

Роль ванілоїдного рецептора типу 1 та глутаматних рецепторів у синаптичній активності нейронів пластинки X спинного мозку щурів

К.В. Коройд, І.О. Блащак, С.В. Романенко

Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: Koroid.k.v@gmail.com

Це дослідження спрямоване на розуміння механізмів ноцицептивної сигналізації в пластинці X спинного мозку, що беруть участь у регуляції больових відчуттів. Спочатку до системи прикладали тетродотоксин, який блокує потенціали дії, що давало змогу ізолювати мініатюрну синаптичну активність (mEPSCs). Після цього додавали агоніст ванілоїдних рецепторів транзйентного потенціалу 1 (TRPV1), який викликав значне підвищення частоти та амплітуди mEPSCs. На фоні дії тетродотоксину вплив капсаїцину мав двофазний характер: спочатку різко збільшувалася частота подій, а потім, поступово знижувалася, але амплітуда збільшувалася. Контрольне, без тетродотоксину, прикладання капсаїцину також викликало збільшення синаптичної активності, однак цей вплив не був двофазним. Додаткове блокування NMDA-рецепторів (AP-5) частково зменшувало капсаїциніндуковану активність, в той час як блокатор AMPA-рецепторів (CNQX) майже повністю її усував, що свідчить про критичну роль глутаматних рецепторів у підтримці мережевої взаємодії. Отримані результати підкреслюють важливість TRPV1 у центральній сенсйбілізації та можливість його регуляції, що відкриває нові шляхи модуляції хронічного болю.

Ключові слова: TRPV1; капсаїцин; пластинка X; спинний мозок; глутаматні рецептори; AMPA; NMDA; тетродотоксин; ноцицепція.

ВСТУП

Ноцицепція — процес кодування нервовими закінченнями впливу на організм шкідливих подразників — невід’ємна частина сприйняття болю, при цьому X-пластинка спинного мозку є ділянкою для інтеграції соматосенсорних і вісцеральних вхідних даних [1]. Нейрони X-пластинки відіграють вирішальну роль у модулюванні сигналів болю та беруть участь у процесах, пов’язаних із вісцеральною ноцицепцією та вегетативною регуляцією [2]. Втім точні механізми за допомогою яких нейрони X-пластинки залучені у процес ноцицепції, незважаючи на його важливість, залишаються не повністю зрозумілими.

Однією із ключових ланок у ноцицептивній передачі сигналів є ванілоїдний рецептор транзйентного потенціалу 1 (TRPV1), неселективний катйонний канал, який активується капсаїцином, теплом і кислим рН.

Цей рецептор добре охарактеризований у периферичних сенсорних нейронах, де його активація призводить до входу іонів кальцію та натрію у нервові закінчення, знижуючи поріг генерації або викликаючи потенціал дії [3]. Однак експресія TRPV1 не обмежується периферією. Є дані, що він також має важливе значення у центральних ноцицептивних шляхах, у тому числі в спинному мозку [4].

Нещодавні дослідження показали, що рецептори TRPV1 сприяють синаптичній модуляції всередині спинного мозку, особливо в пластинках I і II. Наприклад, активація TRPV1 у цих регіонах була пов’язана з посиленням збудливої нейротрансмісії та зміною больової чутливості [5]. Проте питання специфічних ефектів активації TRPV1 у нейронах X-пластинки, які менш вивчені, залишаються відкритим. Враховуючи, що ця пластинка є одним із центрів для інтеграції

різних аферентних вхідних сигналів, розуміння того як TRPV1 модулюють нейрональну активність у цій ділянці, може мати вирішальне значення для розробки таргетованої терапії болю.

Метою нашого дослідження було вивчення впливу активації TRPV1 на синаптичну активність нейронів пластинки X спинного мозку, а також визначення ролі глутаматних рецепторів у підтримці капсаїциніндукованої активності.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили на самцях шурів лінії Вістар, вік яких становив 11-12-й постнатальний день (P11–P12). Всіх тварин утримували у віварії Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця з вільним доступом до їжі та води, сталою температурою повітря, природним світловим циклом і стандартним комбікормовим харчуванням.

