

1. Efecte acute şi cronice ale BDNF şi GDNF asupra activării canalelor termoTRP

Introducere

Neurotrofinele reprezintă o familie de proteine cu rol în supravieţuirea, dezvoltarea şi funcţionarea neuronilor. Neurotrofinele fac parte din clasa factorilor de creştere şi asigură supravieţuirea neuronilor prin prevenirea iniţierii morţii celulare; de asemenea, au rol în diferenţierea celulelor progenitoare pentru a forma neuroni şi în diferenţierea neuronilor în cursul dezvoltării. În organismul adult, neurotrofinele au rol în semnalizarea celulară şi sunt mediatori şi modulatori ai durerii inflamatorii. Implicarea neurotrofinelor (NTF) în percepţia durerii este bine cunoscută, foarte bine documentată fiind neurotrofina NGF (nerve growth factor) şi rolul său pro-algezic (Nicol, Vasko, 2007; Pezet, McMahon, 2006). Neurotrofinele sunt importante în dezvoltare, fiind esenţiale pentru supravieţuirea şi diferenţierea neuronilor, atât în sistemul nervos periferic, cât şi în sistemul nervos central. Sunt importante şi în organismul adult, unde îndeplinesc rol de molecule de semnalizare inducând modificări fenotice ale neuronilor ca răspuns la stimuli nocivi sau leziuni ale sistemului nervos (Sah et al., 2003). Scopul acestui studiu a fost evaluarea efectelor expunerii cronice (12-24h) şi acute ale BDNF şi GDNF asupra neuronilor senzitivi din DRG, în special asupra canalelor ionice TRPM8, TRPA1 şi TRPV1. Toţi aceşti receptori sunt implicaţi în semnalizarea durerii periferice şi sunt modulaţi de o serie de agenţi pro-inflamatori.

Rezultate

1.1. Co-exprimarea canalelor termoTRP, în neuroni DRG, pe baza sensibilităţii la frig şi mentol, AITC şi capsaicină

Există o controversă în ceea ce priveşte gradul de co-exprimare a canalelor termoTRP în neuronii senzitivi, în special în cazul co-exprimării dintre TRPM8 şi TRPA1 sau TRPV1. În culturi primare de neuroni DRG, în mediu fără ser şi fără factori neurotrofici (în cazul grupului de control), am identificat câteva populaţii majore de neuroni, pe baza sensibilităţii la stimulii folosiţi. Am aplicat frig şi mentol pentru a identifica neuronii care exprimă TRPM8, capsaicină, un agonist specific pentru TRPV1 şi alilizotiocianat, activator al TRPA1. Astfel, în grupul de control, procentul de neuroni CMS, exprimând cel mai probabil TRPM8, a fost de 9,2% (47 din 513 neuroni). Pragul termic de activare al acestei populaţii a fost de $25,8 \pm 0,5$ °C (n = 47). În plus, faţă de această populaţie, 5 celule au fost activate de frig dar au fost insensibile la mentol şi nu au fost incluse în grupul de neuroni CMS. Dintre cei 47 de neuroni CMS, 25 (53.2%) au fost direct activaţi de mentol 100 µM iar restul de 22 au fost sensibilizaţi în prezenţa mentolului. În grupul de control, 27,5% (141 din 513) dintre neuroni au fost sensibili la AITC (cel mai probabil exprimă TRPA1) şi 60,8% (312/513) au fost activaţi de capsaicină (exprimă TRPV1).

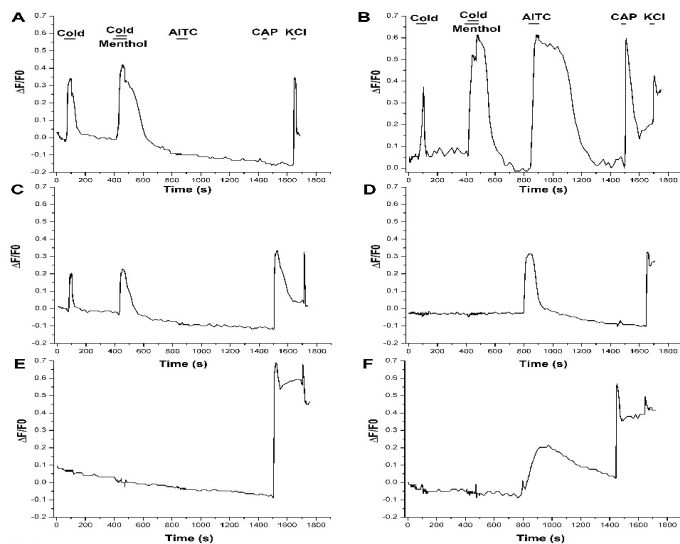


Fig. 3

Fig 1. Exemple reprezentative ale principalelor tipuri de răspunsuri la agoniști ai canalelor termoTRP. **A.** Neuron CMS insensibil la AITC și CAP. **B.** Neuron CMS sensibil atât la AITC cât și la CAP. **C.** Neuron CMS activat de CAP dar nu de AITC. **D.** Neuron sensibil doar la AITC. **E.** Neuron sensibil doar la CAP. **F.** Neuron sensibil la AITc și CAP dar nu la frig și mentol.

În ceea ce privește suprapunerea populațiilor identificate, chiar și în absența factorilor neurotrofici, mai mult de jumătate dintre neuronii CMS au fost activați atât de AITC (53,2%, 25/47) cât și de CAP (53.2%, 25/47), în acord cu date anterioare ale grupului nostru (Babes et al., 2004, 2006; Linte et al., 2007). Marea majoritate a neuronilor activați de AITC au fost sensibili și la capsaicină (122/141, 86.5%) și așa cum era de așteptat, o parte din neuronii sensibili la CAP au răspuns și la AITC (39,1%, 122 din 312 neuroni).

1.2. Tratamentul cronic cu BDNF crește sensibilitatea la capsaicină și mentol în neuroni DRG de șobolan

Culturile primare de neuroni DRG de șobolan au fost tratate cu BDNF 100 ng/ml timp de 12-24h și apoi analizate cu imagistică de calciu. BDNF a influențat atât proporția de neuroni activați cât și amplitudinea răspunsurilor la unii dintre stimulii testați. Astfel, fracția de neuroni sensibili la capsaicină a crescut semnificativ de la 60,8% în control, până la 75,9% (208/274, χ^2 test, $p < 0,001$, figura 4A), iar amplitudinea medie a răspunsului a crescut atât pentru AITC (de la $0,46 \pm 0,01$, $n = 141$ până la $0,54 \pm 0,02$, $n = 78$, testul t Student, unpaired, $p < 0,01$), cât și pentru capsaicină (de la $0,62 \pm 0,01$, $n = 122$, până la $0,68 \pm 0,01$, $n = 208$, $p < 0,01$). Nivelul de co-exprimare între sensibilitatea la AITC și sensibilitatea la capsaicină a crescut de asemenea, în urma tratamentului cu BDNF, 97,4% (76/78), față de 86.5% în condiții control ($p < 0,01$, figura 4B).

