

С. Н. Белугин

Динамика изменений калиевых токов и возбудимости нейронов nts при развитии почечной гипертензии

Белорусский государственный медицинский университет

При развитии почечной гипертензии (ГТ) у крыс в нейронах NTS наблюдается уменьшение плотности инактивируемых калиевых токов (ИКТ) и их персистирующего компонента (ПКТ). Градуальное повышение САД через 1 и 4 недели после перевязывания почечной артерии у крыс сопровождается сокращением времени задержки возбуждения в нейронах NTS. Изменения ПКТ в нейронах NTS ГТ крыс наблюдались раньше (через 1 неделю ГТ) изменений плотности ИКТ (через 4 недели ГТ), что вероятно является составляющей градуальных перестроек возбудимости нейронов NTS при стойком повышении артериального давления.

Ключевые слова: динамика изменений калиевых токов, перевязывание почечной артерии, возбудимость нейронов.

Нейроны ядра одиночного тракта (Nucleus Tractus Solitarius, NTS) обеспечивают начальный анализ и интеграцию в мозге афферентной информацию от висцеральных рецепторов, в том числе и от артериальных барорецепторов. NTS нейроны барорефлекторного звена проявляют инактивируемую потенциал-зависимую калиевую проводимость в виде калиевых токов с постоянной времени инактивации от нескольких десятков до нескольких сотен миллисекунд (ИКТ) [1]. Плотность ИКТ и их инактивационные свойства специфически характеризуют нейроны центрального барорефлекторного звена NTS, являясь определяющими параметрами в степени задержки возбуждения (до нескольких сотен миллисекунд) в ответ на афферентную стимуляцию [1,2]. Микроинъекция антагониста ИКТ 4-аминопиридина в NTS приводит к ослаблению барорефлекторной регуляции [3]. При почечной гипертензии выявлено понижение плотности ИКТ в мембране нейронов NTS [2]. Изменения плотности ИКТ и инактивационных свойств могут быть результатом изменения количества калиевых каналов в мембране, их субъединичного состава и связанных с этим стойких изменений биофизических свойств каналов мембраны. Изменения ИКТ в мембране нейронов NTS рассматриваются в качестве вероятной причины изменения возбудимости нейронов NTS при хронической 4 недельной почечной гипертензии [2] и при генетической форме стойкой гипертензии крыс [4]. Вместе с тем сравнительный анализ состояния ионной проводимости мембраны нейронов при развитии гипертензии на начальных стадиях (1 неделя) и через длительный период сохранения устойчивого повышенного артериального давления (4 недели), а также оценка в этой связи возбудимости нейронов важны в определении последовательности адаптационных перестроек в сердечнососудистом барорефлекторном центре.

Целью настоящего исследования было изучение ИКТ и возбудимости нейронов NTS при формировании стойкого повышения артериального давления

негенетической причиной – в модели почечной гипертензии продолжительностью 1 неделя и 4 недели.

Материал и методы

Эксперименты выполнены на взрослых крысах (2-3 месяца) самцах, Sprague-Dawley линии 375-500г. Анестезию крыс производили медетомидином (0,5 мг/кг, в.б.) и кетамином (75 мг/кг, в.б.). Гипертензию (ГТ) у крыс индуцировали путем частичной односторонней перевязки почечной артерии с контралатеральной нефрэктомией [5]. Нормотензивным крысам (НТ) производили только одностороннюю нефрэктомию.

Эксперименты выполнены через 1 и 4 недели после операций. За 2 дня перед экспериментом артериальный катетер помещался в бедренную артерию крыс. После двухдневного восстановительного периода кровяное давление измеряли у бодрствующей крысы в условиях свободного поведения животных путем подсоединения артериального катетера к преобразователям давления (Kobe) и McLab/Cambridge Electronic Design A/D для дальнейшего расчета среднего артериального давления (САД) у каждой ГТ крысы. В экспериментах использовано 25 НТ крыс, 5 крыс с 1 недельной гипертензией (САД=134,8±3,7 мм рт.ст.) и 11 крыс с 4 недельной гипертензией (САД=154,1±7,5 мм рт.ст.).

