УДК 577.25+57.053.2

С. В. РОМАНЕНКО[1], П. Г. КОСТЮК[2], О. П. КОСТЮК[2]

АКТИВНІСТЬ КАНАЛІВ TRPV1 У ПЕРВИННИХ НОЦИЦЕПТИВНИХ НЕЙРОНАХ ЩУРІВ: ВПЛИВ ЗМІН ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО РІВНЯ КАЛЬЦІЮ

Надійшла 14.07.09

Досліджували кальцієві транзієнти, викликані аплікацією капсаїцину (селективного агоніста каналів TRPV1) у нейронах дорсокорінцевих гангліїв (ДКГ) із середнім (35–25 мкм) та маленьким (менше 25 мкм) розмірами соми в умовах розвитку іншого кальцієвого транзієнта, індукованого попередньою деполяризацією плазматичної мембрани цих нейронів. Згадані транзієнти в нейронах ДКГ щурів вимірювали за допомогою кальційчутливого флуоресцентного зонда Fura 2/AM. У клітинах обох груп амплітуди капсаїциніндукованих відповідей при інтервалах 3, 7 та 10 с щодо початку попередньої деполяризації були меншими порівняно з контрольними в середньому на 26.8, 22.1 та 4.5 % відповідно для популяції середніх нейронів та на 35.3, 21.1 та 22.4 % для маленьких нейронів. У таких умовах спостерігалися помітні затримки реакцій на аплікації капсаїцину та певне зниження рівня внутрішньоклітинного кальцію на момент початку розвитку цих реакцій відносно відповідних значень в ізольованих транзієнтах, зумовлених деполяризацією. Зроблено висновок, що збудження первинних ноцицептивних нейронів та активація потенціалкерованих кальцієвих каналів призводять до помітної модуляції активності каналів TRPV1 і зміни їх ролі в процесі больової рецепції.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: нейрони дорсальнокорінцевих гангліїв, кальцієві транзієнти, канали TRPV1, капсаїцин.

ВСТУП

Мембранні рецептор-канальні комплекси TRPV1 належать до надродини TRP і мають так звані ванілоїдні рецептори. Канали цього типу досить широко розповсюджені в клітинах різних тканин організму, проте найбільший рівень їх експресії спостерігається в нервовій тканині. Вперше дані канали були виявлені в нейронах дорсальнокорінцевих гангліїв (ДКГ) малого та середнього розмірів, тобто в первинних аферентних нейронах, що мають відношення до ноцицепції [1]. За своїми властивостями такі рецептор-канальні комплекси є полімодальними. TRPV1 активуються у відповідь на дію ванілоїдних сполук (капсаїцину, резініфератоксину), а також при тепловій стимуляції (≥43 ºС), істотній ацидифікації зовнішньоклітинного середовища (pH ≤ 5.9) та ін. У подальших дослідженнях було виявлено, що ці канали також можуть бути активовані в умовах аплікації камфори, токсинів павуків та оксиду азоту (NO). Їх активність модулюється певними зовнішньоклітинними катіонами та низкою ендо- та екзогенних сполук. Через збіг теплового порогу активації даних каналів з порогом активації ноцицептивних С-волокон (больовим порогом чутливості шкіри щодо термічних стимулів) та порогом теплової стимуляції при якому у дрібних нейронах ДКГ виникає катіонний струм, прийнято вважати, що рецептори TRPV1 є тепловими. Вони активуються в умовах, коли термічні струми перевищують больовий поріг [2]. Результати досліджень з геномодифікованими тваринами підтверджують цю думку. Так, у нокаутних мишей з відсутністю ванілоїдних рецепторів першого типу в експериментах *in vitro* та *in vivo* не реєструвалося реакцій на дію капсаїцину, надлишкову концентрацію іонів водню та теплову стимуляцію (до 50 ºС) [3]. У різних випадках розвитку патологічної больової чутливості спостерігаються зміни експресії та властивостей каналів TRPV1. Виявлено значну роль ванілоїдних рецепторів у генезі

[1] Міжнародний центр молекулярної фізіології НАН України, Київ (Україна).
[2] Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).
Ел. пошта: sergii@biph.kiev.ua (С. В. Романенко).

хімічної та термічної гіпералгезії в моделі діабетичної нейропатії. Зроблено припущення, що згадані феномени є результатом зміни рівня експресії TRPV1 у плазматичних мембранах первинних аферентних нейронів, причому напрямки зрушень є залежними від типу волокон цих ноцицептивних одиниць (збільшення в разі нейронів з А-волокнами та зменшення в одиниць з С-волокнами) [4]. У моделі нейропатичного болю, спричиненого перерізанням периферичних нервів, спостерігалося підвищення рівня експресії TRPV1 у непошкоджених нейронах ДКГ [5]. Було також виявлено, що зміни у TRPV1 беруть участь у формуванні надмірної больової чутливості, зумовленої запаленням (в умовах формалінового тесту та аплікацій карагенану та повного ад'юванта Фроїнда (CFA). Відповідні зрушення пов'язані з модуляцією цих каналів різними ендогенними агентами, котрі вивільнюються при запальних процесах, та зниженням порогу активації таких каналів [3]. У результаті зазначених впливів надпороговою для активації даних каналів може стати навіть температура тіла. Отже, ванілоїдні рецептори відіграють важливу роль у процесах формування больових відчуттів як у нормальних, так і в патологічних умовах. Останнє значною мірою зумовлено тією обставиною, що TRPV1 є чутливими до дії багатьох чинників, пов'язаної з розвитком патологічних процесів.

На сьогодні накопичено багато даних щодо каналів TRPV1, проте функціональна роль вказаних мембранних утворень залишається не зовсім зрозумілою. Це пояснюється значною кількістю суперечливих відомостей. Так, якщо роль TRPV1 обмежується терморецепцією, то незрозумілим залишається факт експресії зазначених каналів не лише в мембранах сенсорних нервових закінчень, а й у соматичних мембранах нейронів ДКГ, у мембранах ендоплазматичного ретикулуму зазначених клітин, у церебральних синапсах первинних аферентів, а також у плазматичних мембранах нейронів деяких структур головного мозку [6]. На сьогодні немає також єдиної думки щодо того, чи є TRPV1 депоактивованими каналами. Крім того, TRPV1 активуються таким ендогенним агентом, як анандамід, та деякими іншими метаболітами арахідонової кислоти, а ці сполуки одночасно є агоністами канабіноїдних рецепторів. Іншими словами, виявляється, що один і той самий агент може активувати не тільки проноцицептивні структури мембрани, але й антиноцицептивні. Отже, деякі важливі аспекти функцій каналів TRPV1 як на клітинному рівні, так і на рівні цілого організму залишаються нез'ясованими. Метою нашого дослідження було з'ясування питання про зміни чутливості ванілоїдних рецепторів до екзогенних агоністів, а також їх можливої участі в процесах, супроводжуючих активність нейронів ДКГ, які експресують дані канали.

МЕТОДИКА

Техніка виділення окремих нейронів ДКГ була аналогічною застосованій у наших попередніх роботах [7]. Використовували свіжоізольовані нейрони ДКГ щурів віком 21 день. Виділені на грудному та поперековому рівнях ганглії вміщували в охолоджений модифікований розчин Тіроде наступного складу (у мілімолях на 1 л): NaCl – 140, KCl – 2, $CaCl_2$ – 2, $MgCl_2$ – 2, HEPES – 10, глюкоза – 10 (pH 7.35), після чого ферментативно обробляли підігрітим до 36 °С розчином Тіроде з додаванням 1 мг/мл колагенази (тип 1А; «Sigma», США) та 1 мг/мл протеази (тип XIV; "Sigma", США), витримуючи зразки в термостаті з постійним перемішуванням. Після такої обробки ганглії відмивали в чистому розчині Тіроде та пропускали в 0.5 мл розчину Тіроде через пастерівські піпетки різного вихідного діаметра протягом 5 хв. Отриману таким чином клітинну суспензію наносили на покривні скельця, попередньо оброблені полі-L-лізином ("Sigma", США), та вміщували на 30 хв у термостат при температурі 36 °С для прикріплення клітин до поверхні скелець.

