

О.С.Белугина, С.Н.Белугин

Блокирование неинактивируемых калиевых токов при внутриклеточном диализе цАМФ в нейронах NTS. Симуляция изменений нейрональной активности

Белорусский государственный медицинский университет

Внутриклеточный диализ цАМФ (0,1 ммоль) нейронов ядра одиночного тракта (NTS) блокирует неинактивируемые калиевые токи (НКТ) на 26-34% (ANOVA, $P < 0,001$). Блокирование амплитуды НКТ при диализе цАМФ сопровождается уменьшением значения активационной характеристики (V_c) на 1,8 мВ ($P < 0,05$), что отражает увеличение «воротного» заряда каналов отвечающих за потенциал-зависимый компонент НКТ. Амплитудно-кинетические характеристики НКТ находясь под модулирующим контролем цАМФ-зависимого механизма фосфорилирования вероятно предопределяют частотную характеристику и задержку возбуждения нейронов барорефлекторного звена NTS.

Ключевые слова: цАМФ, NTS, калиевые токи, нейроны, барорефлекс, пэч-кламп

Сердечно-сосудистый барорефлекс и нелинейный характер ответа нейронов барорефлекторного звена в дорзальных отделах Nucleus Tractus Solitarius (NTS) на повышение артериального давления ослабляются селективными блокаторами неинактивируемых калиевых каналов [1,2]. Согласно существующим данным нейрональные выходящие неинактивируемые калиевые токи (НКТ) блокируются при повышении внутриклеточной цАМФ-зависимой протеинкиназной активности [3,4,5]. Аденилатциклазная активность в нейронах NTS [6], а также ослабление барорефлекса и тахипноэ при прямом введении проникаемых через мембрану аналогов цАМФ в NTS [7] указывают на наличие цАМФ-зависимых механизмов фосфорилирования в этой структуре мозга. При внутриклеточном диализе цАМФ (0,05 ммоль/л) менее 50% нейронов NTS сохраняют адаптивный (нелинейный) характер возбуждения на повышение артериального давления [1]. Однако возможные эффекты цАМФ на НКТ нейронов NTS изучались недостаточно. Модулирование НКТ цАМФ зависимым механизмом в нейронах NTS затрагивает понимание механизмов регуляции деятельности сердечно-сосудистых стволовых центров и вероятно их адаптационную значимость.

В настоящей работе изучались НКТ диссоциированных нейронов из NTS крыс при внутриклеточном диализе цАМФ.

Материал и методы

Эксперименты выполнены на 31 крысе (2-3 месяца) самцах, линии Sprague-Dawley (375-500 г, Charles River Laboratories). Анестезия крыс производилась медетомидином и кетамином (0,5 мг/кг и 75 мг/кг, в.б., соответственно). Крысам производилась односторонняя нефрэктомия без контралатеральной перевязки почки. Анестезия прерывалась атипамезолом (1 мг/кг, в.б.) по завершению хирургических процедур.

Эксперименты выполнены через 28-35 дней 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 5-и бодрствующих крыс в условиях свободного поведения путем подсоединения артериального катетера к преобразователю давления (Kobe) и визуализировалось при помощи устройства McLab/Cambridge Electronic Design A/D. Измерение кровяного давления крысы производилось в течение 3-х часов и значения давления в течение последнего часа вычислялись в индекс среднего артериального давления (САД). САД у крыс составило $110,2 \pm 5,4$ мм рт.ст ($n=5$).

В день эксперимента крысы ингаляционно анестезировались изофлюраном и ствол мозга быстро извлекался и располагался в ледяном буфере Кребса (50). 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. После разбивки аликвота нейрональной суспензии в DMEMS помещалась в перфузионную камеру для осаждения клеток на 5 минут. Отмывание от DMEMS производилось перфузионным раствором, содержащим (ммоль/л): NaCl, 140; D-глюкоза, 33; NEPES, 10; KCl, 3; CaCl₂, 2; MgCl₂, 1,2 (pH 7.4; осмоляльность 305 – 320 мОсм). При тестировании калиевых токов в осажденных нейронах перфузионный раствор не содержал CaCl₂ и в составе имел 0,5 мкмоль тетродотоксин – селективный блокатор потенциал-зависимых натриевых каналов (TTX, Sigma, St.Louis, Mo, USA).

