

Карымова Елена Александровна

**ИОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ КОДИРОВАНИЯ НОЦИЦЕПТИВНЫХ
СИГНАЛОВ: РОЛЬ МЕДЛЕННЫХ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ**

Специальность: 03. 00. 02 - Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет» и в Учреждении Российской академии наук Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН.

Научный руководитель: доктор физико-математических наук, профессор
Иванов Вадим Константинович

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, чл.-корр. РАМН, профессор
Самойлов Владимир Олегович

доктор физико-математических наук, с.н.с.
Орлов Юрий Николаевич

Ведущая организация: Физико-технический институт им. А. Ф. Иоффе РАН

Защита состоится "___" _____ 2009 г. в ___ часов на заседании
Диссертационного Совета Д 212.229.25 при ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский
государственный политехнический университет» по адресу: 195251, Санкт-Петербург,
Политехническая ул., д. 29 (ауд. ...)

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ГОУ ВПО
«Санкт-Петербургский государственный политехнический университет».

Автореферат разослан "___" _____ 2009 года

Ученый секретарь
диссертационного совета:

кандидат физико-математических наук
Власова Ольга Леонардовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Задачи исследования молекулярных механизмов кодирования болевого сигнала и участия в этом процессе мембранных ионных каналов представляются актуальными в связи с отсутствием в арсенале лекарственных препаратов таких анальгетиков, которые могли бы эффективно купировать боль, не вызывая негативных побочных эффектов. Новый подход к решению этой проблемы может быть осуществлен благодаря выяснению биофизических механизмов модуляции потенциалочувствительности медленных натриевых каналов $Na_v1.8$, ответственных за кодирование ноцицептивной информации. Поэтому в нашей работе объектом исследования стали каналы $Na_v1.8$. Выяснение их роли в процессе генерации повторных ответов мембраной ноцицептивного нейрона явилось целью настоящей работы.

Термин боль обозначает субъективное переживание, которое служит симптомом ряда заболеваний человека. Около 90% всех заболеваний связано с болью. По мнению Международной ассоциации изучения боли, следует разделять понятия боли и ноцицепции. Ноцицепция — это нейрофизиологическое понятие, обозначающее восприятие, проведение и обработку сигналов о повреждающих воздействиях и (или) патологических процессах. Начальным звеном ноцицептивной системы являются болевые рецепторы (ноцицепторы), расположенные практически во всех тканях организма. Сигналы различных модальностей преобразовываются рецепторной мембраной ноцицепторов в аналоговый сигнал, рецепторный ток, а затем электровозбудимой мембраной - в универсальный для нервной системы дискретный код нервных импульсов. Низкая частота нервных импульсов несет информацию, например, о тактильных или температурных воздействиях, а ее повышение при усилении стимула является сигналом о возможном повреждении. Именно эта высокочастотная посылка нервных импульсов и воспринимается нами как болевое ощущение. Частотная граница, отделяющая ноцицептивные разряды (более высокочастотные) от адекватных, возникающих в ответ на температурные или тактильные стимулы, составляет единицы импульсов в секунду (Borovikova et al., 1997; Ревенко и Гаврилова, 2007). Потенциалозависимые медленные натриевые каналы являются важнейшей молекулярной структурой, определяющей генерацию потенциалов действия и частоту повторных ответов в сенсорных нейронах (Kostyuk et al., 1981; Gold et al., 1996). В ноцицептивных нейронах главную роль в кодировании ноцицептивных сигналов играют тетродотоксин-устойчивые натриевые каналы (Веселовский и др., 1979). При механических повреждениях, воспалительных процессах или действии гипералгезических агентов происходит увеличение плотности

или потенциалочувствительности медленных натриевых каналов в мембране ноцицептивного нейрона (Akorian et al., 1996; Gold et al., 1996, Lai et al., 2004), что ведет к повышению частоты импульсной активности. Напротив, снижение частоты повторных ответов должно вызывать аналгетический эффект. Так, местные анестетики блокируют ионные каналы, но их действие не является избирательным (Brau et al., 2001). Помимо блокирования ноцицептивных сигналов, нарушается, например, и моторная активность (см. Denac et al., 2000). Антиноцицептивный эффект может быть реализован благодаря другому, более специфическому, ионному механизму. Этот механизм заключается в модуляции воротных характеристик каналов $Na_v1.8$.

Для того чтобы на системном уровне выявить физиологическую роль изменения параметров указанных воротных систем, необходимо исследовать импульсную активность в условиях максимально приближенных к адекватным. В методе локальной фиксации потенциала мы исследуем изолированные нейроны, ограниченное время жизни которых, как и ряд других неконтролируемых процессов в данных экспериментальных условиях, являются принципиальным ограничением. Математическая модель позволяет не только устранить ряд этих ограничений, но и выяснить функциональную роль отдельных молекулярных параметров, поскольку мы можем изменять их в широком диапазоне значений независимо друг от друга.

С помощью метода математического моделирования создатели мембранной ионной теории (Hodgkin and Huxley, 1952, a-d) выяснили роль ионных каналов в генерации нервных импульсов на примере мембраны гигантского аксона кальмара. В дальнейшем основные принципы ионной теории Ходжкина-Хаксли были с успехом использованы рядом других авторов для выяснения ионных механизмов формирования импульсной активности, генерируемой различными электровозбудимыми мембранами (Ходоров, 1969; Krylov and Makovsky, 1978; Миронов, 1984; Read and Siegel, 1999; Herzog et al., 2001; Shield and Kunze, 1997).

В нашей работе с помощью методов математического моделирования и локальной фиксации напряжения предпринимается попытка выяснить роль каналов $Na_v1.8$ в процессе импульсного кодирования ноцицептивной информации. В качестве агента, модулирующего потенциалочувствительность этих каналов, была использована коеновая кислота, являющаяся лекарственной субстанцией неопиоидного анальгетика «Аноцептин», разработанного в Институте физиологии им. И. П. Павлова РАН.

