

ВПЛИВ ГАБАПЕНТИНУ НА РІЗНІ ПОПУЛЯЦІЇ НЕЙРОНІВ ДОРСАЛЬНОКОРИНЦЕВИХ ГАНГЛІЇВ ЩУРІВ ІЗ СРЕПТОЗОТОЦИНІНДУКОВАНИМ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ

Надійшла 10.03.09

Досліджували вплив габапентину (агента, подібного за молекулярною будовою до гамма-аміномасляної кислоти – ГАМК) на викликані деполяризацією кальцієві транзйенти в малих (діаметр соми до 25 мкм), середніх (25–35 мкм) та великих (більше 35 мкм) нейронах дорсальнокоринцевих гангліїв (ДКГ) щурів із стрептозотоциніндукованим діабетом. Згадані транзйенти вимірювали за допомогою кальційчутливого флуоресцентного барвника Fura 2/AM. Амплітуда кальцієвих транзйентів у щурів з діабетом була дещо вищою, ніж у здорових тварин (у великих та середніх нейронах ДКГ у середньому приблизно на 12, а у малих на 8 %). Розвиток діабету призводив до істотного збільшення повної тривалості таких транзйентів: у великих, середніх та малих нейронах ДКГ середні значення цього параметра у тварин з діабетом були відповідно в 2.6, 4.3 та 2.5 разу більші, ніж у нормі. Тривалості транзйентів на рівні половини амплітуди ($T_{0.5}$) у результаті розвитку діабету зазнавали значно менших змін. Аплікації габапентину (25 мкМ) призводили до зменшення амплітуди кальцієвих транзйентів, їх повної тривалості та $T_{0.5}$. Ефекти габапентину були найсильнішими щодо великих нейронів ДКГ, де амплітуда кальцієвих транзйентів зменшувалася майже на 36 %, а загальна тривалість – більше ніж втричі. Параметр $T_{0.5}$ під дією габапентину зазнавав помірних змін (зменшення у межах 8–12 % у всіх групах нейронів ДКГ). Зменшення амплітуди кальцієвих транзйентів під дією габапентину розрізнялись у різних підгрупах нейронів ДКГ. Серед нейронів із сомами середнього розміру зменшення цього параметра у капсаїцинпозитивних клітинах складало 16.3, а у капсаїциннегативних – 36.7 %. Отримані дані свідчать про здатність габапентину певною мірою нормалізувати параметри змінених у результаті розвитку діабету кальцієвих транзйентів у нейронах ДКГ. Ця здатність є найбільш вираженою щодо великих нейронів, частина котрих у тварин з діабетом, вірогідно, аномально залучаються в передачу ноцицептивних впливів, а також щодо частини середніх нейронів ДКГ, причетних до формування відчуттів гострого болю.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: нейрони дорсальнокоринцевих гангліїв, кальцієві транзйенти, габапентин, ноцицепція, діабет.

ВСТУП

Цукровий діабет – важке хронічне захворювання, що розвивається внаслідок порушення секреції інсуліну β -клітинами підшлункової залози та відповідного підвищення рівня глюкози в крові. Стан цукрового діабету зумовлює різке підвищення ризику низки важких ускладнень, таких, як нефропатія,

ангіопатія, кардіоміопатія, ретинопатія, нейропатія та енцефалопатія. Проявом діабетичної нейропатії є патологічно змінена больова чутливість, що пов'язано насамперед з порушеннями функції та структури первинних аферентних нейронів. Звичайні клінічні прояви діабетичної нейропатії – це гострі, пекучі больові відчуття, котрі часто посилюються вночі. Фактори, що зумовлюють розлади функцій сенсорних нейронів, є досить різноманітними. Певну роль можуть відігравати порушення кровопостачання та живлення аферентних нервових волокон, «затиснення» їх іншими тканинами внаслідок набрякання, розлади внутрішньоклі-

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).

тинних процесів у сомі та відростках аферентних одиниць. Так, відомо, що порушення вуглеводного обміну призводить до порушення функцій мітохондрій і, як наслідок, зменшення синтезу АТФ. Недостатня забезпеченість АТФ зумовлює дисфункцію ряду АТФаз (натрій-калієвої, натрій-кальцієвої та ін.), порушення активності іонних каналів та багатьох внутрішньоклітинних сигнальних і метаболічних шляхів. Одним з істотних наслідків таких внутрішньоклітинних розладів є розлад кальцієвого гомеостазу в клітині. Відомо, що мітохондрії самі по собі є важливим комплексом кальційрегулюючих структур, а АТФ є необхідним для роботи кальцієвої «помпи» в плазматичній та ендоплазматичній мембранах, кальцієвих обмінників, а також для фосфорилування білків трансмембранних каналів.

Аферентні нейрони, котрі генерують та проводять ноцицептивні сигнали, мають аферентні волокна С- та Аδγ-типів; вони розрізняються за своїми властивостями та будовою, розмірами сом, характеристиками проведення потенціалів дії (ПД) та типом експресії мембранних каналів та рецепторів [1]. Розробка та удосконалення лікувальних впливів на ці нейрони з метою знеболення у випадку діабетичної нейропатії є актуальною медичною проблемою. Так, місцеві анестетики (наприклад, лідокаїн), загальні знеболюючі агенти (анальгін), блокатори кальцієвих каналів (в основному дигідропіридини) не є селективними та мають досить багато побічних ефектів [2].

Габапентин – 1-(амінометил) циклогексаноцтова кислота – за молекулярною будовою є аналогом основного гальмівного трансмітера в ЦНС – ГАМК. Дана речовина, що спочатку застосовувалася для лікування епілептичних нападів, згодом почала використовуватись як антибольовий агент [3]. Особливістю цієї речовини порівняно з іншими препаратами такого роду є низький рівень побічних ефектів, що пов'язано зі специфічністю її дії на нервову тканину. Було показано, що габапентин здатний ефективно пригнічувати больові відчуття у піддослідних тварин в умовах формалінового тесту, тесту «гаряча платівка» («hot plate»), інтенсивного механічного подразнення кінцівки («raw pressure»), тесту «відсмикування хвоста» («tail flick»), а також моделі болю, індукованого карагеноном [4–8]. Виявилось, що механізми дії габапентину досить багатобічні. Встановлено, що габапентин може взаємодіяти з помірною афінністю з ГАМК_A- та ГАМК_B-рецепторами, збільшувати рівень ГАМК

у головному мозку та одночасно зменшувати там рівень глутамату, пригнічуючи збуджуючу синаптичну передачу, опосередковану глутаматними AMPA-рецепторами. Габапентин пригнічує натрієві струми через натрієві потенціалзалежні канали, активує АТФ-залежні калієві канали та пригнічує активність потенціалзалежних кальцієвих каналів [3]. Результати клінічних досліджень показали, що габапентин є ефективним при лікуванні післяопераційного болю в умовах мастектомії та операцій на колінному суглобі, тригемінальної та постгерпетичної невралгії, а також болів при оперізувальному лишаї [9–12].

Особливості впливу габапентину на сенсорні нейрони різних типів залишаються маловивченими. Очевидно, що популяції цих нейронів істотно розрізняються за своїми властивостями та, відповідно, чутливістю до алгогенних та анальгетичних агентів. У нашій попередній роботі ми виявили помітну специфічність впливів габапентину на різні розмірні групи нейронів дорсальнокорінцевих гангліїв (ДКГ) щурів [13]. Метою даного дослідження було з'ясування особливостей впливу габапентину на нейрони ДКГ різних типів в умовах розвитку експериментального стрептозотоциніндукованого цукрового діабету. Отримані результати можуть бути корисними в аспекті з'ясування можливостей застосування даного препарату з терапевтичною метою при діабетичних нейропатіях.