Регистрация мембранных токов производилась 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». Electrodes для «пэтч-кламп» регистрации изготавливались из кварцевых капиллярных трубок (1,0 мм внешний диаметр и 0,7 мм внутренний диаметр) вытянутых в лазерном пуллере P-200 (Sutter Instrument Co.). Electrodes заполнялись электродным раствором без цАМФ, либо с цАМФ (0,1 ммоль). Electrode раствор состоял (в ммоль/л): KCl, 140; MgCl₂, 2; EGTA, 10; ГТФ, 0.1; АТФ, 4; NEPES, 10 (pH 7,2; осмоляльность 280-300 мОсм) и имели сопротивление 3-8 Мом при тестировании в перфузионном растворе.

Эксперименты производились 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. Формировался «seal» – гигаомный контакт электрода с мембраной клетки, после чего с помощью отрицательного давления (подсасыванием) 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. Регистрируемые токи были отфильтрованы по частоте от составляющих выше 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. Наличие инактивируемых калиевых токов в клетках NTS рассматривалось в качестве электрофизиологического признака нейронов барорефлекторного звена [2]. «Вольт-кламп» протоколы для анализа неинактивируемых калиевых токов (НКТ) состояли из ступенчатых команд (400мс; -70 мВ, -50 мВ, -30 мВ, -10 мВ, +10 мВ, +30 мВ) от предварительно фиксируемого значения (-40 мВ) (рис.1. вставка). Обуславливающий уровень мембранного потенциала -40 мВ (400 мс) блокирует низкопороговые выходящие потенциал-зависимые калиевые токи, инактивируемое уже при значениях мембранном потенциала покоя (– 60 мВ).

Проводимость мембраны для выходящих токов (G) рассчитывалась по формуле $G=I_{peak}/(V_m - E_k)$, где I_{peak} – плотность пикового значения тока (пА/пФ) при V_m – командном мембранном потенциале, E_k – равновесный потенциал по калию (– 83 мВ). Зависимость нормализованной проводимости от мембранного потенциала (V_m) соответствовала уравнению Больтцмана: $G/G_{max}=\{1+\exp[-(V_m - V_h)/V_c]\}^{-1}$, где G_{max} – максимальная проводимость, V_h – значение мембранного потенциала при котором отмечается 50% проводимости для изучаемых токов от максимума. Крутизна сигмоидной зависимости Больтцмана характеризуется фактором наклона V_c (мВ): $V_c = RT/zF$, где R – газовая константа, T – абсолютная температура в °К, F – константа Фарадея, z – «воротный» заряд, $RT/F = 25$ мВ при 22°C.

Симуляция активности одиночного нейрона NTS исполнена на персональном компьютере в MATLAB (версия 7.0) с использованием функции ode45. 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 принято: обуславливающая гиперполяризация (– 140 мВ), деполяризующее воздействие наносимое на мембрану нейрона (40 пА), четыре потенциал-зависимых ионных проводимости и проводимость утечки. Уравнение для расчета симулированной активности имеет вид:

$$d V_m /dt=(I_{app} - I_{Na}(V_m, t) - I_{Kf}(V_m, t) - I_{Ks}(V_m, t) - I_{Kn}(V_m, t) - I_L(V_m, t))/ C_m, (1)$$

где I_{app} – деполяризующий ток, I_{Na} – натриевый ток, I_{Kf} – калиевый быстро-инактивируемый ток, I_{Ks} – калиевый медленно-инактивируемый ток, I_{Kn} – калиевый неинактивируемый ток, I_L – ток утечки.