Цель и задачи исследования. Целью работы явилось исследование биофизических механизмов кодирования ноцицептивных сигналов и роли медленных натриевых каналов в этом процессе.

Задачи настоящего исследования заключались в следующем:

1. На основании собственных экспериментальных данных разработать математическую модель типа Ходжкина-Хаксли мембраны ноцицептивного нейрона для выяснения механизмов импульсного кодирования ноцицептивных сигналов мембраной указанного нейрона.
2. Выяснить механизмы модуляции коеновой кислотой потенциалочувствительности медленных натриевых каналов и роли этого процесса в кодировании ноцицептивных сигналов на основании собственных экспериментальных данных и в расчетах на модели.
3. Выяснить роль медленных натриевых каналов в процессах частотного кодирования и адаптации мембраны ноцицептивного нейрона к действию постоянного стимула. Исследовать роль медленной натриевой инактивации каналов $Na_v1.8$ в указанных процессах.

Основные положения, выносимые на защиту. Положения, выносимые на защиту, заключаются в следующем:

1. На основании собственных экспериментальных данных, полученных методом локальной фиксации потенциала, построена модель типа Ходжкина-Хаксли мембраны ноцицептивного нейрона, с помощью которой исследованы ионные механизмы кодирования ноцицептивных сигналов.
2. Снижение потенциалочувствительности активационной воротной системы медленных натриевых каналов приводит к уменьшению частоты повторных ответов мембраны ноцицептивного нейрона. Благодаря этому механизму при воздействии коеновой кислоты может происходить купирование патологической боли периферического происхождения.
3. Модификация математической модели мембраны ноцицептивного нейрона с учетом экспериментально обнаруженной медленной компоненты инактивационного процесса каналов $Na_v1.8$ приводит к снижению частоты повторных ответов. Важной особенностью этого эффекта является возникновение адаптации мембраны к действию постоянного стимула.
4. Снижение плотности каналов $Na_v1.8$ приводит к снижению частоты импульсной активности.

Научная новизна. В работе впервые показано, что уменьшение потенциалочувствительности активационного воротного устройства каналов $Na_v1.8$ при воздействии относительно низких концентраций коеновой кислоты ведет к резкому снижению частоты повторных ответов мембраны ноцицептивного нейрона (возможный механизм анальгезии). Проведено экспериментальное исследование характеристик процесса медленной инактивации каналов $Na_v1.8$. Расчеты на модели впервые показали,

что учет этих характеристик ведет к адаптации мембраны к действию постоянного стимулирующего тока и к снижению частоты импульсной активности, что особенно важно при разработке новых анальгетических препаратов.

Теоретическое и практическое значение работы. Полученные данные представляются важными для понимания молекулярных биофизических механизмов кодирования ноцицептивных сигналов. Результаты и выводы работы могут быть использованы при чтении курсов лекций по биофизике и физиологии. Они также могут быть использованы в медицине и в фармакологии при разработке анальгетиков нового поколения.

Апробация работы. Основные положения работы доложены и обсуждены на следующих конференциях: Политехнический симпозиум «Молодые ученые – промышленности северо-западного региона» (Санкт-Петербург, 2006); XX съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова. (Москва, 2007); Всероссийский форум студентов, аспирантов и молодых ученых «Наука и инновации в технических университетах» (Санкт-Петербург, 2007); конференция «Механизмы регуляции и взаимодействия физиологических систем организма человека и животных в процессах приспособления к условиям среды», (Санкт-Петербург – Колтуши, 2007); The 2nd St.-Petersburg Humboldt-Kolleg Conference «Technologies of the 21st Century: Biological, Physical, Informational and Social Aspects» (Saint-Petersburg, 2008).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 137 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, экспериментальных результатов, обсуждения результатов, выводов, заключения и списка литературы, содержащего 114 источников. Работа иллюстрирована 28 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ВВЕДЕНИЕ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, указаны цель и задачи исследования, приведены основные научные положения, показано научно-практическое значение исследования.

Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Приведены общие сведения о классификации, о строении и функциях ионных каналов. Более подробно описаны характеристики медленных натриевых каналов $Na_v1.8$. Приведены общие сведения о формировании болевого ощущения, рассмотрены различные физиологические механизмы боли. Приведено описание модели Ходжкина-Хаксли и воротного процесса медленных натриевых каналов. Особое место уделено

вкладу каналов $Na_v1.8$ в процесс кодирования ноцицептивных сигналов и способам модуляции активности данной популяции каналов.

Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Эксперименты были выполнены на культивируемых изолированных нейронах спинальных ганглиев крыс линии *Wistar*. Для получения нейронов применяли модифицированный нами метод краткосрочного культивирования диссоциированных сенсорных нейронов (Kostyuk et al., 1981; Elliott, Elliott, 1993).

Регистрация ионных токов. В работе использовали метод локальной фиксации напряжения (patch-clamp метод) в конфигурации "регистрация тока от целой клетки" ("whole-cell") (Hamill et al., 1981). Эксперименты проводили с помощью аппаратно-программного комплекса (Крылов и др., 1996), включающего в себя усилитель - ЕРС 7 и IBM-совместимый персональный компьютер.

Растворы. В работе использовались стандартные растворы (концентрации представлены в ммоль/л) для исследования кинетических характеристик натриевых каналов. Внеклеточный раствор: NaCl-65, CaCl₂-2, MgCl₂-2, Choline Cl-90, HEPES Na-10, тетродотоксин (TTX) -0.0001, pH=7.4. Внутриклеточный: CsF-100, NaCl-10, CsCl-40, MgCl₂-2, HEPES Na-10, pH = 7.2. Исключение ионов калия позволило избавиться от всех компонентов калиевого тока, а ионы фтора во внутриклеточном растворе обеспечивали блокирование кальциевых токов (Kostyuk et al., 1975). В работе использованы реактивы фирмы "Sigma".