Дотримувалися положень Конвенції з біоетики Ради Європи (1997), Гельсінської декларації Всесвітньої Медичної Асоціації (1996), Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), загальних етичних принципів наукових досліджень, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (2001), Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006) та з погодження комітету з біомедичної етики Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, (протокол № 1/22 від 2 лютого 2022 р.).

Це дослідження спрямоване на розширення розуміння механізмів центральної сенсibiliзації, пов'язаних із больовими сигналами, та виявлення потенційних мішеней для нових підходів до лікування хронічного болю [6, 7]. Сенсорна, і зокрема ноцицептивна, інформація в спинному мозку обробляється через тонку взаємодію всіх нейронних мереж [1]. Тому, щоб дос-

лідити зміни мініатюрних збуджувальних постсинаптичних струмів (mEPSCs) нам слід було вивчити їх роботу в максимально інтактному середовищі, тобто зі збереженою мережевою взаємодією. Таким потребам відповідають моделі *ex vivo* препаратів описані у деяких працях [8–10]. Біологічний матеріал для дослідів отримували після декапітації шурів. Видалений хребет поміщали в оксигенований розчин сахарози, що містив (ммоль/л): сахароза – 190; декстроза – 10; глюкоза – 20; NaHCO₃ – 26; K-глюконат – 0,75; KH₂PO₄ – 1,25; MgCl₂ – 4; MgSO₄·7H₂O – 3; CaCl₂·2H₂O – 0,5; міоїнозитол – 3; Na-аскорбат – 4; тіосечовина – 2; Na-піруват – 3 (pH 7,4 при насичені 95% O₂ і 5% CO₂). Температура розчину відповідала кімнатній (20–24°C). Спинний мозок видаляли та очищували від твердої мозкової оболонки після чого розривали двома пінцетами для доступу до клітин X-пластинки. Після гемісекції його фіксували (пластинкою X догори) до металеві пластини для подальшого дослідження.

Для електрофізіологічних реєстрацій сагітальну гемісекцію спинного мозку переміщували до експериментальної камери, яку постійно перфузували зі швидкістю 6–7 мл/хв пробарботованим карбогеном розчином Krebsa, такого складу (ммоль/л): декстроза – 5; NaCl – 122; глюкоза – 5; NaHCO₃ – 26; KCl – 2,5; NaH₂PO₄ – 1,25; MgCl – 1,1; CaCl₂·2H₂O – 2; Na-піруват – 2.

Нейрони візуалізували за допомогою мікроскопа Sutter Instrument SOM («Sutter Instrument», США) з 40-кратним водно-імерсійним об'єктивом Olympus LUMPlanFL N 40×/0.80 («Olympus», Японії) методом бічного інфрачервоного освітлення світлодіодом (860 нм, ± 3°, SFH4550, «Osram») [11, 12].

Скляні мікропіпетки витягували на пуллєрі Sutter P-87 («Sutter instruments», США) зі скляних заготовок BF150-86-10 (borosilcate glass with filament, зовнішній діаметр – 1,5 мм, внутрішній діаметр – 0,86 мм, довжи-

на – 10 см) виробництва “Sutter instrument” (США). Піпетки мали діаметр кінчика 1-2 мкм, а їх опір становив 3-4 МОм при заповненні внутрішньоклітинним розчином такого складу (ммоль/л): CsCl – 10, Cs-метансульфонат – 130, MgATФ – 4, NaГТФ – 0,4, HEPES – 10, 2Na-фосфокреатин – 5, EGTA – 5 (рН 7,3).

