

РОЛЬ P2X₃-ПУРИНОРЕЦЕПТОРОВ НОЦИЦЕПТИВНЫХ АФФЕРЕНТНЫХ НЕЙРОНОВ В ФОРМИРОВАНИИ БОЛЕВОГО СИНДРОМА ПРИ ВОСПАЛЕНИИ

Поступила 10.09.12

Ионотропные пуриновые рецепторы типа P2X играют важную роль в процессах генерации и передачи ноцицептивных сигналов. Однако роль определенных подтипов данных рецепторов в этих процессах все еще окончательно не выяснена из-за отсутствия селективных модуляторов их работы. В нашей работе исследовалось воздействие негидролизуемого аналога диаденозиновых полифосфатов (АДП) диаденозин 5',5'''-P¹, P⁴-(β, γ-метилен)тетрафосфата (AppCH₂ppA) на пуринорецепторы сенсорных нейронов *in vitro* и его влияния *in vivo* на ноцицепцию у крыс при различных болевых синдромах. Было обнаружено, что данный АДП селективно модулирует работу пуринорецепторов подтипа P2X₃ через механизмы высокоаффинной десенситизации. Было выяснено, что АДП существенно влияет на механизмы периферической, но не центральной сенситизации при воспалении. Данные результаты позволили сделать вывод, что рецепторы подтипа P2X₃ – основные рецепторы, ответственные за передачу ноцицептивной информации в условиях воспаления. Показано также, что рецепторы подтипа P2X₃ практически не участвуют в процессах генерации болевых синдромов нейропатической природы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пуриновые рецепторы P2X₃, диаденозиновые полифосфаты (АДП), нейроны дорсальнокорешковых ганглиев, воспаление, нейропатия.

ВВЕДЕНИЕ

Ноцицептивные (болевые) сигналы возникают в соответствующих соматосенсорных рецепторах – периферических терминалях ноцицептивных первичных афферентных нейронов. От сегментарных ноцицептивных сенсорных единиц (определенной группы нейронов дорсальнокорешковых ганглиев, ДКГ) такие сигналы поступают к нейронам дорсальных рогов спинного мозга и оттуда идут в головной мозг по соответствующим восходящим путям. Острая боль является результатом преимущественно прямого возбуждения ноцицептивных периферических рецепторных структур – сенсорных терминалей высокопороговых афферентных волокон – при действии высокоинтенсивных стимулов различной модальности (механических, тер-

мических, химических), тогда как боль, связанная с воспалением, представляет собой результат относительно продолжительного патологического процесса, возникающего после повреждения тканей организма. Кроме собственно боли, воспаление сопровождается такими явлениями, как аллодиния и гипералгезия, и продолжается в течение длительного времени.

Значительную роль в процессах возникновения и модуляции ноцицептивных сигналов играют пурины. Эти соединения являются специфическими агонистами мембранных пуриновых рецепторов, широко представленных в весьма разнообразных клетках нервной системы. Пуринергические механизмы и соответствующие рецепторы определенных подтипов причастны к возникновению различных аспектов болевых состояний [1–3]. Есть основания полагать, что среди всего разнообразия пуринорецепторов ключевую роль в формировании ноцицептивных сигналов играют ионотропные рецепторы типа P2X [4–7]. Несмотря на то что рецепторы этого типа изучаются уже на протяжении длительного времени [8], сведения о молекулярных механизмах их функционирования и роли этих ре-

¹ Государственная ключевая лаборатория молекулярной и клеточной биологии, Киев (Украина).

² Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев (Украина).

Эл. почта: viatchenko@biph.kiev.ua (В. Ю. Вятченко-Карпинский); nana@biph.kiev.ua (Н. В. Войтенко).

цепторов в генерации и передаче болевых сигналов остаются довольно ограниченными. В значительной мере данные исследования тормозятся из-за отсутствия селективных модуляторов работы пуринорецепторов разных подтипов.

Основным эндогенным агонистом пуринорецепторов является АТФ. В то же время специфическим действием на пуриновые рецепторы обладают аналоги АТФ – диаденозиновые полифосфаты (АДП). Эти эндогенные молекулы обнаружены в значительных количествах в гиппокампе, обонятельной луковице, коре головного мозга и некоторых других отделах нервной системы [9]. Считается, что они способны выступать в роли нейротрансмиттеров в отношении рецепторов, активирующихся внеклеточным АТФ, а также модулировать работу таких рецепторов [10–12].

В настоящей работе представлены результаты исследования влияния синтетического негидролизуемого АДП диаденозин 5',5'''-P¹, P⁴-(β, γ-метил)тетрафосфата (AppCH₂ppA) на ноцицептивные механизмы у крыс в условиях экспериментов *in vitro* и *in vivo* (когда такие эффекты тестировались при развитии ряда болевых синдромов). На основе полученных данных были определены подтипы пуринорецепторов, которые участвуют в формировании указанных синдромов.

МЕТОДИКА

Все опыты с животными проводились согласно протоколам, принятым Комитетом по биоэтике Института физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, и соответствовали требованиям Международной Ассоциации по изучению боли.

