УДК 577.352.54:612.181.6

Зміни в адренергічній модуляції кальцієвих струмів нейронів ганглія трійчастого нерва, викликані фактором росту нервової тканини

М.В. Телька, О.В. Рихальський, М.С. Веселовський

Інститут фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України, Київ; e-mail:mariyka.t@gmail.com

Досліджено вплив норадреналіну на потенціалкеровані кальцієві струми (ПККС) нейронів ганглія трійчастого нерва (ГТН), що культивувалися з та без фактора роста нервової тканини (ФРНТ). Аплікація норадреналіну (100 мкмол/л) не призводила до змін у низькопорогових та пригнічувала високопорогові ПККС. Дія цього катехоламіну викликала зменшення амплітуди високопорогового ПККС на 30 ± 5 та 13 ± 8 % за умов наявності та без ФРНТ відповідно. Одночасно спостерігалося пригнічення швидкої компоненти високопорогового ПККС. Вищеописані зміни у кінетиці відбувалися у 11 з 13 нейронів з та лише у 3 з 15 без ФРНТ. Норадреналініндуковані зміни у ПККС супроводжувалися зміщенням кривої інактивації до більш негативних значень. Результати наших експериментів показали взаємозв›язок адренергічної модуляції ПККС та ФРНТ. Лише високопорогові ПККС беруть участь у модуляції електричної активності норадреналіном. Таким чином, збільшення вмісту ФРНТ не тільки запускає механізми інтенсивного проростання симпатичних волокон, але й призводить до підсилення адренергічного впливу на передачу сенсорного сигналу.

Ключові слова: нейрони ганглія трійчастого нерва; потенціалкеровані кальцієві канали; норадреналін; фактор росту нервової тканини.

ВСТУП

Адренергічна модуляція електричної активності залучена у контроль передачі сенсорного сигналу з периферії у центральну нервову систему при нейропатологіях, у яких задіяна симпатична нервова система [1, 2]. Попередні морфологічні та електрофізіологічні дослідження показали, що дія норадреналіну на нейрони сенсорних гангліїв призводить до пригнічення електричної активності через α_2- адренорецептори. Здебільшого ці зміни спостерігаються у ноцицептивних нейронах [3 - 5]. Потенціалкеровані кальцієві канали відіграють важливу роль у функціонуванні нейронів, вони беруть участь у імпульсній збудливості, а також слугують основним джерелом надходження кальцію у внутрішньоклітинне середовище, де відбувається багато кальційзалежних процесів [6,7]. У роботах на спінальних гангліях, при ушкодженні периферичних нервів спостерігаються зміни у параметрах кальцієвих струмів [8,9].

Фактор росту нервової тканини (ФРНТ) – це пептид з сімейства нейротрофінів, який необхідний для розвитку і підтримування життєдіяльності симпатичних і сенсорних нейронів [10, 11]. Концентрація ФРНТ підвищується у міжклітинному просторі у відповідь на ушкодження периферичних нервів. Рецептори цього пептиду, такі як TrkA та p75, локалізуютьсяі на сомах нейронів малого розміру, більша частина яких залучена у передачу больової інформації [12, 13]. Введення або аплікація ФРНТ призводить до розвитку підвищеної чутливості [14, 15]. Він через внутрішньоклітинні шляхи підсилює відповіді нейронів спінальних гангліїв на капсаїцин [16, 17]. Культивування нейронів з надлишковою концентрацією

© М.В. Телька, О.В. Рихальський, М.С. Веселовський

ФРНТ (50 –100 нг/мл) спричинює зміни у електрофізіологічних параметрах нейронів, що формують С- та Аδ- волокна [18, 19]. Показано, що цей пептид підвищує збудливість і має вплив на адренергічну модуляцію імпульсної активності нейронів спінальних гангліїв [20]. Отже, ФРНТ відіграє роль синситезувального агента при ушкодженні або запаленні периферичних нервів. Механізми, що лежать в основі патогенезу аферентів трійчастого нерва відрізняються від периферичних [21].