Мембранні струми реєстрували за допомогою підсилювачів Axon CNS MultiClamp 700B («Molecular Devices», США) та Axon CNS Axoclamp 900A («Molecular Devices», США) а також аналого-цифрового/цифроаналогового перетворювача Digidata 1440A («Molecular Devices», США), який контролювали за допомогою програми pClamp 11.3 («Molecular Devices», США). Потенціал на клітинній мембрані підтримували на рівні -70 мВ. До перфузійного розчину приклали речовини до кінцевих концентрацій: тетродотоксин – 0,5 мкмоль/л; капсаїцин – 1 мкмоль/л; AP-5 – 30 мкмоль/л; CNQX – 10 мкмоль/л.

Електрофізіологічні записи аналізували за допомогою програми NeuroExpress для автоматичної детекції mEPSC. Оцінювали частоту, яка являє собою величину, обернену до інтервалу між подіями. Проміжні результати оцінювали, використовуючи програмний пакет Microsoft Office Excel. Для статистичного аналізу і побудови графіків застосовували мову програмування R (версія 4.3.2) та бібліотек: Tidyverse; PerformanceAnalytics; Readxl; DT; Plotly; R Markdown; Knitr.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У дослідженні були проаналізовані зміни амплітуди та частоти mEPSCs у нейронах пластинки X (n = 10) спинного мозку після прикладання капсаїцину на фоні дії тетродотоксину, блокатора потенціалзалежних натрієвих каналів. Спочатку проводили базові записи контрольної активності нейронів протягом мінімум 10 хв. Ці контрольні записи дали змогу отримати контрольні значення

частоти та амплітуди EPSCs. Після введення тетродотоксину значно знижувалася частота та амплітуда EPSCs, що вказувало на пригнічення спонтанних постсинаптичних подій. Ми фіксували лише мініатюрну активність, що давало змогу точніше аналізувати вплив фармакологічних агентів на синаптичну передачу без впливу потенціалів дії (рис.1).

Наступним етапом було прикладання капсаїцину, специфічного агоніста TRPV1. Це призвело до значного медіанного збільшення частоти (66%; $\sigma=8,7$) та амплітуди (19,3%; $\sigma=7,4$) mEPSCs, що вказувало на їх активацію та збільшення кількості постсинаптичних подій. У нейронах відбувалися двофазні зміни синаптичної активності. На першому етапі після введення зафіксовано значне підвищення частоти mEPSCs (68,2%; $\sigma=8,1$), що свідчить про підсилення синаптичної активності та активацію синапсів. У наступній фазі частота дещо знижувалася (-4,7%; $\sigma=12,5$), хоча залишалася вищою за контрольні значення, однак при цьому амплітуда синаптичних подій продовжувала збільшуватися (13,8%; $\sigma=5,4$). Для перевірки статистичної значущості відмінностей між цими групами був використаний тест Колмогорова-Смірнова. Для кожної з клітин $P<0,001$ (рис.2). Цей двофазний характер відповіді на дію капсаїцину може бути зумовлений різними механізмами активації TRPV1 та їх регуляцією на рівні пресинаптичних терміналів.

Детальний аналіз отриманих результатів дав змогу розділити нейрони на дві групи, залежно від їхньої відповіді на дію капсаїцину. У першій групі нейронів (40% від загальної кількості) він викликав значне підвищення як частоти (81,1%; $\sigma=11,1$), так і амплітуди (15,2%; $\sigma=8,3$) mEPSCs. Ці клітини демонстрували високу чутливість до активації TRPV1, що, ймовірно, вказує на більшу їх щільність на синаптичних терміналах або підвищене вивільнення нейротрансмітерів. У другій групі клітин (60% нейронів) також збільшувалася частота mEPSCs (43,4%;

