

Regulacja funkcji kanałów jonowych Na⁺ przez receptory opioidowe*

Grzegorz Witkowski¹, Paweł Szulczyk²

¹Studium Medycyny Molekularnej, Warszawa

²Akademia Medyczna w Warszawie, I Wydział Lekarski, Katedra i Zakład Fizjologii Klinicznej i Doświadczalnej

Streszczenie

Receptory opioidowe typu μ należą do grupy receptorów opioidowych, które modyfikują funkcję licznych efektorów błonowych (cyklaza adenylowa, kanały jonowe K⁺, Ca⁺⁺ i Na⁺) i cytoplazmatycznych (aktywacja fosfolipazy A2, kinazy białkowej typu C, kinazy MAPK, hamowanie kinazy białkowej typu A). Fosforylacja potencjałozależnych kanałów jonowych Na⁺ przez kinazę białkową typu A i C prowadzi do zmiany kinetyki prądu jonowych Na⁺. Celem pracy było zbadanie mechanizmu transdukcji sygnału od receptora opioidowego typu μ do potencjałozależnych kanałów jonowych. Receptory opioidowe aktywowano przez podanie DAMGO – syntetycznego, specyficznego agonisty receptora μ . Podanie DAMGO wywoływało spadek amplitudy oraz zmianę kinetyki prądu jonowego Na⁺ w neuronach niepiramidowych. Efekt był hamowany po podaniu inhibitorów kinaz białkowych A i C. Z kolei podanie aktywatora kinazy A i C zmieniało kinetykę i amplitudę prądu jonowego Na⁺ w sposób podobny do DAMGO. W neuronach piramidowych kory przedczołowej nie wykazano wpływu aktywacji receptora opioidowego typu μ na prąd jonowy Na⁺. Wnioski: W neuronach niepiramidowych kory przedczołowej aktywacja receptorów opioidowych typu μ moduluje funkcje potencjałozależnych kanałów jonowych Na⁺ w mechanizmie zależnym od kinazy białkowej A i C.

Wstęp

Receptory opioidowe występują w neuronach ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego. Zastosowanie alkaloidowych agonistów receptorów opioidowych (morfina i pochodne: fentanyl, buprenorfina, itp.)

* Praca była finansowana z budżetu Komitetu Badań Naukowych

Projekt No: KBN-0575/P05/2005/28

oraz z budżetu Akademii Medycznej w Warszawie projekt No: IMA/W2/2005

wywołuje szereg efektów klinicznych, które zwykle dzielimy na efekty ośrodkowe i obwodowe. Do działań ośrodkowych zaliczamy: działanie przeciwbólowe, uspakajające, przeciwkaszlowe, depresję czynności oddechowej, obniżenie progu drgawkowego, działanie pro- i przeciwwymiotne, zwężenie źrenic. Leki pobudzające receptory opioidowe działają na układ dokrewny - powodując wzrost uwalniania hormonu antydiuretycznego, i zahamowanie uwalniania części przysadkowych hormonów tropowych: folitropiny, lutropiny, tyreotropiny. Do działań obwodowych należą: wzrost napięcia mięśni gładkich jelit, indukcja uwalniania histaminy z komórek tucznych (skurcz oskrzeli i skórne odczyny alergiczne). Wyżej opisane, efekty kliniczne wiążą się z aktywacją trzech typów receptorów opioidowych - μ , δ i κ [3]. W obrębie każdego typu wyróżnianych jest szereg podtypów np. $\mu 1$ i $\mu 2$. Pod względem budowy biochemicznej podtypy te charakteryzują się około 60% homologią. Wszystkie obecnie znane receptory opioidowe są receptorami metabotropowymi działającymi za pośrednictwem białek $G_{i/o}$.

Ligandy receptorów opioidowych są klasyfikowane w różnoraki sposób. Możemy je podzielić np. na: endogenne (enkefaliny, endorfiny, dynorfiny) i egzogenne (morfina), naturalne i syntetyczne (enkefaliny - DAMGO, DPDPE), wybiórcze i niewybiórcze, o działaniu ago-, antagonistycznym lub mieszanym.

