

С. Н. Белугин

УМЕНЬШЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ КАЛИЕВЫХ ТОКОВ ИЗОЛИРОВАННЫХ 4-АМИНОПИРИДИНОМ В НЕЙРОНАХ NTS КРЫС С ПОЧЕЧНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Белорусский государственный медицинский университет

Проведен сравнительный анализ инактивируемых калиевых токов (ИКТ) чувствительных к 4-аминопиридину (4-АП) в пэтч-кламп экспериментах на нейронах NTS у крыс при нормотензии и при почечной форме гипертензии. Обнаружено уменьшение плотности чувствительных к 4-АП ИКТ в нейронах NTS крыс с 4-недельной почечной гипертензией. Изменения ИКТ чувствительных к 4-АП в мембране нейронов NTS при почечной гипертензии вероятно отражают долговременные изменения гиперполяризующих эффектов данных калиевых токов и возбудимости нейронов сердечно – сосудистого центра.

Нейроны ядра одиночного тракта (*Nucleus Tractus Solitarius, NTS*) обеспечивают начальный анализ в

мозге афферентной информации от висцеральных рецепторов, в том числе и от артериальных барорецепторов. Инак-

тивируемая потенциал-зависимая калиевая проводимость является гиперполяризующей составляющей ионной проводимости мембраны нейронов *NTS* и проявляется инактивируемыми калиевыми токами (ИКТ), известными также как калиевые А-токи, с постоянной времени инактивации 10 – 200 мс [1]. В центральных нейронах барорефлекторного звена дорзального отдела *NTS* величина ИКТ влияет на задержку возбуждения (до нескольких сотен миллисекунд) в ответ на деполяризующий стимул или афферентную стимуляцию [1,2]. Ухудшение ИКТ в нейронах *NTS* при ренальной форме гипертензии сопровождается уменьшением задержки возбуждения [2], что нашло подтверждение и при генетической форме гипертензии крыс (SHR) [3]. Известно также, что микроинъекция антагониста калиевых А-токов 4-аминопиридина (4 – АП) в *NTS* приводит к ослаблению барорефлекторной регуляции [4]. Пока не определены типы калиевых каналов ответственных за ИКТ в *NTS*. Исследования в этом направлении предполагают фармакологическое выделение и изучение ИКТ при помощи 4 – АП. Целью настоящего исследования было изучение ИКТ чувствительных к 4 – АП в *NTS* нейронах при почечной гипертензии у крыс. Симуляция нейрональной активности применена для уточнения роли инактивируемого калиевого компонента ионной проводимости для задержки возбуждения.

Материал и методы

Эксперименты выполнены на 13 крысах (2-3-месячные) самцах, линии Sprague-Dawley (375 – 500 г, Charles River Laboratories). Анестезия крыс произведена медетомидином и кетаминном (0,5 мг/кг и 75 мг/кг, в.б. соответственно). Гипертензия (ГТ) была индуцирована частичной односторонней перевязкой почечной артерии с контралатеральной нефрэктомией [5].

Нормотензивных крыс (НТ, $n=7$) анестезировали аналогичным образом. НТ крысам производили одностороннюю нефрэктомию, контралатерально почку не перевязывали. При завершении хирургических процедур анестезию прерывали атипамезолом (1 мг/кг, в.б.).

Эксперименты выполнены через 28-35 дней (4-недельная гипертензия) после перевязки почки. За 2 дня перед экспериментом артериальный катетер помещался в бедренную артерию пока животное находилось под медетомидин/кетаминной анестезией. После двухдневного восстановительного периода кровяное давление измеряли у бодрствующей крысы в условиях ее свободного поведения путем подсоединения артериального катетера к преобразователю давления (Kobe) и устройству для визуализации McLab/Cambridge Electronic Design A/D. Контроль за кровяным давлением производился в течение 3 часов, в течение третьего часа вычислялся индекс среднего артериального давления (САД). У ГТ крыс САД составило $179,0 \pm 12,5$ мм рт.ст. ($n=6$, $M \pm SEM$).

