

## УЧАСТИЕ ПРОТЕИНКИНАЗЫ С В РЕЦЕПТОР-ОПОСРЕДОВАННЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПРОЦЕССАХ

© 2019 г. В. А. Пеннийнен<sup>1,\*</sup>, В. Б. Плахова<sup>1</sup>, И. В. Рогачевский<sup>1</sup>, С. Г. Терехин<sup>1</sup>,  
С. А. Подзорова<sup>1</sup>, Б. В. Крылов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное Государственное бюджетное учреждение науки  
Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН,  
199034 Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6, Россия

\*E-mail: pvalentina2@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.02.2019 г.

После доработки 22.03.2019 г.

Принята к публикации 16.04.2019 г.

Коленовая кислота является специфическим агонистом опиоидоподобных рецепторов, обнаруженных в мембране сенсорного нейрона. Эти рецепторы связаны с каналами  $\text{Na}_v1.8$ , участвующими в кодировании ноцицептивной информации. Данные, полученные методом локальной фиксации потенциала, свидетельствуют о том, что на мембранном уровне процесс лиганд-рецепторного связывания коленовой кислоты проявляется в снижении эффективного заряда активационного воротного устройства каналов  $\text{Na}_v1.8$ . Применение специфического ингибитора протеинкиназы С не влияло на этот рецептор-опосредованный механизм модуляции указанных каналов. На тканевом уровне получен противоположный результат: указанный ингибитор (Тамохифен) полностью блокировал сигнал, вызванный приложением коленовой кислоты и направленный радиально на геном нервной клетки. Тот факт, что Тамохифен устранял нейрит-стимулирующий эффект коленовой кислоты, доказывает участие протеинкиназы С в исследуемом каскадном процессе в качестве последовательного звена.

**Ключевые слова:** коленовая кислота, ноцицепция, сенсорные нейроны, метод локальной фиксации потенциала, метод органотипического культивирования, каналы  $\text{Na}_v1.8$ , протеинкиназа С

**DOI:** 10.1134/S0235009219030089

### ВВЕДЕНИЕ

Коленовая кислота является специфическим агонистом обнаруженных нами в мембране сенсорного нейрона опиоидоподобных рецепторов, которые передают сигнал к каналам  $\text{Na}_v1.8$ , кодирующим ответы ноцицепторов (Крылов и др., 1999; Krylov et al., 2017). В роли трансдуктора сигнала здесь выступает  $\text{Na, K-ATPase}$  в комплексе с Src-киназой (Пеннийнен и др., 2014; Шелых и др., 2017; Penniуunen et al., 2018). Этот рецептор-опосредованный сигнал направлен также и на геном сенсорного нейрона, что приводит к регуляции роста нейритов (Penniуunen et al., 2018). Другие участники данного внутриклеточного каскадного процесса, активируемого коленовой кислотой и связанного с сигнальным комплексом  $\text{Na, K-ATPase/Src}$ , остаются малоизученными.

Исследования последних двадцати лет показали, что  $\text{Na, K-ATPase}$ , помимо своей хорошо известной насосной функции, выполняет также и функцию трансдуктора сигнала в мембранах клеток различных тканей (Komietiani et al., 1998; Xie,

Askari, 2002; Khalaf et al., 2018; Pratt et al., 2018). Данная функция запускается очень низкими (наномолярными) концентрациями убаина, которые были обнаружены в крови человека (Hamlyn et al., 1991). Видимо, эндогенные концентрации убаина достаточны для запуска внутриклеточных каскадных процессов, причем функцию трансдуктора сигнала в этих случаях выполняют не G-белки, а  $\text{Na, K-ATPase/Src}$ -киназный комплекс. Указанный комплекс осуществляет клеточно-специфическую трансдукцию сигнала, активируя пути Raf/MEK/ERK, PLC/РКС, PI3K/Akt, а также  $\text{Ca}^{2+}$  сигнализацию и генерацию ROS (Tian et al., 2006; Aperia et al., 2016; Cui, Xie, 2017). Отметим, что в клетках, которые способны на пролиферативный рост, запускаемая убаином передача сигналов может активировать как Src-зависимый, так и Src-независимый пути (Xie, Askari, 2002; Liu et al., 2007; Wu et al., 2013; Madan et al., 2017). На клетках линии LM- $\alpha$ 3-1 был продемонстрирован Src-независимый способ активации путей ERK и Akt с участием PI3K и РКС, индуцируемый убаином (Madan et al.,

2017). В сенсорном нейроне нами было обнаружено, что очень низкие эндогенные концентрации убаина трансдуктор-опосредованно активируют Src-зависимый p38-МАР-киназный сигнальный путь (Пенниайнен и др., 2016). Однако рецептор-опосредованный Src-зависимый механизм внутриклеточной сигнализации, запускаемый коеновой кислотой при взаимодействии с опиоидоподобным рецептором, остается неизученным.

Цель настоящей работы – выяснение роли протеинкиназы С в указанном рецептор-опосредованном сигнальном процессе в первичном сенсорном нейроне.

## МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Метод органотипической культуры эмбриональной нервной ткани.** Исследования проведены на эксплантатах дорзальных ганглиев 10-12-дневных куриных эмбрионов, культивируемых в чашках Петри на подложках из коллагена в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Sanyo, Япония) в течение трех суток при 36.5°C и 5% -ном CO<sub>2</sub>. В работе использовали питательную среду следующего состава: 45% раствора Хенкса, 40% среды Игла, 10% фетальной сыворотки коровы с добавлением глюкозы (0.6%), глутамина (2 ммоль/л) и гентамицина (100 ед/мл) (Penniyaunen et al., 2018). В ряде экспериментов в культуральную среду добавляли специфический ингибитор протеинкиназы С Tamoxifen (Tmf) (Tsubaki et al., 2018; Valvassori et al., 2017) и коеновую кислоту. Контрольными служили эксплантаты, культивированные только в условиях питательной среды. Для визуализации объектов использовался микроскоп Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия). Полученные изображения анализировались с использованием программ ImageJ и ZEN\_2012. Для количественной оценки роста эксплантатов применялся морфометрический метод. Индекс площади (ИП) рассчитывался как отношение площади зоны роста эксплантата к исходной центральной площади, где находились немигрирующие клетки. Значение ИП контрольных эксплантатов принимали за 100%. Работа выполнена на оборудовании ЦКП “Конфокальная микроскопия” Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

**Метод локальной фиксации потенциала.** В электрофизиологических экспериментах нами был использован метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp method) в конфигурации “регистрация активности целой клетки” (“whole-cell”) (Hamill et al., 1981). Объектом исследования являлись полученные методом краткосрочного культивирования изолированные сенсорные нейроны, выделенные из областей L<sub>5</sub>–S<sub>1</sub> ганглиев спинного мозга новорожденных крысят линии *Wistar*. Интактные нервные клетки были получе-

ны путем культивирования изолированных нейронов в течение двух часов в стандартных питательных средах с использованием CO<sub>2</sub>-инкубатора. Более подробно модифицированный метод краткосрочного культивирования диссоциированных сенсорных нейронов описан ранее (Плахова и др., 2003; Penniyaunen et al., 2018).

Работу проводили на животных из ЦКП “Биоколлекция ИФ РАН”.

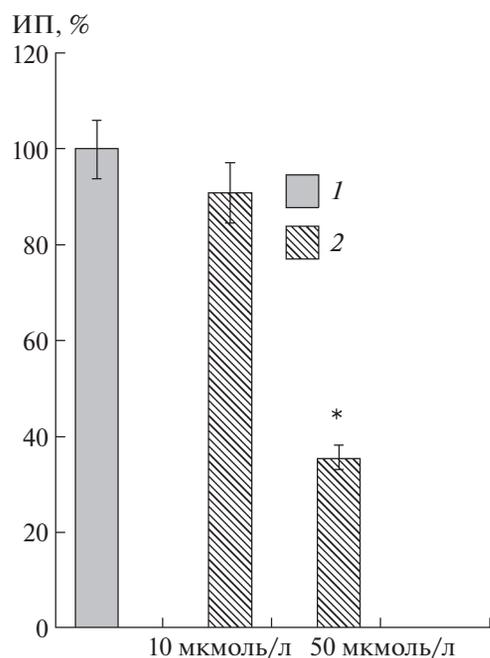
Для регистрации характеристик каналов Na<sub>v</sub>1.8. применялись стандартные растворы (концентрации представлены в ммоль/л). Внеклеточный: NaCl – 65, CaCl<sub>2</sub> – 2, MgCl<sub>2</sub> – 2, Choline Cl – 70, HEPES Na – 10, TTX – 0.0003, pH 7.4. Внутриклеточный: CsF – 100, NaCl – 10, CsCl – 40, MgCl<sub>2</sub> – 2, HEPES Na – 10, Tmf – 0.01, pH 7.2. Наличие ионов фтора во внутриклеточном растворе и полное отсутствие ионов калия позволили избавиться от всех компонентов калиевых и кальциевых токов (Kostyuk et al., 1975; Elliott, Elliott, 1993). Благодаря присутствию во внеклеточном растворе тетродотоксина блокировалось функционирование быстрых тетродотоксинчувствительных каналов, что делало возможным регистрировать ответы только одной популяции натриевых каналов, Na<sub>v</sub>1.8. В работе использованы реактивы фирмы Sigma (США).

Токи натриевых каналов Na<sub>v</sub>1.8 фиксировались до и после приложения коеновой кислоты в присутствии Tmf во внутриклеточном растворе. Оценку изменения потенциалочувствительности каналов Na<sub>v</sub>1.8 осуществляли на основании регистрации величины эффективного заряда ( $Z_{\text{eff}}$ ) активационного воротного устройства указанных каналов с применением метода Алмерса (Almers, 1978). Подробно этот подход описан в наших предыдущих работах (Крылов и др., 1999; Krylov et al., 2017).

Статистическую обработку полученных результатов выполняли в программе STATISTICA 8.0 (StatSoft, США) с использованием *t*-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего. Различия принимались статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Метод органотипической культуры ткани** был использован для выяснения участия протеинкиназы С во внутриклеточных каскадных процессах, рецептор-опосредованно запускаемых коеновой кислотой. Нами было исследовано влияние Tmf, специфического ингибитора протеинкиназы С, на рост нейритов сенсорных нейронов. При добавлении Tmf в питательную среду в концентрации 50 мкмоль/л наблюдали достоверное ингибирование роста нейритов дорзальных