Фармакологическое разделение натриевых токов. Для выделения медленных натриевых токов во внеклеточный раствор вводили 1 нмоль/л тетродотоксина (Almers, Levinson, 1975). Это приводило к полному устранению быстрых натриевых токов. Тетродотоксин в указанной концентрации присутствовал во внеклеточной среде в течение всей регистрации токов и перфузии, что позволило исследовать только медленные каналы.

Метод математического моделирования. Решение системы дифференциальных уравнений шестого порядка осуществлялось с помощью метода, основанного на методе Рунге-Кутты четвертого порядка с адаптивным изменением шага, использующим для оценки погрешности метод Рунге-Кутты пятого порядка. Для создания программного комплекса модифицирована стандартная численная процедура (Press et al., 1997) на языке Фортран.

Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ

Использование метода математического моделирования при исследовании импульсной активности электровозбудимой мембраны, ее интегративной характеристики, предоставляет уникальную возможность исследовать физиологическую роль только одного из параметров медленных натриевых каналов,

определяющих специфичность ноцицептивных ответов. При этом остальные их характеристики могут оставаться неизменными, что обычно невозможно осуществить с помощью других физиологических или биофизических методов.

3.1 Основные типы ионных каналов в мембране ноцицептивного нейрона

В использованных нами нейронах спинальных ганглиев крысы, как правило, одновременно присутствуют оба основных типа потенциалозависимых натриевых каналов: медленные тетродотоксин-устойчивые (Na_s) и быстрые тетродотоксин-чувствительные (Na_f). Относительный вклад каждой из популяций в суммарную натриевую проводимость может варьировать (0.2-0.8). Наряду с натриевыми в ноцицептивном нейроне присутствуют калиевые каналы и потенциалонезависимые каналы токов утечки.

3.2 Экспериментальное исследование воротных характеристик каналов $Na_v1.8$ и характеристик импульсной активности, генерируемой мембраной ноцицептивного нейрона

Исследование воротных характеристик каналов $Na_v1.8$. В работе проведено исследование характеристик каналов $Na_v1.8$. Для этого с помощью методики локальной фиксации потенциала были получены экспериментальные записи токов каналов $Na_v1.8$. Представленный набор экспериментальных данных достаточен для того, чтобы получить описание характеристик активационной и инактивационной воротных систем при всех потенциалах физиологического диапазона (рис. 1). Одновременная аппроксимация, обеспечивающая наилучшее соответствие для потенциалозависимостей стационарного распределения параметров $G_{Na_s}(E)$ и $h_{Na_s}(E)$ и постоянных времени соответствующих процессов ($\tau_m(E)$ и $\tau_h(E)$), позволяет найти вид зависимостей от потенциала констант скоростей прямого и обратного переходов активационного и инактивационного воротных процессов каналов $Na_v1.8$:

$$\alpha_{m_{Na_s}} = \frac{0,05(1 + \exp(E + 44)/8)}{1 + \exp((E - 7)/10)}; \quad \beta_{m_{Na_s}} = 0,05(1 + \exp(-(E + 6)/16));$$

$$\alpha_{h_{Na_s}} = 0,0008(\exp(-E/30)); \quad \beta_{h_{Na_s}} = \frac{0,22}{1 + 0,24\exp(-E/7)}.$$

[1]

