

Адренергічна модуляція високопорогових потенціалкерованих кальцієвих струмів у нейронах ганглія трійчастого нерва

М.В. Телька, В.Ю. Маслов, М.С. Веселовський, С.А. Федулова

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

Досліджено вплив норадреналіну на струми через високопорогові потенціалкеровані кальцієві канали нейронів ганглія трійчастого нерва (ГТН). Відмічено, що струм через кальцієві канали пригнічувався під впливом норадреналіну у 91% нейронів ГТН, при цьому у 62% клітин зменшувалася лише амплітуда (перша група), а у 29% також уповільнювалася кінетика (друга група). У першій групі попередня високоамплітудна деполаризація не впливала на дію норадреналіну, а у другій – призводила до відновлення кінетики та (частково) амплітуди струму. Це свідчить про відсутність прямого впливу субодиночї G-білка на кальцієві канали у першій групі нейронів та суттєвому його внеску у загальну модулюючу дію у другій. Одночасна аплікація норадреналіну з йохімбіном та селективними блокаторами різних типів кальцієвих каналів показала, що адренергічна модуляція кальцієвих струмів у нейронах ГТН опосередковується α_2 -адренорецепторами на 60%, близько половини (52%) загального адренергічного впливу реалізується через канали N-типу, внесок R- та P/Q-каналів становить 35 та 13% відповідно.

Ключові слова: ганглії трійчастого нерва; норадреналін; модуляція; високопорогові кальцієві канали.

ВСТУП

Ганглії трійчастого нерва (ГТН) складається з псевдоуніполярних нейронів, що проводять сенсорні сигнали від органів голови та шиї у ЦНС. Адренергічний вплив на нейрони ГТН як в нормі, так і за патологічних умов здійснюється симпатичними постгангліонарними волокнами верхнього шийного ганглія [1]. Норадреналін, що вивільняється з них, модулює електричну активність нейронів ГТН [2, 3]. Ці зміни відбуваються внаслідок взаємодії метаботропних адренорецепторів з потенціалкерованими іонними каналами [4–6], вплив на які здійснюється завдяки каскаду внутрішньоклітинних реакцій, запущених активацією G-білка та відрізняється для каналів різних типів [7–9]. Це достатньо детально досліджено на спінальних гангліях, тоді як дані про норадреналінвикликану модуляцію кальцієвих каналів на нейронах ГТН практично відсутні.

© М.В. Телька, В.Ю. Маслов, М.С. Веселовський, С.А. Федулова

Метою нашої роботи було в нейронах ГТН дослідити норадреналініндуковані зміни у характеристиках потенціалзалежних струмів через кальцієві канали та визначити типи каналів, які задіяні у адренергічній модуляції.

МЕТОДИКА

Електрофізіологічні дослідження проводили на нейронах первинної культури дисоційованих клітин ГТН [10]. У роботі використовували реактиви виробництва «Sigma» (США). Для приготування первинної культури нейронів виділяли ганглії однодобових щурів лінії Вістар обох статей та поміщали в розчин, що містив буфер НЕРЕС, мінімальне середовище Ігла та антибіотики. Для ферментативної обробки використовували 0,2%-й розчин пронази. Після цього етапу приготування проводили механічну дезагрегацію

пастерівськими піпетками різного діаметра. Клітини інкубували при 37°C у повітряно-газовому середовищі, збагаченому CO₂ до 5%. Розчин для культивування містив мінімальне середовище Ігла з додаванням 10% кінської сироватки («Gibco», США), 6 мкг/мл інсуліну та антибіотики. Проліферацію гліальних клітин зупиняли додаванням на 2-гу добу культивування цитозин-А-D-арабіно-фуранозиду (ARA-C; 7 мкмоль/л), розчин замінювали на наступну добу.

