

УДК 577.352.53, 57.085.23

Особенности ответов TRPV1-рецепторов при их активации протонами, капсаицином и их смесью при разных мембранных потенциалах

Е. А. Цветков^{1,2}, Н. Н. Потапова¹, К. В. Большаков^{1,2*}¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223, Санкт-Петербург, просп. Тореза, 44²Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7-9

*E-mail: k.bolshakov@biotechnologies.ru

Поступила в редакцию 31.05.2016

Принята к печати 21.11.2016

РЕФЕРАТ На культуре клеток СНО, трансфицированных плазмидами, кодирующими TRPV1-рецепторы, изучены ответы, вызываемые капсаицином и протонами в отдельности и при их совместной аппликации при разных значениях мембранного потенциала. Методом фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка» показано, что вызванные капсаицином и протонами токи суммируются арифметически при потенциалах от 20 до –40 мВ. При потенциалах фиксации ниже –40 мВ наблюдается неаддитивность эффектов агонистов: суммарный ток, регистрируемый при совместной аппликации агонистов, существенно превышает сумму токов, возникающих при аппликации каждого из агонистов в отдельности. Такая потенциал-зависимая потенциация токов через TRPV1-каналы, по всей видимости, лежит в основе сенсibilизации TRPV1-рецепторов при воспалении и боли, когда растут концентрации провоспалительных медиаторов, являющихся агонистами данных рецепторов. Однако деполяризация мембраны, возникающая при активации TRPV1-рецепторов, ограничивает их последующий ответ, что может служить защитным механизмом, ограничивающим их активацию.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА TRPV1, капсаицин, pH, агонисты TRPV1-рецепторов, взаимодействие агонистов TRPV1-рецепторов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ СНО – Chinese Hamster Ovary (клетки соединительной ткани яичника китайского хомячка); TRPV1 – Transient Receptor Potential cation channel subfamily V member 1 (ванилоидный рецептор, тип 1); GFP – Green Fluorescent Protein (зеленый флуоресцентный белок); МП – мембранный потенциал.

ВВЕДЕНИЕ

Капсаициновые рецепторы (TRPV1) представляют собой сложноорганизованные полимодальные сенсорные системы, которые реагируют на разнообразные стимулы как химической, так и физической природы [1–12]. В большинстве случаев эти воздействия вызывают открытие поры канално-рецепторного комплекса и возникновение трансмембранного ионного тока.

Полимодальность TRPV-рецепторов приводит к тому, что они способны реагировать не только на аппликацию отдельных агонистов, но и на их комбинации. Последнее, как правило, вызывает взаимную потенциацию ответов, что ранее было описано для разных сочетаний агонистических воздействий,

в том числе капсаицина, производных арахидоновой кислоты, pH, а также таких физических стимулов, как изменение температуры, мембранного потенциала или давления [1–13]. В частности, имеются данные о том, что закисление среды повышает чувствительность TRPV1-рецепторов к капсаицину [4, 14, 15], а повышение температуры смещает зависимость их активации потенциалом в сторону деполяризации [16].

Поскольку закисление среды является важным признаком развивающейся воспалительной реакции [17], то потенциацию TRPV1-рецепторов, наблюдаемую при сочетании этих факторов с другими агонистическими воздействиями (например, с капсаицином), можно рассматривать как часть сигнального механизма, запускаемого в клетке в ответ на воспа-

ление. Описание феноменологии такой потенциации и ее механизма представляет практический интерес как для понимания самого воспалительного процесса, так и для изучения путей его коррекции.

Тем не менее анализ опубликованных данных свидетельствует о том, что описание потенциации TRPV1-рецепторов, наблюдаемой при их одновременной активации двумя агонистами, не является полным. В частности, отсутствуют данные о том, как такое взаимодействие может зависеть от мембранного потенциала – важного параметра клетки, влияющего как на сигнальные каскады, так и на сами рецепторы, в том числе и капсаициновые.

Задачей настоящей работы было изучение взаимодействия агонистов капсаицина и протонов при разных значениях потенциала фиксации.

