

# Вплив активації TRPA1-рецепторів на десенситизацію TRPV1-каналів у нейронах дорсальних гангліїв щура

А.В. Драган<sup>1</sup>, О.А. Петрушенко<sup>1</sup>, О.П. Бурлак<sup>1,2</sup>, О.О. Лук'янець<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;

<sup>2</sup>Міжнародний центр молекулярної фізіології НАН України, Київ; e-mail: elena@biph.kiev.ua

*Досліджували активність TRPA1- та TRPV1-каналів, їх чутливість до селективних активаторів – алілізотіоціанату (АІТС) і капсаїцину, особливості взаємодії цих каналів. Використовували метод мікрофлуоресцентної мікроскопії та кальційчутливий барвник fura-2AM. Експерименти проводили на культивованих нейронах дорсальних гангліїв щура. Встановлено, що аплікація АІТС і капсаїцину на сомю DRG-нейронів викликала значне зростання вмісту внутрішньоклітинного Ca<sup>2+</sup>. Кількаразові повторні аплікації капсаїцину призводили до суттєвого зниження амплітуди кальцієвих транзєнтів (десенситизація TRPV1-каналів), що становило 20,7% від початкового значення. Подальша аплікація АІТС відновлювала чутливість TRPV1-каналів до капсаїцину (ресенситизація TRPV1-каналів). Таким чином, наші дослідження вказують на наявність регуляції активності TRPV1-каналів з боку TRPA1- каналів.*

*Ключові слова:* TRPV1-канали; TRPA1-рецептори; кальцій; DRG-нейрони; кальцієва сигналізація; капсаїцин; алілізотіоціанат.

## ВСТУП

Два представники родини каналів транзєнтного рецепторного потенціалу (TRP) – TRPA1- (анкіринові рецептори) та TRPV1- (ванілоїдні рецептори), що можуть коекспресуватися в периферичних сенсорних нейронах, відіграють важливу роль у формуванні ноцицептивної чутливості нервової системи [1–3]. Також ці рецептори суттєво задіяні в термочутливості та в процесах, що не пов'язані із нейрональною активністю [4].

TRPV1- канали відносяться до полімодальних рецепторів, чутливих до пошкоджувальних високих температур (понад 43°C), зміни рН (ацидоз і алкалоз), «ендованілоїдів» (анандамід, метаболіти арахідонової кислоти тощо). З іншого боку, TRPV1-канали чутливі до дії таких різних «пекучих» рослинних продуктів, як капсаїцин (з гострого перцю), резиніфератоксин (з рослини евкаліпт), піперин

(їдкий інгредієнт чорного перцю), гінгерол і зінгерон (з імбиру), камфора, а також євгенол (з гвоздичної олії) [5]. TRPV1-канали можуть активуватися низкою хімічних агентів – етанолом, отрутами з медуз і павуків та деякими іншими сполуками [5]. TRPA1-канали також відносяться до полімодальних ноцицепторних рецепторів різних пошкоджувальних стимулів, включаючи такі «пекучі» хімічні сполуки, як алілізотіоціанат, наявний в гірчичній олії, тіосульфінати, які є в часнику, коричний альдегід і сльозогінні гази [6, 7].

Відомо, що обидва ці канали відносяться до неселективних кальційпроникних катіонних каналів, які беруть участь у регуляції внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію [8–11], відіграючи важливу сигнальну роль у нервових клітинах [12, 13]. Показано, що TRPA1- та TRPV1-канали здатні взаєморегулювати свою активність, і активація одного з них може підсилювати або пригнічувати чут-

© А.В. Драган, О.А. Петрушенко, О.П. Бурлак, О.О. Лук'янець

ливість іншого до відповідних селективних агоністів [9, 14].

Метою нашої роботи було вивчення взаємодії TRPA1- та TRPV1-каналів у кальцієвій сигналізації DRG-нейронів, зокрема можливого впливу активації TRPA1-каналів на функціонування TRPV1-каналів у тому самому нейроні.

## МЕТОДИКА

*Культивування нейронів дорсальних гангліїв щура.* В експерименти брали однодобову культуру нейронів дорсальних гангліїв, виділених із шурів лінії Вістар віком 9 діб. Декапітацію щура проводили відповідно до вимог НАН України з використання експериментальних тварин. Виділені спинномозкові ганглії переносили у розчин Тіроде, що містив ферменти: колагеназу (тип IA, «Sigma-Aldrich», США) в концентрації 1 мг/мл та протеазу (тип XIV, «Sigma-Aldrich», США) в концентрації 2 мг/мл, в якому утримувалися протягом 30 хв. при 37°C. Для усунення залишків ферментів та запобігання їх подальшій дії ганглії інкубували в розчині DMEM («Sigma-Aldrich», США) із 10%-ю телячою ембріональною сироваткою (FBS) протягом 10 хв за цієї самої температури із кількаразовою заміною розчину для повної інактивації ферментів білками сироватки. Далі ганглії піпетували за допомогою Пастерівських піпеток різного діаметра у 0,5 мл культурального середовища (DMEM із FBS та антибіотиками) для одержання суспензії клітин. Отриману суспензію осаджували на попередньо знежирених скельцях у стерильних чашках Петрі та розміщували в CO<sub>2</sub>-інкубаторі. В дослідах використовували клітини наступної доби після їх культивування.

