
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**СЕГМЕНТ-СПЕЦИФИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА
НА УРОВЕНЬ КАНАЛОВ TRPV1 И TRPA1 В ТОЛСТОЙ КИШКЕ КРЫСЫ**

© 2025 г. К. А. Дворникова¹, Е. Ю. Быстрова¹, О. Н. Платонова¹,
А. А. Федорова^{1,2}, А. Г. Марков^{1,2,*}

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: markovag@infran.ru

Поступила в редакцию 24.06.2025 г.

После доработки 23.07.2025 г.

Принята к публикации 25.07.2025 г.

Исследование молекулярных механизмов интероцепции болевых сигналов остается актуальной проблемой висцеральной физиологии. Одним из видов болевой чувствительности являются хронические абдоминальные боли, возникающие при заболеваниях желудочно-кишечного тракта и часто продолжающиеся после их завершения. Развитие абдоминального болевого синдрома инициируется запуском молекулярных изменений в стенке кишки, детали которого остаются не исследованными. Каналы транзитного рецепторного потенциала (TRP), а именно TRPV1 и TRPA1, расположены в нервных клетках энтеральной нервной системы и участвуют в формировании ощущения висцеральной боли и гиперчувствительности. Толстая кишка крыс имеет неравномерное распределение этих каналов на протяжении своей проксимально-дистальной оси. Предполагается, что эти каналы могут быть вовлечены в начальные этапы формирования абдоминальной болевой чувствительности. Целью данного исследования было изучение сегмент-специфического изменения уровня каналов TRPV1 и TRPA1 при инициации воспаления однократным введением липополисахарида (ЛПС). В исследовании использовали тест на болевую чувствительность “холодная и горячая пластина”, методы морфометрического анализа, регистрацию электрофизиологических параметров в камере Уссинга и вестерн-блот для оценки уровня белков TRPA1 и TRPV1. Однократное введение ЛПС приводит к уменьшению уровня TRPA1 в восходящем и в нисходящем отделах толстой кишки. В восходящем отделе изменения уровня TRPV1 не выявлено, в то же время в нисходящем отделе зарегистрировано значительное увеличение уровня TRPV1. В тесте “горячая и холодная пластина” изменения ноцицепции не наблюдалось. Таким образом, в прямой модели ЛПС-токсичности было установлено сегмент-специфическое изменение уровня TRPV1- и TRPA1-каналов.

Ключевые слова: интероцепция, висцеральная чувствительность, липополисахарид, воспаление, толстая кишка, TRPV1, TRPA1

DOI: 10.7868/S2658655X25110117

ВВЕДЕНИЕ

Болевая чувствительность представляет собой фундаментальный физиологический процесс, отражающий развитие дисфункции органа или его повреждение. Одним из широко распространенных видов болевой чувствительности являются хронические абдоминальные боли, возникающие в том числе при заболеваниях желудочно-кишечного тракта [1]. Изучение молекулярных и клеточных механизмов, лежащих в основе возникновения болевого абдоминального синдрома, остается актуальной задачей физиологии висцеральных систем. Механизмы развития висцеральной гиперчувствительности после воспалительных процессов в кишке до конца не изучены [2]. Исследования в этой области направлены в основном на изучение молекулярных механизмов поддержания состояния висцеральной гиперчувствительности и сохранения абдоминальной боли после завершения патологического процесса [3]. Следует учесть, что развитие висцеральной гиперчувствительности происходит поэтапно. Необходимо исследовать молекулярные механизмы, лежащие в начале развития болевого синдрома и обеспечивающие инициацию последующих этапов развития этого процесса. Поэтому перспективным направлением исследований является изучение начальных этапов развития болевой чувствительности при возникновении воспаления кишки.

Одним из определяющих молекулярных элементов, обеспечивающих сенсорные функции кишки, являются каналы семейства TRP, в частности ванилоидные (TRPV1) и анкириновые (TRPA1). Эти каналы были обнаружены в нейронах энтеральной нервной системы, в эпителиальных клетках, они осуществляют детекцию химических и термических стимулов, а также участвуют в различных физиологических процессах, в частности, в таких как восприятие боли [4]. Установлено, что повышенная экспрессия этих каналов коррелирует с тяжестью заболеваний органов желудочно-кишечного тракта, подчеркивая их значимость в патогенезе абдоминальной боли [5]. В то же время известно, что толстая кишка демонстрирует выраженные региональные различия в морфологии, функции и молекулярном составе, которые отражают сегмент-опосредованную специализацию ее физиологической роли [6]. Согласно имеющимся данным о сегментарных различиях в экспрессии TRPV1 и TRPA1, имеется региональное распределение в толстой кишке с различиями в уровнях экспрессии между проксимальным и дистальным отделами: с преобладанием TRPA1 в проксимальном отделе, а TRPV1 преимущественно в дистальном [7]. Неравномерность распределения каналов послужила основанием для изучения возможного сегмент-специфического вклада различных отделов толстой кишки, а также каналов TRPV1 и TRPA1 в развитие болевой чувствительности.

Однако на сегодняшний день каналы TRPV1 и TRPA1 в контексте изучения их вклада в начальные этапы развития болевой чувствительности при инициации воспаления толстой кишки остаются малоисследованными. В частности, остается неосвещенным вопрос об уровне этих каналов в толстой кишке в начале воспаления при системном введении липополисахарида (ЛПС). Известно, что ЛПС является естественным активатором TRPA1 и TRPV1 [8, 9] и может напрямую или опосредованно активировать TRPV1 и TRPA1, приводя к развитию воспалительной реакции и появлению болевой чувствительности [10]. Ввиду этого имеющиеся сведения, подтверждающие факт регионального распределения каналов TRPV1 и TRPA1 в толстой кишке, вызывают безусловный интерес к выяснению того, как системное введение ЛПС повлияет на уровень TRPV1 и TRPA1 в контексте их сегментарной специализации в толстой кишке.

Целью настоящей работы явилось исследование сегмент-специфического изменения уровня каналов TRPV1 и TRPA1 при инициации воспаления путем однократного введения ЛПС.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Эксперименты были проведены на самцах крыс Wistar, массой 100–200 г ($n = 20$), предоставленных ЦКП “Биоколлекция ИФ РАН” (Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН), которых содержали в стандартных условиях вивария. Животные получали пищу и воду *ad libitum*. Все эксперименты на животных проводились в соответствии с Руководством по уходу за лабораторными животными и их использованию (ГОСТ 33215-2014 от 01.07.2016).