В день эксперимента крыс ингаляционно анестезировали изофлюраном, ствол мозга извлекали и располагали в ледяном буфере Кребса (50С). Ствол мозга нарезался вибратором (Warner Instrument Corp.) на поперечные срезы толщиной 440 мкм в области calamus scriptorius. Срезы инкубировали в PIPES буфере с трипсином (Sigma, тип XI, 3-5мг/10мл) 55 мин при 340С. После ферментной обработки область NTS иссекали и механически разбивали в DMEMS буфере. После разбивки аликвоту нейрональной суспензии помещали в перфузионную камеру для осаждения клеток на 5 минут. Перфузию клеток производили раствором с составом (ммоль/л): NaCl, 140; D-глюкоза, 33; NEPES, 10; KCl, 3; CaCl₂, 2; MgCl₂, 1,2 (pH 7,4, осмоляльность 305-320 мОсмоль/л).

Регистрацию мембранных токов («вольт – кламп» протокол) и колебаний мембранного потенциала («ток – кламп» протокол) производили методом «пэтч-кламп» в конфигурации «вся клетка». Electrodes изготавливали из кварцевых капиллярных трубок, которые заполняли раствором содержащим (ммоль/л): KCl, 140; MgCl₂, 2; EGTA, 10; ГТФ, 0,1; АТФ, 4; NEPES, 10 (pH 7,2, осмоляльность 280 – 300 мОсмоль). В перфузионном растворе заполненные электроды имели сопротивление 3 – 8 Мом. Эксперименты проводили 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. Формировали гигаомный контакт электрода с мембраной клетки, после чего с помощью отрицательного давления образовывали конфигурацию «вся клетка». Для оптимизации регистрации калиевых токов в «вольт-кламп» протоколах наружные растворы не содержали Ca²⁺ и Na⁺, но включали 0,5 мкмоль селективного блокатора потенциал-зависимых натриевых токов - тетродотоксина (TTX, Sigma, St.Louis, MO, USA).

В «вольт – кламп» экспериментах регистрируемые ионные токи

пересчитывали с учетом размера клетки на плотность тока (пА/пФ). Регистрируемые токи отфильтровывали по частоте от составляющих выше 1 кГц с частотой разрешения при хранении – 5 кГц. Клетки брали в расчет если токи утечки были менее 50 пА. Последовательное сопротивление при регистрации было менее 15 Мом и компенсировано на 40-70%. «Вольт – кламп» протоколы выходящих токов состояли из прямоугольных деполяризующих мембранный потенциал команд от исходного фиксируемого значения (-110 мВ или -40 мВ, 400мс) до одного из значений в диапазоне – 70 ~ +70 мВ (400мс)(рис.1.а.вставка). Равновесный потенциал (E_k) оценивали при регистрации следовых деактивационных компонентов выходящих токов. При 3 ммоль КС1 E_k составлял -83 ± 2 мВ у нейронов (n=19) НТ крыс и -81 ± 2 мВ у нейронов (n=15) ГТ крыс. При 20 ммоль КС1 E_k составил -54 ± 9 мВ (n=3, НТ нейроны).

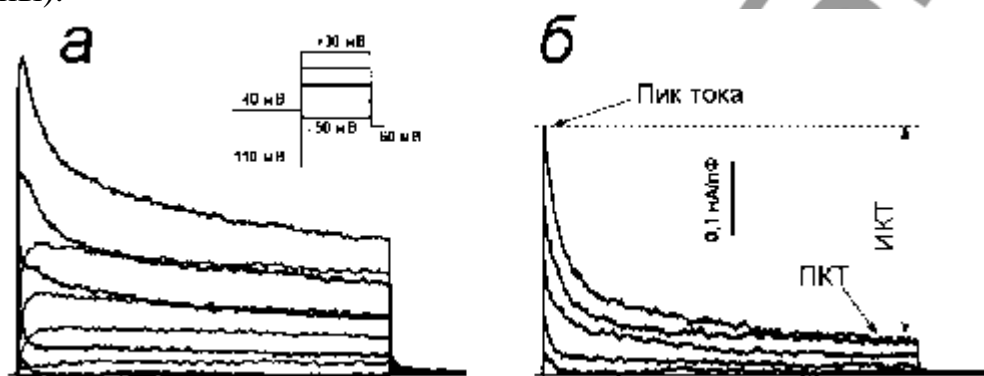


Рис.1. а - выходящие калиевые токи «вольт-кламп» протоколов «А» и «Б», на вставке – фрагменты «вольт-кламп» протоколов: обуславливающие стимулы -110 мВ («А»-протокол) и -40 мВ («Б» - протокол), командные стимулы от -50 мВ до +30 мВ. б - ИКТ и ПКТ в результате цифрового вычитания значений токов протокола «Б» из протокола «А». Продолжительность регистрируемых токов в ответ на командный стимул -400 мс

