Національна академія наук України

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця

Реферат

Молекулярні механізми регуляції клітинних взаємодій

Кузнецов Кирило Ігорович – кандидат біологічних наук, науковий співробітник Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця

Кулик Вячеслав Борисович - кандидат біологічних наук, молодший науковий співробітник Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця

Савотченко Аліна Володимирівна – кандидат біологічних наук, науковий співробітник Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця

Янко Роман Васильович – кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця

КиЇв 2017

Сучасна наука постулює, що одним з основних інструментів задіяних до адаптації організму у відповідь на дію численних факторів зовнішнього та внутрішнього середовища є пластичність головного мозку, як важлива та невід'ємна особливість нервової системи, що допомагає змінювати її активність. Під час розвитку та навчання індивідуальні нейрони, синапси та мережі, які вони формують, змінюються як наслідок досвіду. Ці зміни відбуваються на різних рівнях, від функції окремого іонного каналу до морфології нейронів та їхніх мереж, а в часовому діапазоні – від мілісекунд до років. З'ясування механізмів синаптичної пластичності є одним з актуальних питань сучасної нейрофізіології. Явище пластичності нервової системи полягає у зміні характеру передачі сигналів через синапси, або зміні кількості синапсів. Синаптична пластичність модифікує зв'язок між конкретними нейронами, активність локальних нейронних мереж та взаємозв'язки між окремими системами мозку. Основними процесами, які є результатом діяльності мозку і базуються на феноменах пластичності – є навчання та пам'ять. Дослідження останніх років показали, що між цими двома процесами існує глибокий внутрішній зв'язок, як на генетичному, так і на фізіологічному рівнях. Він проявляється у спільному характері активації генів, експресія яких відбувається на різних етапах онтогенезу і впливає на процеси формування коротко- та довготривалої пам'яті. В однієї з частин роботи ми досліджували вплив модифікації поверхневих зарядів мембрани нейронів на різні види пластичності. Відомо, що поверхня нервової клітини густо вкрита негативно зарядженими полісіаловими кислотами (ПСК). Ці сполуки входять до складу глікопротеїдів та гангліозидів зовнішньої поверхні мембрани. Маючи аніонну природу, ПСК залучені у різноманітні механізми клітинної сигналізації. У головному мозку існує два основних носії сіалових кислот: нейронні молекули клітинної адгезії (NCAM) та потенціал-керовані натрієві канали. Полісіалові кислоти впливають на пропускні властивості потенціалактивованих натрієвих каналів через створення локального електричного поля біля компартменту канального рецептора. Комплекс ПСК-NCAM залучений у процеси нейрогенезу, клітинної міграції та аксонного росту. Нейрамінідаза є ключовим ферментом у розщепленні сіалових кислот. Вона зустрічається у багатьох організмах та міститься в різних тканинах, в тому числі і нервовій. Концентрація нейрамінідази істотно варіює в залежності від фізіологічних умов. Численні дослідження стверджують, що коливання кількості позаклітинної нейрамінідази здатні впливати на нервову активність. Результати гістохімічних досліджень показали, що при блокуванні активності нейрамінідази відбувається швидке позаклітинне акумулювання полісіалових кислот у нервовій тканині. Також спостерігається достовірне збільшення спонтанної активності органотипової культури гіпокампа. В експериментах на свіжоізольованих зрізах гіпокампа щурів, було показано вірогідне збільшення викликаних постсинаптичних потенціалів у радіальному шарі зони CA1 внаслідок додавання блокатору нейрамінідази. При дослідженні короткотривалої пластичності гіпокампа, а саме пластичності в умовах

парної стимуляції та посттетанічної потенціації, не було виявлено жодних достовірних різниць у даних показниках після блокування нейрамінідази. Показано достовірне зменшення інтенсивності та вірогідності виникнення довготривалої потенціації, а також підвищення рівня короткотривалої депресії внаслідок блокування нейрамінідази. Пригнічення активності нейрамінідази призводило до вірогідного підвищення епілептиформної активності у двох моделях нападів *in vitro*.