В день эксперимента крысы были ингаляционно анестезированы изофлюраном и ствол мозга быстро извлекался и располагался в ледяном буфере Кребса (5°C). Ствол мозга нарезался вибратором (Warner Instrument Corp.) на поперечные срезы толщиной 440 микрон в области *calamus scriptorius*. Срезы инкубировали в PIPES буфере с триспином (Sigma, тип XI, 3-5 мг/10 мл) 55 мин при 34°C. После ферментной обработки, срезы трехкратно промывали в инкубационном растворе и сохраняли при комнатной температуре (22°C) в постоянно оксигенируемом PIPES буфере. Срезы ствола мозга располагали на стеклянной поверхности и область *NTS* иссекали. Участок *NTS* механически разбивали в DMEMS буфере. Аликвоту нейрональной суспензии в DMEMS помещали в перфузионную камеру для осаждения клеток на 5 минут. Перфузию клеток в камере производили раствором, состоящим из (ммоль/л): NaCl, 140; D-глюкоза, 33; HEPES, 10; KCl, 3; CaCl₂, 2; MgCl₂, 1,2 (pH 7,4; осмоляльность 305-320 мОсмоль). Раствор для тестирования калиевых токов подавался

непосредственно на клетку при помощи двухканальной стеклянной пипетки и состоял из (ммоль/л): NaCl, 132; D-глюкоза, 33; HEPES, 10; KCl, 3; MgCl₂, 2; TTX, 0,5 мкмоль/л (Sigma, St.Louis, Mo, USA). В перфузионный раствор для тестирования калиевых токов добавлялся также 4 – аминопиридин (4 – АП), 5 ммоль/л.

Регистрацию мембранных токов производили методом «пэтч-кламп» в конфигурации «вся клетка» (содержимое электрода сообщается с цитоплазмой клетки) на диссоциированных нейронах *NTS*. Данный метод позволяет регистрировать изменения трансмембранного ионного тока всей клетки при фиксации на заданном уровне мембранного потенциала – «вольт-кламп». Электроды для «пэтч-кламп» регистрации изготавливали из кварцевых капиллярных трубок (1,0 мм внешний диаметр и 0,7 мм внутренний диаметр) вытянутых в лазерном пуллере Р – 200 (Sutter Instrument Co.). Электроды заполняли электродным раствором, который состоял из (ммоль/л): KCl, 140; MgCl₂, 2; EGTA, 10; ГТФ, 0,1; АТФ, 4; цАМФ, 0,1; HEPES, 10 (pH 7,2; осмоляльность 280 – 300 мОсмоль). Электроды имели сопротивление 3 – 8 Мом при тестировании в перфузионном растворе.

Эксперименты производили с использованием интегрирующего усилителя Axopatch-200B (Axon Instruments, Foster City, CA) и pCLAMP компьютерных программ (версия 8.1 Axon Instruments) на персональном компьютере класса Pentium. Формировался «seal» – гигаомный контакт электрода с мембраной клетки, после чего с помощью отрицательного давления образовывали пригодную для регистрации калиевых токов конфигурацию «вся клетка». В «вольт-кламп» экспериментах регистрируемые ионные токи пересчитывали на плотность тока (пА/пФ) с целью нормализации показателей полученных от клеток разных размеров. Регистрация токов осуществлялась в полосе частот менее 1 кГц, с частотой разрешения при хранении – 5 кГц.

Последовательное сопротивление составило менее 15 Мом и компенсировалось на 40-70%. Перед каждой регистрацией мембранный тест производился с тем, чтобы иметь подтверждение стабильности суммарного сопротивления электрод-клетка. «Вольт-кламп» протоколы для анализа активационной кинетики выходящих токов состояли из прямоугольных стимулов-сдвига мембранного потенциала от исходного фиксируемого значения (– 110 мВ или – 40 мВ, 400 мс) до одного из значений в диапазоне – 70 ~ +70 мВ (400 мс, через каждые 20 мВ) (см. фрагменты протокола рис.1). Равновесный потенциал (E_k) оценивался при регистрации следовых деактивационных компонентов выходящих токов. При 3 ммоль KCl $E_k = -83 \pm 2$ мВ для нейронов ($n=19$) НТ крыс и $E_k = -81 \pm 2$ ммоль для нейронов ($n=15$) ГТ крыс. При 20 ммоль KCl $E_k = -54 \pm 9$ мВ ($n=3$).