*Визначення експресії генів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).* РНК виділяли з нейрональної культури DRG-нейронів, вирощеної на скельцях, покритих полілізином. З дослідних чашок Петрі, де знаходилися скельця, виливали культуральне середовище і вносили по 1 мл тризолу (TRIzol® Reagent, Ambion®) у чашку. Далі

РНК виділяли як описано виробником. Отриману тотальну РНК переводили у к-ДНК за допомогою набору реактивів “Revert Aid H Minus First Strand cDNA synthesis Kit” (Thermo Scientific) за протоколом виробника. З цією к-ДНК проводили полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР), додаючи реагенти для проходження реакції “2’PCR Master Mix” («Fermentas (Thermo Fisher Scientific)», Литва) як описано виробником. В реакційну суміш додавали праймери з кінцевою концентрацією 0,25 мкмоль/л. Для виявлення експресії генів, що кодують білки TRPV1-каналів, використали праймери з послідовністю F 5’-AGC GAG TTC AAA GAC CCA GA-3’ та R 5’-TTC TCC ACC AAG AGG GTC AC-3’ з розміром продукту 300 пар основ. Для TRPA1-каналів брали праймери з послідовністю F 5’-CCC CAC TAC ATT GGG CTG CA-3’ та R 5’-CCG CTG TCC AGG CAC ATC TT-3’ з розміром продукту 500 пар основ. ПЛР проводили в термоциклері PeqSTAR 96 Universal Gradient («PeqLAB Biotechnologie GmbH»). Пробірки з реакційною сумішшю зберігали при 8 °C. Режим ампліфікації був однаковий для всіх реакцій. Отримані ПЛР-продукти розганяли протягом 30 хв у горизонтальному електрофорезі (Cleaver Scientific Ltd) з режимом 100 В, 80 мА та 8 Вт за допомогою блоку живлення Electrophoresis Power Supply Consort EV243 («Consort bvba», Бельгія). Використовували агарозний гель («Fermentas»), розчинений в однократному трисацетатному буфері 50’TAE («Fermentas», Литва) до кінцевої концентрації 1,5% та з додаванням бромистого етидію (MoBio Laboratories, Inc.) до кінцевої концентрації 0,5 мкг/мл. Всі амплікони були внесені в агарозний гель разом з барвником 6’DNA Loading Dye («Fermentas», Литва) та відповідність розміру продукту визначали за маркером Gene Ruler 100 bp («Fermentas», Литва). Всі продукти після електрофорезу були сфотографовані в ультрафіолетовому світлі за однакових умов.

*Вимірювання змін концентрації Ca<sup>2+</sup> за допомогою мікрофлуоресцентного методу.*

Для дослідження змін  $[Ca^{2+}]_i$  в сенсорних нейронах дорсальних гангліїв щура використовували кальцієвий індикатор fura-2AM [15]. Клітини інкубували протягом 30 хв при  $37^\circ C$  з барвником у зовнішньоклітинному розчині. Після цього їх відмивали чистим розчином і залишали в ньому на 20 хв для завершальної деестерифікації fura-2AM без світла. Далі скельця переносили в чашку з лункою та закріплювали на інвертованому мікроскопі Olympus IX 71 (Японія). Протягом експерименту скельце постійно промивалося розчином Tyrode такого складу (ммоль/л): NaCl – 125, KCl 2,5,  $- CaCl_2$  2,  $MgCl_2$  – 1, Hepes – 20, глюкоза – 10 (рН 7,4 доводилось TrisOH).

Збудження флуоресцентного барвника та реєстрацію результатів здійснювали за допомогою системи та програмного забезпечення Cell M (Olympus, Німеччина) на довжинах хвилі 340 (F1) та 380 (F2) нм з використанням ксенонової лампи та відповідних фільтрів. Емісію барвника реєстрували в діапазоні 480–570 нм з піком 510 нм. Зміни концентрації внутрішньоклітинного  $Ca^{2+}$  встановлювали співвідношенням інтенсивності свічення зонда при двох довжинах хвиль  $R=F1/F2$ . Перед початком замірів фонову флуоресценцію визначали за допомогою програмного забезпечення (Cell M, Olympus, Німеччина) та враховували у подальших вимірюваннях.

Аплікацію та зміну розчинів здійснювали електронною системою крапельної подачі або їх заміною у вимірювальній камері із швидкістю 1 мл за 30 с. Всі реактиви для експериментів були отримані від фірми («Sigma-Aldrich», США).

Статистичний аналіз результатів виконували із програмним забезпеченням OriginPro (OriginLab Corporation, США).

## РЕЗУЛЬТАТИ

ПЛР-аналіз показав, що мРНК TRPV1- та TRPA1- каналів експресуються в DRG- нейронах. Рис. 1 демонструє отримані фореграми агарозного гель-електрофорезу з

ПЛР-продуктами TRPV1- та TRPA1- генів. Експресія мРНК TRPA1-каналів була удвічі вищою, ніж мРНК TRPV1-каналів. Наші результати збігаються з експериментами на DRG-нейронах мишей, у яких експресію цих генів оцінювали під час постнатального розвитку [16]. Рівень експресії мРНК TRPV1-каналів зменшувався, а мРНК TRPA1-каналів суттєво збільшувався у мишей 21-ї доби постнатального онтогенезу (P21) порівняно з новонародженими (P0).