МЕТОДИКА

У наших експериментах ми використовували модель стрептозотоциніндукованого цукрового діабету. Для цього щурам-самцям лінії Вістар віком 21 день внутрішньоочеревинно двічі з інтервалом 24 год вводили 80 мг/кг стрептозоточину в 0.9 %-вому розчині NaCl. Їх утримували в умовах, ідентичних таким у нашій попередній роботі [13], на однаковому раціоні, з вільним доступом до їжі та води. Результати, отримані нами раніше [13] на інтактних нормальних щурах, у даній роботі використовували як контрольні. Розвиток діабету через три тижні верифікували згідно із зовнішнім виглядом і поведінкою тварин (розвиток ретинопатії, випадіння волосся, надмірне споживання води), а також істотним підвищенням концентрації глюкози в плазмі крові, взятої із хвостової вени; експрес-аналіз проводили за допомогою глюкометра („Precision QID MediSense”, США). Рівень глюкози 12–28

мМ вважався вірогідною ознакою розвитку діабету, і до групи експериментальних тварин були віднесені щури тільки з такими показниками [14, 15].

Для проведення дослідів використовували свіжоізольовані нейрони ДКГ контрольних щурів та щурів з цукровим діабетом; їх вік на той момент складав 45–60 днів. Виділені на грудному та поперековому рівнях ганглії вміщували в охолоджений модифікований розчин Тіроде наступного складу (у мілімолях на 1л): NaCl – 140, KCl – 2, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 2, HEPES – 10, глюкоза – 10 (pH 7.35). Для отримання окремих клітин виділені ганглії ферментативно обробляли підігрітим до 36 °С розчином Тіроде із 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 (90 хв⁻¹) протягом 30 хв. Після ферментативної обробки ганглії відмивали в чистому розчині Тіроде протягом 20 хв при дещо повільнішому перемішуванні (70 хв⁻¹), вміщували в 0.5 мл розчину Тіроде та пропускали через скляні оплавлені пастерівські піпетки різного 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 скельця.

Після вказаних процедур клітини промивали свіжим розчином Тіроде та завантажували флуоресцентним кальцієвим зондом Fura-2. Для цього зразки вміщували в розчин Тіроде із додаванням диметилсульфоксидного розчину ацетоксиметилестерої форми даного барвника (Fura-2/AM) у концентрації 5 мкМ та 10 мкл/мл 0.05 %-вого розчину детергента Плуронік (F-127, «Molecular Probes», США) і витримували в термостаті протягом 30 хв. З метою забезпечення деестерифікації незарядженої форми зонду клітини промивали нормальним розчином Тіроде та витримували в темряві при температурі 35 °С протягом 30 хв.

Для подальшого проведення вимірів рівня внутрішньоклітинного кальцію скельця з клітинами переносили в робочу камеру дослідницької установки, оснащеної флуоресцентним мікроскопом з водоімерсійним об'єктивом (×40), фотоелектронним помножувачем та електронною системою попередньої обробки сигналу («Luigs und Neumann», ФРН). Клітини в камері постійно суперфузувалися нормальним розчином Тіроде. Кальцієві транзйенти, викликані дією гіперкалієвого розчину, реє-

стрували за допомогою програмного забезпечення «Tida 5.18» («Tida software», «Batelle», ФРН). Внутрішньоклітинний рівень Ca²⁺ розраховували згідно з рівнянням Грінкевича [16].

Деполаризацію мембрани для ініціації кальцієвого транзйента здійснювали з використанням розчину наступного складу (у мілімолях на 1 л): NaCl – 92, KCl – 50, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 2, HEPES – 10, глюкоза – 10 (pH 7.35). Для вивчення впливу габапентину на нейрони ДКГ проводили аплікацію розчину даного агента («Sigma», США) у концентрації 25 мкМ у нормальному розчині Тіроде протягом 3–5 хв; аплікація виконувалася під час реєстрації відповідного кальцієвого транзйента, викликаного дією гіперкалієвого розчину [8, 17].

Записи транзйентів піддавали низькочастотній цифровій фільтрації, застосовуючи програми «Tida 4.11» («НЕКА Elektronik», ФРН). Статистична обробка даних проводилася за допомогою програми «Exel 2003». Числові дані представлені нижче у вигляді середніх значень ± середньоквадратичне відхилення (s.d.); кількість досліджуваних нейронів у кожній групі наведена при першому згадуванні в дужках разом з відповідним параметром. Статистичну вірогідність міжгрупових різниць оцінювали з використанням критерію Ст'юдента; граничним значенням вважалось значення $P < 0.05$. Склад бімодальних розподілів числових даних визначали із застосуванням апроксимації таких гістограм сумою розподілів Гауса за методом найменших квадратів за допомогою програми «MathLab 2007».

РЕЗУЛЬТАТИ

Аналогічно тому, як це робилося в наших попередніх дослідженнях, ми розділили досліджувані нейрони на три розмірні групи: з малим (до 25 мкм), середнім (25–35 мкм) та великим (більше 35 мкм) діаметром соми. Згідно з літературними даними, межі таких діапазонів відповідають об'єктивним характеристикам статистичного розподілу значень розміру нейронів ДКГ [18]. Прийнято вважати, що чутливі периферичні закінчення маленьких нейронів ДКГ відносяться до групи ноцицепторів, а відповідні аферентні волокна – до С-типу. Середні нейрони теж пов'язані з ноцицепцією, вони мають тонкі мієлінізовані волокна групи Аδ. Вважають, що дана популяція нейронів ДКГ має відношення до формування відчуття гострого болю. Великі нейрони ДКГ мають мієлінізовані волокна більшого

діаметра; їх периферичні структури не є ноцицепторами, а відносяться до пропріоцепторів та інших відносно низькопорогових соматичних рецепторів [19].

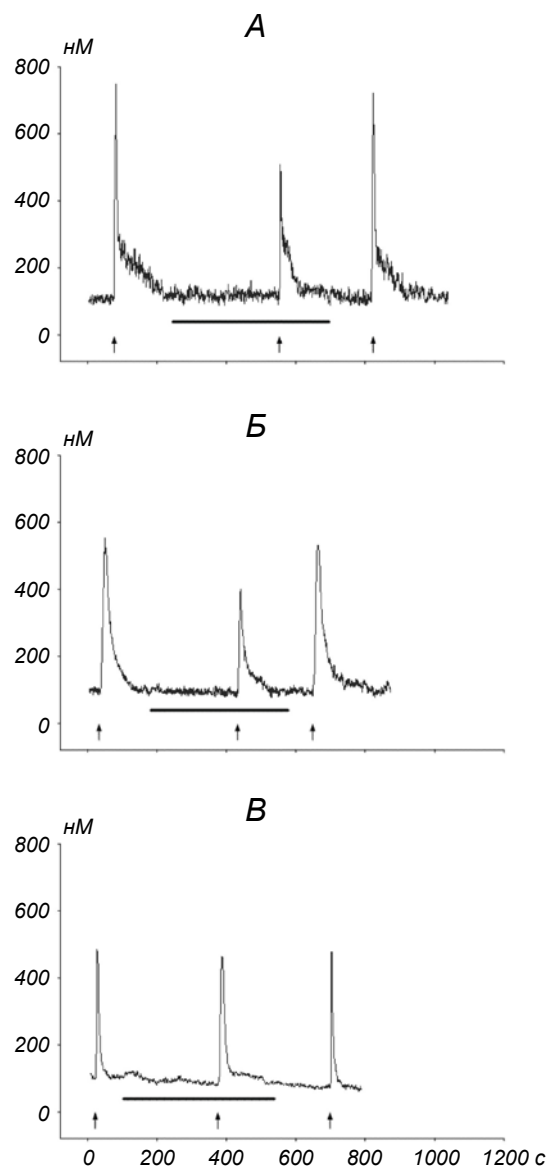
У перебігу дослідження дії габапентину кальцієві транзйенти викликалися трьома послідовними короткочасними (7 с) аплікаціями гіперкалієвого розчину. Перший такий транзйент був контрольним та використовувався для подальшого порівняння з двома іншими. Друга аплікація гіперкалієвого розчину проводилася в присутності габапентину в концентрації 25 мкМ; дія габапентину починалася за 3–5 хв до початку калієвої деполяризації, котра ініціювала кальцієвий транзйент, і тривала 6–7 хв. Третя аплікація гіперкалієвого розчину виконувалася без габапентину та після відмивання відповідного нейрона в розчині Тірде протягом 1–2 хв. Щоб усунути можливу різницю у наповненні кальцієвих депо різних нейронів, на початку експерименту проводилося попереднє прикладання гіперкалієвого розчину.

