

С. Н. Белугин

Особенности экспрессии калиевых токов и ГАМК-а рецептор-зависимых ответов в нейронах NTS при почечной гипертензии

Белорусский государственный медицинский университет

В каждом из исследованных нейронов NTS нормотензивных и гипертензивных крыс зарегистрированы методом “patch-clamp” калиевые и хлорные токи. Выявлено понижение инактивируемых калиевых токов (ИКТ), а также смещение концентрационной зависимости амплитуды бикикулин-чувствительных хлорных токов индуцируемых ГАМК «вправо» в нейронах NTS гипертензивных крыс. Наблюдаемое уменьшение ИКТ и ослабление ГАМК-А рецептор-зависимых хлорных токов предполагает ограничение гиперполяризующей роли калиевой и хлорной проводимостей в NTS при негенетической, почечной форме гипертензии. Ключевые слова: особенности экспрессии, гипертензия.

Инактивируемые потенциал-зависимые калиевые токи (ИКТ) являются одной их отличительных характеристик нейронов центрального звена барорефлекса в дорзомедиальной зоне Nucleus Tractus Solitarius (NTS) [1]. Микроинъекция в NTS 4-аминопиридина (4-АП, антагониста ИКТ) ослабляет барорефлекторную регуляцию частоты сердечных сокращений [2]. Большинство нейронов NTS проявляют также хлорную проводимость, гиперполяризующую мембрану при активации гамма-аминомасляной кислотой (ГАМК) ионотропных ГАМК-А (GABA-A) рецепторов [3]. Активация ГАМК-А рецепторов в NTS сопровождается прессорным эффектом [4]. Из-за проявления инактивационных свойств ИКТ при значениях мембранного потенциала – 50 – 60 мВ гиперполяризация мембраны нейрона является необходимым условием для восстановления калиевой проводимости. Учитывая зависимость проявления ИКТ от гиперполяризационных (тормозных) процессов в мембране нейронов, обращает на себя внимание выявленное ранее в самостоятельных сериях экспериментов ухудшение, как ИКТ [5], так и ГАМК-А-зависимого торможения в нейронах NTS при почечной форме гипертензии [6]. Изменения ИКТ и гиперполяризующих эффектов ГАМК могут быть в ряду свидетельств адаптивных изменений центральных механизмов барорефлекса при стойком повышении артериального давления.

Целью настоящего исследования было тестирование и проведение сравнительного анализа ИКТ в диссоциированных нейронах NTS нормотензивных и гипертензивных крыс. Нейроны NTS для анализа ИКТ отбирались по наличию индуцируемого гамма-аминомасляной кислотой хлорного тока, блокируемого бикикулином.

Материал и методы

Эксперименты выполнены на 17 взрослых крысах (1-3х месячные) самцах, Sprague-Dawley линии (375-500 г, Charles River Laboratories), которых содержали по 2 в клетке в комнате для лабораторных животных со

свободным доступом к пище и воде. Все крысы имели по одной неделе для акклиматизации перед их использованием в экспериментах. Анестезию крыс проводили медетомидином (0,5 мг/кг, Pfizer) и кетаминем (75 мг/кг, Fort Dodge Laboratory) в асептических условиях, внутривентриально (в.б.). Гипертензия индуцирована путем частичной односторонней перевязки почки с контралатеральной нефрэктомией [7].

Нормотензивные крысы (НТ, 9 крыс) анестезированы аналогичным образом. НТ крысам производили одностороннюю нефрэктомию без перевязки контралатеральной почки (sham-операция). При завершении хирургических процедур анестезию прерывали атипамезолом (Pfizer, 1 мг/кг, в.б.). Первые 2-5 дней после операции крысам в качестве анальгезии вводился внутримышечно нубаин.

Эксперименты выполнены через 28 – 35 дней (4 недельная гипертензия, 8 крыс) после перевязки почки. За 2 дня перед экспериментом артериальный катетер помещался в бедренную артерию крысы под медетомидин/кетаминовой анестезией (0,5 мг/кг и 75 мг/кг, соответственно, в.б.). После двухдневного восстановительного периода кровяное давление измеряли у бодрствующих крыс в условиях их свободного поведения путем подсоединения артериального катетера к преобразователям давления Kobe и McLab/Cambridge Electronic Design A/D. Кровяное давление контролировали 3 часа и данные значений давления за последний час пересчитывали в индекс среднего артериального давления (САД). У 8 гипертензивных крыс (ГТ) САД составило $186,1 \pm 8,3$ мм рт.ст.