Дизайн эксперимента. Системное введение ЛПС (модель ЛПС-токсичности) моделирует протекание острой фазы грамотрицательного сепсиса и представляет собой легко контролируемую и воспроизводимую прямую модель инициации воспаления путем однократного введения эндотоксина [11, 12]. Животные были случайным образом разделены на две группы: (а) – контрольная группа “NaCl” ($n = 10$) – инъекция 0.9%-ного NaCl (в/б, 1 мл) (ПФК Обновление, Россия); (б) “ЛПС” ($n = 10$) – инъекции ЛПС (в/б, ЛПС из *Escherichia coli*, серотип O55:B5; Sigma Aldrich, США) в дозе 1 мг/кг массы тела в 1 мл 0.9%-ного NaCl для индукции прямой модели ЛПС-токсичности (системное введение ЛПС). Каждая группа была разделена на 2 подгруппы: 1-ю подгруппу ($n = 5$) использовали для оценки болевой чувствительности в поведенческом эксперименте, далее проводили забор тканей толстой кишки в восходящем и нисходящем отделах для проведения морфометрического анализа и вестерн-блот-анализа; 2-ю подгруппу ($n = 5$) использовали для оценки состояния тканевого барьера кишки в камере Уссинга.

Крыс подвергали эвтаназии через 24 ч после инъекции путем декапитации гильотиной с предварительной анестезией (Золетил 100 в дозе 40 мг/кг массы тела, в/б (Virbac, Франция)). Затем полностью извлекали толстую кишку, из которой брали ткани из восходящего и нисходящего отделов. У групп крыс после проведения теста болевой чувствительности (по 5 животных для обеих групп) проводили забор материала для гистологического анализа и вестерн-блота (рис. 1).

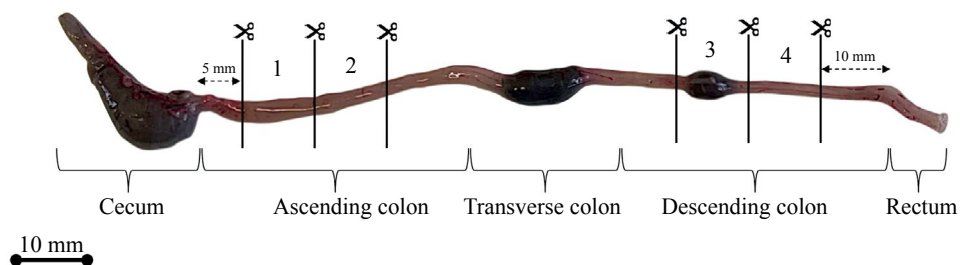


Рис. 1. Схема забора материала. Образцы 1, 4 – забор ткани толстой кишки из восходящего (в 0.5 см от слепой кишки) и нисходящего (в 1 см от прямой кишки) отделов для проведения морфометрического анализа. Образцы 2, 3 – забор тканей для проведения вестерн-блота.

Оценка изменения массы тела крыс и болевой чувствительности при однократном введении ЛПС. Измерение массы тела животных проводили ежедневно, утром, на лабораторных весах M-ER 122ACF-3000.1 LCD (Китай). Для оценки болевой чувствительности использовался тест “холодная и горячая пластина” (CHP, Bioseb, Франция) при температурах 55 °C и –2 °C. Это устройство позволяет оценить болевую чувствительность грызунов в результате воздействия тепла или

холода [13]. На экспериментальных животных моделях описаны как эффекты гипералгезии [14, 15], так и гипоалгезии [16]. В нашей работе этот тест применялся с целью оценки соматической болевой чувствительности при начальных стадиях развития ЛПС-индуцированного воспаления. Все животные были предварительно адаптированы к устройству до начала экспериментов. Крыс помещали на горячую пластину, нагретую до 55 °С, или на холодную пластину, охлажденную до –2 °С. Животные оставались на пластинах до первого появления типичных болевых реакций, к которым относили: отдергивание задней лапы, подпрыгивание, облизывание лап или умывание. Время до появления этих реакций (т.е. латентный период болевой реакции) считалось показателем болевого порога. При определении болевой чувствительности каждое животное тестировали три раза с интервалом 10 мин между измерениями, которые усредняли по каждой особи. Далее рассчитывали средние значения для выборки (группа “NaCl”, $n = 5$; группа “ЛПС”, $n = 5$).

Морфометрический анализ. Забор ткани толстой кишки для морфометрического анализа проводили с двух участков: восходящей (в 0.5 см от слепой кишки) и нисходящей кишки (в 1 см от прямой кишки) (рис. 1). После извлечения образцы отделяли от окружающих тканей и освобождали от содержимого, промывая в физиологическом растворе хлорида натрия. Образцы фиксировали в 10%-ном забуференном формалине (БиоВитрум, Россия) в течение 24 ч с последующей промывкой в проточной водопроводной воде и обезвоживанием в батарее спиртов восходящей концентрации. После этого образцы заливали в парафин (БиоВитрум, Россия) для подготовки гистологических срезов. Анализ морфометрических показателей проводился на поперечных срезах толщиной 5 мкм, окрашенных гематоксилином (Leica Biosystems, США) и эозином (Медикс, Россия). Срезы тканей сканировали при 40-кратном увеличении на автоматизированном сканере препаратов Leica Aperio GT450 v 1.3 (Leica Microsystems Inc., Германия). Измерения общей толщины кишечной стенки, мышечной оболочки и глубины крипт на полученных снимках проводились с помощью программного обеспечения Aperio ImageScope 12.4.6 (Leica Microsystems Inc., Германия). У грызунов ввиду свойств пищеварения формируются гистологические особенности толстого отдела кишечника. Слизистая оболочка образует множество складок для реализации сепараторного механизма образования фекалий [17]. Ввиду этого для измерений выбирались участки, где слизистая оболочка не формирует таких складок, а подслизистая основа расположена параллельно мышечному слою. Измерения глубины либеркюновых желез проводились, когда срез проходил строго продольно по всей глубине крипты от мышечной пластинки слизистой оболочки до просвета кишки. У всех животных измерения каждого показателя проводили на пяти участках среза. Учитывая возможную зависимость величины измеряемых параметров от массы тела, все данные нормализованы по весу животных посредством введения корректирующих коэффициентов, где массе тела, равной 100 г, присваивался корректирующий коэффициент 1. Нормализация по весу проводилась только для морфометрического анализа. Полученные после нормализации данные представлены в относительных единицах.

Регистрация электрофизиологических характеристик в камере Уссинга. Для оценки барьерных свойств и проницаемости эпителия толстой кишки при действии ЛПС использовали камеру Уссинга по стандартной методике [18]. Восходящий и нисходящий сегменты монтировали в камеру Уссинга, заполненную раствором Кребса–Рингера, содержащим (в mM): NaCl 119; KCl 5; CaCl₂ 1.2; MgCl₂ 1.2; NaHCO₃ 25; Na₂HPO₄ 1.6; NaH₂PO₄ 0.4; d-глюкозы 10; (pH 7.4). В течение регистрации (60 мин) в камерах поддерживалась температура 37 °С при постоянной аэрации карбогеном (95% O₂ и 5% CO₂). В камере Уссинга регистрировали ток “короткого замыкания” (“кз”), который является отражением активного транспорта через эпителий. Для определения трансэпителиального сопротивления ткани, отражающего проницаемость ткани для различных соединений и электролитов, регистрировали отклонение напряжения в режиме “фиксации

тока” при величине тока 10 мкА. Трансэпителиальное сопротивление (ТЭС) рассчитывалось по закону Ома: $R = \Delta U / I$. Полученную величину нормировали на площадь исследуемого участка ткани (0.13 см²). Для оценки парацеллюлярной проницаемости для макромолекул в камеру Уссинга с апикальной стороны добавляли флуоресцеин натрия (376 Да) (Sigma Aldrich, Германия), через 60 мин отбирали пробы раствора с базолатеральной стороны эпителия. Концентрацию флуоресцеина натрия анализировали с помощью лазерного сканера Typhoon FLA 9500 (GE, США).

