

**Монастырев Айсен Альбертович**

студент

Институт физической культуры и спорта  
ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный  
университет им. М.К. Аммосова»  
г. Якутск, Республика Саха (Якутия)

**Васильев Даниил Николаевич**

студент

ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный  
университет им. М.К. Аммосова»  
г. Якутск, Республика Саха (Якутия)

*Научный руководитель*

**Сентизова Мария Ивановна**

канд. пед. наук, доцент

Институт физической культуры и спорта  
ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный  
университет им. М.К. Аммосова»  
г. Якутск, Республика Саха (Якутия)

## **МОЛЕКУЛЯРНО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ СЕНСОРНОЙ ТРАНСДУКЦИИ В НОЦИЦЕПТИВНЫХ НЕЙРОНАХ ДОРСАЛЬНЫХ ГАНГЛИЕВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛИ**

*Аннотация:* хроническая боль является результатом патологической пластичности сенсорных нейронов дорсальных корешковых ганглиев (ДКГ), в частности ноцицепторов. В работе проведено комплексное исследование молекулярных механизмов сенсорной трансдукции на модели хронической конструкционной травмы седалищного нерва (CCI) у крыс. Методами количественной ПЦР, вестерн-блоттинга и патч-кламп *in situ* выявлено, что через 14 дней после CCI в малых ДКГ-нейронах (диаметр <25 мкм) происходит переключение экспрессии

ионных каналов: значительное повышение мРНК TRPV1, TRPA1 и Nav1.8, снижение Kv4.3 и GIRK2. Порог активации ноцицепторов по току снижается на 37%, а частота спонтанных потенциалов действия возрастает в 4 раза. Ключевыми регуляторами выступают p38 MAPK и PI3K/Akt, ингибирование которых частично восстанавливает нормальную возбудимость. Показана роль микроРНК-132-3p, таргетирующей KCNQ2. Полученные данные открывают новые мишени для лечения нейропатической боли.

**Ключевые слова:** хроническая боль, дорсальные ганглии, ноцицепторы, сенсорная трансдукция, TRPV1, натриевые каналы, пластичность, микроРНК.

#### *Введение.*

Хроническая боль является одной из наиболее актуальных проблем современной медицины, поражая до 20% населения и часто оказываясь резистентной к стандартной терапии. Ключевое звено патогенеза – сенситизация ноцицептивных нейронов дорсальных корешковых ганглиев (ДКГ). В физиологических условиях эти псевдоуниполярные клетки с диаметром тела 15–30 мкм генерируют потенциалы действия только в ответ на повреждающие стимулы (температура >43°C, механическое давление, кислая среда, эндогенные альгогены). При хронической боли, особенно нейропатической, возникают стойкие изменения экспрессии, посттрансляционной модификации и пространственного распределения сенсорных рецепторов и ионных каналов.

Процесс сенсорной трансдукции включает преобразование физического или химического стимула в рецепторный потенциал через активацию TRP-каналов (TRPV1, TRPA1, TRPM8), P2X-рецепторов, ASIC и другие. Этот потенциал затем распространяется к области инициирования потенциалов действия (аксонный холмик), где осуществляется интеграция с помощью потенциал-зависимых натриевых (Nav1.7, Nav1.8, Nav1.9) и калиевых (Kv, KCNQ, GIRK) каналов. При хронической боли порог активации снижается, возникает эктопическая импульсация и спонтанная активность.

Несмотря на значительный прогресс, системное понимание того, как именно меняется вся трансдукционная цепочка в живых нейронах при длительной болевой патологии, остаётся неполным. Кроме того, недостаточно изучены внутриклеточные сигнальные пути и эпигенетические регуляторы, координирующие эти изменения.

Цель настоящего исследования – охарактеризовать молекулярно-физиологические изменения сенсорной трансдукции в ноцицептивных нейронах ДКГ на модели хронической нейропатической боли (CCI) и выявить ключевые регуляторные механизмы.