Метою нашої роботи було перевірити вплив ФРНТ на потенціалкеровані кальцієві канали нейронів ганглія трійчастого нерва (ГТН) і визначити його значення у норадреналініндукованій модуляції потенціалкерованих кальцієвих струмів (ПККС).

МЕТОДИКА

Електрофізіологічні дослідження проводили на нейронах первинної культури дисоційованих клітин ГТН. Для приготування первинної культури нейронів виділяли ганглії однодобових щурів лінії Вістар обох статей та поміщали в розчин, що містив буфер HEPES, мінімальне середовище Ігла («Sigma», США) та антибіотики. Для ферментативної обробки використовували 0,2 %-й розчин пронази («Sigma», США). Після цього етапу приготування препарат механічно дисоціювали пастерівськими піпетками різного діаметра. Клітини розвивалися за 37^0C у середовищі, збагаченому CO_2 до 5 %. Розчин для культивування містив мінімальне середовище Ігла з додаванням 10 % кінської сироватки («Gibco», США), 6 мкг/мл інсуліну («Sigma», США) та антибіотиків. Проліферацію гліальних клітин зупиняли додаванням на 2-гу добу культивування цитозин-А-D-арабинофуранозиду (ARA-C; «Sigma», США) таким чином, щоб кінцева концентрація цього агента в розчині становила 7 мкмоль/л. Заміну розчину здійснювали на наступну добу. За 4 доби до проведення експериментів у частині чашок зі зразками замінювали розчин на такий, що містив надлишкову концентрацію ФРНТ (100 нг/мл), а у інших просто замінювали середовище на ідентичне.

Експерименти виконували за кімнатної температури на 14 –18-ту добу культивування. Для реєстрації кальцієвих струмів зовнішньоклітинний розчин містив (ммоль/л.) : хлорид холіну – 130, $MgCl_2$ – 2, $CaCl_2$ – 2, TEA-Cl – 20, 4-амінопіридин – 3, глюкоза – 10, HEPES – 10; pH 7,4 (доведено CsOH). Піпетки заповнювали внутрішньоклітинним розчином такого складу (ммоль/л): ацетат цезію – 90; CsCl – 20; TEA-Cl – 20; $MgCl_2$ – 2; Na_2АТФ – 3; NaАДФ – 0.5; NaГТФ – 0,5; EGTA – 10; HEPES – 10 (всі реактиви «Sigma», США); pH 7,3 (доведено CsOH). Опір patch-піпетки з внутрішнім діаметром кінчика 1–1,5 мкм та заповненої внутрішньоклітинним розчином становив 4–5 МОм. Ємність піпетки компенсували після отримання гігаомного контакту безпосередньо перед проривом мембрани. Для нейронів визначали середній розмір соми як середнє арифметичне значення великого і малого діаметрів.

Електрофізіологічні дослідження виконували на клітинах розміром менше ніж 25 мкм із застосуванням методу patch – clamp у конфігурації «ціла клітина». Для відведення відповідей від клітин використовували підсилювач Axopatch -1D («Axon Instruments», США). Сигнали оцифровували і записували за допомогою аналогово - цифрового перетворювача DigiData 1322A і програмного пакета pClamp 9.0 («Axon Instrumets», США) з частотою оцифровки 10 кГц. Під час кожної реєстрації здійснювали контроль якості контакту «мембрана - піпетка» за значенням сталої часу ємнісного струму у відповідь на прикладання коротких (10 мс) гіперполяризувальних прямокутних поштовхів напруги невеликої амплітуди (-10 мВ).

Аплікацію норадреналіну застосовували через систему суперфузія [22]. Для уникнення артефактів, пов’язаних з подачею розчинів, на клітину по черзі подавали зовнішньоклітинний розчин, а потім застосовували цей розчин з доданим норадре-

наліном у концентрації 100 мкмоль/л. Така концентрація є максимальною, що застосовується для сенсорних нейронів [18,19].