Експерименти виконували при кімнатній температурі на 11–15-ту добу культивування, оскільки саме за цей період експресуються більшість типів потенціалкерованих кальцієвих каналів. Для реєстрації струмів через кальцієві канали використовували зовнішньоклітинний розчин, який містив (ммоль/л): холін хлорид – 140, MgCl₂ – 4, BaCl₂ – 2, TEA-Cl – 20, 4-амінопіридин – 3, глюкоза – 10, NEPEP – 20; рН 7,4 (доведено CsOH). У зовнішньоклітинному розчині іони кальцію еквімолярно замінено на барій для уникнення ефектів, пов'язаних з кальційзалежною інактивацією кальцієвих каналів. Електроди-піпетки заповнювали внутрішньоклітинним розчином такого складу (ммоль/л): цезій ацетат – 90, CsCl – 20, TEA-Cl – 20, MgCl₂ – 2, Na₂АТФ – 3, NaАДФ – 0,5, NaГТФ – 0,5, EGTA – 10, NEPEP – 20; рН 7,3 (доводили CsOH). Електричний опір електродів (внутрішній діаметр кінчика 1–1,5 мкм) становив 4–5 МОм. Ємність електрода компенсували після отримання гігаомного контакту безпосередньо перед проривом мембрани. Розмір соми нейронів визначали як середнє арифметичне значення великого і малого діаметрів. Електрофізіологічні дослідження виконували на клітинах розміром менших ніж 25 мкм із застосуванням методу фіксації потенціалу у конфігурації «ціла клітина». Для відведення використовували підсилювач Axopatch-1D («Axon Instruments», США). Сигнали оцифровували з частотою 10 кГц та записували на диск комп'ютера для

подальшого аналізу за допомогою аналогово-цифрового перетворювача DigiData 1322A і програмного пакета pClamp 9.0 («Axon Instruments», США). Під час кожної реєстрації контролювали якість контакту «мембрана – електрод» за значенням сталої часу ємнісного струму у відповідь на прикладання коротких (10 мс) гіперполяризуючих прямокутних поштовхів напруги з амплітудою –5 мВ.

Аплікацію норадренліну, йохімбіну та селективних антагоністів кальцієвих каналів здійснювали через систему швидкої локальної суперфузії [11]. Для уникнення артефактів, пов'язаних з подачею розчинів, на клітині в контролі подавали зовнішньоклітинний розчин, а потім з доданою у відповідній концентрації діючою речовиною. Струми через кальцієві канали активували зміною потенціалу від –70 до 0 мВ протягом 200 мс. Період між стимуляціями становив 10 с.

Вибірки перевіряли на нормальність розподілу за критерієм Шапіро–Уїлка. Результати представлено як середнє арифметичне ± стандартне відхилення (M ± m). Вірогідність різниці середніх встановлювали з використанням парного t-тесту Стьюдента. Відмінності вважали значущими при P < 0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У відповідь на зміну потенціалу від –70 до 0 мВ у нейронах ГТН реєстрували вхідний струм через високопорогові потенціалкеровані кальцієві канали, який дозозалежно пригнічувався при аплікації норадреналіну. Залежність доза-ефект апроксимувалася відповідно до закону Міхаеліса–Ментен з параметрами EC₅₀ = 0,14 ± 0,02 мкмоль/л та максимальним пригніченням струму на 20 ± 1%. Насичення ефекту відбувалося при концентрації норадреналіну 10 мкмоль/л. Амплітуда струму зменшувалася через 5–10 с, сягаючи стаціонарного значення через 20–25 с після початку аплікації.

Дія норадреналіну (25 мкмоль/л) викликала пригнічення струму в 91% (n = 96) ней-

ронів ГТН, а у 9% ($n = 9$) клітин зменшення амплітуди струму не спостерігалось або було меншим на 5% від контролю. Така норадреналінрезистентність свідчить про відсутність чи низький рівень експресії адренорецепторів на частині нейронів ГТН. За характером впливу норадреналіну на струм через кальцієві канали нейрони було розділено на дві групи: у першій амплітуда зменшувалася без змін кінетики (62%, $n = 65$) (рис. 1, а), тоді як у другій – спостерігали також уповільнення фронту наростання (29%, $n = 31$; див. рис. 1, б). У другій групі зміни кінетики характеризувалися зміщенням максимального значення струму відносно початку стимулу від $12 \pm 1,5$ мс у контролі до 48 ± 9 мс при дії норадреналіну. При цьому фаза зростання струму в контролі апроксимувалася моноекспоненційною залежністю з постійною часу $2,6 \pm 0,4$ мс ($n = 12$). При аплікації норадреналіну фаза зростання вхідного струму модифікувалася додатковою

компонентною з часовою константою ($20,6 \pm 3,5$ мс; $n = 12$); при цьому швидка компонента достовірно не відрізнялася від контролю, постійна часу становила $2,9 \pm 0,5$ мс ($n = 12$). Наявність цих двох груп свідчить про те, що нейрони ГТН відрізняються за співвідношенням кальцієвих каналів різних типів, а також, можливо, за внутрішньоклітинними механізмами впливу норадреналіну.