В «ток – кламп» экспериментах использована обуславливающая гиперполяризация нейрона током (-100 пА, 500 мс) с последующей прямоугольной деполяризующей командой +40 пА (1000 мс)(рис.3). «Ток-кламп» регистрация осуществлялась с использованием внеклеточно перфузионного раствора без ТТХ, в предусмотренном аппаратными средствами автоматическом режиме - «I-Clamp Fast Mode». Частотные составляющие регистрируемых колебаний мембранного потенциала находились в полосе менее 5 кГц. Данные «ток-кламп» протокола были отцифрованы для хранения при 20 кГц.

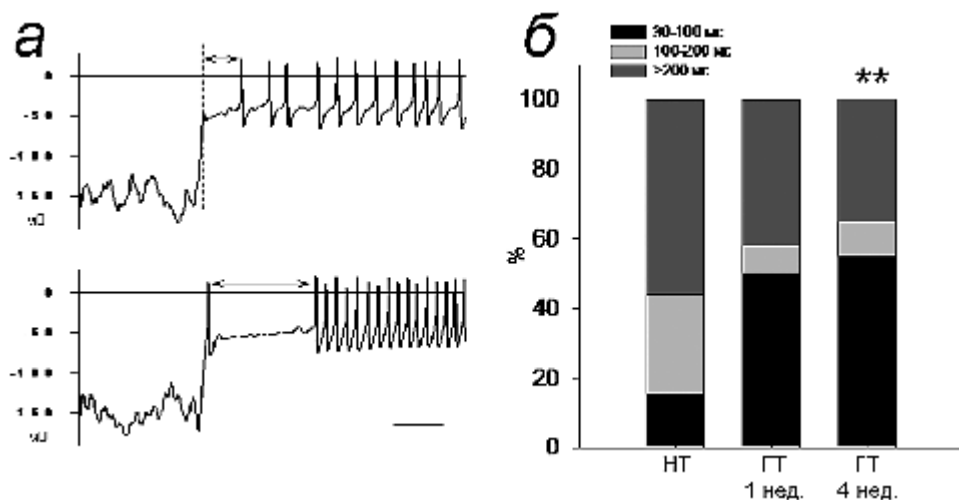


Рис.3. а – задержка возбуждения >30 мс в «ток-кламп» протоколе с обуславливающей гиперполяризацией – 100 пА (0,4 с) и деполяризующей прямоугольной командой +40 пА (1 с), нижняя запись – пример задержки возбуждения в форме длительного первого межспайкового интервала, горизонтальный отрезок 100 мс. б – процентное распределение нейронов NTS НТ (n=52) и ГТ (1 неделя, n=9 и 4 недели, n=20) крыс по длительности задержки возбуждения. Тест для НТ и ГТ (4 недели) нейронов, ** – $P < 0,01$

Потенциал формируемый между электродным раствором и венклеточным буфером составил – 4 мВ и в дальнейшем не корректировали. С целью контроля за качеством контакта клетка-электрод во время эксперимента не производили вычитание токов утечки. Анализ данных производили после завершения эксперимента с использованием Clampfit Software (Axon) и Sigma Plot 8.1.