ПККС реєстрували у режимі фіксації потенціалу. Вольт - амперні характеристики інтегральних кальцієвих струмів проводили за підтримуваного потенціалу -100 мВ. Від цього потенціалу мембрану деполяризували до 35 мВ прямокутними поштовхами потенціалу з інкрементом 5 мВ. Оцінку густини ПККС визначали як відношення амплітуди максимального кальцієвого струму до ємності досліджуваної ділянки мембрани, котра є пропорційною її площі. Ємність визначали автоматичним інтегруванням площі під кривою струму, що заряджав мембрану. Дослідження впливу норадреналіну на амплітудні, кінетичні та часові показники високопорогових ПККС проводили за протоколом, у яких струм викликався поштовхом потенціалу від -70 до 0 мВ, тривалістю 500 мс. Період між реєстраціями становив 10 с.

Результати перевіряли на нормальність розподілу за критерієм Шапіро–Уілка та подані як середнє арифметичне ± стандартне відхилення (M ± m). Достовірність різниці середніх значень встановлювали за критерієм Стьюдента або дисперсійного аналізу (ANOVA). Різницю вважали статистично достовірною при значеннях $P<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У всіх нейронах ГТН зареєстровано ПККС. У 60 % (n=40) нейронів ідентифіковано низько- та високопорогові ПККС, в іншій частині – лише високопорогові. Значення амплітуд високо- та низькопорогових ПККС відрізнялися на декілька порядків (рис.1,а). Наявність низькопорогових ПККС підтвер-

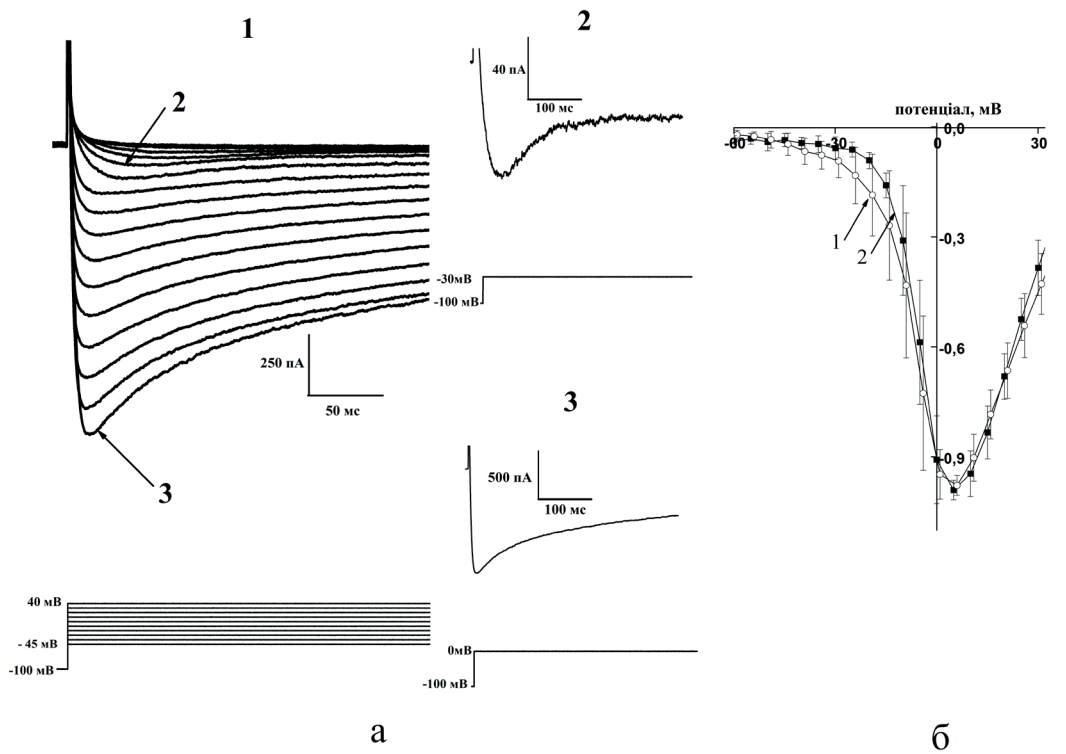

Рис.1 Потенціалкеровані кальцієві струми (ПККС) нейронів ганглія трійчастого нерва (ГТН): а – накладені реєстрації кальцієвих струмів у відповідь на зростаючі імпульси потенціалу(1). Залежно від потенціалу на мембрані зареєстровано низько- (2) та високопороговий ПККС (3). б – нормовані усереднені вольт-амперні характеристики піка кальцієвого струму нейронів, з (1) та без (2) низькопорогового компонента