Культивирование нейронов ДКГ. Культура первичных сенсорных нейронов (нейронов ДКГ) готовилась по ранее описанному методу [13], модифицированному для условий настоящей работы. Самцов крыс линии Вистар в возрасте двух-трех недель постнатального развития наркотизировали эфиром и декапитировали. Все остальные операции проводились соответственно ранее описанной методике [13]. Приготовленная таким образом культура использовалась в течение одних-двух суток.

Эксперименты проводились на клетках ДКГ, имеющих относительно малые размеры сомы и классифицируемых согласно этим признакам как ноцицептивные первичные афферентные нейроны.

Интегральные трансмембранные ионные токи в нейронах ДКГ регистрировали с помощью методики «пэтч-клэмп» в конфигурации «целая клетка». Потенциал на клеточной мембране поддерживали на уровне -70 мВ. Ответы на действие агониста рецепторов типа P2X цитидин-5'-трифосфата (ЦТФ) измеряли с использованием усилителя А-М Systems 2400 (США) и разработанного сотрудником Института физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины Я. А. Бойчуком программного обеспечения «Ledar». Результаты обрабатывали с применением программ «AnDatRa 3.3», «OriginLab OriginPro 8.0» и «Microsoft Office Excel 2003».

Основным инкубационным раствором, используемым при экспериментальных процедурах, был модифицированный раствор Тироде, имеющий следующий состав (в миллимолях на 1 л): NaCl – 152, KCl – 5, MgCl₂ – 1, CaCl₂ – 2, глюкоза – 10, HEPES – 10. Уровень pH доводили до 7.4 с помощью NaOH. Осмотичность выравнивалась с применением глюкозы и составляла 320 мосм. Раствор, которым заполнялись пипетки, содержал в себе (в миллимолях на 1 л): CsCl – 130, CaCl₂ – 0.5, MgCl₂ – 5, K₂ATP – 5, NaGTP – 0.5, HEPES – 10 и EGTA – 5. Уровень pH доводился до значения 7.2 с помощью CsOH. В качестве агонистов рецепторов типа P2X использовали ЦТФ в концентрации 100 мкМ и упомянутый выше АДП (App CH₂ppA) в концентрациях 100 мкМ и 1 мМ. Все реактивы, за исключением АДП, любезно предоставленного М. Райтом и А. Миллером (Imperial College, Великобритания), были приобретены у фирмы «Sigma» (США).

Эксперименты in vivo. Индукция хронического неинфекционного воспаления. Опыты проводились на крысах линии Вистар. Хроническое воспаление периферических тканей развивалось вследствие подкожной инъекции 100 мкл полного адьюванта Фройнда (ПАФ), разведенного в 0.9 %-ном растворе NaCl в пропорции 1:1, в заднюю конечность крысы. В опыт животные брались через сутки после инъекции ПАФ.

Индукция хронической боли путем компрессии септального нерва (СН). Передавливание СН, приводящее к развитию нейропатии и соответствующего болевого синдрома, выполнялось согласно ранее описанным протоколам [14, 15].

Индукция экспериментального диабета. Развитие нейропатической боли, связанной с диабетической гипералгезией, происходило в условиях индуцированного введением стрептозотоцина (СТЗ) диабета [16]. СТЗ растворяли в цитратном буфере

(концентрация 100 мМ; рН доводился до 4.2 с помощью NaOH). Животные брались в опыт через четыре–семь недель после инъекции СТЗ, когда гипералгезия нейропатической природы становилась отчетливо выраженной (что подтверждалось результатами соответствующих тестов). Контрольной группе крыс внутрибрюшинно инъецировали физиологический раствор. Обе группы животных содержались в идентичных условиях.

Формалиновый тест. Тестирование производилось согласно общепринятой методике [17]. Как известно, в условиях данного теста возникает и острая, и воспалительная боль. 50 мкл 0.5 %-ного раствора формалина инъецировали подкожно в стопу задней конечности. В качестве характерного болевого поведенческого феномена рассматривали подергивания пораженной конечности. Наблюдения осуществлялись в пределах тест-интервала длительностью 45 мин, разделенного на отрезки по 1.0 мин. Регистрацию и предварительный анализ данных выполняли с использованием специальной программы, написанной в нашей лаборатории. Для статистического анализа результатов применяли программу «Microsoft Excel 2003».

