

УДК 612

ОСОБЕННОСТИ ПУРИНЕРГИЧЕСКОЙ МОДУЛЯЦИИ МИОНЕВРАЛЬНОЙ ПЕРЕДАЧИ НА ФОНЕ КАПСАИЦИНА

© 2024 г. А.Е. Хайруллин*, **, #, М.А. Мухамедьяров*, Р.Д. Мухамедзянов*, Н.М. Каштанова*, Е.Н. Животова*, Г.Г. Сучкова*, А.Р. Шайхутдинова*, А.А. Еремеев**, С.Н. Гришин*

*Казанский государственный медицинский университет, ул. Бутлерова, 49, Казань, 420012, Россия

**Казанский федеральный университет, Кремлевская ул., 18, Казань, 420008, Россия

#E-mail: khajrulli@ya.ru

Поступила в редакцию 15.01.2024 г.

После доработки 15.01.2024 г.

Принята к публикации 26.01.2024 г.

Исследована проблема мионевральной передачи в присутствии «интегратора боли и термочувствительности» – капсаицина. Проверено действие известных модуляторов синаптической передачи – пуринов (АТФ и аденозина) на фоне капсаицина. После выдерживания нервно-мышечного препарата лягушки в перфузирующем растворе, содержащем капсаицин, ингибиторные эффекты обоих пуринов оказались значительно снижены. Нивелирование капсаицином депрессорного действия аденозина связано с ингибированием непосредственно A_1 -сигнализации, так как агонист A_{2A} -рецепторов CGS21680 проявил выраженное, почти полностью скрытое в контроле, потенцирующее действие на фоне капсаицина. Мы предполагаем, что известное нейропротекторное действие капсаицина в первую очередь связано с устранением ингибирования эндогенными пуринами вызванного квантового выхода нейротрансммиттера.

Ключевые слова: капсаицин, АТФ, аденозин, нервно-мышечный синапс, калиевые каналы А-типа, вызванная квантовая секреция.

DOI: 10.31857/S0006302924010135, EDN: QZLTZG

Капсаицин (ванилиламид 8-метил-6-ноненовой кислоты) – алкалоид, содержащийся в различных видах стручкового перца *Capsicum*, тмина, чеснока и проч. [1]. Рецептор капсаицина (так называемый «ваниллоидный», TRPV1) представляет собой неселективный катионный канал, структурно родственной членам семейства ионных каналов TRP [2]. Он воспринимается звеном механизма, который регулирует сигнальные функции рецепторов при развитии воспалительных реакций, генерации боли, терморегуляции и прочих функций, в которые вовлечены TRPV1-рецепторы.

Ваниллоидные рецепторы рассматриваются как «интеграторы химических и физических составляющих болевых стимулов» [3], в том числе опосредованных пуриновой сигнализацией [4]. Что характерно, внутриклеточный АТФ увеличивает активность ионных каналов, активируемых капсаицином, путем взаимодействия с нуклеотид-связывающими доменами в ооцитах [5].

Отмечена полимодальность TRPV1-рецептора, приводящая к тому, что он способен реагировать не только на аппликацию отдельных агонистов, но и на их комбинации. В результате, как правило, возникает взаимная потенциация ответов, к примеру, при различных сочетаниях действия капсаицина, производных арахидоновой кислоты, рН, а также таких физических воздействий, как изменение температуры, мембранного потенциала или давления [1–3]. Интересно, что большинство перечисленных факторов (а именно производные арахидоновой кислоты, изменение температуры, мембранного потенциала и пр.) также определяют эффективность пуринергической сигнализации [6, 7]. Особо отметим, что именно за P2Y-рецепторами АТФ закреплен статус температурозависимых [8–10]. Но при этом и у TRPV1 повышение температуры смещает их потенциалозависимость в сторону деполяризации [11]. На этом фоне ничего неожиданного в том, что обнаружена ваниллоидная и P2-рецепторная конвергентная синаптическая активность в центральной нервной системе [12, 13].