Исследование образцов методом вестерн-блота. Для определения уровня белков (TRPA1, TRPV1) в образцах толстой кишки крысы при системном введении ЛПС был проведен вестерн-блот-анализ. Электрофорез лизатов толстой кишки крыс проводили в вертикальной электрофорезной камере (Bio-Rad, США) в 10%-ном полиакриламидном геле. Электроперенос белков проводили полусухим методом в устройстве Hoefer (Fisher Scientific, США) с использованием PVDF-мембран. Затем мембраны PVDF блокировали с помощью блокирующего буфера на основе 5%-ного сухого молока в течение 45 мин при 24 °C и инкубировали в течение ночи при 4 °C в одном из растворов: первичных кроличьих антител к TRPA1 (FNab09013, Fine Test, Китай) или первичных мышиных антител к TRPV1 (sc-398417, Santa Cruz, США) или инкубировали в растворе первичных мышиных антител к β -тубулину (ab8224, Abcam, Великобритания). Далее первичные антитела отмывали и мембраны инкубировали с одним из вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена против кролика (AB205718, Abcam, Великобритания) или против мыши (AB205719, Abcam, Великобритания) в течение 1 ч при 24 °C. Хемилюминесцентные изображения были получены на ChemiDoc XRS+ Imaging System (Bio-Rad, США) с использованием раствора Clarity Western ECL (Bio-Rad, США). Обработка полученных изображений проводилась с помощью программного обеспечения Image Lab 6.1 (Bio-Rad, США). Интенсивность сигнала тестируемых белков была нормализована к интенсивности сигнала β -тубулина.

Статистический анализ. Статистическую обработку и анализ результатов исследования проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8 (GraphPad, США). Для выявления различий между группами в поведенческом тесте, в электрофизиологических экспериментах, а также при исследовании уровней белка методом вестерн-блота применяли непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Для выявления различий между группами при оценке морфометрических показателей использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с апостериорным тестом Тьюки. Значение вероятности $p < 0.05$ рассматривали как статистически достоверное. Все данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего ($mean \pm SEM$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка изменения массы тела крыс и болевой чувствительности при однократном введении ЛПС. В результате однократного введения ЛПС у крыс через 24 ч наблюдалось снижение массы тела на 10% по сравнению с исходным уровнем. Масса тела животных контрольной группы не изменилась. Латентный период болевой реакции в группе “NaCl” был равен 7.1 ± 0.5 с в тесте горячей пластины (55 °C). При введении ЛПС данный показатель не изменился и составил 6.6 ± 0.9 с ($n = 5$ для каждой группы, U-критерий Манна–Уитни, $p > 0.05$). В тесте холодной пластины (–2 °C) латентный период в контрольной группе “NaCl” имел величину 63.1 ± 14.3 с, в группе “ЛПС” был равен 88.8 ± 13.1 с ($n = 5$ для каждой группы, U-критерий Манна–Уитни, $p > 0.05$).

Морфометрический анализ. Общая толщина стенки кишки в восходящем и нисходящем отделах в контрольной группе составила 154.8 ± 9.0 и 155.0 ± 5.4 ($n = 25$ для каждого отдела, однофакторный дисперсионный анализ, $p > 0.05$). При действии ЛПС

данный показатель статистически значимо увеличивался по сравнению с контролем, составив 256.6 ± 10.9 в восходящем и 273.7 ± 9.7 в нисходящем отделах ($n = 25$ для каждого отдела, однофакторный дисперсионный анализ, $p < 0.001$) (рис. 2, 3а). Достоверных различий между толщиной стенки в восходящем и нисходящем отделах кишки в контрольной и опытной группах не обнаружено (однофакторный дисперсионный анализ, $p > 0.05$) (рис. 2, 3а).

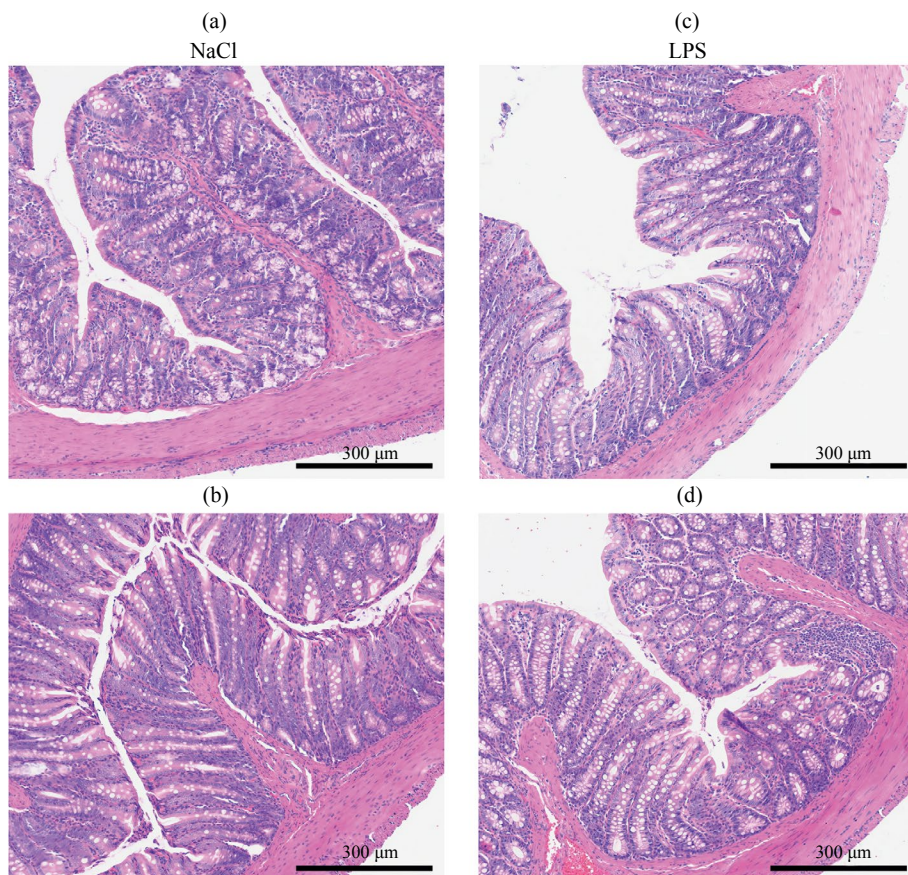


Рис. 2. Гистологические изображения образцов толстой кишки крыс, окрашенных гематоксилином и эозином восходящего (а), (с) и нисходящего (b), (d) отделов. (а), (b) – Срезы группы “NaCl”; (с), (d) – срезы группы “ЛПС”; увеличение 10×.