Після таких процедур клітини промивали свіжим розчином Тіроде та завантажували флуоресцентним кальцієвим зондом Fura-2. Для цього зразки вміщували в розчин Тіроде із додаванням диметилсульфоксидного розчину ацетоксиметилестерової форми флуоресцентного барвника Fura (Fura-2/AM, 5 мкМ) і 10 мкл/мл 0.05 %-вого розчину детергента плуронік (F-127; "Molecular Probes", США) та витримували в термостаті протягом 30 хв. Деестерифікацію зонду клітини забезпечували промиванням нормальним розчином Тіроде та експозицією в темряві при температурі 35 °С протягом 30 хв.

Рівень внутрішньоклітинного кальцію в клітинах вимірювали за допомогою установки, оснащеної флуоресцентним мікроскопом з водоімерсійним об'єктивом, фотоелектронним помножувачем та електронною системою попередньої обробки сигналу («Luigs und Neumann», ФРН). Клітини в камері постійно суперфузували нормальним розчином Тіроде. Реєстрація кальцієвих транзієнтів прово-

дилася з використанням програмного забезпечення «Tida 5.18» («Tida software», «Batelle», ФРН). Внутрішньоклітинний рівень Ca^{2+} розраховували згідно з рівнянням Грінкевича [8].

Для ініціації кальцієвих транзієнтів плазматичну мембрану нейронів ДКГ деполяризували за допомогою аплікації гіперкалієвого розчину наступного складу (у мілімолях на 1 л): NaCl – 92, KCl – 50, $CaCl_2$ – 2, $MgCl_2$ – 2, HEPES – 10, глюкоза – 10 (pH 7.35). Активацію ванілоїдних рецепторів здійснювали із застосуванням їх селективного агоніста – капсаїцину. Його вихідний розчин (1.0 мМ) у диметилсульфоксиді зберігали при температурі 4 °С. Робочий розчин капсаїцину готували за допомогою розбавлення цього вихідного розчину в нормальному розчині Тіроде до концентрації 60 нМ.

Записи транзієнтів обробляли з використанням цифрових фільтрів низьких частот, застосовуючи програми «Tida 4.11» («HEKA Elektronic», ФРН). Статистична обробка даних проводилася за допомогою програм «Origin Pro 7.5» та «Exel 2003». Числові дані, наведені нижче, представлені у вигляді середніх значень ± похибка середнього; кількість досліджуваних нейронів у кожній групі вказана в дужках разом з відповідним параметром. Статистичну вірогідність міжгрупових різниць оцінювали із застосуванням критерію Ст'юдента.

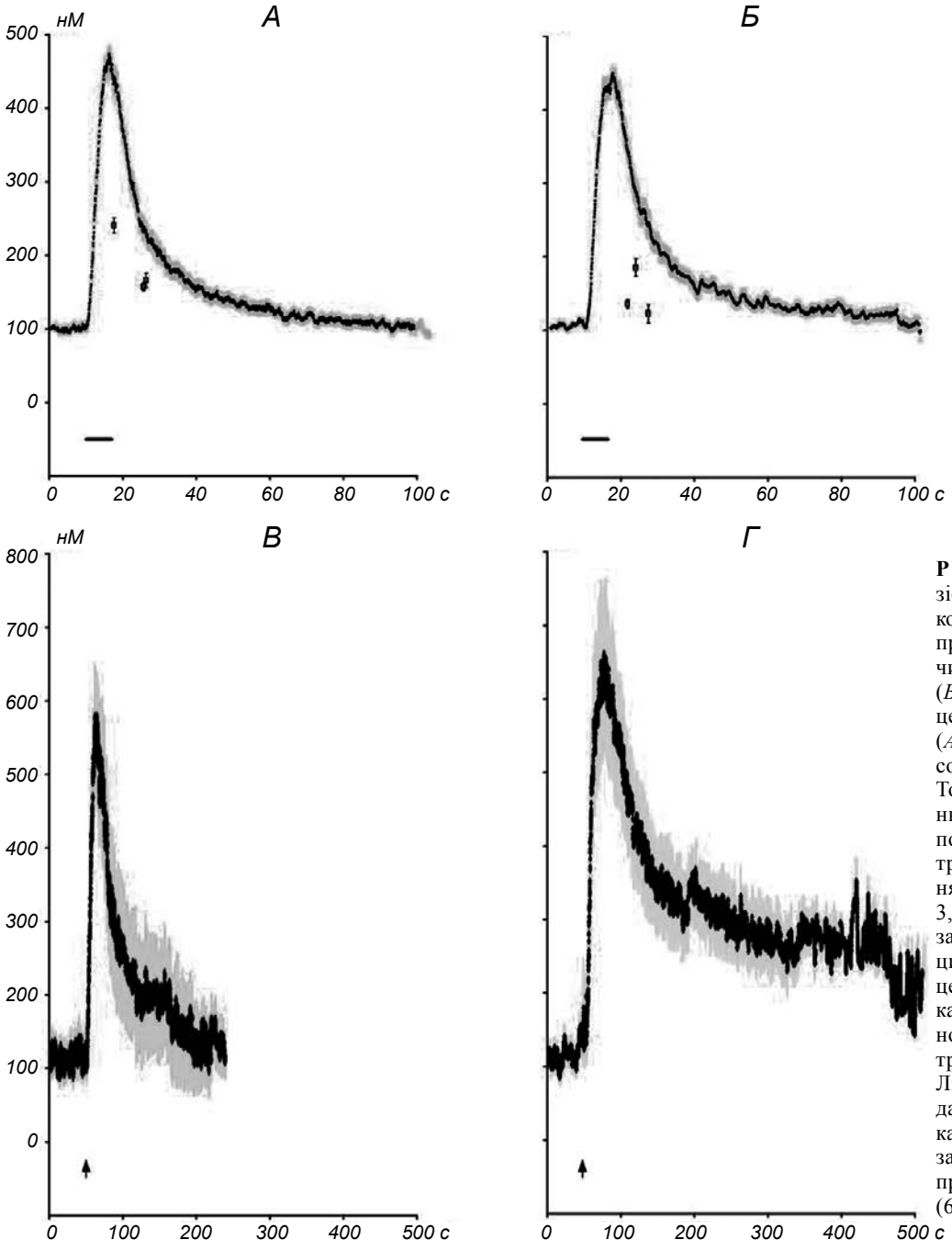
РЕЗУЛЬТАТИ

У наших експериментах досліджувалися нейрони ДКГ двох розмірних груп – із середніми та маленькими сомами (діаметр 25–35 та менше 25 мкм). Така класифікація відповідає даним літератури, згідно з якими розподіл нейронів ДКГ за розмірами соми є тримодальним (серед зазначених клітин можна відмітити три групи – великих, середніх та малих одиниць, і ці групи вірогідно відрізняються одна від одної) [9]. Вважається, що периферичні відростки нейронів ДКГ середнього розміру є тонкими мієлінізованими волокнами типу Аδ. Частина даних нейронів виконують функцію детекції й передачі больового відчуття та відповідно відносяться до первинних ноцицепторів. Чутливі периферичні закінчення маленьких нейронів ДКГ є виключно ноцицепторами, а відповідні аферентні волокна відносяться до немієлінізованих волокон С-типу [10]. Усі досліджувані нейрони були капсаїцинпозитивними, що характерно лише для ноцицептивних нейронів ДКГ [11].