Сокращения: ТКП – токи концевой пластинки.

В настоящее время в связи с широким внедрением в фармакологическую практику местных анальгезирующих средств на основе капсаицина повышенное внимание уделяется вскрытию механизмов его способности купировать боль, обеспечивая ослабление болевой сигнализации на периферии. В связи со всем этим мы провели представляемое вашему вниманию исследование перекрестных эффектов пуринов и капсаицина в мионевральных синапсах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка рабочего раствора капсаицина. Капсаицин принадлежит к фармакологической группе «Раздражающие средства природного происхождения» [14]. Для приготовления используемого в эксперименте рабочего раствора капсаицина мы проводили ряд процедур.

Вскрытие упаковки и взятие навески проводили в вентилируемом помещении в вытяжном шкафу. У совершающего вскрытие упаковки и взвешивание был надет респиратор. Осуществлялся непрерывный медицинский контроль. После завершения всех необходимых действий проводили стандартные реабилитационные процедуры, предусмотренные для лиц, имевших контакт с раздражающими средствами.

Методика электрофизиологического эксперимента. Эксперименты по регистрации токов концевой пластинки (ТКП) проводили *in vitro* на препарате *n. ichiaticus – m. sartorius Rana ridibunda*. Декапитацию осуществляли под эфирным наркозом. Сухожилие дистального конца мышцы брали на лигатуру, мышцу отсепаровывали до места вхождения в нее нерва. После вскрытия брюшной полости седалищный нерв брали на лигатуру у места вхождения в спинной мозг и выделяли до места вхождения в мышцу. Для предотвращения сокращений мышцы поперечно рассекли ее волокна.

Непрямое раздражение нерва проводили серебряными электродами в отдельной герметической увлажненной камере, изолированной от ванночки, в которую помещали мышечный препарат. Герметизацию отсека с нервом осуществляли тонкой пластиной, покрытой слоем вазелина. Электростимуляцию нерва для регистрации токов концевой пластинки осуществляли прямоугольными импульсами сверхпороговой амплитуды длительностью 0.2–0.4 мс с частотой 0.03 Гц.

Вызванную квантовую секрецию оценивали по амплитудно-временным параметрам вызванных ТКП, которые отводились потенциальным и токовым микроэлектродами в области концевой пластинки мышечного волокна. Оценку результатов – накопления и усреднения ТКП – осуществляли с помощью персонального компьюте-

ра с периодом опроса 5–20 мкс на точку. Расчет параметров спада токов концевой пластинки проводили при помощи программного обеспечения Origin. Мышечный препарат перфузировали со скоростью 2 мл/мин раствором Рингера, в который апплицировали растворы АТФ, аденозина, CGS21680 и капсаицина (Sigma, США).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы SPSS Statistics. Проверку соответствия полученных данных нормальному распределению проводили с помощью критерия Колмогорова. Рассчитывали средние арифметические анализируемых параметров и стандартную ошибку. Статистическую значимость наблюдаемых изменений оценивали с помощью критерия Стьюдента для независимых и попарно сопряженных выборок. Различия рассматривали как значимые при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Базовые эффекты пуринов. Вначале мы оценивали действие экзогенного аденозина на характеристики многоквантовых токов концевой пластинки. При фиксации потенциала на уровне -40 мВ средняя амплитуда многоквантовых токов концевой пластинки составила 137 ± 24 нА ($n = 28$). Спад токов описывался одной экспонентой с постоянной времени спада 1.42 ± 0.11 мс ($n = 28$). Добавление аденозина в микромолярных концентрациях вызывало снижение амплитуды токов концевой пластинки. При использовании аденозина в концентрации 100 мкМ снижение амплитуды токов происходило до $70.1 \pm 1.2\%$ ($n = 28$, $p < 0.001$) (рис. 1). Экзогенный аденозин не влиял существенно на время роста и постоянную времени спада токов. Эффект аденозина на амплитуду токов был обратим, после отмывания раствором Рингера амплитуда сигнала восстанавливалась до исходных величин ($n = 28$, $p > 0.05$).