Все данные представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка средней ($M \pm SEM$). Амплитудные значения калиевых токов в зависимости от мембранного потенциала сравнивали методом ANOVA («two-way») с тестированием по Fisher LSD (post-hoc). Достоверными считали различия если $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В NTS нейронах НТ и ГТ крыс деполяризующими командами в «вольт-кламп» протоколе были индуцированы выходящие потенциал – зависимые инактивируемые и неинактивируемые калиевые токи (рис.1.а). Оценка инактивируемых калиевых токов (ИКТ) была возможна только после цифрового вычитания неинактивируемого компонента калиевых токов (протокол «Б», обуславливающая фиксация мембранного потенциала при – 40 мВ) из суммы калиевых токов (протокол «А», обуславливающая фиксация мембранного потенциала при – 110 мВ). В результате вычитания были рассчитаны ИКТ по разнице между пиком результирующего тока и персистирующим компонентом (ПКТ, калиевый ток через 400 мс от начала деполяризующей команды) (рис.1.б). Ранее сообщалось, что плотность ИКТ более 30 пА/пФ при – 10 мВ наблюдается у 57 из 87 нейронов НТ крыс (67%) и 33 из 47 нейронов ГТ крыс (70%)[2]. В настоящей работе для анализа использованы нейроны с плотностью ИКТ более 30 пА/пФ при – 10 мВ.

При сравнительном анализе ИКТ между нейронами NTS НТ, 1 недельных

ГТ и 4 недельных ГТ крыс наблюдали понижение ИКТ в нейронах ($n=14$, $P < 0,001$, ANOVA) 4 недельных ГТ крыс (рис.2). ИКТ нейронов ($n=9$) 1 недельных ГТ крыс не отличались от ИКТ нейронов ($n=25$) НТ крыс.

При гипертензии наблюдали пониженные ПКТ, как в нейронах ($n=9$, $P < 0,05$, ANOVA) 1 недельных ГТ крыс, так и нейронах ($n=14$, $P < 0,01$, ANOVA) 4 недельных ГТ крыс (рис.2).

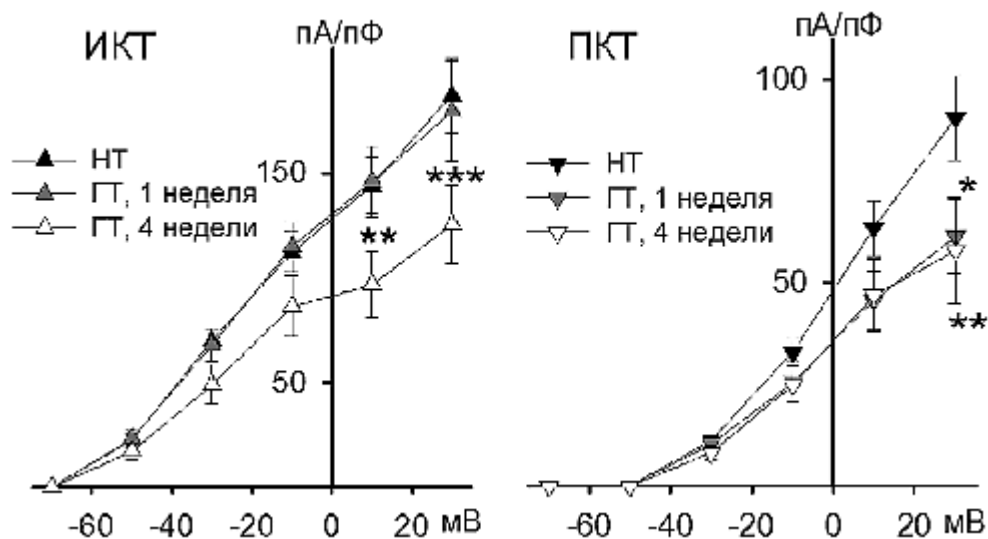


Рис.2. Плотность ИКТ (Пик – ПКТ) и ПКТ в зависимости от мембранного потенциала НТ ($n=25$) и ГТ (1 неделя, $n=9$; 4 недели, $n=14$) нейронов NTS. 1 неделя и 4 недели – продолжительность ренальной гипертензии у ГТ крыс. * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$ («two-way» ANOVA)

В «ток – кламп» экспериментах нейроны NTS классифицированы по длительности задержки возбуждения на три группы: менее 100 мс, 100 – 200 мс и более 200 мс. Выявлено достоверное увеличение относительного числа нейронов с меньшей длительностью задержки возбуждения при 4 недельной гипертензии (рис.3.б).