$$I_x(V_m, t) = G_{maxx} a_k b(V_m - E_x), \quad (2)$$

где I_x – ток (пА), G_{maxx} – максимальная проводимость (нС) и E_x – равновесный потенциал (мВ) для соответствующего иона (x), а – «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_{Kn}). Поскольку «воротные» функции активации и инактивации являются как потенциал-зависимыми, так и зависимыми от времени, то изменения данных функций описывались дифференциальным уравнением первого порядка

$$dy/dt = (y\Gamma - y)/t, \quad (3)$$

где y – соответствующая «воротная» функция (a или b), $y\Gamma$ – устойчивые значения «воротных» функций при бесконечно длительном поддержании стабильных значений мембранного потенциала ($a\Gamma$ или $b\Gamma$), t – постоянная времени активации или инактивации соответственно. Устойчивые значения «воротных» функций активации и инактивации ($a\Gamma$ и $b\Gamma$) описывались соответственно кинетическими уравнениями:

$$a\Gamma = (1 + \exp[-(V_m + V_h)/V_c])^{-1}, \quad (4)$$

$$b\Gamma = (1 + \exp[(V_m + V_{hh})/V_{cc}])^{-1}, \quad (5)$$

где V_h – значение мембранного потенциала (мВ) соответствующее 50% устойчивой активации, V_{hh} – значение мембранного потенциала (мВ) соответствующее 50% устойчивой инактивации, V_c и V_{cc} – параметры наклона (мВ) «воротных» функций устойчивой активации и устойчивой инактивации соответственно.

Для получения симулированной активности нейрона (1) мы использовали в уравнениях (2), (3), (4) и (5) собственные экспериментальные данные амплитудно-кинетических характеристик ионных токов изолированных нейронов NTS [8,9].

Все данные описанные в настоящем исследовании выражались в виде средних значений \pm SEM (стандартная ошибка средней). Различия плотности токов оценивались с учетом значений мембранного потенциала методом «two-way» ANOVA посредством Fisher (LSD, «post hoc») тестирования. Для сравнительного анализа использовался t-критерий «two-tailed» по Student. Различия принимались как достоверные если $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Величины НКТ были значительно снижены у нейронов с диализом цАМФ по сравнению с НКТ нейронов без внутриклеточного диализа цАМФ на 26% и 34% при +10 мВ и +30 мВ соответственно (ANOVA, $P < 0,001$) (рис.1.а, б). Данное отличие не носило достоверно потенциал-зависимый характер. При цАМФ диализе наблюдалось уменьшение значения V_c – крутизны наклона сигмоидной зависимости проводимости мембраны по НКТ с $9,3 \pm 0,4$ мВ ($n=25$) до $7,5 \pm 0,7$ мВ ($n=32$, $P < 0,05$). Показатель V_h , выражающий 50% вероятность открытия ионных каналов, при внутриклеточном диализе цАМФ не претерпевал изменений (рис.1.в).

