

## **Эффект цАМФ на инактивационную кинетику калиевых токов нейронов NTS при почечной гипертензии**

*Белорусский государственный медицинский университет, Минск*

Проведен сравнительный анализ инактивационной кинетики калиевых токов (ИКТ) в «пэтч-кламп» экспериментах на нейронах NTS при нормотензии и при почечной форме гипертензии. Выявлено деполяризационное смещение параметра устойчивой инактивации ИКТ ( $V_{hi}$ ) от -03 мВ до -89 мВ при диализе цАМФ нейронов NTS ГТ крыс в отличие от нейронов НТ крыс, что предположительно может отражать депрессорные последствия цАМФ-зависимого фосфорилирования калиевых каналов нейронов барорефлекторного звена NTS при почечной форме гипертензии.

**Ключевые слова:** эффект нейронов, гипертензия.

Нейроны дорзального отдела Nucleus Tractus Solitarius (NTS) первыми в мозге принимают и анализируют сенсорную информацию от висцерорецепторов, в том числе и от сосудистых барорецепторов [1]. Возбудимость нейронов барорефлекторного звена в NTS зависит от состояния потенциал-зависимой калиевой проводимости и, в особенности, проявляющей быстрые активационные и инактивационные свойства. Трансмембранная инактивируемая калиевая проводимость в нейронах NTS выявляется в виде инактивируемых калиевых А-токов (ИКТ), предопределяет характерную задержку возбуждения, ограничивает частоту генерации потенциалов действия и ускоряет реполяризацию мембраны при генерации потенциала действия [2,3].

Стойкое повышение среднего значения артериального давления предполагает перестройки в центральном звене барорефлекса, обусловленные повышенной афферентной сигнализацией от сосудистых барорецепторов [1]. В нейронах NTS при почечной форме гипертензии крыс выявлено ухудшение ИКТ, уменьшение времени задержки возбуждения и замедление реполяризации потенциала действия [2]. Обнаруженная в нейронах NTS аденилатциклазная активность [4], а также ослабление барорефлекса и тахипноэ при прямом введении проникающих через мембрану аналогов циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) в NTS [5], указывают на наличие цАМФ-зависимых механизмов фосфорилирования в нейронах этой структуры мозга. Известно, что ИКТ нейронов мозга могут быть модулированы цАМФ-зависимыми механизмами. Ранее было выявлено деполяризационное смещение устойчивой активационной зависимости ИКТ от мембранного потенциала при внутриклеточном диализе цАМФ в нейронах NTS нормотензивных (НТ) крыс, что не наблюдалось в нейронах NTS гипертензивных (ГТ) крыс [6,7]. цАМФ-зависимая модуляция параметров ИКТ предположительно является потенциальным звеном реализации синаптических механизмов регуляции возбудимости нейронов NTS. Инактивационные свойства ИКТ в качестве вероятного объекта модуляции цАМФ-зависимыми механизмами в нейронах NTS до настоящего времени не изучались.

Принимая в расчет важность состояния инактивационной кинетики ИКТ для уровня возбудимости нейронов NTS, в работе проводится сравнительный анализ

показателей устойчивой инактивации ИКТ при внутриклеточном диализе цАМФ нейронов NTS крыс при нормотензии и при почечной форме гипертензии.

#### Материал и методы

Эксперименты выполнены на 22 крысах (2 – 3 месяца) самцах, линии Sprague-Dawley (375 – 500 г, Charles River Laboratories). Анестезию крыс производили медетомидином и кетамином (0,5 мг/кг и 75 мг/кг, внутривенно, соответственно). Гипертензия (ГТ) у 12 крыс была индуцирована частичной односторонней перевязкой почки с контралатеральной нефрэктомией [8].

Нормотензивные крысы (НТ, n=10) были анестезированы аналогичным образом. НТ крысам производили только одностороннюю нефрэктомию, контралатерально почку не перевязывали. Анестезию прерывали атипамезолом (1 мг/кг, внутривенно).

