

**PN2 164/1.10.2007 Conf. Dr. Alexandru Babes**

Titlul proiectului:

**MECANISMELE PERIFERICE ALE DURERII INFLAMATORII: ROLUL  
CANALELOR ACTIVATE DE TEMPERATURILE EXTREME, TRPA1 SI  
TRPV2**

Director proiect: Conf. Dr. Alexandru Babes, Universitatea din Bucuresti  
Faza unica 2007 – Sinteza lucrării

Obiectivele proiectului de fata pe anul 2007 au constat în pregătirea modelului experimental pentru studiul activității canalelor TRP, și mai precis TRPV2 și TRPA1, în condiții inflamatorii. Durerea inflamatorie este un tip de durere cronică asociat cu lezarea tesuturilor periferice și cu eliberarea unei diversități de mediatori precum bradikinină (BK), prostaglandinele E2 (PGE2) și I2 (PGI2), histamina, serotonina, factorul de creștere neuronal (NGF – nerve growth factor), alți factori neurotrofici, o serie de chemokine și citokine, ATP, ioni de K<sup>+</sup> și aciditate tisulară. Unii dintre acești mediatori au proprietatea de a activa direct terminațiile cutanate ale neuronilor senzitivi implicați în detectia stimulilor dureroși (nociceptori), în timp ce alți mediatori duc la sensibilizarea nociceptorilor, adică la scăderea pragului lor de activare, fără a iniția direct activarea acestora. Scopul studiului nostru este înțelegerea mecanismelor prin care anumiți mediatori inflamatori își exercită efectul de sensibilizare a nociceptorilor prin influențarea activității unor canale ionice din familia TRP, precum TRPV2 și TRPA1 (Caterina et al., 2007). Terminațiile cutanate ale nociceptorilor exprimă mai multe canale din familia TRP, activate de o diversitate de stimuli termici (TRPV1, TRPV2, TRPM8, posibil TRPA1), chimici (TRPV1, TRPA1) sau mecanici (TRPA1, posibil TRPV2). Dintre acestea, TRPV2 și TRPA1 prezintă un interes deosebit, fiind printre cel mai puțin studiate canale din familia TRP (Levine, 2007). Unul dintre obiectivele proiectului nostru este să evidențiem maniera în care anumiți mediatori inflamatori (în particular BK, PGE2 și NGF, dar și alții) modifică nivelul de exprimare și proprietățile biofizice ale acestor canale. Se știe deja că BK activează TRPA1 dar mecanismul implicat nu a fost încă elucidat. Astfel, s-a sugerat pe de o parte o implicare a fosfolipazei C (PLC), a cărei activare sub acțiunea BK ar duce la formarea de diacil glicerol (DAG), care ar activa TRPA1 printr-o interacție directă (Bandell et al., 2004). Pe de altă parte, s-a emis și ipoteza conform căreia la activarea TRPA1 sub acțiunea BK ar contribui și activarea TRPV1 și influxul de calciu prin acest canal, știindu-se că TRPA1 este activat la creșterea concentrației intracelulare de ioni de calciu. Interacțiunea TRPA1 cu alți mediatori inflamatori nu a fost încă studiată. În ceea ce privește canalul TRPV2, informațiile legate de activitatea acestuia în neuronii senzitivi sunt încă și mai puțin decât în cazul TRPA1. Astfel, în timp ce pentru celelalte canale TRP termo-sensibile (TRPV1, 3, 4, TRPM8 și TRPA1) au fost generați deja soareci în care genele respective au fost inactivate (soareci knockout), pentru TRPV2 un astfel de model nu există încă, motiv pentru care fiziologia și patofiziologia acestui canal nu sunt încă pe deplin înțelese. Studii recente întreprinse în laboratorul nostru în colaborare cu Institutul de Fiziologie și Fiziopatologie Experimentală de la Universitatea din Erlangen (Leffler et al., 2007) au adus informații noi cu privire la mecanismul activării acestui canal la temperaturi

crescute (>52 °C) și la farmacologia acestuia (s-a pus în evidență un efect blocant al cationilor trivalenți asupra TRPV2).