Вычитание токов утечки и анализ данных производился после завершения эксперимента с использованием Clampfit Software (Axon) и Sigma Plot 8.1.

Нанесение растворов для тестирования калиевых токов на клетки производили через двухканальную стеклянную пипетку спустя 5 мин от момента образования конфигурации «вся клетка». Положение двухканальной стеклянной пипетки (внутренний диаметр каждого канала 0,5 мм) контролировали скоростным ступенчатым перфузионным устройством (Warner Perfusion Fast-Step, Warner Instrument Corp.). Каждый канал пипетки был соединен силиконовой трубкой с клапанной системой, регулирующей доступ к растворам без 4 – АП и с 4 – АП. Первый канал пипетки располагался в непосредственной близости от клетки, перпендикулярно перфузионному потоку в камере. Раствор без 4 – АП, но содержащий тетрадоксин блокировал генерацию потенциалов действия и предотвращал доступ 4 – АП из второго канала пипетки. Для подачи 4 – АП в программе протокола выставлялся цифровой сигнал, посылаемый на Warner Perfusion Fast-Step, что позволяло производить подачу перфузионного раствора с 4 – АП путем изменения положения канала пипетки, и одновре-

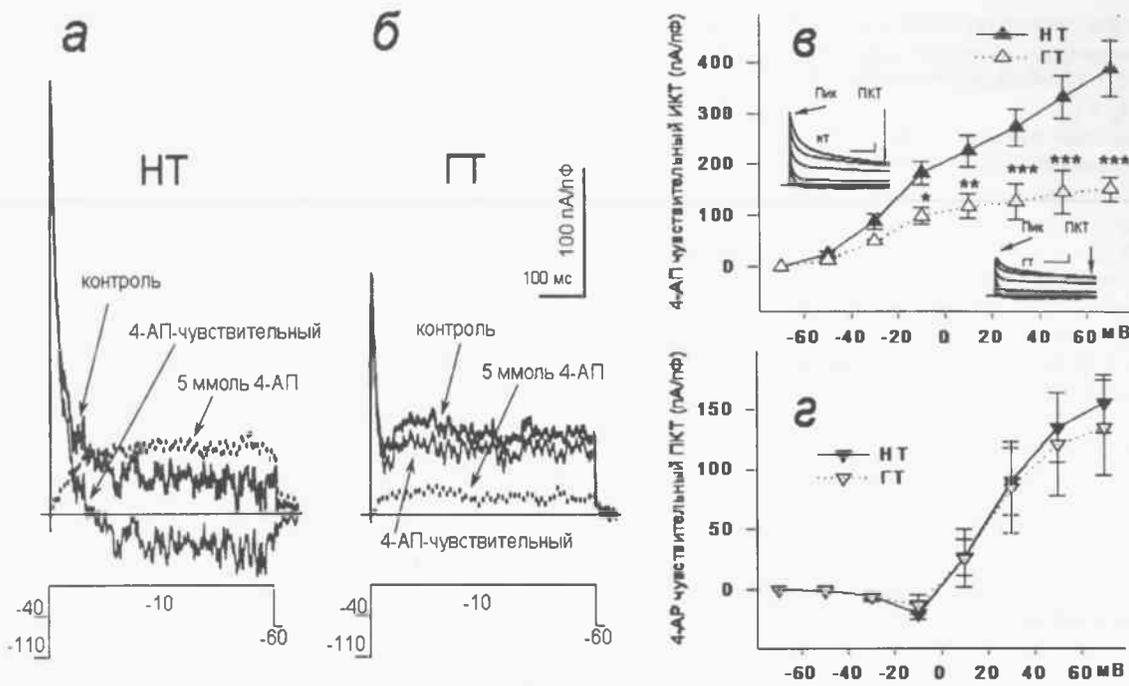


Рис. 1. Инактивируемые калиевые токи (ИКТ, —) чувствительные к 4-АП в нейронах NTS HT (а) и ГТ (б) крыс. в – плотность чувствительных к 4-АП ИКТ (разница между пиковым значением и ПКТ, см. вставки) в нейронах HT (▲) и ГТ (△) крыс. г. – плотность чувствительных к 4-АП ПКТ в нейронах HT (▼) и ГТ (▽) крыс.