При исследовании толщины мышечной оболочки выявлены достоверные различия между восходящим и нисходящим отделами в контрольной группе. Значения показателя составили соответственно 66.8 ± 4.8 и 43.2 ± 2.4 ($n = 25$ для каждого отдела, однофакторный дисперсионный анализ, $p < 0.001$). При действии ЛПС отмечено статистически значимое увеличение толщины мышечной оболочки по сравнению с контролем: 111.8 ± 7.2 (восходящий отдел) и 80.4 ± 5.2 (нисходящий отдел) ($n = 25$ для каждого отдела, однофакторный дисперсионный анализ, $p < 0.001$) (рис. 2, 3b). Для экспериментальной группы также характерны внутригрупповые различия между отделами (однофакторный дисперсионный анализ, $p < 0.01$).

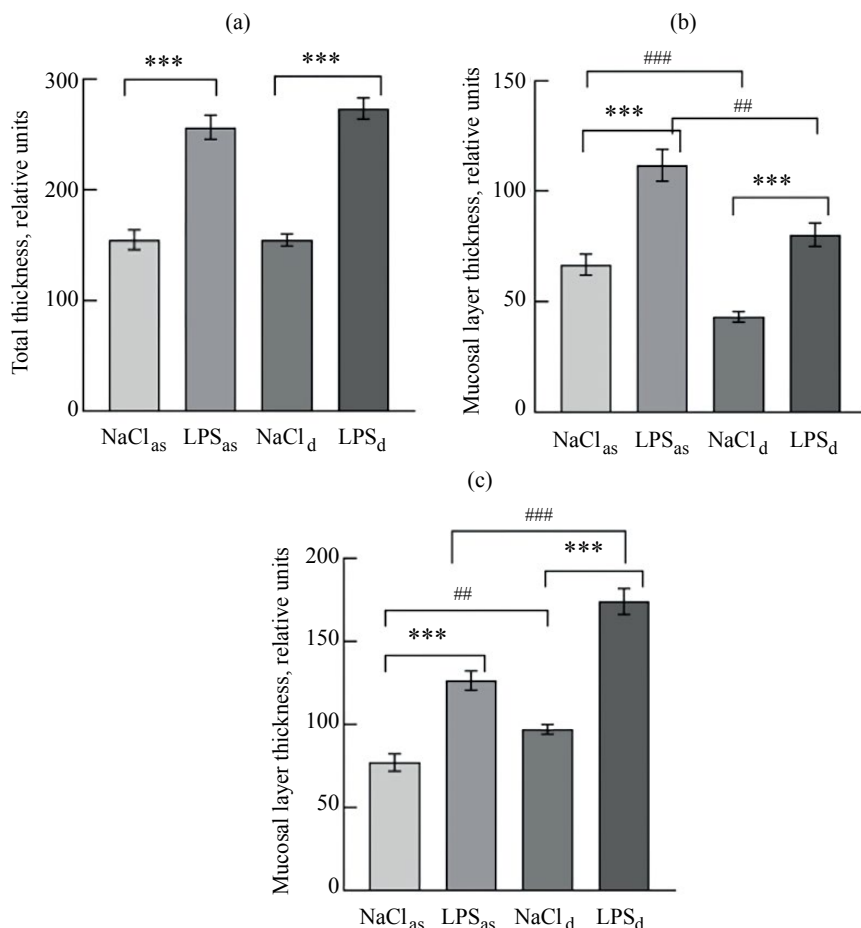


Рис. 3. Значения общей толщины стенки кишки (а), толщины мышечной оболочки (б) и толщины слизистой оболочки (с) восходящего и нисходящего отделов кишки. Данные представлены в относительных единицах. Различия достоверны: *** – $p < 0.001$, ### – $p < 0.001$, ## – $p < 0.01$ (однофакторный дисперсионный анализ); $n = 25$ для каждой группы. NaCl_{as} – контроль, восходящий отдел; NaCl_d – контроль, нисходящий отдел; LPS_{as} – экспериментальная группа, восходящий отдел; LPS_d – экспериментальная группа, нисходящий отдел.

В восходящем сегменте у контрольной группы (NaCl) толщина слизистой оболочки была достоверно больше, чем в нисходящем. Значения показателя составили соответственно 77.0 ± 5.2 и 97.0 ± 3.0 ($n = 25$ для каждого отдела, однофакторный дисперсионный анализ, $p < 0.01$). При действии ЛПС данный показатель статистически значимо увеличивался по сравнению с контролем, составив 126.4 ± 5.9 в восходящем отделе и 174.0 ± 7.8 в нисходящем отделе ($n = 25$ для каждого отдела, однофакторный дисперсионный анализ, $p < 0.001$) (рис. 2, 3с). Внутригрупповые различия в группе “ЛПС” достоверны, отмечалось увеличение толщины слизистого слоя в нисходящем отделе по сравнению с восходящим.

Исследование электрофизиологических характеристик в камере Уссинга. При сравнении величин ТЭС в группе “NaCl” в нисходящем отделе отмечались более низкие значения по сравнению с восходящим ($75 \pm 6 \text{ Ом} \times \text{см}^2$ vs $34 \pm 1 \text{ Ом} \times \text{см}^2$ соответственно,

U-критерий Манна–Уитни, $p < 0.001$) (рис. 4а, d). Значения тока “кз” восходящего отдела по сравнению с нисходящим отделом статистически достоверно не различались между собой (рис. 4b, e). Одновременно с этим в группе “NaCl” парацеллюлярная проницаемость была выше в нисходящем отделе по сравнению с восходящим (0.6 см/с vs 0.1 см/с соответственно, U-критерий Манна–Уитни, $p < 0.05$) (рис. 4с, f).

Введение ЛПС вызывало достоверное снижение ТЭС в восходящем отделе на 28 %, с $75.1 \pm 6.0 \text{ Ом} \times \text{см}^2$ до $53.6 \pm 8.0 \text{ Ом} \times \text{см}^2$ по сравнению с группой “NaCl” (U-критерий Манна–Уитни, $p < 0.01$) (рис. 4а). Кроме того, применение ЛПС приводило к значимому увеличению тока “кз” восходящего отдела кишки по сравнению с группой “NaCl” ($34 \pm 5 \text{ мкА}$ vs $20 \pm 3 \text{ мкА}$ соответственно, U-критерий Манна–Уитни, $p < 0.05$) (рис. 4b). Данные, полученные для нисходящего отдела, свидетельствуют о том, что при введении ЛПС изменений ТЭС не наблюдалось (рис. 4d). Одновременно с этим обнаружено увеличение тока “кз” в пять раз при введении ЛПС по сравнению с группой “NaCl” ($157 \pm 25 \text{ мкА}$ vs $28 \pm 7 \text{ мкА}$ соответственно, U-критерий Манна–Уитни, $p < 0.001$) (рис. 4е).