Într-o primă fază a proiectului nostru am întreprins o optimizare a modelului experimental folosit pentru studiul canalelor ionice implicate în nocieptie, și anume cultura primară de neuroni senzitivi din ganglionii spinali de sobolan (Baccaglini & Hogan, 1983), precum și a instalației experimentale utilizate pentru activarea termică a neuronilor în cultura (Reid et al., 2001). Un aspect important al modelului folosit constă în influența mediului de cultura, și în special al serului de cal, asupra proprietăților nocieptivilor (nivel de exprimare și co-exprimare al diferitelor canale ionice, proprietățile biofizice ale acestora, etc...). Din acest motiv, pentru obținerea unor condiții control cât mai reproductibile, am trecut la cultivarea neuronilor din ganglionii spinali în mediu fără ser, folosind o rețetă preluată după Bottenstein & Sato, 1979. Culturile realizate în aceste condiții au evidențiat o bună supraviețuire a neuronilor, fără alterări morfologice. Am testat efectul folosirii serului de cal în cultura primară asupra exprimării și co-exprimării a trei canale TRP distincte, și anume TRPM8, TRPA1 și TRPV1, prin monitorizarea răspunsului neuronilor la trei agonisti ai acestor canale: mentolul (1 mM), uleiul de mustar (sau alil-izotiocianatul, AITC, 500 μM) și capsaicina (2 μM). Dintre acești compuși capsaicina și AITC sunt specifici pentru TRPV1 și respectiv TRPA1, fapt dovedit de studiile realizate pe soarecii knockout pentru TRPV1 (Davis et al., 2000; Caterina et al., 2000) și cei knockout pentru TRPA1 (Kwan et al., 2006; Bautista et al., 2006). Mentolul nu este un agonist specific pentru TRPM8, el activând și TRPA1 (Karashima, 2007) la concentrații de ordinul zecilor și sutelor de micromolari. Cu toate acestea, aceiași autori (Karashima et al., 2007) au arătat că la o concentrație de 1 mM mentolul inhibă activitatea TRPA1 dar rămâne un activator al TRPM8, deci la această concentrație răspunsurile neuronilor reflectă evident activarea TRPM8 și deci putem considera mentolul un agonist specific pentru acest din urmă canal. Studiile noastre au arătat că prezența serului de cal inhibă exprimarea TRPA1, numărul neuronilor care au răspuns la aplicarea de AITC fiind semnificativ mai mic decât în absența serului de cal (1 din 37, în comparație cu 7 din 42 în absența serului,  $p = 0,04$ , testul  $\chi^2$ ). De asemenea, exprimarea canalului TRPV1 pare să fie și ea inhibată în prezența serului de cal, condiție în care 19 neuroni din 37 au răspuns la aplicarea de capsaicină (51%). În absența serului de cal au răspuns la capsaicină 32 de neuroni din 42 (76%,  $p = 0,02$ , testul  $\chi^2$ ). În ceea ce privește TRPM8, nivelul de exprimare al acestui canal nu a fost influențat de prezența serului de cal (au răspuns la mentol 7 neuroni din 37 în prezența și 6 neuroni din 42 în absența serului de cal, diferența fiind nesemnificativă din punct de vedere statistic). Din punct de vedere al amplitudinii răspunsurilor neuronale la diferiții agonisti ai canalelor TRP folosite nu s-au înregistrat diferențe semnificative din punct de vedere statistic (testul  $t$  al lui Student). Aceste rezultate sugerează că prezența serului de cal în mediul de cultura influențează caracteristicile funcționale ale neuronilor din ganglionii spinali în cultura primară, și deci se impune folosirea unui mediu fără ser pentru a pune în evidență efectul unor mediatori inflamatori sau al unor factori neurotrofici asupra activității canalelor ionice din familia TRP.