джувалася існуванням струмів зі швидкою кінетикою інактивації за змін потенціалу від -100 до -30 мВ. При деполяризації мембрани деяких клітин до 0 мВ внеском низькопорогового ПККС у кінетику інтегрального струму можна знехтувати, бо високопороговий ПККС міг сягати 1 нА (див. рис. 1, а, 2, а, 3).

Вольт - амперні характеристики піка інтегрального струму нейронів з низькопороговим ПККС відрізнялися від тих, у яких вона були відсутня (див. рис.1,б). Оцінено середню густину ПККС: -38 ±14 пА/пФ (n=36) та -52 ± 21 пА/пФ (n=30) за умов культивування з та без ФРНТ відповідно.

Отримані результати не показали достовірних відмінностей у експресії кальцієвих каналів за різних умов культивування. Поясненням цього може слугувати те, що ми обмежувалися лише розміром клітини, а діапазон коливання густини кальцієвих струмів сильно коливався. Дані нашої попередньої праці показали гетерогенність за тривалістю фази спаду, у формуванні якої беруть участь кальцієві канали [23].

Аплікація норадреналіну не викликала ніяких змін у ПККС при деполяризації мембрани від -100 до -30 мВ і призводила до пригнічення при зміні потенціалу на мембрані від -100 до 0 мВ (рис.2, а, 1, а, 2). На вольт-амперній характеристиці ПККС за низьких значень потенціалу пригнічення відсутнє і підвищується зі збільшенням деполяризації (див. рис.2, а,3). Таким чином, адренергічна модуляція здійснюється лише через високопорогові ПККС. Наявність ФРНТ у середовищі для культивування призводила