Відомо, що TRPV1- та TRPA1-рецептори є неселективними іонними каналами, які здатні пропускати іони натрію та кальцію. Тому ми використовували метод внутрішньоклітинної кальциметрії, описаний нами раніше [17–19]. Він дає змогу вивчати активність указаних TRP-каналів реєстрацією змін внутрішньоклітинної концентрації кальцію за допомогою кальцієвого барвника та мікрофлуоресцентної техніки.

Для активації TRPV1-каналів застосовували їх селективний агоніст — капсаїцин у концентрації 0,2 мкмоль/л, а TRPA1-каналів їх селективний агоніст алілізотіоціанат (AITC) у концентрації 1 мкмоль/л. На початку кожного експерименту використовували аплікацію гіперкалієвого розчину (50 ммоль/л) щоб перевірити функціональний стан нейронів. Обирались DRG-нейрони малого діаметра (менше ніж 30 мкм), які відносяться до но-

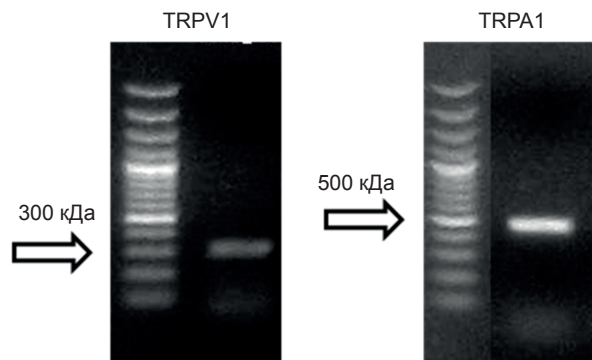


Рис.1. Експресія TRPV1- та TRPA1-каналів у нейронах дорсальних гангліїв щура. Агарозний гель-електрофорез продуктів полімеразної ланцюгової реакції підтвердив експресію TRPV1- та TRPA1- мРНК цих нейронів

цицептивних, капсаїцин-чутливих нейронів. Більші за розміром клітини ( понад 40 мкм ) у дослід не брали.

Показано, що тестовані DRG- нейрони неоднорідні щодо експресії TRPV1- та TRPA1- каналів, оскільки зустрічалися різні комбінації відносно їх активності у певному нейроні. В цих дослідах обирались для вимірювань тільки ті нейрони, які відповідали на аплікацію як капсаїцину, так і АІТС, тобто експресували одночасно TRPA1- та TRPV1- канали. На рис.2, а представлені кальцієві транзйєнти, викликані аплікацією агоністів TRPA1- та TRPV1- каналів на одній і тій самій клітині.

Для підтвердження факту, що дія АІТС не пов'язана із неспецифічністю його впливу, а його активність направлена дійсно на TRPA1-рецептори, в наступних експериментах використовували селективний блокатор TRPA1-каналів – речовину НС-030031. Як було показано раніше, селективність до TRPA1 була визначена тестуванням блокатора до 48 різних ферментів, рецепторів та транспортерів (MDS Pharma Service, Taipei, Taiwan) [20, 21]. Використовували НС-030031 в концентрації 100 мкмоль/л, який додавали

разом з АІТС. Як видно з рис. 2,б, блокатор TRPA1-рецепторів суттєво пригнічував амплітуду кальцієвих транзйєнтів, викликаних АІТС. У цьому разі амплітуда транзйєнтів становила  $15,64 \pm 0,03\%$  ( $n=3$ ) від її значень у контрольних умовах. Таким чином, застосування селективного блокатора TRPA1-каналів підтверджує, що АІТС-індуковані кальцієві транзйєнти відображають активність саме TRPA1- каналів.

Слід зазначити, що значення амплітуд кальцієвих транзйєнтів, викликаних капсаїцином та АІТС, дещо відрізнялися у досліджуваних нейронів і в середньому їх співвідношення було  $0,892 \pm 0,03$  ( $n=10$ ). При повторних аплікаціях капсаїцину амплітуда кальцієвих транзйєнтів поступово зменшувалася, що відповідало десенситизації TRPV1-рецепторів. Цей процес зберігався більше ніж 10 хв ( рис. 3, а). При подальших повторних аплікаціях капсаїцину, відновлення або збільшення амплітуди кальцієвих транзйєнтів не відбувалося, або було дуже незначним.