После аппликации АТФ наблюдалось снижение амплитуды многоквантовых ТКП. Так, АТФ в концентрации 100 мкМ к 15-й минуте снижала амплитуду ТКП до $66.2 \pm 1.0\%$ ($n = 28$, $p < 0.001$) от контрольного значения (рис. 1).

Как для АТФ, так и для аденозина падение амплитуды было обратимым при отмывке физиологическим раствором.

Эффекты пуринов на фоне капсаицина. В следующих сериях экспериментов мы проверяли базовые эффекты пуринов на фоне эффективной концентрации капсаицина, которая составляет 10 нМ [15].

После получасового выдерживания нервно-мышечного препарата в перфузирующем растворе, содержащем капсаицин, амплитуда ТКП незначительно увеличивалась (до $104.9 \pm 3.5\%$, $n = 16$) (рис. 1). На этом фоне ингибиторные эф-

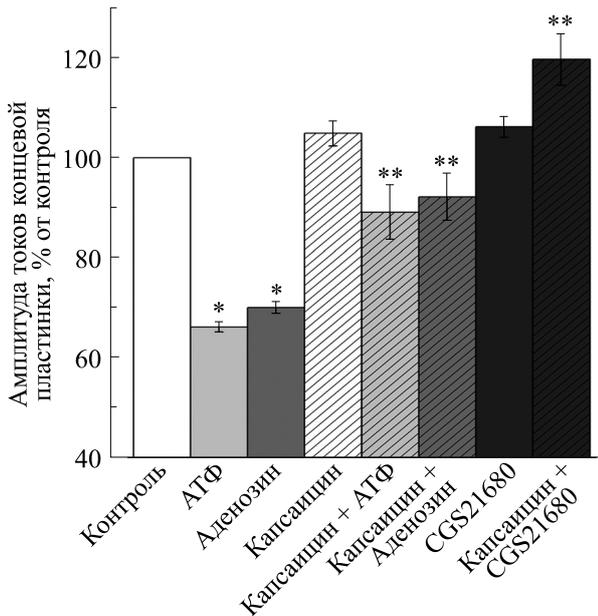


Рис. 1. Влияние капсаицина и агонистов пуриновых рецепторов на амплитуду многоквантовых токов концевой пластинки мионеврального препарата *m. sartorius* озерной лягушки. Результаты представлены в виде $M \pm m$ в % от исходных величин, принятых за 100%; * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем, ** – $p < 0.05$ по сравнению с базовыми эффектами АТФ, аденозина или CGS21680.

фекты обоих пуринов оказались значительно снижены. Так, после 15 мин аппликации 100 мкМ АТФ в этих условиях наблюдалось снижение амплитуды ТКП только лишь до $89.1 \pm 5.4\%$ ($n = 8$, $p < 0.05$).

Аденозин на фоне 10 нМ капсаицина снижал амплитуду ТКП до $92.2 \pm 4.7\%$ ($n = 8$, $p < 0.05$) (рис. 1). В этих модифицированных условиях отмывка от пуринов полностью реализовывалась.

Эксперименты с CGS21680. Наконец, решая вопрос, через какие из двух задействованных в норме пресинаптических аденозиновых рецепторных путей (A_1 или A_2) [16] задействованы в наблюдаемом на фоне капсаицина снижении эффекта аденозина, мы провели анализ вещества, мобилизирующего активность рецепторов аденозина в присутствии капсаицина.

Для этого было изучено действие агониста одного из подтипов (A_{2A}) аденозиновых рецепторов CGS21680 (N6-замещенный аналог NECA) [17]. В отличие от аденозина, CGS21680 в концентрации 10 нМ не только не подавлял амплитуду ТКП, но даже вызывал ее небольшое повышение – до $106.9 \pm 2.1\%$ от контроля ($n = 5$) (рис. 1).

