

Применение метода бифуркационного анализа для выяснения механизмов кодирования ноцицептивных сигналов

© О.Е. Дик, Т.Н. Шелых, В.Б. Плахова, А.Д. Ноздрачев, С.А. Подзорова, Б.В. Крылов

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН,
199034 Санкт-Петербург, Россия
e-mail: krylov@infran.ru

(Поступило в Редакцию 10 декабря 2014 г.)

С помощью метода локальной фиксации потенциала исследованы характеристики медленных натриевых каналов, ответственных за кодирование болевых сигналов. Получены количественные значения констант скоростей переходов „нормальных“ и фармакологически модифицированных активационных воротных устройств этих каналов. Построена математическая модель типа Ходжкина–Хаксли мембраны ноцицептивного нейрона. В качестве фармакологического агента была использована коеновая кислота, являющаяся лекарственной субстанцией нового неопиоидного анальгетика. Применение бифуркационного анализа позволило выяснить границы области, в которой происходит генерация периодической импульсной активности. Эта граница разделяет множество значений параметров модели на те, при которых наблюдается периодическая импульсация, и значения, при которых колебания отсутствуют или являются затухающими. Полученные результаты свидетельствуют о том, что тончайший эффект модуляции физической характеристики части белковой молекулы, ее эффективного заряда приводит к снижению возбудимости мембраны ноцицептивного нейрона и, следовательно, к купированию боли.

Настоящая работа направлена на выяснение возможной физиологической роли активационной воротной структуры медленного натриевого канала $Na_V1.8$ в импульсном кодировании ноцицептивной информации. Регистрация трансмембранных ионных токов через медленные тетродотоксин-нечувствительные натриевые каналы $Na_V1.8$ методом локальной фиксации потенциала и математическое моделирование мембраны ноцицептивного нейрона, учитывающее вклад этих каналов в генерацию импульсной активности, позволили показать снижение возбудимости мембраны только за счет модуляции потенциалозависимых характеристик активационного воротного устройства. Эти изменения, приводящие к уменьшению величины эффективного заряда, переносимого через мембрану ноцицептивного нейрона при открывании активационного устройства каналов $Na_V1.8$, описывают специфическое воздействие коеновой кислоты (5-гидрокси- γ -пирон-2-карбоновой кислоты), являющейся лекарственной субстанцией нового отечественного анальгетика, отличающегося совершенно безопасным механизмом действия и сильным обезболивающим эффектом [1]. Таким образом, результаты нашего исследования объясняют молекулярный механизм анальгетического действия коеновой кислоты.

Эксперименты выполнены на культивируемых изолированных нейронах спинальных ганглиев крыс линии Wistar с использованием методики, которая подробно описана ранее [2]. Интактные клетки, полученные после 2 h культивирования в стандартных питательных средах, переносили в экспериментальную камеру, перфузируемую наружным раствором. В настоящей работе использовались реактивы фирмы „Sigma“ (США). Трансмембранные ионные токи $I_{NaS}(E, t)$ через медленные тетродотоксин-нечувствительные натриевые каналы

$Na_V1.8$ [3] регистрировали методом локальной фиксации потенциала в условиях плотного контакта в конфигурации регистрации активности целой клетки [4].

Потенциалозависимые константы скоростей переходов воротных структур медленных натриевых каналов определялись многопараметрическим методом наименьших квадратов. Минимизация функционала осуществлялась методом градиентного спуска. В контрольных условиях эти зависимости для активационной воротной системы были определены как

$$\begin{aligned} \alpha_S(E) &= \exp(a_1 E + b_1) = \exp(0.043E - 2.22), \\ \beta_S(E) &= \exp(a_2 E + b_2) = \exp(-0.048E - 4.33), \end{aligned} \quad (1)$$

а после применения коеновой кислоты в концентрации 100 nmol/l приобретали вид

$$\begin{aligned} \alpha_S(E) &= \exp(0.047E - 2.71), \\ \beta_S(E) &= \exp(-0.025E - 3.65), \end{aligned} \quad (2)$$