Показано, что нелинейная суммация ответов рецепторов TRPV1 на совместную аппликацию протонов и капсаицина наблюдается лишь при потенциалах, близких к потенциалу покоя. При деполяризации мембраны при развитии воспаления и различных патологий суммация становится линейной. По всей видимости, данное свойство TRPV1-рецепторов является защитным, ограничивающим их гиперактивацию в патологических состояниях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Работа выполнена на рекомбинантных рецепторах TRPV1, конститутивно или транзистентно экспрессирующихся в клетках СНО. Клетки СНО культивировали в стандартных условиях в среде DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium, «Биолот») с 10% эмбриональной бычьей сывороткой (fetal bovine serum, Hyclone) и 1% гентамицином в инкубаторе с влажной атмосферой, 5% содержанием CO₂ при температуре 37°C. Трансфекцию проводили с помощью липофектамина-2000 (Invitrogen, США) согласно рекомендациям производителя. Для трансфекции на 35-мм чашку Петри с культурой СНО наносили 0.5 мкг плазмиды, кодирующей ген *TRPV1*, и 0.5 мкг плазмиды, кодирующей ген *eGFP*, которые были предоставлены Dr. Staruschenko и Dr. Medina соответственно. Эксперименты проводили со 2 по 5 день после трансфекции. Эффективность трансфекции определяли по интенсивности флуоресценции GFP, оцениваемой на микроскопе MF-51 (M-shot). Часть работы выполнена на конститутивно трансфицированных клетках СНО, любезно предоставленных лабораторией Е.В. Гришина. Различия между двумя видами трансфекции отсутствовали, поэтому данные были объединены.

Регистрацию токов осуществляли в конфигурации «целая клетка» в режиме фиксации мембран-

ного потенциала. В работе использовали усилитель EPC10 (НЕКА Elektronik, США) и пакет программ PatchMaster v8.2 (НЕКА Elektronik). Тестовые растворы апплицировали с помощью системы смены растворов NANION (Nanion, Германия) через микро-манифолд с внутренним диаметром 250 мкм, время замены раствора составляло около 100 мс. Для снижения десенситизации рецепторов в результате многократной аппликации растворов частота их предъявления не превышала 1 раза в 45 с. Регистрирующие пипетки изготавливали на микрокузнице P-87 (Sutter Instruments Co., США) из боросиликатных заготовок с филаментом (Sutter Instruments Co.). Наружный и внутренний диаметры заготовок – 1.5 и 0.86 мм соответственно. Сопротивление заполненных пипеток составляло 3–6 МОм. Для электрофизиологических тестов клетки переносили в раствор следующего состава (мМ): 140 NaCl, 5 KCl, 1 MgSO₄, 2.5 CaCl₂; 10 глюкоза; 10 HEPES, pH 7.4. Состав пипеточного раствора (мМ): 100 CsF, 40 CsCl, 5 NaCl, 0.5 EGTA, 10 HEPES, pH 7.2. Для приготовления растворов использовали реактивы фирмы Sigma (США). Капсаицин разводили согласно рекомендациям фирмы (Sigma), в 96% этаноле до концентрации 10 мМ и добавляли необходимое количество для получения указанных конечных концентраций.

Статистическую обработку осуществляли с помощью программы EXCEL. Сравнение средних значений и оценку их принадлежности к одной/разным выборкам проводили с помощью парного t-теста Стьюдента, поскольку выборки средних были получены на одной клетке. Поскольку разные клетки имели разные амплитуды ответов на капсаицин и протоны (ввиду разной плотности рецепторов и различий размеров клеток), то при измерении потенцирующего действия мы нормировали амплитуды тока каждой клетки на амплитуду капсаицинового ответа этой клетки. Величину EC₅₀ и коэффициента Хилла оценивали с помощью пакета ORIGIN при аппроксимации экспериментальных данных теоретической кривой уравнения Хилла: $I = I_{\max} (1 / (1 + (EC_{50} / [C])^s))$, где I_{\max} – амплитуда тока при насыщающих концентрациях лигандов, капсаицина или pH; I – амплитуда тока при текущей концентрации лиганда $[C]$; EC₅₀ – концентрация половинного максимального эффекта; s – коэффициент Хилла. EC₅₀ для концентрации протонов обозначен в тексте в единицах кислотности – pH₅₀.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования совместного действия используемых агонистов TRPV1-рецепторов сначала оценивали диапазон рабочих концентраций при их аппликации по отдельности. С этой целью строили