Струми в нейронах з цими двома типами пригнічень по-різному реагували на попередню високоамплітудну деполяризацію, яка впливає на взаємодію $\beta\gamma$ -субодиниці G-білка та $\alpha 1$ -субодиниці кальцієвого каналу та призводить до збільшення амплітуди кальцієвого струму [12, 13]. Схема такої деполяризації (рис. 2, а) полягає у послідовному прикладанні попереднього кондиціонуючого імпульсу тривалістю 50 мс та амплітудою 160 мВ за 15 мс до тестуючого імпульсу амплітудою 80 мВ. Попередня деполяризація у нейронах першої групи практично не впливала на

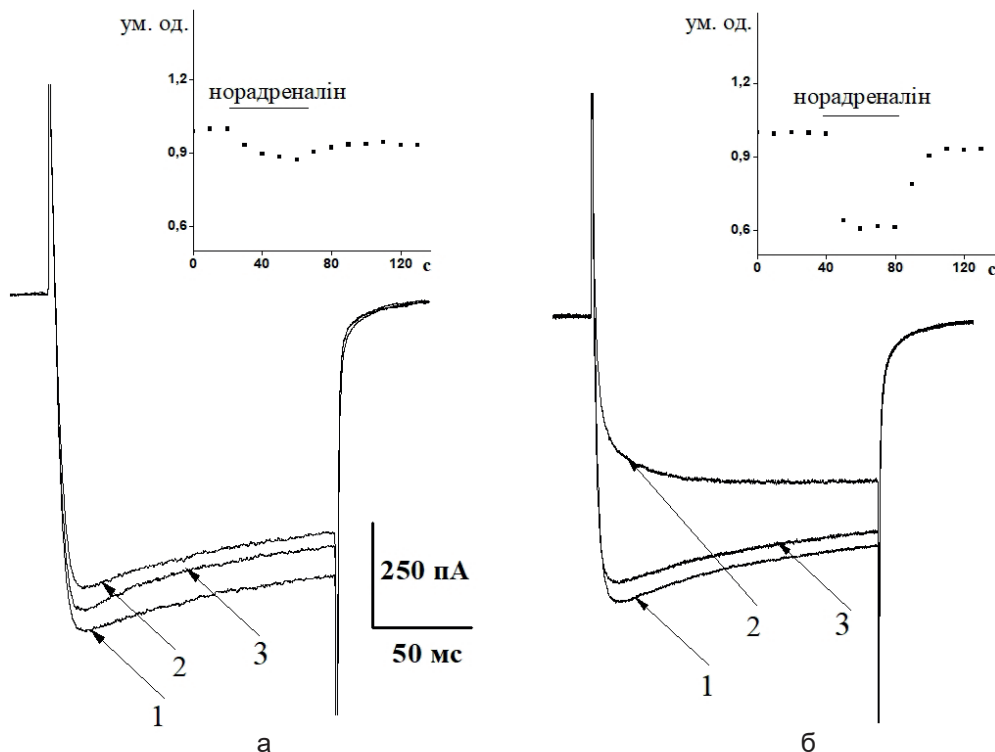


Рис. 1. Два типи норадреналінвикликаного модуляції струмів через потенціалкервані кальцієві канали нейронів ганглія трійчастого нерва: а – без змін (а) та з уповільненням кінетики (б): 1 – контроль, 2 – аплікація норадреналіну та відмив. У вкладках наведено часовий перебіг зміни амплітуди струму відповідного нейрона при дії норадреналіну

струм за наявності норадреналіну, а у другій групі призводила до відновлення кінетики та частково амплітуди струму від 80 ± 4 до $90 \pm 3\%$ (див. рис. 2, б). Отримані результати свідчать, що взаємодія $\beta\gamma$ -субодиниці G-білка з кальцієвим каналом частково залучена у клітинні механізми адренергічного модулюючого впливу в одних нейронах ГТН (друга група) і практично відсутня в інших (перша група).