Cu toate că fracția de neuroni sensibili la frig sau amplitudinea răspunsurilor la răcire nu s-au modificat, BDNF a indus o creștere a proporției de neuroni sensibili la mentol de la 13,5% (69/513) până la 19,4% (53/274), $p < 0,05$ (figura 4A). Mai mult, răspunsul la mentol a fost semnificativ mai mare în cazul neuronilor tratați cu BDNF ($0,26 \pm 0,02$, $n = 53$), comparativ cu grupul de control ($0,2 \pm 0,02$, $n = 69$, $p < 0,05$). Această

observație, corelată cu o creștere semnificativă răspunsului la AITC, sugerează că cel puțin o parte din sensibilitatea la mentol ar putea fi mediată de TRPA1, așa cum s-a propus deja (Karashima et al., 2007).

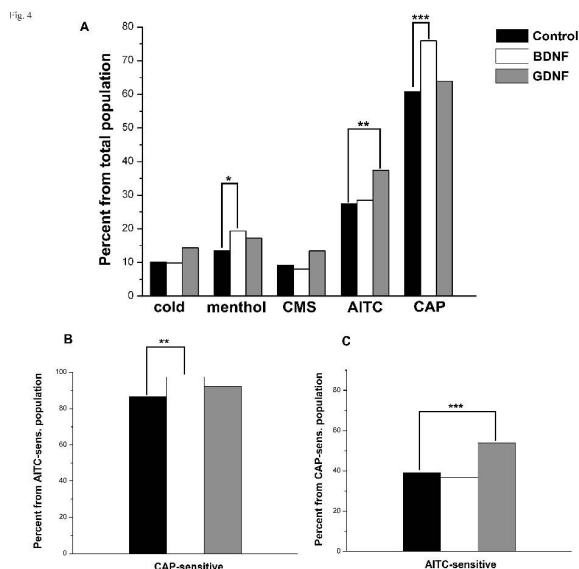


Fig. 2 Efecte ale incubării cronice cu BDNF și GDNF asupra populațiilor neuronale. A. Modificări ale populațiilor CMS, sensibile la frig, mentol, AITC, și CAP, induse de BDNF (alb) și GDNF (gri), comparativ cu controlul (negru). B. Frația de neuroni sensibili la AITC, care răspunde și la CAP a crescut după tratamentul cu BDNF. C. Frația de neuroni sensibili la CAP, care răspunde și la AITC a crescut după tratamentul cu GDNF. Testul χ^2 , * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

1.3. Tratamentul cronic cu GDNF crește fracția de neuroni sensibili la AITC

Neuronii din culturile primare au fost tratați cronic, timp de 12 - 24h cu GDNF 100 ng/ml. Efectele înregistrate pentru această neurotrofină nu au fost la fel de puternice ca în cazul BDNF. GDNF nu a afectat amplitudinile răspunsurilor la frig, mentol, alilizotiocianat sau capsaicină. În schimb, fracția de neuroni sensibili la AITC a crescut semnificativ, după tratamentul cu GDNF, de la 27,5% (141/513) în control, până la 37,4% (117/313) ($p < 0,01$, tabelul 1). De asemenea, a crescut proporția de neuroni sensibili la capsaicină care au răspuns și la AITC (reflectă gradul de co-exprimare funcțională între TRPA1 și TRPV1), de la 39,1% (122/312) în control, până la 54% (108/200, $p < 0,001$, figura 4C).

O altă observație interesantă este faptul că GDNF a indus creșterea fracției de celule, din totalul de neuroni studiați, care co-exprimă TRPM8 și TRPV1 sau TRPM8 și TRPA1. Astfel, în grupul de control, procentul de neuroni CMS activați de capsaicină a fost de 4,87% (25 din 513) din totalul neuronilor, dar a crescut până la 9,58% (30 din 313) după tratamentul cronic cu GDNF ($p < 0,01$, testul chi square), sugerând o creștere a gradului de co-exprimare TRPM8/TRPV1. În condiții control, 4,87% (25 din 513) din totalul neuronilor studiați au fost neuroni CMS sensibili la AITC, iar această populație a crescut până la 8,31% (26/313, $p < 0,05$ testul chi square), după incubare peste noapte cu GDNF, dovadă a creșterii gradului de co-exprimare TRPM8/TRPA1.

1.4. Aplicarea acută a neurotrofinelor previne desensibilizarea nociceptorilor

O altă problemă abordată în cadrul acestui studiu, a fost efectul acut al BDNF și GDNF asupra activării nociceptorilor de către temperaturi ridicate (45 °C) și de către AITC. Un stimul termic de încălzire, constând într-o rampă de la ~ 32 °C până la ~ 45 °C, a fost aplicat înainte și imediat după expunerea neuronilor la BDNF sau GDNF (100 ng/ml, 7 minute). La sfârșitul experimentului celulele au fost stimulate cu capsaicină 2 μM pentru a identifica neuronii care exprimă TRPV1. Acest fapt este susținut de rezultatele obținute, din 122 de neuroni sensibili la căldură înregistrați, marea majoritate (114, 9,4%) au fost activați și de capsaicină, agonist specific pentru TRPV1. În plus, răspunsurile la căldură și la capsaicină au fost puternic corelate (coeficientul de corelație Pearson $r = 0,41$, $p < 0,0001$). În condiții control (fără tratament cu NTF), stimularea repetată cu căldură a indus o tahifilaxie semnificativă: în cadrul populației de neuroni sensibili la CAP, al doilea răspuns la cald a fost mai mic ($0,49 \pm 0,05$ față de $0,33 \pm 0,05$, testul t Student, paired, $p < 0,0001$, $n = 28$, figura 5A și B). În cazul tratamentului cu BDNF, această reducere semnificativă a amplitudinii răspunsului la cald nu se mai observă: $0,48 \pm 0,03$ pentru primul stimul și $0,47 \pm 0,04$ pentru al doilea stimul, (NS, $n = 33$, figura 3A și B). Ca măsură a magnitudinii tahifilaxiei am folosit raportul dintre amplitudinea răspunsului la al doilea stimul termic și amplitudinea răspunsului la primul stimul termic. Rezultatele demonstrează că BDNF a înlăturat desensibilizarea neuronilor sensibili la capsaicină indusă de căldură: raportul în cazul grupului de control a fost $0,68 \pm 0,05$ față de $1,10 \pm 0,13$ pentru grupul tratat cu BDNF (testul t Student, unpaired, $p < 0,01$, figura 5C), desensibilizarea fiind practic înlocuită de o ușoară sensibilizare după tratamentul acut cu neurotrofine.