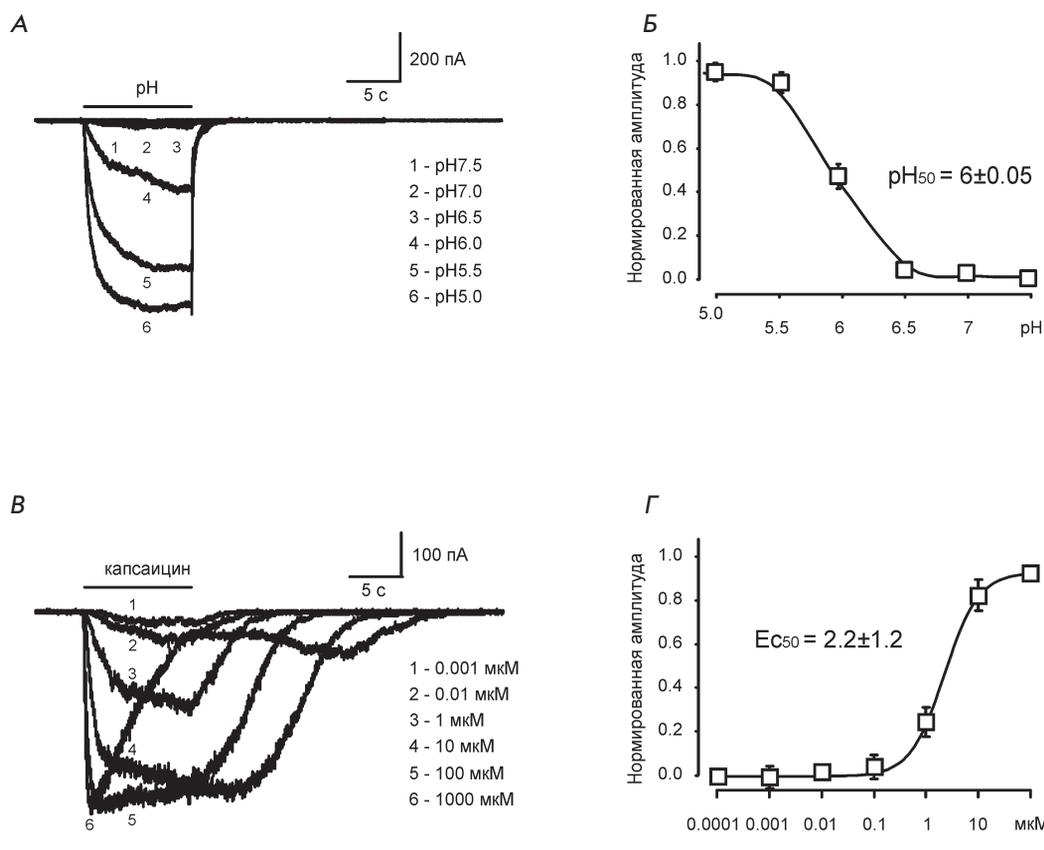


Рис. 1. Чувствительность TRPV1-рецепторов к протонам и капсаицину. **А** – осциллограммы ответов репрезентативной клетки, возникающих при аппликации раствора с различным уровнем рН. **Б** – кривая доза-эффект, нормированная по амплитуде тока, регистрируемого при подаче раствора с рН 5.0. $pH_{50} = 6.0 \pm 0.05$; $n = 10$. **В** – осциллограммы ответов репрезентативной клетки, возникающих при унифицированной аппликации капсаицина разных концентраций. **Г** – кривая доза-эффект, нормированная по амплитуде тока, регистрируемого при подаче насыщающей концентрации капсаицина. $EC_{50} = 2.2 \pm 1.2$ мкМ; $n = 10$