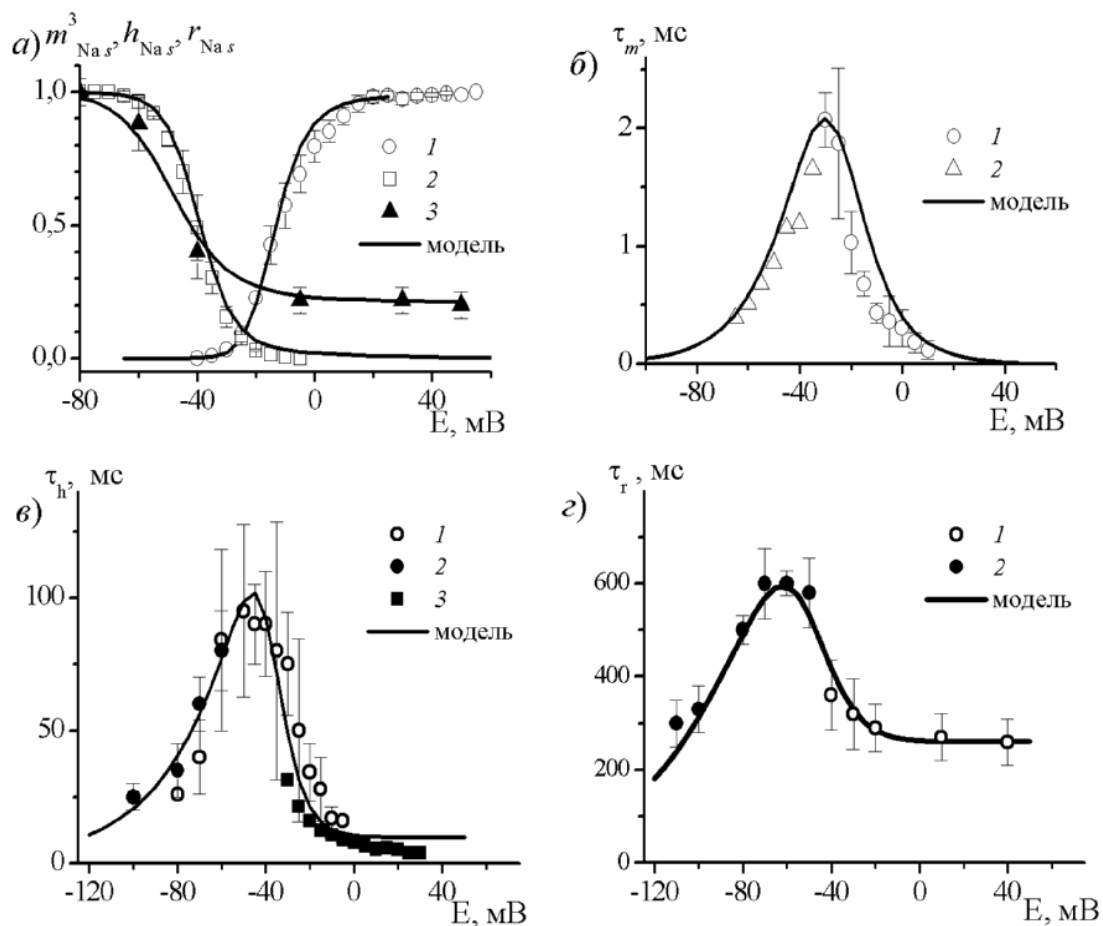


Рисунок 1. Воротные характеристики медленных натриевых каналов

a - стационарные характеристики медленных натриевых каналов. Потенциалозависимости стационарной активации и инактивации построены по экспериментальным данным и рассчитаны с помощью констант скоростей перехода (1, 2, 3 – полученные экспериментально кривые потенциалозависимостей для стационарных активации $m_{Na_s}^3(E)$, инактивации $h_{Na_s}(E)$, и медленной инактивации $r_{Na_s}(E)$, соответственно).

б - зависимость постоянной времени активации медленного натриевого тока $\tau_m(E)$ от величины тестирующего потенциала (1 – τ_m , построенная по данным исследований деактивации каналов при реполяризации мембраны от постоянного кондиционирующего стимула (0 мВ) длительностью 10 мс к различным тестирующим потенциалам (< -40 мВ) ($n = 2$); 2 – τ_m , построенная по данным исследований развития активации при деполяризации мембраны к различным тестирующим потенциалам (> -40 мВ) ($n = 6$)).

в - зависимость постоянной времени быстрой фазы инактивации от величины тестирующего потенциала $\tau_h(E)$.

г - потенциалозависимость постоянной времени медленной фазы инактивации от величины тестирующего потенциала $\tau_r(E)$.

Для количественной оценки потенциалочувствительности активационной воротной системы мы использовали подход, предложенный Алмерсом (Алмерс, 1981; Крылов и др., 1999). Вычислялся эффективный воротной заряд (Z_{eff}) по тангенсу угла наклона предельной логарифмической чувствительности потенциалозависимости проводимости медленных натриевых каналов.

Измерение величины плотности медленных натриевых каналов. В экспериментах использовались нейроны диаметром 10-30 мкм, что соответствует емкости мембраны от 10 до 30 пФ. Значения емкости были измерены экспериментально. Величина максимальной натриевой проводимости мембраны интактного нейрона варьирует в широких пределах (от 100 до 400 нСм). Мы выбрали в качестве стандартной $G_{Na_s}^{\max} = 200$ нСм.

Импульсная активность ноцицептивного нейрона: результаты экспериментов в режиме фиксации тока. В отдельной серии экспериментов с использованием режима фиксации тока была исследована импульсная активность ноцицептивных нейронов. При подаче ступеньки деполяризующего тока, начиная с некоторого порогового значения, наблюдалась генерация одиночного ответа или серии импульсов. При выключении быстрого натриевого тока способность генерации потенциала действия сохранялась. Данная серия экспериментов показала, что генерация мембраной нейрона импульсной активности (как одиночного потенциала действия, так и серии импульсов) возможна за счет функционирования следующих популяций ионных каналов: калиевых, быстрых натриевых, медленных натриевых и каналов тока утечки.

3.3 Построение модели мембраны ноцицептивного нейрона

Базовая модель ноцицептивного нейрона должна включать в себя основные типы ионных каналов, обеспечивающих генерацию импульсной активности. Помимо быстрых натриевых, калиевых каналов и каналов утечки необходимо учесть наличие медленных натриевых каналов, преобладание которых свойственно для ноцицептивного нейрона, и определить границы варьирования параметров $G_{Na_s}^{\max}$, $G_{Na_f}^{\max}$, G_K^{\max} , G_L^{\max} , описывающих максимальные проводимости медленных и быстрых натриевых каналов, калиевых каналов и каналов тока утечки, соответственно. Таким образом, численные параметры модели имеют следующие значения: $G_{Na_f}^{\max} = 50$ нСм, $G_{Na_s}^{\max} = 200$ нСм, $G_K^{\max} = 40$ нСм, $E_{Na} = 55$ мВ, $E_K = -85$ мВ, емкость мембраны $C_m = 20$ пФ. Потенциал покоя и потенциал реверсии токов утечки были выбраны равными -70 мВ. Величина проводимости каналов тока утечки (G_L) была выбрана нами равной 5 нСм.