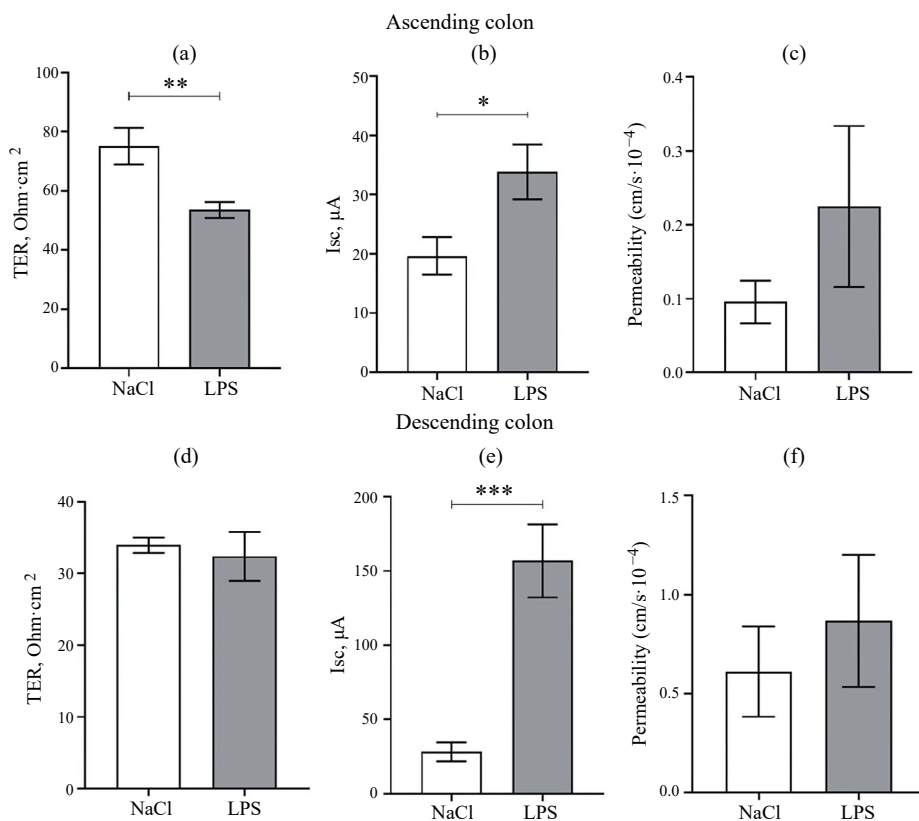


Рис. 4. Барьерные свойства восходящего (ascending) и нисходящего (descending) отделов толстой кишки у разных групп крыс. (а), (b) – Показатели ТЭС и тока “кз” в восходящем отделе толстой кишки; (d), (е) – показатели ТЭС и тока “кз” в нисходящем отделе толстой кишки; (с) – парацеллюлярная проницаемость для восходящего отдела толстой кишки; (f) – парацеллюлярная проницаемость для нисходящего отдела толстой кишки. Различия достоверны: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ (U-критерий Манна–Уитни). $n = 10$ для каждой группы. TER (ТЭС) – трансэпителиальное сопротивление, I_{sc} (ток “кз”) – ток “короткого замыкания”, $\mu\text{А}$ – микроампер, $\text{Ohm} \times \text{см}^2$ – $\text{Ohm} \times \text{см}^2$, LPS – липополисахарид.

При сравнении величин ТЭС восходящего отдела с нисходящим в состоянии эндотоксемии более низкие значения показателя характерны для нисходящего отдела ($54 \pm 3 \text{ Ом} \times \text{см}^2$ vs $32 \pm 3 \text{ Ом} \times \text{см}^2$, U-критерий Манна–Уитни, $p < 0.01$) (рис. 4а, d). При этом в нисходящем отделе отмечаются более высокие значения тока “кз” по сравнению с восходящим отделом ($157 \pm 25 \text{ мкА}$ vs $34 \pm 5 \text{ мкА}$ U-критерий Манна–Уитни, $p < 0.001$) (рис. 4б, е). В то же время ЛПС не изменял парацеллюлярную проницаемость для флуоресцеина натрия в обоих сегментах (рис. 4с, f).

Определение TRPA1 и TRPV1 в ткани толстой кишки методом вестерн-блот. При анализе результатов вестерн-блота по оценке уровня белков TRPA1 и TRPV1 была выявлена разница в интенсивности сигнала между экспериментальной и контрольной группами (рис. 5а, б).

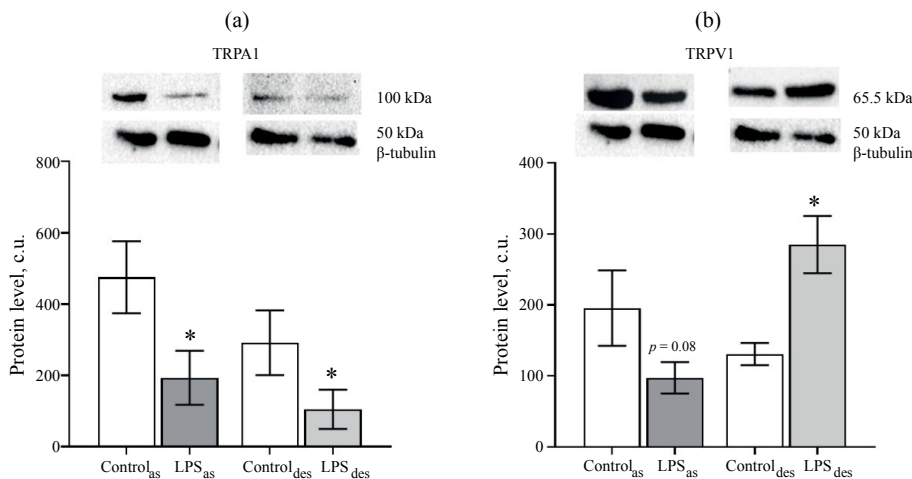


Рис. 5. Изменение уровня белков TRPA1 и TRPV1 в восходящем и нисходящем отделах кишки при действии ЛПС. (а) – Репрезентативные иммуноблоты и уровни TRPA1, (б) – репрезентативные иммуноблоты и уровни TRPV1. Интенсивность сигнала белков интереса нормализована по интенсивности сигнала β-тубулина в соответствующих образцах. Средние уровни тестируемых белков в образцах толстой кишки крыс из группы “NaCl” приняты за 100 %. Различия достоверны: * – $p < 0.05$ (U-критерий Манна–Уитни); $n = 4$ для каждой группы. NaCl_{as} – контроль, восходящий отдел; NaCl_d – контроль, нисходящий отдел; LPS_{as} – экспериментальная группа, восходящий отдел; LPS_d – экспериментальная группа, нисходящий отдел.