графики дозовой зависимости действия капсаицина и протонов при мембранном потенциале -80 мВ. Полученные результаты представлены на *рис. 1*. Видно, что ответы на закисление среды возникают при рН 6.5, далее их амплитуда растет с повышением кислотности и достигает насыщения при рН 5.5 и выше. Ответы на капсаицин появлялись при концентрации 0.01 мкМ, достигали насыщения при значениях, близких к 100 мкМ. Однако с ростом концентрации капсаицина амплитуда ответов снижалась. Вероятно, падение амплитуды ответов при высоких концентрациях капсаицина связано с его неспецифическим действием на мембрану клеток. Поэтому концентрации капсаицина выше 100 мкМ в дальнейшем не использовали. EC_{50} для капсаицина составила 2.2 ± 1.2 мкМ ($n = 10$), а pH_{50} для рецепторов TRPV1 составил 6.0 ± 0.05 ($n = 10$), что хорошо согласуется с данными [4]. Следует отметить, что ни капсаицин, ни рН в исследованных концентрациях не вызывали тока у нетрансфицированных клеток СНО. Ответы на капсаицин и рН у трансфицированных клеток блокировались 10 мкМ рутениевого красного. Это свидетельствует о том, что регистрируемые в этих условиях токи опосредованы рецепторами TRPV1.

Для изучения взаимодействия эффектов протонов и капсаицина при разных потенциалах использовали следующий протокол. Сначала регистрировали ответ

на аппликацию раствора с определенным значением рН, далее подавали раствор с капсаицином, после чего апплицировали раствор с заданным рН и капсаицином совместно и в тех же концентрациях. В отдельной серии экспериментов мы показали, что изменение порядка (последовательности) аппликации агонистов не влияло на амплитуды ответов. В ходе анализа данных амплитуду ответа на совместную аппликацию капсаицина и протонов ($I_{(pH+Kан)}$) сопоставляли с суммой амплитуд ответов ($I_{pH} + I_{Kан}$), полученных при аппликациях капсаицина ($I_{Kан}$) и протонов (I_{pH}) по отдельности. Полученные данные иллюстрирует *рис. 2*, где в качестве тестовых концентраций капсаицина и протонов взяты 0.1 мкМ и рН 5.0 соответственно. Из *рис. 2* видно, что амплитуда ответов на совместную аппликацию используемых агонистов ($I_{(pH+Kан)}$) может существенно превышать сумму амплитуд ответов ($I_{pH} + I_{Kан}$), полученных при аппликациях капсаицина ($I_{Kан}$) и рН (I_{pH}) по отдельности. Данная потенциация зависит от уровня мембранного потенциала и максимально выражена в условиях гиперполяризации клетки. При потенциале -40 мВ амплитуда тока, вызываемого 0.1 мкМ капсаицином при рН 5.0, достоверно превышала сумму ответов, вызываемых при аппликации 0.1 мкМ капсаицина и при снижении рН до 5.0, при $p < 0.01$; при потенциале -120 мВ это различие было достоверно при $p <$