Базовий рівень кальцію у великих нейронах ДКГ ($n = 8$) тварин з діабетом складав у середньому 104.7 ± 11.0 , у середніх ($n = 29$) – 111.9 ± 7.4 , а у маленьких ($n = 6$) – 109.1 ± 6.5 нМ. Базові значення рівня внутрішньоклітинного кальцію в кожній групі нейронів не змінювалися після відновлення рівня кальцію внаслідок кожного викликаного кальцієвого транзйента та не зазнавали помітних змін після аплікацій габапентину (рис. 1). Результати порівняння наведених значень з відповідними даними для інтактних контрольних тварин [13] показали, що базовий рівень кальцію в нейронах середнього розміру діабетичних тварин був у середньому більший на 4 %; у групах маленьких та великих нейронів аналогічні значення практично не відрізнялися від контрольних.

Значення амплітуд кальцієвих транзйентів у тварин з діабетом складали для великих клітин ДКГ 445.4 ± 35.5 , для середніх – 439.9 ± 25.2 , а для маленьких – 442.4 ± 34.7 нМ. Отже, амплітуди кальцієвих транзйентів для різних популяцій нейронів у разі розвитку діабету помітно перевищували такі в інтактних тварин [13]. У нейронів із сомами великого розміру таке перевищення складало в середньому 12.2 %; аналогічна різниця для середніх нейронів дорівнювала 12.0, а для популяції маленьких – 8.2 %.

Найбільш істотні зміни, пов'язані з розвитком діабету, демонстрував такий параметр викликаних деполяризацією кальцієвих транзйентів, як їх повна

тривалість (T). У щурів з діабетом середньогрупове значення цього параметра складало в середньому для великих нейронів ДКГ 198.6 ± 35.5 , для середніх – 135.0 ± 27.9 , а для маленьких – 113.0 ± 18.0 с. Нагадаємо, що відповідні значення в інтактних тварин [13] дорівнювали відповідно 55.4 ± 14.8 , 31.3 ± 11.2 та 44.6 ± 14.3 с. Іншими словами, повна три-



Р и с. 1. Записи кальцієвих транзйентів, викликаних короткочасним прикладанням гіперкалієвого розчину тричі поспіль – в умовах контролю, під час аплікації габапентину та після відмивання відповідно, у нейронах дорсальнокоріньцевих гангліїв із великими (А), середніми (Б) та маленькими (В) розмірами соми.

По осі абсцис – час, с; по осі ординат – концентрація внутрішньоклітинного кальцію, нМ. Лінією під записами показано тривалість прикладання габапентину, стрілками позначено моменти прикладання гіперкалієвого розчину.

