УДК 577.359

ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВАЦІЇ НАТИВНИХ ПРОТОН-АКТИВОВАНИХ РЕЦЕПТОРІВ, ЩО ЕКСПРЕСУЮТЬСЯ В ПІРАМІДОПОДІБНИХ НЕЙРОНАХ АМІГДАЛИ ЩУРІВ

С. В. Свиденко[1], О. Л. Кондрацька[2]

[1] *National Technical University of Ukraine Kiev Polytechnic Institute*
[2] *Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences*

Анотація

В роботі досліджувались основні характеристики нативних протон-активованих рецепторів, що експресуються в пірамідоподібних нейронах амігдали щура, зокрема процеси активації рецепторів, дію на протон-активовані рецептори ряду сполук-антагоністів та механізми їх взаємодії. За результатами проведених досліджень побудовано криву концентраційної залежності та порівняння її з активаційною кривою ASIC1a гомомерних рецепторів. Отримано значення половинної активаційної дії EC50. Зроблено припущення про субодиничний склад протон-активованих рецепторів в нейронах амігдали.

Ключові слова: ASIC, амігдала

Вступ

Протон-активовані іонні канали (acid-sensing ion channels - ASICs). Сімейство ASIC каналів включає 6 різновидів: ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3, ASIC4. ASIC канали у великій кількості зустрічаються в нейронах центральної нервової системи (ЦНС), де було знайдено щонайменще (ASIC1a, ASIC2a и ASIC2b) субодиниці з шести відомих. Серед всіх субодиниць, представлених в мозку, ASIC1a є найбільш поширеною. Гомомерні ASIC1a и гетеромерні ASIC1a/2b каналі здатні проводити як іони Na+, так і Ca2+[4]. Показано, що ASIC1a и ASIC2 приймають безпосередню участь в процесах синаптичної пластичності, навчанню, передачі нервового збуждення, ішемічниих процесах та гибелі нейронів, а також епілепсії[1]. ASIC1a канали були виявлені в амігдалоподібному тілі, приймаючому важливу роль в процесі тривожної поведінки. Було показано, що миші, нокаутні за геном, кодуючому ASIC1a, значно менше піддаються виникаючому почутті тривоги, у відповідь на різкі шуми та запах хижака. При цьому підвищена експресія каналів в організмі призводила до підсилення почуття тривоги, однак не впливала на утворення необґрунтованої тривоги. Комплекс амігдали є структурою, що знаходиться в медіально-скроневій долі, яка приймає безпосередню участь в емоційній поведінці, особливо в генерації тривоги і умовного страху (Девіс і Уелен 2001; Леду, 2000)[2]. Анатомічно амігдалоподібний комплекс може бути розділений на >13 ядер, які мають великі місцеві та додаткові з'єднання амігдалоподібного тіла (Сах та ін., 2003). Сенсорна інформація від кори головного мозку і структури таламуса досягає амігдали на рівні латерального (LA) та базолатерального (BLA) ядра[2]. Інформація обробляється локально, а потім передається, як безпосередньо, так і через основне ядро, до центру ядра (central nucleus CEA)[2].

1. Методика досліджень

Тварини. Дослідження проводились на ізольованих нейронах базолатерального ядра амігдали щурів віком 14-16 діб лінії Wistar, що утримувалися на стандартній лабораторній дієті у віварії Інститутут Фізіології ім. О.О. Богомольця. Вибір тварин за такими критеріями зумовлений тим, що до цього терміну закінчується диференціація пірамідоподібних нейронів амігдали, крім того, розвиток елементів сполучної тканини не зашкоджує виділенню поодиноких нейронів методом вібродисоціації. *Експеримент.* Спочатку тварину анестезували і декапітували. Мозок швидко виймали та робили зрізи товщиною 400 мкм. Зрізи тримали в інкубаційному розчині (в mM: 124 NaCl, 5 KCl, 2.4 CaCl2, 1.1 MgSO4, 24 NaHCO3, 10 glucose, 1.2 KH2PO4) насиченим 95% O2 і 5% CO2 при кімнатній температурі (20-24 °C), щонайменше 1 год. Далі зрізи переміщували в стандартний розчин (в mM: 130 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl2, 2 MgCl2, 10 HEPES, 10 glucose; and pH доводили до 7. 4 розчином NaOH 1M) та отримували ізольовані нейрони методом вібдисоціації. Зрізи видалялися, а механічно дисоційованим нейронам давали час осісти на дно чашки протягом 20 хв. Такі нейрони, що піддаються дисоціації зберегли свої оригінальні морфологічні особливості включаючи короткі частини їх проксимальних дендритів. Методом patch-clamp отримаували реєстрацію струмів. Для дослідів було використано 33 клітини. На одній клітині, зазвичай, вимірювали 3-5 концентрацій. Для того, щоб побудувати криву дози активації вибирали ряд pH, які використовуватимемо. Діапазон значень pH: 6.9; 6.7; 6.2; 6.0; 5.5; 5.0;