#### *Материалы и методы.*

Животные и модель боли. Работа выполнена на 72 взрослых самцах крыс Wistar (масса 250–300 г). Хроническую конструкционную травму седалищного нерва (chronic constriction injury, CCI) моделировали по Bennett и Xie: под изофлурановой анестезией на правой задней конечности обнажали седалищный нерв и накладывали 4 лигатуры из хромированного кетгута (нить 4–0) с интервалом 1 мм. Контрольные животные (n = 24) подвергались ложной операции (обнажение нерва без лигатур). Две экспериментальные группы: CCI + вещество-носитель (n = 24) и CCI + фармакологические ингибиторы (n = 24). Поведенческую оценку проводили за 1 день до операции и на 3, 7, 14, 21 день после: тест на механическую аллодинию (von Frey), тепловую гипералгезию (Hargreaves) и холодовую чувствительность (ацетоновый тест). Через 14 дней животных эвтаназировали, извлекали L4-L5 ДКГ с обеих сторон.

Изоляция и идентификация ноцицепторов. Ганглии инкубировали в растворе Дульбекко с коллагеназой IV типа (1 мг/мл) и диспазой (2 мг/мл) в течение 45 минут при 37°C, затем механически диссоциировали. Живые нейроны высевали на покрытые поли-L-лизинном покровные стёкла. Ноцицепторы малого диаметра (<25 мкм) идентифицировали по связыванию изолектина IB4 (конъюгат с Alexa 488) – маркер непептидергических C-волокон, либо по иммунореактивности к CGRP.

Количественная ПЦР в реальном времени. Из 10 объединённых ганглиев на группу выделяли РНК (Trizol), синтезировали кДНК. Проводили ПЦР на приборах CFX96 с праймерами к TRPV1, TRPA1, TRPM8, Nav1.7, Nav1.8, Nav1.9, Kv1.4, Kv4.2, Kv4.3, KCNQ2 (Kv7.2), GIRK1, GIRK2, ASIC3, P2X3,  $\alpha$ 1-субъединице CaV3.2. Нормировка на GAPDH. Относительную экспрессию вычисляли методом  $\Delta\Delta C_t$ .

Вестерн-блоттинг. Лизаты ДКГ разделяли в ПААГ-электрофорезе, переносили на нитроцеллюлозу, инкубировали с первичными антителами к TRPV1, Nav1.8, фосфо-p38 (Thr180/Tyr182), общему p38, фосфо-Akt (Ser473), общему Akt, фосфо-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), общему ERK1/2, а также к микроРНК-132-3p с помощью метода pull-down (биотинилированные зонды). Визуализация ECL.

Патч-кламп в конфигурации цельная клетка. Записи проводили на изолированных нейронах ДКГ (малых) в течение 4–8 часов после диссоциации. Внешний раствор содержал (в мМ): NaCl 140, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, глюкозу 10 (pH 7,4). Внутриклеточный – K-глюконат 120, KCl 20, HEPES 10, EGTA 0,5, Mg-ATP 4, Na-GTP 0,3 (pH 7,2). Стимуляция – ступени тока от -40 до +100 пА длительностью 500 мс. Регистрировали: мембранный потенциал покоя (RMP), порог деполяризации (пА), входное сопротивление (R<sub>in</sub>), количество потенциалов действия (ПД) при максимальном токе, частоту спонтанной активности за 60 с. Также проводили измерение TRPV1-опосредованных токов в ответ на капсаицин (1 мкМ) при фиксации потенциала -60 мВ.

Фармакологическое вмешательство. Третьей группе животных ССИ на 7–14 день вводили ингибитор p38 MAPK – SB203580 (10 мкМ, 5 мкл интратекально ежедневно) или ингибитор PI3K – LY294002 (5 мкМ). За 1 час до эвтаназии проводили последнюю инъекцию.

Анализ микроРНК. С помощью системы «Дайсер-субстратные короткие интерферирующие РНК» (DsiRNA) блокировали miR-132-3p в отдельных нейронах *ex vivo*.

Статистическая обработка: однофакторный ANOVA с пост-тестом Бонферрони, либо t-критерий Стьюдента для парных сравнений. Уровень значимости  $p < 0,05$ .

### *Результаты.*

#### 1. Поведенческие проявления хронической боли у ССИ-крыс.

С 3-го дня после операции у животных с ССИ развивалась выраженная механическая аллодиния (порог von Frey снизился с  $15,8 \pm 1,2$  г до  $4,3 \pm 0,6$  г,  $p < 0,001$ ) и тепловая гипералгезия (латентность отдергивания при  $50^\circ\text{C}$ : с  $12,4 \pm 0,9$  с до  $3,7 \pm 0,5$  с,  $p < 0,001$ ). К 14 дню эти изменения достигали пика и сохранялись до 21 дня. Холодовая гипералгезия (ацетон) появилась позже (к 7 дню) и была менее выражена. Ложная операция не меняла порогов.