Un alt obiectiv al studiului nostru este identificarea și caracterizarea unor compuși naturali sau de sinteză cu potențial efect analgezic sau/si anti-inflamator. În cadrul

colaborării cu Institutul National de Microbiologie și Imunologie Cantacuzino din București am testat efectele unor compuși extrasi din rădăcinile de *Helleborus purpurascens* asupra activității unor canale ionice din familia TRP exprimate în neuronii senzitivi din ganglionii spinali în cultura primară. Substanțele extrase din *Helleborus* s-au dovedit a avea o serie de efecte anti-inflamatoare și imunosupresive, fiind folosite de mult timp în medicina tradițională în regiunea Balcanilor. Dintre compușii testați am identificat o substanță (MCS-18A) cu efect inhibitor asupra receptorului pentru capsaicină TRPV1. Modelul experimental folosit a fost cel al culturii primare de neuroni din ganglionii spinali, iar tehnica experimentală a fost microfluorimetria de calciu (sau imagistica de calciu). Microfluorimetria de calciu constă în încărcarea celulelor cu un indicator fluorescent pentru calciu, în cazul nostru Calcium Green-1 AM. În urma incubării neuronilor cu acest indicator, în prezența unui agent care facilitează solubilizarea acestuia (Pluronic), Calcium Green-1 este preluat în citoplasma neuronală unde suferă o reacție de dezesterificare în urma căreia capătă sarcină electrică și nu mai poate traversa membrana celulară, fiind astfel acumulat în concentrație crescută în citosol. Celulele sunt apoi stimulate termic sau chimic, folosind diferiți agonisti ai canalelor implicate în nocicepție, ceea ce duce la apariția unui influx de calciu prin membrana plasmatică și deci la creșterea concentrației citoplasmatică a ionilor de calciu în celulele activate. Această creștere a concentrației intracelulare de calciu ( $[Ca^{2+}]_i$ ) duce la modificarea spectrului de emisie fluorescentă al Calcium Green-1 prin creșterea intensității de emisie la lungimi de undă mai mari de 520 nm. Folosind un sistem de achiziție de imagine se poate monitoriza cantitativ în timp real emisia fluorescentă a indicatorului Calcium Green-1 într-un număr de neuroni în cultura și modificarea acesteia sub acțiunea unor stimuli chimici sau termici. Am testat doi compuși, NCSA și MCS-Ab-162, ambii extrasi din rădăcinile de *Helleborus purpurascens*.

## **Compusul NCSA – rezultate preliminare**

### *A. Tehnica folosită: imagistica (microfluorimetria) de calciu*

#### *B. Protocol:*

- a) control – celulele au fost expuse de 5 ori la interval de 3 sau 4 minute la o concentrație de 300 nM capsaicină (10 secunde). În final s-a optat pentru un interval de 4 min între stimulările cu capsaicină (Fig. 1).
- b) experimentele cu NCSA – înainte de a treia stimulare cu capsaicină s-a aplicat compusul NCSA la o concentrație de 24 μg/ml (diluție 1/1000 a soluției stoc), timp de 1 min, iar a treia aplicare de capsaicină s-a efectuat în prezența NCSA. S-a revenit apoi la soluție extracelulară standard și s-a continuat stimularea cu capsaicină (de încă două ori cu excepția unui experiment în care s-a mai aplicat capsaicină o singură dată).

#### *C. Rezultate*

1. Control Au fost puse în evidență două tipuri majore de celule sensibile la capsaicină (300 nM). O parte din celule au răspuns cu o creștere substanțială a concentrației intracelulare de calciu, după care s-au desensibilizat și nu au mai răspuns la aplicările

ulterioare de capsaicina (grupul A). O a doua categorie de celule, desi au prezentat o anumita desensibilizare, au continuat sa raspunda si la stimularile urmatoare. Aproape toate celulele care au raspuns la primele doua aplicari de capsaicina au continuat sa raspunda si la urmatoarele stimulari (grupul B).