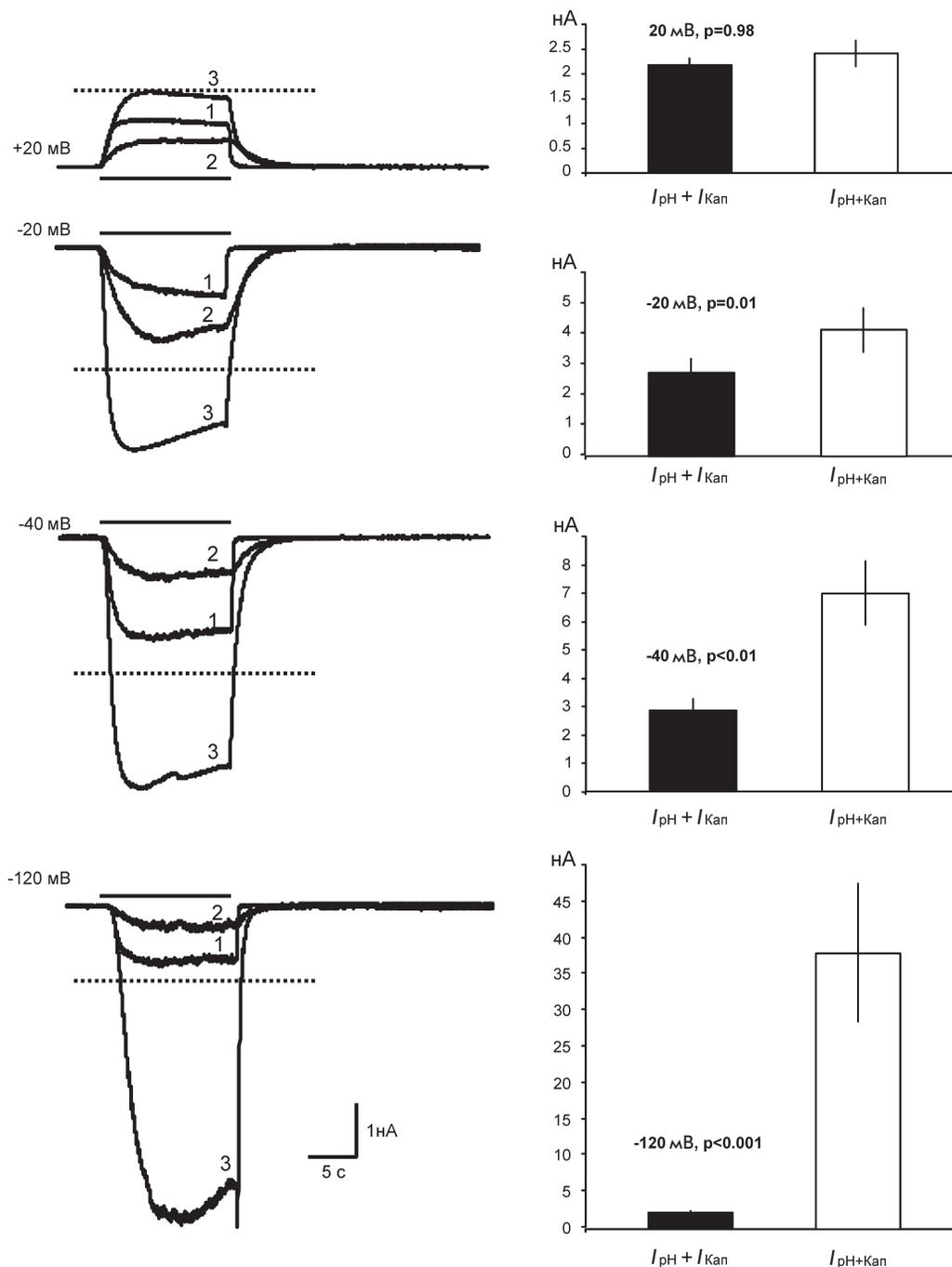


Рис. 2. Взаимодействие эффектов протонов и капсаицина при разных значениях фиксации мембранного потенциала. Левая колонка – токи, возникающие при аппликации раствора с pH 5.0 (1); при аппликации растворов с 0.1 мкМ капсаицина (2) при совместной аппликации раствора с pH 5.0 и раствора с 0.1 мкМ капсаицина (3). Прерывистая линия – теоретическая величина алгебраической суммы амплитуд токов, возникающих при аппликации раствора с pH 5.0 и раствора с 0.1 мкМ капсаицина. Правая колонка – сопоставление амплитуд теоретической (черный столбик) и экспериментальной (белый столбец) сумм токов, возникающих при совместной аппликации капсаицина и протонов. Уровень достоверности отличий средних теоретической и экспериментальной сумм токов приведен над столбцами

0.001. Смещение МП в сторону деполяризации снижает уровень потенциации и приближает амплитуду ответа на совместную аппликацию капсаицина и протонов к сумме ответов при их независимой аппликации. При 20 и -20 мВ различия амплитуд совместного ответа и суммы амплитуд отдельных ответов на агонисты недостоверны.