Вплив TRPA1-рецепторів на десенситизацію TRPV1-каналів вивчали за іншим протоколом. Клітини підлягали повторюваним послідовним аплікаціям капсаїцину три-

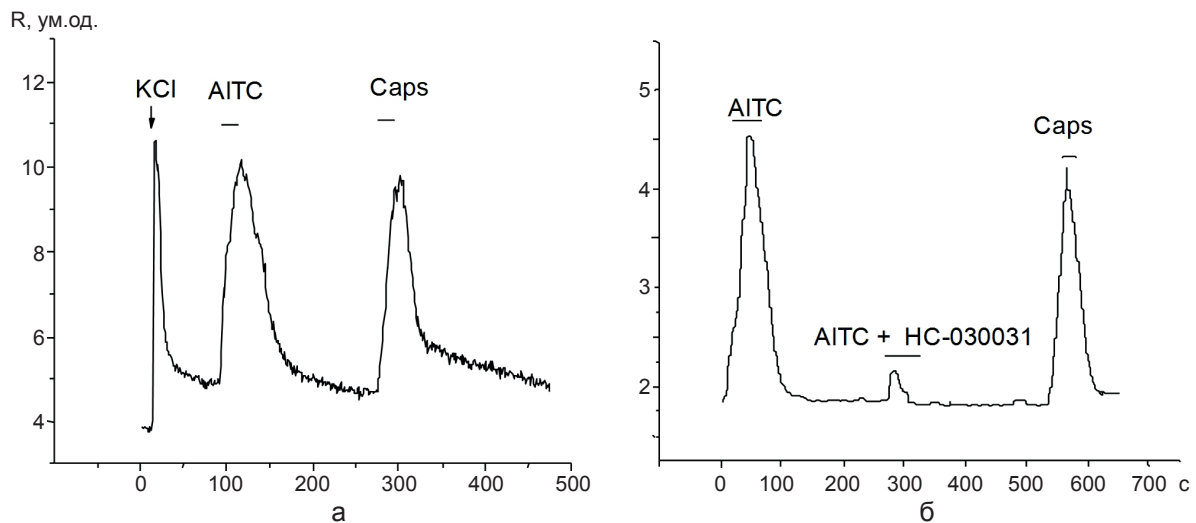


Рис.2. Кальцієві транзйєнти, викликані агоністами TRP-каналів: а – кальцієві транзйєнти, викликані деполяризацією мембрани (KCl) та аплікацією агоністів TRPV1- (капсаїцин, Caps) та TRPA1- (алілізотіоціанат, АІТС) каналів; б – вплив блокатора TRPA1-каналів (НС-030031) на кальцієві транзйєнти, викликані дією агоніста TRPA1-каналів. Моменти аплікації показані стрілкою та лініями

валістю по 20 с для активації TRPV1-каналів та подальшої їх десенситизації. Після цього аплікували АІТС протягом 120 с. У всіх випадках також значно зменшувалася амплітуда кальцієвих транзєнтів, індукованих додаванням АІТС (див. рис. 3, б). Далі на клітину знову подавали капсаїцин, агоніст TRPV1-каналів. Як видно із рисунка, амплітуда кальцієвого транзєнта, викликаного активацією TRPV1-каналів, відновлювалася (або навіть перевищувала початкове значення). Після активації TRPA1-каналів спостерігалася ресенситизація TRPV1-рецепторів. Усереднені значення приведені на рис. 3, в у вигляді відношення значення амплітуди кальцієвих транзєнта, викликаного активацією TRPV1-каналів у процесі десенситизації (стовпчик 2) та ресенситизації (стовпчик 3) до величини, що вимірювалася на початку експерименту

(стовпчик 1). Амплітуда кальцієвих транзєнтів, викликаних капсаїцином, зменшувалася під час десенситизації до  $20,66 \pm 7,42\%$  ( $n=10$ ) від початкового, а після ресенситизації поверталася до значень, близьких до початкових.

Далі перевірили чи дійсно активація TRPA1-рецепторів потрібна для ресенситизації TRPV1-рецепторів, використавши протокол експериментів, представлений на рис. 3, б, але в цьому разі аплікацію агоністів проводили за наявності блокатора TRPA1-каналів HC-030031 (100 мкмоль/л). Як видно із рис. 4, послідовні аплікації 0,2 мкмоль/л капсаїцину тривалістю 10 с призводили до десенситизації TRPV1-рецепторів протягом декількох хвилин. Потім у розчин додавали активатор TRPA1-каналів (1 мкмоль/л АІТС) протягом 30 с за наявності їх селективного

