

УДК 612.822.3

А.Ю.Артамонов (4 курс, каф. ФХОМ), Б.В. Крылов, д.б.н.  
(институт физиологии им. И.П. Павлова РАН)

## ИНГИБИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ЭНДОМОРФИНОВ НА ПОТЕНЦИАЛОЗАВИСИМЫЕ НАТРИЕВЫЕ ТОКИ СЕНСОРНЫХ НЕЙРОНОВ

Агонисты опиоидных рецепторов обладают широким спектром регуляторного влияния на клеточные процессы. Эти агонисты оказывают влияние на функционирование ионных каналов клеточной мембраны по механизму, опосредованному системой вторичных мессенджеров. В настоящее время достаточно подробно изучено влияние опиатов, в том числе и опиоидных пептидов, на активность различных типов Са-каналов и К-каналов. Общими звеньями в этом случае являются рецептор-опосредованная активация G-белков и ингибирование аденилатциклазного пути регуляции. Для потенциалозависимых натриевых каналов отсутствуют доказательства участия указанных звеньев в регуляции их активности. В то же время, участие Na-каналов в общей схеме регуляторного действия опиоидных пептидов не вызывает сомнений: их функциональная активность зависит от уровня потенциала покоя, определяемого К-каналами. Это, в свою очередь, через уровень электрической активности клеток в сочетании с уровнем свободного Са в цитоплазме, влияет на синтез и высвобождение опиоидных пептидов, экспрессию опиоидных рецепторов.

Особая роль в формировании анальгезирующего и анестезирующего компонентов действия опиоидов может принадлежать медленным ТТХ-устойчивым натриевым каналам (ТТХr), поскольку известно, что каналы именно этого типа определяют характер разрядов ноцицептивных С-афферентов.

Выделенные в последние годы эндогенные опиоидные пептиды эндоморфин-1 (ЕМ1) и эндоморфин-2 (ЕМ2) обладают высоким избирательным сродством к  $\mu$ -опиоидным рецепторам. Исследования различных аспектов влияния эндоморфинов свидетельствуют о том, что эти пептиды обладают всем спектром рецептор-опосредованных эффектов, типичных для  $\mu$ -опиоидных агонистов. Эндоморфины в наномолярных концентрациях вызывают ингибирование Са-каналов и активацию К-каналов. Оба пептида оказывают гипотензивное действие. Они способны существенно снижать вызванную активность нейронов дорзальных корешков спинного мозга и при локальном приложении ингибировать реакцию на воспалительные процессы при различных повреждающих воздействиях.

Низкие действующие концентрации и отсутствие многих побочных эффектов, характерных для экзогенных опиатов, делают их перспективными субстанциями с точки зрения создания принципиально новых анальгетических препаратов. В связи с этим особый интерес представляет исследование влияния ЕМ1 и ЕМ2 на характеристики потенциалозависимых натриевых каналов сенсорных нейронов.

Методы. Эксперименты выполнены на культивируемых изолированных нейронах спинальных ганглиев новорожденных крысят. Для выделения нейронов был применен модифицированный метод краткосрочного культивирования, обеспечивающий высокий выход жизнеспособных клеток.

Трансмембранные ионные токи регистрировали с помощью метода фиксации потенциала на целой клетке в условиях плотного контакта (метод patch-clamp, в конфигурации «whole-cell»). Эксперименты проводили с использованием аппаратно-программного комплекса на основе усилителя «L/M EPC-7» и ПЭВМ.

При использованных составах стандартных растворов величина равновесного потенциала для ионов Na в соответствии с уравнением Нернста [1] составляет 33 мВ.

$$E_{Na} = (RT/F) \cdot \ln([Na]_{out}/[Na]_{in}) \quad (1)$$

Поскольку растворы с обеих сторон мембраны не содержали ионов, обладающих проницаемостью, сравнимой с ионами натрия, это значение может быть принято за величину потенциала реверсии натриевых токов, и было использовано для оценки установления ионного равновесия между клеткой и содержимым пипетки после прорыва мембраны и поддержания постоянства ионного состава в процессе эксперимента. Кроме того, в качестве критерия постоянства условий регистрации, производился контроль за величиной проводимости токов утечки и последовательного сопротивления.

Для количественного описания зависимости ингибирующего эффекта (IC) эндоморфинов на величину проводимости натриевых каналов ( $IC = G(CEM)/GN$ ) было использовано уравнение Хилла [2]:

$$IC = 1 / (1 + ([C]/[C50])^n) \quad (2)$$

где IC - степень ингибирования при данной концентрации, C - действующая концентрация агента, C50 - концентрация, вызывающая ингибирование до уровня 0.5 по сравнению с контролем, n - коэффициент Хилла

Результаты статистической обработки представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

Результаты. При исследовании показано, что оба пептида в концентрациях 1-10 мкМ не оказывают существенного влияния на характеристики потенциалозависимых ТТХs и ТТХr натриевых токов. При увеличении концентрации пептидов до 10-200 мкМ наблюдалось дозозависимое ингибирующее влияние на амплитуду суммарного натриевого тока, как при внеклеточном, так и внутриклеточном приложении.

#### *Выводы:*

1. Полученные в работе результаты показывают, что EM1 и EM2 оказывают ингибирующий эффект на ТТХr и ТТХs натриевые токи сенсорных нейронов при концентрациях от 10 до 500 мкМ. Таким образом, диапазон действующих концентраций на несколько порядков превосходит диапазон концентраций специфического связывания с рецепторами и диапазон рецептор - опосредованных эффектов. Поэтому можно заключить, что ингибирующий эффект эндоморфинов не опосредован рецепторным взаимодействием, а является результатом их прямого воздействия на натриевые каналы.
2. Исследованные в работе эндогенные пептиды EM1 и EM2 по диапазону концентрации, вызывающих прямое ингибирование натриевой проводимости, соответствуют большинству экзогенных агонистов и, возможно, более эффективны, чем энкефалины.
3. Принципиальное сходство в характере действия EM1 и EM2 при вне- и внутриклеточном приложении, позволяет предположить, что в структуре Na-каналов, как ТТХs, так и ТТХr, имеются центры (центр) связывания с эндоморфинами, которые, вероятно, расположены ближе к внутреннему устью или более доступны со стороны цитоплазмы.
4. Можно предположить, что именно наличие положительно заряженной и пространственно отделенной группы  $NH_3^+$  Tyr1 позволяет исследуемым тетрапептидам блокировать ионпроводящую пору натриевых каналов по механизму, подобному механизму блокирования местными анестетиками.
5. Полученные в работе данные показывают, что эндоморфины оказывают ингибирующий эффект на токи через Na-каналы в концентрациях на два порядка ниже, чем энкефалины. Исходя из их структурных особенностей можно предположить, что различия в эффективности связаны с большей длиной и меньшей гидрофобностью энкефалинов по сравнению с эндоморфинами.

Ранее было показано (Крылов и др., 1999), что агонисты опиоидных рецепторов в концентрациях, соответствующих диапазону взаимодействия с рецептором, способны оказывать модифицирующее влияние на активационную воротную систему ТТХr каналов, снижая ее потенциалочувствительность. Отсутствие аналогичного действия эндоморфинов, которые

обладают не только высоким сродством, но и высокой избирательностью к  $\mu$ -рецепторам (в отличие от морфина), позволяет допустить, что вышеуказанный механизм предполагает взаимодействие лигандов с другими опиоид-подобными рецепторами, которые не являются мишенью для эндоморфинов, но могут связывать экзогенные опиаты.