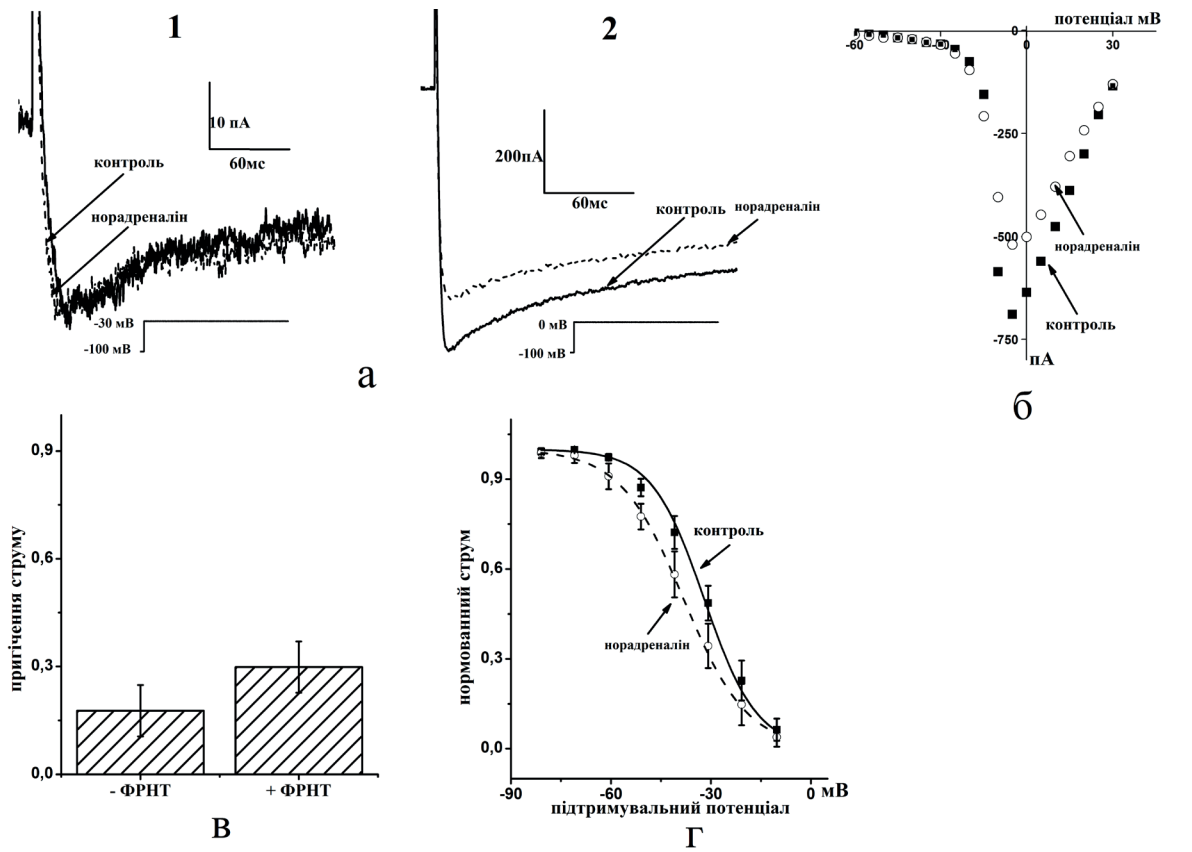

Рис.2 Вплив норадреналіну на низько- (1) та високо порогові (2) потенціалкеровані кальцієві струми (ПККС): а – характерний приклад для однієї клітини дії норадреналіну; б – зміни у вольт-амперній характеристиці для цієї клітини, що викликані аплікацією норадреналіну; в – пригнічення максимального кальцієвого струму нейронів, що культивувалися за різних умов; г – зміщення кривої стаціонарної інактивації високопорогових ПККС внаслідок дії норадреналіну (n=5)

до сильнішого пригнічення максимального кальцієвого струму (див. рис. 2,б).

Дія норадреналіну на високопороговий ПККС, що був викликаний у відповідь на деполяризацію мембрани від -70 до 0 мВ, призводила до зменшення амплітуди у більшій частині нейронів (28 клітин з 31). Норадреналінвикликані зміни у високопорогових ПККС спостерігали через 10 – 40 мс (рис.3,а). Пригнічення амплітуди у нейронів, що культивувалися з ФРНТ(n = 10), було достовірно більшим, ніж за його відсутності (n=19; див. рис. 3,б).

Проведено аналіз кінетики зниження високопорогового ПККС у 144 нейронів ГТН. Незалежно від умов культивування вони генерували кальцієві струми різної кінетики: у 39 клітин спад апроксимувався двома експонентами, у іншій частині добре описувався однією. Межі коливання постійної часу спаду кальцієвого струму становили від сотень до тисячі мілісекунд. Гістограми розподілу цього показника для нейронів ГТН, що культивувалися з та без ФРНТ достовірно не відрізнялися (критерій Колмогорова-Смірнова , P<0,05; результати не наведено).

Вплив норадреналіну на деякі нейрони зворотно призводив до зміни у кінетиці високопорогових ПККС, пригнічуючи швидкий компонент у кривій спаду (див. рис. 3,в). Більша частина нейронів з цим ефектом культивувалася з ФРНТ (12 клітин з 18; див.