менно регистрировать клеточные входящие калиевые токи. После заданного интервала времени пипетка автоматически возвращается в исходное положение.

В конфигурации «вся клетка» при исключении из внеклеточного солевого раствора ТТХ и добавлении 2 ммоль $CaCl_2$ регистрировали колебания мембранного потенциала при сохранении неизменным суммарного значения трансмембранных ионных токов - «ток-кламп». В «ток-кламп» экспериментах использована обуславливающая гиперполяризация нейрона током (-100 пА, 500 мс) с последующим прямоугольным деполяризующим воз-

оде45. Симулированный нейрон NTS представлял собой одиночный компартмент с мембранной емкостью ($C_m=1$ мкФ/см²) находящейся в параллельной цепи с потенциал- и время-зависимыми ионными проводимостями. В расчет принимали: обуславливающую гиперполяризацию (-140 мВ), деполяризующее воздействие на мембрану нейрона (40 пА), четыре потенциал-зависимые ионные проводимости и ионную проводимость утечки. Расчет симулированной активности производили по формуле:

$$dV_m/dt = (I_{app} - I_{Na}(V_m, t) - I_{Kf}(V_m, t) - I_{Ks}(V_m, t) - I_{Kl}(V_m, t) - I_L(V_m, t)) / C_m \quad (1)$$

где I_{app} – деполяризующий ток; I_{Na} – натриевый ток; I_{Kf} – калиевый ток с быстрой кинетикой инактивации; I_{Ks} – калиевый ток с медленной кинетикой инактивации; I_{Kl} – калиевый неинактивируемый ток; I_L – ток утечки.

$$I_x(V_m, t) = G_{max}^x a^k b(V_m, E_x) \quad (2)$$

где I_x – ионный ток (пА), G_{max}^x – максимальная проводимость (наносименсы, нС); E_x – равно-

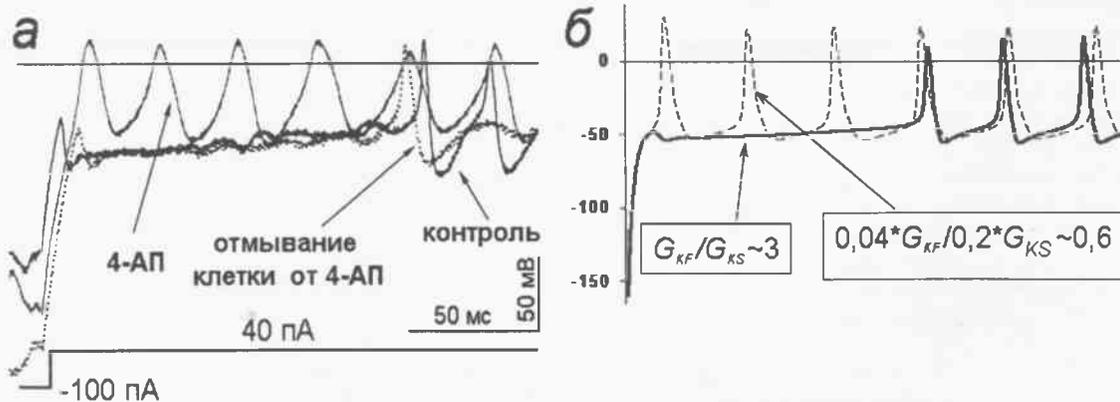


Рис.2. а – эффект 4-АП (—) на электрическую активность нейрона NTS в ток-кламп протоколе. В контрольной записи и после отмыывания клетки от 4-АП отмечается задержка возбуждения, блокируемая при перфузии 4-АП. б – симуляция электрической активности нейрона NTS при уменьшении констант максимальной проводимости по ИКТ (- - -) с быстрой ($\tau=15$ мс, G_{KF}) и медленной ($\tau=300$ мс, G_{KS}) динамикой инактивации.