В день эксперимента крыс ингаляционно анестезировали изофлюраном, ствол мозга извлекали и располагали в ледяном буфере Кребса (50С). Ствол мозга нарезался вибротомом (Warner Instrument Corp.) на поперечные срезы толщиной 440 мкм в области calamus scriptorius. Срезы инкубировали в PIPES (piperazine-N, N'-bis-(2-ethanesulfonic acid)) буфере с трипсином (Sigma, тип XI, 3-5 мг/10 мл) 60 мин при 340С. После ферментной обработки, срезы трехкратно промывали в инкубационном растворе и сохраняли при комнатной температуре (220С) в постоянно оксигенируемом PIPES буфере. Срезы ствола мозга располагали на стеклянной поверхности, область NTS иссекали лезвием скальпеля. Участок NTS механически разбивали в DMEMS (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GibcoBRL) буфере с помощью отполированной на огне стеклянной пипетки. После разбивки аликвоту нейрональной суспензии в DMEMS помещали в перфузионную камеру для осаждения клеток в течение 5 минут, после чего перфузию клеток проводили раствором содержащим (ммоль/л): NaCl, 140; D-глюкоза, 33; HEPES (N(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)), 10; KC, 1,3; CaCl₂, 1,5; MgCl₂, 1,2 (pH=7,4, осмоляльность 315 – 330 мосмоль/л). Все нейроны изучались в течение 6 часов после диссоциации.

Регистрацию ионных токов проводили при фиксации мембранного потенциала методом «patch-clamp» в конфигурации «вся клетка» (содержимое электрода сообщается с цитоплазмой клетки) на диссоциированных нейронах NTS.

Протокол для анализа выходящих калиевых токов состоял из прямоугольного стимула +10 мВ (500мс), который следовал за обуславливающей фиксацией мембранного потенциала: – 110 мВ (протокол «А»), и – 40 мВ (протокол «Б») (рис.1, а, вставка).

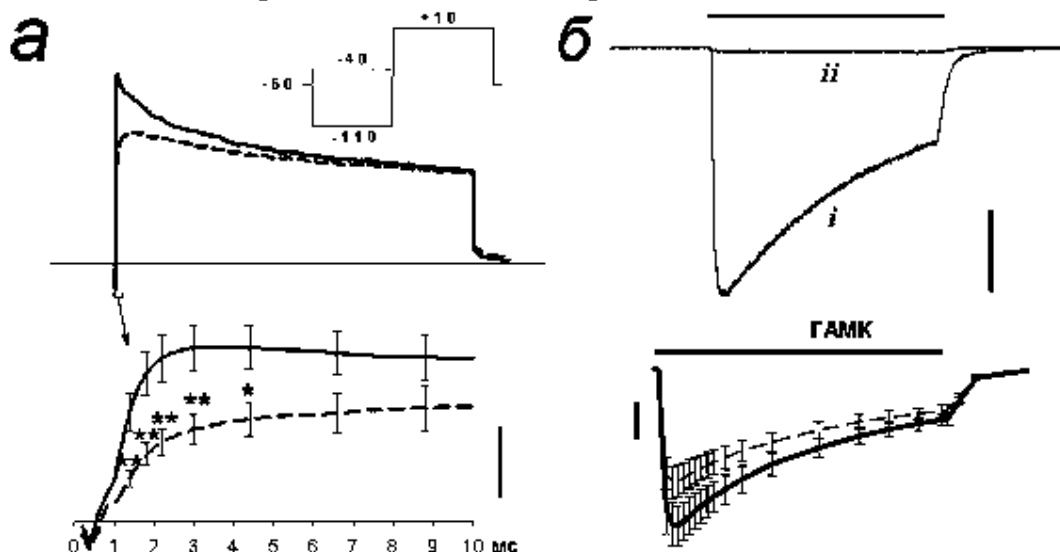


Рис.1. Калиевые токи (а) в NTS нейронах имеющих хлорную проводимость (б,г) в ответ на ГАМК (0,1 ммоль, 5 с), и блокируемую биккулином (б,г). а – усредненные кривые калиевых токов (при +10 мВ, 500 мс) нейронов НТ (—, n=15) и ГТ (---, n=13) крыс. Записи калиевых токов получены путем цифрового вычитания значений токов протокола с обуславливающим стимулом –40 мВ (см.вставку) из значений токов протокола с обуславливающим стимулом –110 мВ. б – усредненные кривые хлорных токов (нижний график) нейронов НТ (—, n=15) и ГТ (---, n=13) крыс. * – P < 0,05, ** – P < 0,01. Вертикальные отрезки: 0,1 нА/пФ

