

# Норадренергічний вплив на тонічну імпульсацію нейронів 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: masl@biph.kiev.ua

*Адренорецептори відіграють ключову роль у взаємодії симпатичної та сенсорної систем у нормі та при невропатичних станах. Нами було досліджено вплив норадреналіну на тонічну імпульсацію культивованих нейронів ганглія трійчастого нерва (ГТН) щура. У більшості клітин (68%) аплікація норадреналіну не призводила до істотних змін активності при збереженні здатності нейронів до тонічної генерації потенціалів дії (ПД). У решти клітин (32%) чутливість до дії норадреналіну була високою: нейрони втрачали здатність генерувати тонічну активність, при цьому спостерігали значні зміни параметрів окремого ПД. Показано, що норадреналін викликає вплив на імпульсацію нейронів ГТН опосередкований головним чином уповільненням кінетики активації високопорогових потенціалкерованих кальцієвих каналів. Отримані результати свідчать про можливість диференціації симпто-сенсорного впливу на передачу сенсорної інформації у провідних шляхах трійчастого нерва.*

*Ключові слова: ганглії трійчастого нерва; норадреналін; тонічна активність; потенціал дії; потенціалкеровані кальцієві канали.*

## ВСТУП

Дослідження провідних шляхів трійчастого нерва та симпто-сенсорного впливу на них має як фундаментальне (розширює уявлення про взаємодію різних відділів периферичної нервової системи), так і практичне значення, адже симпатична іннервація відіграє важливу роль у розвитку невралгічних та невропатичних станів [1]. Відомо, зокрема з наших попередніх праць, що норадреналін, який вивільняється з постгангліонарних симпатичних волокон, викликає зміни електрофізіологічних характеристик та імпульсної активності нейронів ганглія трійчастого нерва (ГТН) [2–4]. Він активує метаботропні адренорецептори, які в свою чергу взаємодіють з потенціалкерованими іонними каналами [5, 6]. Така взаємодія відбувається внаслідок активації G-білка та каскадів внутрішньоклітинних процесів, які відрізняються для каналів різних типів [7–9]. Ці процеси достатньо добре вивчено у нейронах спінальних гангліїв, а нейрони

ГТН у цьому аспекті залишаються практично недослідженими.

Метою нашої роботи було з допомогою аналізу норадреналінвикликаних змін тонічної імпульсації нейронів ГТН виявити мембранні провідності та клітинні механізми, відповідальні за такі зміни.

## МЕТОДИКА

*Культикування нейронів ГТН.* Методика культивування дисоційованих клітин ГТН щура не відрізнялася від розробленої та описаної нами раніше [10]. 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  $\text{CO}_2$  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 (7 мкмоль/л). Розчин замінювали на наступну добу. Всі використані у роботі реактиви, якщо не зазначено інше, було придбано у виробника «Sigma» (США).

*Електрофізіологічні дослідження.* Електрофізіологічні відведення від культивованих нейронів ГТН здійснювали при кімнатній температурі (близько  $20^\circ\text{C}$ ) на 11-15-ту добу культивування. Покривні скельця з культивованими клітинами поміщали у камеру зі зовнішньоклітинним розчином такого складу (ммоль/л):  $\text{NaCl}$  – 140,  $\text{KCl}$  – 3,  $\text{MgCl}_2$  – 2,  $\text{CaCl}_2$  – 2, глюкоза – 10,  $\text{HEPES}$  – 10; рН 7,4 (доведено  $\text{NaOH}$ ). Електроди-піпетки для електрофізіологічного відведення заповнювали внутрішньоклітинним розчином, до складу якого входили (ммоль/л): глюконат калію – 155,  $\text{EGTA}$  – 10,  $\text{MgCl}_2$  – 2,  $\text{Na}_2\text{ATP}$  – 3,  $\text{NaADP}$  – 0,5,  $\text{NaGTP}$  – 0,5,  $\text{HEPES}$  – 10; рН 7,3 (доведено  $\text{KOH}$ ). Використовувані електроди мали внутрішній діаметр кінчика 1–1,5 мкм, їх електричний опір був у межах 4–5 МОм. Відведення здійснювали від клітин, розмір яких (середнє арифметичне великого та малого діаметрів) не перевищував 25 мкм. Дослідження проводили у конфігурації «ціла клітина» (whole cell) у режимі фіксації струму (current clamp). Після утворення гігаомного контакту та безпосередньо перед проривом мембрани компенсували електричну ємність електрода. Нейрони активували деполяризуючими прямокутними імпульсами струму тривалістю 1 с та амплітудою до 100 пА. Аналізували активність лише тонічних нейронів, які були здатні генерувати регулярні потенціали дії (ПД) протягом усього часу деполяризації. Для відведення, оцифрування та запису зареєстрованої активності нейронів використовували підси-

лювач 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 та 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 норадреналіну здійснювали через систему швидкої локальної суперфузії [11]. Для уникнення артефактів, пов'язаних з подачею розчинів, на клітину в контролі подавали зовнішньоклітинний розчин, а потім розчин з норадреналіном.