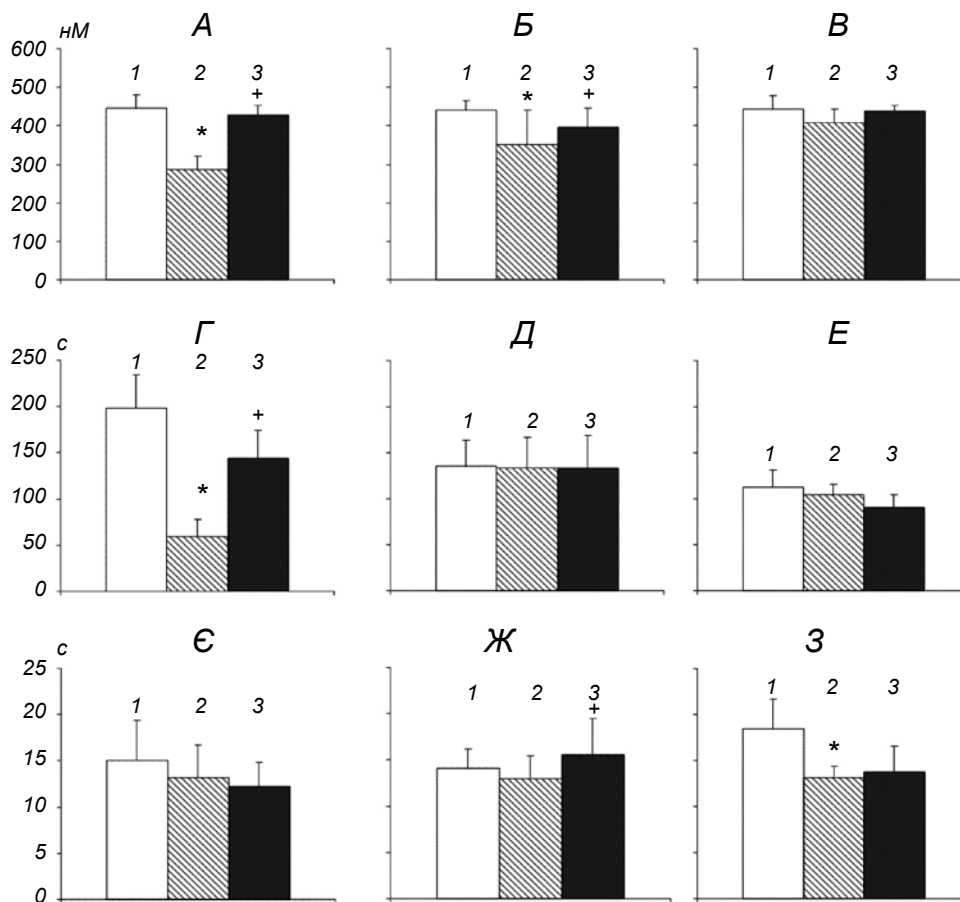


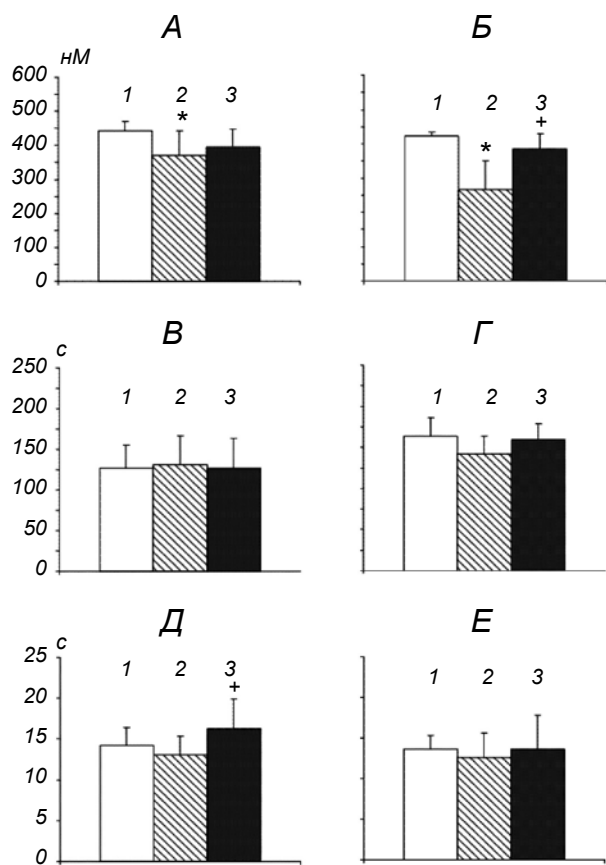
Рис. 2. Середні значення амплітуди кальцієвих транзєнтів (А, Б, В), їх повної тривалості (Г, Д, Е) та тривалості на рівні половини амплітуди (Є, Ж, З) у вихідному стані (1), під час аплікації габапентину (2) та після відмивання (3) у великих (А, Г, Є), середніх (Б, Д, Ж) та маленьких (В, Е, З) нейронах дорсальнокоринцевих гангліїв шурів із стрептозотосиніндукованим діабетом.

Наведено середні значення \pm середньоквадратичні відхилення. Зірочками позначено випадки вірогідних ($P < 0.05$) відмінностей показників відповідних параметрів під дією габапентину від контрольних значень, хрестиками – вірогідних відмінностей значень відповідного параметра після відмивання габапентину від значення, зумовленого дією габапентину.

валість кальцієвих транзєнтів у великих нейронах ДКГ перевищувала таку в інтактних тварин більш ніж втричі (на 261 %), у середніх нейронах – більш ніж вчетверо (на 331.1 %), а у маленьких – у 2.5 разу (на 153.6 %). Щоб точніше характеризувати кальцієві транзєнти, ми також визначали тривалість таких транзєнтів на рівні половини їх амплітуди (далі $T_{0.5}$). Даний параметр не охоплює всього процесу динамічної зміни концентрації кальцію в клітині, але, оскільки вимірювання проводиться на ділянці стрімких змін, значення $T_{0.5}$ значно менше залежить від шумів. Крім того, очевидно, що значення повної тривалості транзєнта T не можна виміряти з високою точністю, оскільки власне момент повернення рівня кальцію до базової величини визначити досить важко. Вимірювання $T_{0.5}$ дало

середні значення 15.0 ± 4.4 с для великих нейронів, 14.0 ± 2.1 с для середніх та 18.4 ± 3.3 с для маленьких (рис. 2). Отже, середні значення $T_{0.5}$ транзєнтів у великих нейронах ДКГ у шурів з діабетом було навіть меншим, ніж у контрольних здорових тварин (на 15 %; $P > 0.05$). У той же час значення $T_{0.5}$ діабетичних тварин у середніх за розміром нейронах ДКГ були дещо більшими, ніж у нормі (на 17.3 %; $P > 0.05$), а у маленьких нейронів ця різниця була досить значною (32.4 %; $P > 0.05$).

Резюмуючи всі наведені дані, слід зазначити, що розвиток експериментального цукрового діабету у шурів зумовлював у цілому досить помірне підвищення амплітуди викликаних деполяризацією кальцієвих транзєнтів у всіх розмірних групах нейронів ДКГ. „Швидка” фаза цих транзєнтів, яка характе-



Р и с. 3. Середні значення амплітуди (А, Б), тривалості (В, Г) та ширини на рівні половини амплітуди (Д, Е) кальцієвих транзєнтів у капсаїцинпозитивних (А, В, Д) та капсаїциннегативних (Б, Г, Е) нейронах.

Решта позначень ті ж самі, що й на рис. 2.

ризувалася значенням $T_{0.5}$, у великих нейронах ДКГ демонструвала певну тенденцію до скорочення, тоді як у середніх та малих нейронах її тривалість збільшувалася; особливо значні зміни спостерігались у популяції малих нейронів (зростання на 32.4 %). Найдраматичніші зміни в умовах розвитку діабету відбувались у такого параметра кальцієвих транзєнтів, як їх повна тривалість. Цей показник у тварин з діабетом збільшувався в рази. При цьому найзначніших змін повна тривалість транзєнтів зазнавала в середніх нейронах. Отже, в умовах діабету істотно подовжується саме „повільна” фаза повернення значення внутрішньоклітинної концентрації кальцію в клітині до вихідного рівня.

Другий викликаний деполяризацією кальцієвий транзєнт у тест-серії реєструвався під час дії габапентину. Середня амплітуда кальцієвих транзєнтів в умовах аплікації габапентину, що передувала дії гіперкалієвого розчину та тривала під час такої дії,

у великих нейронах ДКГ діабетичних щурів складала 285.9 ± 36 , у групі середніх нейронів – 352.1 ± 87.8 , а у малих нейронах – 497.9 ± 34.2 нМ. Таким чином, амплітуда кальцієвих транзєнтів у великих нейронах ДКГ порівняно з такою контрольного кальцієвого транзєнта у цих самих нейронах під дією габапентину зменшувалася у середньому на 35.8 % ($P < 0.05$). У групі середніх нейронів таке зменшення складало 20 ($P < 0.05$), а у малих – 7.8 ($P > 0.05$) %. Отже, найбільший ефект, спричинений дією габапентину на нейрони ДКГ щурів з діабетом, спостерігався у групі великих нейронів. У середніх нейронах ефект був істотним, але помітно меншим, а у малих нейронів зміни були вельми помірними та невірогідними. При аналогічній дії габапентину на нейрони ДКГ здорових тварин найбільший ефект спостерігався у середніх клітинах. У малих нейронах він був так само незначним та невірогідним, а в популяції великих нейронів був майже відсутній [13].

Значення повної тривалості кальцієвого транзєнта для великих нейронів ДКГ тварин з діабетом у середньому складало 59.6 ± 18.7 с; для групи середніх нейронів цей показник становив 133.4 ± 33.3 , а для малих – 104.6 ± 10.8 с. Отже, середнє значення повної тривалості такого зрушення у великих нейронах ДКГ порівняно з таким першого контрольного кальцієвого транзєнта під дією габапентину драматично зменшувалося та складало лише 30 % контрольного, взятого за 100 %. Воно істотно наближалося до тривалості транзєнтів у контрольних тварин [13]. У середніх нейронах таке зменшення було практично відсутнім (у середньому лише 1.2 %), а у малих – досить помітним (7.5 %). Значення $T_{0.5}$ під дією габапентину помітно зменшувалося у всіх розмірних групах нейронів ДКГ. Таке зменшення становило 12.3 % для великих нейронів ДКГ, 8.1 % – для середніх нейронів та 10.3 % – для малих нейронів щурів з діабетом.