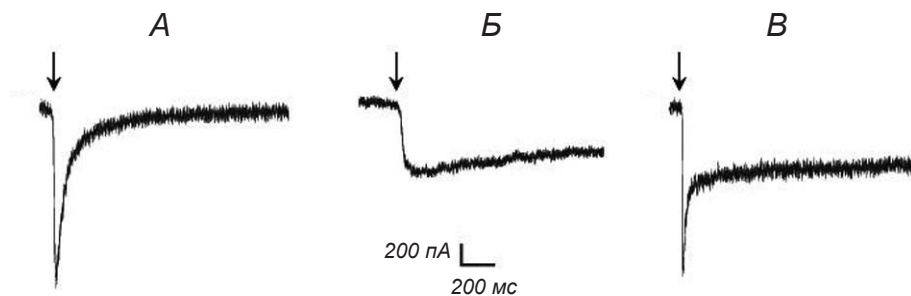
Подошвенный тест (метод Харгривса). Исследования эффектов активации терморецепторов проводились согласно ранее опубликованному методу [18] с помощью специального аппарата («Ugo Basil», Италия). С целью предупреждения ожогов время непрерывной работы источника инфракрасного излучения было ограничено 33 с. Для статистического анализа данных использовали программу «Microsoft Excel 2003».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Селективная модуляция работы пуринорецепторов подтипа P2X₃ под влиянием АДП в условиях in vitro. Всего было исследовано 28 изолированных ноцицептивных нейронов ДКГ малого диаметра (диаметр сомы 20–25 мкм). В ответ на приложение 100 мкМ ЦТФ – агониста рецепторов типа P2X – в этих клетках возникали катионные токи трех видов (рис. 1). Наиболее распространенными (встречались в 17 исследованных клеток) были токи относительно большой амплитуды, достигавшей в ряде случаев нескольких наноампер. Процессы и активации, и инактивации таких токов были достаточно быстрыми (А). Данные кинетические характеристики соответствуют активации P2X-пуринорецепторов подтипа P2X₃ [19]. Гораздо реже (три клетки) наблюдались токи значительно меньшей амплитуды (до нескольких сот пикоампер). Такие токи быстро активировались и очень медленно инактивировались (Б). Подобные характеристики токов соответствуют активации рецепторов подтипа P2X_{2/3} [20]. В остальных случаях (восемь клеток) наблюдались токи с промежуточными характеристиками, что соответствовало одновременной активации рецепторов обоих упомянутых подтипов (В).

Аппликация АДП вызывала в исследованных нейронах ДКГ токи со сходными характеристиками, однако их амплитуда была меньше, чем у токов, которые отмечались при аппликации ЦТФ.

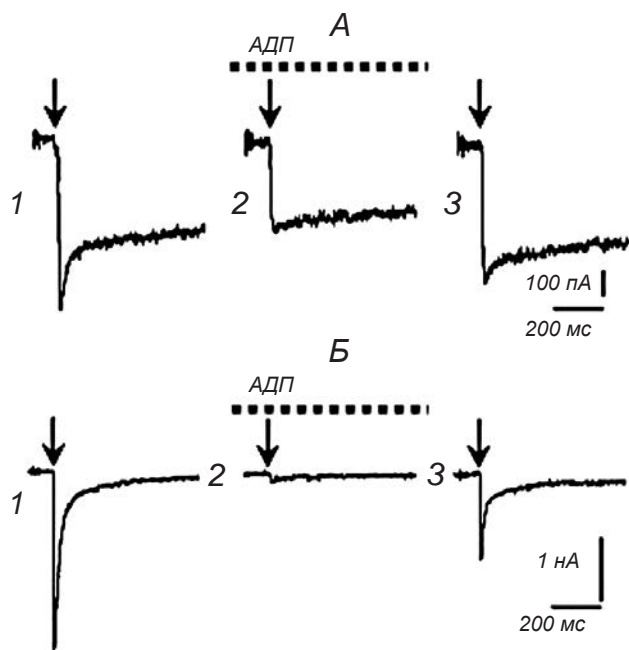
В условиях одновременного приложения 100 мкМ АДП и 100 мкМ ЦТФ в случаях, когда наблюдались смешанные токи (восемь клеток), у последних про-



Р и с. 1. Токи, наблюдаемые в нейронах дорсальнокорешковых ганглиев при аппликации цитидин-5'-трифосфата (стрелками указаны моменты аппликации).

А–В – токи, соответствующие активации рецепторов подтипов P2X₃ (А) и P2X_{2/3} (Б), а также одновременной активации рецепторов обоих подтипов (В).

Р и с. 1. Струми, які спостерігаються в нейронах дорсальнокорінцевих гангліїв при аплікації цитидин-5'-трифосфату (стрілками позначені моменти аплікації).



падал «быстрый» компонент, тогда как «медленный» сохранялся неизменным (рис. 2, А). Эффект был обратимым, и после отмывания «быстрый» компонент подобных токов восстанавливался. Из нейронов ДКГ, в которых наблюдались типичные «быстрые» токи, эффекты одновременного приложения АДП и ЦТФ были тестированы в 15 клетках. Действие АДП могло приводить к полному исчезновению подобных токов (Б). Данный эффект также был в значительной мере обратимым. Степень ингибирования «быстрых» токов в нейронах ДКГ зависела от концентрации АДП. Среднее значение константы половинного ингибирования (IC_{50}), согласно нашим измерениям и расчетам, составляло 11.55 ± 6.34 мкМ.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что АДП в использованных концентрациях селективно модулирует функционирование рецепторов, относящихся исключительно к подтипу P2X₃, и не влияет на функционирование пуринорецепторов других подтипов, экспрессируемых в нейронах ДКГ крыс. Эндогенные АДП обычно рассматриваются как агонисты пуринорецепторов типа P2X [21]. Согласно данным Мельника и соавт. [22], синтетический негидролизруемый АДП ArrCH₂ppA по своим характеристикам идентичен эндогенному АДП диаденозин-тетрафосфату [22, 23]. На основании этого можно сделать вывод о том, что ArrCH₂ppA является агонистом P2X₃-рецепторов. Соответствующие эффекты действительно можно было наблю-