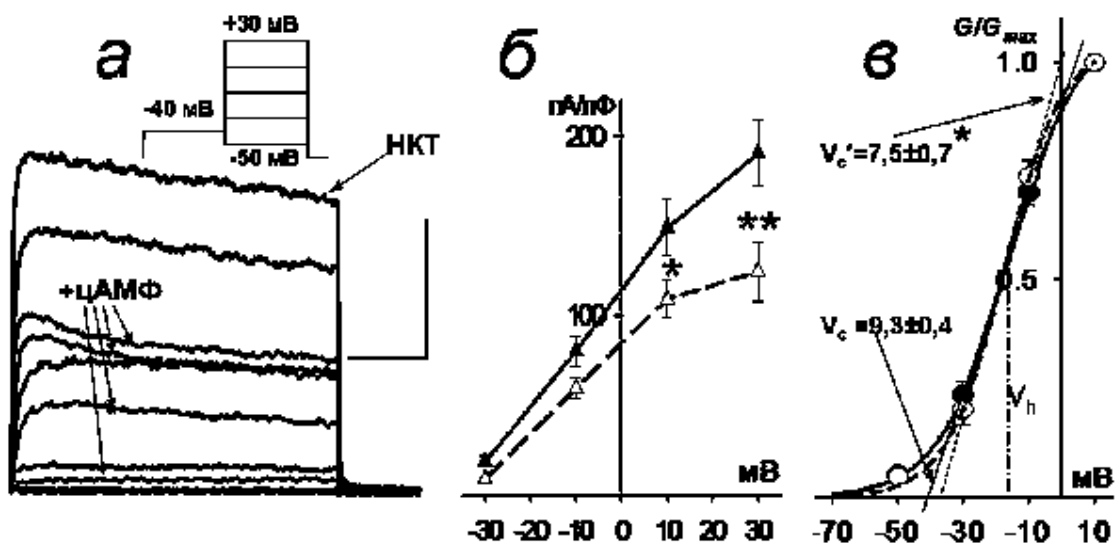


Рис.1. а – примеры контрольных НКТ (—) и НКТ нейронов с диализом цАМФ (---). На вставке: фрагмент «вольт-кламп» протокола, обуславливающий стимул -40 мВ и командные стимулы от -50 мВ до $+30$ мВ. Горизонтальный отрезок – 100 мс, вертикальный отрезок – 100 пА/пФ. б – плотность НКТ в зависимости от мембранного потенциала, контрольных (\blacktriangle) и с диализом цАМФ (\triangle) нейронов. * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$ (ANOVA). в – нормализованная проводимость по НКТ в зависимости от мембранного потенциала, контрольных (—) и с диализом цАМФ (---) нейронов. V_c, V_c' – факторы наклона (мВ). * – $P < 0,05$ (t-Student).

При симуляции нейрональной активности с учетом наблюдаемых изменений амплитуды НКТ и кинетического параметра НКТ V_c при диализе цАМФ удалось выявить изменения параметров симулированной активности одиночного нейрона: сокращение длительности задержки возбуждения и увеличение частоты потенциалов действия (рис.2).