Синаптична передача між нейронами є динамічним процесом, який демонструє різні типи пластичності. Нейрональна пластичність є предметом інтенсивного вивчення протягом останніх десятиліть (Zucker and Regehr, 2002; Blitz et al., 2004). Значна увага у цьому процесі приділяється з'ясуванню ролі різних типів ліганд-та потенціалкерованих каналів мембрани у забезпеченні фізіологічної активності нейронів. Робота цих каналів впливає на зміну локальної концентрації внутрішньоклітинного кальцію, що є ключовою подією як у індукції синаптичної пластичності, так і в регуляції широкого спектру клітинних функцій від збудливості до експресії генів. У зв'язку з цим, наступним етапом досліджень було вивчення динаміки внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію в гангліозних клітинах сітківки (ГКС) щурів та виявлення ролі потенціал-керованих каналів у її змінах. У літературі існує лише декілька робіт, присвячених вивченню кальцієвої сигналізації при різних рівнях експресії деяких типів потенціалкерованих кальцієвих каналів (Margolis et al., 2010) та при змінах синаптичних входів ГКС, що були індуковані ретинальною дегенерацією (Margolis et al., 2008). Проте, роль Kv3 каналів у формуванні кальцієвого сигналу в ГКС залишалась недослідженою. Зокрема, не з'ясовано, як зміни у тонічній високочастотній імпульсації ГКС впливають на динаміку внутрішньоклітинного кальцію.

Таким чином, виникла необхідність дослідження ролі потенціалкерованих калієвих каналів родини Kv3 у забезпеченні тонічної високочастотної генерації ПД та їх впливу на зміни внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію в ГКС ока дорослих ссавців.

З використанням блокаторів тетраетиламонію, 4-амінопіридину, α-дендротоксину та кадмію хлориду нами було встановлено ключову роль Kv3.1/Kv3.2 каналів у підтриманні тонічної високочастотної генерації ПД. Експресія цих каналів забезпечує швидку реполяризацію мембранного потенціалу та високу амплітуду слідової гіперполяризації, що зумовлює відповідно коротку тривалість ПД та скорочення рефрактерного періоду ГКС.

Наявність специфічних Kv3.1/Kv3.2 мРНК було виявлено в даних нейронах за допомогою ПЦР зі зворотною транскрипцією для окремої клітини. Досліджено зміни внутрішньоклітинної концентрації кальцію у відповідь як на викликану високочастотну імпульсацію, так і на викликаний кальцієвий струм. Показано, що амплітуда кальцієвого сигналу лінійно залежить як від частоти генерації ПД, так і від тривалості кальцієвого струму, що свідчить про відсутність внеску кальцій-індукованого викиду кальцію з

клітинних депо ГКС. Виявлено відсутність вкладу низькопорогового кальцієвого струму у формування кальцієвого сигналу в сомі ГКС. Вперше показано, що наявність Kv3.1/Kv3.2 каналів на мембранах ГКС модулює кальцієвий вхід при високочастотній тонічній генерації ПД та запобігає значному зростанню внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію при даній частоті імпульсації, яке може чинити цитотоксичну дію. Дослідження фізіологічних властивостей гангліозних клітин сітківки ока є досить важливими, оскільки синаптичні входи від біполярних та амакринових клітин, ГКС обробляють, кодують і передають аферентну імпульсацію до головного мозку та відіграють ключову роль у реалізації зорової функції.

Протягом останніх десятиліть розуміння того, як мозок отримує та обробляє зорову, слухову, соматосенсорну інформацію та ін., зазнало революційних змін. Найбільший прогрес відбувся у розумінні механізмів формування, передачі та обробки больових сигналів у нормі та патології. Втім, незважаючи на значний поступ у цій галузі, сучасна медицина має надзвичайно скромні можливості для подолання болю та пояснення молекулярних механізмів дії навіть вже існуючих антиноціцептивних препаратів. Раніше вважалося, що аналгетичний ефект опіоїдів зумовлений їх дією на механізми ЦНС. Проте, останнім часом накопичуються докази того, що потужного знеболюючого ефекту можна досягти активацією опіоїдних рецепторів на периферії (особливо при запальних процесах). Відомо, що P2X3-рецептори, які експресуються в первинних сенсорних нейронах і активуються АТФ та її аналогами, задіяні у модуляцію больової чутливості(G. Burnstock., 1972). Водночас, введення селективних антагоністів рецепторів, що містять P2X3-субодиницю, повністю блокує невропатичний та викликаний запаленням біль у піддослідних тварин (K. Alexander *et.al*., 1999). Спільна експресія опіоїдних та P2X3-рецепторів на мембранах нейронів спінальних гангліїв (СГ) обумовлює актуальність пошуку зв’язку між цими об’єктами. Беручи до уваги функціональне призначення цих двох типів рецепторів у організмі, дослідження взаємодії опіоїдних та P2X3-рецепторів на клітинному рівні набувають особливого значення.