Так, при системном введении ЛПС уровень TRPA1 статистически значимо снижался как в восходящем, так и в нисходящем отделе толстой кишки по сравнению с соответствующими участками кишки контрольной группы (U-критерий Манна–Уитни, $p < 0.05$, $n = 4$ для каждого отдела) (рис. 5а). В восходящем отделе изменение уровня TRPV1 не выявлено (U-критерий Манна–Уитни, $p = 0.09$, $n = 4$) (рис. 5б). В то же время в нисходящем отделе системное введение ЛПС вызывал значительное (почти в 2 раза) увеличение уровня TRPV1 (U-критерий Манна–Уитни, $p < 0.05$, $n = 4$) (рис. 5б). Посегментное сравнение уровня TRPV1 и TRPA1 не выявило статистически значимых различий.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Развитие абдоминального болевого синдрома требует изучения молекулярных механизмов на разных стадиях его формирования, включая процесс инициации воспаления. Цель данного исследования заключалась в выяснении возможного включения

каналов TRPV1 и TRPA1 в процесс формирования абдоминальной гиперчувствительности в различных сегментах толстой кишки крысы при однократном системном введении ЛПС. Выяснение этого вопроса требует разработки методического подхода, который позволяет отделить системное действие ЛПС на болевую чувствительность от его влияния на функциональное состояние толстой кишки. Известно, что применение ЛПС ведет к снижению массы тела животных [11, 12]. В проведенных исследованиях при однократном введении ЛПС установлено уменьшение массы тела крыс в опытной группе, что свидетельствует об эффективности выбранной дозы. Важно было установить, достаточно ли этого введения, чтобы изменить болевую чувствительность в организме? Известно, что соматическая и висцеральная чувствительность взаимосвязаны между собой [19]. Для определения болевой чувствительности применяли тест “горячая и холодная пластина”, позволяющий комплексно оценить периферические и центральные механизмы развития болевой реакции [13]. Существенным для выбора данного метода являлось также функциональное разделение в активации TRP-каналов при действии различных температурных стимулов. При использовании прямой модели ЛПС-токсичности было необходимо оценить развитие соматический болевой чувствительности для последующей оценки возможных механизмов изменения уровня каналов TRPV1 и TRPA1. Известно, что TRPV1 активируется при повышении, а TRPA1 – при понижении температуры [4]. Полученные результаты показали, что болевой порог животных на холодовое и тепловое воздействие не изменялся у крыс после однократного системного введения ЛПС.

При однократном введении ЛПС ноцицепции в тестах “холодная и горячая пластина” не наблюдалось. Однако анализ ряда морфометрических показателей и электрофизиологических характеристик показывает, что введение ЛПС вызывает структурные и функциональные изменения в стенке толстой кишки уже через 24 ч после инъекции. В частности, изменились такие параметры как общая толщина стенки кишки, толщина мышечной и слизистой оболочки, а также проницаемость эпителия, что может указывать на дисфункцию кишечного барьера и развитие отека [20, 21]. Таким образом, примененное воздействие вызывает дисфункцию, что говорит об адекватности применяемой дозы при однократном введении ЛПС.

Следует учитывать имеющиеся данные о существенной разнице в распределении TRPV1 и TRPA1 вдоль оси толстой кишки в проксимально-дистальном направлении. Экспрессия TRPA1 преобладает в проксимальном, а TRPV1 в дистальном отделе толстой кишки [7]. В связи с этим было выдвинуто предположение о сегмент-специфическом включении этих каналов в инициацию процессов болевой чувствительности при дисфункции кишки.

В проведенной работе впервые было установлено, что при системном введении ЛПС уровень TRPA1 снижается в восходящем и нисходящем отделах толстой кишки по сравнению с соответствующими участками кишки животных контрольной группы. В то же время введение эндотоксина приводит к значительному увеличению уровня TRPV1 только в нисходящем сегменте кишки, что демонстрирует сегмент-специфические изменения уровня этих каналов в толстой кишке.

Представляют интерес возможные механизмы повышения уровня TRPV1 при действии эндотоксина. На сегодняшний день известно, что введение ЛПС может сенсibilизировать TRPV1 через механизм, опосредованный TLR4 (Toll-like receptor 4), тем самым способствуя возникновению боли, ассоциированной с воспалением [8, 9, 22]. Точные механизмы сегмент-специфических различий в уровне TRPV1, наблюдаемых в проведенном исследовании, не вполне ясны, но можно предположить, что они могут быть обусловлены изначально существующим различием в функциональной организации разных отделов толстой кишки, например, отличающимся по составу микробиома, разным функциональным состоянием эпителия, особенностями транспортных процессов в эпителии и т.д.

Снижение TRPA1 в обоих отделах толстой кишки представляет собой неожиданный результат, механизм которого требует дальнейшего изучения. Известно, что ЛПС является естественным активатором TRPA1-каналов [8, 9]. С этой точки зрения снижение уровня TRPA1 после однократного введения ЛПС, на первый взгляд, противоречит литературным данным, поскольку уменьшение количества этого белка должно приводить к ингибированию молекулярных механизмов, лежащих в основе воспаления и боли [23]. Действительно, в ряде исследований показано, что при воспалении уровень TRPA1 повышался, а его активность усиливалась под действием провоспалительных медиаторов, высвобождаемых при повреждении тканей [23, 24]. В свою очередь, TRPA1 может также распознавать ЛПС независимо от TLR4, приводя к острому воспалению и боли [23].

Однако надо учесть, что TRPA1 может демонстрировать не только провоспалительное, но и противовоспалительное действие в кишке [25–27]. В частности, в отношении его противовоспалительного действия имеются указания на то, что TRPA1 способствует снижению экспрессии нескольких провоспалительных нейропептидов, цитокинов и хемокинов, обуславливая уменьшение воспаления. Следовательно, снижение уровня TRPA1, которое было продемонстрировано в нашем исследовании, может отражать ингибирование защитной роли TRPA1 при патологическом процессе.

К тому же нельзя исключать тот факт, что каналы TRPA1 и TRPV1 способны образовывать гетеродимер и соактивироваться, что, предположительно, может способствовать возникновению новых синергических эффектов, в том числе приводя к ингибированию активации одного канала другим [28, 29]. При этом, как уже отмечалось выше, точные механизмы, за счет которых происходит снижение уровней TRPA1 в обоих сегментах толстой кишки на ранних стадиях воспаления, пока неизвестны, учитывая также тот факт, что TRPA1 локализуется преимущественно в восходящем отделе [7].

Несмотря на то, что активация каналов TRPA1 и их уровень в ткани кишки не обязательно взаимосвязаны, полученные результаты указывают на необходимость дальнейших исследований для прояснения этого вопроса. Кроме того, они формулируют новую проблему в оценке действия ЛПС на болевую чувствительность. Поскольку активация каналов при одновременном уменьшении их уровня в исследуемой структуре – это новое соотношение факторов, его необходимо учитывать при анализе молекулярных механизмов возникновения абдоминальной боли.