Эксперименты выполнены через 28-35 дней (ГТ 4 недели) после нефрэктомии. За 2 дня до эксперимента артериальный катетер помещали в бедренную артерию крысы под медетомидин/кетаминовой анестезией. После двухдневного восстановительного периода кровяное давление измеряли у бодрствующей крысы в условиях свободного поведения животного путем подсоединения артериального катетера к преобразователю давления (Kobe) и устройству McLab/Cambridge Electronic Design A/D для визуализации параметров давления. Измерение кровяного давления производили в течение 3 часов и данные собранные в течение последнего часа пересчитывали в индекс среднего артериального давления (САД). У ГТ крыс САД составляло 173,77,5 мм рт.ст. (n=12, M SEM).

В день эксперимента животных ингаляционно анестезировали изофлюраном, ствол мозга быстро извлекали и помещали в ледяной буфер Кребса (5 0С). Медуллярную часть ствола мозга крысы нарезали вибратором (Warner Instrument Corp.) на поперечные срезы толщиной 440 мкм в области calamus scriptorius. Срезы инкубировали в PIPES буфере с трипсином (Sigma, тип XI, 3-5 мг/10 мл) 55 мин при 34 0С. После ферментной обработки срезы трехкратно промывали в инкубационном растворе и сохраняли при комнатной температуре (22 0С) в постоянно оксигенируемом PIPES буфере. Срезы ствола мозга располагали на стеклянной поверхности и область NTS иссекали. Участок NTS механически разбивали при помощи отполированной пипетки в DMEMS буфере. Аликвоту нейрональной суспензии в DMEMS помещали в перфузионную камеру для осаждения клеток на 5 минут. Перфузию клеток производили раствором, содержащим (ммоль/л): NaCl, 140; d-глюкоза, 33; HEPES, 10; KCl, 3; CaCl<sub>2</sub>, 2; MgCl<sub>2</sub>, 1,2 (pH 7,4; осмоляльность 305-320 мОсмоль). Внеклеточный перфузионный раствор для тестирования калиевых токов содержал (ммоль/л): NaCl, 132; d-глюкоза, 33; HEPES, 10; KCl, 3; MgCl<sub>2</sub>, 2; ТТХ, 0,5 μМ (тетродотоксин, Sigma, St.Louis, Mo, USA).

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». Electrodes для «пэтч-кламп» регистрации изготавливали 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 заполняли электродным раствором без цАМФ, либо с цАМФ (0,1 ммоль/л). Electrode раствор содержал (ммоль/л): KCl, 140; MgCl<sub>2</sub>, 2;

EGTA, 10; ГТФ, 0,1; АТФ, 4; НЕРЕС, 10 (рН 7,2; осмоляльность 280 – 300 мОсмоль), и имел сопротивление 3 – 8 Мом при тестировании в перфузионном растворе.

Для регистрации ионных токов использован интегрирующий усилитель Axopatch-200B (Axon Instruments, Foster City, CA) и персональный компьютер класса Pentium с пакетом компьютерных программ pCLAMP версии 8.1 (Axon Instruments). Формировали гигаомный контакт (seal) электрода с мембраной клетки, после чего с помощью отрицательного давления образовывали конфигурацию «вся клетка». В «вольт-кламп» экспериментах регистрируемые ионные токи пересчитывали на плотность тока (пА/пФ) для 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 компенсировано на 40 – 70%. Перед каждой регистрацией мембранный тест производили с тем, чтобы иметь подтверждение стабильности суммарного сопротивления электрод-клетка. «Вольт-кламп» протоколы для анализа устойчивой инактивации ионных токов состояли из ступенчатой команды 0 мВ (500 мс) после обуславливающей фиксации мембранного потенциала (400 мс): – 130 мВ, – 120 мВ, – 110 мВ, – 100 мВ, – 90 мВ, – 80 мВ и – 70 мВ (фрагмент протокола на вставке рис.1). Ток, регистрируемый при 0 мВ, после обуславливающей фиксации мембранного потенциала – 60 мВ принимали в расчет при оценке инактивируемых калиевых токов, поскольку состоял из неинактивируемого компонента выходящих калиевых токов.