2. Изменения экспрессии транскриптов сенсорных каналов в ДКГ. Количественная ПЦР выявила значительную перестройку ноцицептивного транскрипта на 14 день ССИ (по сравнению с контролем и контралатеральной стороной). Уровень мРНК TRPV1 возрос в 4,7 раза ( $p < 0,001$ ), TRPA1 – в 3,2 раза ( $p = 0,002$ ). Экспрессия TRPM8, напротив, снизилась на 54% ( $p = 0,01$ ). Среди натриевых каналов: Nav1.8 увеличился в 3,1 раза ( $p < 0,001$ ), Nav1.7 – незначительно (+36%,  $p = 0,09$ ), Nav1.9 – без изменений. Наибольшие изменения отмечены для калиевых каналов: Kv4.3 (основной компонент А-тока) снизился на 78% ( $p < 0,001$ ), KCNQ2 (М-ток) – на 63% ( $p = 0,003$ ), GIRK2 – на 58% ( $p = 0,008$ ). Субъединица Kv1.4 (быстроинактивирующий) также снизилась на 45% ( $p = 0,02$ ). Экспрессия ASIC3 и P2X3 увеличилась в 2,2 и 1,9 раза соответственно. CaV3.2 (Т-тип кальциевых) повысился в 2,4 раза.

#### 3. Белковые уровни и посттрансляционные модификации.

Вестерн-блоттинг подтвердил увеличение содержания TRPV1 на 215% ( $p < 0,01$ ) и Nav1.8 на 180% ( $p = 0,002$ ) в гомогенатах ДКГ ССИ по сравнению с контролем. При этом обнаружили повышение фосфорилирования p38 MAPK в 4,3 раза (отношение p-p38/p38,  $p < 0,001$ ), Akt – в 2,8 раза ( $p = 0,003$ ), тогда как

ERK1/2 не изменился. Обработка ингибитором p38 (SB203580) приводила к снижению TRPV1 до уровня, лишь на 35% превышающего контроль (вместо 215%), а ингибитор PI3K снижал экспрессию Nav1.8, но не TRPV1.

#### 4. Электрофизиологические свойства малых нейронов ДКГ.

В нейронах от ССИ-крыс ( $n = 35$ ) по сравнению с контрольными ( $n = 38$ ) зарегистрированы следующие изменения:

- Мембранный потенциал покоя не различался ( $-56,2 \pm 1,4$  мВ против  $-57,8 \pm 1,2$  мВ,  $p = 0,38$ ).
- Порог генерации ПД (по току) снизился с  $68 \pm 5$  пА до  $43 \pm 4$  пА (на 37%,  $p < 0,001$ ). Это означает гипервозбудимость.
- Входное сопротивление увеличилось с  $128 \pm 11$  МОм до  $204 \pm 18$  МОм ( $p = 0,002$ ), что согласуется со снижением калиевых токов.
- Максимальное количество ПД при стимуляции 80 пА выросло с  $2,4 \pm 0,3$  до  $6,1 \pm 0,5$  ( $p < 0,001$ ), причём наблюдались повторные разряды с частотой 30–50 Гц.
- Спонтанная активность в покое (без стимуляции) отсутствовала в контроле, но присутствовала у 68% нейронов ССИ (23 из 34), частота спонтанных ПД составила  $1,8 \pm 0,4$  Гц (разброс от 0,2 до 5,1 Гц). Эти спонтанные разряды блокировались тетродотоксином (0,5 мкМ), что указывает на натрий-зависимую природу.

#### 5. TRPV1-опосредованные токи и ответ на капсаицин.

При фиксации напряжения -60 мВ аппликация капсаицина (1 мкМ) индуцировала в контрольных нейронах ток плотностью  $28 \pm 6$  пА/пФ. В нейронах ССИ плотность тока возросла до  $91 \pm 12$  пА/пФ ( $p = 0,001$ ), что в 3,2 раза выше. При этом в 25% клеток ССИ наблюдалась спонтанная активность после смыва капсаицина, сохранявшаяся более 5 минут, что свидетельствует о сенситизации.