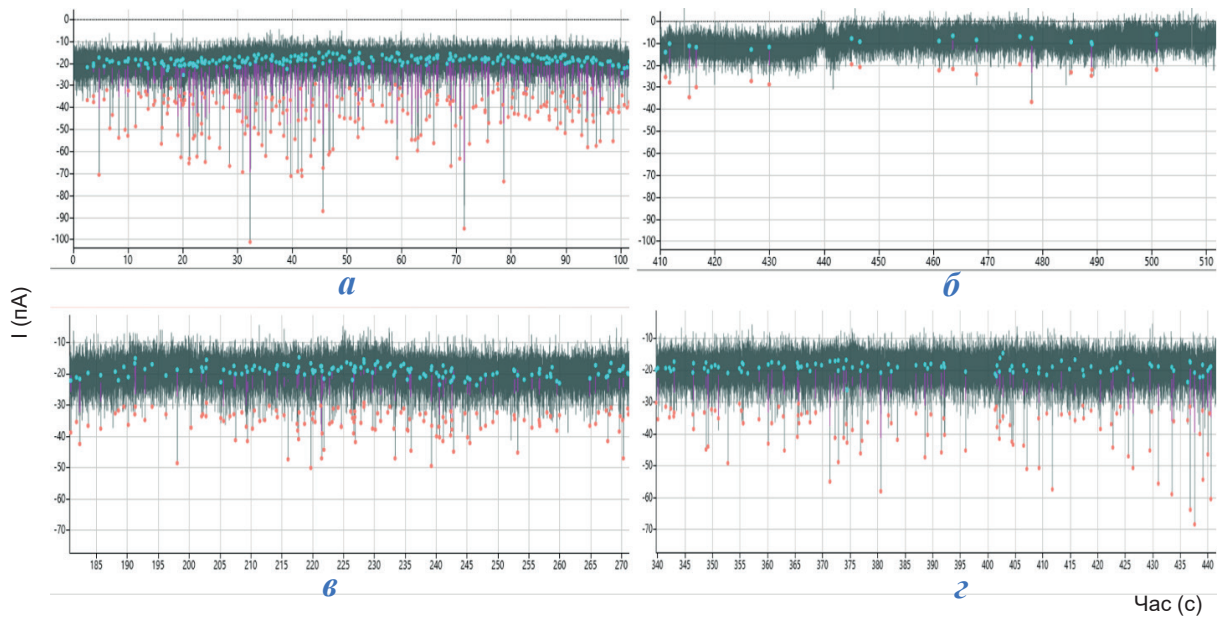


Рис. 1. Приклад електрофізіологічного запису з визначеними подіями: а - контрольний запис; б - реєстрація після прикладання тетродотоксину; в і г реєстрація α і β фази після додавання капсаїцину відповідно