Опіоїд-індукована аналгезія широко застосовується в клінічній практиці, проте питання молекулярних механізмів такого знеболення достеменно не з’ясовано. В рамках даної роботи вперше оцінено внесок активності P2X3-рецепторів до низки процесів, що залучаються у знеболення, викликане опіоїдами на рівні периферичної нервової системи. З’ясовано вплив ендогенного опіоїду лей-енкефаліну на активність P2X3-рецепторів у нейронах спінальних гангліїв. Також вперше окреслено роль внутрішньоклітинних біохімічних шляхів у взаємодії опіоїдних рецепторів, котрі опосередковують аналгезію, з P2X3-рецепторами, що відповідають за ноціцепцію. В роботі показано та досліджено подвійний вплив ендогенного агоніста опіоїдних рецепторів на струми, опосередковані P2X3-рецепторами у сенсорних нейронах спінальних гангліїв щурів. Встановлено, що вплив лей-

енкефаліну на P2X3-опосередковані струми в сенсорних нейронах, забезпечується низкою G-білок спряжених механізмів. Доведено, що лей-енкефалін не впливає на десенситизацію P2X3-рецепторів, а протинаправлена дія опіоїда на зазначені рецептори може опосередковуватися активацією чутливих до токсину кашлюку Gi/o- та нечутливих – Gq-білків. Зокрема показано, що зв'язування лей-енкефаліну з μ-опіоїдними 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 пригнічуючий вплив опіоїда. Стимулюючий ефект ендогенного опіоїда був прихований і проявлявся лише в умовах блокування Gi/o-білків токсином кашлюку.

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

Іншими знеболюючими ендо- та екзокринними факторами можна вважати мелатонін та дозовану нормобаричну гіпоксію (ДНГ). Мелатонін є гормоном, який виробляється шишкоподібною залозою в головному мозку. Однією з його позитивних якостей є можливість полегшити біль. Нині відомо, що утворення мелатоніну підвищує синтез ендорфінів, які є природньою знеболювальною речовиною. Мелатонін блокує дію двох ключових ензимів – 5-ліпоксигенази і циклоокісгенази-2, які збільшують рівень запалення і призводять до виникнення болю. Він також перешкоджає вироблення інтерлейкіну-6 та інших прозапальних факторів, які поглиблюють хід запалення.

На сьогодні відомо, що біль - це сигнал який вказує про поруш цілісності організму, чи активації патологічного процесу. Однак не всі патологічні процеси супроводжуються відчуттям болю. Існує ряд патологій при виникненні яких в першу чергу відбувається розростання сполучної тканини (фіброз) в тому чи іншому органі, що призводить до ущільнення його тканини, пригнічення функціональної активності. Тому, виникає доцільність у пошуку методів, шляхів можливої корекції стану сполучної тканини, підвищення функціональної активності та фізіологічної регенерації в печінці, легенях, щитоподібної (ЩЗ) та підшлункової залози (ПЗ). Одними із методів нормалізації фізіологічних функцій, вище перерахованих органів, може бути застосування дозованої нормобаричної гіпоксії (ДНГ), а також введення гормону епіфіза – мелатоніну. Наступну частину роботи присвячено дослідженню та порівнянню впливу екзогенного мелатоніну та ДНГ у весняний та осінній періоди року на стан сполучної тканини та морфометричні показники функціональної активності паренхіматозних