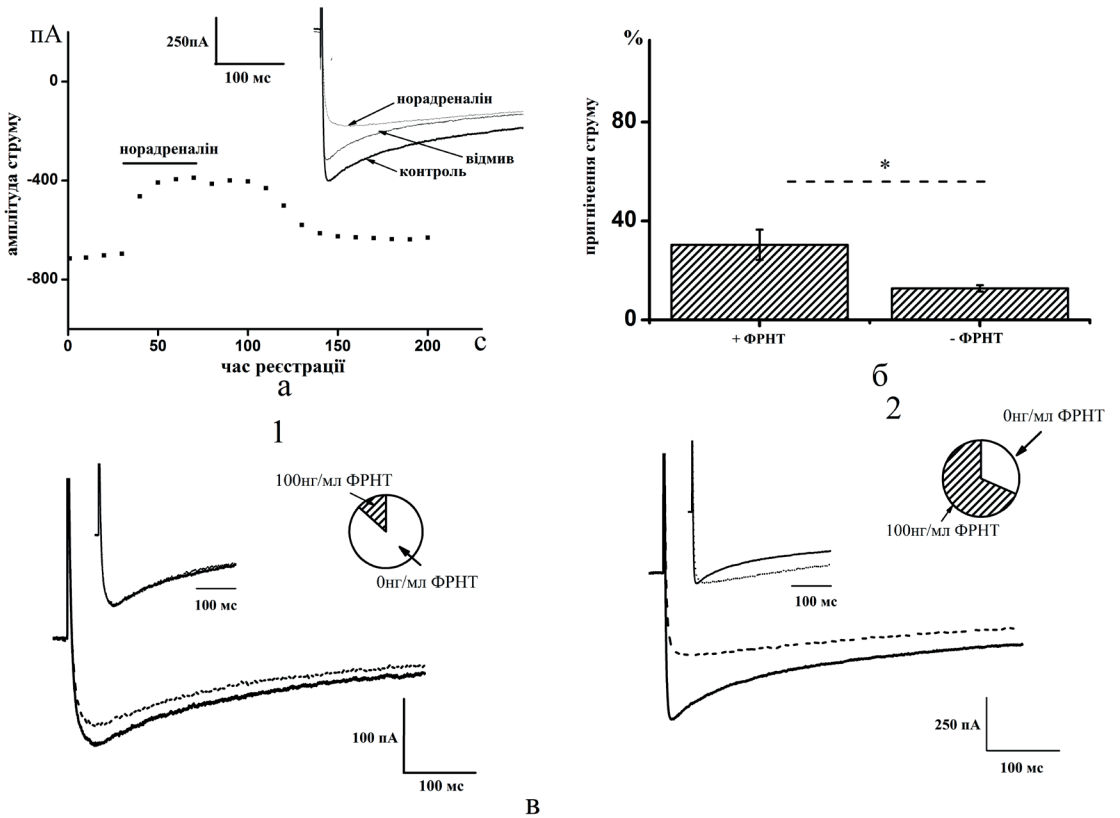

Рис.3 Норадреналініндуковані зміни високопорогових потенціалкерованих кальцієвих струмів (ПККС) нейронів ганглія трійчастого нерва, що культивувалися за наявності та без фактора росту нервової тканини (ФРНТ): а – приклад характерного пригнічення норадреналіном у часі кальцієвого струму. У вставці представлено нативні реєстрації. б – порівняння пригнічення амплітуд високопорогового ПККС нейронів, що культивувалися за різних умов. в – зміна кінетики кальцієвого струму при дії норадреналіну. Спостерігалося два випадки: зменшення струму, але без змін у кінетиці (1) та пригнічення швидкого компонента струму (2). У вставках для кожного прикладу наведені нормовані високопорогові ПККС та відсоткове співвідношення нейронів, що культивувалися за різних умов, у яких спостерігалися наведені ефекти

рис. 3,в,2). У переважній більшості нейронів (13 з 15) ГТН, що культивувалися без ФРНТ, дія норадреналіну призводила до зменшення амплітуди, але кінетика спаду залишалися без змін (див. рис. 3, в, 1). Нейрони, у яких норадреналін викликав зміни у кінетиці високопорогових ПККС, аплікація цього агента призводила до зміщенням кривої інактивації до більш негативних потенціалів (див. рис. 2,в).

Наші результати показали, що вплив норадреналіну здійснюється через високопорогові кальцієві канали. Цей катехоламін призводить до змін у кінетиці кальцієвих каналів, пригнічуючи швидкий компонент кривої спаду високопорогових ПККС. Це пояснюється наявністю N-типу кальцієвих каналів, які чутливі до агоністів α- адренорецепторів [8, 9]. Наявність ФРНТ у середовищі для культивування спричиняє підсилення ефекту норадреналініндукованих змін у кальцієвих каналів. Це вказує на те, що збільшення ФРНТ у міжклітинному просторі не тільки запускає механізми проростання симпатичних волокон, але й призводить до змін у норадреналініндукованій модуляції електричної активності.