Zaburzenia funkcji kory przedczołowej leżą u podstaw procesów związanych z ostrym i przewlekłym przyjmowaniem środków opioidowych i ściśle związane są z powstaniem uzależnienia. Są dwa argumenty przemawiające za tym, że funkcja neuronów kory przedczołowej jest modyfikowana przez morfinę. Po pierwsze w neuronach piramidowych i niepiramidowych kory przedczołowej występuje ekspresja receptorów opioidowych [10]. Ponadto podawanie egzogennej morfiny modyfikuje funkcje neuronów kory przedczołowej [10].

Mechanizm działania receptorów opioidowych

Stwierdzono, że aktywacja receptora opioidowego typu μ wywołuje następujące efekty komórkowe [14]:

1. Działanie ograniczone do błony komórkowej polega na aktywacji receptora opioidowego, aktywacji białka G i modyfikacji przed podjednostki białka G efektorów błonowych. Do efektorów błonowych, kontrolowanych w tym mechanizmie, przez receptory typu μ należą:
 - cyklaza adenyloza (jest hamowana),
 - kanały jonowe potasowe prostownicze dokomórkowe (są aktywowane),
 - potencjałozależne kanały jonowe wapniowe typu N, P, Q i R (są hamowane).

2. Ponadto aktywacja receptorów typu μ może modyfikować funkcje efektorów komórkowych za pośrednictwem wtórnych przekaźników cytoplazmatycznych do których należą:

- fosfolipazy A2 (jest aktywowana),
- kinazy białkowej typu C (PKC, jest aktywowana),
- kinazy białkowej typu A (PKA, jest aktywowana),
- kinazy typu MAPK (jest aktywowana),
- kanały jonowe wapniowe typu L (są aktywowane),
- kanałów potasowych wapniowozależne (są aktywowane),
- hamowanie potencjałozależne kanały wapniowe typu T (są hamowane),

Dane powyższe wskazują, że aktywacja receptorów opioidowych typu μ modyfikuje funkcje jonowych K^+ , oraz kinazy białkowej A (PKA) i C (PKC).

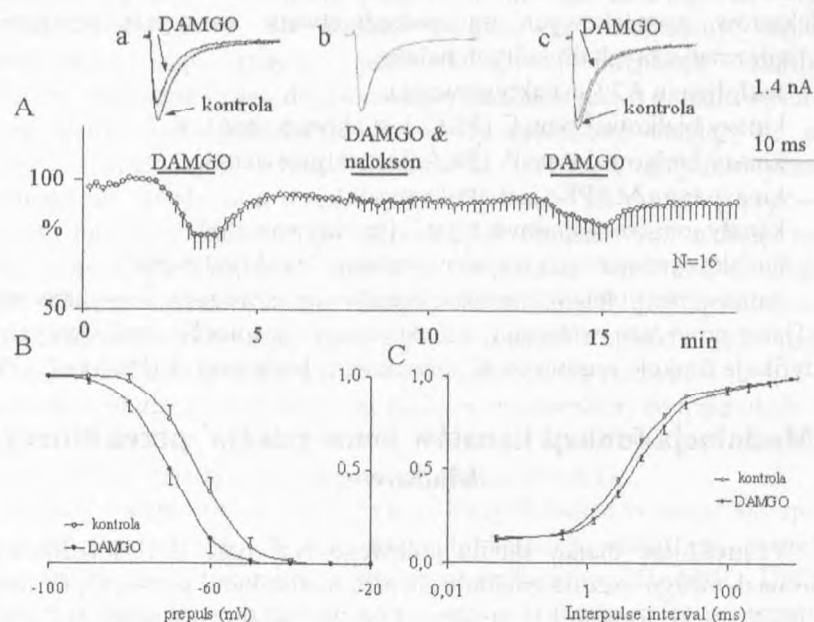
Modulacja funkcji kanałów jonowych Na^+ przez kinazy białkowe.

W strukturze białka kanału jonowego Na^+ typu IIA zlokalizowanego w neuronach mózgu szczura znajduje się pięć miejsc które podlegają fosforylacji przez PKA [8, 9]. Również w strukturze białka kanału jonowego Na^+ znajdują się miejsca fosforylowane przez PKC [2]. Wykazano, że aktywacja PKA i PKC powoduje zmianę kinetyki różnych podtypów kanałów jonowych Na^+ [8, 9, 12, 13].