Также необходимо учитывать, что изменения/нарушения в функционировании TRPA1 и TRPV1 приводят к значительным изменениям в кишечной микробиоте, в частности к снижению ее разнообразия [30, 31]. Это отражается не только на количестве микроорганизмов, но и, что более важно, на развитии воспалительных и болевых процессов в кишке. Известно, что снижение микробного разнообразия ассоциировано с усилением воспалительных реакций и повышенной чувствительностью кишки к боли [31, 32]. Эти данные указывают на то, что изменения в уровнях TRPA1 и TRPV1 могут не только влиять на механизмы болевой чувствительности, но и оказывать значительное воздействие на микробиом, что в совокупности способствует развитию или подавлению воспалительных процессов.

Полученные результаты позволяют предположить, что разные отделы толстой кишки реагируют по-разному на воспалительные изменения, ассоциированные с системным введением ЛПС, а вариабельность уровней TRPA1 и TRPV1 отражает адаптивные механизмы, лежащие в основе ответа на воспаление, в том числе на начальной стадии, и обуславливает последующее формирование болевого синдрома. Учитывая важную роль TRPA1 и TRPV1 в трансдукции воспалительных и болевых сигналов [23, 24], можно сделать вывод, что разнонаправленное изменение их экспрессии и активности в различных сегментах кишки при системном введении ЛПС представляет собой возможный механизм, способствующий развитию висцеральной гиперчувствительности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возвращаясь к вопросу, поставленному в начале этого исследования, можно утверждать, что системное введение ЛПС уже на этапе инициации воспалительного процесса (через 24 ч) вызывает морфофункциональные изменения в стенке толстой кишки крыс. Также исследование впервые демонстрирует разнонаправленное изменение уровней TRPA1 и TRPV1 в восходящем и нисходящем отделах кишки при действии ЛПС, что подчеркивает важную роль этих каналов в раннем ответе на воспаление.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (К. А. Д., Е. Ю. Б., А. А. Ф. и А. Г. М.), сбор данных (К. А. Д., А. А. Ф. и Е. Ю. Б.), обработка данных (К. А. Д., А. А. Ф., Е. Ю. Б. и О. Н. П.), написание и редактирование манускрипта (К. А. Д., А. А. Ф., Е. Ю. Б., О. Н. П. и А. Г. М.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 24-25-00267).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям. Протокол исследования № 03/11 от 11 марта 2024 г. был составлен в соответствии с требованиями Директивы ЕС 2010/63/EU об экспериментах на животных и одобрен Комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dekel R, Drossman DA, Sperber AD* (2015) Abdominal Pain in Irritable Bowel Syndrome (IBS). In: Kapural L (ed) *Chronic Abdominal Pain: An Evidence-Based, Comprehensive Guide to Clinical Management*. Springer, New York, pp. 59–67.
2. *Li Y-C, Zhang F-C, Xu TW, Weng R-X, Zhang H-H, Chen Q-Q, Hu S, Gao R, Li R, Xu G-Y* (2024) Advances in the pathological mechanisms and clinical treatments of chronic visceral pain. *Mol Pain* 20: 17448069241305942. <https://doi.org/10.1177/17448069241305942>
3. *Ford AC, Vanner S, Kashyap PC, Nasser Y* (2024) Chronic Visceral Pain: New Peripheral Mechanistic Insights and Resulting Treatments. *Gastroenterology* 166: 976–994. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2024.01.045>
4. *Zhang M, Ma Y, Ye X, Zhang N, Pan L, Wang B* (2023) TRP (transient receptor potential) ion channel family: structures, biological functions and therapeutic interventions for diseases. *Signal Transduct Target Ther* 8: 261. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01464-x>
5. *González-Ramírez R, Chen Y, Liedtke WB, Morales-Lázaro SL* (2017) TRP Channels and Pain. In: Emir TLR (ed) *Neurobiology of TRP Channels*. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL), pp 125–148.

6. *Bharucha AE, Camilleri M* (2019) Physiology of the Colon and Its Measurement. In: Yeo CJ (ed) *Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, 2 Volume Set* (Eighth Edition). Elsevier, Philadelphia, pp 1676–1688.
7. *Evans C, Howells K, Suzuki R, Brown AJH, Cox HM* (2023) Regional characterisation of TRPV1 and TRPA1 signalling in the mouse colon mucosa. *Eur J Pharmacol* 954: 175897. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175897>
8. *Startek JB, Talavera K, Voets T, Alpizar YA* (2018) Differential interactions of bacterial lipopolysaccharides with lipid membranes: implications for TRPA1-mediated chemosensation. *Sci Rep* 8: 12010. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30534-2>
9. *Boonen B, Alpizar YA, Sanchez A, López-Requena A, Voets T, Talavera K* (2018) Differential effects of lipopolysaccharide on mouse sensory TRP channels. *Cell Calcium* 73: 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2018.04.004>
10. *Mazgaen L, Gurung P* (2020) Recent Advances in Lipopolysaccharide Recognition Systems. *Int J Mol Sci* 21: 379. <https://doi.org/10.3390/ijms21020379>
11. *Dickson K, Lehmann C* (2019) Inflammatory Response to Different Toxins in Experimental Sepsis Models. *Int J Mol Sci* 20: 4341. <https://doi.org/10.3390/ijms20184341>
12. *Korneev KV* (2019) Mouse Models of Sepsis and Septic Shock. *Mol Biol (Mosk)* 53: 799–814. <https://doi.org/10.1134/S0026898419050100>
13. *Yalcin I, Charlet A, Freund-Mercier M-J, Barrot M, Poisbeau P* (2009) Differentiating thermal allodynia and hyperalgesia using dynamic hot and cold plate in rodents. *J Pain* 10: 767–773. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2009.01.325>
14. *Jain P, Materazzi S, De Logu F, Rossi Degl'Innocenti D, Fusi C, Li Puma S, Marone IM, Coppi E, Holzer P, Geppetti P, Nassini R* (2020) Transient receptor potential ankyrin 1 contributes to somatic pain hypersensitivity in experimental colitis. *Sci Rep* 10: 8632. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65618-5>
15. *López-Estévez S, López-Torrellardona JM, Parera M, Martínez V* (2022) Long-lasting visceral hypersensitivity in a model of DSS-induced colitis in rats. *Neurogastroenterol Motil* 34: e14441. <https://doi.org/10.1111/nmo.14441>
16. *Traub RJ, Wang G* (2004) Colonic inflammation decreases thermal sensitivity of the forepaw and hindpaw in the rat. *Neurosci Lett* 359: 81–84. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.02.026>
17. *Slesarenko N, Komikova VA, Stepanishin VV* (2019) The morphofunctional characteristic of rodents' intestine. *Lab Anim Sci Rus* 2. <https://doi.org/10.29296/2618723X-2019-03-01>
18. *Markov AG, Fedorova AA, Kravtsova VV, Bikmurzina AE, Okorokova LS, Matchkov VV, Cornelius V, Amasheh S, Krivoi II* (2020) Circulating Ouabain Modulates Expression of Claudins in Rat Intestine and Cerebral Blood Vessels. *Int J Mol Sci* 21: 5067. <https://doi.org/10.3390/ijms21145067>
19. *Lyubashina OA, Sivachenko IB, Busygina II* (2020) Neurophysiological features of visceral and somatic pain. *Usp Fiz Nauk* 53: 3–14. <https://doi.org/10.31857/S0301179822020072>
20. *Bekusova V, Fatyykhov I, Amasheh S, Markov A* (2021) Heterogeneity of the barrier properties of the colon in rat. *Biol Communicat* 66: 160–170. <https://doi.org/10.21638/spbu03.2021.207>
21. *Di Vincenzo F, Del Gaudio A, Petito V, Lopetuso LR, Scaldaferri F* (2024) Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: a narrative review. *Int Emerg Med* 19: 275–293. <https://doi.org/10.1007/s11739-023-03374-w>
22. *Diogenes A, Ferraz CCR, Akopian AN, Henry MA, Hargreaves KM* (2011) LPS sensitizes TRPV1 via activation of TLR4 in trigeminal sensory neurons. *J Dent Res* 90: 759–764. <https://doi.org/10.1177/0022034511400225>
23. *Meseguer V, Alpizar YA, Luis E, Tajada S, Denlinger B, Fajardo O, Manenschijn J-A, Fernández-Peña C, Talavera A, Kichko T, Navia B, Sánchez A, Señaris R, Reeh P, Pérez-García MT, López-López JR, Voets T, Belmonte C, Talavera K, Viana F* (2014) TRPA1 channels mediate acute neurogenic inflammation and pain produced by bacterial endotoxins. *Nat Commun* 5: 3125. <https://doi.org/10.1038/ncomms4125>