*Статистичний аналіз отриманих результатів.* Вибірки перевіряли на нормальність розподілу за критерієм Шапіро–Уїлка. Результати представлено як середнє арифметичне  $\pm$  стандартна похибка середнього ( $M \pm m$ ).

Достовірність різниці середніх встановлювали з використанням критерію t Ст'юдента. Відмінності вважали значущими при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

До першої групи нейронів ГТН ввійшло 26 клітин, які після аплікації норадреналіну зберігали здатність до тонічної генерації ПД (рис. 1, а). Відповідні середні значення частоти ПД становили  $13,9 \pm 0,9$  та  $11,7 \pm 0,8 \text{ с}^{-1}$ , що відповідає пригніченню на 26%. Сумарний ефект зниження частоти тонічної імпульсації проілюстровано на рис. 2, на якому представлено відповідну діаграму розсіювання. Ця залежність достатньо добре апроксимувалася лінійною функцією ( $r = 0,82$ ).

При цьому також змінювалась амплітуда окремого ПД (див. рис. 1, б), відповідні середні значення та похибки середнього становили  $98 \pm 2$  та  $92 \pm 2$  мВ. Таке зменшення на 5% є незначним, проте різниця

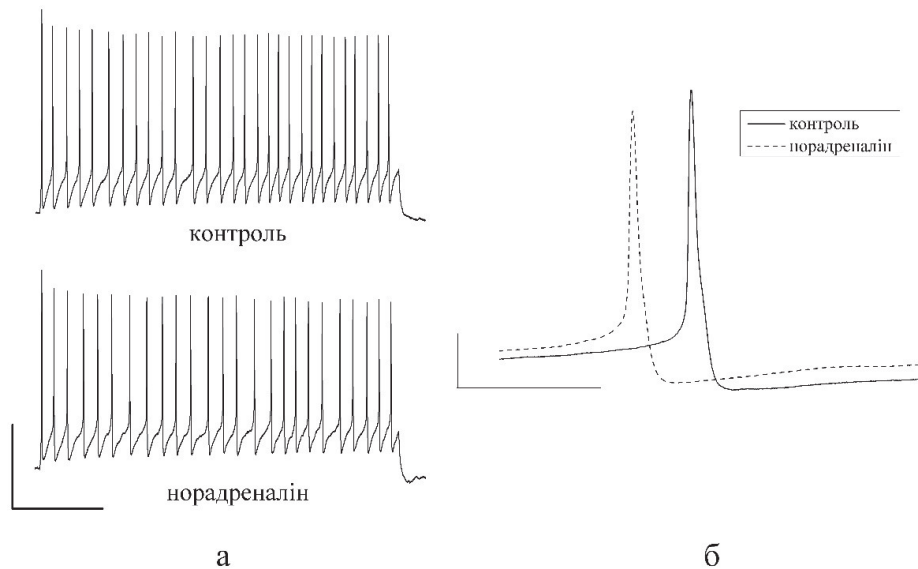


Рис. 1. Тонічна імпульсація нейрона ганглія трійчастого нерва (перша група). Репрезентативні реєстрації імпульсації (а) та окремого потенціалу дії (б) в контролі та після аплікації норадреналіну (100 мкмоль/л). Калібрування: а – 50 мВ, 500 мс; б – 25 мВ, 10 мс

була достовірною. Також вірогідно на 9% зростав час деполяризації (від 10 до 90%) ПД, відповідні значення становили  $0,81 \pm 0,04$  мс у контролі та  $0,88 \pm 0,05$  мс при дії норадреналіну. Час реполяризації (від 90 до 10%) ПД зменшувався на 13% з  $2,7 \pm 0,2$  до  $2,3 \pm 0,2$  мс ( $P = 4 \cdot 10^{-4}$ ). При цьому дещо зростала (на 5%) ширина на половині висоти ПД:  $1,8 \pm 0,08$  та  $1,88 \pm 0,09$  мс. Не було виявлено достовірного впливу норадреналіну на амплітуду слідової гіперполяризації ПД, середнє значення якої в контролі становило  $29 \pm 2$  мВ.