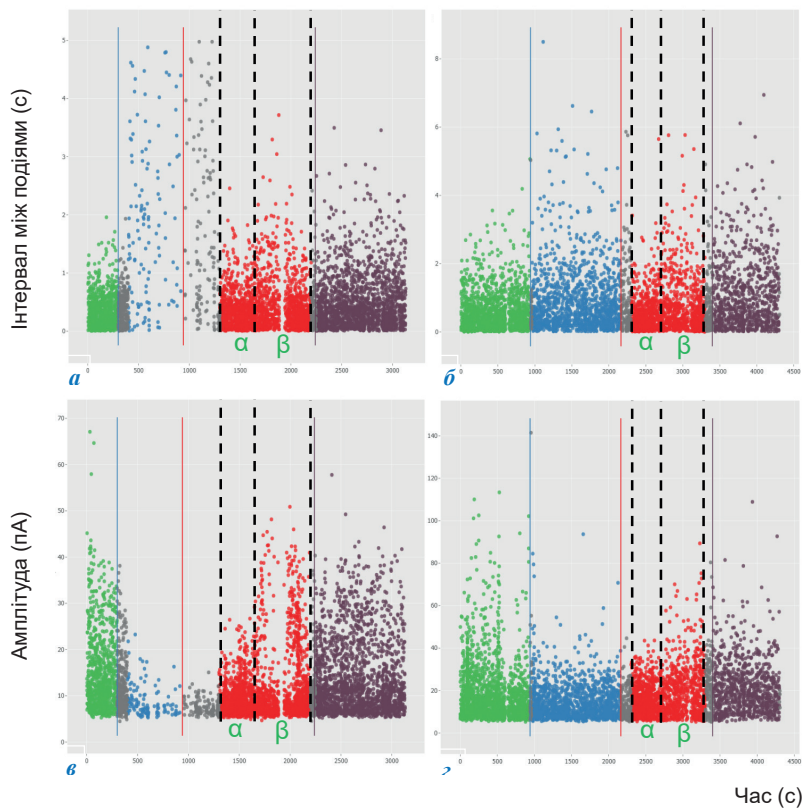


Рис. 2. Інтервал між подіями і амплітуда: а, в — клітина зі значним впливом капсаїцину; б, г — клітина з помірним впливом капсаїцину

$\sigma=2,66$) та амплітуда (4,5%; $\sigma=5,47$) після введення капсаїцину, проте ці зміни були менш вираженими ($P<0,001$). Це може бути пов'язано з нижчою щільністю TRPV1 або з іншими особливостями регуляції їхньої синаптичної активності (рис. 3).

У додатковій серії експериментів вивчали вплив капсаїцину без попереднього додавання тетродотоксину, що дало можливість зберегти спонтанну нейрональну активність та аналізувати природну синаптичну передачу в нейронах пластинки X ($n = 5$). Як і в попередніх експериментах, прикладання капсаїцину призводило до значного підвищення синаптичної активності (частота збільшувалась на 38,8%; $\sigma=19,7$). Щоб дослідити механізми цього ефекту, до зовнішнього середовища послідовно додавали блокатори глутаматних рецепторів. Спочатку вводили AP-5, блокатор NMDA-рецепторів, що призвело до помірного зниження активності (частота зменшилась на 22,7% порівняно з дією капсаїцину, $\sigma=21,3$; $P<0,001$; див. рис 3). Це свідчило про те, що частина капсаїциніндукованої активності залежить від NMDA-рецепторів, які, ймовірно, забезпечують тривалу деполаризацію постсинаптичних нейронів. Однак після додання CNQX, блокатора

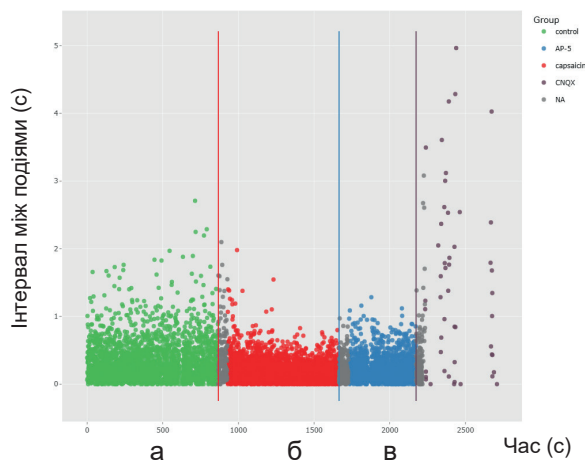


Рис. 3. Характерний приклад активності нейрона пластинки X у контролі (а) та при прикладанні капсаїцину (б); AP-5 (в); CNQX (г)

AMPA-рецепторів, активність повністю зникла, що говорить про домінуючу роль цих рецепторів, які відповідають за генерацію швидких постсинаптичних струмів, у синаптичній передачі (рис. 4).

ВИСНОВКИ

Наші результати показують, що активація TRPV1 має значний вплив на синаптичну активність нейронів пластинки X спинного мозку. Виявлений двофазний характер змін у частоті та амплітуді mEPSCs свідчить про складну регуляцію постсинаптичних процесів під дією капсаїцину. Крім того, різниця у відповідях між нейронами підкреслює функціональну гетерогенність пластинки X та важливість цих рецепторів у модуляції больових сигналів на рівні структур спинного мозку.