Для более детальной характеристики феномена потенциации TRPV1-рецепторов аналогичные эксперименты проводили при разных концентрациях агонистов. Концентрацию капсаицина варьировали

в диапазоне от 0.1 до 10 мкМ, а уровни pH – от 5.5 до 7.0. В качестве параметра оценки выявленной потенциации использовали отношение амплитуды тока, полученного при совместной аппликации агонистов ($I_{(pH+Kап)}$), к сумме амплитуд токов, полученных при аппликации этих агонистов по отдельности ($I_{pH} + I_{Kап}$). В графическом виде значения этой величины ($I_{(pH+Kап)}/(I_{pH} + I_{Kап})$) представлены на рис. 3. В столбцах этого рисунка приведены данные, полученные при одних и тех же значениях pH, где варьировали концентрацию капсаицина, а в строках –

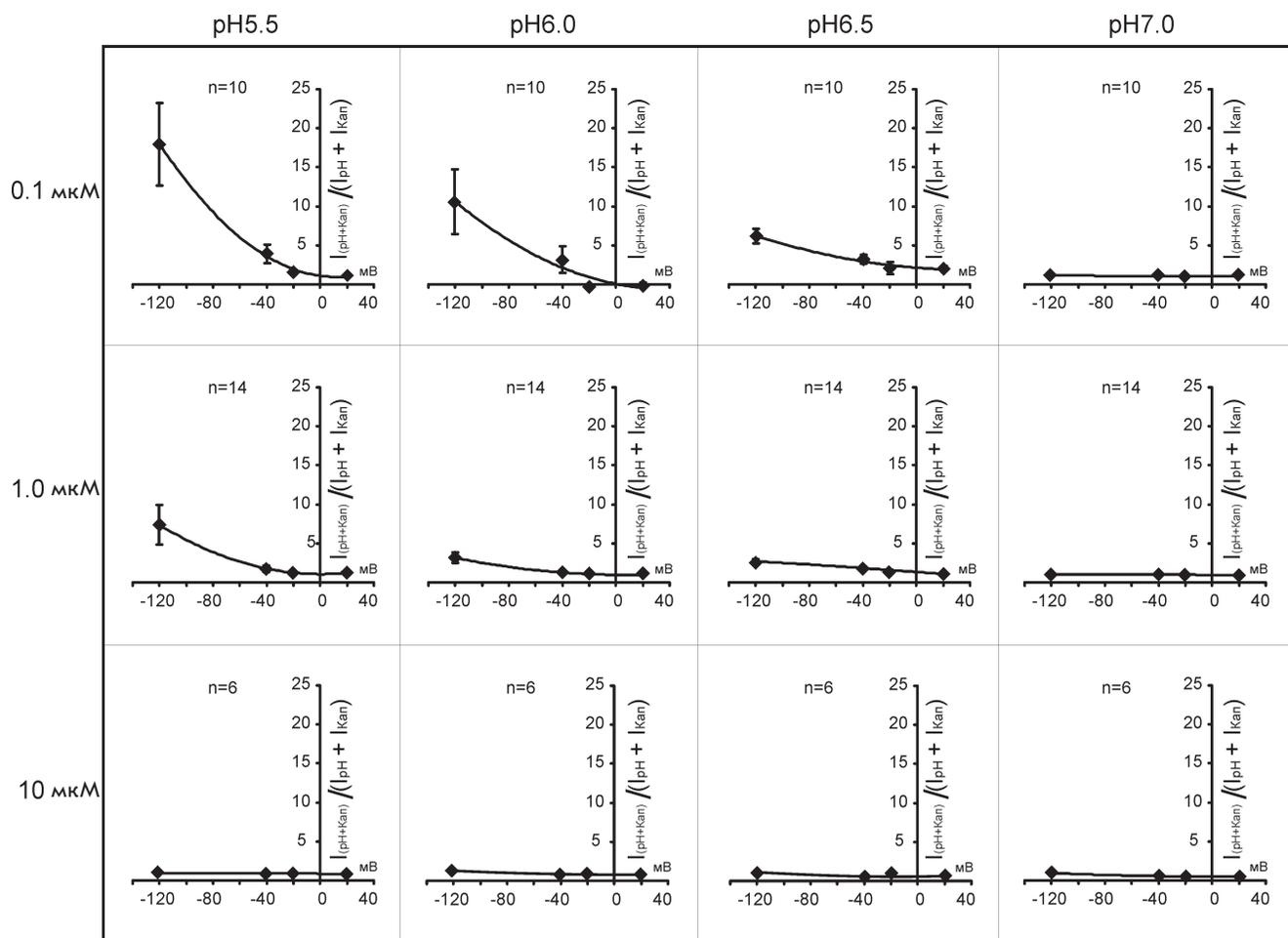


Рис. 3. Зависимость потенции капсаициновых рецепторов от мембранного потенциала при разных значениях pH и концентрации капсаицина. Объяснение схемы аппликации растворов, измерения амплитуд и анализа данных приведено в тексте

при одних и тех же концентрациях капсаицина, где варьировали pH. Следует отметить, что при концентрации капсаицина больше 10 мкМ эффект потенциации не наблюдался, поэтому тесты с более высокой концентрацией агониста не проводили.

Из рис. 3 видно, что эффект потенциации зависит от всех параметров, контролируемых в этих тестах. Наибольший эффект наблюдали в условиях максимальной гиперполяризации клеток при максимальной закисленности среды и наименьших концентрациях капсаицина (см. верхний левый график на рис. 3). Видно, что степень потенциации TRPV1-рецепторов прямо зависит от концентрации протонов и растет по мере закисления при фиксации концентрации капсаицина. При этом потенцирующее действие протонов лучше проявляется при низких концентрациях капсаицина и практически исчезает при повышении концентрации до 10 мкМ. Таким образом, наблюдается обратная зависимость потен-