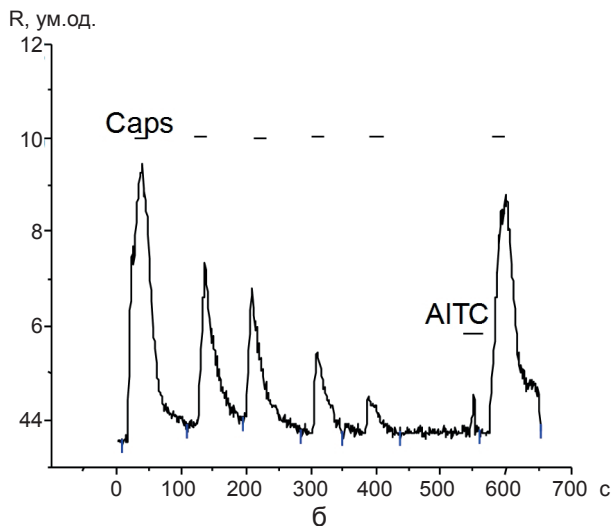
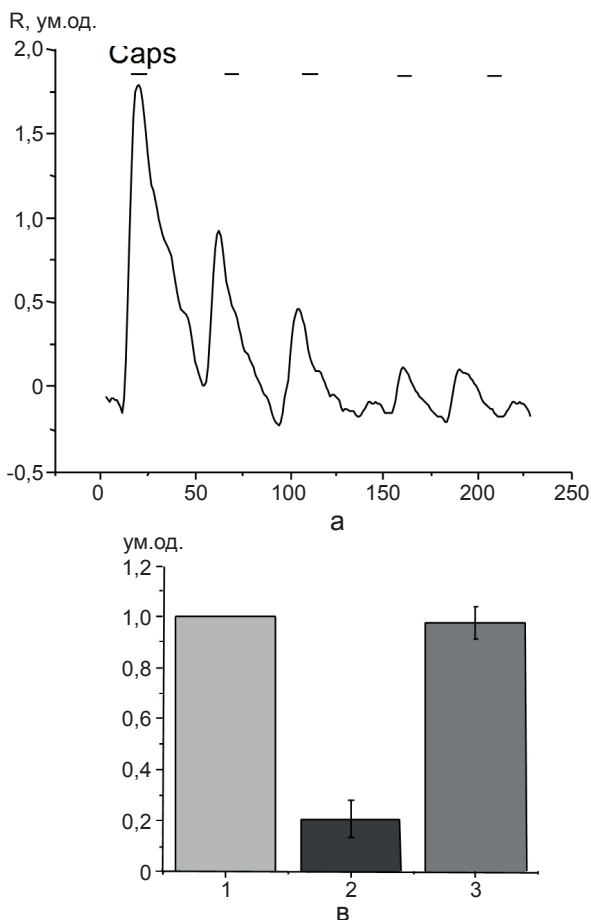


Рис.3. Десенситизація та ресенситизація TRPV1-каналів: а – показані кальцієві транзєнти, викликані повторними аплікаціями капсаїцину (Caps); б – ресенситизація TRPV1-каналів, викликана активацією TRPA1-каналів. Кальцієві транзєнти, викликані повторними аплікаціями капсаїцину та АІТС; в – середні значення амплітуди кальцієвих транзєнтів під час десенситизації та ресенситизації TRPV1-каналів: на початку експерименту (1), під час десенситизації (2) та після ресенситизації після прикладання алізіотіюанату АІТС (3),  $n=10$ .  $**P<0,05$  порівняно з амплітудою кальцієвого транзєнта, викликаного капсаїцином на початку експерименту. Моменти аплікації показані лініями

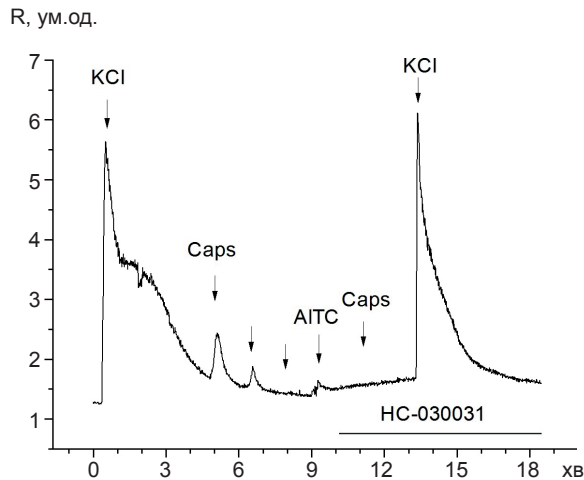


Рис.4. Вплив антагоніста TRPA1-каналів на процес ресенситизації TRPV1-каналів. Кальцієві транзйенти викликані повторними аплікаціями капсаїцину (Caps). Спостерігається десенситизація TRPV1-рецепторів. Аплікація активатора TRPA1-каналів АІТС у продовженій присутності їх блокатора HC-030031 (показано лінією) із наступною аплікацією капсаїцину та KCl. Моменти аплікації показані стрілками

антагоніста. Наступна аплікація агоніста TRPV1-каналів капсаїцину демонструвала, що у цьому разі, ресенситизації TRPV1-каналів не відбувалося (див. рис. 4). Хоча деполаризація мембрани гіперкальєвим розчином (50 ммоль/л) викликала кальцієві транзйенти з амплітудою, близькою до початкової в контрольних умовах.

Слід зазначити, що відповіді DRG-нейронів, які реагували виключно на аплікацію капсаїцину і не реагували на АІТС, також підлягали десенситизації, однак пролонгована аплікація АІТС не відновлювала чутливість таких нейронів до капсаїцину. Це свідчить про те, що саме активація TRPA1-рецепторів викликає ресенситизацію TRPV1-каналів, а не можлива неспецифічна дія АІТС на TRPV1-канали.

## ОБГОВОРЕННЯ

TRPA1- та TRPV1- канали є неселективними кальцієвими каналами і можуть впливати на внутрішньоклітинний кальцієвий гомеостаз [13]. Як відомо, його порушення може приз-

водити до патологій нервової системи, включно з невропатіями та больовими синдромами [12]. Нещодавні дослідження свідчать про можливу наявність взаємних зв'язків TRPA1- та TRPV1-каналів, які можуть впливати на їх активність та модулювати дію їх агоністів [3, 9, 14]. Так, було показано, що короткотривала активація TRPA1-каналів десенситизує TRPV1-канали, і навпаки — короткотривала активація TRPV1-каналів десенситизує TRPA1-канали [10, 22]. Однак, як показують наші дослідження та літературні дані [23], при пролонгованій активації TRPA1-каналів ефект дещо інший. При вже десенситизованих TRPV1-каналах така активація TRPA1-каналів призводить до ресенситизації TRPV1-каналів.