елементів печінки, респіраторного відділу легень, щитоподібної і підшлункової залози у нормотензивних (лінія Вістар) та спонтанно-гіпертензивних (лінія SHR) щурів. Виявлено, що у щурів лінії Вістар та SHR 28-ми добовий вплив як мелатоніну, так і ДНГ у весняний і осінній періоди року підвищує функціональну і синтетичну активність паренхіми печінки. Встановлено, що вплив вище вказаних факторів щурам двох різних ліній призводить до зростання загальної площі альвеолярної поверхні, повітряності легень, поліпшені їх вентиляції та зменшенні кількості елементів сполучної тканини (СТ) в респіраторному відділі легень. Показано, що введення мелатоніну щурам лінії Вістар, незалежно від пори року, знижує процеси фізіологічної регенерації та функціональної активності щитоподібної залози (ЩЗ). Про це свідчить збільшення середньої площі поперечного перерізу фолікулів та площі колоїду, зменшення площі фолікулярного епітелію, зростання внутрішнього діаметру фолікулів та зниження висоти тироцитів, фолікулярно-колоїдного індексу та зростання індексу накопичення колоїду. Введення мелатоніну у весняний період зменшує кількість елементів СТ, а при осінньому впливі, навпаки – відбувається суттєве збільшення ширини міждольової, міждолькової та міжфолікулярної СТ в залозі. Після 28-добового впливу ДНГ в переривчастому режимі у весняний період виявлено ознаки підвищення функціонування ЩЗ, а в осінній період, навпаки – зниження активності залози. Введення мелатоніну щурам лінії SHR у весняний період підвищує синтетичну активність ЩЗ. Виявлено, що у щурів цієї лінії вплив ДНГ у весняний період має ознаки підвищення функціонування ЩЗ, а в осінній період, навпаки – зниження активності залози. Встановлено, що введення мелатоніну стимулює функціональну активність екзо- та ендокринної частини підшлункової залози щурів лінії Вістар у весняний період в більшій мірі, ніж восени. У тварин, які отримували ДНГ виявили зниження активності ендокринної частини залози, а восени, навпаки – активність її зростала. Вплив гіпоксії, незалежно від пори року, знижує ширину прошарків міждолькової та міжацинусної СТ в залозі. Показано, що як екзо-, так і ендокринна частина підшлункової залози щурів лінії SHR в значно меншій мірі реагує на вплив мелатоніну та гіпоксії, ніж у нормотензивних тварин.

Отримані дані можуть мати не тільки теоретичне значення, а й становити певний практичний інтерес для оптимізації сезонного застосування дозованої нормобаричної гіпоксії та мелатоніну при комплексному лікуванні печінки, легень, щитоподібної та підшлункової залози у людей з підвищеним артеріальним тиском.

Наукова новизна: Результати даного циклу наукових праць носять фундаментальний характер. У цій роботі вперше продемонстровано, що блокування ендогенної нейрамінідази призводить до вірогідного зменшення порогу та збільшення інтенсивності епілептиформної активності в гіпокампі у двох моделях епілепсії *in vitro* – габазиновій та низькомагнієвій. Виявлено вірогідне збільшення амплітуди і частоти спонтанної масової електричної

активності в органотипових зрізах гіпокампа після аплікації блокатору нейрамінідази. Продемонстровано вірогідне збільшення амплітуди викликаних постсинаптичних потенціалів у радіальному шарі зони CA1 гіпокампа після преінкубації із NADNA. Вперше показано вплив пригнічення активності нейрамінідази на синаптичну пластичність в препаратах гіпокампа, а саме, збільшення інтенсивності короткотривалої депресії та зменшення вірогідності виникнення та інтенсивності довготривалої потенціації в радіальному шарі зони CA1 гіпокампа щурів внаслідок блокування нейрамінідази. Вперше показано, що пригнічення активності нейрамінідази не призводить до змін проявів синаптичної пластичності, викликаних парною стимуляцією, та посттетанічної потенціації (ПТП) в радіальному шарі зони CA1 гіпокампа щурів.

В роботі вперше отримані дані стосовно механізмів забезпечення високочастотної тонічної генерації ПД у ГКС ока дорослих ссавців. Показано, що здатність ГКС ока дорослого щура до такої генерації можлива завдяки наявності на їх мембранах потенціалкерованих високопорогових калієвих Kv3.1/Kv3.2 каналів, які забезпечують швидку реполяризацію мембрани та високу амплітуду слідової гіперполяризації, що зумовлює відповідно коротку тривалість ПД та скорочення рефрактерного періоду нейрона. Вперше для ГКС ссавців встановлена роль Kv3.1/Kv3.2 каналів у динаміці змін внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію. Показано, що потенціалкеровані Kv3.1/Kv3.2 калієві канали модулюють вхід кальцію у клітину при високочастотній тонічній генерації ПД. Активація цих каналів також запобігає значному зростанню внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію при даній частоті імпульсації, яке може чинити цитотоксичну дію.
В даній роботі вперше показано та досліджено подвійний вплив ендогенного агоніста опіоїдних рецепторів лей-енкефаліну (ЛЕК) на струми, опосередковані P2X3-рецепторами у соматосенсорних нейронах спінальних гангліїв щурів. Встановлено, що вплив ЛЕК на P2X3-опосередковані струми в сенсорних нейронах забезпечується низкою G-білок-спряжених процесів. Доведено, що ЛЕК не впливає на десенситизацію P2X3-рецепторів, а амбівалентна дія опіоїда на зазначені рецептори може опосередковуватися активацією G-білків, чутливих до токсину кашлюку $G_{i/o}$- та нечутливих до цього токсину G_q-білків. Зокрема, вперше показано, що зв'язування ЛЕК з μ-опіоїдними рецепторами призводить до одночасної активації G-білків обох типів, які мали б справляти подвійний вплив на P2X3-рецептори. Однак в контрольних умовах ми реєстрували лише пригнічуючий вплив ЛЕК. Стимулюючий ефект ендогенного опіоїда був прихований і проявлявся лише в умовах блокування $G_{i/o}$-білків токсином кашлюку.