Вплив транзієнтного підвищення внутрішньоклітинного рівня кальцію ($[Ca^{2+}]_i$), зумовленого активацією потенціалкерованих кальцієвих каналів мембрани нейрона, на кальцієві транзієнти, індуковані активацією ванілоїдних рецепторів, тестували за допомогою послідовних прикладань гіперкалієвого розчину (що призводило до деполяризації плазматичної мембрани) та розчину капсаїцину – специфічного агоніста TRPV1 із різними затримками між моментами початку відповідних аплікацій (Δt). Значення Δt становили 3, 7 або 10 с. Власне тривалість аплікації гіперкалієвого розчину в наших експериментах становила 7, а розчину капсаїцину – 10 с. Таким чином, затримка 3 с відповідала послідовній аплікації гіперкалієвого розчину (3 с), одночасній аплікації цього розчину та капсаїцину (4 с) та прикладанню чистого розчину капсаїцину в розчині Тіроде (6 с). Затримка 7 с відповідала послідовним прикладанням активаторів, а при затримці 10 с експозиція включала в себе проміжок відмивання нормальним розчином Тіроде (3 с). Щоб усунути можливу різницю в наповненості кальцієвих депо різних нейронів, перед початком вимірювань проводилося попереднє прикладання гіперкалієвого розчину.

Значення базового рівня кальцію в нейронах ДКГ середнього розміру становило в середньому 99.7 ± ± 1.2, а в маленьких клітинах – 108.8 ± 1.6 нМ. У кожній з досліджуваних груп нейронів базовий рівень кальцію після відповідних маніпуляцій з клітинами відновлювався до попереднього значення.

Середня амплітуда кальцієвого транзієнта, викликаного деполяризацією плазматичної мембрани, у групі середніх нейронів дорівнювала 411.8 ± ± 5.8 нМ (n = 21). У групі маленьких нейронів цей показник був дещо меншим та становив 381.1 ± ± 4.8 нМ (n = 21). Відмінності між повними тривалостями (T) та тривалостями на рівні половини амплітуди ($T_{0.5}$) даних транзієнтів у групах середніх та маленьких нейронів складали в середньому близько 30 %, але індивідуальні значення вказаних параметрів помітно варіювали, і різниця не була вірогідною. На відміну від транзієнтів, викликаних аплікацією гіперкалієвого розчину, кальцієві транзієнти, викликані прикладанням капсаїцину, демонстрували істотні міжгрупові відмінності. Середня амплітуда "капсаїцинових" транзієнтів у групі середніх нейронів складала 509.7 ± 21.0 нМ (n = 8), а в групі маленьких була помітно більшою – 619.4 ± 28.9 нМ (n = 11; $P < 0.05$). Дуже істотною була різниця між тривалостями відповідних тран-

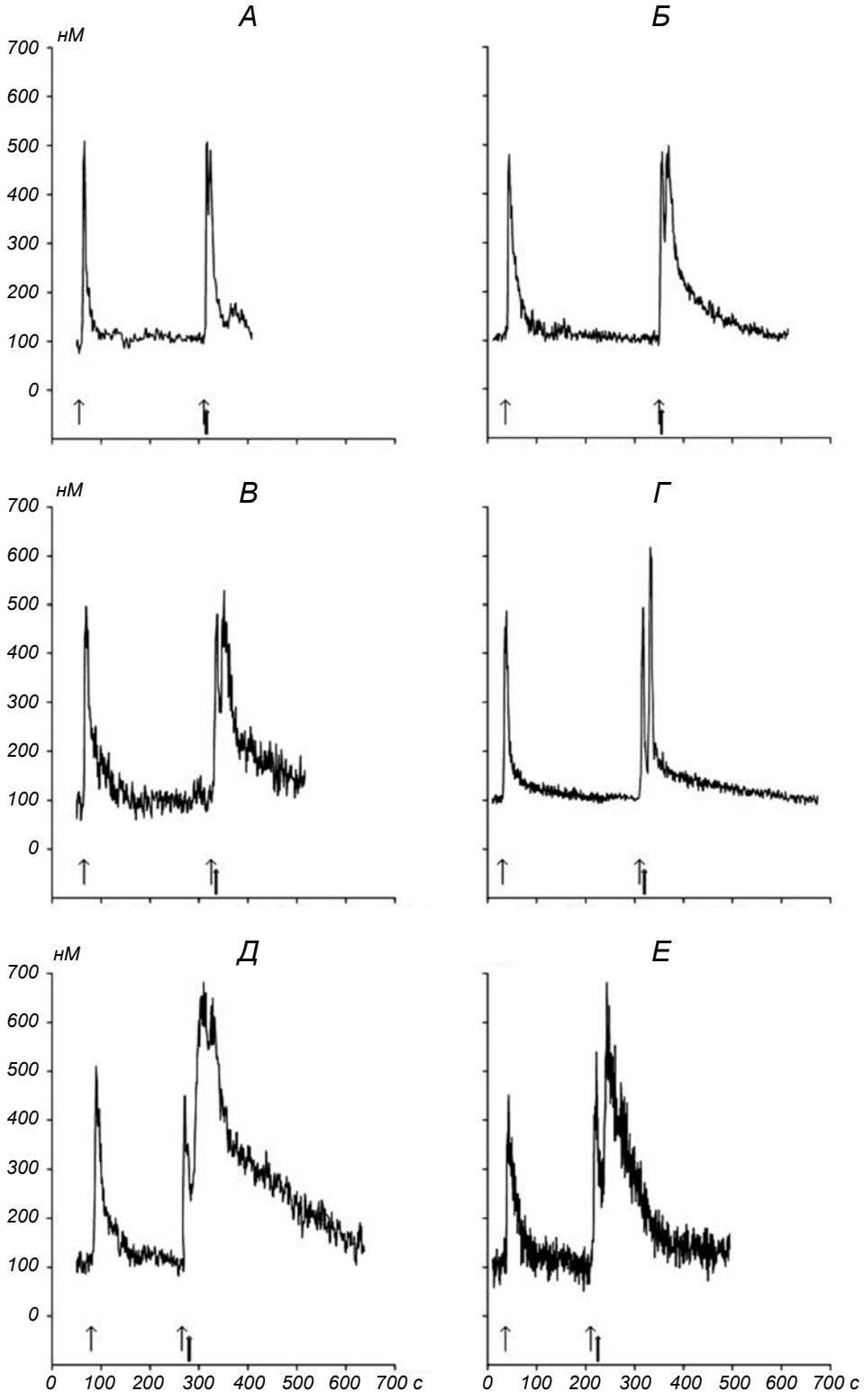


Р и с. 1. Усереднені кальцієві транзієнти (зміни внутрішньоклітинної концентрації кальцію), викликані прикладанням гіперкалієвого розчину (*А, Б*) та розчину капсаїцину (*В, Г*) у нейронах дорсальнокорінцевих гангліїв щурів із середнім (*А, В*) та малим (*Б, Г*) розмірами соми.