Для построения базовой модели типа Ходжкина-Хаксли мембраны ноцицептивного нейрона был разработан полный набор уравнений и вид зависимостей от потенциала констант скоростей для каналов с использованием как литературных (Read, 1996; Chevrier et al., 2004), так и собственных экспериментальных данных (уравнения [1]). Базовая система из шести взаимно связанных линейных дифференциальных уравнений первого порядка, описывающих эволюцию во времени потенциала на мембране

ноцицептивного нейрона, включает в себя следующие уравнения:

$$\begin{aligned}
 C_m \frac{dE}{dt} &= I_m - I_{Na_s} - I_{Na_f} - I_K - I_L; \\
 \frac{dm_{Na_s}(E,t)}{dt} &= \alpha_{m_{Na_s}}(E)(1 - m_{Na_s}(E,t)) - \beta_{m_{Na_s}}(E)m_{Na_s}(E,t); \\
 \frac{dh_{Na_s}(E,t)}{dt} &= \alpha_{h_{Na_s}}(E)(1 - h_{Na_s}(E,t)) - \beta_{h_{Na_s}}(E)h_{Na_s}(E,t); \\
 \frac{dm_{Na_f}(E,t)}{dt} &= \alpha_{m_{Na_f}}(E)(1 - m_{Na_f}(E,t)) - \beta_{m_{Na_f}}(E)m_{Na_f}(E,t); \\
 \frac{dh_{Na_f}(E,t)}{dt} &= \alpha_{h_{Na_f}}(E)(1 - h_{Na_f}(E,t)) - \beta_{h_{Na_f}}(E)h_{Na_f}(E,t); \\
 \frac{dn(E,t)}{dt} &= \alpha_n(E)(1 - n(E,t)) - \beta_n(E)n(E,t).
 \end{aligned}$$

Здесь I_m - суммарный ток, протекающий через мембрану; I_{Na_s} , I_{Na_f} , I_K , I_L - медленный натриевый, быстрый натриевый, калиевый ток и ток, протекающий через каналы тока утечки, соответственно. Переменные активации и инактивации m , n и h соответствующих типов токов имеют смысл вероятности нахождения канала в открытом или закрытом состоянии и могут принимать значения от 0 до 1.

3.4 Экспериментальное исследование влияния коеновой кислоты на медленные натриевые каналы

В экспериментах по исследованию воздействия коеновой кислоты (лекарственной субстанции неопиоидного анальгетика «Аноцептин») на медленные натриевые каналы было обнаружено, что снижение потенциалочувствительности медленных натриевых каналов происходит за счет двух факторов. Во-первых, за счет смещения зависимости натриевой проводимости от потенциала $G_{Na_s}(E)$ в сторону больших потенциалов приблизительно на 4 мВ и, во-вторых, за счет уменьшения величины эффективного воротного заряда Z_{eff} (что проявляется в изменении наклона начального участка вольт-амперной характеристики и, как следствие, начального участка кривой проводимости).

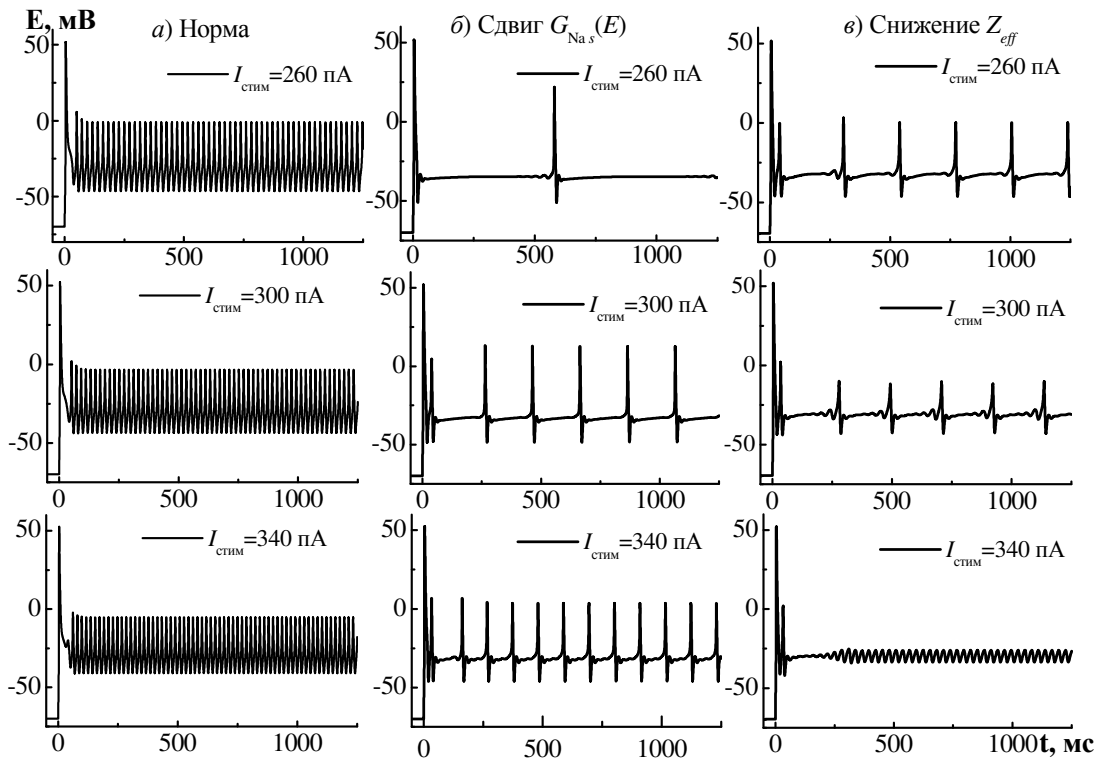


Рис. 2. Импульсная активность ноцицептивного нейрона в условиях фиксации тока

Расчеты были проведены в трех случаях: *a* - на базисной модели; *б* - при модификации модели в случае смещения $G_{Na,s}(E)$; *в* - при модификации модели в случае снижения Z_{eff} .

3.5 Модулирование активности каналов $Na_v1.8$: исследование на модели

3.5.1 Изменение характеристик активационной воротной системы каналов $Na_v1.8$ под воздействием коеновой кислоты и их роль в формировании рисунка импульсной активности мембраны ноцицептивного нейрона

Расчеты на базовой модели ноцицептивного нейрона показали, что модель может воспроизводить импульсную активность в ответ на приложение ступеньки постоянного стимулирующего тока в диапазоне от 80 до 360 пА. На рисунке 2, *a* приведена ритмическая активность, генерируемая базовой моделью мембраны сенсорного нейрона для значений стимулирующего тока 260, 300 и 340 пА.