Іншим важливим фактом, який ми спостерігали, було те, що пролонгована аплікація АІТС після десенситизації TRPV1-каналів капсаїцином не викликала кальцієвих транзйентів або їх амплітуда була дуже незначною. Це могло б свідчити про відсутність TRPA1-каналів на досліджуваній клітині. Однак DRG-нейрони, що були відібрані для дослідів, давали виражену відповідь на разову коротку аплікацію АІТС на початку експериментів, що говорить про наявність на їх поверхні функціонально активних TRPA1-каналів. Таким чином, те, що аплікація АІТС не спричинила появи кальцієвого транзйента у клітинах із попередньо десенситизованими TRPV1-каналами, є ще одним доказом взаємодії цих каналів. Як показали наші експерименти, на клітинах, що відповідали тільки на специфічний агоніст TRPV1-каналів – капсаїцин, і не відповідали на АІТС, аплікація останнього не призводила до ресенситизації TRPV1-каналів. Також виявилось, що за наявності HC-030031, здатність АІТС викликати ресенситизацію TRPV1-каналів втрачалась, що підтверджує взаємодію TRPV1- та TRPA1-каналів і що саме активація TRPA1-каналів відновлює активність (ресенситизацію) TRPV1-каналів.

Згідно з літературними даними, взаємодія TRPV1- та TRPA1-каналів може відбуватися або безпосередньою взаємодією цих каналів, або через залучення вторинних посередників. Так, електрофізіологічними дослідженнями на рівні функціонування поодиноких каналів показано, що існує безпосередня взаємодія молекул TRPV1- та TRPA1- каналів [14]. Отже, ці результати вказують, що TRPA1- та TRPV1-канали можуть безпосередньо взаємодіяти та утворювати гетеродимери [14, 24].

Серед вторинних посередників, які впливають на активність TRPV1-каналів, було показано залучення їх фосфорилування протеїнкіназою C, що активується діацилгліцеролом (DAG). Відомо, що родина TRPV-каналів потенціюється фосфорилуванням у спосіб, що не залежить від типу активатора [25–27]. Показано, що активність поодиноких TRPV1-каналів збільшується внаслідок їх фосфорилування протеїнкіназою C [27], причому вона фосфорилує безпосередньо молекулу каналу [25]. Так само фосфорилування впливає і на активність мембранних потенціалзалежних кальцієвих каналів [28–31].

Іншим вторинним посередником, який впливає на активність TRPV1-каналів, є іони кальцію. Так, було показано, що вони відіграють суттєву роль у десенситизації TRPV1-каналів [10]. Вважається, що механізм десенситизації забезпечує кальційзалежна фосфатаза кальцинейрин [8]. Цікаво, що такий самий механізм кальційзалежного пригнічення спостерігався і у потенціалзалежних кальцієвих каналів, який також забезпечується їх дефосфорилуванням кальцинейрином [32, 33]. Таким чином, можна припустити, що існує спільний механізм потенціалізації та пригнічення різних родин кальцієвих каналів через їх фосфорилування/дефосфорилування.

Слід зазначити, що існують літературні дані, котрі вказують на залучення кальцій- та фосфорилування незалежних механізмів, здатних модулювати активність TRPV1-каналів. Наприклад, що TRPV1-канали мо-

жуть безпосередньо активуватися DAG без участі протеїнкінази C [34].

Враховуючи полімодальність TRPV1-каналів, припускається, що залежно від типу стимулу (температура, pH, агоністи) можуть бути залучені різні механізми взаємодії TRPV1- та TRPA1-рецепторів. Таким чином, результати наших досліджень разом із працями інших авторів [9, 14], вказують на наявність взаємодії активностей TRPA1- та TRPV1-каналів, що експресуються в ноцицептивних нейронах. Отримані результати вказують на здатність TRPA1-рецепторів ресенситизувати TRPV1-рецептори. Подальші дослідження взаємодії згаданих каналів дають змогу виявити механізми розвитку таких патологічних станів, як діабетична нейропатія та больові синдроми при патологічних процесах.