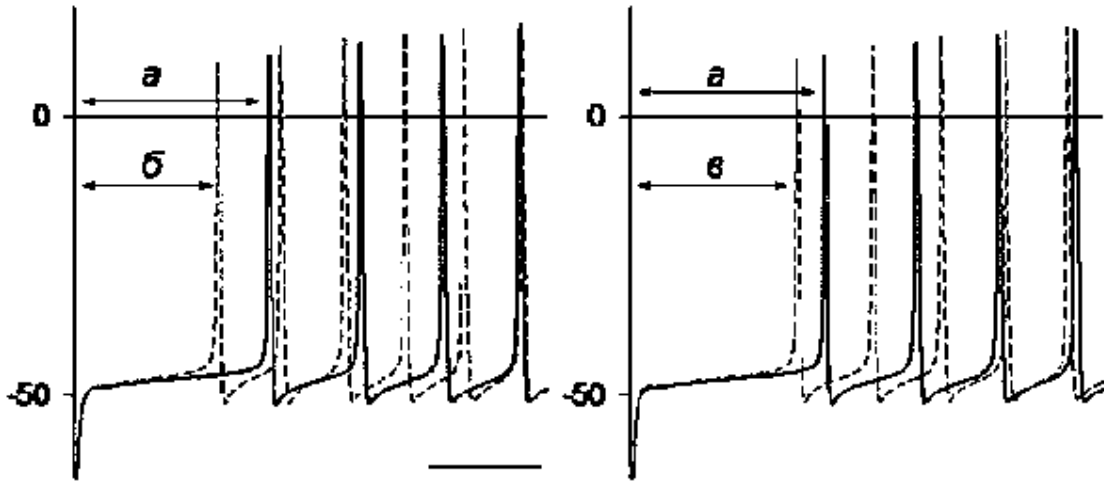


Рис.2. Симуляция электрической активности одиночного нейрона NTS до изменения кинетических параметров (V_c и G_{max}) НКТ (—) и после (---). а – задержка возбуждения 82,5 мс согласно экспериментальным *in vitro* значениям V_c (10 мВ) и G_{max} (2,5) НКТ нейронов без внутриклеточного диализа цАМФ, б – задержка возбуждения 60 мс при $V_c=7$ мВ и $G_{max}=2,5$, в – задержка возбуждения 70 мс при $V_c=10$ мВ и $G_{max}=1,5$. Горизонтальный отрезок – 50 мс.

В нейронах NTS НКТ представлены, как потенциал-зависимой, так и кальций-зависимой компонентами калиевой проводимости с постоянной времени инактивации >200 мс [10,11]. Блокада апамином и харибдотоксином кальций-зависимых НКТ в NTS усиливает брадикардию в ответ на раздражение барорецепторов [1,2], ослабляя барорефлекторный ответ в составе кардиопульмонального рефлекса [12]. Обращает на себя внимание независимый от мембранного потенциала блокирующий эффект цАМФ на амплитуду НКТ в нейронах NTS, поскольку в нейронах существуют апамин-чувствительные кальций-зависимые калиевые каналы типа SK, которые потенциал-независимы. Вместе с тем, уменьшение величины кинетического параметра V_c НКТ при внутриклеточном диализе цАМФ может указывать на модулирование также потенциал-зависимого компонента НКТ в нейронах NTS, поскольку уменьшение V_c вероятно свидетельствует об увеличении «воротного» заряда потенциал-зависимых неинактивируемых калиевых каналов.

Ранее было установлено присутствие потенциал-зависимых Kv3 каналов неинактивируемого типа в нейронах NTS [13]. В нейронах гиппокампа уменьшение калиевой проводимости Kv3 каналов наблюдалось при стимуляции внутриклеточного фосфорилирования протеинкиназой-A [5]. Полученное нами блокирование НКТ в условиях внутриклеточного диализа цАМФ нейронов NTS при положительных значениях мембранного потенциала (+10 мВ, +30 мВ) согласуется с высокопороговым характером кинетики активации калиевых каналов группы Kv3.

Вероятным объектом для цАМФ-зависимого фосфорилирования в нейронах NTS могут быть и потенциал-зависимые, с медленной инактивацией калиевые каналы группы Kv1. Так, ослабление сосудистых барорефлексов и кардиопульмональных рефлексов происходит при введении дендротоксина (селективного блокатора Kv1 каналов) в NTS [2]. Известны многочисленные факты изменений инактивационных свойств каналов группы Kv1 путем цАМФ-зависимого либо Са-зависимого фосфорилирования основной (альфа) и добавочных (бета) субъединиц. Уменьшение амплитуды НКТ при внутриклеточном диализе цАМФ в нашем исследовании согласуется с уменьшением неинактивируемого компонента выходящих калиевых токов при цАМФ-зависимом фосфорилировании Kv1.1 каналов встроенных в яйцеклетки Xenopus [14]. Межнейрональные отличия изменений НКТ могут быть предопределены гетерогенностью в нейронах NTS фосфорилируемых альфа и бета субъединиц в составе каналов группы Kv1.

Одним из вероятных претендентов на роль синаптического активатора цАМФ-зависимых механизмов фосфорилирования в нейронах NTS является серотонин. Показано, что специфическая активация серотониновых рецепторов 5-НТ4 в NTS ослабляет брадикардию в составе кардиопульмонального рефлекса [7]. Известно, что серотониновые рецепторы 5-НТ4 сопряжены с активацией аденилатциклазы и цАМФ-зависимой блокадой кальций-зависимой калиевой проводимости в нейронах гиппокампа [4]. Потенциальным нейромодулятором в сердечно-сосудистом центре NTS с цАМФ-зависимым механизмом действия может быть так же секретин, имеющим деполяризующий эффект на нейроны NTS [15]. Однако механизмы модуляции НКТ нейронов сердечно-сосудистого центра NTS синаптически активными агентами (серотонином, ГАМК), в том числе и нейропептидом-секретином еще предстоит изучить.