Відомо, що адренергічна модуляція кальцієвих каналів у багатьох центральних та периферичних нейронах здійснюється за рахунок активації α_2 -адренорецепторів [4, 14, 15]. У нейронах ГТН ці рецептори також експресуються, а їх активація призводить до пригнічення електричної

активності [6]. Однак вплив цього типу адренорецепторів на потенціалкервані кальцієві канали у нейронах ГТН раніше не досліджувався. Аплікація селективного антагоніста α_2 -адренорецепторів йохімбіну разом з норадреналіном призводила до зменшення струму через кальцієві канали в середньому на $13 \pm 2\%$ ($n = 7$), тоді як при прикладанні лише норадреналіну – на $21 \pm 2\%$ ($n = 7$; рис. 3). Отримані результати показують, що при дії норадреналіну пригнічення кальцієвих струмів частково (близько 60%) опосередковується α_2 -адренорецепторами, однак також у цей процес залучені адренорецептори інших типів (найімовірніше, α_1).

За своїми електрофізіологічними та фармакологічними властивостями високо-

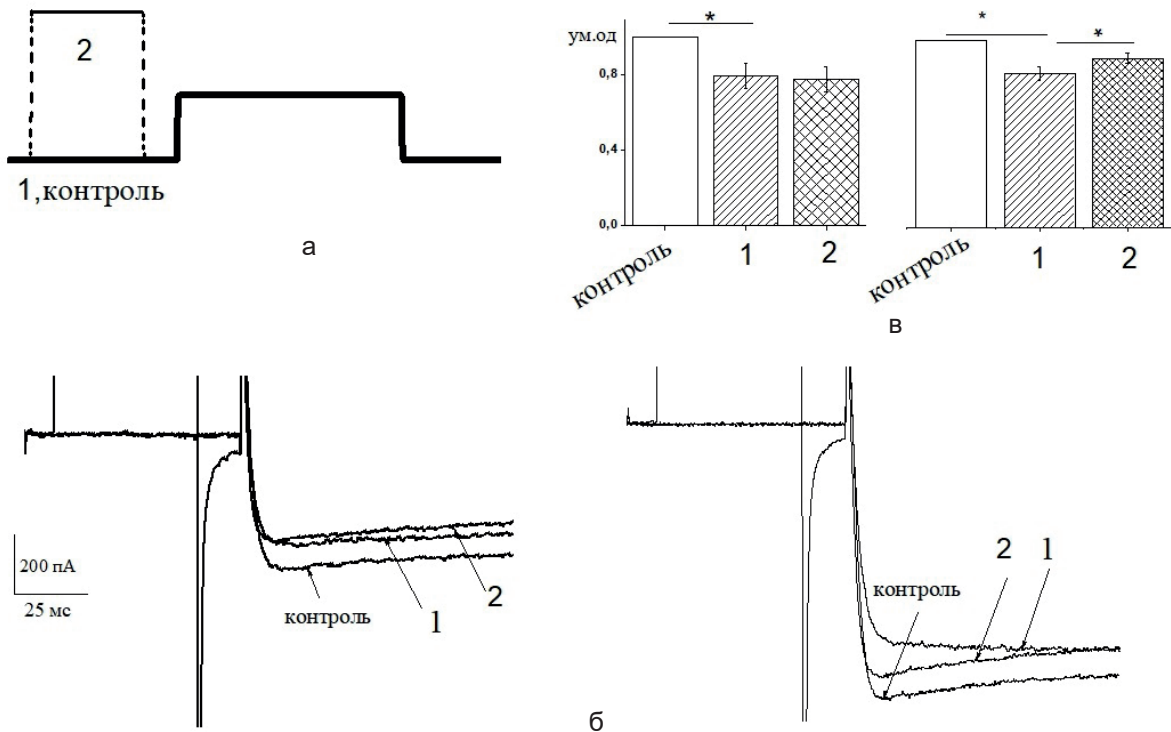


Рис.2. Вплив попередньої деполаризації на струм через потенціалкервані кальцієві канали нейронів ганглія трійчастого нерва за наявності норадреналіну. На а – схема протоколу стимуляції: за наявності НА, ресстрували струм у відповідь на деполаризацію від -80 до 0 мВ (1), після чого застосовували протокол з попереднім імпульсом від -80 до 80 мВ тривалістю 50 мс (2). На б – реєстрації струмів без відновлення (ліворуч) та з відновленням (праворуч) кінетики струму після. На в – статистичне порівняння нормованих на контрольні значень вхідного заряду в контролі, при аплікації НА (1), при аплікації норадреналіну та попередній деполаризації (2) для нейронів без відновлення (ліворуч) та з відновленням (праворуч) кінетики струму