На пресинаптической мембране существуют A_1 - и A_2 -типы аденозиновых рецепторов, причем активация первых приводит к ингибированию

амплитуды ТКП, в то время как активация вторых – к противоположному эффекту [16]. Если отмеченное нами ранее нивелирование капсаицином депрессорного действия аденозина связано с ингибированием непосредственно A_1 -сигнализации, то эффект CGS21680 должен соответственно модифицироваться на фоне капсаицина.

Чтобы проверить это, в следующей серии экспериментов мы апплицировали 10 нМ CGS21680 в присутствии 10 нМ капсаицина. В этом случае под действием CGS21680 амплитуда ТКП увеличивалась уже до $119.7 \pm 5.2\%$ ($n = 7$, $p < 0.05$) (рис. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

Капсаицин является мощным модулятором клеточной активности и межклеточных взаимодействий [1]. Отмечено его разноплановое влияние на активность Ca^{2+} -каналов L-, N- и T-типа [18, 19]. Не участвует ли кальциевая компонента в обнаруженном модулировании базового эффекта аденозина на фоне капсаицина? Но это противоречило бы литературным данным, которые подчеркивают кальций-независимость синаптических эффектов этого пурина [7, 8].

Как известно, капсаицин – блокатор быстрых K^+ -каналов А-типа [20–22]. Так, было обнаружено обратимое дозозависимое ингибирование капсаицином тока через данный подтип калиевых ионных каналов в чувствительном ганглии тройничного нерва крыс [21]. А-тип калиевых каналов – это калиевые каналы, которые активируются деполяризацией, особенно после периода гиперполяризации, и затем быстро инактивируются, обычно в пределах 1–100 мс. Токи, соответствующие этому типу каналов, впервые были выделены авторами работы [23], которые назвали их А-токами. Калиевые А-каналы функционируют в различных нейронах, регулируя пачечную ритмическую активность, определяют задержку спайков и в некоторых случаях участвуют в реполяризации мембраны после потенциала действия. Ранее мы показали, что во многих тканях аденозиновые P_1 -рецепторы сопряжены с K^+ -каналами [7]. Более того, было найдено, что пресинаптическое действие аденозина на функциональное состояние скелетных мышц, складывающееся из активации аденозиновых A_1 -рецепторов, сопряженных с А-типом калиевых каналов, и A_{2A} -рецепторов, приводит к результирующему ингибиторному эффекту на амплитуду токов концевой пластинки и силу сокращения [7, 8].

В представляемых нами в этой статье данных показано (рис. 2), что нивелирование капсаицином депрессорного действия аденозина связано с