Учитывая гиперполяризующий эффект кальций-зависимых калиевых токов, блокирование НКТ при внутриклеточном диализе цАМФ нейронов NTS может являться условием повышения возбудимости, как возбуждающих нейронов (с моно – и поли – синаптическими характеристиками), так и вставочных ГАМК – эргических нейронов NTS. Результат симуляции активности одиночного нейрона имеющего амплитудно-кинетические параметры ионных токов нейронов NTS с пониженными НКТ и Vc значениями (как при диализе цАМФ) позволяет отметить признаки повышенной возбудимости: сокращение задержки возбуждения и межспайковых интервалов по сравнению с аналогичными показателями в модели нейрональной активности с исходными показателями НКТ. Облегчение или ослабление сердечно-сосудистого барорефлекса может быть предопределено популяционным соотношением возбуждающих и тормозных нейронов вовлеченных в активность при активации цАМФ-зависимых механизмов в NTS.

Заключение. Блокирующий эффект в результате диализа цАМФ на амплитуду НКТ и улучшение активационного свойства (Vc) НКТ в нейронах NTS вероятно свидетельствуют о внутриклеточном цАМФ-зависимом

фосфорилировании калиевых каналов, как с потенциал-зависимыми свойствами, так и нечувствительных к изменениям мембранного потенциала.

Литература

1. Paton, J. F., Li, Y. W., Schwaber, J. S. // *Ann. NY Acad. Sci.* 2001. Vol. 940, P.157 – 168.
2. Butcher, J.W., Paton, J. F. R.// *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 1998. Vol. 274, R677 – R685.
3. Yajun, R., Barnwell, L. F., Alexander, J. C. et al// *The J. of Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, N.17, P. 11769 – 11779.
4. Torres, G. E., Chaput, Y., Andrade, R. // *Mol. Pharmacol.* 1995. Vol. 47, P.191 – 197.
5. Rudy, B., McBain, C. J. // *Trends in Neurosci.* 2001. Vol. 24, N.9. P.517 – 526.
6. Singh, R., Tiku, M. K. // *Brain Research.* 1985. Vol. 358, P.1 – 9.
7. Edwards, E., Paton, J.F.R. // *Am. J. Physiol.* 1999. Vol. 277, (Heart Circ. Physiol. 46). P. H1914 – H1923.
8. Белугин, С. Н., Белугина, О.С., Миффлин, С. В.// *Докл. НАН Беларуси.* 2006. Т. 50, № 6, С. 90 – 95.
9. Belugin, S., Mifflin, S. // *J. Neurophysiol.* 2005. Vol. 94, N.6, P.3849 – 3859.
10. Paton, J. F.R., Foster, W. R., Schwaber, J. S. // *Brain Research.* 1993. Vol. 604, P.112 – 125.
11. Moak, J.P., Kunze, D.L.// *Am. J. Physiol.* 1993. Vol. 265, H1596 – H 1602.
12. Bonham, A. C., Joad, J. P. // *J. Physiol. (Lond.).* 1991. Vol. 441, P. 95 – 112.
13. Brooke, R. E., Atkinson, L., Batten, T. F. C., et al // *Neuroscience.* 2004. Vol. 126, P.1001 – 1010.
14. Levin, G., Chikvashvili, D., Singer-Lahat, D. et al // *The J. of Biol. Chem.* 1996. Vol. 271, N.46, P. 29321 – 29328.
15. Yang, B., Goulet, M., Boismenu, R., Ferguson, A.V. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2004. Vol. 286, R927 – R934.