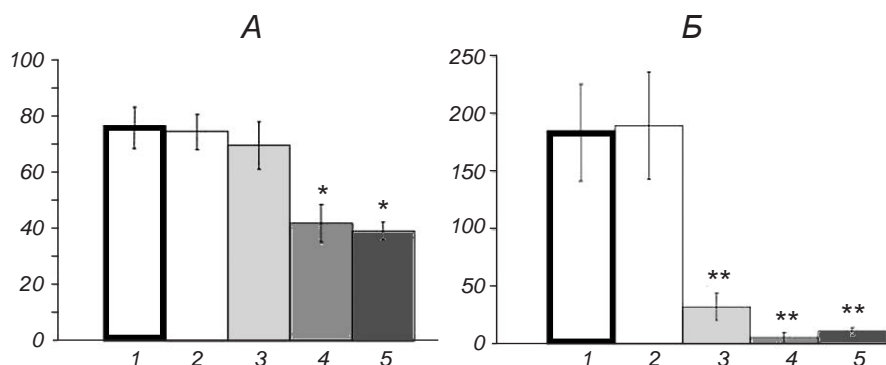
Р и с. 2. Влияние аналога диаденозиновых полифосфатов (АДП) на ионные токи, вызванные в нейронах дорсальнокорешковых ганглиев приложением цитидин-5'-трифосфата (ЦТФ).

А – в случае смешанного тока, соответствующего совместной активации пуринорецепторов подтипов P2X₃ и P2X_{2/3}; Б – в случае активации только рецепторов подтипа P2X₃. 1 – токи, вызванные изолированной аппликацией ЦТФ; 2 – токи в условиях аппликации АДП; 3 – токи после отмывания АДП. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Р и с. 2. Вплив аналога діаденозинових поліфосфатів (АДП) на іонні струми, викликані в нейронах дорсальнокоріневих гангліїв прикладанням цитидин-5'-трифосфату.

дать, если концентрацию АДП существенно повышали. Ингибирующий же эффект ArrCH₂ppA в отношении ионных токов через P2X₃-рецепторы, наблюдавшийся в наших опытах, можно, видимо, интерпретировать как результат высокоаффинной десенситизации, которая характерна для пуринорецепторов данного подтипа [24]. Полученные в настоящей работе результаты позволяют определить ArrCH₂ppA как высокоселективный модулятор рецепторов подтипа P2X₃.

P2X₃-рецепторы как основные молекулярные рецепторные структуры, ответственные за генерацию болевых сигналов при воспалении. Для определения роли рецепторов подтипа P2X₃ в генерации болевых сигналов при острой боли и воспалении в исследованиях *in vivo* был использован формалиновый тест. Данный метод позволяет оценить чувствительность животного как к острой, так и к воспалительной боли. Инъекция формалина (50 мкл 0.5 %-ного раствора) производилась подкожно в подошву задней конечности. В качестве поведенческого проявления болевой реакции в данных условиях рассматривались подергивания пораженной конечности. Изолированное введение 5 %-ного формалина вызывало типичные двухфазные поведенческие ответы. Первая фаза – фаза острой боли – длилась в среднем 6 мин, после чего частота подергиваний конечности существенно падала. Начало второй фазы – фазы тонической боли – определяли как повторное увеличение частоты характерных поведенческих болевых проявлений; длительность указанной фазы в среднем составляла 35 мин. По истечении этого времени подопытные животные уже не демонстрировали признаков дискомфорта и боли. Среднее значение общего количества характерных болевых поведенческих феноменов на протяжении первой фазы в



Р и с. 3. Влияние аналога диаденозиновых полифосфатов (АДП) на количество ноцицептивных поведенческих реакций (подергиваний конечности) у крыс в условиях формалинового теста.

А – во время фазы острой, *Б* – тонической боли. * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$. 1 – в условиях контроля; 2–5 – в условиях воздействия 1 нМ, 1, 10 и 100 мкМ АДП соответственно. По вертикали – количество подергиваний конечности в пределах периодов наблюдения; показаны значения средних по группе \pm стандартное отклонение.

Р и с. 3. Вплив аналога діаденозинових поліфосфатів (АДП) на кількість ноцицептивних поведінкових реакцій (сіпань кінцівки) у щурів в умовах формалінового тесту.

исследованной нами группе животных составляло в среднем 76.3 ± 6.8 , а на протяжении второй – 185.5 ± 41.1 ($n = 6$).

Изолированные подкожные инъекции в подошву задней конечности 100 мкл АДП в концентрации 100 мкМ не вызывали существенных изменений поведения экспериментальных животных. Единичные подергивания конечности наблюдались в таких случаях в течение 4 мин непосредственно после инъекции, после чего животные практически не демонстрировали признаков дискомфорта. Общее количество болевых проявлений на протяжении временного интервала, соответствующего в условиях формалинового теста фазе острой боли, составляло 6.7 ± 1.8 , а в интервале, соответствующем фазе тонической боли, – 0.3 ± 0.2 ($n = 3$). Таким образом, введение АДП само по себе не вызывало сколь-нибудь существенных болевых эффектов; незначительные проявления боли в начале периода наблюдения, видимо, связаны в основном с инъекцией как таковой.