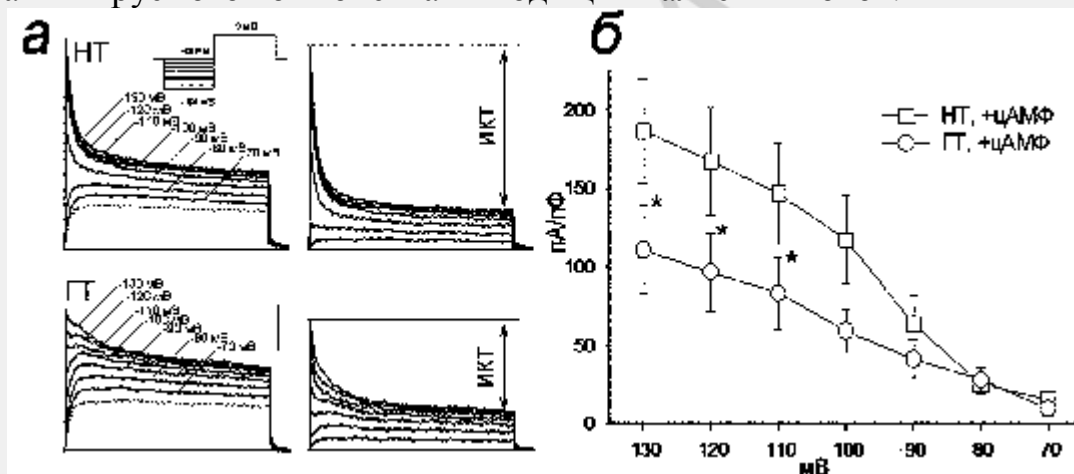


Рис.1. а – ИКТ нейронов из NTS нормотензивных (НТ) и гипертензивных (ГТ) крыс. На графиках слева – суммарные калиевые токи индуцированные прямоугольной командой (0 мВ, 0,5 с) после обуславливающей гиперполяризации -130 мВ, -120 мВ, -110 мВ, -100 мВ, -90 мВ, -80 мВ, -70 мВ и -60 мВ (0,4 с), пунктиром – неинактивируемый калиевый ток после обуславливающей гиперполяризации – 60 мВ. На вставке – фрагмент протокола регистрации токов при 0 мВ. На графиках справа – расчет ИКТ по разнице между пиковым и персистирующим значениями тока после цифрового вычитания неинактивируемого калиевого тока из суммы калиевых токов. Вертикальный отрезок – 0,1 нА. б – плотность ИКТ в зависимости от обуславливающей гиперполяризации. \* – P < 0,05 (ANOVA)

Равновесный калиевый потенциал  $E_K$  (мВ) определяли по деактивационным токам при значениях мембранного потенциала от – 110 мВ до – 30 мВ после тест-стимула 0 мВ (125 мс). При 3 ммоль KCl  $E_K$  равнялся –  $83 \pm 2$  мВ для нейронов (n=19) НТ крыс и –  $81 \pm 2$  мВ для нейронов (n=15) ГТ крыс. При 20 ммоль KCl  $E_K$  равнялся –  $54 \pm 9$  мВ (n=3, НТ нейроны).

Цифровое вычитание значений токов утечки и анализ данных производили после завершения эксперимента с использованием Clampfit Software (Axon) и Sigma Plot 8.1.

Потенциал-зависимую инактивацию выходящих токов оценивали по уравнению

$$\frac{I - I_0}{I_{\text{max}}} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V_m - V_{hi}}{V_{ci}}\right)}, \quad (4)$$

где  $I$  – значение тока измеренного в протоколе для устойчивой потенциал-зависимой инактивации и  $V_0$  – исходное значение тока (обуславливающее значение мембранного потенциала – 70 мВ),  $I_{\text{max}}$  – максимальное значение тока,  $V_m$  – мембранный потенциал (мВ).  $V_{hi}$  – инактивационный параметр – значение обуславливающего мембранного потенциала (мВ), при котором ток составляет 1/2 от максимального значения,  $V_{ci}$  – фактор наклона (мВ).