**Рис. 1.** Влияние ингибитора протеинкиназы С Tmf на рост нейритов дорзальных ганглиев 10-12-дневных куриных эмбрионов.

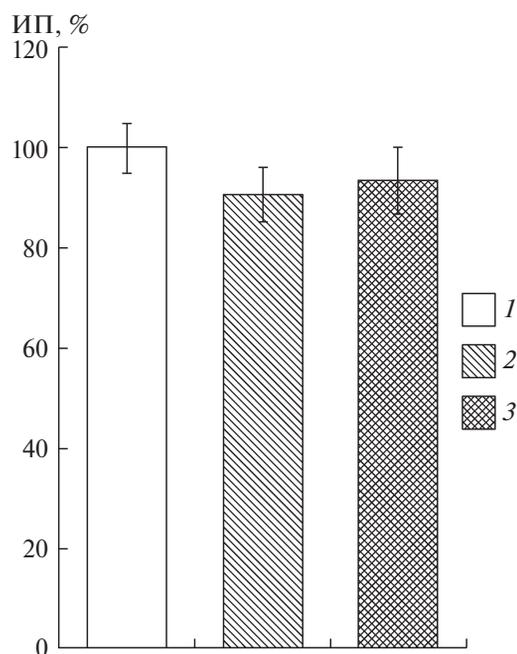
1 – контроль; 2 – Tmf.

По оси ординат – индекс площади эксплантатов (ИП, %).

\* – различия достоверны относительно контрольных эксплантатов,  $p < 0.05$ .

ганглиев на  $65 \pm 7\%$  ( $n = 28$ ,  $p < 0.05$ ) по отношению к контрольным значениям ( $n = 30$ ). В концентрации 10 мкмоль/л Tmf практически не влиял на рост нейритов: ИП экспериментальных эксплантатов не отличался от своего контрольного значения (рис. 1).

Как было отмечено выше, выраженная нейрит-стимулирующая активность коеновой кислоты реализуется благодаря ее воздействию на опиоидоподобный рецептор, связанный с Na,K-АТФазой, которая выполняет в данном случае функцию трансдуктора сигнала и передает его далее на геном. Ранее нами в аналогичных экспериментальных условиях было показано, что коеновая кислота в концентрации 10 нмоль/л значительно стимулирует рост нейритов сенсорных нейронов (Penniуunen et al., 2018). Результаты, полученные в настоящей работе, показывают, что нейрит-стимулирующий эффект коеновой кислоты устранялся при культивировании дорзальных ганглиев в среде, содержащей указанную субстанцию (10 нмоль/л) и ингибитор протеинкиназы С Tmf (10 мкмоль/л) (рис. 2). Так как в данной концентрации сам по себе Tmf не влияет на рост нейритов, можно заключить, что протеинкиназа С участвует во внутриклеточном каскаде, кото-



**Рис. 2.** Изменение индекса площади эксплантатов дорзальных ганглиев 10–12-дневных куриных эмбрионов при воздействии коеновой кислоты (10 нмоль/л) в присутствии ингибитора протеинкиназы С Tmf (10 мкмоль/л).

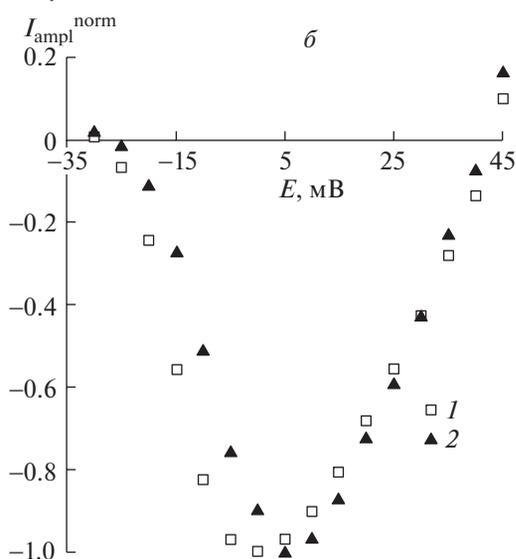
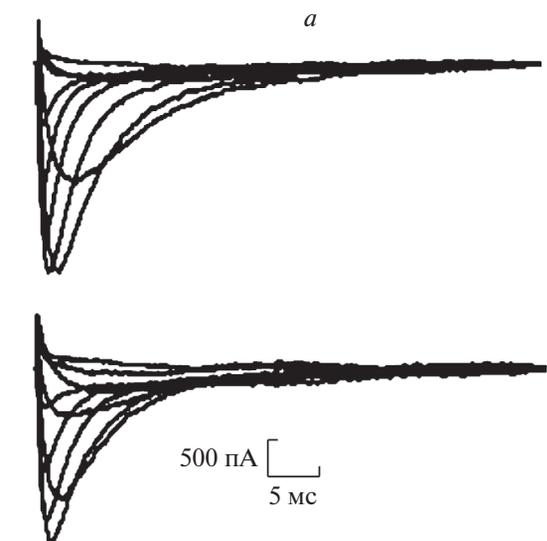
1 – контроль; 2 – Tmf; 3 – коеновая кислота + Tmf.

По оси ординат – индекс площади эксплантатов (ИП, %).

\* – различия достоверны относительно контрольных эксплантатов,  $p < 0.05$ .

рый рецептор-опосредованно запускается коеновой кислотой.

**Метод локальной фиксации потенциала** позволил исследовать участие протеинкиназы С в процессе передачи сигнала в тангенциальном направлении (вдоль мембраны нейрона) от опиоидоподобного рецептора к каналам  $Na_v1.8$ . Во всех экспериментах, включая контрольные, внутриклеточный раствор содержал специфический ингибитор протеинкиназы С Tmf в концентрации 10 мкмоль/л. Эта концентрация была выбрана на основании представленных выше результатов, поскольку применение метода органотипической культуры ткани показало, что именно такая концентрация Tmf приводила к блокированию рецептор-опосредованного влияния коеновой кислоты на рост нейритов. На рис. 3,а представлены записи семейств натриевых токов  $Na_v1.8$ , полученные до и после приложения коеновой кислоты (100 нмоль/л) с наружной стороны мембраны. На рис. 3,б приведены нормированные пиковые вольт-амперные характеристики натриевых токов, построенные обычным способом (Hodgkin, Huxley, 1952) в контрольном эксперименте и после воздействия коеновой кислоты.