**A.V. Dragan<sup>1</sup>, O.A. Petrushenko<sup>1</sup>, O.P. Burlak<sup>1,2</sup>, E.A. Lukyanetz<sup>1,2</sup>**

#### **EFFECT OF TRPA1 RECEPTOR ACTIVATION ON TRPV1 CHANNEL DESENSITIZATION IN RAT DORSAL GANGLION NEURONS**

The activity of TRPA1 and TRPV1 channels, their sensitivity to selective activators - allyl isothiocyanate (AITC) and capsaicin (Caps), especially their interaction were studied. The method of microfluorescent microscopy and  $Ca^{2+}$  sensitive dye fura-2AM. Registration of changes in the concentration of intracellular  $Ca^{2+}$  was performed by using the ratio of fluorescence signals measured at two wavelengths ( $R = F1/F2$ ). Researches were conducted on cultured neurons of rat dorsal ganglia (DRG neurons). Application of AITC and Caps on soma of DRG neurons resulted in an increase in intracellular  $Ca^{2+}$ . Consistent repeated Caps applications resulted in a significant reduction in the amplitude of  $Ca^{2+}$  transients (desensitization of TRPV1 channels), which accounted 20,7% of initial value. Further application of selective TRPA1 channel agonist (AITC) resulted in restoration of sensitivity to capsaicin TRPV1 channels (resensitization TRPV1 channels). Thus, we have established the presence of regulation of TRPV1 channel activity by TRPA1 channels.

Key words: TRPV1-channels; TRPA1-receptors; calcium; DRG-neurons; calcium signaling; capsaicin; allyl isothiocyanate.

<sup>1</sup>*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology NASU, Kyiv;*

<sup>2</sup>*International Center for Molecular Physiology NASU, Kyiv, Ukraine*

**А.В. Драган, Е.А. Петрушенко, О.П. Бурлак,  
Е.А. Лукьянец**

**ВЛИЯНИЕ АКТИВАЦИИ TRPA1-РЕЦЕПТО-  
РОВ НА ДЕСЕНСИТИЗАЦИЮ  
TRPV1-КАНАЛОВ В НЕЙРОНАХ  
ДОРСАЛЬНЫХ ГАНГЛИЕВ КРЫСЫ**

Исследовали активность TRPA1- и TRPV1-каналов, их чувствительность к селективным активаторам – аллилизотиоцианата (АИТС) и капсаицина, особенности их взаимодействия. Использовали метод микрофлуоресцентной микроскопии и кальцийчувствительный краситель fura-2AM. Изменения концентрации внутриклеточного  $Ca^{2+}$  регистрировали с помощью соотношения измеряемых сигналов флуоресценции на двух длинах волн ( $R = F1/F2$ ). Исследования проводили на культуре нейронов дорсальных ганглиев крысы (DRG-нейроны). Показано, что аппликация АИТС и капсаицина на сом DRG-нейронов значительно повышала содержание внутриклеточного  $Ca^{2+}$ . Последовательная повторная аппликация капсаицина существенно снижала интенсивность кальциевых транзиев (десенситизация TRPV1-каналов). Дальнейшая аппликация АИТС, селективного агониста TRPA1-каналов восстанавливала чувствительность TRPV1-каналов к капсаицину (ресенситизация TRPV1-каналов), которая составляла 20,7% от начального значения. Таким образом, мы установили наличие регуляции активности TRPV1-каналов со стороны TRPA1-каналов.

Ключевые слова: TRPV1-каналы; TRPA1-рецепторы; кальций; DRG-нейроны; кальциевая сигнализация; капсаицин; аллилизотиоцианат.

**REFERENCES**

1. Everaerts W, Gees M, Alpizar YA, Farre R, Leten C, Apetrei A. et al. The capsaicin receptor TRPV1 is a crucial mediator of the noxious effects of mustard oil. *Curr Biol*. 2011 Feb 22;21(4):316-21.
2. Bevan S, Andersson DA. TRP channel antagonists for pain--opportunities beyond TRPV1. *Curr Opin Investig Drugs*. 2009 Jul;10(7):655-63.
3. Fernandes ES, Russell FA, Spina D, McDougall JJ, Graepel R, Gentry C, et al. A distinct role for transient receptor potential ankyrin 1, in addition to transient receptor potential vanilloid 1, in tumor necrosis factor alpha-induced inflammatory hyperalgesia and Freund's complete adjuvant-induced monarthritis. *Arthritis Rheum*. 2011 Mar;63(3):819-29.
4. Fernandes ES, Fernandes MA, Keeble JE. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. *Br J Pharmacol*. 2012 May;166(2):510-21.
5. Brederson JD, Kym PR, Szallasi A. Targeting TRP channels for pain relief. *Eur J Pharmacol*. 2013 Sep 15;716(1-3):61-76.
6. Hinman A, Chuang HH, Bautista DM, Julius D. TRP channel activation by reversible covalent modification.

7. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Dec 19;103(51):19564-8.
7. Gijssen HJ, Berthelot D, De Cleyn MA, Geuens I, Brone B, Mercken M. Tricyclic 3,4-dihydropyrimidine-2-thione derivatives as potent TRPA1 antagonists. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012 Jan 15;22(2):797-800.
8. Koplas PA, Rosenberg RL, Oxford GS. The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci*. 1997 May 15;17(10):3525-37.
9. Akopian AN, Ruparel NB, Jeske NA, Hargreaves KM. Transient receptor potential TRPA1 channel desensitization in sensory neurons is agonist dependent and regulated by TRPV1-directed internalization. *J Physiol*. 2007 Aug 15;583(Pt 1):175-93.
10. Vyklicky L, Novakova-Tousova K, Benedikt J, Samad A, Touska F, Vlachova V. Calcium-dependent desensitization of vanilloid receptor TRPV1: a mechanism possibly involved in analgesia induced by topical application of capsaicin. *Physiol Res*. 2008;57 Suppl 3:S59-S68.
11. Dragan A, Rosada V, Lukyanetz EA. Investigation of calcium signaling of TRPA1 membrane channels in the sensory neurons by fluorescent method. *Proceedings of the XIIIth International Young Scientist's conference on applied physics*. 2013: 142-3.
12. Kostyk PG, Kostyuk E, Lukyanetz EA. Calcium ions in brain function - from physiology to pathology. Kyiv: Naukova Dumka; 2005.[Ukrainian]
13. Kostyk PG, Kostyuk EP, Lukyanetz EA. Intracellular calcium signalling: structure and function. Kyiv: Naukova Dumka; 2009.
14. Staruschenko A, Jeske NA, Akopian AN. Contribution of TRPV1-TRPA1 interaction to the single channel properties of the TRPA1 channel. *J Biol Chem*. 2010 May 14;285(20):15167-77.
15. Lukyanetz EA, Stanika RI, Koval LM, Kostyuk PG. Intracellular mechanisms of hypoxia-induced calcium increase in rat sensory neurons. *Arch Biochem Biophys*. 2003;410(2):212-21.
16. Jankowski MP, Ross JL, Weber JD, Lee FB, Shank AT, Hudgins RC. Age-dependent sensitization of cutaneous nociceptors during developmental inflammation. *Mol Pain*. 2014;10:34.
17. Lukyanetz IA, Kostyk PG, Lukyanetz EA. Calcium Signaling in Carassius Cerebellar Neurons: Role of the Mitochondria. *Neurophysiology*. 2009 Dec;41(6):375-9.
18. Lukyanetz IA, Kostyk PG, Lukyanetz EA. The involvement of calcium transport systems of the plasma membrane in calcium exchange in neurons of the Carassius gibelio cerebellum. *Neurophysiology*. 2009 Aug;41(4):231-7.
19. Lukyanets IA, Lukyanetz EA. Modulation of calcium signalling by the endoplasmic reticulum in Carassius neurons. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Apr 19;433(4):591-4.
20. Eid SR, Crown ED, Moore EL, Liang HA, Choong KC, Dima S, et al. HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced



- mechanical hypersensitivity. *Mol Pain*. 2008;4:48.
21. McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Aug 14;104(33):13525-30.
  22. Akopian AN, Ruparel NB, Patwardhan A, Hargreaves KM. Cannabinoids desensitize capsaicin and mustard oil responses in sensory neurons via TRPA1 activation. *J Neurosci*. 2008 Jan 30;28(5):1064-75.
  23. Matta JA, Cornett PM, Miyares RL, Abe K, Sahibzada N, Ahern GP. General anesthetics activate a nociceptive ion channel to enhance pain and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jun 24;105(25):8784-9.
  24. Salas MM, Hargreaves KM, Akopian AN. TRPA1-mediated responses in trigeminal sensory neurons: interaction between TRPA1 and TRPV1. *Eur J Neurosci*. 2009 Apr;29(8):1568-78.
  25. Vellani V, Mapplebeck S, Moriondo A, Davis JB, McNaughton PA. Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J Physiol*. 2001 Aug 1;534(Pt 3):813-25.
  26. Fan HC, Zhang X, McNaughton PA. Activation of the TRPV4 ion channel is enhanced by phosphorylation. *J Biol Chem*. 2009 Oct 9;284(41):27884-91.
  27. Studer M, McNaughton PA. Modulation of single-channel properties of TRPV1 by phosphorylation. *J Physiol*. 2010 Oct 1;588(Pt 19):3743-56.
  28. Kostyuk PG, Lukyanetz EA, Ter-Markosyan AS. Parathyroid hormone enhances calcium current in snail neurones - Simulation of the effect by phorbol esters. *Pflug Arch*. 1992;420(2):146-52.
  29. Kostyuk PG, Lukyanetz EA, Doroshenko PA. Effects of serotonin and cAMP on calcium currents in different neurones of *Helix pomatia*. *Pflug Arch /Eur J Physiol*. 1992;420(1):9-15.
  30. Lukyanetz EA, Kostyuk PG. Two distinct receptors operate the cAMP cascade to up-regulate L-type Ca channels. *Pflug Arch*. 1996;432(2):174-81.
  31. Lukyanetz EA, Sotkis AV. Serotonin-induced changes in the activity of single Ca<sup>2+</sup> channels in *Helix pomatia* neurons. *Neurophysiology*. 1996;28(2-3):103-10.
  32. Kostyuk PG, Lukyanetz EA. Mechanisms of antagonistic action of internal Ca<sup>2+</sup> on serotonin-induced potentiation of Ca<sup>2+</sup> currents in *Helix* neurones. *Pflug Arch*. 1993 Jun;424(1):73-83.
  33. Lukyanetz EA. Evidence for colocalization of calcineurin and calcium channels in dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*. 1997;78(3):625-8.
  34. Woo DH, Jung SJ, Zhu MH, Park CK, Kim YH, Oh SB, et al. Direct activation of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) by diacylglycerol (DAG). *Mol Pain*. 2008;4:42.

*Матеріал надійшов  
до редакції 24.10.2013*