Все данные, описанные в настоящем исследовании, выражали 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 (Sigma Plot 8.1). Для сравнительного анализа использовался также t-критерий «two-tailed» по Student. Достоверными считались различия если  $P < 0,05$ .

#### Результаты и обсуждение

Деполяризующей ступенчатой командой (0 мВ) после обуславливающей гиперполяризации мембраны нейронов NTS были индуцированы выходящие калиевые токи (рис.1.а). Путем цифрового вычитания из суммы калиевых токов неинактивируемого компонента были изолированы инактивируемые калиевые токи, которые достигали пиковых значений в первые 10 мс и затем экспоненциально убывали. Разность между пиком тока и значением тока через 500 мс (т.е. персистирующим компонентом) использована для количественной оценки ИКТ (рис.1.а). Для нейронов барорефлекторного звена в NTS наличие ИКТ является одной из электрофизиологических и функциональных характеристик [3]. Использованный протокол регистрации ИКТ в зависимости от величины обуславливающей гиперполяризации мембранного потенциала позволил оценить устойчивую инактивацию ИКТ при внутриклеточном диализе цАМФ.

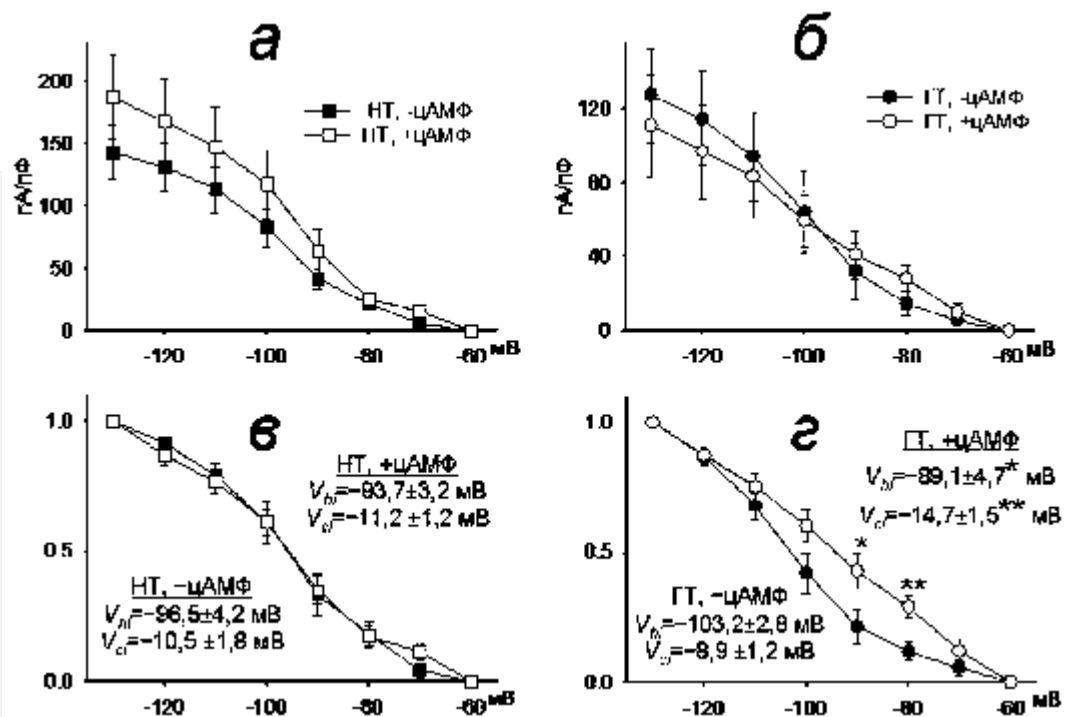


Рис.2. Плотность ИКТ (пА/пФ) цАМФ-диализируемых (? , 0) нейронов и без цАМФ (!, ?) нейронов NTS HT (а) и ГТ (б) крыс. в и г – нормализованные значения ИКТ нейронов NTS HT и ГТ крыс соответственно. \* –  $P < 0,05$ , \*\* –  $P < 0,01$  (Student)

При внутриклеточном диализе цАМФ величина ИКТ нейронов ( $n=9$ ) HT крыс превышала значения ИКТ нейронов ( $n=9$ ,  $P < 0,001$ , ANOVA) ГТ крыс (рис.1.б). Вместе с тем величина ИКТ не отличалась между нейронами HT ( $n=6$ ) и ГТ ( $n=9$ ) крыс в экспериментах, где во внутриэлектродный раствор цАМФ не добавлялся.