Электроды изготовляли из кварцевых капиллярных трубок (1,0 мм внешний диаметр и 0,7 мм внутренний диаметр) вытянутых в лазерном пуллере Р-200 (Sutter Instrument Co.). Электродный раствор содержал (ммоль/л): KCl, 140; MgCl₂, 2; EGTA, 10; ГТФ, 0,1; АТФ, 4; цАМФ, 0,1; NEPES, 10 (pH=7,2, осмоляльность 280 – 300 мосмоль/л). Пипеточные электроды заполненные раствором имели сопротивление 3 – 9 Мом при тестировании в перфузионном растворе. Эксперименты проведены с использованием интегрирующего усилителя Axopatch-200В (Axon Instruments, Foster City, CA) и pCLAMP компьютерных программ (версия 8.1 Axon Instruments) на персональном компьютере класса Pentium. Сначала формировали «seal» – гигаомный контакт электрода с мембраной клетки, при котором содержимое электрода изолировано от цитоплазмы клетки фрагментом мембраны. С помощью отрицательного давления «seal» разрывали и формировали конфигурацию «вся клетка» пригодную для регистрации ионных токов.

При регистрации хлорных токов создавали условия для исключения натриевой, кальциевой и калиевой проводимости: наружные растворы не содержали Ca²⁺, включали селективный блокатор потенциал-зависимых натриевых каналов-тетродотоксин (ТТХ, Sigma, St.Louis, MO, USA) и мембранный потенциал удерживался при – 60 мВ для минимального проявления калиевой проводимости. Внеклеточный раствор для

тестирования эффекта ГАМК содержал (ммоль/л): NaCl, 132; KCl, 3; MgCl₂, 2; D-глюкоза, 33; HEPES, 10; ГАМК, 0,001 – 0,1; ТТХ, 0,0005. Последовательность аппликации концентраций ГАМК в протоколе была от меньшей (1 мкмоль) к большей (3, 10, 30 и 100 мкмоль). Концентрации ГАМК использовали в дальнейшем для расчета эффективной концентрации EC₅₀ согласно зависимости

$$I = I_{\min} + \frac{I_{\max} - I_{\min}}{[1 + (A/EC_{50})^n]}$$

где I – значение пика хлорного тока при концентрационном значении ГАМК (A), I_{max} – значение пика хлорного тока при максимальной концентрации ГАМК, I_{min} – значение пика хлорного тока при минимальной концентрации ГАМК, n – Хилла фактор (наклон сигмоиды).

В работе контролировали равновесный потенциал для хлорных токов [3]. Регистрируемые ионные токи пересчитывали на плотность тока пА/пФ с целью нормализации показателей полученных от клеток разных размеров. Регистрация ионных токов осуществлялась в полосе частот менее 1 kHz, с частотой разрешения при хранении 10 kHz.

Клетки брали в расчет если токи утечки были менее 50 пА. Последовательное сопротивление было менее 15 Мом и компенсировано на 40 – 70%. Перед каждой регистрацией мембранный тест производили с тем, чтобы иметь подтверждение стабильности суммарного сопротивления электрод – клетка. Нанесение ГАМК на клетки производили спустя 5 минут от момента образования конфигурации «вся клетка» и после тестирования калиевых токов.

Двухканальную стеклянную пипетку (внутренний диаметр каждого канала 0,5 мм) брали для подачи ГАМК на клетку. Подачу ГАМК 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 солевым растворам с ГАМК. Первый канал пипетки располагали в непосредственной близости от клетки перпендикулярно общему потоку перфузионного раствора через камеру. Поток солевого раствора без ГАМК, но содержащий тетродотоксин блокировал генерацию потенциалов действия и предотвращал доступ ГАМК из второго канала пипетки. Для аппликации ГАМК на клетку в программе протокола выставлялся цифровой сигнал посылаемый на Warner Perfusion Fast-Step, что позволяло производить подачу раствора с ГАМК (5 сек) путем изменения положения канала пипетки, и одновременно регистрировать клеточные входящие хлорные токи. После заданного интервала времени пипетка автоматически возвращалась в исходное положение. Для подтверждения ГАМК-А-рецептор-зависимого ответа в ряде экспериментов клетки перфузировали также раствором содержащим одновременно ГАМК (0,1 ммоль) и селективный блокатор ГАМК-А рецепторов - бикугулин (0,03 ммоль) (рис.1.б).

Равновесный потенциал для калия (E_K) оценивали на основании данных протокола, позволяющего регистрировать следовые (вслед за током индуцированным командой 0 мВ, 125 мс) деактивационные токи в первые 50 мс при значениях мембранного потенциала от – 110 до – 30 мВ. E_K при концентрации КСl во внеклеточном растворе в 3 ммоль составил – 83 мВ.