**Рис. 3.** Влияние коеновой кислоты на потенциало-чувствительность медленных натриевых каналов  $Na_v1.8$  в экспериментах с использованием внутриклеточного раствора, содержащего ингибитор протеинкиназы С Tmf в концентрации 10 мкмоль/л.

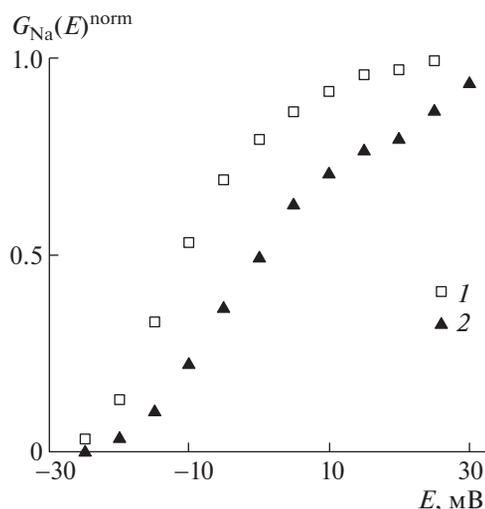
*a* – записи семейств медленных натриевых токов, зарегистрированных до (вверху) и после (внизу) приложения коеновой кислоты (100 нмоль/л) с внешней стороны мембраны нейрона.

Тестирующий потенциал изменялся от  $-35$  до  $45$  мВ с шагом  $10$  мВ. Во всех записях поддерживаемый потенциал, длительность которого составляла  $500$  мс, был равен  $-110$  мВ. Токи утечки и емкостные токи вычтены программным способом.

*b* – нормированные значения пиковых вольт-амперных характеристик медленных натриевых каналов.

Зависимости построены по данным контрольного эксперимента (1) и после приложения  $100$  нмоль/л коеновой кислоты (2).

Как видно, приложение коеновой кислоты вызывает сдвиг вольт-амперной характеристики вправо в область положительных потенциалов,



**Рис. 4.** Потенциалозависимость хордовой проводимости медленных натриевых каналов, полученная в экспериментах с использованием внутриклеточного раствора, содержащего ингибитор протеинкиназы С Tmf в концентрации  $10$  мкмоль/л.

Функция  $G_{Na}(E)$  была нормирована, т.е. строилась  $G_{Na}(E)^{norm} = G_{Na}(E)/G_{Na}^{max}(E)$ , где  $G_{Na}^{max}(E)$  – ее максимальное значение. Показаны данные контрольного эксперимента (1) и результаты, полученные после приложения  $100$  нмоль/л коеновой кислоты (2).

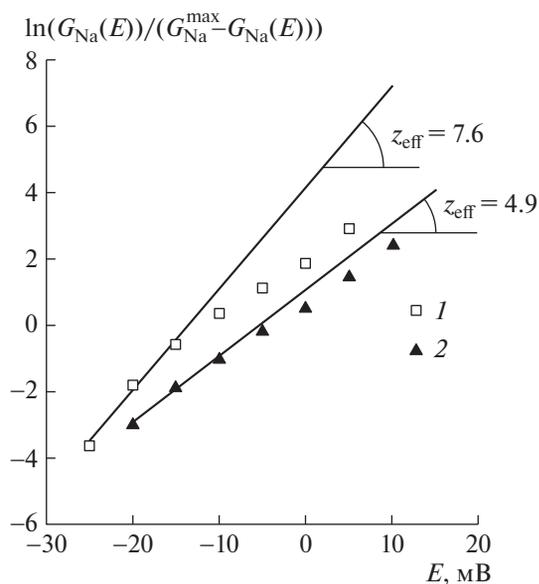
что свидетельствует о взаимодействии этого агента с обнаруженным нами опиоидоподобным рецептором и, следовательно, об активации рецептор-опосредованного механизма сигнализации (Крылов и др., 1999; Krylov et al., 2017; Penniyaynen et al., 2018). Важным количественным параметром, который определяет электровозбудимость мембраны ноцицептивного нейрона, является эффективный заряд активационной воротной системы медленных натриевых каналов  $Na_v1.8$ . Для его измерения были построены зависимости хордовой проводимости от величины трансмембранной разности потенциалов  $G_{Na}(E)$ . Эта функция имеет вид

$$G_{Na}(E) = I_{max}(E)/(E - E_{Na}),$$

где  $E_{Na}$  – величина потенциала реверсии натриевого тока,  $I_{max}(E)$  – амплитудное значение тока при деполяризующем потенциале  $E$ .

Функция  $G_{Na}(E)$  имеет начальный S-образный участок, крутизна которого отражает особенности потенциало-чувствительности активационного процесса. После построения нормированной функции  $G_{Na}^{norm}(E)$  (рис. 4) легко видеть, что крутизна этого участка изменяется после действия коеновой кислоты.

Для количественной оценки функции  $G_{Na}(E)$  обычно применяется распределение Больцмана.