ации токов, вызванных протонами, от концентрации капсаицина, т.е. при возрастании концентрации капсаицина происходит уменьшение степени потенциации.

Чувствительность потенциации рецепторов капсаицина к мембранному потенциалу клетки позволяет предположить, что аппликация капсаицина в условиях снижения pH среды будет приводить к изменению вольт-амперных характеристик ответов капсаицинового рецептора на действие агонистов. Для проверки этого предположения мы сопоставили вольт-амперные характеристики каналов, полученные при активации рецепторов капсаицином, протонами и совместной аппликации этих агентов при концентрациях, которые в предыдущих опытах соответствовали максимальной выраженности эффекта потенциации. Результат этих экспериментов показан на рис. 4. Ответы на протоны, капсаицин характеризуются входящим выпрямлением, что хорошо согла-

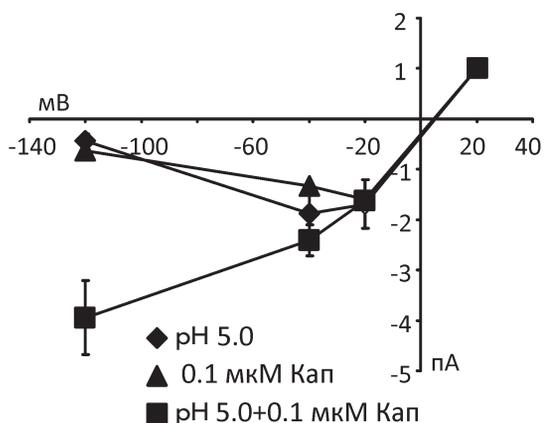


Рис. 4. Вольт-амперные характеристики ответов TRPV1-рецепторов на агонисты. Треугольники – вольт-амперная характеристика ответов, вызываемых аппликацией капсаицина (0.1 мкМ); ромбы – вольт-амперная характеристика ответов, вызываемых аппликацией раствора с pH 5.0; прямоугольники – вольт-амперная характеристика ответов, вызываемых совместной аппликацией закисленного раствора (pH 5.0) и капсаицина (0.1 мкМ)

суется с данными [2, 14]. При совместной аппликации протонов и капсаицина степень выпрямления уменьшается. Ослабление выпрямляющих свойств рецепторов TRPV1 можно рассматривать как элемент механизма, который регулирует сигнальные функции рецепторов при развитии воспалительных реакций, рецепции боли, терморегуляции и прочих функций, в которые вовлечены TRPV1-рецепторы [1–12].