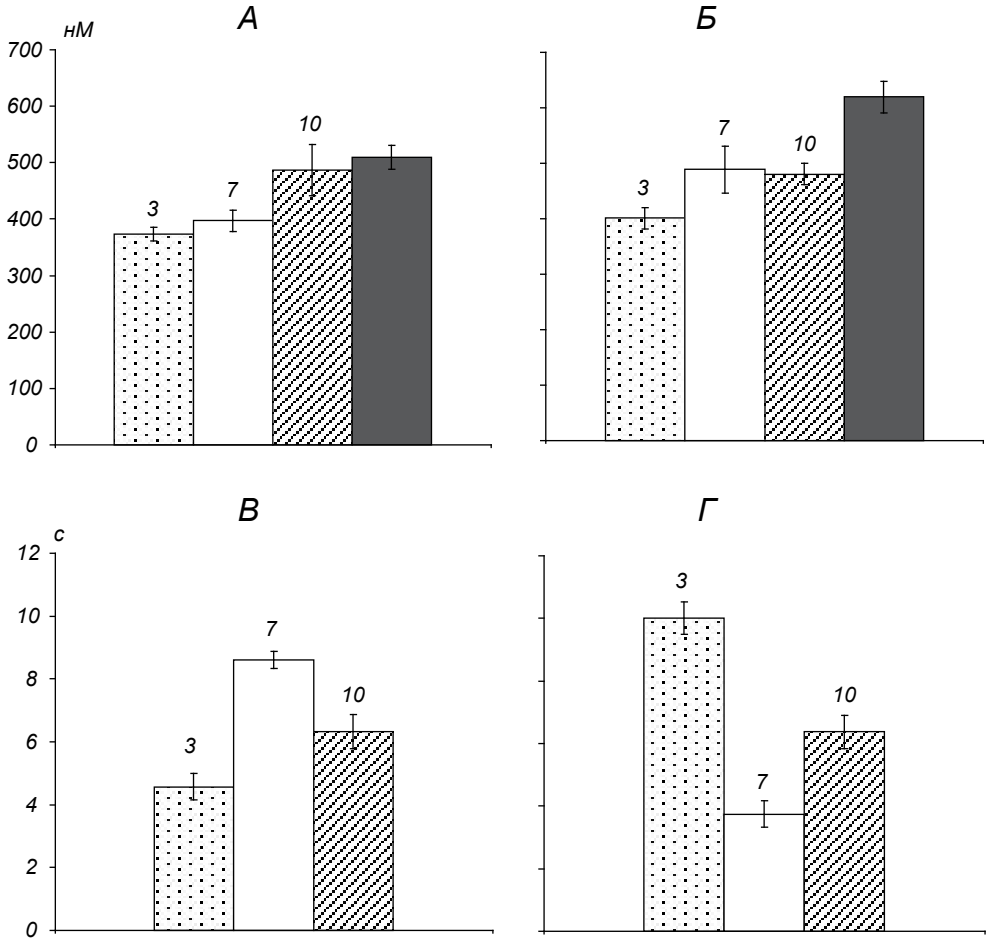
Точками позначено рівні внутрішньоклітинного кальцію, з яких починали формуватися кальцієві транзієнти, зумовлені прикладанням капсаїцину, відповідно через 3, 7 та 10 с після початку деполяризації мембрани клітини. По осі абсцис – час, с; по осі ординат – концентрація внутрішньоклітинного кальцію, нМ. Усі транзієнти подано із відповідною до кожної точки транзієнта похибкою середнього. Лінія під записами (*А, Б*) відповідає тривалості прикладання гіперкалієвого розчину; стрілками під записами (*В, Г*) позначені моменти прикладання розчину капсаїцину (60 нМ).

зієнтів. Якщо в групі середніх нейронів значення T цих зрушень варіювало в межах 120–220 с (рис. 1, *В*), то в групі маленьких клітин воно звичайно перевищувало 450 с (*Г*). Іншими словами, кальцієві транзієнти, викликані деполяризацією мембрани, у групі середніх нейронів були такими ж самими або дещо більшими, ніж у маленьких клітинах, тоді як транзієнти, зумовлені прикладанням капсаїцину, в групі маленьких нейронів були значно більшими (рис. 1).

Приклади транзієнтних підвищень рівня кальцію, спричинених прикладанням капсаїцину, після попередньої деполяризації мембрани з Δt = 3, 7 та 10 с наведені на рис. 2. У випадку трисекундної затримки таке підвищення, виміряне від базового рівня, складало в середніх нейронах 373.2 ±



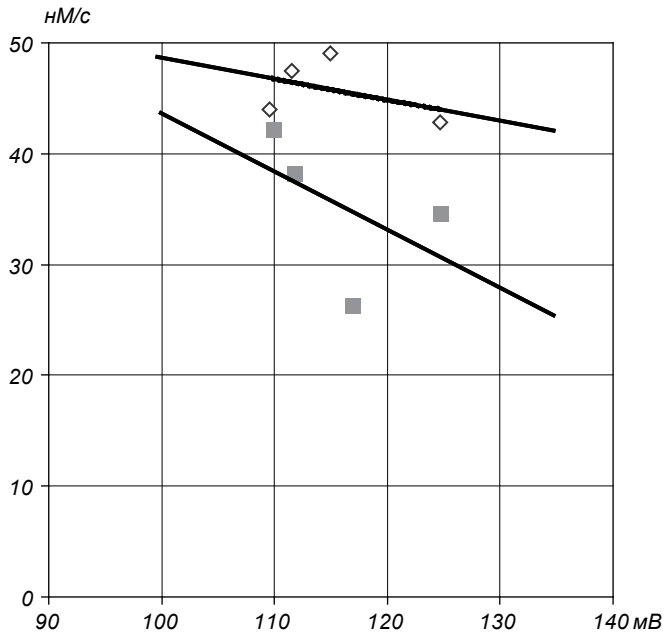
Р и с. 2. Записи кальцієвих транзієнтів, викликаних послідовним прикладанням гіперкалієвого розчину та розчину капсаїцину із різними затримками між початками аплікацій – 3 (*А, Б*), 7 (*В, Г*) та 10 (*Д, Е*) с у нейронах дорсальнокорінцевих гангліїв щурів із середнім (*А, В, Д*) та малим (*Б, Г, Е*) діаметрами соми.
Тонкими стрілками під записами позначено моменти прикладання гіперкалієвого розчину, товстими – моменти прикладання розчину капсаїцину (60 нМ). Решта позначень ті ж самі, що й на рис. 1.



Р и с. 3. Середні значення амплітуд кальцієвих транзієнтів (*А, Б*), викликаних прикладанням розчину капсаїцину через 3, 7 і 10 с після попередньої деполяризації клітини (затримки вказані над стовпчиками) та ізольованим прикладанням вказаного розчину (праві стовпчики із щільною штриховкою), а також відповідні першим трьом випадкам середні значення затримок Δt_R ініціації капсаїцинових транзієнтів (*В, Г*) у нейронах дорсальнокорінцевих гангліїв із середнім (*А, В*) та малим (*Б, Г*) діаметрами соми. Показані середні значення ± похибка середнього.

± 11.6 нМ (n = 7) (*А*), а в групі маленьких клітин ДКГ – 400.1 ± 18.7 нМ (n = 7) (*Б*). У випадках затримки між моментами аплікацій 7 с транзієнтне "капсаїцинове" підвищення кальцію в популяції середніх нейронів у середньому складало 396.9 ± 18.6 нМ (n = 9) (*В*), а в маленьких нейронах – 488.5 ± 42.7 нМ (n = 10) (*Г*). Якщо проміжок часу між аплікаціями гіперкалієвого розчину та розчину капсаїцину дорівнював 10 с, відповідні показники у вказаних розмірних групах нейронів становили 486.7 ± 45.1 та 480.4 ± 19.3 нМ (n = 11 та 8) (*Д, Е*). Отже, амплітуди транзієнтних підвищень внутрішньоклітинного кальцію, зумовлених прикладанням капсаїцину після попередньої деполяризації мембрани, в усіх випадках були дещо меншими, ніж амплітуди транзієнтів, викликаних ізольованими аплікаціями капсаїцину, і це спостерігалося в обох групах нейронів ДКГ. Даний факт свідчить про те, що протягом розвитку кальцієвого транзієнта, зумовленого деполяризацією плазматичної мембрани, здатність TRPV1 до активації селективним агоністом – капсаїцином – помітно зменшувалася.