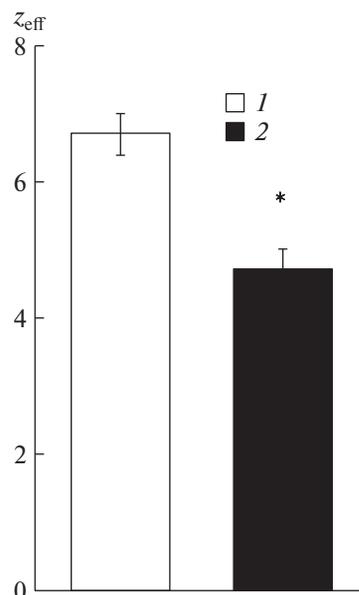


**Рис. 5.** Присутствие во внутриклеточном растворе ингибитора протеинкиназы С Tmf в концентрации 10 мкмоль/л не блокирует эффект снижения потенциалочувствительности активационной воротной системы медленных натриевых каналов.

Экспоненциальные функции, представленные в логарифмическом масштабе (ось ординат), позволяют определить величины  $Z_{\text{eff}}$  по тангенсам углов наклона асимптот, проведенных к начальным участкам этих функций в контрольном опыте (1) и после приложения 100 нмоль/л коеновой кислоты с внешней стороны мембраны клетки (2).

При этом предполагается, что стационарные характеристики переходов между состояниями активационной воротной системы натриевых каналов определяются потенциалозависимостью хордовой проводимости. Для оценки величины  $Z_{\text{eff}}$  активационной системы нами применяется другой подход, впервые предложенный создателями мембранной ионной теории (Hodgkin, Huxley, 1952) и модифицированный позднее (Almers, 1978). Рисунок 5 иллюстрирует этот способ построения  $Z_{\text{eff}}$ . Тангенсы углов наклона регрессионных прямых построены по первым трем точкам и определяют предельную логарифмическую чувствительность (Almers, 1978) каналов  $\text{Na}_v1.8$  к изменениям трансмембранного потенциала. В представленном эксперименте величина  $Z_{\text{eff}}$ , измеренная в единицах заряда электрона, изменяется от 7.6 (в контрольном эксперименте) до 4.9.

На рис. 6 представлены средние значения эффективного заряда в контрольных экспериментах и при действии коеновой кислоты в концентрации 100 нмоль/л. Во всех опытах происходит снижение величины  $Z_{\text{eff}}$  в присутствии Tmf во внутриклеточном растворе, что полностью совпадает с данными, полученными в предыдущей работе.



**Рис. 6.** Снижение эффективного заряда активационной воротной системы медленных натриевых каналов после приложения коеновой кислоты в экспериментах с использованием внутриклеточного раствора, содержащего ингибитор протеинкиназы С Tmf в концентрации 10 мкмоль/л.

1 – контрольные значения; 2 – после приложения коеновой кислоты (100 нмоль/л).

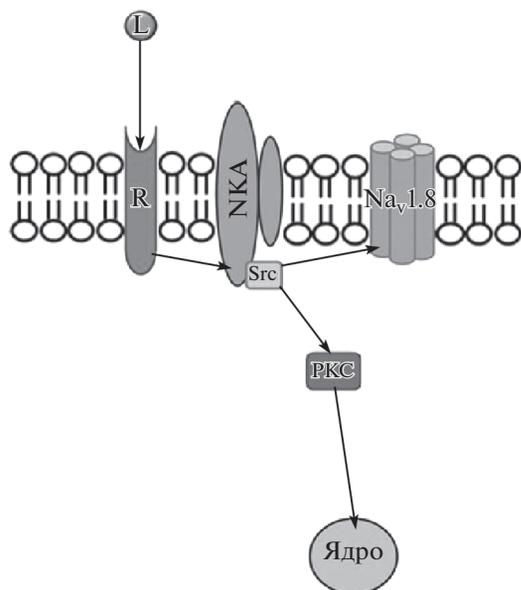
\* – различия достоверны относительно контрольных значений,  $p < 0.05$ .

Как было установлено, коеновая кислота в концентрации 100 нмоль/л также снижает величину эффективного заряда в экспериментах с обычными растворами, не содержащими Tmf (Plakhova et al., 2014).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное нами исследование роли протеинкиназы С в механизмах передачи сигнала, запускаемого при активации коеновой кислотой опиоидоподобного рецептора, позволило выявить следующие особенности этих процессов. На мембранном уровне лиганд-рецепторное связывание исследуемого агента проявляется в сдвиге пиковой вольт-амперной характеристики каналов  $\text{Na}_v1.8$  и снижении эффективного заряда их активационного воротного устройства. Применение специфического ингибитора протеинкиназы С не влияло на этот рецептор-опосредованный процесс: сигнал, запускаемый коеновой кислотой, без искажений доходил до своего эффекторного звена, которым служили медленные натриевые каналы.

Совершенно иначе происходит распространение этого сигнала в радиальном направлении. Данные, полученные на тканевом уровне, свиде-



**Рис. 7.** Схема рецептор-опосредованной модуляции процессов внутриклеточной сигнализации в сенсорном нейроне, запускаемых коеновой кислотой в тангенциальном и радиальном направлениях.

L – коеновая кислота; R – опиоидоподобный рецептор; NKA – Na<sub>2</sub>K-АТФаза; Na<sub>v</sub>1.8 – медленный натриевый канал Na<sub>v</sub>1.8; PKC – протеинкиназа С.

тельствуют об участии протеинкиназы С в процессе внутриклеточной сигнализации, направленном на геном нервной клетки. Tmf устранял нейрит-стимулирующий эффект коеновой кислоты, что доказывает участие этого белка в исследуемых каскадных процессах в качестве последовательного звена.