Слід відзначити, що виявлення вищезгаданих достовірних змін було зумовлено застосованим методом швидкої локальної суперфузії. Це дало нам можливість досліджувати окремих нейронів без вимушеної необхідності піддавати дії інші нейрони у експериментальній камері, скоротити час реєстрації та використати при аналізі парний t-тест Стьюдента. Зважаючи на характеристики вибірок, отриманих у цій роботі, цілком очевидно, що без використання парного тесту висновки про достовірність впливу

норадреналіну зробити було б неможливо.

У 12 серед 38 досліджених тонічних нейронів ГТН (32%, друга група клітин) при аплікації втрачалася здатність до тонічної генерації ПД (рис. 3). В контролі значення середньої частоти імпульсації цих нейронів становило  $12,7 \pm 1,0$  с<sup>-1</sup>, що достовірно не від-

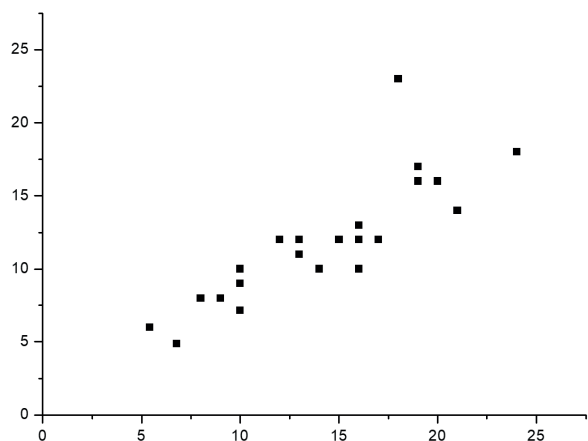


Рис. 2. Діаграма розсіювання для частоти тонічної імпульсації нейронів ганглія трійчастого нерва (перша група). Вісь абсцис: частота імпульсації в контролі, с<sup>-1</sup>; вісь ординат: частота імпульсації після аплікації норадреналіну (100 мкмоль/л), с<sup>-1</sup>. Кожна точка на діаграмі відповідає окремому нейрону

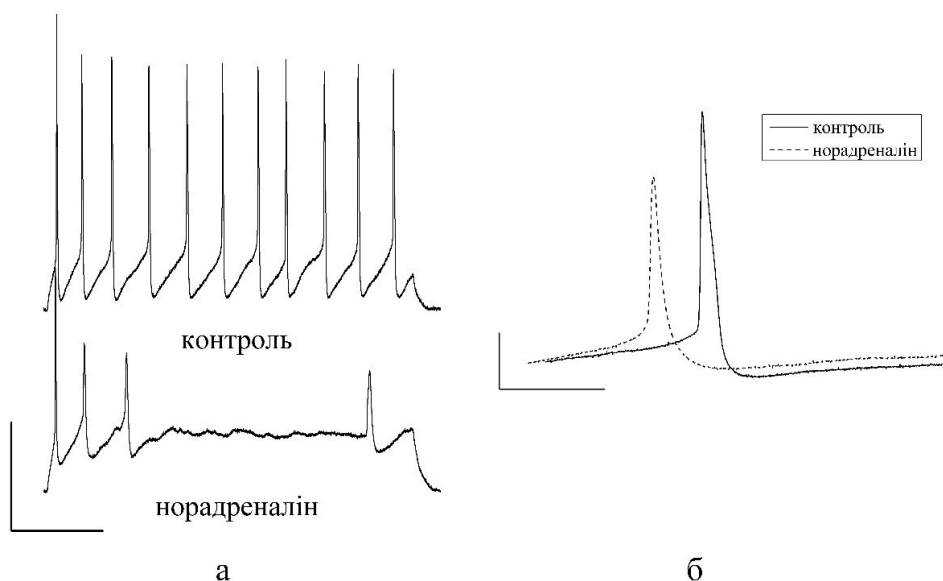


Рис. 3. Імпульсація нейрона ганглія трійчастого нерва (друга група). Репрезентативні реєстрації імпульсації (а) та окремого потенціалу дії (б) в контролі та після аплікації норадреналіну (100 мкмоль/л). Калібрування: а – 50 мВ, 500 мс; б – 25 мВ, 10 мс

різняється від такої для першої групи клітин ( $13,9 \pm 0,9 \text{ c}^{-1}$ ). І хоча при цьому говорити про частоту тонічної імпульсації не має сенсу, проте аналіз змін параметрів окремого ПД (які клітини не втрачали здатності генерувати) являв собою значний інтерес.