порогові потенціалкервані кальцієві канали поділяються на N, L, P/Q та R-типи [16]. Відносний внесок каналів кожного типу у інтегральний струм оцінювали за пригніченням струму при дії відповідного селективного блокатора у насичуючій концентрації. Аплікація ω -конотоксину (1 мкмоль/л, N-тип), ніфедипіну (10 мкмоль/л, L-тип) та ω -агатоксину (1 мкмоль/л, P/Q) призводила до зменшення струму через потенціалкервані кальцієві канали на $41 \pm 6\%$ (діапазон значень від 15 до 74%), $28 \pm 8\%$ (8–47%) та $12 \pm 4\%$ (37–2%) відповідно. Сума цих середніх становить 81%, тобто можна було б очікувати, що частка струму через канали R-типу буде 19%. Проте після сумісної аплікації всіх трьох вищезгаданих селективних блокаторів середня відносна амплітуда залишкового струму була майже в 1,5 раза більшою ($27 \pm 5\%$; 11–44%). Така невідповідність, хоча і не є статистично достовірною, ймовірно свідчить про наяв-

ність певної кореляції у експресії різних типів високопорогових потенціалкерваних кальцієвих каналів на нейроні ГТН, що потребує окремого дослідження.

Дія норадреналіну за наявності всіх блокаторів пригнічувала залишковий струм, зумовлений активацією каналів R-типу на $7 \pm 2\%$ (відносно контрольної амплітуди струму до аплікації блокаторів). В аналогічних дослідах із застосуванням селективних блокаторів L, N та P/Q-типів каналів залишковий струм пригнічувався на $19 \pm 5\%$ ($n = 7$), $7 \pm 2\%$ ($n = 13$) та $12 \pm 2\%$ ($n = 11$) відповідно (рис. 4). Отже, на фоні дії ніфедипіну вплив норадреналіну не відрізнявся від такого в контролі, що свідчить про відсутність помітної адренергічної модуляції каналів L-типу на нейронах ГТН. Норадреналініндуковане пригнічення за наявності ω -конотоксину та ω -агатоксину було достовірно меншим, щодо значень коли їх не додавали. Таким чином, середне