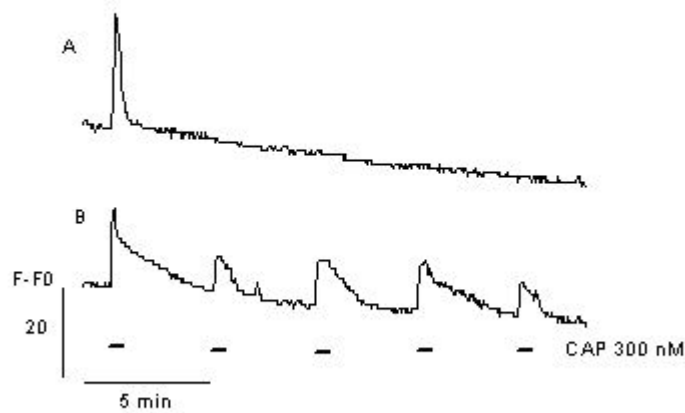


Fig. 1. Exemple de celule din grupurile A si B.

2. NCSA a sensibilizat puternic raspunsul la capsaicina în cazul celulelor din grupul B (care au raspuns la primele doua aplicari de capsaicina) în toti cei trei neuroni testati (Fig. 2). În doua dintre aceste celule sensibilizarea a fost urmata de o desensibilizare prelungita (absenta raspunsului la stimulare ulterioara cu capsaicina).

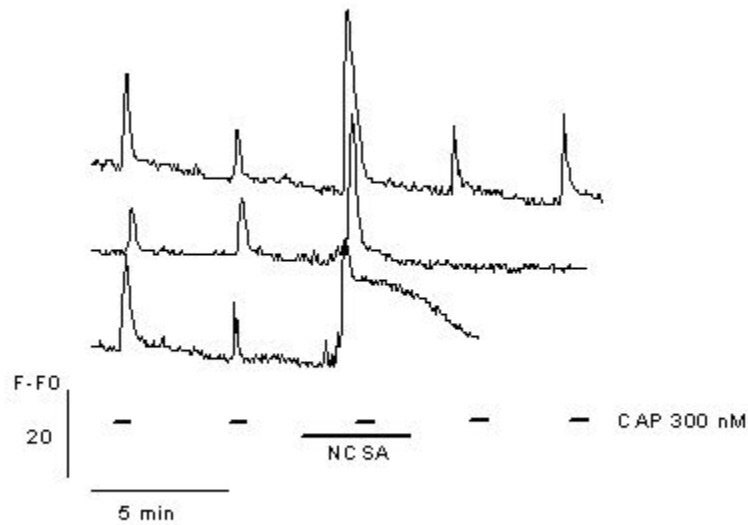


Fig. 2. Trei neuroni în care NCSA a sensibilizat raspunsul la capsaicina.

Figura 3 prezinta analiza statistica a experimentelor ilustrate în figura 2. Au fost folositi în analiza 3 neuroni asupra carora s-a aplicat capsaicina în prezenta compusului NCSA si 5 neuroni înregistrati în conditii control.

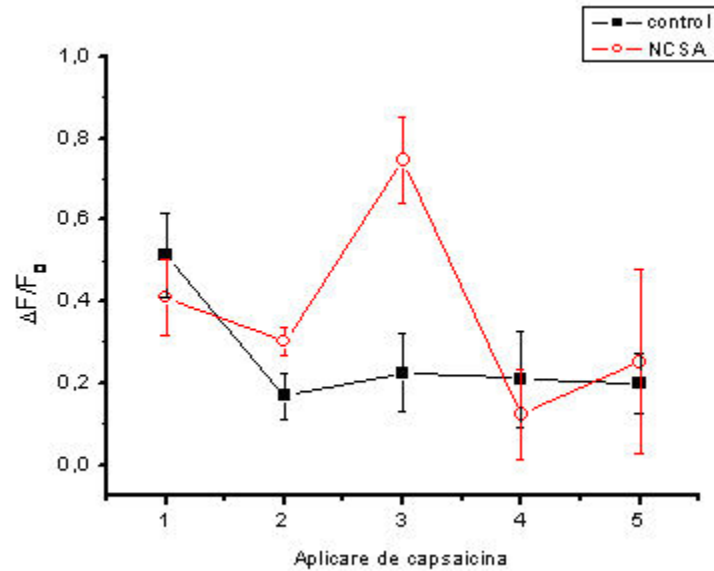


Fig. 3. Statistica (preliminara) a efectului NCSA asupra neuronilor din grupul B ( control n = 5; NCSA n = 3).