Середні значення амплітуди ПД у контролі та після аплікації норадреналіну становили  $95 \pm 5$  та  $74 \pm 8$  мВ відповідно. Різниця середніх є статистично достовірною та сягає 22% від контрольного значення. Це у більше ніж у 4 рази перевищує відповідний показник у першій групі нейронів, які зберігали здатність до тонічної генерації при дії норадреналіну. Амплітуда слідової гіперполяризації (аналогічно першій групі) не змінювалася: середні значення становили  $26 \pm 2$  та  $25 \pm 1$  мВ у контролі та після аплікації норадреналіну відповідно. Час деполяризації (від 10 до 90%) ПД достовірно зріс на 68%: з  $0,81 \pm 0,06$  до  $1,36 \pm 0,24$  мс, що більше ніж у 7 разів перевищує відповідний показник у першій групі. Зміни часу реполяризації (від 90 до 10%) ПД у групах практично не відрізнялися: відповідні середні значення у

другій групі сягали  $3,3 \pm 0,5$  та  $2,9 \pm 0,4$  мс (12% порівняно з 13% у першій групі). Також дещо зросла ширина ПД на половині висоти: з  $2,1 \pm 0,3$  до  $2,4 \pm 0,3$  мс, що становить 14% від контролю.

Результати статистичного аналізу частоти тонічної імпульсації та параметрів окремого ПД представлено на діаграмі рис. 4. Отримані результати свідчать, що у двох групах нейронів ГТН частота імпульсації та параметри окремого ПД у контролі достовірно не відрізнялися. Проте аналіз різниці у змінах параметрів окремого ПД дає можливість зробити висновок про клітинні механізми впливу норадреналіну на імпульсну активність нейронів ГТН, зокрема про роль різних типів потенціалкерованих іонних каналів та взаємодії з ними адренорецепторів.

Відмінності у чутливості досліджених електрофізіологічних характеристик нейронів двох груп до дії норадреналіну мають наступну «ієрархію» (див. рис. 4): незначні зміни частоти та повне зникнення тонічної імпульсації, величина ефекту відрізняється у рази (час деполяризації, амплітуда та ширина

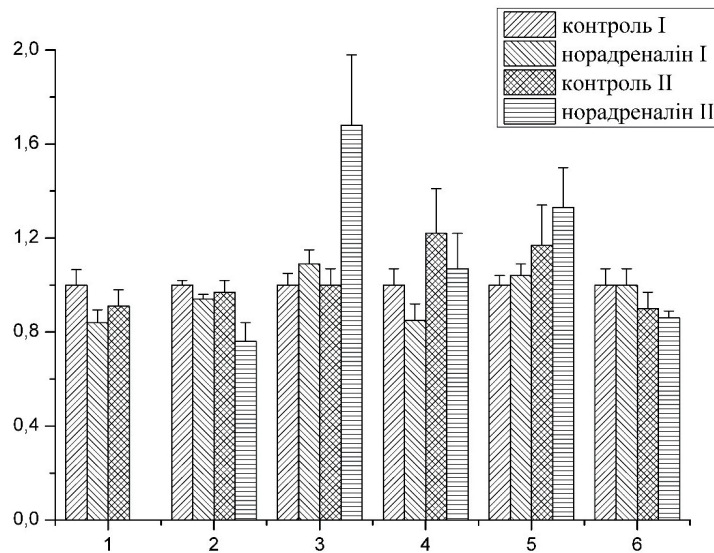


Рис. 4. Статистичний аналіз змін електрофізіологічних характеристик нейронів ганглія трійчастого нерва при дії норадреналіну (порівняння першої та другої груп). Представлено (нормовані на контроль у першій групі) середні значення та стандартні похибки середнього частоти тонічної імпульсації (1, для другої групи при дії норадреналіну не визначалась) та параметрів окремого потенціалу дії: амплітуда (2), час деполяризації від 10 до 90% (3), час реполяризації від 90 до 10 % (4), ширина на половині висоти (5), амплітуда слідової гіперполяризації (6)

на половині висоти ПД, практична відсутність (час реполяризації) та повна відсутність впливу (амплітуда слідової гіперполяризації ПД). Ці результати дають важливу інформацію про роль різних мембранних провідностей у норадреналінвикликаних змінах тонічної імпульсації нейронів ГТН. Слід зазначити, що при безпосередній перевірці впливу норадреналіну на фармакологічно ізольовані окремі типи потенціалкерованих каналів інформація про характер імпульсації цього нейрона є недоступною, адже при блокуванні частини мембранних провідностей процес генерації ПД істотно спотворюється.