В отличие от нейронов NTS HT крыс внутриклеточный диализ цАМФ нейронов NTS ГТ крыс приводит к деполяризационному (вправо) смещению нормализованной сигмоидной зависимости ИКТ. При этом параметр устойчивой инактивации  $V_{hi}$  смещался от  $-103,2 \pm 2,8$  мВ ( $n=9$ ) до  $-89,1 \pm 4,7$  мВ ( $n=9$ ,  $P < 0,019$ , Student) (рис.2.г). Параметр  $V_{hi}$  не отличался между нейронами HT крыс до диализа цАМФ ( $-96,5 \pm 4,2$  мВ,  $n=6$ ) и при диализе цАМФ ( $-93,7 \pm 3,2$  мВ,  $n=9$ ) (рис.2.в). Фактор наклона кривой ( $V_{ci}$ ) сигмоидной зависимости устойчивой инактивации ИКТ в нейронах ГТ крыс также менялся при диализе цАМФ от  $-8,9 \pm 1,2$  мВ до  $-14,7 \pm 1,5$  мВ ( $P < 0,01$ ) (рис.2.г).

Ранее в протоколах, позволяющих оценить активационную кинетику было отмечено, что при цАМФ диализе нейронов NTS HT и ГТ крыс наблюдается увеличение постоянной времени ( $t$ ) экспоненциального убывания ИКТ [7]. Замедление кинетики убывания ИКТ при диализе цАМФ свидетельствует о возрастании вероятности неполной инактивации ИКТ и усиление персистирующего компонента ИКТ, что в большей степени имело место в нейронах NTS ГТ крыс. Обнаруженное деполяризационное смещение при диализе цАМФ параметра устойчивой инактивации ( $V_{hi}$ ) ИКТ в нейронах барорефлекторного звена NTS ГТ крыс согласуется и с данными других авторов, показавших смещение  $V_{hi}$  для ИКТ в сторону более позитивных значений мембранного потенциала нейронов гиппокампа при активации протеинкиназы-А [9]. Увеличение фактора наклона ( $V_{ci}$ ) сигмоидной зависимости устойчивой инактивации ИКТ в нейронах ГТ крыс при диализе цАМФ вероятно может является следствием более медленной кинетики экспоненциального убывания ИКТ.

Класс калиевых каналов ответственных за ИКТ в барорефлекторных нейронах NTS пока не определен, однако быстрая деинактивационная динамика ИКТ [2] дает основания предполагать присутствие калиевых каналов класса Kv4 в мембране изучаемых нейронов. Калиевые каналы класса Kv4 широко представлены в нейронах мозга. В частности, Kv4.2 каналы выявлены в холецистокинин-чувствительных нейронах NTS, участвующих в формировании чувства пищевого насыщения и вероятно не имеющих непосредственного отношения к системному гемодинамическому контролю [10]. Известно, что каналы класса Kv4 подвержены в нейронах цАМФ-зависимому фосфорилированию. Так, при тестировании форсколина (активатор протеинкиназа-А-зависимого фосфорилирования) на нейронах гиппокампа, имеющих калиевые каналы Kv4.2 в комплексе с белком KChIP3, возрастает постоянная времени экспоненциального убывания индуцируемых ИКТ [11].

Как известно, замедление кинетики инактивации каналов может уменьшить негативный вклад инактивационных процессов в величину пика ионной проводимости через канал. Однако выявленное ранее при диализе цАМФ замедление инактивации ИКТ [7] и наблюдаемое в настоящем исследовании деполяризационное смещение инактивационной зависимости ИКТ в нейронах NTS ГТ крыс не сопровождаются изменениями плотности ИКТ. Поэтому данный факт может лишь косвенно свидетельствовать об относительном снижении плотности ИКТ при внутриклеточном диализе цАМФ в нейронах NTS ГТ крыс.

