

Изменения амплитуды и инактивационных свойств калиевых токов нечувствительных к тетраэтиламмонiu в нейронах nts при почечной гипертензии

Белорусский государственный медицинский университет

Проведен сравнительный анализ инактивируемых калиевых токов (ИКТ) выделенных при помощи тетраэтиламмония (ТЭА) в «пэтч-кламп» экспериментах на нейронах NTS у крыс при нормотензии и при почечной форме гипертензии. Обнаружено уменьшение плотности нечувствительных к ТЭА ИКТ и замедление их инактивационной кинетики в нейронах NTS крыс с 4 недельной почечной гипертензией. Изменения ИКТ нечувствительных к ТЭА в мембране нейронов NTS при почечной гипертензии вероятно отражают долговременные изменения гиперполяризующих эффектов данных калиевых токов и возбудимости нейронов сердечно – сосудистого центра. **Ключевые слова:** тетраэтиламмоний, инактивируемые калиевые токи, почечная форма гипертензии.

Инактивируемые калиевые токи (ИКТ), известные как калиевые А – токи, являются основной составляющей выходящих ионных токов в нейронах центрального барорефлекторного звена в дорзальных отделах Nucleus Tractus Solitarius (NTS) [1]. Индукция ИКТ ведет к задержке возбуждения нейрона на сотни миллисекунд. Уменьшение плотности ИКТ в нейронах NTS при почечной форме гипертензии сопровождается уменьшением задержки возбуждения [2]. При генетической форме гипертензии крыс (SHR) также описано уменьшение задержки возбуждения в нейронах NTS [3]. Ранее было установлено, что в нейронах NTS тетраэтиламмония – хлорид (ТЭА) блокирует преимущественно неинактивируемую калиевую проводимость [4]. Таким образом, использование ТЭА позволяет выделить нечувствительные к ТЭА ИКТ и подвергнуть в дальнейшем анализу инактивируемую калиевую проводимость в NTS.

В настоящей работе проводится сравнительный анализ амплитуды и инактивационных свойств ИКТ, сепарированных при помощи исключения калиевых токов чувствительных к ТЭА в нейронах NTS у крыс при нормотензии и при почечной форме гипертензии.

Материал и методы

Эксперименты выполнены на 11 крысах (2 – 3х месячные) самцах, линии Sprague – Dawley (375 – 500 г, Charles River Laboratories). Анестезия крыс производилась медетомидином и кетамином (0,5мг/кг и 75мг/кг, внутривентриально соответственно). Гипертензия (ГТ) была индуцирована частичной односторонней перевязкой почечной артерии с контралатеральной нефрэктомией [5].

Нормотензивные крысы (НТ, n=6) анестезировались аналогичным образом. НТ крысам производилась односторонняя нефрэктомия, контралатерально почка не перевязывалась. Анестезия прерывалась атипамезолом (1мг/кг, в.б.) по завершению хирургических процедур.

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/кетаминовой анестезией. После двухдневного восстановительного периода кровяное давление промерялось у бодрствующей крысы в условиях свободного поведения путем подсоединения артериального катетера к преобразователю давления (Kobe) и устройства для визуализации McLab/Cambridge Electronic Design A/D. Кровяное давления контролировали в течение 3х часов и показатели давления за последний час использованы для расчета индекса среднего артериального давления (САД). У ГТ крыс САД составляло $182,8 \pm 14,5$ мм рт.ст. (n=5, $M \pm SEM$).

В день эксперимента крысы ингаляционно анестезировались изофлюраном и ствол мозга быстро извлекался и располагался в ледяном буфере Кребса (50С). Ствол мозга нарезался вибратором (Warner Instrument Corp.) на поперечные срезы толщиной 440 микрон в области calamus scriptorius. Срезы инкубировались в PIPES буфере с трипсином (Sigma, тип XI, 3 – 5 мг/10 мл) 55 мин при 340С. После ферментной обработки, срезы трехкратно промывались в инкубационном растворе и сохранялись при комнатной температуре (220С) в постоянно оксигенируемом PIPES буфере. Срезы ствола мозга располагались на стеклянной поверхности и область NTS иссекалась. Участок NTS механически разбивался в DMEMS буфере. Аликвота нейрональной суспензии в DMEMS помещалась в перфузионную камеру для осаждения клеток на 5 минут. Отмывание клеток от DMEMS производилась раствором состоящим из (ммоль/л): NaCl, 140; D – глюкоза, 33; HEPES, 10; KCl, 3; CaCl₂, 2; MgCl₂, 1,2 (рН 7,4; осмоляльность 305 – 320 мОсм). Внеклеточный перфузионный раствор для тестирования калиевых токов состоял (ммоль/л): NaCl, 132; D – глюкоза, 33; HEPES, 10; KCl, 3; MgCl₂, 2; TTX, 0,0005 ммоль/л (Sigma, St.Louis, Mo, USA). В перфузионный раствор для тестирования калиевых токов добавлялся тетраэтиламмония – хлорид (ТЭА), 10 ммоль/л.