Полученных нами данных недостаточно для формирования окончательного вывода о механизмах потенциации капсаициновых рецепторов при совместной аппликации капсаицина и протонов. Однако, учитывая факт изменения выпрямляющих свойств

канала при совместной подаче агонистов, в качестве механизма этого явления можно рассматривать как потенциал-зависимое увеличение чувствительности этих рецепторов к одному из агонистов в присутствии другого, так и возможность модификации параметров инактивации рецепторов в данных экспериментальных условиях. Для проверки этих предположений и выявления механизмов взаимодействия ответов, вызываемых при активации рецепторов протонами и капсаицином при разных потенциалах, а также физиологического значения такого взаимодействия необходимы дополнительные исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаруженная зависимость потенцирующего действия агонистов TRPV1 при их совместной аппликации от мембранного потенциала показывает еще одну особенность рецепторов TRPV1, позволяющую им тонко подстраивать свой ответ к совокупности внешних и внутренних факторов. Так, потенциация ответов TRPV1 при гиперполяризации позволяет этим рецепторам включаться на ранней стадии воспаления, когда концентрация воспалительных агентов еще не слишком высока. Поскольку срабатывание данных рецепторов может быть связано с запуском апоптоза, то исчезновение потенциации ответов при совместной аппликации агонистов на фоне деполяризации будет служить защитным механизмом. Однако понимание функциональной значимости амплитуды ответов TRPV1, а также характеристика молекулярных механизмов, опосредующих взаимодействие разных агонистов данных рецепторов, требует дальнейших исследований.

Работа поддержана РФФИ (грант № 15-04-03957) и программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zhu M.X. TRP channels. Boca Raton: Taylor & Francis, 2011.
- Caterina M.J., Schumacher M.A., Tominaga M., Rosen T.A., Levine J.D., Julius D. // Nature. 1997. V. 389. № 6653. P. 816–824.
- Blumberg P.M., Pearce L.V., Lee J. // Curr. Top Med. Chem. 2011. V. 11. № 17. P. 2151–2158.
- Vanilloid Receptor TRPV1 in Drug Discovery: Targeting Pain and Other Pathological Disorders / Eds Gomtsyan A., Faltynek C.R. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2010.
- Venkatachalam K., Montell C. // Annu. Rev. Biochem. 2007. V. 76. P. 387–417.
- Nilius B., Voets T. // Pflügers Arch. 2005. V. 451. № 1. P. 1–10.
- Pedersen S.F., Owsianik G., Nilius B. // Cell Calcium. 2005. V. 38. № 3–4. P. 233–252.
- Voets T., Talavera K., Owsianik G., Nilius B. // Nat. Chem. Biol. 2005. V. 1. № 2. P. 85–92.
- Ramsey I.S., Delling M., Clapham D.E. // Annu. Rev. Physiol. 2006. V. 68. P. 619–647.
- Nilius B. // Biochim. Biophys. Acta. 2007. V. 1772. № 8. P. 805–812.
- Nilius B., Owsianik G., Voets T., Peters J.A. // Physiol. Rev. 2007. V. 87. № 1. P. 165–217.
- Nilius B., Mahieu F. // Mol. Cell. 2006. V. 22. № 3. P. 297–307.
- Dhaka A., Uzzell V., Dubin A.E., Mathur J., Petrus M., Bandell M., Patapoutian A. // J. Neurosci. 2009. V. 29. № 1. P. 153–158.
- Tominaga M., Caterina M.J., Malmberg A.B., Rosen T.A., Gilbert H., Skinner K., Raumann B.E., Basbaum A.I., Julius D. // Neuron. 1998. V. 21. № 3. P. 531–543.
- Ryu S., Liu B., Qin F. // J. Gen. Physiol. 2003. V. 122. № 1. P. 45–61.
- Voets T., Droogmans G., Wissenbach U., Janssens A., Flokkerzi V., Nilius B. // Nature. 2004. V. 430. № 7001. P. 748–754.
- Grivennikov S.I., Greten F.R., Karin M. // Cell. 2010. V. 140. № 6. P. 883–899.