В условиях одновременных подкожных введений в конечность формалина и АДП (последнего – в концентрациях 1 нМ, 1, 10 или 100 мкМ) ($n = 5$ для каждой группы) двухфазный характер болевой поведенческой реакции сохранялся. В данном случае на протяжении фазы острой боли при использовании АДП в концентрациях 1 нМ и 1 мкМ статистически достоверных изменений количества

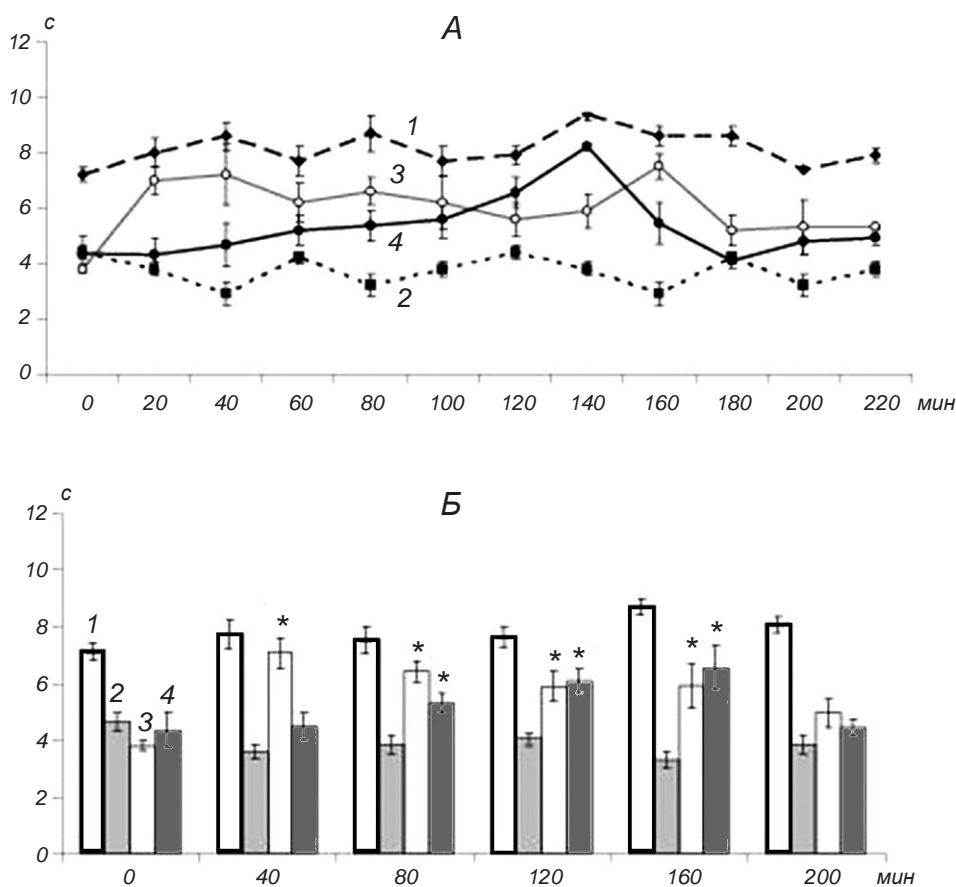
подергиваний конечности не наблюдалось, а при концентрациях АДП 10 и 100 мкМ количество проявлений ноцицептивных реакций в пределах первой фазы по сравнению с количеством таковых после изолированного введения формалина становилось заметно меньше (рис. 3, *А*). Общее количество подергиваний конечности в течение указанной фазы в случаях концентраций АДП 1 нМ, 1, 10 и 100 мкМ составляло в среднем 74.2 ± 6.4 , 69.3 ± 8.4 , 41.8 ± 6.7 и 39.0 ± 3.2 , что соответствовало 97.2 ± 8.4 , 90.8 ± 11 , 54.7 ± 8.7 и 51.1 ± 4.2 % значений, наблюдаемых в условиях изолированного введения формалина. В пределах второй фазы тонической боли (*Б*) при концентрации АДП 1 нМ статистически достоверных изменений не отмечалось, но при концентрациях 1, 10 и 100 мкМ интенсивность ноцицептивных проявлений (количество подергиваний конечности) становилась достоверно меньшей. Общее количество подергиваний на протяжении этой фазы равнялось в среднем 190.2 ± 46.7 , 32.3 ± 11.9 , 5.8 ± 4.2 и 10.8 ± 3.2 , что соответствовало 102.5 ± 25.2 , 17.4 ± 6.4 , 3.1 ± 2.3 и 5.8 ± 1.7 % количества реакций, наблюдаемых в случае изолированного введения формалина. Сама длительность второй («воспалительной») фазы под влиянием АДП в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ становилась значительно меньшей, составляя 19, 29 и 35 % таковой в условиях изолированного действия формалина. Значения IC_{50} АДП в условиях формалинового те-

ста составляли 4.7 ± 4.1 мкМ для фазы острой боли и 0.3 ± 0.1 мкМ – для фазы тонической боли.