Rezultate similare au fost obținute și pentru cel de-al doilea factor neurotrofic studiat, GDNF: amplitudinile răspunsurilor la cald înainte și după tratamentul cu GDNF au fost $0,40 \pm 0,03$, respectiv $0,43 \pm 0,03$ (NS, $n = 36$, figura 3A și B). Nu se înregistrează o desensibilizare a neuronilor indusă de stimulare termică repetată, ca în cazul grupului de control ($0,49 \pm 0,07$, respectiv $0,36 \pm 0,07$, $n = 15$, $p < 0,05$). În plus, valoarea raportului dintre cele două amplitudini a fost $1,20 \pm 0,11$ pentru grupul tratat cu GDNF comparativ cu $0,74 \pm 0,1$ în cazul grupului de control ($p < 0,05$, figura 3C).

Fig. 3

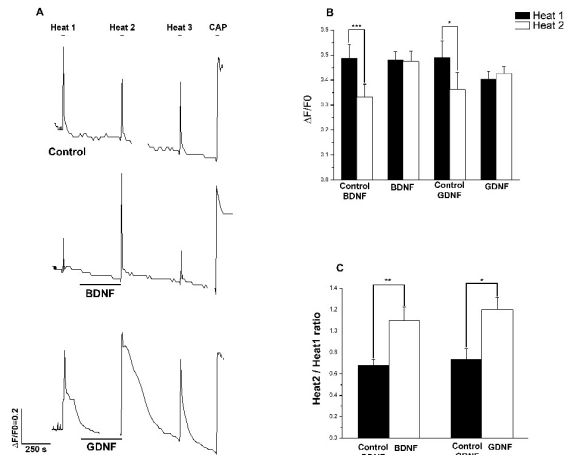


Fig. 3 Aplicarea acută de BDNF sau GDNF previne desensibilizarea răspunsurilor la căldură. **A.** Exemple reprezentative de răspunsuri la căldură (45 °C) și CAP în condiții control (sus), în celule tratate cu BDNF (mijloc) și în celule tratate cu GDNF (jos). **B.** analiza statistică a experimentelor ilustrate în A., barele reprezintă răspunsurile medii la primul (negru) și al doilea (alb) stimul termic; barele de eroare reprezintă S.E.M. **C.** Compararea rapoartelor între al doilea și primul răspuns la căldură, ca măsură a gradului de desensibilizare. Testul statistic utilizat a fost testul t Student, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Pentru a studia efectul aplicării acute a NTF asupra TRPA1 am utilizat un protocol constând în două aplicări succesive de AITC (20 μ M, 1 min), între care a fost aplicată una dintre neurotrofine (100 ng/ml, 7 minute).

Fig. 4

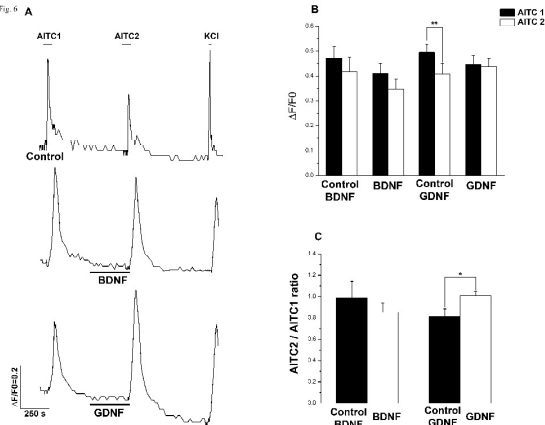


Fig. 4 Aplicarea acută de GDNF previne desensibilizarea răspunsurilor la AITC. **A.** Exemple reprezentative de răspunsuri la aplicări succesive de AITC în condiții control (sus), în celule tratate cu BDNF (mijloc) și în celule tratate cu GDNF (jos). **B.** analiza statistică a experimentelor ilustrate în A., barele reprezintă răspunsurile medii la prima (negru) și a doua (alb) aplicare de AITC; barele de eroare reprezintă S.E.M. **C.** Compararea rapoartelor între al doilea și primul răspuns la AITC, ca măsură a gradului de desensibilizare. Testul statistic utilizat a fost testul t Student, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

În grupul de control, aplicarea repetată de AITC s-a soldat cu o tahifilaxie semnificativă, amplitudinea răspunsului scăzând de la $0,49 \pm 0,03$ pentru primul stimul, la $0,41 \pm 0,04$ pentru cel de-al doilea ($p < 0,05$, $n=26$, figura 4A și B). Acest efect a fost anulat de tratamentul cu GDNF: $0,45 \pm 0,04$ respectiv $0,43 \pm 0,03$

(NS, n = 25, figura 4A și B). O altă indicație a faptului că GDNF reduce gradul de desensibilizare a neuronilor sensibili la AITC, o reprezintă valoarea raportului dintre cel de-al doilea și primul răspuns la AITC: $0,81 \pm 0,07$ pentru control față de $1,00 \pm 0,05$ pentru neuronii tratați cu GDNF ($p < 0,05$, figura 6C). În schimb, răspunsul neuronilor la AITC nu a fost afectat de tratamentul cu BDNF.