Таким чином, нами вперше показано, що ендогенний агоніст опіоїдних рецепторів викликає два протилежно спрямовані впливи на P2X3-рецептори нейронів спінальних гангліїв, причому обидва ефекти опосередковані активацією фосфоліпази C.

Виявлено, що у нормотензивних (лінія Вістар) та гіпертензивних (лінія SHR) щурів 28-ми добовий вплив як мелатоніну, так і дозованої нормобаричної гіпоксії (ДНГ) у весняний і осінній періоди року підвищує функціональну і синтетичну активність паренхіми печінки. Встановлено, що вплив мелатоніну та ДНГ щурам двох різних ліній (Вістар і SHR) призводить до зростання загальної площі альвеолярної поверхні, повітряності легень, поліпшені їх вентиляції та зменшенні кількості елементів сполучної тканини в респіраторному відділі легень. Показано, що введення мелатоніну щурам лінії SHR у весняний період підвищує синтетичну активність ЩЗ. Виявлено, що у щурів цієї лінії вплив ДНГ у весняний період має ознаки підвищення функціонування ЩЗ, а в осінній період, навпаки – зниження активності залози. Встановлено, що введення мелатоніну стимулює функціональну активність екзо- та ендокринної частини підшлункової залози щурів лінії Вістар у весняний період в більшій мірі, ніж восени

Теоретичне та практичне значення отриманих результатів Отримані дані певною мірою розширюють уявлення про роль ендогенної нейрамінідази у таких явищах, як індукована епілептиформна активність, спонтанна масова електрична активність, та пластичність синаптичної передачі в нейронних мережах гіпокампа. Описані явища розкривають модулюючу дію ендогенної нейрамінідази, яка міститься в організмі, на нервову активність за нормальних умов та при деяких патологічних станах. Крім того, враховуючи той факт, що в основі дії найбільш поширених антивірусних препаратів лежить пригнічення нейрамінідазної активності, отримані дані мають бути взяті до уваги у фармакологічних розробках. Результати роботи представляють передусім фундаментальний інтерес, оскільки вперше отримано дані стосовно ролі потенціалкерованих високопорогових калієвих Kv3.1/Kv3.2 каналів у модуляції припливу кальцію в соми ГКС. Продемонстровано, що при активації низькопорогових кальцієвих каналів не відбувається змін внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію в сомах ГКС. Отримані дані щодо можливої побічної дії блокаторів калієвих каналів, які не впливають безпосередньо на потенціалкеровані кальцієві канали та на динаміку входу кальцію в клітину. Такі дані можуть мати практичне значення при розробці нових фармакологічних препаратів та терапевтичних підходів до лікування певних хвороб сітківки, що пов’язані з порушеннями кальцієвого гомеостазу в ГКС.

Проведені дослідження дозволили виявити та охарактеризувати зв’язок між μ-опіоїдними та P2X3-рецепторами первинних соматосенсорних нейронів СГ щурів, що проявляється в здатності ендогенного опіоїда ЛЕК модулювати струми, опосередковані P2X3-рецепторами у цих нейронах. Результати експериментів розкривають нову функціональну роль опіоїдів, котрі беруть участь у регуляції активності первинних ноціцептивних нейронів. Отримані результати розширюють існуючі уявлення про низку механізмів, що обумовлюють знеболюючий ефект опіоїдів, викликаний їх локальним периферичним застосуванням. Крім того, результати досліджень

свідчать про існування раніше не описаних шляхів регуляції активності P2X3-рецепторів у сенсорних нейронах.

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

Загальна кількість статей за циклом праць 31 з них у міжнародних журналах 20 та 41 тез на міжнародних конференціях.

Загальна кількість посилань на публікації авторів згідно бази даних Google Scholar складає 165, (SCOPUS – 145), сумарний h-індекс (за роботою) Google Scholar = 12, (SCOPUS – 9).

Кузнецов К. І.

Кулик В. Б.

Савотченко А. В.

Янко Р. В.