Реакції нейронів із середнім розміром соми на аплікації капсаїцину через 3 та 7 с після попередньої деполяризації вказували, що чутливість до капсаїцину в таких умовах була значно меншою порівняно з такою, що спостерігалася при довшій затримці (10 с; рис. 3, *А*). Реакції середніх нейронів на аплікації капсаїцину при затримці 10 с мало відрізнялися за амплітудою від контрольних кальцієвих транзієнтів, зумовлених ізольованими аплікаціями цього агента. У групі маленьких нейронів ДКГ

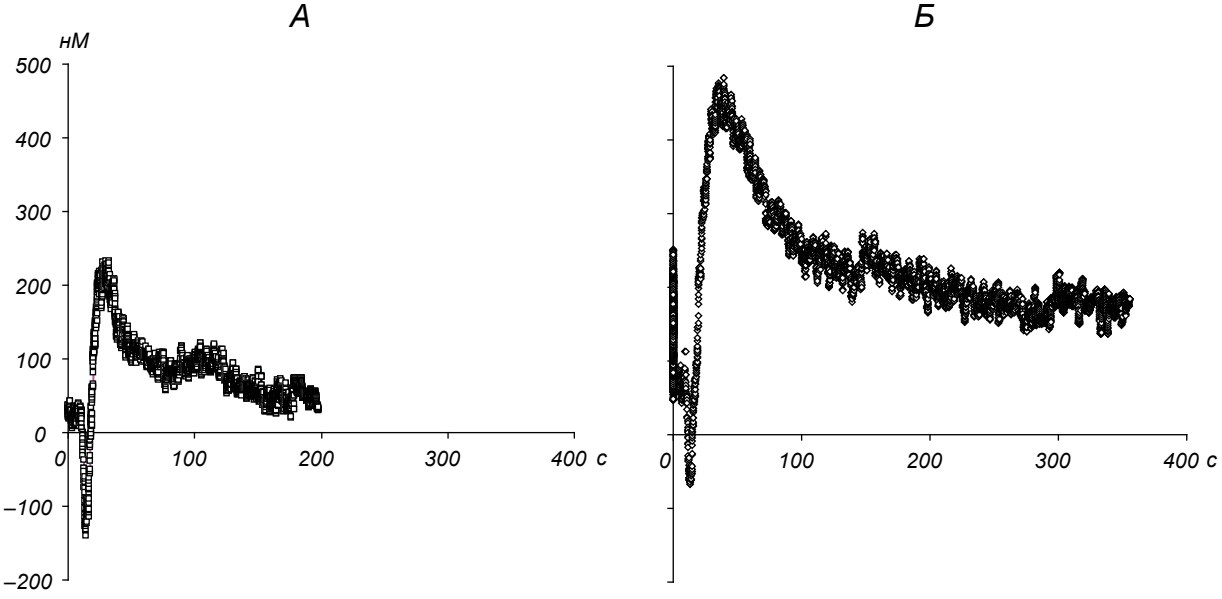


Р и с. 4. Залежність приросту внутрішньоклітинної концентрації кальцію протягом 1 с в умовах прикладання розчину капсаїцину через 3, 7 і 10 с після попередньої деполяризації клітини та ізольованого прикладання капсаїцину від електрорушійної сили для іонів кальцію на плазмолемі у нейронах дорсальнокорінцевих гангліїв щурів із середнім та малим розмірами соми; показані також відповідні лінійні апроксимації до кожної групи точок (позначені ромбами та квадратами відповідно).
По осі абсцис – електрорушійна сила для іонів кальцію, мВ; по осі ординат – значення приросту концентрації внутрішньоклітинного кальцію за 1 с, нМ/с.

усі «постдеполяризаційні» реакції на дію капсаїцину були вірогідно меншими (на 21–35 %) порівняно з контрольними капсаїцинзумовленими транзієнтами (*Б*). Найбільше пригнічення спостерігалося при найменшому значенні Δt (3 с). Реакції на аплікації капсаїцину із затримками 7 та 10 с у групі маленьких нейронів були майже подібними.

Особливістю постдеполяризаційних реакцій клітин ДКР на дію капсаїцину була не лише менша амплітуда підвищення рівня внутрішньоклітинного кальцію. У разі аплікацій капсаїцину спостерігалася помітна затримка між моментами початку такого прикладання та ініціації реакції на даний агент (рис. 3, *В, Г*). Так, у групі середніх нейронів ДКГ при Δt = 3 с подібна затримка становила в середньому 4.6 ± 0.4, а в групі маленьких – 10.0 ± 0.5 с. При Δt = 7 с такі затримки дорівнювали в середньому 8.6 ± 0.3 та 3.8 ± 0.4 с, а при інтервалі між початками аплікації гіперкалієвого розчину та капсаїцину 10 с – 6.3 ± 0.5 та 6.4 ± 0.5 с відповідно. Середні значення згаданих затримок відповідей на аплікацію капсаїцину вірогідно відрізнялися.

Ще однією особливістю реакцій обох досліджуваних груп нейронів ДКГ на аплікацію капсаїцину було значення рівня внутрішньоклітинного кальцію, з якого починалося формування відповідної



Р и с. 5. Криві, що характеризують різниці між кальцієвими транзієнтами, викликаними прикладанням гіперкалієвого розчину та розчину капсаїцину (отримані за допомогою віднімання перших транзієнтів від других) у нейронах дорсальнокорінцевих гангліїв щурів із середнім (*А*) та малим (*Б*) діаметрами соми.
По осі абсцис – час, с; по осі ординат – концентрація внутрішньоклітинного кальцію, нМ.

реакції (V_0). Як видно з рис. 1, усі відповідні точки для обох груп нейронів ДКГ лежали нижче траєкторій відповідних усереднених транзієнтів. Так, у разі аплікацій капсаїцину через 3 с після початку аплікації гіперкалієвого розчину значення вихідного рівня внутрішньоклітинного кальцію в групі середніх нейронів у середньому становило 235.6 ± ± 10.1, а в групі маленьких нейронів ДКГ – 190.2 ± ± 10.7 нМ. При Δt = 7 с середні значення становили 153.6 ± 5.7 та 143.6 ± 5.8, а при Δt = 10 с – 162.7 ± ± 9.7 та 131.3 ± 11.4 нМ відповідно (*А, Б*).

ОБГОВОРЕННЯ

На сьогодні уявлення про роль каналів TRPV1 залишаються досить суперечливими. Мультимодальність цих каналів, модуляція їхньої активності багатьма міжклітинними та внутрішньоклітинними процесами (навіть лише на рівні периферичних нервових утворень) та специфічний характер експресії TRPV1 у нервовій системі вказують на те, що роль даних каналів у периферичних сенсорних структурах не обмежується лише функцією сенсорів щодо надпорогових больових/температурних стимулів. Як прийнято вважати, канали родини TRP є еволюційно більш давніми мембранними структурами порівняно з потенціалкерованими та деякими ліганднкерованими кальцієвими каналами. Це примушує припускати їхню більш загальну роль у процесах життєдіяльності як окремо клітини, так і організму в цілому [12]. У зв'язку з цим зрозумілий інтерес викликає аналіз взаємодії активності зазначених каналів із змінами внутрішньоклітинного рівня іонів кальцію, реалізованими при різноманітних формах активності нейронів ДКГ.

Записи кальцієвих транзієнтів, представлені на рис. 2, свідчать про те, що в результаті короткочасного прикладання агоніста TRPV1 капсаїцину після попередньої деполяризації нейронів відповідне транзієнтне підвищення кальцію за своєю величиною не відповідає сумі значень рівня внутрішньоклітинного кальцію на момент прикладання капсаїцину та амплітуди ізольованого капсаїцинового транзієнта. Воно є навіть меншим, ніж сама амплітуда окремого незалежного капсаїцинзумовленого кальцієвого транзієнта.

Такий характер відповідей на прикладання капсаїцину після попередньої деполяризації клітини є характерним як для середніх, так і для малих нейронів ДКГ. Очевидно, що причиною таких змін реакції клітин на капсаїцинову стимуляцію є вплив внутрішньоклітинних процесів, пов'язаних з деполяризацією мембрани нейронів.

Найбільш очікуваним фактором, котрий може впливати на вхід кальцію через активовані капсаїцином TRPV1-канали, може бути зміна електрохімічного потенціалу, зумовленого різницею концентрацій іонів кальцію у внутрішньо- та зовнішньоклітинному просторі. Цей самий потенціал одночасно є рушійною силою для іонів кальцію, що надходять до внутрішньоклітинного простору через TRPV1. Значення електрохімічного потенціалу в нашому випадку вираховується за наступною формулою

$$E_{Ca^{2+}} = 2.303 \times \frac{RT}{z\mathrm{F}} \lg \frac{[Ca^{2+}]_{in}}{[Ca^{2+}]_{ex}}, \qquad (1)$$

де $E_{Ca^{2+}}$ – значення електрорушійної сили, R – універсальна газова стала, T – абсолютне значення температури, z – заряд відповідної частинки, F – стала Фарадея, $[Ca^{2+}]_{in/ex}$ – відношення концентрацій вільних іонів кальцію з внутрішнього/зовнішнього боків мембрани.