Рисунок 7 обобщает полученные данные. Они свидетельствуют о том, что расхождение сигналов, запускаемых коеновой кислотой при ее специфическом связывании с опиоидоподобным рецептором, происходит на уровне протеинкиназы С: этот белок участвует во внутриклеточных каскадных процессах, направленных на геном клетки. Однако он не принимает участия в тангенциальном распространении сигнала к каналам Na<sub>v</sub>1.8, кодирующим ноцицептивную информацию. Коеновая кислота, являющаяся лекарственной субстанцией разрабатываемого нами неопиоидного анальгетика, снижает возбудимость ноцицепторов благодаря рецептор-опосредованной модуляции каналов Na<sub>v</sub>1.8 (Plakhova et al., 2014), что является механизмом купирования нейропатической боли. Другим важнейшим проявлением положительного действия коеновой кислоты является ее нейрит-стимулирующий эффект. Данные, полученные в настоящей работе, указывают на важную роль, которую играет протеинкиназа С в рассматриваемом механизме. Детализация этого внутриклеточного каскадного

процесса является задачей дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013–2020 гг. (ГП-14, раздел 64), гранта РФФИ N 18-015-00079.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Крылов Б.В., Дербенев А.В., Подзорова С.А., Людино М.И., Кузьмин А.В., Изварина Н.Л. Морфин уменьшает чувствительность к потенциалу медленных натриевых каналов. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 1999. Т. 85. № 2. С. 225–236.
- Пеннийнен В.А., Кипенко А.В., Лопатина Е.В., Крылов Б.В. Участие р38 MAPK сенсорных нейронов в сигнальном каскаде, запускаемом убаином. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2016. Т. 102. № 12. С. 80–86.
- Пеннийнен В.А., Ячнев И.Л., Кипенко А.В., Лопатина Е.В., Крылов Б.В. Роль Src-киназы в рецепции инфракрасного излучения. *Сенсорные системы*. 2014. Т. 28. № 4. С. 90–94.
- Плахова В.Б., Подзорова С.А., Мищенко И.В., Баграев Н.Т., Клячкин Л.Е., Маляренко А.М., Романов В.В., Крылов Б.В. Возможные механизмы действия инфракрасного излучения на мембрану сенсорного нейрона. *Сенсорные системы*. 2003. Т. 17. № 1. С. 24–31.
- Шелых Т.Н., Рогачевский И.В., Мошкина В.Н., Подзорова С.А., Крылов Б.В., Плахова В.Б. Исследование влияния ингибитора Src-киназы PP2 на способность убаина модулировать медленные натриевые каналы. *Сенсорные системы*. 2017. Т. 31. № 1. С. 16–21.
- Almers W. Gating currents and charge movements in excitable membranes. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 1978. V. 82. № 7. P. 97–190.
- Aperia A., Akkuratov E.E., Fontana X.J., Brismar H. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, a new class of plasma membrane receptors. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2016. V. 310. P. C491–C495. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00359.2015>
- Cui X., Xie Z. Protein interaction and Na/K-ATPase-mediated signal transduction. *Molecules*. 2017. V. 22. № 6. E990. <https://doi.org/10.3390/molecules22060990>
- Elliott A.A., Elliott J.R. Characterization of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium currents in small cells from adult rat dorsal root ganglia. *J. Physiol. (Lond.)*. 1993. V. 463. № 4. P. 39–56.
- Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers. Arch.* 1981. V. 391. № 1. P. 85–100.
- Hamlyn J.M., Blaustein M.P., Bova S., DuCharme D.W., Harris D.W., Mandel F., Mathews W.R., Ludens J.H. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88. № 21. P. 6259–6263.