Відсутність достовірних змін амплітуди слідової гіперполяризації свідчить про незначний вплив норадреналіну на калієві канали, принаймні при генерації тонічних ПД. Вплив на амплітуду ПД здійснюється внаслідок блокування високопорогових кальцієвих каналів, адже в літературі відсутні дані про дію норадреналіну на натрієві канали. Можна було б припустити, що у обох групах відрізняється внесок (принаймні чутливих до норадреналіну) кальцієвих

каналів у ПД: незначний у першій групі та суттєвий у другій, що і призводить до різниці у впливі на тонічну імпульсацію. Проте у проведених нами раніше дослідженнях [12] не було виявлено нейронів ГТН з достовірними відмінностями у ступені пригнічення амплітуди кальцієвого струму при дії норадреналіну. На нашу думку, механізм цієї різниці має інше пояснення, а саме, через вплив не на амплітудні, а на кінетичні характеристики кальцієвого струму. На підтримку цього припущення також свідчить відсутність різниці у впливі норадреналіну на фазу реполяризації ПД. Наша гіпотеза полягає у тому, що досліджені у цій роботі дві групи тонічних нейронів ГТН, які відрізняються чутливістю до дії норадреналіну, та описані нами раніше клітини цього ганглія, які відрізнялись за механізмом впливу норадреналіну на кальцієві канали [12], є тотожними. Було виявлено два типи пригнічення: при першому норадреналін впливав лише на амплітуду струму через ПКК без змін кінетики, а при другому зменшення амплітуди супроводжувалось уповільненням



фази наростання. При цьому зміщення максимального значення струму відносно початку деполяризації при дії норадреналіну збільшувалося у 4 рази. Саме це уповільнення, на нашу думку, є визначальним для суттєвого зменшення внеску ПКК у генерацію ПД у тонічних нейронах ГТН. Таким чином, можна дійти висновку, що нейрони обох груп, що відрізняються за характером змін тонічної імпульсації, відповідають клітинам першого та другого типу пригнічення, виділених за особливостями впливу норадреналіну на кальцієвий струм. Виглядає логічним припущення, що досліджені тонічні нейрони ГТН належать до функціонально різних груп. Це питання потребує подальших досліджень.

У електрофізіологічних дослідженнях на фармакологічно виділених струмах через ПКК нами раніше було встановлено, що інгібітор протеїнкінази С хелеритрин (5 мкмоль/л) зменшував вплив норадреналіну на 60% при дії першого типу [13]. Ефект другого типу був нечутливим до цього блокатора, проте полегшувався попередньою деполяризацією мембрани нейрона [12]. Ці результати свідчать про наявність у нейронах ГТН двох клітинних механізмів дії норадреналіну на ПКК: протеїнкіназа С-залежний та  $G\beta\gamma$ -опосередкований [14–16]. Особливості такого модуляторного впливу на рівні імпульсації нейронів ГТН проявляються у вираженій різниці дії норадреналіну на здатність нейронів до тонічної генерації ПД.

Таким чином, у нашій роботі досліджено норадреналінвикликані зміни тонічної імпульсації та параметрів окремого ПД нейронів ГТН. Такі зміни моделюють процес симпатосенсорного впливу на передачу імпульсації у шляхах трійчастого нерва. Встановлено, що у більшості клітин (68%, перша група) аплікація норадреналіну не призводила до істотних змін досліджених параметрів при збереженні здатності нейронів до тонічної генерації ПД. У решті клітин (32%, друга група) чутливість до дії норадреналіну була високою: нейрони втрачали здатність генерувати тонічну актив-

ність, при цьому спостерігали значні зміни параметрів окремого ПД. Аналіз різниці змін параметрів ПД у групах I та II показав, що норадреналінвикликаний вплив на активність нейронів ГТН опосередкований головним чином уповільненням кінетики активації високопорогових ПКК. Порівняння цього результату з отриманими нами раніше даними та літературними відомостями дає можливість зробити висновок, що здатність нейронів ГТН до тонічної імпульсації за наявності норадреналіну забезпечується протеїнкіназа С-залежними каскадами впливу адренорецептора на ПКК, тоді як високу чутливість до дії норадреналіну виявляють нейрони, в яких в адренергічну модуляцію кальцієвого струму залучений безпосередній вплив  $G\beta\gamma$ -субодиниці на кальцієвий канал. Отримані результати свідчать про можливість диференціації симпато-сенсорного впливу на передачу інформації у провідних шляхах трійчастого нерва. Слід відзначити, що диференціацію впливу адренорецепторів на ПКК у різних функціональних підгрупах нейронів було раніше описано на нейронах симпатичного ганглія [17].