3. NCSA a determinat reaparitia sensibilitatii la capsaicina la celulele din grupul A, precum si raspunsuri la capsaicina la celule initial insensibile (figura 4).

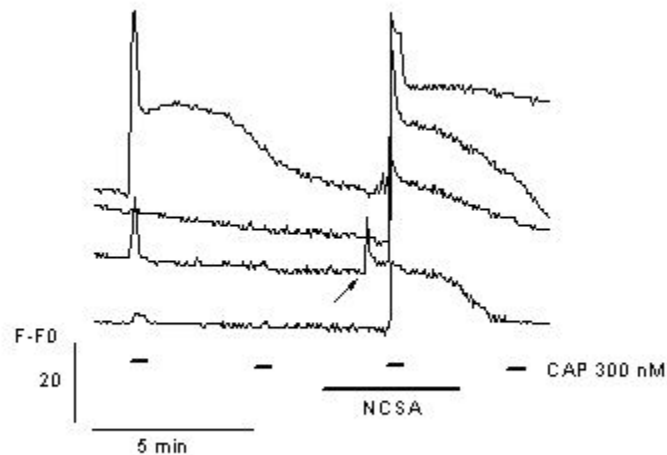


Fig. 4. Trei neuroni din grupul A care au raspuns din nou la capsaicina în urma tratarii cu NCSA si un neuron initial insensibil care a raspuns la capsaicina dupa aplicarea de NCSA. Se poate observa ca un neuron prezinta o crestere a concentratiei de calciu la aplicarea de NCSA (sageata).

#### D. Concluzii (preliminare)

NCSA pare sa induca o sensibilizare puternica a raspunsului la capsaicina. Este posibil ca aceasta sensibilizare sa fie urmata de instalarea unei perioade de desensibilizare, dar acest aspect trebuie investigat în continuare.

### Compusul MCS-Ab-162 – antagonist al receptorului TRPV1

#### A. Tehnica folosita: imagistica (microfluorimetria) de calciu

#### B. Protocol:

- control – celulele au fost expuse de 5 ori la interval de 4 minute la o concentratie de 300 nM capsaicina timp de 15 secunde (Fig.1).
- experimentele cu MCS-Ab-162 – înaintea celei de-a treia stimulari cu capsaicina s-a aplicat compusul la o concentratie de 1  $\mu$ g/ml (dilutie 1/1000 a solutiei stoc), timp de 2 min, iar a treia aplicare de capsaicina s-a efectuat în prezenta MCS-Ab-162. S-a revenit apoi la solutie extracelulara standard si s-a continuat stimularea cu capsaicina de înca doua ori.

#### C. Rezultate

MCS-Ab-162 a inhibat puternic raspunsul la capsaicina în cazul celulelor din grupul B (care au raspuns la primele doua aplicari de capsaicina, vezi figura 1) în toti cei opt neuroni testati (Fig. 5).

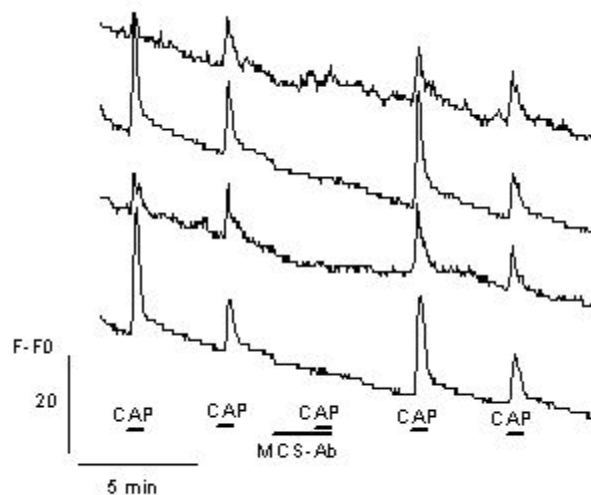


Fig. 5. Patru neuroni în care MCS-Ab-162 a inhibat raspunsul la capsaicina.