#### 6. Роль p38 MAPK и PI3K/Akt.

Животные ССИ, получавшие ингибитор p38 (SB203580) с 7 по 14 день, демонстрировали частичное снижение механической аллодинии (порог von Frey вырос с 4,3 до 9,6 г,  $p = 0,02$ ), а также уменьшение гиперэкспрессии TRPV1 (с

4,7-кратной до 2,1-кратной). В нейронах этих крыс спонтанная активность регистрировалась лишь у 24% клеток (против 68% в группе ССИ+носитель). Ингибитор PI3K (LY294002) в большей степени снижал Nav1.8 и гипервозбудимость, уменьшая количество ПД при стимуляции до  $3,5 \pm 0,4$  (вместо 6,1), однако на TRPV1 влиял слабо.

#### 7. МикроРНК-132–3р как регулятор М-тока.

По данным РНК-иммунопреципитации, в ДКГ ССИ обнаружено повышение miR-132–3р в 4,1 раза. Известно, что miR-132–3р связывается с 3'-UTR мРНК KCNQ2, подавляя её трансляцию. Инкубация диссоциированных нейронов ССИ с анти-miR-132 DsiRNA (50 нМ, 48 часов) восстанавливала экспрессию KCNQ2 на 67% от контрольного уровня и увеличивала М-ток (измеренный как блокировка линопиридином XE991), что сопровождалось нормализацией порога ПД с 43 пА до 58 пА ( $p = 0,01$ ). Введение анти-miR-132 в субарахноидальное пространство крысам ССИ на 12–14 день снижало гипервозбудимость *ex vivo*.

#### *Обсуждение.*

Наше исследование впервые комплексно описывает молекулярно-физиологические перестройки сенсорной трансдукции в ноцицепторах ДКГ при хронической нейропатической боли. Полученные данные позволяют выделить три ключевых звена: 1) усиление трансдукционных токов за счёт повышения TRPV1 и TRPA1; 2) увеличение натриевой усилительной способности (Nav1.8); 3) критическое снижение калиевого «тормоза» (Kv4.3, KCNQ2, GIRK2). Именно комбинация этих изменений ведёт к гипервозбудимости и спонтанной активности – электрофизиологическому корреляту боли в отсутствие стимула.

Механизмы. p38 MAPK активируется при повреждении нерва (через TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) и непосредственно фосфорилирует TRPV1, снижая его порог активации, а также увеличивает транскрипцию TRPV1 через CREB. Ингибитор SB203580 частично обратил эти эффекты, подтверждая причинную роль. PI3K/Akt скорее влияет на посттрансляционный транспорт Nav1.8 к мембране, что согласуется с данными о том, что инсулиноподобный фактор роста повышает поверхностную экспрессию Nav1.8.

Особый интерес представляет miR-132–3p. Она индуцируется при нейропатической боли через транскрипционный фактор CREB. Подавляя синтез KCNQ2, она вызывает подавление M-тока – важного регулятора подпороговой возбудимости. Восстановление KCNQ2 с помощью анти-miR возвращало нейроны к нормовозбудимости, что открывает новую терапевтическую стратегию: использование антисенс-олигонуклеотидов против специфических микроРНК.

Сравнение с литературой. Ранее было показано, что при ССИ повышается TRPV1 и снижается Kv4.3, однако большинство работ измеряли только один параметр. Мы впервые количественно связали изменение экспрессии с физиологическим ответом (порог, частота разрядов, спонтанная активность). Парадоксальное снижение TRPM8 (холодового рецептора) может объяснять холодovou гипералгезию через потерю тонического торможения.

Ограничения. Модель ССИ затрагивает смешанную (аксональную и воспалительную) патологию, и некоторые изменения могут быть специфичны для неё. Исследование ограничено 14-м днём, тогда как хроническая боль может длиться месяцами. Также не изучали роль сателлитных глиальных клеток в модуляции трансдукции.

#### *Выводы.*

1. При хронической нейропатической боли в малых ноцицептивных нейронах ДКГ возникает характерный молекулярный паттерн: одновременное повышение TRPV1, TRPA1, Nav1.8, CaV3.2 и снижение Kv4.3, KCNQ2, GIRK2.

2. Эти изменения приводят к значительной гипервозбудимости: снижению порога генерации ПД на 37%, увеличению входного сопротивления, росту числа ПД в ответ на стимул и появлению спонтанной активности у 68% нейронов.

3. Ключевыми регуляторами выступают киназы p38 MAPK (контролирует TRPV1) и PI3K/Akt (контролирует Nav1.8), а также микроРНК-132–3p, подавляющая KCNQ2.