Смещение активационной кривой. Первый обнаруженный нами экспериментально фактор, приводящий к снижению потенциалочувствительности - смещение зависимости натриевой проводимости от потенциала $G_{Na,s}(E)$ вправо вдоль оси потенциалов при неизменном значении Z_{eff} . Ниже приведены рассчитанные по нашим экспериментальным данным константы скоростей, отражающие указанную модификацию.

$$\alpha_{m_{Na,s}} = \frac{0,05(1 + \exp(E + 40)/8)}{1 + \exp((E - 11)/10)}; \quad \beta_{m_{Na,s}} = 0,05(1 + \exp(-(E + 2)/16)).$$

Расчеты на модели с использованием данных констант показали, что после модификации математической модели, отражающей сдвиг потенциалозависимости кривой $G_{Na_s}(E)$ в сторону деполяризации на 4 мВ (при неизменном значении Z_{eff}), происходит снижение частоты повторных ответов (рис. 2, б).

Снижение эффективного воротного заряда. Модификации, отражающие снижение Z_{eff} , могли быть получены при изменении выражений констант α_m и β_m :

Расчеты с использованием данных констант показали, что снижение Z_{eff} приводит

$$\alpha_{m_{Na_s}} = \frac{0,05(1 + \exp(E + 40)/9)}{1 + \exp((E - 11)/25)}; \quad \beta_{m_{Na_s}} = 0,05(1 + \exp(-(E + 2)/20)).$$

также к значительному уменьшению частоты повторных ответов (рис. 2, в).

Обнаруженные экспериментально факторы снижения возбудимости медленных натриевых каналов были исследованы с помощью построения функции стимул-ответ (f , имп/с – $I_{стим}$, пА) мембраны исследуемого нейрона (рис. 3).

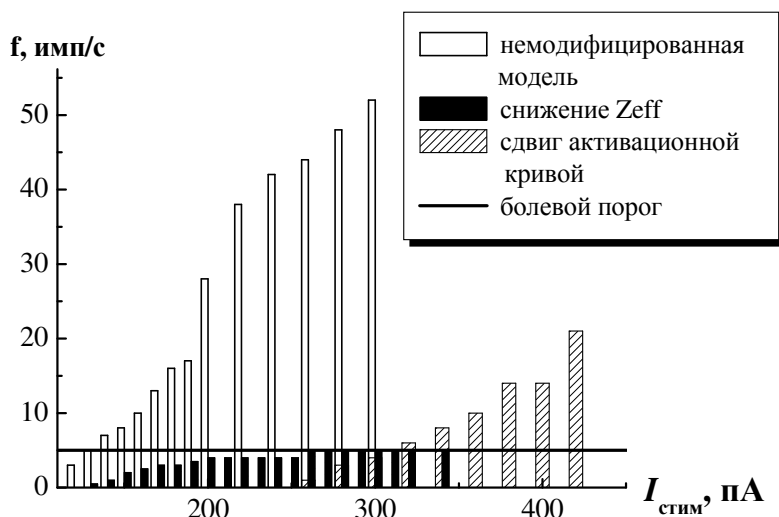


Рис. 3. Зависимость частоты от величины стимулирующего тока (стимул-ответ)

ноцицептивного нейрона, рассчитанная на модели.

Зависимость стимул-ответ в контрольных расчетах (белые столбики), при модификациях математической модели, отражающих снижение Z_{eff} (черные столбики) и сдвиг кривой $G_{Na_s}(E)$ вправо вдоль оси потенциалов (заштрихованные столбики). Линией отмечена частота $f=5$ Гц, являющаяся пороговой для болевого ощущения.

Эта функция

отражает процесс импульсного кодирования ноцицептивных сигналов. В контрольных расчетах генерация повторных ответов наблюдается в диапазоне стимулирующих токов от 80 до 300 пА. Функция стимул-ответ носит монотонный характер. Снижение эффективного заряда приводит к уменьшению крутизны исследуемой функции и резкому снижению частоты повторных ответов. При этом становится невозможным превышение болевого порога составляющего приблизительно 5 имп/с (горизонтальная прямая на рис. 3). Этот результат свидетельствует о том, что Z_{eff} является важнейшим параметром, уменьшение которого существенно снижает частоту повторных ответов во всем диапазоне стимулирующих токов, при котором возможна генерация повторных ответов. Исследуемый нами другой фактор, ведущий к снижению потенциалочувствительности медленных натриевых каналов, а именно сдвиг $G_{Na_s}(E)$

вдоль оси потенциалов, оказывается менее эффективным с точки зрения снижения частоты повторных ответов. Снижение частоты, хотя и значительное, наблюдается только в узком диапазоне стимулирующих токов (< 350 пА). Дальнейшее увеличение $I_{\text{стим}}$ ведет к резкому росту частоты повторных ответов. Возможная болевая реакция ноцицепторов может возникнуть при больших стимулирующих токах. В отличие от этого снижение частоты повторных ответов при уменьшении эффективного воротного заряда наблюдается во всем диапазоне стимулирующих токов. Можно заключить, что важнейшую роль в кодировании ноцицептивных сигналов играет снижение величины эффективного воротного заряда, ведущее к надежному уменьшению частоты повторных ответов во всем диапазоне стимулирующих токов.

3.5.2 Изменение характеристик инактивационной воротной системы каналов $Na_v1.8$ под воздействием коленовой кислоты и их роль в формировании рисунка импульсной активности мембраны ноцицептивного нейрона

После учета медленной натриевой инактивации базовая система уравнений для натриевого тока приняла вид: $I_{Na_s} = G_{Na_s} m_{Na_s}^3(E) h_{Na_s}(E) r_{Na_s}(E)(E - E_{Na})$.