24. Devesa I, Planells-Cases R, Fernández-Ballester G, González-Ros JM, Ferrer-Montiel A, Fernández-Carvajal A (2011) Role of the transient receptor potential vanilloid 1 in inflammation and sepsis. *J Inflamm Res* 4: 67–81.
<https://doi.org/10.2147/JIR.S12978>
25. Engel MA, Leffler A, Niedermirtl F, Babes A, Zimmermann K, Filipović MR, Izydorczyk I, Eberhardt M, Kichko TI, Mueller-Tribbensee SM, Khalil M, Siklosi N, Nau C, Ivanović-Burmazović I, Neuhuber WL, Becker C, Neurath MF, Reeh PW (2011) TRPA1 and substance P mediate colitis in mice. *Gastroenterology* 141: 1346–1358.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.07.002>
26. Kun J, Szitter I, Kemény A, Perkecz A, Kereskai L, Pohóczky K, Vincze A, Gódi S, Szabó I, Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Z (2014) Upregulation of the transient receptor potential ankyrin 1 ion channel in the inflamed human and mouse colon and its protective roles. *PLoS One* 9: e108164.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108164>
27. Bertin S, Aoki-Nonaka Y, Lee J, de Jong PR, Kim P, Han T, Yu T, To K, Takahashi N, Boland BS, Chang JT, Ho SB, Herdman S, Corr M, Franco A, Sharma S, Dong H, Akopian AN, Raz E (2017) The TRPA1 ion channel is expressed in CD4+ T cells and restrains T-cell-mediated colitis through inhibition of TRPV1. *Gut* 66: 1584–1596.
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310710>
28. Schwartz ES, Christianson JA, Chen X, La J-H, Davis BM, Albers KM, Gebhart GF (2011) Synergistic role of TRPV1 and TRPA1 in pancreatic pain and inflammation. *Gastroenterology* 140: 1283–1291.e1–2.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.12.033>
29. Fischer MJ, Edwardson JM (2014) V2A2lidating TRP channel heteromers. *Temperature* (Austin) 1: 26–27.
<https://doi.org/10.4161/temp.29548>
30. Nagpal R, Mishra SK, Deep G, Yadav H (2020) Role of TRP Channels in Shaping the Gut Microbiome. *Pathogens* 9: 753.
<https://doi.org/10.3390/pathogens9090753>
31. Zhang W, Lyu M, Bessman NJ, Xie Z, Arifuzzaman M, Yano H, Parkhurst CN, Chu C, Zhou L, Putzel GG, Li T-T, Jin W-B, Zhou J, JRI Live Cell Bank, Hu H, Tsou AM, Guo C-J, Artis D (2022) Gut-innervating nociceptors regulate the intestinal microbiota to promote tissue protection. *Cell* 185: 4170–4189.e20.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.09.008>
32. Foppa C, Rizkala T, Repici A, Hassan C, Spinelli A (2024) Microbiota and IBD: Current knowledge and future perspectives. *Dig Liver Dis* 56: 911–922.
<https://doi.org/10.1016/j.dld.2023.11.015>

Colonic Segment-Specific Effect of Lipopolysaccharide on TRPV1 and TRPA1 Levels in Rats

**K. A. Dvornikova^a, E. Yu. Bystrova^a, O. N. Platoniva^a, A. A. Federova^{a, b},
and A. G. Markov^{a, b, *}**

^aPavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

^bDepartment of General Physiology, Faculty of Biology, St. Petersburg, Russia

**e-mail: markovag@infran.ru*

One of the most pressing issues in visceral physiology is the investigation of the molecular mechanisms behind pain signal interoception. Chronic abdominal pain is a type of pain sensitivity that arises during gastrointestinal disorders and frequently persists after they are healed. Abdominal pain syndrome is caused by molecular alterations in the intestinal wall, the specifics of which are still unknown. TRPV1 and TRPA1 are transient receptor potential (TRP) channels found in enteric nervous system nerve cells that contribute to the development of visceral pain and hypersensitivity perception. The rat colon's uneven distribution of channels along its proximal-distal axis suggests they may be involved in the initial stages of abdominal pain sensitivity. The goal of the present study was to evaluate segment-specific alterations in TRPV1 and TRPA1 channel levels after inflammation is initiated by a single lipopolysaccharide (LPS) dose. The study used the "cold and hot plate" pain sensitivity test, morphometric analysis methods, recording of electrophysiological parameters in the Ussing chamber, and Western blotting to assess the TRPA1 and TRPV1 protein expression. The results of this research show that a unitary administration of LPS leads to diminished TRPA1 levels in both the ascending and descending colons. No variations in TRPV1 levels were found in the ascending colon, but a significant rise was recorded in the descending colon. There were no observed changes in nociception in "cold and hot plate" test. Thus, a segment-specific alteration in the levels of TRPA1 and TRPV1 channels was established in the direct model of LPS toxicity.

Keywords: interoception, visceral sensitivity, lipopolysaccharide, inflammation, colon, TRPV1, TRPA1