Discuții

Acest studiu a investigat efectele expunerii acute și cronice a neuronilor din ganglionii rădăcinii dorsale la factorii neurotrofici (NTF) BDNF și GDNF. Am studiat modificarea exprimării funcționale a trei canale ionice termoTRP (TRPM8, TRPA1 și TRPV1) în urma incubării cronice cu NTF. Au fost testate și efectele acute ale neurotrofinelor asupra răspunsurilor la căldură nocivă (~ 45 °C) și AITC. În concluzie, rezultatele noastre identifică potențiale mecanisme prin care BDNF și GDNF își exercită efectele pro-algezice. Ambele neurotrofine precum și receptorii lor (trkB and GFR α 1) sunt modulate pozitiv în inflamație (Qiao, Grider, 2007; Cho et al., 1997; Amaya et al., 2004; Malin et al., 2006), indicând faptul că au un rol activ în durerea inflamatorie cronică. Acest studiu furnizează dovezi ale faptului că tratamentul cronic cu BDNF și GDNF induce alterări ale expresiei funcționale ale anumitor canale TRP cu potențial rol în durerea inflamatorie. În plus, aplicarea acută a respectivelor neurotrofine sensibilizează nociceptorii la stimuli chimici și termici nocivi care pot sta la baza inițierii durerii inflamatorii.

2. Modularea receptorului polimodal TRPA1 sub acțiunea receptorului serotoninergic 5-HT₂

TRPA1 (Transient Receptor Potential Ankyrin 1) este un canal ionic polimodal exprimat în neuronii senzitivi din ganglionii rădăcinii dorsale și din cei trigeminali. Serotonina (5-HT) este o monoamină neurotransmițătoare, derivată de la triptofan; se găsește cu precădere în tractul gastro-intestinal, în plachetele sanguine și în SNC. Serotonina este considerată a fi un agent proinflamator și pronociceptiv la nivel periferic; eliberarea acesteia la nivelul măduvei spinării provoacă efecte analgezice. Scopul studiului nostru a fost acela de a investiga modularea receptorului TRPA1 de către serotonină (5-HT) și receptorul serotoninergic (5-HT₂) și de a stabili calea de semnalizare implicată în acest proces.

2.1. Neuronii din ganglionii rădăcinii dorsale

A. Condiții de control

Protocolul de lucru folosit a constat în 3 aplicări de AITC de concentrație 10 μ M și o a patra aplicare de AITC de 100 μ M. Fiecare aplicare a fost efectuată timp de 40" la un interval de 6'. Între aplicări, celulele au fost perfuzate cu soluție extracelulară.

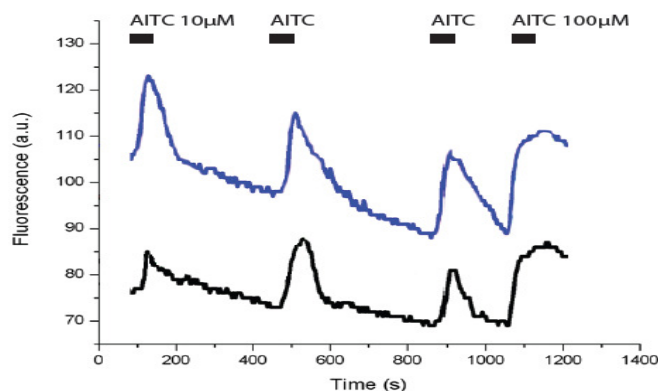


Fig. 1. Din grafic, se poate observa faptul că nu apare o desensibilizare pronunțată a răspunsurilor la aplicarea repetată a agonistului specific TRPA1, AITC; Răspunsurile la cea de-a doua aplicare de AITC nu au fost diferite față de cele inițiale (0.26 ± 0.02 în comparație cu 0.21 ± 0.02 , mean $\pm$ SEM, $n = 64$, $p > 0.05$, one-way ANOVA).

B. Experimente efectuate cu serotonină (5-HT)

Protocolul de lucru folosit a constatat în 3 aplicări de AITC de concentrație $10 \mu\text{M}$ și o a patra aplicare de AITC de $100 \mu\text{M}$. Înainte și pe durata celei de-a doua aplicări de AITC, 5-HT a fost aplicată într-o concentrație de $10 \mu\text{M}$.

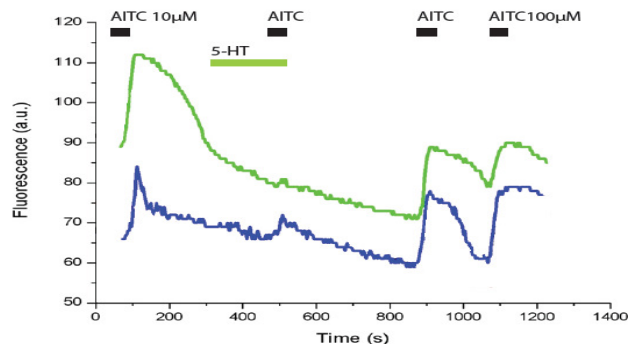


Fig. 2. Graficul de mai sus ilustrează efectul inhibitor pe care serotonină îl are asupra răspunsurilor la agonistul specific TRPA1, AITC. Aplicarea acesteia a condus la o scădere a răspunsurilor la AITC cu 55% (0.08 ± 0.01 în comparație cu 0.18 ± 0.02 , $n = 80$, $p < 0.0001$).

C. Experimente efectuate cu DOI (1-(4-iodo-2,5-dimethoxyphenyl)-2-aminopropane hydrochloride)

Protocolul de lucru a constatat în 3 aplicări de AITC $10 \mu\text{M}$ și una de $100 \mu\text{M}$. Agonistului specific receptorului 5-HT_2 , DOI a fost aplicat într-o concentrație de 100 nM înainte și pe durata celei de-a doua aplicări de AITC.

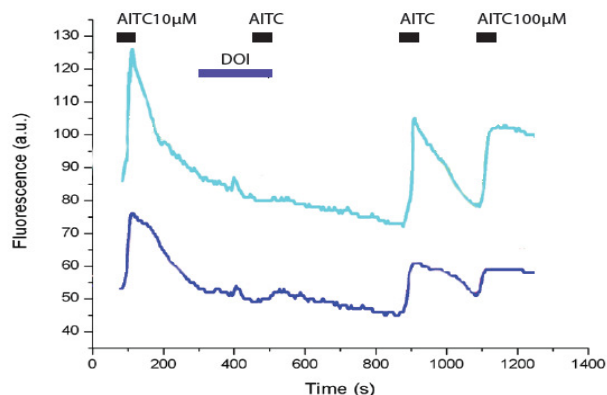


Fig. 3. În figură, se poate observa faptul că în urma aplicării substanței DOI, răspunsul neuronal la agonistul specific TRPA1, AITC este puternic, dar reversibil diminuat. DOI a avut un efect și mai puternic decât serotonina, astfel încât cel de-al doilea răspuns la AITC a fost redus cu 85% în comparație cu răspunsul inițial (0.06 ± 0.01 în comparație cu 0.42 ± 0.04 , $n = 27$, $p < 0.0001$).