Все данные в настоящем исследовании выражали в виде средних значений \pm стандартная ошибка средней ($M \pm SEM$). Статистическая достоверность различий между средними значениями оценивалась по t – тест Стьюдента. Различия считались достоверными если $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Деполаризацией мембраны до +10 мВ после обуславливающей гиперполяризации (– 110 мВ, 400 мс, протокол «А») индуцированы одновременно, как неинактивируемые (НКТ), так и инактивируемые калиевые токи (ИКТ). Обуславливающая фиксация мембранного потенциала – 40 мВ (протокол «Б») была важна для индуцирования НКТ последующей деполаризацией. Цифровое вычитание значений калиевого тока протокола «Б» из значений суммы калиевых токов протокола «А» позволило сепарировать ИКТ от НКТ (рис.1.а). При деполаризирующей команде пик ИКТ развивается в течение 10 мс и затем ИКТ убывают (инактивируются) с постоянной времени от нескольких десятков до нескольких сотен мс.

Для нейронов NTS ГТ крыс средние значения ИКТ ($n=13$) в первые 5 мс были ниже соответствующих значений ИКТ нейронов ($n=15$) НТ крыс (рис.1.а). Все исследуемые нейроны NTS отобранные для анализа проявляли также хлорные токи в ответ на ГАМК, которые блокировались селективным блокатором ГАМК-А рецепторов-биккукулином (рис.1.б). Таким образом, данные эксперименты свидетельствуют об одновременном присутствии в нейронах NTS ИКТ и лиганд – зависимой хлорной проводимости.

В отдельной серии экспериментов проанализирована концентрационная зависимость величины хлорных токов в ответ на ГАМК в нейронах NTS НТ и ГТ крыс. Выявлено повышение значения эффективной концентрации ГАМК (EC_{50}) до $21,03 \pm 2,63$ мкмоль/л ($n=16$, $P < 0,05$) в нейронах ГТ крыс по сравнению с EC_{50} в нейронах НТ крыс ($13,03 \pm 1,75$ мкмоль/л, $n=14$) (рис.2).

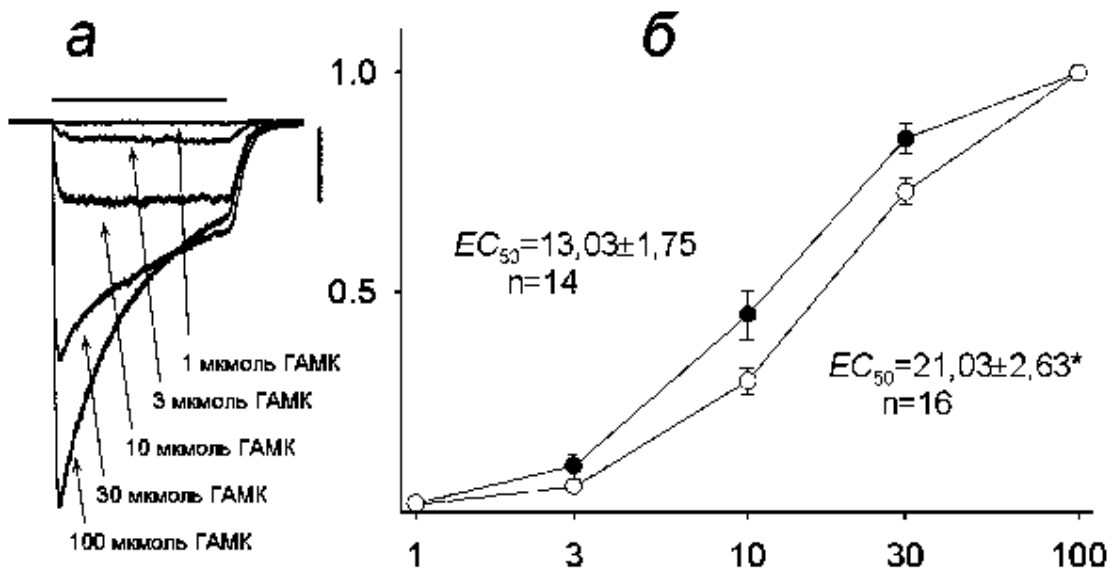


Рис.2. *a* – хлорные токи индуцированные разными концентрациями ГАМК, горизонтальный отрезок – 5 с интервал подачи ГАМК на нейрон, вертикальный отрезок – 1 нА. *б* – нормализованные значения пика хлорных токов в зависимости от концентрации ГАМК (мкмоль/л) и эффективная концентрация ГАМК (EC_{50}) для NTS нейронов НТ (●) и ГТ (○) крыс. * – $P < 0,05$

Наблюдаемое в настоящем исследовании понижение ИКТ в нейронах NTS и смещение концентрационной зависимости лиганд – зависимой хлорной проводимости «вправо» при почечной гипертензии вероятно может быть причиной изменения возбудимости нейронов NTS при хронической гипертензии.