У стані спокою значення $E_{Ca^{2+}}$ дорівнювало в середньому 124.7 мВ. Значення внутрішньоклітинної концентрації кальцію в нейронах ДКГ середнього розміру при Δt = 3, 7 та 10 с становило відповідно 219, 332 та 285 нМ (рис. 1, *А, Б*). Згідно зі змінами внутрішньоклітинної концентрації кальцію величини електрохімічного потенціалу, розрахованого за формулою (1), набували відповідно значень 114.9, 109.6 та 111.5 мВ. Таким чином, наведені зміни внутрішньоклітинної концентрації кальцію призводять до деякого зменшення електрорушійної сили щодо іонів кальцію (у межах 10–15 мВ). Це становить 8–12 % зменшення порівняно з $E_{Ca^{2+}}$ у стані спокою. У той же час амплітуди транзієнтів, викликаних прикладанням капсаїцину після попередньої деполяризації, у даній популяції нейронів ДКГ були меншими на 5–27 % порівняно із незалежними капсаїцинзумовленими транзієнтами. У групі малих нейронів ДКГ аналогічні зміни електрохімічного потенціалу дорівнювали 7.8–12.9 мВ, що становить 6–10 % зменшення відносно $E_{Ca^{2+}}$ у стані спокою. Відносне ж зменшення амплітуд капсаїцинзумовлених кальцієвих транзієнтів після попередньої деполяризації сягало в цій групі 22–35 %. Отже, зміни електрорушійної сили щодо кальцію, очевидно, не могли бути єдиною причиною падіння амплітуд постдеполяризаційних капсаїцинзумовле-

них кальцієвих транзієнтів як у середніх, так і в маленьких нейронах ДКГ.

Для точнішого визначення впливу змін електрорушійної сили на вхід кальцію при активації ванілоїдних рецепторів оцінимо потік кальцію через плазматичну мембрану при аплікації капсаїцину в умовах попередньої деполяризації мембрани та в контрольних умовах (без попереднього прикладання гіперкалієвого розчину). Вважаємо, що потік кальцію в цитозоль визначається за формулою (2):

$$I_{Ca^{2+}} = \frac{d[Ca^{2+}]}{dt}, \qquad (2)$$

де $I_{Ca^{2+}}$ – потік, t – час.

Приймемо значення dt = 1–3 с. Таке значення взято з огляду на дані попередніх досліджень [13], згідно з якими кальційіндуковане вивільнення кальцію з депо ендоплазматичного ретикулуму (CICR) починається на 1–3-й с з моменту входу кальцію через канали плазматичної мембрани. Отже, аналізуючи підвищення концентрації внутрішньоклітинного кальцію за перші 1–3 с, можна оцінити потік кальцію через плазматичну мембрану клітини. Визначений за формулою (2) потік кальцію через TRPV1-канали пов'язаний з відповідними змінами електрорушійної сили щодо кальцію через співвідношення (3):

$$I_{Ca^{2+}} \sim G_{TRPV1} \times E_{Ca^{2+}}, \qquad (3)$$

де G_{TRPV1} – коефіцієнт пропорційності між потоком ($I_{Ca^{2+}}$) та відповідною йому електрорушійною силою $E_{Ca^{2+}}$.

Якщо кальційпроникна пора, утворена при активації TRPV1 в умовах аплікаціїї капсаїцину, не залежить від будь-яких внутрішньоклітинних процесів, що розвиваються після деполяризації нейрона під дією гіперкалієвого розчину, тоді залежність між кальцієвим потоком та електрорушійною силою має бути лінійною. Як варто зазначити, впливом потенціалів дії (ПД), значна кількість яких ініціюється протягом аплікації гіперкалієвого розчину, можна знехтувати. Адже тривалість окремих ПД більш ніж на два порядки менша тривалості кальцієвого транзієнта, зумовленого деполяризацією мембрани. Крім того, періодична генерація ПД протягом аплікації гіперкалієвого розчину припиняється вже приблизно із 7-ї с розвитку кальцієвого транзієнта, у той час як ефект зменшення входу кальцію при аплікації капсаїцину триває. Залежності між значеннями, розрахованими за формулами (1) та (2) для електрорушійної сили для іонів кальцію та потоку цих іонів крізь плазматичну мембрану в умовах аплікації капсаїцину для середніх та маленьких нейронів ДКГ, а також відповідні лінійні апроксимації для кожної групи точок наведені на рис. 4.

Як видно з даних графіків, кожна група точок не зовсім відповідає лінійному закону (зрозуміло, що про таку відповідність важко судити впевнено при наявності лише чотирьох точок). Проте найбільш показовим є те, що лінійні апроксимації демонструють негативний коефіцієнт нахилу. Іншими словами, коефіцієнт пропорційності у формулі (3) є величиною від'ємною, що неможливо в біологічному аспекті. Наведені вище міркування в цілому свідчать про те, що зміни електрохімічного потенціалу, зумовлені підвищенням концентрації внутрішньоклітинного кальцію в результаті аплікації гіперкалієвого розчину, не можуть цілком визначати спостережувані зміни кальцієвих транзієнтів, викликаних аплікацією капсаїцину після попередньої деполяризації плазматичної мембрани. Це, у свою чергу, вказує на наявність якихось інших внутрішньоклітинних механізмів, що модулюють активність TRPV1-каналів протягом розвитку кальцієвого транзієнта, зумовленого деполяризацією.

Іншою причиною вказаних змін кальцієвих транзієнтів, індукованих короткочасною аплікацією капсаїцину на тлі розвитку кальцієвого транзієнта, викликаного попередньою деполяризацією мембрани нейрона, може бути модуляція активності каналів TRPV1 під дією внутрішньоклітинних агентів, котрі з'являються/накопичуються в цитозолі в значній кількості протягом транзієнтного підвищення внутрішньоклітинного рівня кальцію. Одним із кандидатів на таку роль у внутрішньому середовищі клітини може бути сам кальцій. Згідно з даними деяких досліджень, кальційзалежна та/або кальційкальмодулінзалежна деактивація потенціалкерованих кальцієвих каналів є характерною і для каналів TRPV1 [14]. Таким чином, чим більшою є внутрішньоклітинна концентрація кальцію, тим меншою має ставати активність ванілоїдних рецепторів. Зі збільшенням інтервалу від моменту попередньої деполяризації клітини до моменту прикладання капсаїцину внутрішньоклітинна концентрація кальцію поступово зменшується (рис. 2), а амплітуда транзієнтного підвищення кальцію, зумовлена активацією ванілоїдних рецепторів у відповідні моменти часу, – зростає (рис. 3, *А, Б*). Проте така інтерпретація даного ефекту не може пояснити за-

тримку початку капсаїциніндукованого транзієнта відносно моменту початку аплікації капсаїцину; значення такої затримки є різними для групи середніх (*В*) і малих (*Г*) нейронів ДКГ. Незрозумілим залишається також зниження концентрації кальцію в цитозолі в момент прикладання капсаїцину порівняно з такою, що спостерігається в разі ізольованих транзієнтів, зумовлених деполяризацією клітини в такі ж самі моменти часу (рис. 1, *А, Б*).