Результати нашої роботи розширюють уявлення про клітинні механізми взаємодії симпатичної та сенсорної нервової системи. Вони можуть мати певне значення для клінічної неврологічної практики, зокрема при одночасному застосуванні блокаторів кальцієвих каналів та агоністів/антагоністів адренорецепторів. Слід також зазначити, що такий приклад залежності характеру імпульсації від уповільнення кінетики активації каналів, а не пригнічення амплітуди струму, можна бути використати при викладанні курсів біофізики та електрофізіології.

*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 co-authors of the article.*

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

## **NORADRENERGIC INFLUENCE ON TONIC FIRING IN TRIGEMINAL GANGLION NEURONS**

*Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: masl@biph.kiev.ua*

Adrenoreceptors play a key role in sympathetic influences on sensory neurons in normal and neuropathic conditions. We studied noradrenaline action on tonic firing in cultured rat trigeminal ganglion neurons. In a majority of the neurons (68%), Noradrenaline application had no marked effect on the firing properties. The rest of the cells (32%) were highly sensitive to noradrenaline action; they lost the ability to tonic firing and single action potential parameters significantly changed. It was established that NA-induced action on the firing is mainly due to the activation kinetics slowing of voltage-gated calcium channels. The data suggest a possibility of differential sympatho-sensory interaction in the trigeminal pathways.

**Key words:** trigeminal ganglion; noradrenaline; tonic firing; voltage-gated calcium channels.

### **REFERENCES**

1. Alles SRA, Smith PA. Peripheral voltage-gated cation channels in neuropathic pain and their potential as therapeutic targets. *Front Pain Res (Lausanne)*. 2021, 2:750583.
2. 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.
3. Kummer W, Gibbins IL, Stefan P, Kapoor V. Catecholamines and catecholamine-synthesizing enzymes in guinea-pig sensory ganglia. *Cell Tissue Res*. 1990;261(3):595-606.
4. 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.
5. Abdulla FA, Smith PA. Ectopic alpha2-adrenoceptors couple to N-type Ca<sup>2+</sup> channels in axotomized rat sensory neurons. *J Neurosci*. 1997;17(5):1633-41.
6. Honma Y, Yamakage M, Ninomiya T. Effects of adrenergic stimulus on the activities of Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> channels of dorsal root ganglion neurons in a neuropathic pain model. *Brain Res*. 1999;832(1-2):195-206.
7. 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.
8. Dolphin AC. G protein modulation of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev*. 2003;55(4):607-27.
9. Currie KP. G protein modulation of CaV2 voltage-gated calcium channels. *Channels (Austin)*. 2010;4(6):497-509.
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. Telka MV, Maslov VYu, Veselovsky NS, Fedulova SA. Телька М.В. Adrenergic modulation of high-threshold voltage-gated calcium channels in trigeminal ganglion neurones. *Fiziol Zh*. 2020 065(1):75-82.
13. M. Telka, V. Maslov, S. Fedulova. Changes of the excitability of trigeminal ganglion neurons under noradrenergic modulation of calcium currents. *Eur Neuropsychopharmacol*. 44 (2021) S13-4.
14. Strock J, Diverse-Pierluissi MA. Ca<sup>2+</sup> channels as integrators of G protein-mediated signaling in neurons. *Mol Pharmacol*. 2004;66(5):1071-6.
15. Tedford HW, Zamponi GW. Direct G protein modulation of Cav2 calcium channels. *Pharmacol Rev*. 2006;58(4):837-62.
16. Dolphin AC. A short history of voltage-gated calcium channels. *Br J Pharmacol*. 2006;147 Suppl 1: 56-62.
17. Li C, Horn JP. Differential Inhibition of Ca<sup>2+</sup> channels by alpha2-adrenoceptors in three functional subclasses of rat sympathetic neurons. *J Neurophysiol*. 2008;100(6):3055-63.

*Матеріал надійшов  
до редакції 02.11.2023*