Регистрация мембранных токов производилась методом «пэтч – кламп» в конфигурации «вся клетка» (содержимое электрода сообщается с цитоплазмой клетки). Данный метод позволяет регистрировать изменения трансмембранного ионного тока всей клетки при фиксации на заданном уровне мембранного потенциала – вольт – кламп. Electrodes для «пэтч – кламп» регистрации изготовлялись из кварцевых капиллярных трубок (1,0 мм внешний диаметр и 0,7 мм внутренний диаметр) вытянутых в лазерном пуллере Р – 200 (Sutter Instrument Co.). Electrodes заполнялись электродным раствором, который состоял (в ммоль/л): KCl, 140; MgCl₂, 2; EGTA, 10; ГТФ, 0,1; АТФ, 4; цАМФ,

0,1; NEPES, 10 (рН 7,2; осмоляльность 280 – 300 мОсм). Электроды имели сопротивление 3 – 8 Мом при тестировании в перфузионном растворе.

Эксперименты производились 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 образовывалась конфигурация «вся клетка». В вольт – кламп экспериментах регистрируемые ионные токи пересчитывались на плотность тока (пА/пФ) с целью нормализации показателей полученных от клеток разных размеров. Регистрация токов осуществлялась в полосе частот менее 1 кГц (частота 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 состояли из прямоугольных стимулов – смещения мембранного потенциала от обуславливающего значения (– 110 мВ или – 40 мВ, 400мс) до одного из значений в диапазоне – 70 ~ +70 мВ (400мс, с шагом 20 mV). Равновесный потенциал (E_k) оценивался при регистрации следовых деактивационных компонентов выходящих токов. При 3 ммоль KCl E_k составлял – 83 ± 2 мВ ($M \pm SEM$) у нейронов (n=19) НТ крыс и – 81 ± 2 мВ у нейронов (n=15) ГТ крыс. При 20 ммоль KCl E_k составил – 54 ± 9 мВ (n=3, НТ нейроны).

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

Нанесение перфузионных растворов для тестирования калиевых токов на клетки производилось спустя 5 мин от момента образования конфигурации «вся клетка». Двухканальная стеклянная пипетка (внутренний диаметр каждого канала 0,5 мм) бралась для подачи на клетку растворов под контролем скоростного ступенчатого перфузионного устройства (Warner Perfusion Fast – Step, Warner Instrument Corp.). Каждый канал пипетки был соединен силиконовой трубкой с клапанной системой, регулирующей доступ к растворам без ТЭА и с ТЭА. Первый канал пипетки располагался в непосредственной близости от клетки, перпендикулярно потоку общей перфузии в камере. Раствор без ТЭА, но содержащий тетродотоксин (ТТХ) блокировал генерацию потенциалов действия и предотвращал доступ ТЭА из второго канала пипетки, располагающейся ниже общего потока перфузии. Для подачи ТЭА в программе протокола выставлялся цифровой сигнал, посылаемый на Warner Perfusion Fast – Step, что позволяло производить подачу перфузионного раствора с ТЭА путем изменения положения канала пипетки, и одновременно регистрировать клеточные входящие калиевые токи. После заданного интервала времени

пипетка возвращалась в исходное положение.