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Проведенные эксперименты полностью соответствуют действующим национальным и международным нормам в области этики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Caterina M. J., Schumacher M. A., Tominaga M., Rosen T. A., Levine J. D., and Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, **389** (6653), 816–824 (1997). DOI: 10.1038/39807
- Caterina M. J., Rosen T. A., Tominaga M., Brake A. J., and Julius D. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature*, **398**, 436–441 (1999). DOI: 10.1038/18906
- Золотарев В. А. и Ноздрачев А. Д. Капсаицин-чувствительные афференты блуждающего нерва. *Росс. Физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, **87** (2), 182–204 (2001).
- Burnstock G. Purine and purinergic receptors. *Brain Neurosci. Adv.*, **2**, Art. 2398212818817494 (2018). DOI: 10.1177/2398212818817494
- Kwak J., Wang M. H., Hwang S. W., Kim T. Y., Lee S. Y., and Oh U. *J. Neurosci.*, **20** (22), 8298–8304 (2000). DOI: 10.1523/JNEUROSCI.20-22-08298.2000
- Burnstock G. Introduction to Purinergic Signalling in the Brain. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1202**, 1–12 (2020). DOI: 10.1007/978-3-030-30651-9_1
- Ziganshin A. U., Khairullin A. E., Hoyle C. H. V., and Grishin S. N. Modulatory Roles of ATP and Adenosine in Cholinergic Neuromuscular Transmission. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 6423 (2020). DOI: 10.3390/ijms21176423
- Burnstock G., Arnett T. R., and Orriss I. R. Purinergic signalling in the musculoskeletal system. *Purinergic Signal.*, **9** (4), 541–572 (2013). DOI: 10.1007/s11302-013-9381-4
- Khairullin A. E., Ziganshin A. U., and Grishin S. N. The Influence of Hypothermia on Purinergic Synaptic Modulation in the Rat Diaphragm. *Biophysics*, **65** (5), 858–862 (2020). DOI: 10.1134/S0006350920050085
- Khairullin A. E., Teplov A. Y., Grishin S. N., Farkhutdinov A. M., Ziganshin A. U. The Thermal Sensitivity of Purinergic Modulation of Contractile Activity of Locomotor and Respiratory Muscles in Mice. *Biophysics*, **64** (5), 812–817 (2019). DOI: 10.1134/S0006350919050075
- Voets T., Droogmans G., Wissenbach U., Janssens A., Flockerzi V., and Nilius B. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature*, **430** (7001), 748–754 (2004). DOI: 10.1038/nature02732
- Jin Y. H., Bailey T. W., Li B. Y., Schild J. H., and Andresen M. C. Purinergic and vanilloid receptor activation releases glutamate from separate cranial afferent terminals in nucleus tractus solitarius. *J. Neurosci.*, **24** (20), 4709–4717 (2004). DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0753-04.2004
- Nakatsuka T., Furue H., Yoshimura M., and Gu J. G. Activation of central terminal vanilloid receptor-1 receptors and alpha beta-methylene-ATP-sensitive P2X receptors reveals a converged synaptic activity onto the deep dorsal horn neurons of the spinal cord. *J. Neurosci.*, **22** (4), 1228–1237 (2002). DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-04-01228.2002
- Fattori V., Hohmann M. S. N., Rossaneis A. C., Pinho-Ribeiro F. A., and Verri W. A. Capsaicin: Current Understanding of Its Mechanisms and Therapy of Pain and Other Pre-Clinical and Clinical Uses. *Molecules*, **21**, 844. (2016). DOI: 10.3390/molecules21070844
- Thyagarajan B., Potian J. G., Baskaran P., and McArdle J. J. Capsaicin modulates acetylcholine release at the myoneural junction. *Eur. J. Pharmacol.*, **744**, 211–219 (2014). DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.09.044
- Correia-de-Sá P., Timóteo M. A., and Ribeiro J. A. Presynaptic A1 inhibitory/A2A facilitatory adenosine receptor activation balance depends on motor nerve stimulation paradigm at the rat hemidiaphragm. *J. Neurophysiol.*, **76** (6), 3910–3919 (1996). DOI: 10.1152/jn.1996.76.6.3910
- Burnstock G., Purine and pyrimidine receptors. *Cell. Mol. Life Sci.*, **64** (12), 1471–1483 (2007). DOI: 10.1007/s00018-007-6497-0
- Hagenacker T., Spletstoeser F., Greffrath W., Treede R. D., and Büsselberg D. Capsaicin differentially modulates voltage-activated calcium channel currents in dorsal root ganglion neurones of rats. *Brain Res.*, **1062** (1–2), 74–85 (2005). DOI: 10.1016/j.brainres.2005.09.033
- Hagenacker T. and Büsselberg D. Modulation of intracellular calcium influences capsaicin-induced currents of TRPV-1 and voltage-activated channel currents in nociceptive neurones. *J. Peripher. Nerv. Syst.*, **12** (4), 277–284 (2007). DOI: 10.1111/j.1529-8027.2007.00149.x
- Shimizu T., Majima T., Suzuki T., Shimizu N., Wada N., Kadekawa K., Takai S., Takaoka E., Kwon J., Kanai A. J., de Groat W. C., Tyagi P., Saito M., and Yoshimura N. Nerve growth factor-dependent hyperexcitability of capsaicin-sensitive bladder afferent neurones in mice with spinal cord injury. *Exp. Physiol.*, **103** (6), 896–904 (2018). DOI: 10.1113/EP086951
- Yang R., Xiong Z., Liu C., and Liu L. Inhibitory effects of capsaicin on voltage-gated potassium channels by TRPV1-independent pathway. *Cell Mol. Neurobiol.*, **34** (4), 565–576 (2014). DOI: 10.1007/s10571-014-0041-1
- Kuenzi F. M. and Dale N. Effect of capsaicin and analogues on potassium and calcium currents and vanilloid receptors in *Xenopus* embryo spinal neurones. *Br. J. Pharmacol.*, **119** (1), 81–90 (1996). DOI: 10.1111/j.1476-5381.1996.tb15680.x
- Connor J. A. and Stevens C. F. Prediction of repetitive firing behaviour from voltage clamp data on an isolated

