Our data do not exclude the possibility that opioids may interact with both μ -, and with the other opioid receptors in the same cell, causing the competing effects on P-type calcium channels. It indicates the existence of a fundamentally new mechanism of regulation of calcium channels

Our findings are important for the formation of a more complete understanding of the mechanisms responsible for the regulation of high-threshold calcium channels, as well as to find new ways focused pharmacologic effects on them. Atypical opioid modulation of calcium channels can be useful pharmacological tool for the specific regulation of brain activity.

Keywords: opioid receptors, potentiation, P-type calcium channels, Purkinje neurons, modulation, G-proteins