Іншою причиною модуляції активності TRPV1 може бути не деактивація цих каналів вільними іонами кальцію, а, навпаки, попередня активація (і наступна десенситизація) даних каналів внутрішньоклітинним лігандом, що вивільнюється при розвитку кальцієвого транзієнта, індукованого деполяризацією клітини. Незважаючи на те, що роль ванілоїдних рецепторів у генезі внутрішньоклітинних кальцієвих осциляцій на сьогодні залишається не до кінця вивченою (відповідні дані є багато в чому суперечливими), деякими дослідниками припускається, що TRPV1 можуть бути депоактивованими каналами (SOCC) [11]. Варто зазначити, що для деяких інших членів підродини каналів TRPV така їх властивість є доведеною. Загалом механізм функціонування депоактивованих каналів на сьогодні не є чітко з'ясованим. Проте припускається, що в разі спустошення кальцієвого депо ендоплазматичного ретикулуму виділяється специфічний внутрішньоклітинний месенджер (CIF), активуючий депоактивовані канали. Стосовно каналів TRPV1 у багатьох дослідженнях було показано, що ендогенним лігандом, здатним до активації TRPV1 є така речовина, як анандамід (похідне арахідонової кислоти). Результати нещодавніх досліджень довели, що анандамід може синтезуватися в клітинах організму (зокрема, і в нейронах ДКГ) в умовах значного підвищення внутрішньоклітинної концентрації кальцію [15]. Такий синтез може бути ініційований входом кальцію при активації як іонотропних, так і метаботропних рецепторів, а також при незалежному спустошенні внутрішньоклітинних кальцієвих депо. У цих самих роботах було показано, що в результаті синтезу анандаміду, індукованого підвищенням рівня кальцію в цитозолі, відбувається активація каналів TRPV1 та, відповідно, забезпечується додатковий вхід кальцію до внутрішньоклітинного середовища. Враховуючи дані факти в аспекті наших досліджень, ми можемо припустити, що вхід кальцію всередину клітини при деполяризації мембрани нейронів призводить до інтенсифікації синтезу анандаміду, а це, у свою чергу, активує канали TRPV1. У результаті цього прикладання капсаїцину протягом розвитку транзієнта, зумовленого деполяризацією клітини, не може призводити до розвитку кальцієвого транзієнта, за своїми параметрами відповідного такому при незалежній активації TRPV1. Протягом розвитку "деполяризаційного" кальцієвого транзієнта синтез анандаміду припиняється, наявна кількість даного агента частково виводиться в зовнішньоклітинне середовище спеціальними транспортерами, а частково руйнується всередині клітини. Зрозуміло, що прикладання капсаїцину в пізніші проміжки часу призводить до значнішої активації TRPV1 та, відповідно, більшого входу кальцію (це ми і відмічали в наших дослідах). Особливо добре таку тенденцію можна спостерігати в разі прикладання капсаїцину з найбільшим інтервалом (через 10 с) після моменту деполяризації мембрани клітини в групі середніх нейронів ДКГ. Тут капсаїцинзумовлений кальцієвий транзієнт не демонструє вірогідної різниці порівняно з ізольованим капсаїцинзумовленим транзієнтом. У той же час лише синтез анандаміду та його вплив на TRPV1 не можуть пояснювати наявність затримок між моментом прикладання капсаїцину та моментом ініціації капсаїцинзумовлених відповідей (Δt_R), а також різницю рівнів внутрішньоклітинного кальцію, відносно яких дані відповіді починали формуватися (V_0). Аналізуючи зазначені феномени, ми арифметично віднімали усереднений транзієнт, зумовлений аплікацією капсаїцину, від усередненого транзієнта, що розвивався в результаті деполяризації (рис. 5). Відповідні результати для обох груп нейронів ДКГ вказують на те, що капсаїцинзумовлені транзієнти відрізняються меншою крутизною фази наростання концентрації внутрішньоклітинного кальцію порівняно з такою, котра спостерігається в разі прикладання гіперкалієвого розчину (про це свідчать від'ємні значення на графіках отриманих різниць).

Подібний результат можна було б пояснити тим, що під час активації капсаїцинових рецепторів активація потенціалкерованих кальцієвих каналів виникає з певною затримкою, необхідною для того, щоб вхід кальцію та натрію через активовані TRPV1-канали ставав достатнім для зміщення потенціалу на мембрані нейрона до вищепорогового рівня. Тут слід звернути увагу на те, що найбільша різниця спостерігалася між швидкостями наростання усереднених транзієнтів у ділянках, близьких до пікових. В обох випадках ці ділянки відповідають тим значенням концентрації внутрішньоклітинного

вільного кальцію та тим моментам часу, коли в нейронах починають працювати внутрішньоклітинні механізми виведення надлишкового кальцію з цитозолю. Одним із основних механізмів такого виведення кальцію на даному етапі розвитку транзієнта є захоплення кальцію уніпортером мітохондрій. У роботі Хельвіга та співавт. [16] було показано, що активація TRPV1 за наявності у зовнішньоклітинному середовищі іонів кальцію призводить до значного зниження внутрішньоклітинного pH. Одночасно з цим у деяких дослідженнях [17] було виявлено, що ацидифікація, тобто зниження рівня pH, у нейронах призводить до драматичного зниження амплітуди кальцієвих транзієнтів, зумовлених прикладанням гіперкалієвого розчину. Причиною такого значного зниження є збільшення різниці потенціалів між цитозолем та мітохондріальним матриксом за рахунок надходження додаткових іонів водню. Власне дана різниця потенціалів і створює електрорушійну силу для функціонування уніпортера мітохондрій. Отже, збільшення цієї різниці потенціалів призводить до посилення руху іонів кальцію через уніпортер мітохондрій та, відповідно, до інтенсифікації виведення кальцію з цитозолю. Таким чином, активація TRPV1, зумовлюючи зниження pH, викликає збільшення електрорушійної сили, що переміщує іони кальцію через уніпортер мітохондрій. У результаті мітохондрії швидше "вбирають" кальцій, і швидкість наростання капсаїцинового транзієнта стає меншою порівняно з відповідним параметром деполяризаційного транзієнта.

Наведений механізм, вірогідно, працює також і при активації TRPV1 після попередньої деполяризації мембрани нейрона. Аналогічним чином зменшення внутрішньоклітинного pH призводить до посиленого захоплення кальцію мітохондріями. Проте в даному випадку мітохондрії на момент прикладання капсаїцину або вже накопичили певну кількість кальцію, або ж навіть почали його виведення в цитозоль. Це означає, що ефект, зумовлений зниженням внутрішньоклітинного pH, спроможний лише частково забезпечити зменшення кальцієвого транзієнта, індукованого прикладанням капсаїцину. Проте такого посилення функції мітохондрій цілком достатньо для зниження рівня внутрішньоклітинного кальцію в момент аплікації капсаїцину, а також для виникнення затримки розвитку відповідного транзієнта, зумовленого входом кальцію через канали TRPV1.

Із рис. 1, *А, Б* добре видно, що прикладання капсаїцину через 3 с після деполяризації нейронів ДКГ призводить до значно більшого зниження концентрації внутрішньоклітинного вільного кальцію, від якої починається формування капсаїцинзумовленого транзієнта, аніж у разі більших Δt. Такий характер активації TRPV1 досить добре узгоджується з наведеним вище поясненням. Дійсно, у межах початкової фази розвитку кальцієвого транзієнта, індукованого деполяризацією плазматичної мембрани, мітохондрії лише починають захоплювати кальцій з цитозолю; адже ці органели активно починають даний процес при підвищенні внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} до рівня 400–500 нМ. Умови Δt = 3 с приблизно відповідають саме такій ситуації, коли мітохондрії починають активно депонувати кальцій. Як наслідок такого збігу потенційована активацією TRPV1 здатність мітохондрій до захоплення кальцію, а також ще досить незначна його кількість у вказаних органелах на момент прикладання капсаїцину зумовлюють посилене захоплення вільного кальцію з цитозолю. У випадках же, коли проміжок часу між деполяризацією мембрани нейрона та аплікацією капсаїцину є більшим, мітохондрії вже встигають захопити значну кількість кальцію; відповідно, їх здатність до додаткового захоплення є значно нижчою, ніж така на ранніх стадіях розвитку транзієнта, індукованого прикладанням гіперкалієвого розчину.