Подтверждением существования зависимости возбудимости нейрона от ИКТ являются эффекты 4 – АП (антагониста ИКТ) и степени обуславливающей гиперполяризации на электрическую активность диссоциированных нейронов NTS в «ток-кламп» протоколе [5]. Аппликация 4 – АП на нейрон, а также уменьшение обуславливающей гиперполяризации приводят к сокращению времени задержки возбуждения и характерному изменению формы потенциала действия (расширение спайка и замедление реполяризации).

Блокирование лиганд – зависимой хлорной проводимости в NTS при микроинъекции бикугулина приводит к более выраженной нейрональной активности в ответ на раздражение аортальных барорецепторов [8]. Данный факт может быть объяснен прямым ограничением гиперполяризующего, тормозного эффекта ГАМК. Вместе с тем также следует учитывать, что гиперполяризующие постсинаптические эффекты ГАМК являются обуславливающими для восстановления от инактивации ИКТ, поэтому блокирование ГАМК-А рецепторов в NTS ограничивает проявление и тормозных влияний ИКТ.

Изменения возбудимости нейронов NTS при хронической гипертензии в результате уменьшения ИКТ и ГАМК-А рецепторных межнейрональных

влияний могут быть результатом долговременного повышения сенсорной афферентации от сосудистых барорецепторов. В частности, известна «down» регуляция (регуляция на понижение) ГАМК-А рецепторов при стойком повышении концентрации ГАМК [9]. Ограничение проявления указанных механизмов торможения нейронов в NTS может свидетельствовать об адаптивных изменениях в пользу качественно других ингибиторных механизмов в сердечнососудистом центре. Так, наряду с ухудшением лиганд-зависимой хлорной проводимости (через ионотропные ГАМК-А рецепторы) и ограничением их модулируемости цАМФ-зависимым механизмом [10] при почечной гипертензии в NTS, выявлено усиление тормозных ответов при активации метаботропных ГАМК-Б (GABA-B) рецепторов, что сопровождается более выраженной прессорной реакцией, чем при нормотензии [11]. Предполагаемые адаптивные изменения в NTS при хронически высоком САД проявляются вероятно имеют отношение к особенностям сердечнососудистых реакций в ответ на колебания артериального давления поскольку ранее не было выявлено отличий в спонтанной активности нейронов NTS при гипертензии [6,8].

Вывод

Понижение калиевой инактивируемой проводимости и смещение концентрационной зависимости ГАМК-А-рецептор-зависимой хлорной проводимости «вправо» в нейронах NTS являются сопутствующими и вероятно меняющими возбудимость нейронов в NTS при негенетическом моделировании стойкого повышения артериального давления – почечной гипертензии.

Литература

1. Bailey, T.W., Jin, Y.H., Doyle, M.W., Andresen, M.C. // J. Neurosci. 2002. Vol.22, P.8230-8237.
2. Butcher, J.W., Paton, J. F. R.// Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 1998. Vol. 274, R677 – R685.
3. Tolstykh, G., Belugin, S., Tolstykh, O., Mifflin, S.W. // Hypertension. 2003. Vol. 42, P.732 – 736.
4. Mifflin, S. W. // News Physiol. Sci. 2001. Vol.16, P.266 – 271.
5. Belugin, S., Mifflin, S. // J. Neurophysiol. 2005. Vol.94. N.6, P.3849 – 3859.
6. Mei, L., Zhang, J., and Mifflin, S.W. // Am. J. Physiol. (Reg. Int. Comp.). 2003. Vol.285, R1276?R1286.
7. Grollman, A. // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1944. Vol.57, 102 – 104.
8. Zhang, J., Mifflin, S.W. // Hypertension. 2000. Vol. 35, P. 430?436.
9. Rabow, L.E., Russek, S.J., Farb, D.H. // Synapse. 1995. Vol.21, P. 189 – 274.
10. Белугин, С.Н., Миффлин, С.В. // Доклады НАН Беларуси. 2006. Т. 50. № 4. P.81 – 84.
11. Durgam, V.R., Vitela, M., Mifflin, S.W. // Hypertension. 1999. Vol. 33, P.530?536.