М.В.Телька, О.В. Рихальский, Н.С. Веселовский

ИЗМЕНЕНИЯ В АДРЕНЕРГИЧЕСКОЙ МОДУЛЯЦИИ КАЛЬЦИЕВЫХ ТОКОВ НЕЙРОНОВ ГАНГЛИЯ ТРОЙНИЧНОГО НЕРВА, ВЫЗВАННЫЕ ФАКТОРОМ РОСТА НЕРВНОЙ ТКАНИ

Проведено исследование влияние норадреналина на потенциалзависимые кальциевые токи (ПЗКТ) нейронов ганглия тройничного нерва (ГТН), которые культивировались в присутствие и без фактора роста нервной ткани (ФРНТ). Аппликация норадреналина (100мкмоль/л) не приводила к изменениям в низкопороговых ПЗКТ и имела угнетающее действие на высокопороговые токи. Действие этого катехоламина приводило к уменьшению амплитуды кальциевого тока на 30 ± 5 и 13 ± 8% в условиях культивирования с и без ФРНТ соответственно. Также норадреналин приводил к изменениям в кинетике высокопороговых ПЗКТ: исчезал быстрый компонент тока в 11 из 13 клетках, при наличии нейротрофина в среде для культивирования, без него изменения наблюдались только в 3 клетках из 15. Действие норадреналина на кинетику ПЗКТ сопровождалось смещением кривых стационарной инактивации к более негативным значениям. Результаты наших экспериментов показали взаимосвязь адренергической модуляции ПЗКТ и ФРНТ. В этих процессах принимают участие только высокопороговые ПЗКТ. Наши данные указывают, что увеличение ФРНТ не только запускает механизмы интенсивного прорастания симпатических волокон, но и приводит к усилению адренергического влияния через высокопороговые кальциевые каналы.

Ключевые слова: нейроны ганглия тройничного нерва; потенциал-зависимые кальциевые токи; норадреналин; фактор роста нервной ткани.

M.V. Telka, O.V. Rikhalsky, N.S. Veselovsky

NGF - INDUCED CHANGES IN ADRENERGIC MODULATION OF CALCIUM CHANNELS OF TRIGEMINAL GANGLION NEURONS

We investigated the influence of nerve growth factors (NGF) on adrenergetic modulation voltage dependent calcium currents (VDCC) in trigeminal ganglion neurons. Noradrenalin had no effect on low VDCC but inhibited the high VDCC. Application of noradrenalin (100 μM) resulted in decrease amplitude of high VDCC by (30±5)% and (13±8)% under with or without addition of NGF in the culture medium respectively. When NGF was administered in the TG cell cultures, noradrenalin depressed fast component of high VDCC in majority of neurons (11 of 13).Only in three units of 15 were observed changes in the kinetics of high VDCC under condition without NGF. The changes in the kinetics of high VDCC were accompanied by shifting steady-state inactivation curves to more negative values. These data showed that high voltage dependent calcium channels are involved in adrenergic modulation in TG neurons. In the presence of NGF this effect is enhanced. Our researches were suggest the increase levels of NGF contributed to effect on adrenergic modulation.

Key words: trigeminal ganglion neurons; voltage dependent calcium channels; noradrenalin; nerve growth factor.

O.O. Bogomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv; mariyka.t@gmail.com

REFERENCES

1. Devor M, Janig W, Michaelis M. Modulation of activity in dorsal root ganglion neurons by sympathetic activation in nerve-injured rats. J Neurophysiol. 1994; 71: 37-47.
2. Sato J, Perl ER. Adrenergic excitation of cutaneous pain receptors induced by peripheral nerve injury. Science. 1991; 251:1608-10.
3. Marchetti C, Carbone E, Lux HD. Effect of dopamine and noradrenaline on Ca channels of cultured sensory and sympathetic neurons of chick. Pfluger Arch. 1986;