Уравнения констант скоростей перехода для медленной составляющей инактивации имеют вид:

$$\alpha_{r_{Na_s}}(E) = 0,0001(\exp(-(E + 8)/29)) + 0,0008; \quad \beta_{r_{Na_s}}(E) = \frac{0,003}{1 + 0,24\exp(-(E + 23)/10)}$$

При учете параметров медленной инактивации импульсная активность генерировалась моделью мембраны сенсорного нейрона в другом диапазоне и наблюдался иной характер импульсной активности. Постоянный стимулирующий ток ($I_{\text{стим}}$) варьировался от 80 до 260 пА с шагом 20 пА. При значениях $I_{\text{стим}}$ от 60 до 120 пА генерировался 1 потенциал действия (ПД), при значениях $I_{\text{стим}}$ от 140 до 160 пА – конечная серия импульсов, а при значениях от 180 до 260 пА - бесконечная серия импульсов с установившейся частотой повторных ответов от 1 до 12 имп/с. Отметим, что при генерации более двух ПД наблюдалось прогрессивное увеличение межимпульсных интервалов, т.е. возникла адаптация мембраны к действию постоянного стимула.

Нами были исследованы изменения характера импульсной активности в зависимости от значений предельного уровня стационарной инактивации (рис. 1, *а*) при различных значениях стимулирующего тока. На рисунке 4 представлены данные исследования при величине $I_{\text{стим}}=160$ пА. При снижении $r_{\text{Na},s}^*$ с 0,21 до 0,17 происходит уменьшение количества ПД, генерируемых моделью мембраны ноцицептивного нейрона (рис. 4, *а* и *б*). А при увеличении $r_{\text{Na},s}^*$ с 0,21 до 0,27, количество повторных ответов растет. Таким образом, незначительное изменение предельного уровня медленной инактивации $r_{\text{Na},s}^*$ приводит к достаточно резкому изменению характера импульсной активности. Обнаруженный эффект более выражен для больших стимулирующих токов. Это свидетельствует о возможной физиологической роли медленного инактивационного процесса, включение которого приводит к значительному снижению частоты импульсной активности, что, в конечном итоге, должно приводить к устранению болевого компонента сигнала. Подчеркнем, что полное блокирование повторных ответов при этом не происходит.

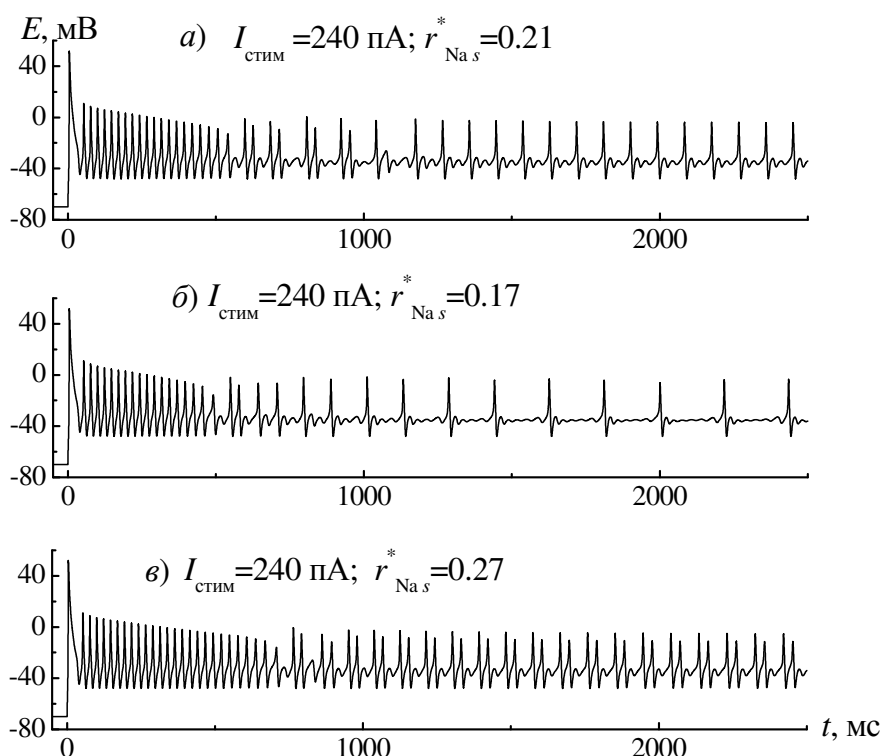


Рис. 4. Влияние предельного уровня медленной инактивации на характеристики импульсной активности

3.5.3 Влияние изменения величины плотности каналов $Na_v1.8$ на частоту повторных ответов

В этой части работы была исследована зависимость характера повторных ответов мембраны ноцицептивного нейрона от величины плотности каналов $Na_v1.8$. Уменьшение относительного вклада интегральной натриевой проводимости при неизменной проводимости быстрых натриевых каналов ($G_{Na_f}^{max}=50$ нС) соответствует избирательному блокированию или снижению уровня экспрессии данного типа каналов. Расчеты на модели показали, что снижение проводимости каналов $Na_v1.8$ приводит к уменьшению частоты повторных ответов при заданном значении стимулирующего тока и к увеличению порога возникновения высокочастотных (болевых) сигналов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании собственных экспериментальных данных, полученных методом локальной фиксации потенциала, было проведено количественное описание медленных натриевых каналов в терминах модели типа Ходжкина-Хаксли. Построена базовая модель, которая затем была модифицирована при исследовании роли воротных характеристик в кодировании ноцицептивных сигналов.