Дослідження підтвердило, що деякі нейрони пластинки X спинного мозку отримують прямі сигнали від первинних аферентів. Це підкреслює їхню ключову роль у передачі больових сигналів у центральній нервовій системі. Активація TRPV1 призводила до суттєвого збільшення частоти та амплітуди mEPSCs, що підтверджує їх важливість у модуляції синаптичної активності та, можливо, посиленні ноцицептивної передачі. Встановлено, що відповідь нейронів на дію капсаїцину мала двофазний характер: у першій фазі суттєво підвищувалась частота та несуттєво амплітуда, а в другій частота неістотно зменшувалась, але значно підвищувалась амплітуда, що доводить складну регуляцію синаптичної передачі TRPV1 у X-пластинці.

Крім того, отримані результати свідчать про можливу участь ендоканабіноїдної системи в регуляції ноцицептивних сигналів у пластинці X спинного мозку. Цей механізм може відігравати важливу роль у модуляції болю на рівні центральної нервової системи та відкриває перспективи для подальших досліджень, спрямованих на розробку нових підходів до лікування больових синдромів.

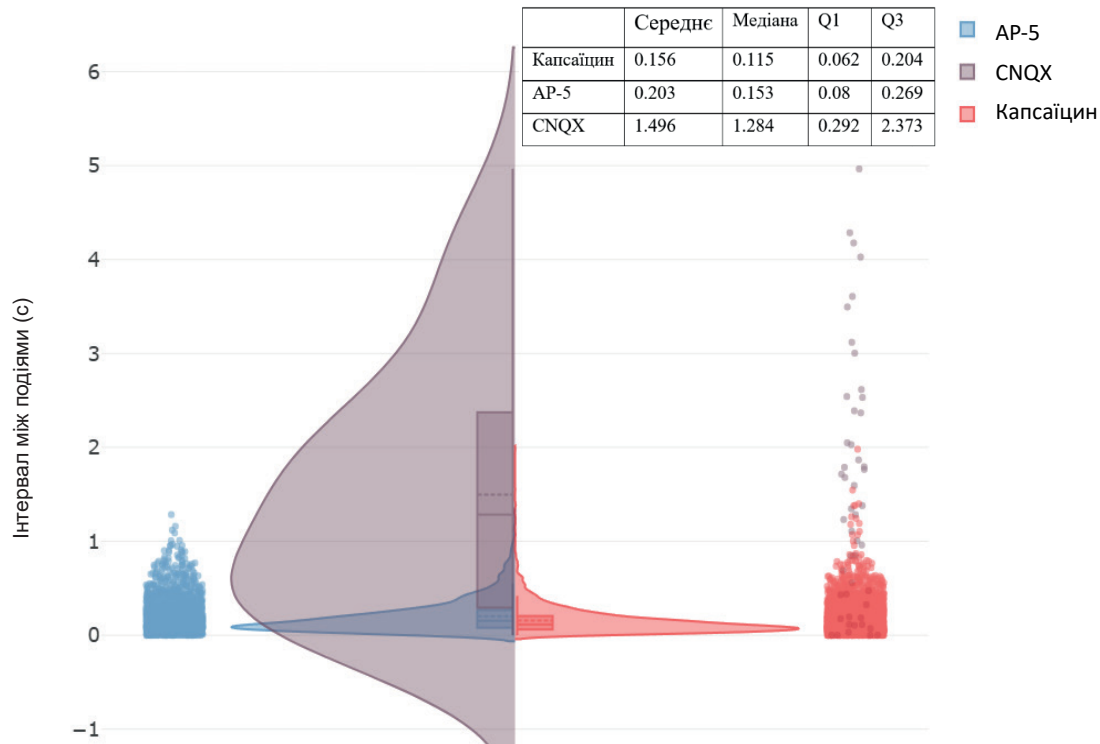


Рис. 4. Скрипкова діаграма для інтервалів між подіями клітині X-пластинки

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.