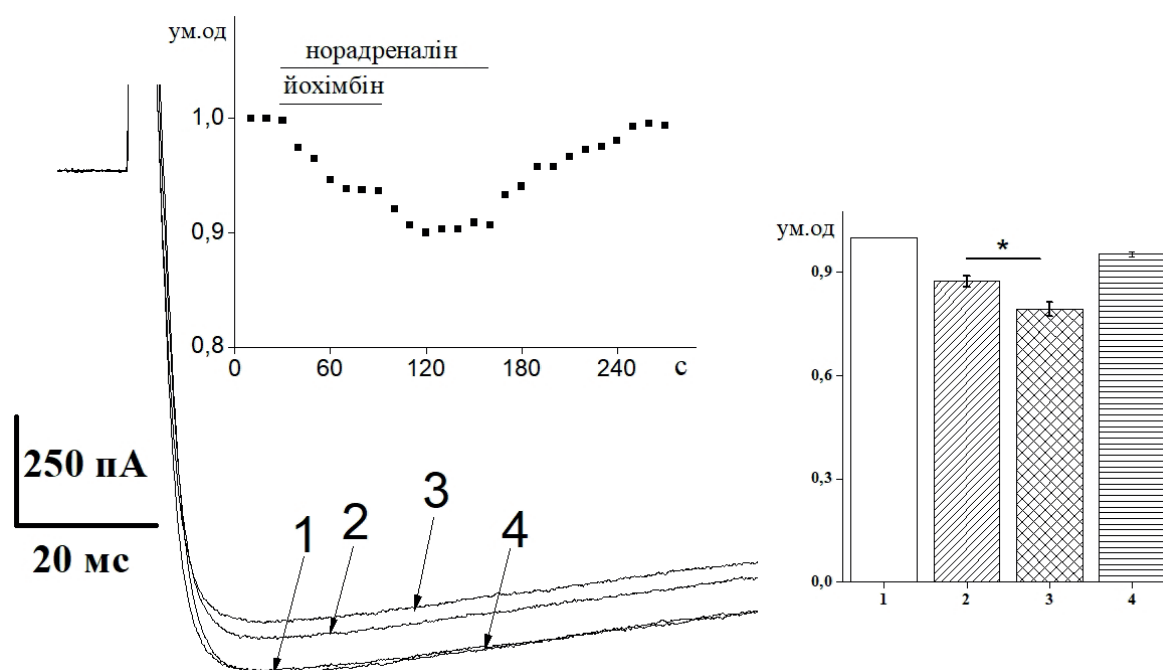


Рис. 3. Роль α_2 -адренорецепторів у адренергічній модуляції струмів через потенціалкервані кальцієві канали нейронів ганглія трійчастого нерва. На а – зміни нормованих (1) струмів при дії норадреналіну разом з йохімбіном (2), при дії лише норадреналіну (3) та при відмиві (4). На б – середні значення нормованих струмів у контролі (1) при сумісній дії норадреналіну з йохімбіном (2) та при дії лише норадреналіну (3)

пригнічення струму через кальцієві канали за відсутності блокаторів становить 20%, при дії на R- та P/Q-, на R- та N-канали – 7 і 12% відповідно, а лише на R – 7%. Отримані результати задають систему лінійних рівнянь відносно невідомих внесків каналів N- та P/Q-типу у загальну дію норадреналіну на кальцієвий струм, розв'язок якої можна записати у наступному вигляді: $N = 0,52$, $R = 0,35$, $P/Q = 0,13$. Отже, у середньому близько половини модулюючого ефекту норадреналіну здійснюється за рахунок каналів N-типу.

У нашій роботі досліджено норадреналін-індуковані зміни характеристик струмів через високопорогові потенціалкервані кальцієві канали нейронів ГТН. Вони лежать в основі процесів симпато-сенсорного впливу на передачу імпульсації у системі трійчастого нерва, зокрема адренергічної модуляції електричної активності.

Встановлено, що у більшості клітин (91%) аплікація норадреналіну призводила до дозозалежного інгібування кальцієвих струмів з константою половинного пригнічення (EC_{50}) 140 мкмоль/л. Аналіз кінетики струмів показав наявність двох електрофізіологічно відмінних типів адренергічної модуляції кальцієвих каналів. У 62% нейронів дія норадреналіну зменшувала амплітуду струму без змін кінетики, а у 29% – додатково спостерігалось уповільнення кінетики активації. За наявності норадреналіну попередня високоамплітудна деполяризація, яка блокує взаємодію $\beta\gamma$ -субодиниці G-білка з кальцієвим каналом, не впливала на струм у нейронах першої групи, а у другій призводила до практично повного відновлення кінетики та часткового – амплітуди. Слід відмітити, що прямий шлях дії адренорецепторів на кальцієві канали в різних нейронах ГТН може бути як практично відсутнім, так і