Преимущественное влияние АДП на периферическую, но не центральную сенситизацию в условиях воспаления. Для выяснения, на какие именно механизмы сенситизации в нервной системе влияет АДП, применялось тестирование с помощью термической стимуляции конечности (методика Харгривса). Данный метод позволяет вести наблюдения в течение длительного времени. Ноцицептивные поведенческие тест-реакции вызывались локальной ноцицептивной термостимуляцией подошвы задней конечности с использованием инфракрасного излучателя. Кондиционирующие влияния длитель-

ной боли обуславливались воспалением периферических тканей, вызванным инъекцией ПАФ, развитием болевого синдрома после перетяжки СН или развитием невропатической гипералгезии вследствие СТЗ-индуцированного диабета. Характерная ноцицептивная поведенческая реакция представляла собой отдергивание стимулируемой конечности, латентный период которого измерялся.

Подкожное введение в подошву задней конечности 100 мкл АДП в концентрации 100 мкМ ($n = 3$) само по себе не приводило к развитию специфических болевых феноменов. Каких-либо отличий от поведения контрольной группы животных ($n = 3$), которым делались аналогичные инъекции физиоло-



Р и с. 4. Влияние аналога диаденозиновых полифосфатов (АДП) на латентный период (ЛП) поведенческой реакции (отдергивания конечности) при термоноцицептивной стимуляции подошвы задней конечности крыс в тесте Харгривса при подкожном и интратекальном введениях АДП.

А – динамика значений ЛП на протяжении 220 мин периода наблюдения в контроле (*1*), в условиях воспаления, вызванного инъекциями полного адьюванта Фройнда – ПАФ (*2*), и в условиях такого воспаления при подкожном (*3*) и интратекальном (*4*) введениях АДП в момент времени, соответствующий началу периода наблюдения. *Б* – диаграммы средних значений ЛП отдергивания конечности в тех же условиях *1–4*, что и на *А*, в различные периоды интервала наблюдения (мин). * $P < 0.05$ при сравнении со значениями в группе *2*.

Р и с. 4. Вплив аналога діаденозинових поліфосфатів (АДП) на латентний період поведінкової реакції (відсмикування кінцівки) при термоноцицептивній стимуляції підшківної задньої кінцівки щурів у тесті Харгрівса при підшкірному та інтратекальному введеннях АДП.

гического раствора, практически не наблюдалось.

После подкожной инъекции 50 %-ного раствора ПАФ в подошву задней конечности у животных в течение суток развивалось воспаление, которое сопровождалось стойкой гипералгезией. Средний латентный период характерной болевой тест-реакции на термостимуляцию (отдергивания конечности) сокращался более чем вдвое, составляя в среднем всего 48.7 ± 2.1 % значения, которое демонстрировали животные контрольной группы. При ноцицептивной тест-стимуляции контралатеральной конечности, в которую ПАФ не вводили, результаты полностью соответствовали таковым в контрольной группе ($n = 6$).

Подкожное введение АДП животным с воспалением периферических тканей, вызванным инъекцией ПАФ, вызывало явный эффект обезболивания, который наблюдался уже через 20 мин после инъекции АДП и длился на протяжении нескольких часов (рис. 4). О развитии относительной гипоалгезии свидетельствовало существенное увеличение среднего латентного периода характерной болевой реакции по сравнению с таковым у крыс с воспалением, которым АДП не вводили. При концентрациях АДП 10, 20, 50 и 100 мкМ латентный период проявлений характерной болевой реакции в среднем составлял соответственно 94.9 ± 3.3 , 86.6 ± 2.5 , 65.8 ± 4.9 и 74.6 ± 3.0 % значений, которые наблюдались в контрольной группе ($n = 6$). Некоторое уменьшение латентного периода характерной болевой реакции на фоне влияния АДП в относительно высоких концентрациях может быть связано с тем, что в данных условиях АДП начинает действовать уже не только как модулятор, но и как агонист пуринорецепторов; это приводит к их активации и, соответственно, возбуждению ноцицептивных нейронов.

В условиях интратекального введения 20 мкМ АДП на уровне люмбального отдела спинного мозга животным с ПАФ-индуцированным периферическим воспалением эффект обезболивания проявлялся, но только через 100–120 мин после инъекции данного агента (рис. 4). Эффект длился всего 60–80 мин, после чего латентный период болевой реакции вновь сокращался до показателей, близких к таковым при воспалении в отсутствие действия АДП (в среднем 66.2 ± 3.2 %; $n = 6$).

В группе животных с компрессией СН термическая стимуляция подошвы ипсилатеральной конечности по методу Харгривса инициировала характерную болевую реакцию со средним латентным

периодом, составляющим 71.4 ± 2.9 % значения аналогичного показателя у животных контрольной группы. Это свидетельствовало о наличии выраженной гипералгезии. При стимулировании же интактной контралатеральной конечности результаты соответствовали таковым в контрольной группе ($n = 6$).

В условиях нейропатической гипералгезии, которая развивалась вследствие СТЗ-индуцированного диабета, латентный период характерной болевой реакции в тесте Харгривса составлял в среднем 74.5 ± 1.5 % показателей у животных контрольной группы ($n = 5$).