406 :104-11.
4. Yagi J, Sumino R. Inhibition of a hyperpolarization-activated current by clodine in rat dorsal root ganglion neurons. J Neurophysiol. 1998 Sep; 80(3): 1094-104.
5. Takeda M, Ikeda M, Tanimoto T, Lipski J and Matsumoto S. Changes of the excitability of rat trigeminal root ganglion neurons evoked by alpha2-adrenoreceptors. Neurosci. 2002; 115(3):731-41.
6. Soeda H, Tatsumi H, Katayama Y. Neurotransmitter release from groth cones of rat dorsal root ganglion neurons in culture. Neurosci. 1997; 77:1187-99.
7. Thayer SA, Miler RJ. Regulation of the intracellular free calcium concentration in single rat dorsal root ganglion neurons in vitro. J Physiol. 1990; 425: 85-115.
8. Abdulla FD, Smith PA. Ectopic alpha2-adrenoceptors couple to N-Type Ca channels in axotomized rat sensory neurons. J Neurosci. 1997 March; 17(5): 1633-41.
9. Honma Y, Yamakage M, Ninomiya T. Effects of adrenergic stimulus on the activities of Ca^{2} and K^{+} channels of dorsal root ganglion neurons in neuropathic pain model. Brain Research. 1999; 832: 195-206.
10. Levi-Montacini R, Angelett PU. Nerve growth factor. Physiol Rev. 1968; 48: 534-69.
11. Ritter AM, Lewin GR, Kremer NE, Mendell LM. Requirement for nerve growth factors in the development of myelinated nociceptors in vivo. Nature. 1991; 350: 500-2.
12. Bennet DL, Averill S, Clary DO, Priestley JV, Mcmahon SB. Postnatal changes in the expression of the trkA high-affinity NGF receptors in primary sensory neurons. Eur J Neurosci. 1996; 8:2204-8.
13. Fang X, Djouhri L, McMullan S, Berry C, Okuse K, Waxman SG et al. TrkA is expressed in nociceptive neurons and influences electrophysiological properties via Nav1.8 expression in rapidly conducting nociceptors. J Neurosci. 2005 May 11; 25(19):4868-78.
14. Ueda M, Hirose M, Takei N, Ibuki T, Naruse Y, Amaya F et al. Nerve growth factor induces systemic hyperalalgesia after thoracic burn injury in the rat. Neurosci Lett. 2002; 328:97-100.
15. Woolf CJ, Safieh-Garabedian B, Ma QP, Crilly P, Winter J. Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory hypersensitivity. Neurosci. 1994; 62:327-31.
16. Shu X, Mendell LM. Acute sensitization by NGF of the response of small-diameter sensory neurons to capsaicin. J Neurophysiol. 2001 Dec; 86:2931-8.
17. Zhu W,Galoyan SM, Petruska JC, Oxford GS, Mendell LM. A developmental switch in acute sensitization of small dorsal root ganglion neurons to capsaicin or noxious heating by NGF. J Neurophysiol. 2004 Nov; 92: 3148-52.
18. Kitamura N, Konno A, Kuwahara T, Komagiri Y. Nerve growth factor induced hyperexcitability of rat sensory neuron in culture. Biomedical Research. 2005; 26(3): 123-30.
19. Djouhri L, Dawbarn D, Robertson A, Newton R, Lawson SN. Time course and nerve growth factor dependence of inflamation-induced alteratios in electrophysiological membrane properties in nociceptive primary afferent neurons. J Neurosci. 2005 Nov 15; 21(22): 8722-33.
20. Zhang Q, Tan Y. Nerve growth factor augments neuronal responsiveness to noradrenaline in cultured dorsal root ganglion neurons of rats. Neurosci. 2011;193:72-9.
21. Tal M, Devor M. Ectopic discharge in injured nerves: comparison of trigeminal and somatic afferents. Brain Research. 1992; 579:148-51.
22. Veselovsky NS, Engert F, Lux HD. Fast local superfusion technique. Pfluger Arch. 1996; 432: 351-4.
23. Telka MV, Rikhalsky OV, Veselovsky NS. Excitability properties of trigeminal ganglion neurons, Fiziol. Zh. 2016; 62(2): 24-34.

Матеріал надійшов до редакції 19.04.2017