2.2. Celule HEK293 transfectate cu *rTRPA1*

A. Condiții de control

În cazul celulelor HEK293 protocolul de lucru a fost același ca și în cazul neuronilor, anume 3 aplicări de AITC de concentrație 10 μM și o a patra aplicare de AITC de 100 μM . Fiecare aplicare a fost efectuată timp de 40'' la un interval de 6'. De asemenea, între aplicări, celulele au fost perfuzate cu soluție extracelulară.

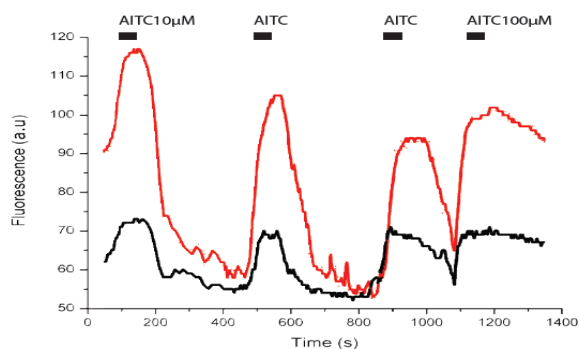


Fig. 4. Ceea ce graficul ilustrează este faptul că nici în cazul celulelor HEK293 transfectate cu TRPA1, nu apare o desensibilizare pronunțată a răspunsurilor la aplicarea repetată a agonistului specific TRPA1, AITC. Răspunsurile la cea de-a doua aplicare de AITC nu au fost diferite față de cele inițiale (0.40 ± 0.09 în comparație cu 0.38 ± 0.05 , mean $\pm$ SEM, $n = 11$, $p > 0.05$, one-way ANOVA).

B. Experimente efectuate cu serotonină

Protocolul de lucru folosit a constat, ca și în cazul neuronilor, tot în 3 aplicări de AITC de concentrație 10 μM și o a patra aplicare de AITC de 100 μM . Serotonina a fost aplicată înainte și pe durata celei de-a doua

aplicări de AITC într-o concentrație de 10 μM . Neuronii care au răspuns la prima și la ultima aplicare de AITC au fost aleși pentru analiza statistică.

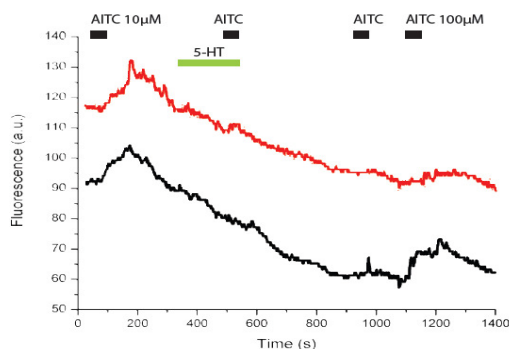


Fig. 5. Un puternic efect inhibitor al serotoninei poate fi observat în graficul de mai sus. Aplicarea de 5-HT a condus la o scădere a răspunsurile la AITC cu 49% ($0,19 \pm 0,05$ în comparație cu $0,37 \pm 0,06$, $n=16$, $p < 0,0001$).

C. Experimente efectuate cu DOI

Protocolul de lucru folosit a fost de 3 aplicări de AITC 10 μM și una de 100 μM . Agonistului specific receptorului 5-HT₂, DOI a fost aplicat într-o concentrație de 100 nM înainte și pe durata celei de-a doua aplicări de AITC.

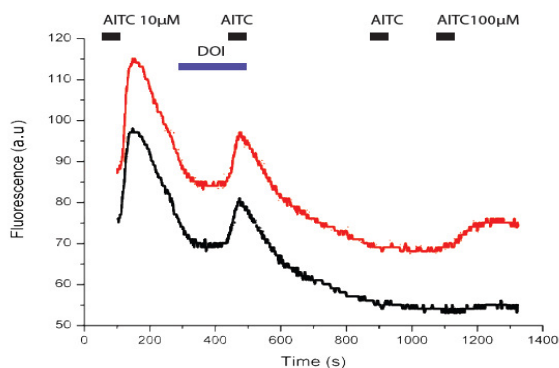


Fig. 6. Efectul inhibitor al substanței DOI se poate observa în cadrul răspunsurilor la cea de-a treia aplicare a agonistului specific TRPA1, AITC. Aplicarea de DOI a avut un puternic efect inhibitor: cel de-al doilea răspuns la AITC a fost redus cu 81% în comparație cu răspunsul inițial ($0,08 \pm 0,05$ în comparație cu $0,42 \pm 0,1$, $n=7$, $p < 0,01$).

3. Prostaglandina E2 (PGE2) activează neuronii senzitivi de șobolan în cultură primară la temperaturi scăzute

Răspunsul neuronal la PGE2 a fost testat la mai multe temperaturi (37, 33 și 25°C) pentru a determina în ce măsură acest efect se datorează scăderii pragului termic de activare al TRPV1 sau avem de-a face cu o activare directă. Protocolul a constatat în trei aplicări consecutive de PGE2 (10μM, timp de 25 de secunde) la interval de patru minute. Un fapt interesant este acela că amplitudinea ($\Delta F/F_0$) primului răspuns la PGE2 a fost similară la cele trei temperaturi (0.29 ± 0.03 la 37 °C, $n=24$, 0.32 ± 0.03 la 33 °C, $n=17$, și 0.35 ± 0.05 la 25 °C, $n=22$). În timp ce la 37 °C cele trei aplicări de PGE2 au declanșat răspunsuri de amplitudine similară (fără diferențe semnificative), atât la 33 cât și la 25 °C a doua aplicare de PGE2 a dus la un răspuns semnificativ mai redus decât primul (desensibilizare: 0.113 ± 0.03 , $p<0.001$, la 33°C și 0.114 ± 0.02 , $p<0.001$, la 25 °C).