Подкожные инъекции АДП (50 мкМ) животным, у которых была произведена компрессия СН, не приводили к существенному уменьшению степени гипералгезии. Латентный период характерной болевой реакции в тесте Харгривса в условиях нейропатии указанного генеза составлял 77.0 ± 1.4 показателей у животных контрольной группы, т. е. был достаточно близок к соответствующему значению в отсутствие действия АДП ($P > 0.05$). Заметных позитивных эффектов не наблюдалось и при аналогичных инъекциях АДП (20 мкМ) животным с гипералгезией, вызванной СТЗ-индуцированным диабетом. У них средний латентный период отдергивания конечности равнялся 73.5 ± 1.9 % контрольного значения, т. е. различия между характеристиками ноцицептивной реакции после введения АДП и в отсутствие такого воздействия были недостоверными ($P > 0.05$). Таким образом, введение АДП животным, у которых развивалась нейропатия под влиянием двух различных факторов (после повреждения СН и в условиях диабета), оказалось практически неэффективным. Показатели болевых реакций, вызванных в этих условиях термонотицептивным раздражением, свидетельствовали о наличии выраженной гипералгезии. При этом они если и изменялись после введения АДП в дозе, которая оказалась эффективной в условиях развития воспалительной боли, то очень слабо.

Согласно данным, полученным в нашей работе, активация рецепторов подтипа P2X₃, видимо, представляет собой один из основных механизмов возникновения воспалительной боли. Результаты же опытов с введением АДП в условиях последствий компрессии СН и наличия диабетической гипералгезии показали, что участие таких рецепторов в поддержании нейропатической боли, очевидно, минимально. Данные интратекального введения

АДП при ПАФ-індуцированном воспалении мож-но интерпретировать следующим образом. АДП обеспечивают модуляцию периферической сенситизации ноцицепторов, а не центральной сенситизации проводящих путей спинного мозга или отделов головного мозга, ответственных за формирование болевой реакции. Характеристики анальгетических эффектов АДП в случае интратекального введения не противоречат представлениям, согласно которым данные агенты влияют именно на нейроны ДКГ, а не на проводящие пути в спинном мозгу. Существенная задержка в данных случаях может быть обусловлена относительно медленным поступлением АДП из спинномозгового канала к клеткам ДКГ [25, 26].

Таким образом, результаты нашего исследования показали, что пуринорецепторы подтипа P2X₃ играют ключевую роль в генерации и проведении болевых сигналов при периферическом воспалении. В то же время эти рецепторы не играют существенной роли в случаях боли нейропатической природы.

Авторы выражают благодарность Н. Лозовой, М. Райту и А. Миллеру за предоставленные АДП.

Работа выполнена при поддержке целевой комплексной программы НАН Украины „Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій”, гранта ДФФД молодым докторам наук, гранта ДФФД Ф46.2/001.

В. Ю. Вятченко-Карпінський^{1,2}, Г. А. Савченко²,
Н. В. Войтенко^{1,2}

РОЛЬ P2X₃-ПУРИНОРЕЦЕПТОРІВ НОЦИЦЕПТИВНИХ АФФЕРЕНТНИХ НЕЙРОНІВ У ФОРМУВАННІ БОЛОВОГО СИНДРОМУ ПРИ ЗАПАЛЕННІ

¹ Державна ключова лабораторія молекулярної та клітинної біології, Київ (Україна).

² Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

Резюме

Ионотропні пуринові рецептори типу P2X відіграють важливу роль у процесах генерації та передачі ноцицептивних сигналів. Проте роль певних підтипів даних рецепторів у цих процесах все ще остаточно не з'ясована через брак селективних модуляторів їх роботи. У нашій роботі досліджувалася дія негідролізованого аналога діаденозинових поліфосфатів (АДП), що не гідролізується – діаденозин 5',5'''-P¹, P⁴-(β, γ-метилен)тетрафосфату (AppCH₂ppA) – на пуринорецептори сенсорних нейронів *in vitro* та його вплив