Узагальнюючи ці зміни середніх значень параметрів кальцієвих транзєнтів під дією габапентину, можна констатувати, що найбільші зрушення як у „швидкій”, так і в наступній „повільній” фазі розвитку транзєнтного підвищення кальцію спостерігаються у великих нейронах ДКГ. Для популяції середніх нейронів такі зміни були значно помірнішими та стосувалися більшою мірою „швидкої” фази підвищення кальцію. Зміни в популяції малих нейронів охоплювали як $T_{0.5}$, так і повну тривалість транзєнта, проте інтенсивність цих

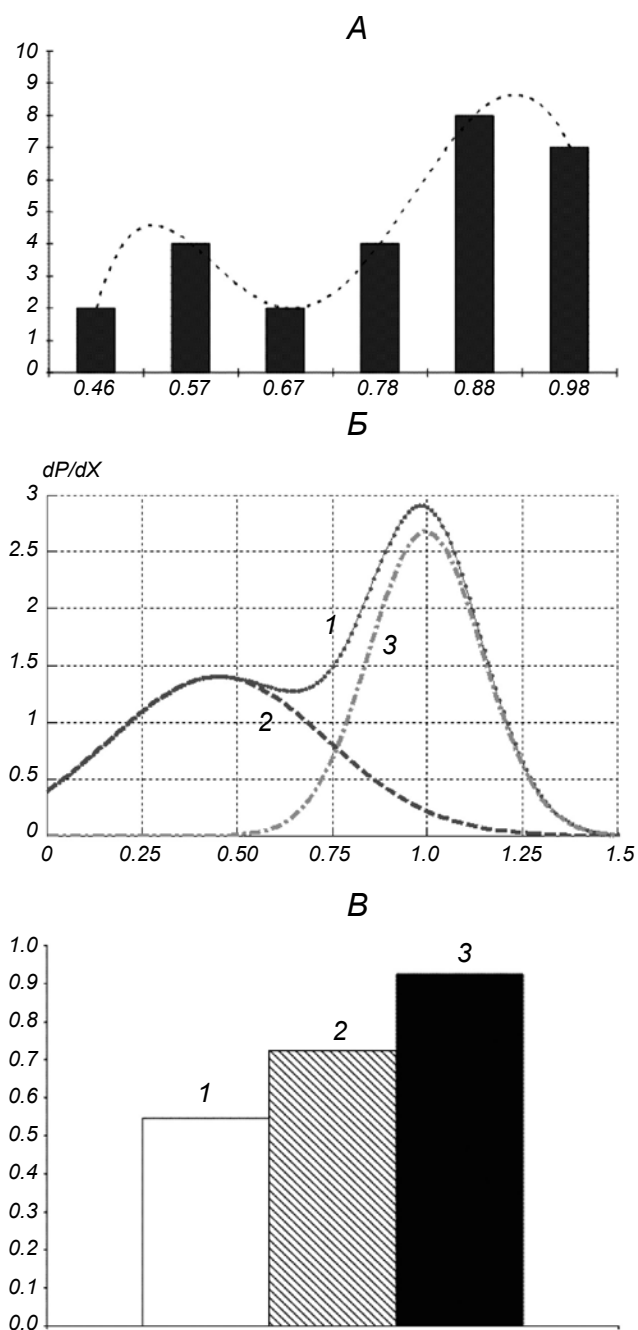


Рис. 4. Неоднорідність змін кальцієвих транзєнтів, викликаних деполаризацією у середніх нейронах дорсальнокоринцевих гангліїв щурів із цукровим діабетом, під впливом габапентину. *А* – гістограма значень відносного зменшення амплітуди кальцієвих транзєнтів під дією габапентину (вісь абсцис); по осі ординат – кількість спостережень. Штриховою лінією позначено інтерполяцію точкових значень кубічними сплайнами. *Б* – аналіз розподілу щільності імовірності значень відносного зменшення амплітуди кальцієвого транзєнта; виділення двох складових за допомогою апроксимації двома функціями Гауса. По осі

змін вказує на вельми помірний вплив габапентину на нейрони даної розмірної групи. Таким чином, у щурів з діабетом вплив габапентину є найістотнішим щодо нейронів ДКГ великого розміру та, вірогідно, частини клітин із сомами середніх розмірів.

Якщо порівнювати дію габапентину на різні популяції нейронів ДКГ діабетичних тварин з такою у здорових щурів, то можна спостерігати, що середнє значення амплітуди у великих нейронах було меншим на 33.2 %. У той самий час для середніх за розміром клітин цей показник був більшим на 23.2 %. Певний, хоч і значно помірніший інкремент амплітуди кальцієвого транзєнта в умовах аплікації габапентину (на 6.9 %) спостерігався у маленьких нейронах діабетичних тварин. Отже, в умовах розвитку діабету значно підвищується ефективність дії габапентину щодо великих нейронів ДКГ, тоді як ефективність у клітинах середнього розміру дещо знижується порівняно з нормою. Для відповідних груп маленьких нейронів статистично вірогідні відмінності в ефекті габапентину не спостерігалися. Повна тривалість кальцієвих транзєнтів у великих нейронах ДКГ тварин з діабетом в умовах габапентину ставала досить близькою до такої у здорових тварин, відрізняючись лише на 6 %. У середніх нейронах транзєнти залишалися більш ніж втричі, а у маленьких – майже вдвічі тривалішими. Відмінності у значеннях $T_{0.5}$ у всіх популяціях нейронів ДКГ між цими двома групами піддослідних тварин були досить помірними (відрізняючись у середньому лише на кілька відсотків). Загалом характеристики транзєнтів в умовах дії габапентину для груп середніх та малих нейронів були в середньому більші за відповідні їм значення у здорових тварин. Ці зміни відбувалися паралельно з такими у першого контрольного транзєнта і, вірогідно, є результатом розладів, зумовлених розвитком діабету. Зменшення зазнавали лише параметри транзєнтів у великих нейронах ДКГ.

Для більш чіткого з'ясування особливостей впливу габапентину на середні нейрони ДКГ ми

абсцис – значення відносних змін кальцієвих транзєнтів під дією габапентину; по осі ординат – щільність імовірності даного розподілу. 1 – розподіл параметрів, отриманих за допомогою апроксимації; 2 – розподіл значень, характерних для імовірно гіперчутливих, 3 – гіпочутливих тварин. *Б* – діаграма відносних зменшень амплітуди кальцієвих транзєнтів для імовірно гіперчутливих (1), нормальних (2) та імовірно гіпочутливих (3) тварин. По вертикалі – відносна зміна амплітуди кальцієвого транзєнта.

проводили додатковий капсаїциновий тест, розділяючи таким чином середні нейрони на капсаїцин-позитивні та капсаїциннегативні (рис. 3). Середня амплітуда гіперкалієвого транзєнта в умовах аплїкації габапентину для капсаїцинпозитивних нейронів середнього розміру ($n = 22$) щурів з діабетом становила 371.7 ± 72.2 , а для капсаїциннегативних нейронів ($n = 6$) – 267.7 ± 83.4 нМ. Такий розподіл середніх нейронів виявив значні відмінності в чутливості клітин цих груп у „швидкій” фазі кальцієвого транзєнта до впливу габапентину. Так, серед капсаїцинпозитивних нейронів зменшення середньогрупового значення амплїтуди становило 16.3 % порівняно з контролем, у той час як для капсаїциннегативних нейронів таке зменшення складало 36.7 %. Очевидно, що в групі середніх нейронів вплив габапентину зумовлений в основному більшою чутливістю капсаїциннегативних нейронів. Середнє значення $T_{0.5}$ для капсаїцинпозитивних та капсаїциннегативних нейронів ДКГ середнього розміру щурів з діабетом складало 13.0 ± 2.3 та 12.6 ± 3.0 с відповідно. Відповідні середні значення повної тривалості транзєнтів становили 131.5 ± 35 та 142.2 ± 21.7 с. Таким чином, у капсаїцинпозитивних нейронах не спостерїгалось значних змін середніх значень повної тривалості та $T_{0.5}$, у той час як у капсаїциннегативних нейронах ДКГ середнього розміру ці зміни були більш значущими та становили відповідно 13 та 7.6 % зменшення відносно відповідних значень контрольних транзєнтів у даних тварин. Наведений результат вказує на більшу чутливість капсаїциннегативних нейронів до габапентину порівняно з капсаїцинопозитивними, що узгоджується з показниками для групи великих нейронів.