весный потенциал для соответствующего иона (x); a – «воротная» функция активации; b – «воротная» функция инактивации (только для I_{Na} , I_{Kf} и I_{Ks}); k – коэффициент кооперативности (4 – для I_{Kf} и I_{Ks} ; 2 – для I_{Na} и I_{Kf}).

Поскольку «воротные» функции активации и инактивации являются как потенциал-зависимыми, так и зависимыми от времени, то их изменения описывали дифференциальным уравнением первого порядка:

$$dy/dt = (y_{\infty} - y)/\tau, (3)$$

где y – соответствующая «воротная» функция (a или b), y_{∞} – устойчивое значение «воротной» функции при стабильных значениях мембранного потенциала (a_{∞} или b_{∞} соответственно); τ – постоянная времени активации или инактивации соответственно. Значения «воротных» функций a_{∞} и b_{∞} описывались уравнениями:

$$a_{\infty} = (1 + \exp^{-((V_m + V_h)/V_c)})^{-1} \text{ («воротная» функция устойчивой активации), (4)}$$

$$b_{\infty} = (1 + \exp^{((V_m + V_h)/V_c)})^{-1} \text{ («воротная» функция устойчивой инактивации), (5)}$$

где V_h – значение мембранного потенциала соответствующее 50% от максимального значения проводимости (в протоколах для тестирования устойчивой активации), мВ; V_h' – значение мембранного потенциала, соответствующее 50% от максимального значения тока (в протоколах для тестирования устойчивой инактивации), мВ; V_c и V_c' – параметры наклона сигмоид «воротных» функций устойчивой активации и устойчивой инактивации соответственно (мВ).

Для получения симулированной активности одиночного нейрона (1) в уравнениях (2) – (5) использованы собственные экспериментальные данные амплитудно-кинетических характеристик ионных токов изолированных нейронов NTS [2, 6].

Все данные в настоящем исследовании представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка средней ($M \pm SEM$). Ток-потенциал зависимости сравнивали методом «two-way» ANOVA посредством Fisher (LSD) «post hoc» тестирования. Для сравнительного анализа использовался t-критерий «two-tailed» по Student. Различия принимали как достоверные если $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

После обуславливающей гиперполяризации (-110 мВ, 400 мс) деполяризацией мембраны нейронов NTS индуцируются одновременно, как неинактивируемые, так и инактивируемые калиевые токи (ИКТ). Обуславливающая фиксация мембранного потенциала -40 мВ позволяет индуцировать последующей деполяризацией только неинактивируемые калиевые токи (НКТ). Цифровое вычитание значений НКТ из суммы калиевых токов позволяет выделить ИКТ (рис.1.а, б, контрольные записи). Разность между пиковым значением тока и значением тока через 400 мс использовалась в качестве количественного значения ИКТ. Наличие ИКТ в клетках NTS рассматривали как электрофизиологический признак нейронов барорефлекторного звена [1]. Подача не клетку раствора с 4 – АП (5 ммоль/л) приводила к блокированию ИКТ (рис.1.а, б). Последующее цифровое вычитание из контрольных значений ИКТ калиевых токов нечувствительных к 4 – АП токов использовано для сепарирования чувствительных к 4 – АП ИКТ (рис.1.а, б).

Величина ИКТ чувствительных к 4 – АП была значительно ниже в NTS нейронах ($n=8$) ГТ крыс по сравнению с NTS нейронами ($n=12$) НТ крыс (ANOVA, $P < 0,001$) (рис.1.в). Данное отличие носило потенциал-зависимый характер.