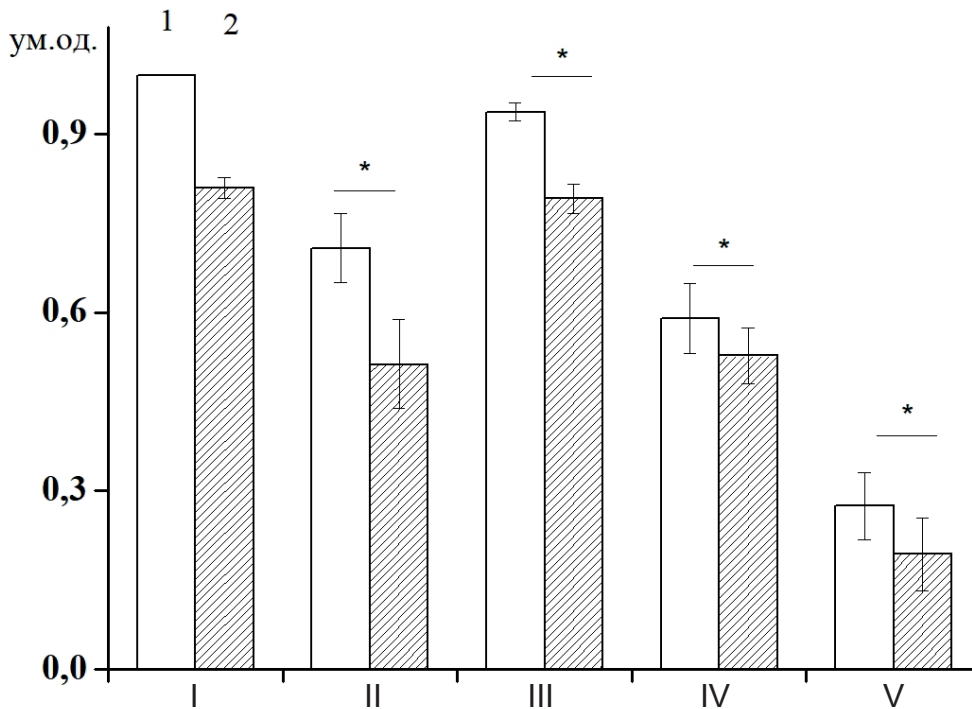


Рис. 4. Участь різних типів високопорогових кальцієвих каналів у адренергічній модуляції нейронів ганглія трійчастого нерва: норадреналін-індуковане пригнічення нормованих струмів через кальцієві канали в контролі (I), при наявності 10 мкмоль/л ніфедипіну (II), 1 мкмоль/л ω -агатоксину (III), 1 мкмоль/л ω -конотоксину (IV) та при аплікації усіх блокаторів (V) 1 – контрольні значення струму та при дії відповідного блокатора. 2 – зменшення струму при аплікації норадреналіну

відповідальним за суттєву частку загального модулюючого впливу. Решта ефекту норадреналіну ймовірно забезпечується іншими внутрішньоклітинними процесами, зокрема з залученням протеїнкінази С [17, 18]. У досліджах з використанням одночасної аплікації норадреналіну та селективних блокаторів різних типів потенціалкероаних кальцієвих каналів встановлено, що близько половини (52%) загального адренергічного впливу реалізується через канали N-типу, внесок R- та P/Q- каналів становить 35 та 13% відповідно.

Наша робота є частиною проекту «Нові молекулярні детермінанти внутрішньоклітинної і міжклітинної сигналізації в нормі та патології» з № державної реєстрації 0120U001281.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

М.В. Телька, В.Ю. Маслов, М.С. Веселовский, С.А. Федулова

АДРЕНЕРГИЧЕСКАЯ МОДУЛЯЦИЯ ВЫСОКОПороГОВЫХ ПОТЕНЦИАЛ-УПРАВЛЯЕМЫХ КальЦИЕВЫХ ТОКОВ В НЕЙРОНАХ ГАНГЛИЯ ТройНИЧНОГО НЕРВА

Исследовано влияние норадреналина на токи через высокопороговые потенциалуправляемые кальциевые каналы нейронов ганглия тройничного нерва (ГТН). Отмечено, что токи через кальциевые каналы угнетались под влиянием норадреналина у 91% нейронов ГТН: при этом в 62% клеток уменьшалась только амплитуда тока (первая группа), а в 29% также наблюдалось замедление кинетики (вторая группа). В первой группе предварительная высокоамплитудная деполаризация не влияла на действие норадреналина, а во второй – приводила к возобновлению кинетики и (частично) амплитуды тока. Это свидетельствует про отсутствие прямого влияния субъединицы G-белка на кальциевые каналы в первой

группы нейронов и к его существенному вкладу в общее модулирующее влияние во второй. Одновременная аппликация ноадреналина с йохимбином и селективными блокаторами разных типов кальциевых каналов показала, что адренергическая модуляция кальциевых токов в нейронах ГТН опосредуется α_2 -адренорецепторами на 60%, и приблизительно половина (52%) общего адренергического влияния реализуется через N, вклад R- и P/Q-каналов составляет 35 и 13% соответственно.

Ключевые слова: ганглий тройничного нерва; норадреналин; модуляция; высокопороговые кальциевые каналы.