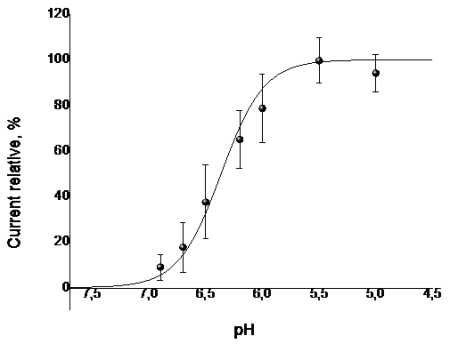

Рис. 2. Крива концентраційної залежності.

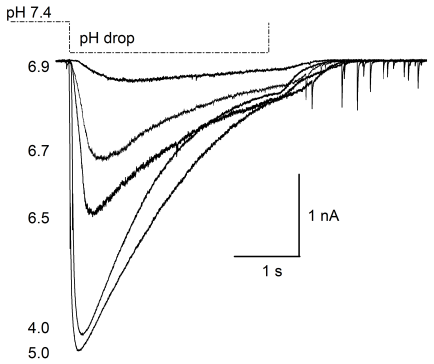

Рис. 1. Оригінальні трейси протон-активованих струмів нейрона, що реєструвалися при аплікації розчинів різного pH. Розчини змінного pH аплікувались на клітину 3 сек. Найменша амплітуда струму реєструвалась при незначних змінах pH (6.9- 6.7) та струм найбільшої амплітуди активувався при змінних pH 5.5 – 4.0.

4.5; 4.0. Струм, що активувався при зміні кожного pH, реєструвався 3-5 разів для досягення стабільного значення контролю. (Амплітуду струму, активованого при pH 5.0 визначали як за 100%, а решта pH – вираховувались як певний відсоток від 100).

2. Результати

За результатами дослідів для нативних протон-активованих рецепторів було побудовано криву концентраційної залежності, або криву активації протон-активованих рецепторів (Рис.2). Активація рецепторів відбувалась уже при дуже малих зсувах pH 7.4-6.9, а насичення було помічено на рівні pH 5.5. Із струмів, що реєструвались з 33 клітин, більшість, що активувалась зміною pH 7,4-6.7 мали амплітуду в інтервалі 0,6. -1,6 нА, що свідчить про високу експресію рецепторів в тестованих клітинах. Значення половинної активаційної дії EC50 складає 6.36 мМ, що корелює із даними літератури для гетеромерних потон-активованих рецепторів[3]. Числове значення коефіцієнта Хіла встановився на рівні p = 2.3.

Порівнявши криву концентраційної залежності з кривою ASIC1a, можна зробити висновок, що криві відрізняються[3]. Для ASIC1a характерне круте зростання та різке насичення. Швидше за все в нейронах амігдали експресуються не лише ASIC1a, присутність яких доведена за допомогою імуногістохімічних дослідів, а й інші субодиниці, що до цього часу не було показано. Присутність іншої субодиниці у складі рецептора може суттєво впливати на його характеристики актинії (як показано), десенсетизації, чутливості до дії антагоністів та залучення цілого рецепторного комплексу до процесів структури мозку.

Висновки

Отримана крива концентраційної залежності відрізняється від кривої ASIC1a маючи більший нахил, що означає присутність деякої додаткової субодиниці. Половинна активаційна дія EC50 за літературними даними складає 6.45 мМ, тобто наше отримане значення EC50, яке склало 6.36 мМ, знаходиться в межах норми. Також зазначимо, що дані на нативних рецепторах в нейронах амігдали отримано вперше і до нас ніхто не намагався це зробити.

Перелік використаних джерел

1. Baron A, Waldmann R, Lazdunski M. ASIC-like, proton-activated currents in rat hippocampal neurons. — Journal of Physiology (2002), 539.2, pp. 485–494.
2. Mikel Lopez De Armentia and Pankaj Sah. Firing Properties and Connectivity of Neurons in the Rat Lateral Central Nucleus of the Amygdala. — J Neurophysiol 92:1285-1294, 2004. —
3. Gunthorpe M. J., Smith G. D., Davis J. B., Randall A. D. Characterisation of a human acid-sensing ion channel (hASIC1a) endogenously expressed in HEK293 cells — Pflügers Arch - Eur J Physiol (2001) 442:668–674.
4. Jianyang Dua, Yuan Lud, Thomas O. Moningere, John A. Wemmied, Michael J. Protons are a neurotransmitter that regulates synaptic plasticity in the lateral amygdala. — Contributed by Michael J. Welsh, April 16, 2014.