Все данные в настоящем исследовании представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка средней ($M \pm SEM$). Ток – потенциал зависимости сравнивались методом “two – way” ANOVA посредством Fisher (LSD) “post hoc” тестирования (Sigma Plot 8.1). Для сравнительного анализа использовался также t – критерий «two – tailed» по Student. Различия принимались как достоверные если $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Предварительная обуславливающая гиперполяризация мембраны нейрона NTS (– 110 мВ, 400 мс) необходима, чтобы индуцировать ступенчатой дерполяризующей командой одновременно, как неинактивируемые, так и инактивируемые калиевые токи (ИКТ)(рис.1.а). После обуславливающей фиксации мембранного потенциала при -40 мВ депполяризацией можно индуцировать только выходящие неинактивируемые калиевые токи (НКТ) (Рис.1.а). Цифровое вычитание значений НКТ из суммы значений калиевых токов позволяет выделить ИКТ. Разность между пиковым значением тока и значением тока через 400 мс (рис.1.б) использовался в качестве количественного значения ИКТ. Наличие ИКТ в клетках NTS рассматривалось как характерный электрофизиологический признак нейронов барорефлекторного звена [1]. Тетраэтиламмония – хлорид (ТЭА) блокирует преимущественно неинактивируемую калиевую проводимость в нейронах NTS [4] и является неселективным блокатором калиевых каналов Kv1.1, кальций – зависимых калиевых каналов группы BK и калиевых каналов группы Kv3 [6]. Таким образом, использование внеклеточного раствора с неселективным блокатором неинактивируемых калиевых каналов позволило подвергнуть тестированию нечувствительные к ТЭА ИКТ.

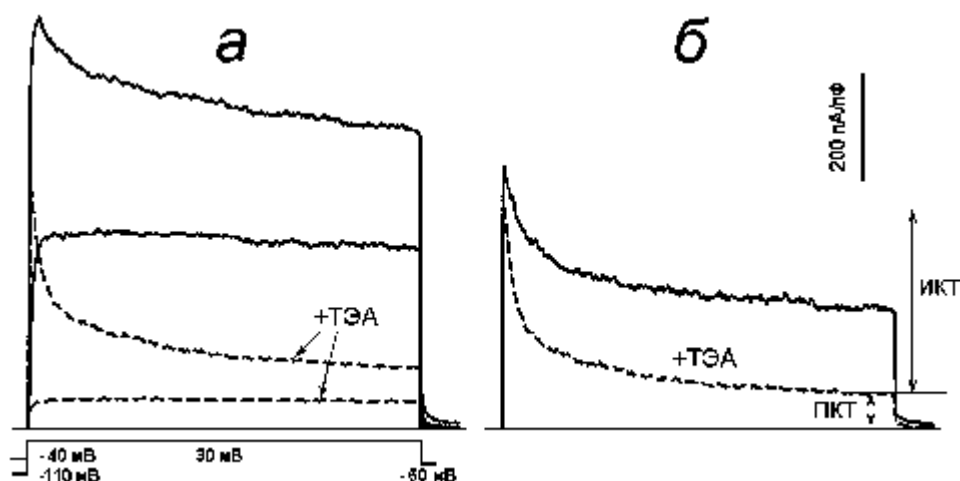


Рис.1. Калиевые токи в контроле (—) и при перфузии 10 ммоль/л ТЭА (- -). а – сумма нечувствительных к ТЭА калиевых токов (верхняя прерывистая

линия) при +30 мВ (0,5 с) и их неинактивируемая составляющая (нижняя прерывистая линия) после обуславливающей фиксации мембранного потенциала (0,4 с) – 110 мВ (в протоколе «А») и –40 мВ (в протоколе «Б») соответственно. б – результирующие калиевые токи после цифрового вычитания неинактивируемой составляющей калиевых токов протокола «Б» из суммы калиевых токов протокола «А». Нечувствительные к ТЭА калиевые токи оценивались по инактивируемой (ИКТ) и персистирующей (ПКТ) составляющим

Нечувствительные к ТЭА ИКТ проявляли экспоненциальный характер убывания (инактивацию) при фиксированном и более положительном значении мембранного потенциала, чем потенциал покоя. Убывание ИКТ имело двухкомпонентный экспоненциальный характер: t_1 – «быстрая» компонента (постоянная времени менее 20 мс) и t_2 – «медленная» компонента (постоянная времени более 100 мс) (рис.2). Постоянные времени убывания нечувствительных к ТЭА ИКТ в нейронах ГТ крыс ($t_1=16,7\pm 1,7$ мс, $t_2=411,7\pm 74,5$ мс, $n=7$, при +30 мВ) превышали соответствующие значения постоянных времени убывания нечувствительных к ТЭА ИКТ в нейронах НТ крыс ($t_1=12,3\pm 0,7$ мс, $P=0,042$; $t_2=201,3\pm 29,5$ мс, $n=8$, $P=0,016$).