- Hodgkin A.L., Huxley A.F. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* 1952. V. 116. № 4. P. 449–472.
- Khalaf F.K., Dube P., Mohamed A., Tian J., Malhotra D., Haller S.T., Kennedy D.J. Cardiotonic steroids and the sodium trade balance: new insights into trade-off mechanisms mediated by the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19 № 92576. <https://doi.org/10.3390/ijms19092576>
- Kometiani P., Li J., Gnudi L., Kahn B.B., Askari A., Xie Z. Multiple signal transduction pathways link Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes. The roles of Ras and mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 24. P. 15249–15256.
- Kostyuk P.G., Krishtal O.A., Pidoplichko V.I. Effect of internal fluoride and phosphate on membrane currents during intracellular dialysis of nerve cells. *Nature.* 1975. V. 257. № 5528. P. 691–693.
- Krylov B.V., Rogachevskii I.V., Shelykh T.N., Plakhova V.B. Frontiers in pain science. Volume 1. New nonopioid analgesics: understanding molecular mechanisms on the basis of patch-clamp and quantumchemical studies. Sharjah, U.A.E., Bentham Science Publishers Ltd., 2017. 203 p. <https://doi.org/10.2174/97816080593001170101>
- Liu L., Zhao X., Pierre S.V., Askari A. Association of PI3K-Akt signaling pathway with digitalis-induced hypertrophy of cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* 2007. V. 293. № 5. P. C1489–C1497. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00158.2007>
- Madan N., Xu Y., Duan Q., Banerjee M., Larre I., Pierre S.V., Xie Z. Src-independent ERK signaling through the rat  $\alpha 3$  isoform of Na/K-ATPase. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2017. V. 312. № 3. C222–C232. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00199.2016>
- Penniyaynen V., Plakhova V., Rogachevskii I., Krylov B. Src kinase is involved in comenic acid-triggered signaling pathways in sensory neurons. *Activitas nervosa superior rediviva.* 2018. V. 60. № 1. P. 19–27.
- Plakhova V., Rogachevsky I., Lopatina E., Shelykh T., Butkevich I., Mikhailenko V., Otellin V., Podzorova S., Krylov B. A novel mechanism of modulation of slow sodium channels: from ligand-receptor interaction to design of an analgesic medicine. *Activitas nervosa superior rediviva.* 2014. V. 56. № 3–4. P. 55–64.
- Pratt R.D., Brickman C.R., Cottrill C.L., Shapiro J.I., Liu J. The Na/K-ATPase signaling: from specific ligands to general reactive oxygen species. *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. № 9. 2600. <https://doi.org/10.3390/ijms19092600>
- Tian J., Cai T., Yuan Z., Wang H., Liu L., Haas M., Maksimova E., Huang X.Y., Xie Z.J. Binding of Src to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase forms a functional signaling complex. *Mol. Biol. Cell.* 2006. V. 17. № 1. P. 317–326. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-08-0735>
- Tsubaki M., Takeda T., Matsumoto M., Kato N., Yasuhara S., Koumoto Y.I., Imano M., Satou T., Nishida S. Tamoxifen suppresses paclitaxel-, vincristine-, and bortezomib-induced neuropathy via inhibition of the protein kinase C/extracellular signal-regulated kinase pathway. *Tumour Biol.* 2018. V. 40. № 10. P. 1–13. <https://doi.org/10.1177/1010428318808670>
- Valvassori S.S., Dal-Pont G.C., Resende W.R., Varella R.B., Peterle B.R., Gava F.F., Mina F.G., Cararo J.H., Carvalho A.F., Quevedo J. Lithium and tamoxifen modulate behavior and protein kinase C activity in the animal model of mania induced by ouabain. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2017. V. 20. № 11. P. 877–885. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyx049>
- Wu J., Akkuratov E.E., Bai Y., Gaskill C.M., Askari A., Liu L. Cell signaling associated with Na<sup>(+)</sup>/K<sup>(+)</sup>-ATPase: activation of phosphatidylinositol 3-kinase IA/Akt by ouabain is independent of Src. *Biochemistry.* 2013. V. 52. № 50. P. 9059–9067. <https://doi.org/10.1021/bi4011804>
- Xie Z., Askari A. Na<sup>(+)</sup>/K<sup>(+)</sup>-ATPase as a signal transducer. *Eur. J. Biochem.* 2002. V. 269. № 10. P. 2434–2439. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02910.x>

## Involvement of protein kinase C in receptor-mediated signaling processes

V. A. Penniyaynen<sup>a, #</sup>, V. B. Plakhova<sup>a</sup>, I. V. Rogachevsky<sup>a</sup>, S. G. Terekhin<sup>a</sup>, S. A. Podzorova<sup>a</sup>, and B. V. Krylov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Pavlov Institute of Physiology of Russian Academy of Sciences, 199034 St. Petersburg, Makarova emb., 6, Russia

<sup>#</sup> E-mail: pvalentina2@yandex.ru

Comenic acid is a specific agonist of opioid-like receptors found in the sensory neuron membrane. These receptors are coupled to Na<sub>v</sub>1.8 channels responsible for nociceptive information coding. Patch-clamp data show that at the membrane level, the ligand-receptor binding of comenic acid is manifested in a decrease in the effective charge transfer of Na<sub>v</sub>1.8 channels activation gating device. The use of a specific protein kinase C inhibitor (Tamoxifen) did not affect this receptor-activated mechanism. A completely different result is obtained at the tissue level: Tamoxifen totally blocks the signal triggered by comenic acid and directed radially to the nerve cell genome. Elimination of the neurite-stimulating effect of comenic acid by Tamoxifen demonstrates that protein kinase C participates in intracellular cascade processes under study as a sequential unit.

**Key words:** comenic acid, nociception, sensory neurons, patch-clamp method, organotypic nerve tissue culture method, Na<sub>v</sub>1.8 channels, protein kinase C