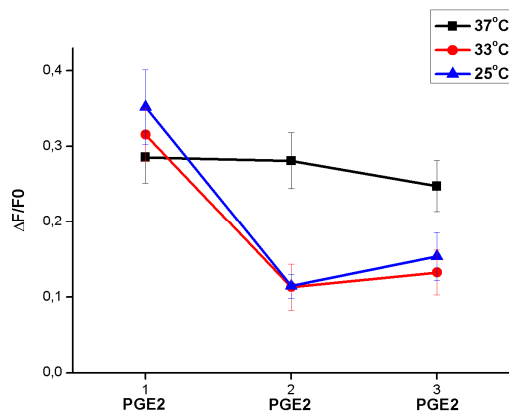


Fig. 7. Comparație între răspunsurile la PGE2 ale neuronilor senzitivi de șobolan la diferite temperaturi. Datele sunt reprezentate ca medie $\pm$ SEM (testul Student corelat, *** $p<0.001$).

3.1. Aplicarea de PGE2 induce un influx de calciu în neuronii senzitivi de șobolan în cultură

Am folosit o soluție extracelulară lipsită de Ca^{2+} pentru a investiga dacă creșterea concentrației intracelulare de calciu indusă de PGE2 se datorează eliberării de Ca^{2+} din reticulul endoplasmic sau intrării de ioni de calciu prin canale ionice membranare. Protocolul a constatat în trei aplicări consecutive de PGE2 (10μM, timp de 25 de secunde) la interval de patru minute. A doua aplicare de PGE2 a fost făcută în absența calciului extracelular (soluția lipsită de Ca^{2+} a fost preaplicată timp de 1 min, precum și în timpul aplicării de PGE2). La sfârșitul protocolului a fost aplicată capsaicină (2μM, timp de 20 de secunde).

Răspunsul la PGE2 în absența ionilor de calciu extracelular a fost substanțial redus în comparație cu răspunsul la prima aplicare de PGE2 (în prezența Ca^{2+} extracelular) (0.06 ± 0.02 în comparație cu 0.28 ± 0.03 , $n = 28$; $p < 0.001$). Din 28 de neuroni sensibili la capsaicină, 21 au răspuns și la capsaicină (75%).

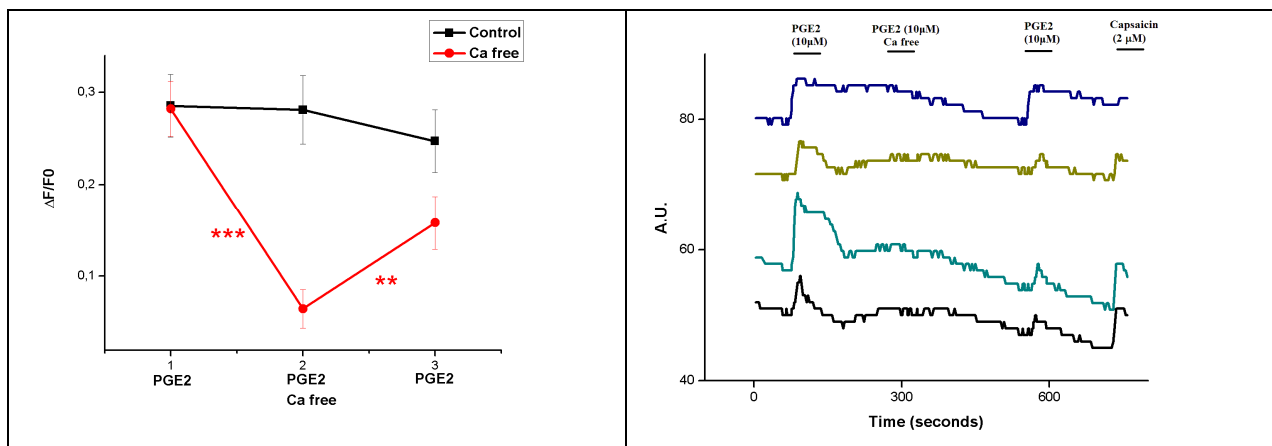


Fig. 8. a. Efectul unei soluții fără calciu asupra răspunsului neuronal la PGE2. Effects of using Calcium free extracellular solution to the PGE2 response in rat DRG neurons. Datele sunt reprezentate ca medie $\pm$ SEM (testul Student corelat, *** $p < 0.001$). b. Exemple de răspunsuri ale neuronilor senzitivi de șobolan la PGE2 în prezența/absența calciului extracelular.

3.2. Răspunsul neuronal la PGE2 este mediat de receptorul polimodal TRPV1

Am testat efectul a trei antagoniști ai TRPV1 asupra răspunsului neuronal la PGE2. Protocolul a constat în trei aplicări consecutive de PGE2 (10μM, timp de 25 de secunde) la patru minute interval, a doua aplicare fiind în prezența unui antagonist al TRPV1 (pre-aplicat timp de 1 min).

Capsazepina (2μM), un antagonist competitive și selective al TRPV1 a indus o scădere pronunțată a răspunsului neuronal la PGE2 (71,4%, de la 0.35 ± 0.05 la 0.1 ± 0.01 , $p < 0.001$, $n=33$), iar recuperarea răspunsului după înlăturarea antagonistului a fost incompletă (0.22 ± 0.05). În mod asemănător, SB366791 (1μM), un alt antagonist specific al TRPV1 a blocat răspunsul neuronal la PGE2 (89,2%, de la 0.37 ± 0.04 la 0.04 ± 0.02 , $p < 0.001$, $n=28$), dar recuperarea a fos completă. A fost testat și efectul Ruthenium Red, un antagonist ne-competitiv și neselectiv al TRPV1. În prezența Ruthenium Red răspunsul neuronal la PGE2 a fost semnificativ redus (82,1%, de la $0,29 \pm 0.04$ la 0.052 ± 0.01 $p < 0.0001$, $n=27$), iar efectul a fost complet reversibil (ca și în cazul SB336791).