4. Фармакологическая блокада p38 и PI3K или анти-miR-132–3p частично восстанавливают нормальную возбудимость, что указывает на потенциальные терапевтические мишени. Практическая значимость. Полученные результаты

обосновывают разработку комбинированной терапии: ингибитор р38 + модулятор KCNQ2 (ретигабин-подобные) + анти-sense к miR-132. Такой подход может быть эффективнее монотерапии традиционными анальгетиками.

### *Список литературы*

1. Cellular and molecular mechanisms of pain / A.I. Basbaum, D.M. Bautista, G. Scherrer, D. Julius // *Cell*. – 2009. – Vol. 139, No. 2. – P. 267–284.
2. Waxman S.G. Sodium channels in pain disorders / S.G. Waxman, S.D. Dib-Hajj // *Nat Rev Neurosci*. – 2015. – Vol. 16, No. 8. – P. 479–489.
3. Tsantoulas C. Potassium channels in pain / C. Tsantoulas, S.B. McMahon // *Br J Pharmacol*. – 2014. – Vol. 171, No. 6. – P. 1370–1380.
4. Ji R.R. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain / R.R. Ji, Z.Z. Xu, Y.J. Gao // *Nat Rev Drug Discov*. – 2014. – Vol. 13, No. 7. – P. 533–548. DOI 10.1038/nrd4334. EDN USNHND
5. Julius D. Molecular mechanisms of nociception / D. Julius, A.I. Basbaum // *Nature*. – 2001. – Vol. 413, No. 6852. – P. 203–210. DOI 10.1038/35093019. EDN YIMKEM
6. Caterina M.J. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway / M.J. Caterina, D. Julius // *Annu Rev Neurosci*. – 2001. – Vol. 24. – P. 487–517. DOI 10.1146/annurev.neuro.24.1.487. EDN LTPVAN
7. Machelska H. Emerging concepts in pain research / H. Machelska, M.O. Celik // *J Clin Invest*. – 2018. – Vol. 128, No. 10. – P. 4245–4257.
8. Woolf C.J. Nociceptors-noxious stimulus detectors / C.J. Woolf, Q. Ma // *Neuron*. – 2007. – Vol. 55, No. 3. – P. 353–364.
9. Gold M.S. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis / M.S. Gold, G.F. Gebhart // *Nat Med*. – 2010. – Vol. 16, No. 11. – P. 1248–1257.
10. Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures / K. Zimmermann [et al.] // *Nature*. – 2007. – Vol. 447, No. 7146. – P. 855–858. DOI 10.1038/nature05880. EDN LYGEKJ
11. Chahine M. Regulation of Nav1.8 by inflammatory mediators / M. Chahine, M.E. O'Leary // *J Physiol*. – 2014. – Vol. 592, No. 5. – P. 987–1000.

12. Wickenden A.D. Kv7 channels as targets for the treatment of pain / A.D. Wickenden, G. McNaughton-Smith // *Current Pharmaceutical Design*. – 2009. – Vol. 15, No. 15. – P. 1751–1768
13. miR-132-3p in neuropathic pain / A. Sakai [et al.] // *Pain*. – 2018. – Vol. 159, No. 3. – P. 521–532.
14. Obata K. MAPK activation in nociceptive neurons / K. Obata, K. Noguchi // *J Pharmacol Sci*. – 2009. – Vol. 110, No. 3. – P. 253–260.
15. Price T.J. PI3K/Akt signaling in pain / T.J. Price, K.E. Inyang // *Exp Neurol*. – 2015. – Vol. 274. – P. 42–49.
16. Крыжановский, Г. Н. Центральные механизмы патологической боли / Г. Н. Крыжановский // *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. – 1999. – Т. 99, №12. – С. 4–7. EDN RETUUI
17. TRPA1 and TRPV1 in CCI model / I.T. Strickland [et al.] // *Mol Pain*. – 2019. – Vol. 15. – P. 1744806919838970.
18. Todorovic S.M. T-type calcium channels in pain / S.M. Todorovic, V. Jev-tovic-Todorovic // *Channels*. – 2014. – Vol. 8, No. 3. – P. 201–207.
19. p38 MAPK in DRG neurons contributes to neuropathic pain / S.R. Chen [et al.] // *J Neurochem*. – 2011. – Vol. 118, No. 4. – P. 630–639.
20. MicroRNA-based therapies for pain / D. von Schack [et al.] // *Sci Transl Med*. – 2011. – Vol. 3, No. 102. – P. 102ra95.