Wpływ PKC na kanały jonowe Na^+ w neuronach kory mózgu, jąder podkorowych, komórkach mięśnia sercowego i mięśni poprzecznie prążkowanych szczura polegał na redukcji amplitudy prądu, zwolnieniu kinetyki inaktywacji oraz przesunięciu krzywej inaktywacji zależnej od potencjału w kierunku bardziej ujemnych wartości potencjału błonowego [11, 12]. Z kolei wpływ aktywacji PKA polegał na redukcji amplitudy prądu jonowego [8].

Wpływ aktywacji receptorów opioidowych typu μ na prądy jonowe Na^+ w neuronach kory przedczołowej

Jest stosunkowo niewiele danych doświadczalnych wskazujących na obecność kontroli potencjałozależnych kanałów jonowych typu Na^+ przez receptory opioidowe typu μ . Wykazano np., że aktywacja prądów jonowych Na^+ przez PGE_2 może być hamowana w czasie aktywacji receptorów opioidowych typu μ [4]. Z kolei liczne dane doświadczalne wskazują, że potencjałozależne kanały jonowe Na^+ w sercu mogą być hamowane bezpośrednio przez agonistów receptora typu μ z pominięciem samego receptora opioidowego [8]. Kontrola



Ryc 1. A. Wpływ DAMGO na amplitudę prądu jonowego Na⁺. Oś pionowa: znormalizowana amplituda prądu jonowego Na⁺ rejestrowanego w neuronach niepiramidowych w warunkach kontrolnych, w czasie podania DAMGO (1 μm) oraz w czasie podania DAMGO (1 μm) razem z naloksonem (10 μm). Podanie agonisty i antagonisty receptora opioidowego oznaczono linią poziomą. Oś pozioma: czas w minutach. Powyżej przedstawiono oryginalne zapisy prądu jonowego Na⁺ w warunkach kontrolnych i podczas podawania DAMGO (a,c) i DAMGO z naloksonem (b). Prąd jonowy Na⁺ indukowany był poprzez bodziec depolaryzujący do -15 mV, trwający 30 ms, poprzedzony 100 ms prepulsem do -100 mV. Potencjał błonowy utrzymywano na poziomie -80 mV.

B. W celu zbadania inaktywacji zależnej od potencjału błonowego błona komórkowa była depolaryzowana przez impuls testowy (-15 mV, 30 ms) poprzedzony bodźcami depolaryzującymi trwającymi 1000 ms o wzrastającej amplitudzie (od -120 do -10 mV). Na osi pionowej przedstawiono znormalizowaną amplitudę maksymalnego prądu Na⁺ wywołaną przez impuls testowy, na osi poziomej odłożono amplitudę bodźca poprzedzającego impuls testowy.

C. Powrót z inaktywacji prądów jonowych Na⁺ był badany przy zastosowaniu protokołu zawierającego dwa identyczne impulsy depolaryzujące - warunkowy i testowy (do -15 mV) trwające 30 ms. Odstęp między impulsami narastał od 0,05 do 3600 ms. Wykres: znormalizowana amplituda prądu jonowego Na⁺ indukowanego przez impuls testowy (oś pionowa), przedstawiona jako funkcja wzrastającego odstępu czasu pomiędzy impulsem warunkowym i testowym (oś pozioma). Wykres w skali logarytmicznej.

kanałów jonowych Na^+ przez receptory opioidowe typu μ za pośrednictwem białek G i wtórnych przekaźników cytoplazmatycznych jest bardzo prawdopodobna biorąc pod uwagę:

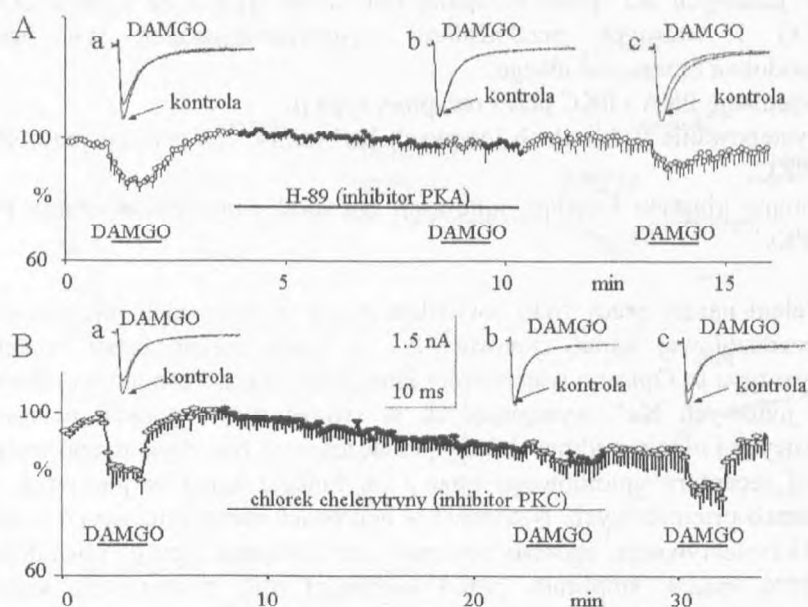
- a. modulację PKA i PKC przez receptory typu μ ,
- b. występowanie w kanałach jonowych Na^+ miejsc fosforylacji przez PKA i PKC,
- c. zmianę kinetyki kanałów jonowych Na^+ pod wpływem działania PKA i PKC.

Celem naszej pracy było stwierdzenie czy w neuronach piramidowych kory przedczołowej kanały jonowe Na^+ są kontrolowane przez receptory opioidowe typu μ . Opisano właściwości kinetyczne tetrodotoksyno-wrażliwych, prądów jonowych Na^+ , występujących w świeżo rozproszonych neuronach piramidowych i niepiramidowych kory przedczołowej. Nie stwierdzono wpływu aktywacji receptora opioidowego typu μ na funkcje kanałów jonowych Na^+ w neuronach piramidowych. Natomiast w neuronach niepiramidowych podanie DAMGO (selektywnego agonisty receptory opioidowego typu μ) powodowało około 20% spadek amplitudy prądu jonowego Na^+ , przesunięcie krzywej inaktywacji w stronę hiperpolaryzacji, wydłużenie czasu powrotu z inaktywacji oraz zwolnienia szybkości narastania i stałej czasu inaktywacji prądu (ryc. 1). Zmiany były odwracalne i blokowane przez antagonistę receptorów opioidowych - nalokson. Wydaje się więc, że aktywacja receptora opioidowego w znaczącym stopniu przyczynia się do hamowania pobudliwości neuronów niepiramidowych kory przedczołowej i w konsekwencji do dysinhibicji neuronów piramidowych.

Zbadano mechanizm transdukcji sygnału od receptora opioidowego typu μ do kanałów jonowych Na^+ w niepiramidowych kory przedczołowej. Stwierdzono, że zablokowanie aktywacji białka G poprzez podanie dokomórkowe niehydrolizującego analogu nukleotydu guaninowego GDP β S znosi efekt hamowania prądu Na^+ przez DAMGO. Wynik ten wskazuje, że w transdukcji sygnału bierze udział białko G.

Podanie forskoliny – aktywatora cykazy adenylowej (co prowadzi do aktywacji PKA) i estru forbolowego (PMA) – aktywatora PKC powodowało redukcję amplitudy, zwolnienie szybkości narastania i zwolnienie stałej czasu inaktywacji prądu Na^+ . Zatem aktywatory PKA i PKC działały na prądy jonowe Na^+ podobnie jak aktywacja receptora opioidowego typu μ .

Całkowite zahamowanie wpływu aktywacji receptora opioidowego typu μ na prąd jonowy Na^+ występowało po inkubacji neuronów niepiramidowych z inhibitorem PKA (H-89).



Ryc 2. A. Wpływ DAMGO i selektywnego inhibitora PKA - H-89 (0,1 μm) na amplitudę prądu jonowego Na⁺. Oś pionowa: znormalizowana amplituda prądu jonowego Na⁺, oś pozioma: czas w minutach. W obecności H-89 podawanego do środowiska zewnątrzkomórkowego nie obserwowano zmniejszenia amplitudy prądu jonowego Na⁺ w czasie podawania DAMGO. Powyżej: oryginalne zapisy prądu jonowego Na⁺ w warunkach kontrolnych i podczas podawania DAMGO (a,c) oraz w trakcie inkubacji z H-89 (b).