Проведенное нами исследование показало, что характеристики как активационной, так и инактивационной воротных систем медленных натриевых каналов $Na_v1.8$ играют важную роль в кодировании ноцицептивных сигналов. Был выявлен вклад экспериментально наблюдаемых факторов (сдвиг вдоль оси потенциалов $G_{Na_s}(E)$ и снижение Z_{eff}). Расчеты показали, что в обоих случаях происходит уменьшение частоты ритмической активности. Данные экспериментально обнаруженные факторы были исследованы на разработанной нами математической модели мембраны ноцицептивного нейрона. В случае снижения Z_{eff} уменьшение частоты импульсации оказалось более выраженным. Тот факт, что снижение эффективного заряда значительно уменьшает частоту повторных ответов, является важным результатом нашей работы. Только в этом случае не происходит превышение болевого порога при увеличении стимулирующего тока.

Расчеты на модели показали, что учет медленной инактивации и модуляция характеристик быстрого инактивационного воротного процесса каналов $Na_v1.8$ оказывают сильное влияние на генерацию повторных ответов мембраны ноцицептивного нейрона. Инактивационные процессы приводят к возникновению адаптации мембраны ноцицептивного нейрона, т.е. к прогрессивному увеличению межимпульсных интервалов при действии постоянного стимула. Отметим также, что благодаря указанным инактивационным процессам может быть реализована антиноцицептивная реакция исследуемой мембраны, проявляющаяся в снижении частоты ее повторных ответов.

Завершая анализ наших результатов, можно заключить, что активационная и инактивационная воротные системы каналов $Na_v1.8$ являются перспективными молекулярными мишенями при разработке анальгетиков нового поколения. Эти воротные системы способны модулировать импульсную активность мембраны ноцицептивного нейрона, специфически выключая только ноцицептивные сигналы.

ВЫВОДЫ

1. На основании собственных экспериментальных данных построена математическая модель Ходжкина-Хаксли мембраны ноцицептивного нейрона. Расчеты на модели показали, что генерация повторных ответов может происходить в широком диапазоне стимулирующих токов, что позволило применить модель для выяснения тончайших молекулярных механизмов кодирования ноцицептивной информации.
2. Совместное применение метода локальной фиксации потенциала и расчетов на модели позволило выяснить молекулярный механизм, обуславливающий анальгетический эффект коеновой кислоты. В его основе лежит уменьшение величины эффективного заряда активационной воротной системы каналов $Na_v1.8$.
3. Ионный механизм адаптации мембраны ноцицептивного нейрона к действию постоянного стимула обусловлен процессом медленной инактивации проводимости натриевых каналов $Na_v1.8$. Уменьшение предельного уровня медленной инактивации приводит к снижению частоты повторных ответов, что делает эту воротную систему перспективной мишенью при разработке новых анальгетических лекарственных препаратов.
4. Уменьшение максимального уровня проводимости каналов $Na_v1.8$, их плотности, приводит к снижению частоты импульсной активности и, следовательно, к антиноцицептивной реакции мембраны исследуемого нейрона.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Карымова Е.В., Плахова В.Б., Шелых Т.Н. Молекулярные механизмы модуляции болевых сигналов // Политехнический Симпозиум, материалы конференции «Молодые ученые – промышленности северо-западного региона». Санкт-Петербург, 2006. С. 194.
2. Крылов Б.В., Плахова В.Б., Рогачевский И.В., Подзорова С.А., Катина И.Е., Карымова Е.А. Ионные механизмы кодирования ноцицептивного сигнала: физиологическая роль тетродотоксиноустойчивых натриевых каналов // Физиологическое общество им И.П. Павлова. Съезд XX, 4-8

июня 2007 г. Москва: Тезисы докл. – М.: Издат. дом «Русский врач», 2007. С.289.

3. Карымова Е.А., Катина И.Е., Плахова В.Б., Иванов В.К., Кулов М.А., Крылов Б.В. Ионные механизмы кодирования болевого сигнала: роль медленных натриевых каналов // Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования, образование. Сбор. трудов под редакцией А.П. Кудинова, Г.Г. Матвиенко. 2007. Т. 8. С. 149-159.
4. Плахова В.Б., Карымова Е.А., Шелых Т.Н. Механизм действия ряда производных γ -пиридона на мембрану сенсорного нейрона // Мат. Всероссийского форума студентов, аспирантов и молодых ученых «Наука и инновации в технических университетах», Санкт-Петербург, 10-12 окт. 2007. С. 183-184.
5. Плахова В.Б., Карымова Е.А. Действие коеновой кислоты: модуляция воротных характеристик медленных натриевых каналов снижает частоту повторных ответов ноцицептивного нейрона // Мат. конференции «Механизмы регуляции и взаимодействия физиологических систем организма человека и животных в процессах приспособления к условиям среды», Санкт-Петербург – Колтуши, 25-27 сент. 2007 г. С. 62.
6. Карымова Е.А., Катина И.Е., Плахова В.Б., Подзорова С.А., Кулов М.А., Крылов Б.В. Возможный механизм кодирования ноцицептивных сигналов: роль медленных натриевых каналов // Сенсорные системы. 2008. Т. 22, N 3. С. 264-277.
7. Карымова Е.А., Катина И.Е., Плахова В.Б., Подзорова С.А., Крылов Б.В., Иванов В.К. Физиологическая роль инактивационной воротной системы медленных натриевых каналов // Научно-технические ведомости СПбГПУ. 2008. Т. 3, № 59. С. 215-223.
8. Karymova E., Katina I. Possible mechanisms of nociceptive signals coding: role of slow sodium channels // The 2nd St.-Petersburg Humboldt-Kolleg Conference «Technologies of the 21st Century: Biological, Physical, Informational and Social Aspects». Saint-Petersburg. October 7–9, 2008. P. 11-12.