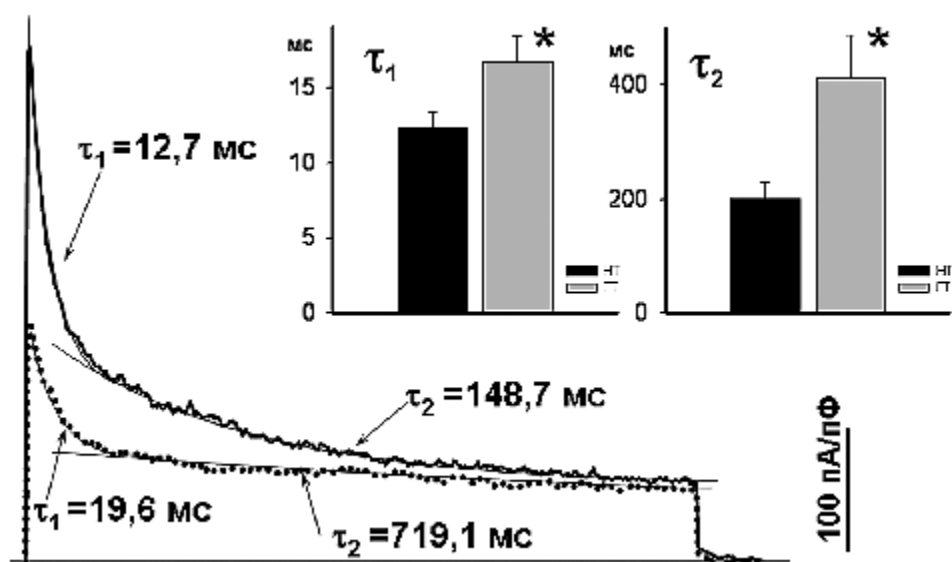


Рис.2. Нечувствительные к ТЭА калиевые токи с ИКТ и ПКТ составляющими в нейронах НТ (—) и ГТ крыс (...). Экспоненциальное убывание ИКТ после пика представлено «быстрой» и «медленной» компонентами – постоянными времени t_1 и t_2 соответственно. Верхний левый график – средние величины t_1 ИКТ нейронов НТ и ГТ крыс, верхний правый график – средние величины t_2 ИКТ нейронов НТ и ГТ крыс. * – $P < 0,05$ (Student)

Величина ИКТ нечувствительных к ТЭА была значительно ниже в NTS нейронах ($n=7$) ГТ крыс по сравнению с ИКТ в NTS нейронах ($n=8$) НТ крыс (ANOVA, $P < 0,001$) (рис.3). Данное отличие носило потенциал – зависимый

характер.

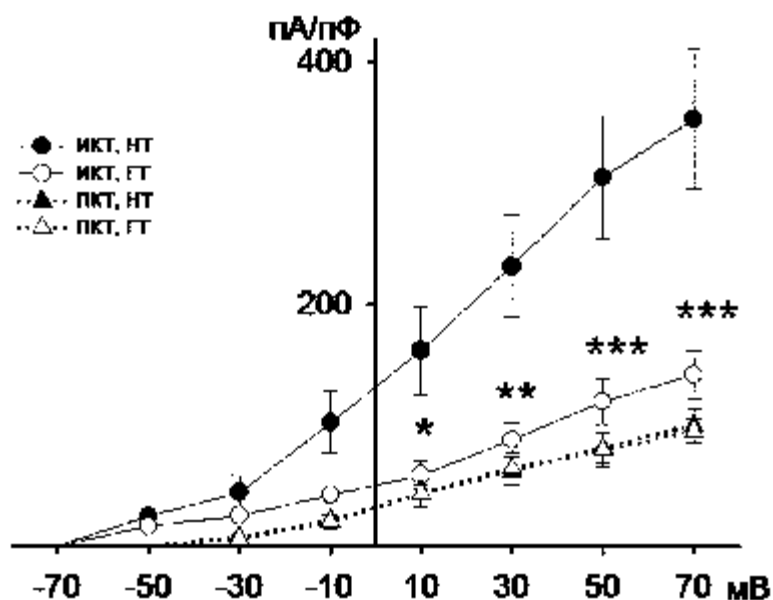


Рис.3. Плотности ИКТ (—) и ПКТ (...) – составляющих калиевых токов нечувствительных к ТЭА в нейронах NTS HT и ГТ крыс. * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$, *** – $P < 0,001$ (ANOVA)