Развитие изменений САД в настоящем исследовании (см. методы исследования) согласуется с динамикой повышения САД другими авторами при формировании стойкой гипертензии у крыс через 1 неделю и 4 недели после нефрэктомии [6]. При формировании почечной гипертензии изменения в сердечнососудистом центре NTS свидетельствуют о вероятно адаптивных перестройках. Так, известно, что количество NTS нейронов с мультиспайковой активностью возрастает после стимуляции аортального нерва у крыс с почечной формой гипертензии [7], что указывает на повышение возбудимости нейронов NTS. В этой связи следует также учитывать прессорный эффект ГАМК при микроинъекции в NTS, который ослабляется при почечной гипертензии крыс [8]. Кроме того известно, что у крыс с 1 и 4 недельной почечной гипертензией в NTS наблюдаются признаки смещения баланса ГАМК-эргических межнейронных влияний в сторону преобладания более медленных тормозных эффектов посредством активации метаботропных ГАМК-В (GABA-B) рецепторов, и снижения активности ионоторопных ГАМК-А (GABA-A) рецепторов [9].

Возбудимость нейронов в NTS может зависеть как от лиганд-рецепторных

перестроек в ГАМК-эргических или глутамат-эргических синапсах нейронов сердечно-сосудистого центра, так и от состояния потенциал-зависимой ионной проводимости мембраны нейронов. Более низкая плотность ИКТ в нейроне приводит к сокращению временного порога возбуждения и облегчения проявления высокочастотных разрядов [2], а также к гипертензивному эффекту при микроинъекции селективного блокатора данных токов (4-АП) в NTS [3]. Понижение плотности ИКТ и уменьшение времени задержки возбуждения в нейронах NTS наблюдалось через 4 недели после нефрэктомии. Вместе с тем в настоящем исследовании в данных «ток-кламп» протокола обращает на себя внимание тенденция увеличения количества нейронов с уменьшенной задержкой возбуждения без признаков понижения плотностью ИКТ при 1 недельной гипертензии. Поскольку задержка возбуждения в нейроне в значительной степени предопределено плотностью ИКТ и кинетикой данных токов, сокращение времени задержки возбуждения при 1 недельной гипертензии вероятно может быть связано с изменением инактивационных свойств ИКТ, опережающих дальнейшее изменение плотности ИКТ. В настоящем исследовании неполную инактивацию ИКТ могут характеризовать ПКТ, которые были понижены как при 1, так и при 4 недельной гипертензии. Помимо собственно инактивационных свойств ИКТ следует также учитывать возможные особенности вклада неинактивируемых калиевых токов в наблюдаемые ПКТ, и таким образом изменения времени задержки возбуждения. Кроме того, в нейронах NTS имеются неселективные катионные токи, модулируемые цАМФ и Са-зависимыми внутриклеточными механизмами фосфорилирования [10], но причастность неселективной катионной проводимости к изменениям возбудимости нейронов NTS при стойкой гипертензии пока неопределена.

Выводы

1. Градуальное повышение САД через 1 и 4 недели после перевязывания почечной артерии у крыс сопровождается сокращением времени задержки возбуждения в нейронах NTS.

2. Уменьшение ПКТ в нейронах NTS у 1 недельных ГТ крыс опережает проявление уменьшения плотности ИКТ (4 неделя гипертензии) в процессе развития почечной гипертензии, что возможно отражает градуальные изменения возбудимости нейронов NTS при стойком повышении артериального давления.

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. Butcher, J.W., Paton, J. F. R.// Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 1998. Vol. 274, P. R677 – R685.
4. Sundaram, K., Johnson, S. M., Felder, R.B. // Neurosci. Lett. 1997. Vol. 225, P. 205 – 209.
5. Grollman, A. // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1944. Vol. 57, P. 102 – 104.
6. Cunningham, J.T., Herrera-Rosales, M., Martinez, M.A., Mifflin, S. // Hypertension. 2007. Vol. 49, P. 653-658.
7. Zhang, J., Mifflin, S.W. // Hypertension. 2000. Vol. 35, P. 430-436.

8. Mifflin, S. W. // News Physiol. Sci. 2001. Vol. 16, P. 266 – 271.

9. Durgam, V.R., Vitela, M., Mifflin, S.W. // Hypertension. 1999. Vol. 33, P. 530-536.

10. Yang, B., Goulet, M., Boismenu, R., Ferguson, A.V. // Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2004. Vol. 286, P. R927 – R934.

РЕПОЗИТОРИЙ БГМУ