Варто також звернути увагу на міжпопуляційні відмінності ефектів послідовного прикладання гіперкалієвого розчину та капсаїцину до середніх та маленьких нейронів ДКГ. Особливо це стосується затримок між прикладанням капсаїцину та моментом, коли стає можливим чітко відрізнити відповідь клітини на дану стимуляцію на тлі розвитку транзієнта, зумовленого деполяризацією (рис. 2). У малих нейронах найбільша затримка відповіді клітини на стимуляцію капсаїцином характерна для ранніх стадій розвитку транзієнта, індукованого деполяризацією (Δt = 3 с). Імовірно, це пов'язано з тим, що мітохондрії на даному етапі в маленьких нейронах лише починають залучатись у процеси регуляції внутрішньоклітинного кальцію. На відміну від маленьких нейронів у нейронах середнього розміру в таких самих експериментальних умовах спостерігається значно менша затримка відповіді клітини на капсаїцинову стимуляцію. Причиною тут може бути та обставина, що амплітуда "деполяризаційного" кальцієвого транзієнта в середніх нейронах є помітно більшою, ніж така в маленьких клітинах. Це означає, що акумуляція вільних іонів

кальцію в цитозолі середніх нейронів реалізується швидше. Отже, поріг активації мітохондрій (400–500 нМ) перевищується раніше, і мітохондрії раніше починають захоплювати кальцій із внутрішньоклітинного середовища. Як наслідок, на момент стимуляції нейрона капсаїцином мітохондрії вже накопичують деяку кількість кальцію; здатність до додаткового захоплення стає дещо меншою порівняно з такою в маленьких нейронах, і затримка відповіді є меншою. Крім того, дані рис. 1 свідчать про те, що амплітуда капсаїцинзумовленого транзієнта в маленьких нейронах більша, ніж у середніх. Це може бути пов'язане з більшим рівнем експресії каналів TRPV1 в дрібних нейронах порівняно з таким у нейронах середнього розміру, що узгоджується з результатами інших досліджень [4]. Отже, потенціюючий вплив аплікації капсаїцину на мітохондрії може бути значнішим у популяції маленьких нейронів ДКГ.

У випадку, коли Δt складає 7 с, співвідношення затримок відповідей у маленьких та середніх нейронах змінюється на протилежне, що цілком узгоджується з викладеними вище припущеннями. Дійсно, у випадку середніх нейронів більш рання інтенсифікація захоплення кальцію мітохондріями зумовлює те, що на момент аплікації капсаїцину (через 7 с) у мітохондріях спостерігається максимум наповненості кальцієм, тобто здатність цих органел додатково захоплювати кальцій (навіть при потенціації, пов'язаній з дією капсаїцину) є мінімальною. У маленьких же нейронах мітохондріальний механізм захоплення кальцію активується дещо пізніше, і, відповідно, мітохондрії більш здатні до накопичення кальцію.

Резюмуючи все вищевикладене, можна зробити припущення, що наявність каналів TRPV1 у соматичній мембрані нейронів ДКГ є ланкою, котра поєднує процеси внутрішньоклітинної регуляції концентрації кальцію та рівня pH. Механізм такої регуляції є досить складним; його компонентами є процеси депонування та вивільнення кальцію мітохондріями, синтез внутрішньоклітинного месенджера, що одночасно може активувати різні, протилежні за своїми властивостями, рецептори, а також бути міжклітинним медіатором, та активація низки мембранних структур.

Узагальнено, весь процес можна представити як наступну послідовність. Активація потенціалкерованих каналів призводить до потужного входу кальцію в клітину. За цим виникає кальцій-індуковане вивільнення кальцію з депо саркоплазматичного ретикулуму. Далі мітохондрії починають вбирати кальцій із цитозолю; одночасно з цим (за невідомим на сьогодні механізмом) виникають активація депоактивованих каналів плазмолеми та опосередкована формуванням анандаміду активація каналів TRPV1. Далі вмикаються механізми депонування кальцію, котрий повертається до саркоплазматичного ретикулуму; внаслідок активації TRPV1-каналів знижується значення pH всередині клітини. Через це депонуюча здатність мітохондрій підвищується, і вони починають інтенсивніше вбирати кальцій. У результаті різке та значне підвищення концентрації внутрішньоклітинного кальцію разом із зниженням pH призводять до деактивації потенціалкерованих та, можливо, інших каналів плазмолеми. Далі починаються поступовий викид кальцію мітохондріями та виведення його відповідними АТФазами плазмолемної та саркоплазматичної мембран, а також натрій-кальцієвим обмінником. Ефектом дії такого механізму є забезпечення стрімкого та потужного, проте нетривалого підвищення рівня внутрішньоклітинного кальцію. Адекватна потужність кальцієвого сигналу є необхідною для запуску/регуляції численних внутрішньоклітинних процесів; з іншого боку, тривале підвищення рівня кальцію є небажаним, бо може призводити навіть до загибелі клітини. Адекватний зв'язок між згаданими вище системами та структурами клітини, а також тонкий баланс їх функціонування є одними з найістотніших чинників, що забезпечують нормальну життєдіяльність клітини.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. M. J. Caterina, M. A. Schumacher, and M. Tominaga, "The capsaicin receptors: a heat-activated ion channel in pain pathway," *Nature*, **389**, No. 5, 816-824 (1997).
2. M. J. Caterina, "Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation," *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **292**, No. 1, 64-76 (2007).
3. M. J. Caterina, A. Leffler, and A. B. Malmberg, "Impare nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor," *Science*, **288**, No. 5464, 306-313 (2000).
4. Shuangsong Hong and J. W. Wiley, "Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in expression and function of vanilloid receptor 1," *JBC*, **280**, No. 1, 618-627 (2005).
5. T. Cristoph, A. Grunweller, and J. Mika, "Silencing of vanilloid receptor TRPV1 by RNAi reduces neuropathic and visceral pain *in vivo*," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **350**, No. 2, 238-243 (2006).
6. Ю. В. Дребот, *Экспрессия мРНК ванилоидных рецепторов*

в культуре нейронов гиппокампа, Автореф. дис. … канд. биол. наук, Киев (2008).
7. С. В. Романенко, П. Г. Костюк, О. П. Костюк, "Вплив габапентину на кальцієві транзієнти в нейронах дорсальнокорінцевих гангліїв щурів", *Нейрофизиология / Neurophysiology*, **40**, № 4, 281–287 (2008).
8. G. Grynkiewicz, M. Poense, and R. Y. Tsien, "A new generation of Ca indicators with greatly improved fluorescence propeties," *J. Biol. Chem*., **260**, No. 6, 3440-3450 (1985).
9. Н. А. Соловйова, *Вивчення впливу гіпоксії оксиду азоту на кальцієві струми сенсорних нейронів мишей*, Автореф. дис. … канд. мед. наук, Київ (1999).
10. В. Ф. Ганонг, *Фізіологія людини*, БаК, Львів (2002).
11. Liu Min, Liu Meng-Chuan, and M. Charalambos, "Versatile regulation of cytosolic Ca^{2+} by vanilloid receptor 1 in rat dorsal root ganglion neurons," *J. Biol. Chem*., **278**, No. 7, 5462-5472 (2003).
12. B. Minke and B. Cook, "TRP channel proteins and signal transduction," *Physiol. Rev.*, **82**, No. 2, 429-472 (2002).
13. І. В. Степанова, *Динамічна взаємодія кальцієвих каналів плазматичної мембрани з внутрішньоклітинними кальцієвими депо в сенсорних нейронах щура,* Автореф. дис. … канд. біол. наук, Київ (2005).
14. M. Numazaki, T. Tominaga, and K. Takeuchi, "Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin," *PNAS*, **100**, No. 13, 8002-8006 (2003).
14. M. Stelt, M. Trevisani, and V. Vellani, "Anandamide acts as an intracellular messenger amplifying Ca^{2+} influx via TRPV1 channels," *EMBO J.*, **24**, No. 17, 3026-3037 (2005).
16. N. Hellwig, T. D. Plant, W. Janson, and Liu Min, "TRPV1 acts as proton channel to induce acidification in nociceptive neurons," *J. Biol. Chem*., **279**, No. 33, 34553-34561 (2004).
17. Є. С. Потапенко, *Вплив змін лужно-кислотної рівноваги позаклітинного середовища на функціонування кальцієвих депо нейронів заднього рогу спинного мозку щурів,* Автореф. дис. … канд. мед. наук, Київ (2004).