Потенциал – зависимые калиевые А – токи с выраженными инактивационными свойствами и нечувствительные к ТЭА могут свидетельствовать о присутствии в мембране нейронов NTS калиевой проводимости связанной с определенными группами калиевых каналов. Вероятными молекулярными кандидатами для анализа нечувствительной к ТЭА инактивируемой проводимости могут быть инактивируемые калиевые каналы Kv1.4 и/или калиевые каналы группы Kv4 [6]. Свидетельством в пользу присутствия в нейронах NTS калиевых каналов группы Kv1 является ослабление сосудистых барорефлексов и кардиопульмональных рефлексов при микроинъекции дендротоксина (селективного блокатора Kv1 каналов) в NTS [7]. Биофизические свойства указанных групп калиевых каналов в нейронах могут быть модулированы в результате фосфорилирования субъединиц данных каналов. Так, ранее было обнаружено блокирование инактивации ИКТ в нейронах NTS диализируемых цАМФ [8], что согласуется с эффектом форсколина (активатор протеинкиназа – А – зависимого фосфорилирования) в нейронах гиппокампа – увеличением постоянной времени инактивации калиевых каналов Kv4.2 находящихся в комплексе с протеином KChIP3 [9]. В настоящем исследовании одним из условий тестирования нечувствительных к ТЭА ИКТ был также внутриклеточный диализ цАМФ из электродного раствора. Более медленная инактивация нечувствительных к ТЭА ИКТ в нейронах NTS ГТ крыс, чем в нейронах HT крыс предположительно может быть результатом особенностей цАМФ – зависимого фосфорилирования инактивируемых калиевых каналов в нейронах NTS при почечной гипертензии.

Известно, что стойкое повышение артериального давления сопровождается повышенной афферентной сигнализацией от сосудистых барорецепторов [10]. Учитывая особенности афферентного потока от сосудистых барорецепторов и возможно нейромодулирующих сигналов в NTS при стойком повышении артериального давления, обращает на себя внимание повышение плотности потенциал-зависимой кальциевой проводимости в нейронах NTS при почечной гипертензии крыс [11]. В этой связи вероятно формирование стойкой внутриклеточной модуляции кальцием калиевых каналов, что может проявляться в пониженной плотности ИКТ и замедление инактивации нечувствительных к ТЭА ИКТ в нейронах NTS при 4 недельной почечной гипертензии. Однако детали внутриклеточных механизмов модулирующих ИКТ в нейронах NTS и зависимых от сенсорного потока и уровня циркулирующих, и локально вырабатываемых сигнальных молекул (ангиотензин II, ГАМК, серотонин и др.) еще предстоит изучить.

Понижение плотности ИКТ в нейронах NTS вероятно ведет к ограничению проявления гиперполяризующих свойств данных токов и сокращению временного порога возбуждения, облегчая проявление более высокочастотного паттерна потенциалов действия при почечной форме гипертензии [2]. Уменьшение ИКТ вероятно находит также проявление в возрастании количества нейронов с мультиспайковой активностью индуцируемой стимуляцией аортального нерва у гипертензивных крыс по сравнению с нормотензивными [12]. Для выяснения механизмов изменений ИКТ при гипертензии требуется, в частности, более подробная информация по качественной экспрессии субъединиц потенциал – зависимых калиевых каналов в нейронах NTS.

Вывод. Уменьшение плотности нечувствительных к ТЭА ИКТ и замедление их инактивации в нейронах NTS крыс с 4 недельной почечной гипертензией отражают вероятно долговременные изменения гиперполяризующих свойств ИКТ в нейронах 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., Mifflin, 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. Moak, J.P., Kunze, D.L. // Am. J. Physiol. 1993 Vol. 265, P. H1596 – H1602.

5. Grollman, A. // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1944. Vol. 57, P. 102 – 104.
6. Coetzee, W.A., Amarillo, Y.C., Chiu, J., Chow, A., et al // Ann. NY Acad. Sci. 1999. Vol. 868, P. 233 – 285.
7. Butcher, J.W., Paton, J. F. R.// Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 1998. Vol. 274, P. R677 – R685.
8. Белугин, С. Н. // Доклады НАН Беларуси. 2007. Т. 51, № 3. С. 103 – 108.
9. Schrader, L.A., Anderson, A.E., Mayne, A. et al // J. Neurosci. 2002. Vol. 22, P. 10123 – 10133.
10. Mifflin, S. W. // News Physiol. Sci. 2001. Vol. 16, P. 266 – 271.
11. Tolstykh, G., de Paula, P. M., Mifflin, S. // Hypertension. 2007. Vol. 49, P. 1163-1169.
12. Zhang, J., Mifflin, S.W. // Hypertension. 2000. Vol. 35. P. 430-436.