K.V. Koroid, I.O. Blashchak, S.V. Romanenko

THE ROLE OF TRPV1 AND GLUTAMATE RECEPTORS IN THE SYNAPTIC ACTIVITY OF LAMINA X NEURONS OF THE RAT SPINAL CORD

Bogomoletz Institute of Physiology of NAS of Ukraine, Kyiv; e-mail: Koroid.k.v@gmail.com

This study is aimed at understanding the mechanisms of nociceptive signaling in lamina X of the spinal cord, which are involved in the regulation of pain sensations. First, tetrodotoxin, which blocks action potentials, was applied to the system, which made it possible to isolate miniature synaptic activity (mEPSCs). After that, they added pidal, an agonist of TRPV1 receptors, which caused a significant increase in the

frequency and amplitude of mEPSCs. Against the background of tetrodotoxin, the effect of capsaicin was biphasic: at first, the frequency of events increased sharply, after which it gradually decreased, but the amplitude increased. A control, without tetrodotoxin, application of capsaicin also caused an increase in synaptic activity, but this effect was not biphasic. Additional blockade of NMDA receptors (AP-5) partially reduced capsaicin-induced activity, while an AMPA receptor blocker (CNQX) almost completely abolished it, suggesting a critical role of glutamate receptors in maintaining this activity. The obtained results emphasize the importance of TRPV1 receptors in central sensitization and the possibility of its regulation, which opens new ways of modulation of chronic pain.

Key words: :TRPV1; capsaicin; lamina X; spinal cord; glutamate receptors; AMPA; NMDA; tetrodotoxin; nociception.

REFERENCES

1. Todd AJ. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci.* 2010;11(12):823-36.
2. Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol.* 1999;57(1):1-164.
3. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature.* 2001;413(6852):203-10.
4. Krotov V, Agashkov K, Romanenko S, Koroid K, Krasiakova M, Belan P, Voitenko N. Neuropathic pain

- changes the output of rat lamina I spino-parabrachial neurons. *BBA Adv.* 2023 Feb 14;3:100081.
5. Krotov V, Agashkov K, Krasniakova M, Safronov BV, Belan P, Voitenko N. Segmental and descending control of primary afferent input to the spinal lamina X. *Pain.* 2022 Oct 1;163(10):2014-20.
 6. Ruiz-Cantero MC, Huerta MÁ, Tejada MÁ, Santos-Caballero M, Fernández-Segura E, Cañizares FJ, et al. Sigma-1 receptor agonism exacerbates immune-driven nociception: Role of TRPV1+ nociceptors. *Biomed Pharmacother.* 2023;115534.
 7. Smith PA. The biology of neuropathic pain. *Fiziol Zh.* 2023; 69(1): 54-67.
 8. Krotov V, Belan P, Voitenko N. Approach for Electrophysiological Studies of Spinal Lamina X Neurons. *Bio Protoc.* 2024;14(14):e5035.
 9. Safronov BV, Szűcs P. Novel aspects of signal processing in lamina I. *Neuropharmacology.* 1 April 2024; 247:109858.
 10. Szucs P, Luz LL, Lima D, Safronov BV. Local axon collaterals of lamina I projection neurons in the spinal cord of young rats. *J Comp Neurol.* 2010;15;518(14):2645-65.
 11. Szűcs P, Pinto V, Safronov BV. Advanced technique of infrared LED imaging of unstained cells and intracellular structures in isolated spinal cord, brainstem, ganglia and cerebellum. *J Neurosci Method.* 2009 Mar;177(2): 369-80.
 12. Safronov BV, Pinto V, Derkach VA. High-resolution single-cell imaging for functional studies in the whole brain and spinal cord and thick tissue blocks using lightemitting diode illumination. *J Neurosci Method.* 2007 Aug;164(2):292-8.

*Матеріал надійшов
до редакції 15.08.2024*