Figura 6 prezinta statistica experimentelor ilustrate în Fig. 5. Grupul de control (n = 5 neuroni) este același ca și cel reprezentat în Fig. 3. Compusul MCS-Ab-162 a fost testat pe 8 neuroni sensibili la capsaicina.

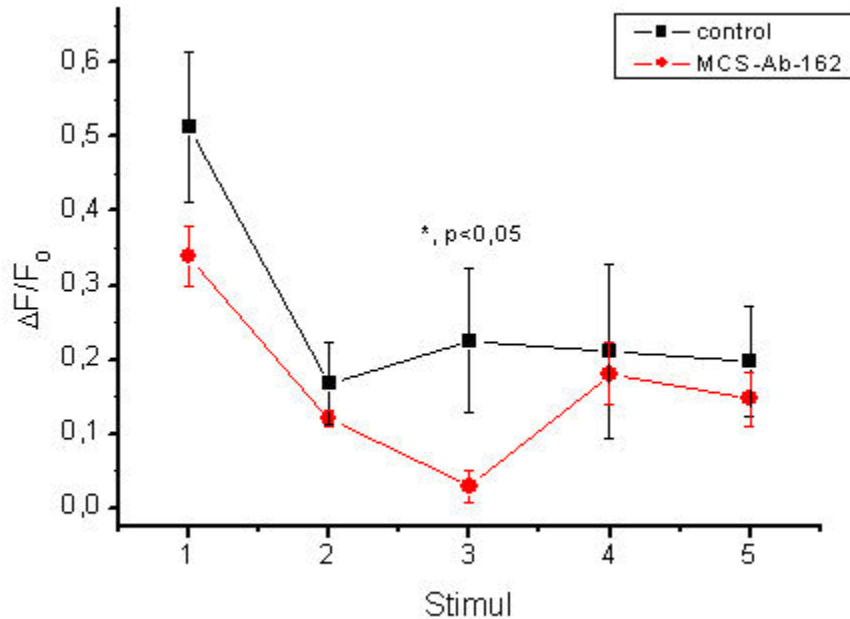


Fig. 6. Statistica efectului MCS-Ab-162 asupra neuronilor din grupul B ( control n = 5; MCS-Ab-162 n = 8). \* - diferenta semnificativa statistic (Student's t test, p<0,05).

#### D. Concluzii

MCS-Ab-162 (1 μg/ml) inhiba practic complet raspunsul la capsaicina (300 nM) mediat de receptorul TRPV1.

#### Referinte bibliografice

- Baccaglini, P. I. & P. G. Hogan (1983). "Some rat sensory neurons in culture express characteristics of differentiated pain sensory cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80(2): 594-598.
- Bandell, M., et al. (2004). "Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin." *Neuron* 41(6): 849-57.
- Bautista, D. M., et al. (2006). "TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents." *Cell*. 124(6): 1269-82.
- Bottenstein, J. E. & G. H. Sato (1979). "Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76(1): 514-517.
- Caterina, M. J., et al. (2000). "Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor." *Science* 288(5464): 306-313.
- Caterina, M. J. (2007). "Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*

292(1): R64-76.

Davis, J. B., et al. (2000). "Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia." *Nature* 405(6783): 183-187.

Karashima, Y., et al. (2007). "Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1." *J Neurosci.* 27(37): 9874-84.

Kwan, K. Y., et al. (2006). "TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction." *Neuron.* 50(2): 277-89.

Leffler, A., et al. (2007). "A high-threshold heat-activated channel in cultured rat dorsal root ganglion neurons resembles TRPV2 and is blocked by gadolinium." *Eur J Neurosci.* 26(1): 12-22. Epub 2007 Jun 26.

Levine, J. D. & N. Alessandri-Haber (2007). "TRP channels: Targets for the relief of pain." *Biochim Biophys Acta.*

Reid, G., et al. (2001). "A system for applying rapid warming or cooling stimuli to cells during patch clamp recording or ion imaging." *J. Neurosci. Meth.* 111(1): 1-8.