Вимірювання третього кальцієвого викликаного деполяризацією транзєнта проводилося після недовготривалого відмивання та характеризувало слїдові характеристики дії габапентину. У групі великих нейронів середнє значення амплїтуди транзєнтів після відмивання дорівнювало 428.2 ± 24.4 нМ; для середніх нейронів цей показник складав 395.7 ± 50.7 , а для групи маленьких – 439.3 ± 13.6 нМ. У великих нейронах спостерїгалось незначне, проте вірогідне зменшення амплїтуди (на 3.9 %) порівняно з такою першого контрольного транзєнта. Також вірогідне, але більш істотне зменшення спостерїгалось у загальній групі середніх нейронів (у середньому на 10 %). У популяції маленьких клітин амплїтуда транзєнта вірогідно не відрїзнялася від такої у контрольного транзєнта та транзєнта, отриманого в умовах аплїкації габапентину.

Значення повної тривалості транзєнтів після відмивання для великих, середніх та маленьких нейронів ДКГ тварин з діабетом становили відповідно 144.5 ± 29.7 , 90.3 ± 14.1 та 90.3 ± 14.1 с. Таким чином, порівняно з відповідними значеннями для контрольного транзєнта повна тривалість кальцієвих транзєнтів після дії габапентину та відмивання вірогідно зменшувалася на 27.3 % у групі великих нейронів, фактично не зазнавала змін у групі середніх нейронів та невірогідно зменшувалася (на 20.2 %) у групі маленьких клітин. Середнє значення $T_{0.5}$ для великих нейронів ДКГ складало 12.3 ± 2.5 с, для середніх нейронів значення даного параметра дорівнювало 15.6 ± 3.9 , а для маленьких – 13.8 ± 2.8 с. Ці значення відносно таких для контрольного транзєнта свідчили про помірне зменшення у групі великих нейронів (18.1 %; $P > 0.05$), неістотне підвищення у середніх нейронах та досить значне, проте невірогідне, зменшення у групі маленьких нейронів (25.2 %; $P > 0.05$). Таким чином, у великих нейронах ДКГ спостерїгалася тенденція до гальмування завантаження клітини кальцієм після попередньої дії габапентину, що зумовлює менші значення всіх параметрів транзєнтів. У групі середніх нейронів такий ефект відмічався лише щодо амплїтуди транзєнта, тобто характерні зміни стосувалися лише „швидкої” первинної фази підвищення внутрішньоклітинного кальцію. Для маленьких нейронів найбільші зміни спостерїгалися в значеннях повної тривалості та $T_{0.5}$, хоча ці зміни не були статистично вірогідними (скорїш за все, за рахунок високої варїабельності).

ОБГОВОРЕННЯ

На сьогодні добре відомо, що в умовах розвитку цукрового діабету метаболїчні розлади та відповідні біохїмічні зміни в організмі призводять до порушення кальцієвого гомеостазу в усіх клітинах організму та в нейронах зокрема. Відповідні зміни величин параметрів кальцієвих транзєнтів є характерними для діабетичних нейропатїй. Збільшення амплїтуди та, особливо, тривалості кальцієвих транзєнтів є добре описаним на сьогодні фактом; щоправда, механізми таких модифїкацій залишаються недостатньо вивченими [20].

Основні ролї в процесї внутрішньоклітинної регуляції кальцію відіграють трансмембранні кальцієві канали, мембранні кальційвивідні структури

(натрій-кальцієвий обмінник, РМСА), кальційчутливі буферні білки, ендоплазматичний ретикулум, мітохондрії, апарат Гольджі та ядро; роль останніх двох у підтриманні кальцієвого гомеостазу є значно меншою [21]. Результати нашої роботи свідчать про те, що пов'язані з діабетом зміни кальцієвого гомеостазу в нейронах ДКГ різних розмірних груп є до певної міри специфічними. Так, у великих нейронах ДКГ амплітуда кальцієвих транзєнтів та його $T_{0.5}$ були не набагато більшими порівняно з нормою, у той час як повна тривалість даних зрушень мала значно більші значення. У групі середніх нейронів також була особливо збільшеною повна тривалість транзєнта, тоді як тривалість на рівні половини амплітуди не демонструвала великих відмінностей від норми. Отже, у великих та середніх нейронах ДКГ в умовах діабету істотно змінюється динаміка виведення вільного внутрішньоклітинного кальцію. Якщо „швидка” початкова фаза цього процесу зазнає помірних змін, то наступна „повільна” фаза затягується в рази. Це свідчить про істотні порушення кальційакумлюючої функції ендоплазматичного ретикулуму, робота якого тісно пов'язана через ріанодинові рецептори з активністю трансмембранних кальцієвих каналів. Подібне тривале збільшення рівня внутрішньоклітинного кальцію може запускати ряд аномальних внутрішньоклітинних процесів (зокрема, синтез токсичного пероксинітриду) та негативно впливати на подальше функціонування клітини. Паралельно таке збільшення може істотно впливати на електричну збудливість мембрани в результаті активації процесів дефосфорилування потенціалчутливих каналів. Зміни амплітуди кальцієвого транзєнта у групі маленьких нейронів на відміну від таких у нейронах ДКГ з великим та середнім розмірами соми були відносно незначними та не досягали межі статистичної вірогідності; у той же час зміни повної тривалості та $T_{0.5}$ були досить істотними. Така специфіка змін може вказувати на індуковане діабетом порушення функцій мітохондрій, що є характерним для діабетичних розладів у нервовій системі та було описане у попередніх роботах [22]. Істотне подовження транзєнтів свідчить про зміни депонууючої здатності ретикулуму вбирати кальцій із цитозолу.

Результати попередніх досліджень показали, що вплив габапентину, спрямований на пригнічення кальцієвого струму через кальцієві канали N-типу, реалізується через дію цього агента на допоміжні субодиниці $\alpha_2\delta$ кальцієвих каналів [23–25]. Проте