Чувствительные к 4 – АП потенциал-зависимым калиевые А – токи могут быть результатом активации в нейронах калиевых каналов: Kv1.4, Kv3.4 и группы Kv4 [7]. Прессорный эффект при микроинъекции 4 – АП в NTS [4] указывает на роль ИКТ для функционального состояния нейронов данной зоны мозга и по-

зволяет предполагать наличие связи стойкого понижения ИКТ в нейронах NTS с особенностями барорефлекторной регуляции артериального давления в условиях повышенного САД. Проявление ИКТ зависит от динамики колебаний суммы возбуждающих и тормозных постсинаптических потенциалов, поскольку длительность и величина гиперполяризации мембраны важны для восстановления от инактивации каналов, а скорость и степень деполяризации мембраны важны для возникновения А-токов, имеющих достаточно быструю кинетику убывания. Динамика колебаний возбуждающих и тормозных постсинаптических потенциалов в нейронах NTS определена, в частности, сенсорным потоком от висцерорецепторов, который повышен при стойкой гипертензии от сосудистых барорецепторов [8]. Уменьшение плотности чувствительных к 4 – АП ИКТ в нейронах NTS при 4 недельной почечной гипертензии возможно сопряжено с повышенной синаптической активностью, вызванной особенностью афферентных стимулов, в том числе и от центральных структур в процессе развития стойкой гипертензии. Однако детали внутриклеточных механизмов модулирующих ИКТ в нейронах NTS в зависимости от сенсорного потока и уровня циркулирующих, и локально вырабатываемых сигнальных молекул (ангиотензин II, ГАМК и др.) еще предстоит выяснить.

Количество нейронов в NTS с мультиспайковой активностью сравнительно больше после стимуляции аортального нерва у крыс с почечной формой гипертензии, чем при нормотензии [9], что свидетельствует об изменениях нейрональной возбудимости в NTS. Уменьшение ИКТ в нейронах NTS при гипертензии вероятно способствует повышению возбудимости нейронов. Подтверждением существования прямой связи возбудимости нейрона и способности данного нейрона проявлять ИКТ является эффект 4 – АП на нейрональную активность в «ток-кламп» протоколе на диссоциированных нейронах NTS: сокращение времени задержки возбуждения и характерное изменение формы потенциала действия (расширение спайка и замедление реполяризации) (рис.2.а). Используя подход математической симуляции активности одиночного нейрона удалось воспроизвести в модели колебания мембранного потенциала (для таких же условий, как и в «ток – кламп» протоколе) прямую зависимость времени задержки первого спайка от инактивируемой калиевой проводимости (I_{Kf} и I_{Ks}) (рис.2.б). Более подробная информация по субъединичному составу калиевых каналов нейронов NTS может помочь в определении механизмов изменений ИКТ при гипертензии.

Вывод. Уменьшение экспрессии чувствительных к 4 – АП ИКТ в нейронах NTS крыс с 4 недельной почечной гипертензией отражает вероятно долговременные изменения возбудимости нейронов сердечно – сосудистого центра.

Литература

1. Bailey, T.W., Jin, Y.H., Doyle, M.W., Andresen, M.C. // J. Neurosci. 2002. Vol.22. P.8230-8237.
2. Belugin, S., Miffin, S. // J. Neurophysiol. 2005. Vol.94. N.6. P.3849 – 3859.
3. Sundaram, K., Johnson, S. M., Felder, R.B. // Neurosci. Lett. 1997. Vol.225. P.205 – 209.
4. Butcher, J.W., Paton, J. F. R. // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 1998. Vol. 274, R677 – R685.
5. Grollman, A. // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1944. Vol.57. P.102 – 104.
6. Белугин, С. Н., Белугина, О.С., Миффлин, С. В. // Доклады НАН Беларуси. 2006. Т. 50. № 6. С. 90 – 95.
7. Coetzee, W.A., Amarillo, Y., Chiu, Y., Chow, A. et al // Ann. NY Acad. Sci. 1999. Vol.868. P. 233 – 285.
8. Miffin, S. W. // News Physiol. Sci. 2001. Vol.16. P.266 – 271.
9. Zhang, J., Miffin, S.W. // Hypertension. 2000. Vol. 35. P. 430-436.