M.V. Telka, V.Yu. Maslov, N.S. Veselovsky, S.A. Fedulova

ADRENERGIC MODULATION OF HIGH VOLTAGE ACTIVATED CALCIUM CHANNELS IN TRIGEMINAL GANGLION NEURONS

Sympathetic postganglionic projections to the trigeminal ganglion (TG) modulate electrophysiological characteristics of neurons, including high voltage activated calcium channels. Here, we studied such a modulation using local noradrenaline application on cultured TG neurons. Noradrenaline inhibited current via calcium channels in 91% of the neurons. In 62% of the cells only amplitude of the current decreased, whereas slowing of the kinetics observed in 29%. In the first group, preliminary high-amplitude depolarization did not affect the noradrenaline action, but in the second group, it led to recover of the kinetics and (partially) the amplitude. This suggests that G-protein mediated way of adrenoceptor-calcium channel interaction is almost absent in the first group, but contribute significantly to the modulation effects in the second group. Simultaneous application of noradrenaline with yohimbine and selective calcium channels subtypes blockers revealed that in TG neurons 60% of adrenergic modulation is realized via α_2 receptors, and about half (52%) of the total effect is carried out via N-type of calcium channels, R- and P/Q-channels contribute 35 and 13% respectively.

Key words: trigeminal ganglion; noradrenaline; modulation; high voltage-activated calcium channels.

REFERENCES

1. Matthews B, Robinson PP. The course of post-ganglionic sympathetic fibres distributed with the trigeminal nerve in the cat. *J Physiol.* 1980;303:391-401.
2. Kummer W, Gibbins IL, Stefan P, Kapoor V. Catecholamines and catecholamine-synthesizing enzymes in guinea-pig sensory ganglia. *Cell and Tissue Res.* 1990;261(3):595-606.
3. Telka MV, Maslov VYu, Veselovsky NS, Fedulova SA. Noradrenaline action on electrical activity of cultured trigeminal ganglion neurons. *Fiziol Zh.* 2019;65(6): 22-9.
4. Abdulla FA, Smith PA. Ectopic alpha2-adrenoceptors

- couple to N-type Ca^{2+} channels in axotomized rat sensory neurons. *J Neurosci.* 1997;17(5):1633-41.
5. 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 a neuropathic pain model. *Brain Res.* 1999;832(1-2):195-206.
 6. Takeda M, Ikeda M, Tanimoto T, Lipski J, Matsumoto S. Changes of the excitability of rat trigeminal root ganglion neurons evoked by alpha(2)-adrenoreceptors. *Neuroscience.* 2002;115(3):731-41.
 7. Dolphin AC. G protein modulation of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev.* 2003;55(4):607-27.
 8. Currie KP. G protein modulation of $\text{CaV}2$ voltage-gated calcium channels. *Channels (Austin).* 2010;4(6):497-509.
 9. Strock J, Diverse-Pierluissi MA. Ca^{2+} channels as integrators of G protein-mediated signaling in neurons. *Mol Pharmacol.* 2004;66(5):1071-6.
 10. Telka MV, Rikhalsky OV, Veselovsky NS. Excitability properties of trigeminal ganglion neurons, *Fiziol Zh.* 2016; 62(2):24-34.
 11. Veselovsky NS, Engert F, Lux HD. Fast local superfusion technique. *Pflügers Arch. : Eur J Physiol.* 1996;432(2):351-4.
 12. Ikeda SR. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature.* 1996;380(6571):255-8.
 13. Tedford HW, Zamponi GW. Direct G protein modulation of $\text{Cav}2$ calcium channels. *Pharmacol Rev.* 2006;58(4):837-62.
 14. Bian X, Galligan JJ. Alpha2-adrenoceptors couple to inhibition of R-type calcium currents in myenteric neurons. *Neurogastroenterol Motil.* 2007;19(10):845-55.
 15. Li C, Horn JP. Differential Inhibition of Ca^{2+} channels by alpha2-adrenoceptors in three functional subclasses of rat sympathetic neurons. *J Neurophysiol.* 2008;100(6):3055-63.
 16. Dolphin AC. A short history of voltage-gated calcium channels. *Br J Pharmacol.* 2006;147 Suppl 1:56-62.
 17. Formenti A, Arrigoni E, Mancina M. Two distinct modulatory effects on calcium channels in adult rat sensory neurons. *Biophys J.* 1993;64(4):1029-37.
 18. Luebke JI, Dunlap K. Sensory neuron N-type calcium currents are inhibited by both voltage-dependent and -independent mechanisms. *Pflügers Arch : Eur J Physiol.* 1994;428(5-6):499-507.

Матеріал надійшов до редакції 01.04.2020