габапентин не однаково взаємодіє з різними типами зазначених допоміжних субодиниць. Так, взаємодії даного агента з субодиницями типів $\alpha_2\delta-3$ та $\alpha_2\delta-4$ не було виявлено. Неідентичну дію справляє габапентин на субодиниці типів $\alpha_2\delta-1$ та $\alpha_2\delta-2$, що відображується в різних значеннях K_D . Ці значення для даних субодиниць відрізняються приблизно втричі (59 та 153 нМ відповідно) [26]. Різний ступінь та характер експресії вказаних субодиниць кальцієвих каналів N-типу в різних нейронах, очевидно, і визначають відповідний характер чутливості зазначених нейронів до габапентину. При цьому розвиток діабету призводить до істотних змін чутливості кальцієвих транзєнтів до дії габапентину. У здорових тварин ми практично не виявляли помітного впливу габапентину на великі нейрони ДКГ. Проте в умовах експериментального цукрового діабету спостерігався неочікувано значний вплив на кальцієві деполаризаційні транзєнти – помірне падіння середньої амплітуди і дуже сильне, більш ніж триразове, скорочення їх загальної тривалості. Слід зазначити, що великі нейрони ДКГ мають аферентні провідники групи A_β , а їх периферичні рецепторні структури є низькопороговими соматосенсорними рецепторами. Аксони цих нейронів прямують до глибоких пластин дорсального рогу спинного мозку, але не в маргінальну зону і поверхневі пластини сірої речовини. Отже, дана популяція нейронів ДКГ в умовах норми не має відношення до проведення ноцицептивної інформації. Реакція великих нейронів на габапентин в умовах розвитку діабету може свідчити про те, що в разі захворювання в цих нейронах експресуються допоміжні субодиниці кальцієвих каналів типу $\alpha_2\delta-1$ (або ж принаймні типу $\alpha_2\delta-2$). Така експресія, згідно з даними наших попередніх досліджень, характерна для досить високопорогових ноцицептивних нейронів з мієлінізованими аферентними волокнами. Отриманий нами результат певною мірою узгоджується з нещодавно одержаними вказівками на те, що великі нейрони ДКГ в умовах розвитку діабетичної нейропатії набувають здатності реагувати на капсаїцинову стимуляцію (дію речовини – агоніста ванілоїдних рецепторів, відповідальних за температурну больову чутливість). У нормі це характерно виключно для ноцицептивних нейронів [27, 28], тобто, можна припустити, що у діабетичних тварин великі нейрони функціонують аномально – беруть участь у формуванні патологічних больових відчуттів. Причиною експресії може бути присутність у цих нейронах характерних для ноци-

цепторів мембранних білків. З іншого боку, такий вплив габапентину свідчить про те, що він здатний забезпечити коригувальну дію на великі нейрони ДКГ в умовах діабету, значно зменшуючи патогенетичну роль останніх у процесах формування нейропатичного болю.

Зовсім інші зміни спостерігались у групі середніх нейронів. У діабетичних тварин аплікації габапентину викликають набагато менші модулюючі ефекти порівняно з такими у нормальних тварин. Характер габапентиніндукованих змін у маленьких нейронах ДКГ в умовах діабету був досить подібним до такого у здорових тварин. Це можна розглядати як свідчення відсутності значних відмінностей у характері експресії допоміжних субодиниць кальцієвих каналів N-типу в мембранах маленьких аферентних нейронів. Все ж слід відмітити статистично вірогідне зменшення $T_{0.5}$ кальцієвих транзєнтів у малих нейронах діабетичних тварин під дією габапентину порівняно з $T_{0.5}$ першого контрольного транзєнта та одночасну відсутність різниці між значеннями $T_{0.5}$ кальцієвих транзєнтів у діабетичних та здорових тварин, отриманими в умовах аплікації габапентину. Разом ці два факти можуть бути пояснені зменшенням надходження кальцію в цитозоль та відповідно меншим кальцієвим навантаженням мітохондрій, що і призводить до майже повної нормалізації „швидкої” фази транзєнта. Крім того, незважаючи на загалом помірний вплив габапентину на маленькі нейрони ДКГ в обох групах експериментальних тварин, наведені факти вказують на більш істотну роль кальцієвих каналів N-типу у нейронах даної популяції в умовах діабету.

Результати, отримані нами для капсаїцинпозитивних та капсаїциннегативних середніх нейронів ДКГ, подібно до таких щодо групи великих нейронів, суперечать нашим попереднім даним, отриманим на здорових тваринах (де габапентин значно інтенсивніше впливав на капсаїцинпозитивні нейрони) [13]. Якщо порівняти зміни чутливості до габапентину у нормальних та діабетичних тварин у цих групах нейронів, можна зробити висновок, що в умовах діабету втрата чутливості у капсаїцинпозитивних нейронів майже вдвічі більша за таку у капсаїциннегативних одиниць (13.8 проти 7.6 %). Слід також зазначити, що базовий внутрішньоклітинний рівень кальцію у капсаїцинпозитивних нейронах діабетичних тварин був дещо більшим порівняно з таким у нормальних тварин, проте й у таких клітин, і у капсаїциннегативних нейронів це підвищення не було вірогідним. Загалом отриманий ре-

зультат можна було б пояснити більш істотним негативним впливом метаболічних розладів при діабеті на капсаїцинпозитивні нейрони та можливим залученням капсаїциннегативних нейронів у компенсаторні процеси при порушенні больової чутливості. Проте слід звернути увагу на особливості розподілу значень відносного зменшення амплітуди транзєнтів під дією габапентину у середніх нейронах. Значення скосу (або коефіцієнта асиметрії розподілу) для цієї групи становить -0.81 . Гістограма вказаних значень відносних зменшень в умовах прикладання габапентину була виразно бімодальною, що може свідчити про існування в даній сукупності двох незалежних розподілів. Для їх розділення ми використали апроксимацію наявних значень за допомогою суми двох функцій Гауса, із визначенням параметрів цих функцій (середніх значень та s.d. відповідно) за методом найменших квадратів. У результаті були отримані середні значення для даних розподілів, що відповідно дорівнювали 0.45 ± 0.28 та 0.99 ± 0.14 . Співіснування таких двох розподілів, вірогідно, зумовлене певними відмінностями в проявах діабетичних нейропатій. Відомо, що порушення в нервовій тканині внаслідок розвитку діабету може призводити до нейропатій різних типів, з проявами в одних випадках гіперчутливості, а в інших – гіпочутливості [20]. Результати досліджень останніх років вказують на різницю в експресії мембранних каналів та рецепторів у сенсорних нейронах тварин з гіпо- та гіперчутливістю до больового подразнення. Для «гіперчутливих» нейронів характерне збільшення експресії ванілоїдних рецепторів низькопорогових кальцієвих каналів та інших каналів в їх плазматичній мембрані. У випадку ж гіпочутливості спостерігається зменшення кількості відповідних білків, що підтверджується показниками трансмембранних струмів та результатами імуногістохімічних досліджень [29–31]. За нашим припущенням, перший розподіл, в який ввійшли нейрони із значним зниженням амплітуди кальцієвого транзєнта під дією габапентину, відповідає такому у тварин із домінуванням гіпералгезії. І навпаки, незначний рівень дії тестованого препарату є характерним для тварин із гіпоалгезією. Можна думати, що габапентин забезпечує помітний позитивний ефект при нейропатії з визначеним больовим синдромом, але справляє вельми помірну дію в протилежному випадку.

Певне залишкове зменшення середнього значення амплітуди третього кальцієвого транзєнта (ви-

міряного після відмивання) у нейронах середнього розміру порівняно з амплітудою першого контроль-ного зрушення, а також зменшення середнього значення повної тривалості в популяції великих нейронів вказують на наявність помірного позитивного постаплікаційного впливу габапентину на нейрони ДКГ тварин з діабетом, тобто на певні прояви нормалізуючої дії габапентину.