B. Wpływ DAMGO i selektywnego inhibitora PKC - chlorku chelerytryny (3 μm) na amplitudę prądu jonowego Na⁺. W czasie podawania inhibitora PKC efekt DAMGO na amplitudę prądu jonowego Na⁺ był znoszony. Oś pionowa: znormalizowana amplituda prądu jonowego Na⁺, oś pozioma: czas w minutach. DAMGO podawano przed, w trakcie i po zakończeniu inkubacji komórki z chlorkiem chelerytryny. Powyżej: oryginalne zapisy prądu jonowego Na⁺ przed i w trakcie podawania DAMGO w warunkach kontrolnych (a, c) i w warunkach inkubacji z chlorkiem chelerytryny (b).

Podobnie podanie chlorku chelerytryny – blokera PKC również hamowało wpływ aktywacji receptora opioidowego μ na kanały jonowe Na⁺ (ryc. 2).

Wyniki powyższych badań wskazują, że białko G oraz PKA i PKC biorą udział w transdukcji sygnału od receptora opioidowego typu μ do kanału jonowego Na⁺.

Piśmiennictwo

1. Alreja, M., Aghajanian G.K. (1993) Opiates suppress a resting sodium dependent inward current and activate an outward potassium current in locus coeruleus neurons. *J. Neurosci.*, 13, 3525-3532.
2. Cantrell, A.R., Catterall, W.A. (2001). Neuromodulation of Na⁺ channels: an unexpected form of cellular plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 2(6), 397-407.
3. Corbett, A., Henderson, G. (2002) Opioid Receptors, <http://www.biotrend.com/pdf/oprev.pdf>
4. Gold, M.S., Levine, J.D. (1996) DAMGO inhibits prostaglandin E2-induced potentiation of a TTX-resistant Na⁺ current in rat sensory neurons in vitro. *Neurosci. Lett.*, 212, 83-86.
5. Ingram S.L., Williams J.T. (1994) Opioid inhibition of I_h via adenylyl cyclase. *Neuron*, 13, 179-186.
6. Ingram S.L., Williams J.T. (1996) Modulation of the I_h by cyclic nucleotides in guinea pig primary afferent neurons. *J. Phys.*, 492, 97-106
7. Joshi S. K., Gebhart G.F. (2003) Nonopioid Actions of U50,488 Enantiomers Contribute to Their Peripheral Cutaneous Antinociceptive Effects. *JPET.*, 305, 919-924
8. Smith, R.D., Goldin, A.L. (1997) Phosphorylation at a Single Site in the Rat Brain Sodium Channel Is Necessary and Sufficient for Current Reduction by Protein Kinase A. *J. Neurosci.*, 17, 6086 - 6093.
9. Smith, R.D., Goldin, A.L. (2000) Potentiation of rat brain sodium channel currents by PKA in *Xenopus* oocytes involves I-II linker. *AM.J. Physiol., Cell Physiol.*, 278, 638-645.
10. Steketee J.D. (2002) Neurotransmitter systems of the medial prefrontal cortex: potential role in sensitization to psychostimulants. *Br. Res. Rev.*, 41, 203-228.
11. Svoboda, K., Lupica C. (1998) Opioid Inhibition of Hippocampal Interneurons via Modulation of Potassium and Hyperpolarization-Activated Cation (I_h) Currents. *J. Neurosci.*, 18, 7084-7098.
12. Qu et al. (1996) Phosphorylation of the S1505 in the cardiac Na⁺ channel is required for modulation by protein kinase C. *J. Gen. Physiol.*, 108, 375-379.
13. Vijayaragavan, K., Boutjdir, M., Chahine, M. (2004) Modulation of Na_v1.7 and Na_v1.8 Peripheral Nerve Sodium Channels by Protein Kinase A and Protein Kinase C. *J. Neurophysiol.* 91, 1556 - 1569.
14. Williams, J.T. et al. (2001) Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol. Rev.*, 81, 299-343.
15. Wimpey, T.L., Chavkin, C. (1991) Opioids activate both an inward rectifier and a novel voltage-gated potassium conductance in the hippocampal formation. *Neuron*, 6(2), 281-289.

Adres do korespondencji:

Grzegorz Witkowski

Akademia Medyczna w Warszawie, I Wydział Lekarski

Katedra i Zakład Fizjologii Klinicznej i Doświadczalnej

Krakowskie Przedmieście 26/28

00-927 Warszawa

tel.: (48 22) 826 42 75

e-mail: gregor@amwaw.edu.pl