Модуляция амплитудно-кинетических характеристик ИКТ, вероятно, может зависеть от синаптической активности в NTS и, вместе с тем, определять уровень возбудимости нейронов NTS и влияя таким образом на характер сердечно-сосудистых рефлексов. Такая возможность подтверждается фактами ослабления барорефлексов при микроинъекции блокаторов калиевых каналов в NTS [12]. Выявленные особенности модуляции ИКТ при диализе цАМФ нейронов NTS при почечной форме гипертензии могут свидетельствовать о том, что на фоне понижения плотности ИКТ при почечной гипертензии, модуляция активационных свойств данных токов, вероятно, приобретает меньшую значимость при стойкой гипертензии и меняется на преимущественную модуляцию их инактивационных свойств. Физиологическое значение данных изменений при гипертензии предположительно может быть сопряжено с особенностями реакций нейронов NTS на колебания артериального давления в условиях стабильно повышенного значения САД и повышенной сенсорной афферентации от барорецепторов [1].

При нормотензии микроинъекция аналога цАМФ в NTS ослабляет барорефлекс [5], как и микроинъекция 4-аминопиридина (блокатора ИКТ) [12]. Однако ослабление инактивации ИКТ и более благоприятное проявление ИКТ при значениях мембранного потенциала покоя в ответ на повышение уровня цАМФ в нейронах NTS при почечной гипертензии крыс, вероятно, могут компенсировать прессорный результат понижения амплитуды ИКТ, к примеру, в ГАМК-эргических нейронах NTS, возбудимость которых обратно связана с эффективностью барорефлекса. Дополнительным подтверждением данного предположения может быть и исчезновение блокирующего влияния цАМФ в нейронах NTS на активационную кинетику при гипертензии, тогда как при нормотензии диализ цАМФ приводит к блоку устойчивой активации ИКТ [6].

Таким образом, деполяризационное смещение параметра устойчивой инактивации ( $V_{hi}$ ) ИКТ при диализе цАМФ нейронов NTS ГТ крыс в отличие от нейронов НТ крыс предположительно может отражать связь внутриклеточного цАМФ-зависимого фосфорилирования калиевых инактивируемых каналов с депрессорным характером модуляции в NTS возбудимости нейронов барорефлекторного звена при почечной форме гипертензии.

### Литература

1. Mifflin, S. W. // *News Physiol. Sci.* 2001. Vol. 16, P. 266 – 271.
2. Belugin, S., Mifflin, S. // *J. Neurophysiol.* 2005. Vol. 94, N 6. P. 3849 – 3859.
3. Bailey, T.W., Jin, Y.H., Doyle, M.W., Andresen, M.C. // *J. Neurosci.* 2002. Vol. 22, P. 8230(8237).
4. Singh, R., Tiku, M. K. // *Brain Res.* 1985. Vol. 358, P. 1 – 9.
5. Edwards, E., Paton, J.F.R. // *Am. J. Physiol.* 1999. Vol. 277, (Heart Circ. Physiol. 46). P. H1914 – H1923.
6. Белугин, С.Н. // Докл. НАН Беларуси. 2007. Т. 51, № 3. С. 103 – 108.
7. Белугин, С.Н., Миффлин, С.В. // Докл. НАН Беларуси. 2007. Т. 51, № 4, С.71 – 76.
8. Grollman, A. // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1944. Vol. 57, P. 102 – 104.
9. Hoffman, D.A., Johnston, D. // *J. Neurosci.* 1998. Vol. 18, P. 3521 – 3528.
10. Sutton, GM, Patterson, LM, Berthoud, HR. // *J Neurosci.* 2004 Vol.24, P. 10240 – 10247.
11. Schrader L.A., Anderson A.E., Mayne A., Pfaffinger P.J., Sweatt J.D. // *J. Neurosci.* 2002. Vol. 22, P. 10123 – 10133.
12. Butcher, J.W., Paton, J. F. R. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 1998. Vol. 274, P. R677 – R685.