in vivo на ноцицепцію у щурів при різних больових синдромах. Було виявлено, що даний АДП селективно модулює роботу пуринорецепторів підтипу P2X₃ через механізми високоафінної десенситизації. Було з'ясовано, що АДП істотно впливає на механізми периферичної, але не центральної сенситизації при запаленні. Дані результати дозволили зробити висновок, що рецептори підтипу P2X₃ – основні рецептори, відповідальні за передачу ноцицептивної інформації в умовах запалення. Показано також, що рецептори підтипу P2X₃ практично не беруть участі в процесах генерації больових синдромів нейропатичної природи.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. K. Hori, N. Ozaki, S. Suzuki, and Y. Sugiura, “Upregulations of P2X₃ and ASIC3 involve in hyperalgesia induced by cisplatin administration in rats,” *Pain*, **149**, No. 2, 393-405 (2010).
2. K. Migata, T. Moriyama, M. Koquchi, et al., “Modulation of P2X receptors in dorsal root ganglion neurons of streptozotocin-induced diabetic neuropathy,” *Neurosci. Lett.*, **452**, No. 2, 200-203 (2009).
3. A. Zhang, Y. Gao, X. Zhong, et al., “Effect of sodium ferulate on the hyperalgesia mediated by P2X₃ receptor in the neuropathic pain rats,” *Brain Res.*, **1313**, 215-221 (2010).
4. J. Barclay, S. Patel, G. Dorn, et al., “Functional downregulation of P2X₃ receptor subunit in rat sensory neurons reveals a significant role in chronic, neuropathic and inflammatory pain,” *J. Neurosci.*, **22**, No. 18, 8139-8147 (2002).
5. D. A. Cockayne, P. M. Dunn, Y. Zhong, et al., “P2X₂ knockout mice and P2X₂/P2X₃ double knockout mice reveal a role for the P2X₂ receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP,” *J. Physiol.*, **567**, No. 2, 621-639 (2005).
6. P. Honore, K. Kage, J. Mikusa, et al., “Analgesic profile of intrathecal P2X₃ antisense oligonucleotide treatment in chronic inflammatory and neuropathic pain states in rats,” *Pain*, **99**, Nos. 1/2, 11-19 (2002).
7. V. Souslova, P. Cesare, Y. Ding, et al., “Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X₃ receptors,” *Nature*, **407**, No. 6807, 1015-1017 (2000).
8. C. Kennedy, “P1- and P2-purinoceptor subtypes – an update,” *Arch. Int. Pharmacodyn. Tér.*, **303**, 30-50 (1990).
9. F. Rodriguez-Pascual, R. Cortes, M. Torres, et al., “Distribution of [³H] diadenosine tetraphosphate binding sites in rat brain,” *Neuroscience*, **77**, No. 1, 247-255 (1997).
10. M. T. Miras-Portugal, J. Gualix, and J. Pintor, “The neurotransmitter role of diadenosine polyphosphates,” *FEBS Lett.*, **430**, Nos. 1/2, 78-82 (1998).
11. J. Pintor, M. A. Diaz-Rey, M. Torres, and M. T. Miras-Portugal, “Presence of diadenosine polyphosphates – Ap4A and Ap5A – in rat brain synaptic terminals. Ca²⁺ dependent release evoked by 4-aminopyridine and veratridine,” *Neurosci. Lett.*, **136**, No. 2, 141-144 (1992).
12. J. Pintor, M. Diaz-Hernández, J. Gualix, et al., “Diadenosine polyphosphate receptors. From rat and guinea-pig brain to human nervous system,” *Pharmacol. Theor.*, **87**, Nos. 2/3, 103-105 (2000).
13. E. Sokolova, A. Nistri, and R. Giniatullin, “Negative cross-talk between anionic GABA_A and cationic P2X receptors of rat dorsal root ganglion neurones,” *J. Neurosci.*, **21**, No. 14, 4958-4968 (2001).

14. G. M. Pitcher, J. Ritchie, and J. L. Henry, "Nerve constriction in the rat: model of neuropathic surgical and central pain," *Pain*, **83**, No. 1, 37-46 (1999).
15. Z. Seltzer, R. Dubner, and Y. Shir, "A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury," *Pain*, **43**, No. 2, 205-218 (1990).
16. L. Shutov, I. Kruglikov, O. Gryshchenko, et al., "The effect of nimodipine on calcium homeostasis and pain sensitivity in diabetic rats," *Cell. Mol. Neurobiol.*, **26**, Nos. 7/8, 1541-1557 (2006).
17. F. Capone and M. Aloisi, "Refinement of pain evaluation techniques. The formalin test," *Ann. Ist. Super. Sanita*, **40**, No. 2, 223-229 (2004).
18. K. Hargreaves, R. Dubner, F. Brown, et al., "A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia," *Pain*, **32**, No. 1, 77-88 (1988).
19. E. Sokolova, A. Skorinkin, I. Moiseev, et al., "Experimental and modeling studies of desensitization of P2X₃ receptors," *Mol. Pharmacol.*, **70**, No. 1, 373-382 (2006).
20. F. M. Smith, P. P. Humphrey, and R. D. Murrell-Lagnado, "Identification of amino acids within the P2X₂ receptor C-terminals that regulate desensitization," *J. Physiol.*, **520**, No. 1, 91-99 (1999).
21. R. Gómez-Villafuertes, J. Gualix, M. T. Miras-Portugal, and J. Pintor, "Adenosine 5'-tetrphosphate (Ap₄), a new agonist on rat midbrain synaptic terminal P2 receptors," *Neuropharmacology*, **39**, No. 12, 2381-2390 (2000).
22. С. І. Мельник, М. Райт, Дж. В. Теннер та ін., "Аналог діаденозинових поліфосфатів модулює передачу сигналу в зрізах гіпокампа", *Фізіол. журн.*, **52**, № 4, 9-12 (2006).
23. S. Melnik, M. Wright, J. A. Tanner, et al., "Diadenosine polyphosphate analog controls postsynaptic excitation in *CA3-CA1* synapses via a nitric oxide-dependent mechanism," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **318**, No. 2, 579-588 (2006).
24. E. B. Pratt, T. S. Brink, P. Bergson, et al., "Use-dependent inhibition of P2X₃ receptors by nanomolar agonist," *J. Neurosci.*, **25**, No. 32, 7359-7365 (2005).
25. E. Bourinet, A. Alloui, A. Monteli, et al., "Silencing of the Ca_v3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception," *EMBO J.*, **24**, No. 2, 315-324 (2005).
26. C. Q. Li, J. M. Xu, D. Liu, et al., "Brain derived neurotrophic factor (BDNF) contributes to the pain hypersensitivity following surgical incision in the rats," *Mol. Pain*, **4**, 27 (2008).