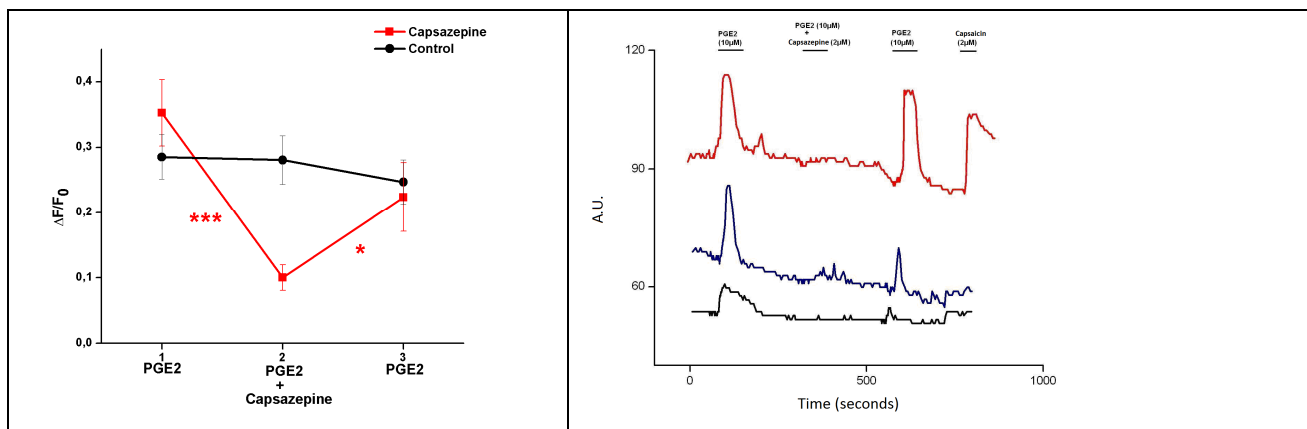


Fig. 9. a. Efectul capsazepinei asupra răspunsurilor la PGE2 în neuroni senzitivi de șobolan în cultură. Datele sunt reprezentate ca medie $\pm$ SEM (testul Student corelat, *** $p < 0.001$). b. Exemple de răspunsuri ale neuronilor senzitivi de șobolan la PGE2 în prezența/absența capsazepinei.

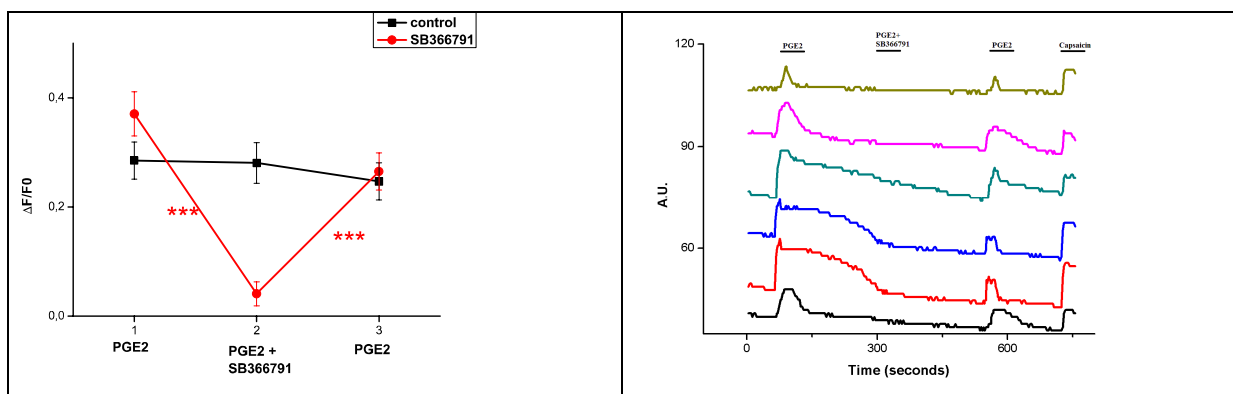


Fig. 10. a. Efectul SB366791 asupra răspunsurilor la PGE2 în neuroni senzitivi de șobolan în cultură. Datele sunt reprezentate ca medie $\pm$ SEM (testul Student corelat, *** $p < 0.001$). b. Exemple de răspunsuri ale neuronilor senzitivi de șobolan la PGE2 în prezența/absența SB366791.

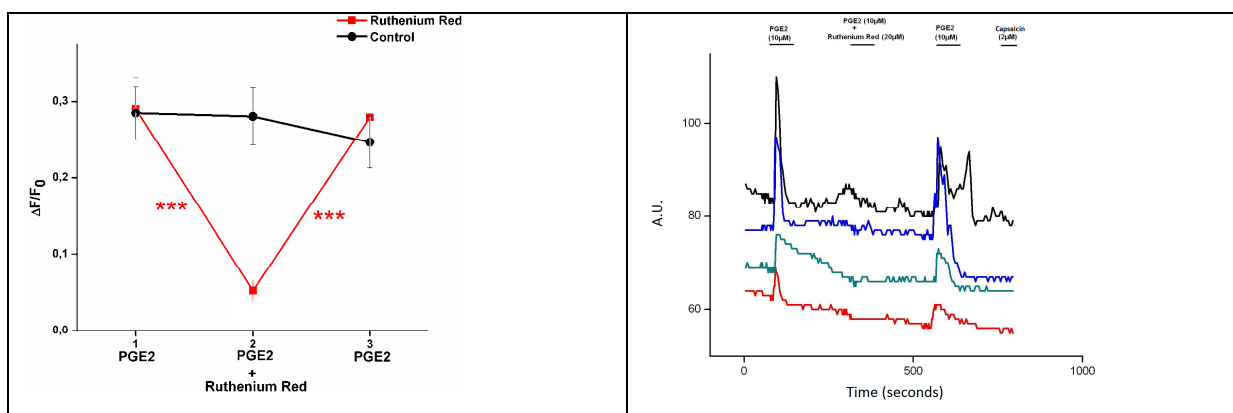


Fig. 11. a. Efectul Ruthenium Red asupra răspunsurilor la PGE2 în neuroni senzitivi de șobolan în cultură. Datele sunt reprezentate ca medie $\pm$ SEM (testul Student corelat, *** $p < 0.001$). b. Exemple de răspunsuri ale neuronilor senzitivi de șobolan la PGE2 în prezența/absența Ruthenium Red.

3.3. Receptorul pentru prostaglandină E2 implicat în activarea directă a neuronilor senzitivi de șobolan este EP1

Pentru a determina care dintre cei patru receptori ai PGE2 este implicat în acest efect asupra neuronilor senzitivi, au fost testați diferiți agonști și antagonști selectivi pentru acești receptori. Într-un prim experiment, AH13205 (1 μ M), un agonist selectiv al receptorului EP2, a fost aplicat timp de 25 s, urmat de o aplicare de PGE2 (10 μ M, timp de 25 de secunde) după patru minute. Doar 5 (20,8%) dintre cei 24 de neuroni activați de PGE2 au răspuns și la aplicarea de AH13205.

Același protocol a fost folosit și pentru Sulproston (1 μ M), un agonist selectiv pentru receptorul EP3. Niciunul dintre cei 20 de neuroni activați de PGE2 nu a răspuns la Sulproston.