Отже, отримані нами дані свідчать про здатність габапентину певною мірою пригнічувати гострі больові відчуття як у нормальних умовах, так і у випадках діабетичних нейропатій. Особливістю даного агента (порівняно з іншими знеболюючими препаратами, що блокують кальцієві канали плазматичної мембрани) є специфічність його дії щодо нервової тканини. Більше того, виразний вплив в умовах норми габапентину справляє саме на ноцицептивні нейрони, ймовірно задіяні у формування відчуття гострого болю (середні нейрони ДКГ з мієлінізованими волокнами). Особливо значною може бути ефективність цього агента у випадках лікування діабетичних нейропатій з вираженим больовим синдромом. В умовах розвитку діабету фармакологічна ефективність даного препарату розповсюджується і на частину великих нейронів ДКГ. У нормальних умовах ці нейрони не задіяні у функцію больової чутливості. Проте результати останніх досліджень свідчать про те, що в умовах діабетичних нейропатій такі великі нейрони можуть брати участь у формуванні патологічних больових відчуттів. Отже, габапентин, можливо, здатний пригнічувати нехарактерну для цих нейронів функцію, зменшуючи таким чином нейропатичні прояви нейродегенеративних порушень при діабеті. На початкових стадіях розвитку діабету використання цього препарату з нейропротекторною метою може бути доречним.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. C. J. Woolf and Qiufu Ma, "Nociceptors – noxious stimuli detectors," *Neuron*, **55**, No. 2, 353-362 (2008).
2. D. J. Triggle, "Calcium channel antagonists: Clinical uses – Past, present and future," *Biochem. Pharmacol.*, **74**, No. 1, 1-9 (2007).
3. Jen-Kun Cheng and Lih-Chu Chiou, "Mechanisms of the antinociceptive action of gabapentin," *J. Pharmacol. Sci.*, **100**, No. 10, 471-486 (2006).
4. Rui-Hua Yang and Jun-Ling Xing, "Effects of gabapentin on spontaneous discharges and subthreshold membrane potential oscillation of type A neurons in injured DRG," *Pain*, **116**, No. 3, 187-193 (2005).
5. T. M. Laughlin, K. V. Tram, and G. L. Wilcox, "Comparison of antiepileptic drugs tiagabine, lamotrigine, and gabapentin in mouse models of acute, prolonged, and chronic nociception," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **302**, No. 3, 1168-1175 (2002).
6. M. J. Field, R. J. Oles, and A. S. Lewis, "Gabapentin (neurontin) and S-(+)-3-isobutylgaba represent a novel class of selective antihyperalgesic agents," *Br. J. Pharmacol.*, **121**, No. 8, 1513-1522 (1997).
7. N. Shimoyama, M. Shimoyama, and A. M. Davis, "Spinal gabapentin is antinociceptive in the rat formalin test," *Neurosci. Lett.*, **222**, No. 1, 65-67 (1997).
8. S. Patel, S. Naeem, and A. Kessingland, "The effects of GABA_B agonists and gabapentin on mechanical hyperalgesia in models of neuropathic and inflammatory pain in the rat," *Pain*, **90**, No. 4, 217-226 (2001).
9. J. Dirks, B. B. Fredensborg, and D. Christensen, "A randomized study of the effects of single-dose gabapentin versus placebo on postoperative pain and morphine consumption after mastectomy," *Anesthesiology*, **97**, No. 3, 560-564 (2002).
10. S. R. Chen and H. L. Pan, "Effect of systemic and intrathecal gabapentin on allodynia in a new rat model of postherpetic neuralgia," *Brain Res.*, **1042**, No. 1, 108-113 (2005).
11. M. Backonja, A. Beydoun, and K. R. Edwards, "Gabapentin for the symptomatic treatment of painful neuropathy in patients with diabetes mellitus: a randomized controlled trial," *JAMA*, **280**, No. 21, 1831-1836 (1998).
12. K. G. Sutton, D. J. Martin, and R. D. Pinnock, "Gabapentin inhibits high-threshold calcium channel currents in cultured rat dorsal root ganglion neurons," *Br. J. Pharmacol.*, **135**, No. 1, 257-265 (2002).
13. С. В. Романенко, П. Г. Костюк, О. П. Костюк, "Вплив габапентину на кальцієві транзєнти в нейронах дорсальнокоринцевих гангліїв щурів", *Нейрофізіологія / Neurophysiology*, **40**, № 4, 281-287 (2008).
14. И. А. Кругликов, *Изменения кальциевой сигнализации в нейронах дорсального рога спинного мозга крыс при диабетической нейропатии*, Автореф. дис. ... канд. биол. наук, Киев (2001).
15. В. О. Пінченко, *Вплив експериментально індукованого цукрового діабету і змін позаклітинного рівня рН на низькопорогові потенціалкервані кальцієві канали в первинних сенсорних нейронах щурів*, Автореф. дис. ... канд. біол. наук, Київ (2007).
16. G. Grynkiewicz, M. Poense, and R. Y. Tsien, "A new generation of Ca indicators with greatly improved fluorescence properties," *J. Biol. Chem.*, **260**, No. 6, 3440-3450 (1985).
17. D. McClelland, R. M. Evans, and L. Barkworth, "A study comparing the actions of gabapentin and pregabalin on the electrophysiological properties of cultured DRG neurons from neonatal rats," *BMC Pharmacol.*, **14**, No. 4, 4-14 (2004).
18. R. S. Scroggs and A. P. Fox, "Calcium current variation between acutely isolated adult rat dorsal root ganglion neurons of different size," *J. Physiol.*, **442**, No. 1, 639-658 (1992).
19. В. Ф. Ганонг, *Фізіологія людини*, БАК, Львів (2002).
20. П. Г. Костюк, О. П. Костюк, О. О. Лук'янець, *Іони кальцію у функції мозку – від фізіології до патології*, Наук. думка, Київ (2005).
21. П. Г. Костюк, В. Л. Зима, І. С. Магура та ін., *Біофізика*, ПЦ «Київський університет», Київ (2008).
22. І. В. Степанова, *Динамічна взаємодія кальцієвих каналів плазматичної мембрани з внутрішньоклітинними кальцієвими депо в сенсорних нейронах щура*, Автореф. дис. ... канд. біол. наук, Київ (2005).

23. A. Stefani, F. Spadoni, and G. Bernardi, "Gabapentin inhibits calcium currents in isolated rat brain neurons," *Neuropharmacology*, **37**, No. 37, 83-91 (1998).
24. Z. D. Luo, N. A. Calcutt, and R. R. Myers, "Injury type-specific calcium channel $\alpha 2\delta$ -1 subunit up-regulation in rat neuropathic pain models correlates with antiallodynic effects of gabapentin," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **303**, No. 3, 1199-1205 (2002).
25. Z. D. Luo, S. R. Chaplan, and T. N. Yaksh, "Upregulation of dorsal root ganglion $\alpha 2\delta$ calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats," *J. Neurosci.*, **21**, No. 6, 1868-1875 (2001).
26. E. Marais, N. Klugbauer, and F. Hofmann, "Calcium channel $\alpha 2\delta$ subunits-structure and gabapentin binding," *Mol. Pharmacol.*, **59**, No. 5, 1243-1248 (2001).
27. S. Hong and J. W. Wiley, "Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in expression and function of vanilloid receptor 1," *J. Biol. Chem.*, **280**, No. 1, 618-627 (2005).
28. S. Hong, L. Agresta, and C. Guo, "The TRPV1 is associated with peripheral stress in large dorsal root ganglion neurons in early diabetic sensory neuropathy," *J. Neurochem.*, **105**, No. 4, 1212-1222 (2008).
29. R. M. Pabbidi, D. S. Cao, and A. Parihar, "Direct role of streptozotocin in inducing thermal hyperalgesia by enhanced expression of transient receptor potential vanilloid 1 in sensory neurons," *Mol. Pharmacol.*, **73**, No. 3, 995-1004 (2008).
30. R. M. Pabbidi, S. Q. Yu, and S. Peng, "Influence of TRPV1 on diabetes-induced alterations in thermal pain sensitivity," *Mol. Pain*, **9**, No. 4, 1-9 (2008).