- neurone soma. *J. Physiol.*, **213**, 31–53 (1971). DOI: 10.1113/jphysiol.1971.sp009366
24. Khairullin A. E., Grishin S. N., and Ziganshin A. U. Presynaptic Purinergic Modulation of the Rat Neuro-Muscular Transmission. *Curr. Issues Mol. Biol.*, **45**, 8492–8501 (2023). DOI: 10.3390/cimb45100535
25. Prescott E. D. and Julius D. A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science*, **300** (5623), 1284–1288 (2003). DOI: 10.1126/science.1083646
26. Kim J. A., Kang Y. S., and Lee Y. S. A phospholipase C-dependent intracellular Ca^{2+} release pathway mediates the capsaicin-induced apoptosis in HepG2 human hepatoma cells. *Arch. Pharm. Res.*, **28** (1), 73–80 (2005). DOI: 10.1007/BF02975139
27. Thyagarajan B., Krivitskaya N., Potian J. G., Hognason K., Garcia C. C., McArdle J. J., Capsaicin protects mouse neuromuscular junctions from the neuroparalytic effects of botulinum neurotoxin *a*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **331**, 361–371 (2009). DOI: 10.1124/jpet.109.156901

Peculiarities of Purinergic Modulation of Myoneural Transmission in Presence of Capsaicin

A.E. Khairullin*, **, M.A. Mukhamedyarov*, R.D. Mukhamedzyanov*, N.M. Kashtanova*, E.N. Zhivotova*, G.G. Suchkova*, A.R. Shaikhutdinova*, A.A. Ereemeev*, and S.N. Grishin*

*Kazan State Medical University, ul. Butlerova 49, Kazan, 420012 Russia

**Kazan Federal University, Kremlevskaya ul. 18, Kazan, 420008 Russia

This study aimed to investigate myoneural transmission in the presence of capsaicin that acts as an “integrator of painful stimuli and causes heat sensation”. The effects of purines such as ATP and adenosine that participate in synaptic transmission in presence of capsaicin have been explored. When the muscle-nerve preparation of frog was perfused with solution containing capsaicin, the inhibitory effects of both purines were significantly reduced. A reduction of the depressant effects of adenosine is associated with the inhibition of A_1 signaling, since the A_{2A} receptor agonist CGS21680 showed pronounced, almost completely hidden in the control, potentiating effect in presence of capsaicin. Our findings suggest that the known neuroprotective effect of capsaicin is primarily due to elimination of inhibition by endogenous purines of the induced quantum output of the neurotransmitter.

Keywords: capsaicin, ATP, adenosine, neuromuscular synapse, A-type potassium channels, induced quantum secretion