În experimental următor am testat efectul antagonistului specific al EP1, SC19220 (100 nM). Protocolul a constat în trei aplicări consecutive de PGE2 (10 μ M, timp de 25 secunde) la interval de patru minute, a doua aplicare având loc în prezența antagonistului EP1 (pre-aplicat timp de 1 min). SC19220 a blocat în mod substanțial și reversibil răspunsul neuronal la PGE2 (81,2%, de la $0,32 \pm 0,03$ la $0,06 \pm 0,01$, $p < 0,001$, $n=35$). Din 35 de neuroni sensibili la PGE2, 31 au fost activați și de capsaicină (88,6%). Aceste rezultate indică faptul că EP1 este receptorul implicat în activarea neuronilor sensibili de către PGE2.

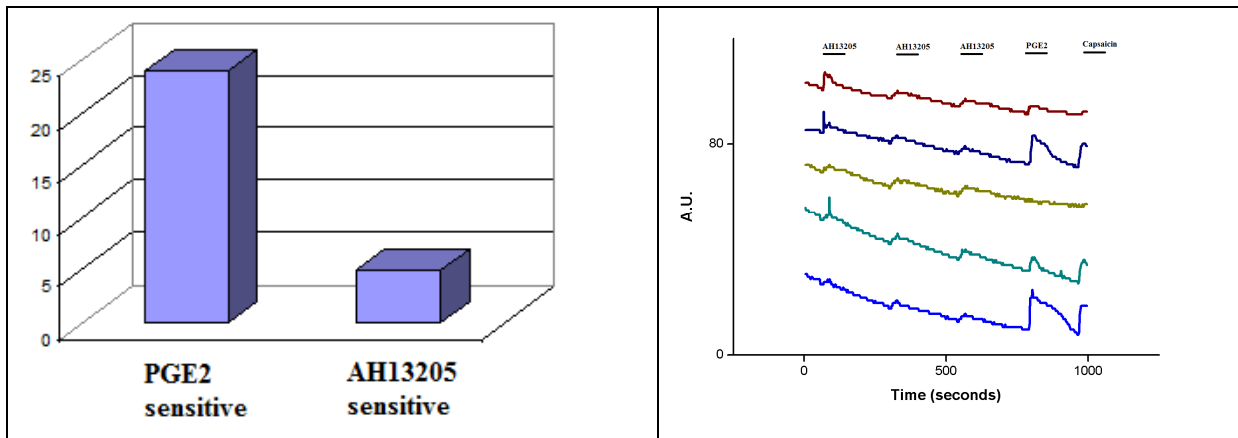


Fig. 12. Co-exprimarea răspunsurilor la PGE2 și AH13205 în neuronii sensibili de șobolan.

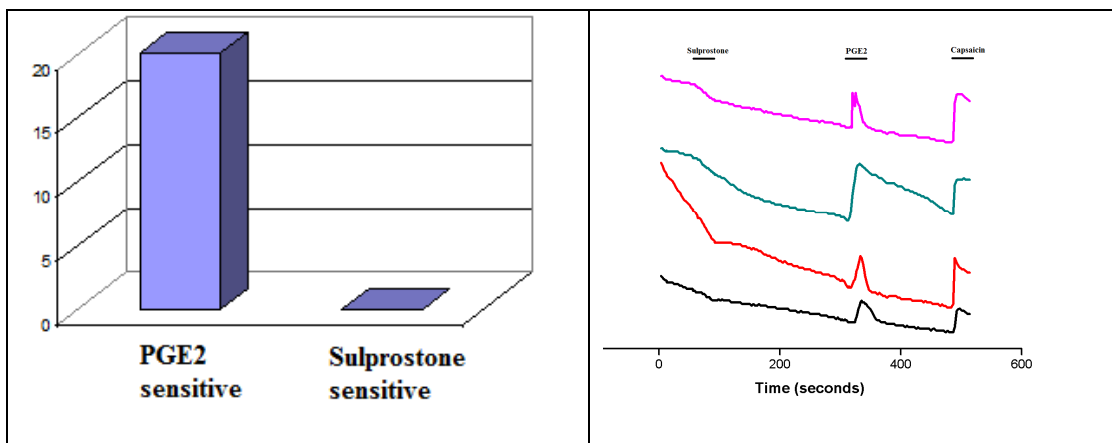


Fig. 13. Co-exprimarea răspunsurilor la PGE2 și Sulproston în neuronii sensibili de șobolan.

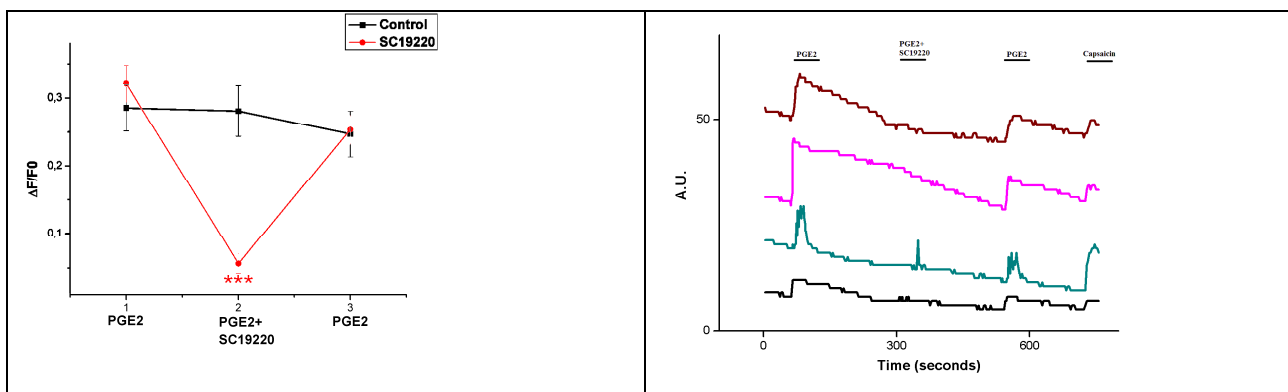


Fig. 14. a. Efectul SC19220 asupra răspunsurilor la PGE2 în neuroni senzitivi de șobolan în cultură. Datele sunt reprezentate ca medie $\pm$ SEM (testul Student corelat, *** $p < 0.001$). b. Exemple de răspunsuri ale neuronilor senzitivi de șobolan la PGE2 în prezența/absența SC19220.

Prof. dr. Alexandru Babes