## REFERENCES

- Almers W. Gating currents and charge movements in excitable membranes. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 1978. V. 82. P. 97–190.
- Aperia A., Akkuratov E.E., Fontana X.J., Brismar H. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, a new class of plasma membrane receptors. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2016. V. 310 (7). P. C491–C495. DOI: 10.1152/ajpcell.00359.2015.
- Cui X., Xie Z. Protein interaction and Na/K-ATPase-mediated signal transduction. *Molecules.* 2017. V. 22 (6). E990. DOI: 10.3390/molecules22060990.
- Elliott A.A., Elliott J.R. Characterization of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium currents in small cells from adult rat dorsal root ganglia. *J. Physiol. (Lond.)*. 1993. V. 463 (4). P. 39–56.
- Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers. Arch.* 1981. V. 391 (1). P. 85–100.
- Hamlyn J.M., Blaustein M.P., Bova S., DuCharme D.W., Harris D.W., Mandel F., Mathews W.R., Ludens J.H. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88 (21). P. 6259–6263.
- Hodgkin A.L., Huxley A.F. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. *J. Physiol.* 1952. V. 116 (4). P. 449–472.
- Khalaf F.K., Dube P., Mohamed A., Tian J., Malhotra D., Haller S.T., Kennedy D.J. Cardiotoxic steroids and the sodium trade balance: new insights into trade-off mechanisms mediated by the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19 (9). 2576. DOI:10.3390/ijms19092576.
- Kometiani P., Li J., Gnudi L., Kahn B.B., Askari A., Xie Z. Multiple signal transduction pathways link Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes. The roles of Ras and mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273 (24). P. 15249–15256.
- Kostyuk P.G., Krishtal O.A., Pidoplichko V.I. Effect of internal fluoride and phosphate on membrane currents during intracellular dialysis of nerve cells. *Nature.* 1975. V. 257 (5528). P. 691–693.
- Krylov B., Derbenev A., Podzorova S., Lyudyno M., Kuz'min A., Izvarina N. Morphine decreases the voltage sensitivity of slow sodium channels. *Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal imeni I.M. Sechenova.* 1999. V. 85 (2). P. 225–236. (in Russian)
- Krylov B.V., Rogachevskii I.V., Shelykh T.N., Plakhova V.B. *Frontiers in pain science.* Volume 1. New nonopioid analgesics: understanding molecular mechanisms on the basis of patch-clamp and quantumchemical studies. Sharjah, U.A.E., Bentham Science Publishers Ltd., 2017. V. 203 p. DOI: 10.2174/97816080593001170101.
- Liu L., Zhao X., Pierre S.V., Askari A. Association of PI3K-Akt signaling pathway with digitalis-induced hypertrophy of cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* 2007. V. 293 (5). P. C1489–C1497. DOI: 10.1152/ajpcell.00158.2007.
- Madan N., Xu Y., Duan Q., Banerjee M., Larre I., Pierre S.V., Xie Z. Src-independent ERK signaling through the rat  $\alpha 3$  isoform of Na/K-ATPase. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2017. V. 312 (3). C222–C232. DOI: 10.1152/ajpcell.00199.2016.
- Penniyaynen V., Plakhova V., Rogachevskii I., Krylov B. Src kinase is involved in comenic acid-triggered signaling pathways in sensory neurons. *Activitas nervosa superior rediviva.* 2018. V. 60(1). P. 19–27.
- Penniyaynen V.A., Kipenko A.V., Lopatina E.V., Krylov B.V. Involvement of p38 MAPK of sensory neurons in ouabain-activated signaling cascade. *Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal imeni I.M. Sechenova.* 2016. V. 102(12). P. 1472–1478. (in Russian).
- Penniyaynen V.A., Yachnev I.L., Kipenko A.V., Lopatina E.V., Krylov, B.V. Probable role of Src-kinase in reception of infrared irradiation. *Sensornye Sistemy.* [Sensory systems]. 2014. V. 28. P. 90–94. (in Russian).
- Plakhova V.B., Podzorova S.A., Mishchenko I.V., Bagraev N.T., Klyachkin, L.E., Malyarenko A.M., Romanov V.V., Krylov B.V. Probable effects of infrared irradiation on sensory neuron membrane. *Sensornye Sistemy.* [Sensory systems]. 2003. V. 17 (1). P. 24–31. (in Russian).
- Plakhova V., Rogachevsky I., Lopatina E., Shelykh T., Butkevich I., Mikhalienco V., Otellin V., Podzorova S., Krylov B. A novel mechanism of modulation of slow sodium channels: from ligand-receptor interaction to design of an analgesic medicine. *Activitas nervosa superior rediviva.* 2014. V. 56 (3–4). P. 55–64.
- Pratt R.D., Brickman C.R., Cottrill C.L., Shapiro J.I., Liu J. The Na/K-ATPase signaling: from specific ligands to general reactive oxygen species. *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19 (9). 2600. DOI: 10.3390/ijms19092600.
- Shelykh T.N., Rogachevskii I.V., Moshkina V.N., Podzorova S.A., Krylov, B.V., Plakhova V.B. Investigation of the effect of PP2 Src kinase inhibitor on the ability of ouabain to modulate slow sodium channels. *Sensornye Sistemy.* [Sensory systems]. 2017. V. 31 (1). P. 16–21. (in Russian).
- Tian J., Cai T., Yuan Z., Wang H., Liu L., Haas M., Maksimova E., Huang X.Y., Xie Z.J. Binding of Src to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase forms a functional signaling complex. *Mol. Biol. Cell.* 2006. V. 17(1). P. 317–326. DOI: 10.1091/mbc.e05-08-0735.
- Tsubaki M., Takeda T., Matsumoto M., Kato N., Yasuhara S., Koumoto Y.I., Imano M., Satou T., Nishida S. Tamoxifen suppresses paclitaxel-, vincristine-, and bortezomib-induced neuropathy via inhibition of the protein kinase C/extracellular signal-regulated kinase pathway. *Tumour Biol.* 2018. V. 40(10). P. 1–13. DOI: 10.1177/1010428318808670.
- Valvassori S.S., Dal-Pont G.C., Resende W.R., Varela R.B., Peterle B.R., Gava F.F., Mina F.G., Cararo J.H., Carvalho A.F., Quevedo J. Lithium and tamoxifen modulate behavior and protein kinase c activity in the animal model of mania induced by ouabain. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2017. V. 20(11). P. 877–885. DOI: 10.1093/ijnp/pyx049.
- Wu J., Akkuratov E.E., Bai Y., Gaskill C.M., Askari A., Liu L. Cell signaling associated with Na(+)/K(+)-ATPase: activation of phosphatidylinositide 3-kinase IA/Akt by ouabain is independent of Src. *Biochemistry.* 2013. V. 52(50). P. 9059–9067. DOI: 10.1021/bi4011804.
- Xie Z., Askari A. Na(+)/K(+)-ATPase as a signal transducer. *Eur. J. Biochem.* 2002. V. 269(10). P. 2434–2439. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2002.02910.x