что соответствовало уменьшению эффективного заряда, переносимого через мембрану ноцицептивного нейрона при открывании активационного воротного устройства каналов $Na_V1.8$. Это уменьшение происходило в пределах от значения $Z_{\text{eff}} = 6.9$, полученного в контрольных опытах, до величины $Z_{\text{eff}} = 5.5$ после воздействия коеновой кислоты. Эффективный заряд (в единицах заряда электрона) рассчитывался по формуле

$$Z_{\text{eff}} = 3(kT/\bar{e})(a_1 - a_2),$$

полученной по методу Алмерса [5], где \bar{e} — заряд электрона, k — постоянная Больцмана, T — абсолютная температура, соответствующая 22°C, коэффициент 3 учитывает, что поведение активационного воротного устройства натриевых каналов соответствует трехбарьерной модели.

Единственным методом, позволяющим выяснить физиологическую роль специфической модификации активационного воротного устройства натриевого канала, ведущего к снижению Z_{eff} , является метод математического моделирования. В связи с тем что основной вклад в генерацию импульсной активности ноцицептивного нейрона млекопитающих при воздействии стимулирующего тока (I) вносят быстрый тетродотоксин-чувствительный натриевый ($I_{\text{Na}f}$), медленный тетродотоксин-устойчивый натриевый ($I_{\text{Na}s}$), задержанный калиевый (I_K) ток и ток утечки (I_L), модель мембраны ноцицептивного нейрона описывалась системой уравнений

$$\begin{aligned} \frac{dE}{dt} &= (I - I_{\text{Na}f}(m, h, E) - I_K(n, E) \\ &\quad - I_L(E) - I_{\text{Na}s}(s, r, E))/c_m, \\ \frac{dx}{dt} &= (x_\infty(E) - x)/\tau_x(E), \quad x = m, h, n, s, r, \\ I_{\text{Na}f} &= g_{\text{Na}f} m^3 h (E - E_{\text{Na}}), \\ I_K(n, E) &= g_K n^4 (E - E_K), \\ I_L(E) &= g_L (E - E_L), \\ I_{\text{Na}s}(s, r, E) &= g_{\text{Na}s} s^3 r (E - E_{\text{Na}}), \end{aligned} \quad (3)$$

где E — мембранный потенциал, m, h, n, s, r — переменные, описывающие активационные и инактивационные воротные процессы, $C_m = 5$ pF — емкость мембраны, $g_{\text{Na}f} = 25$ nS, $g_K = 20$ nS, $g_L = 2.5$ nS — максимальные проводимости, $E_{\text{Na}} = 60$ mV, $E_K = -75$ mV, $E_L = -55$ mV — равновесные потенциалы. Потенциалозависимые характеристики воротных устройств каналов задавались функциями

$$x_\infty(E) = \alpha_x(E) / (\alpha_x(E) + \beta_x(E)),$$

$$\tau_x(E) = 1 / (\alpha_x(E) + \beta_x(E)), \quad x = m, h, n, s, r,$$

где x_∞ — стационарное значение переменной активации или инактивации соответствующей популяции ионных каналов, τ_x — постоянная времени этих процессов. α_x и β_x для $I_{\text{Na}s}$ имели общий вид $\alpha_x(E) = \exp(a_i E + b_i)$, $\beta_x(E) = \exp(a_j E + b_j)$, где коэффициенты были подобраны таким образом, чтобы обеспечить наилучшее соответствие с данными, полученными экспериментально в режиме фиксации потенциала. Константы скоростей для других типов каналов были взяты из литературных данных [6,7]

$$\begin{aligned} \alpha_m(E) &= 0.115(1 + \exp(E + 70)/10) / (1 + \exp(E + 40)/42), \\ \beta_m(E) &= 0.115(1 + \exp(-(E + 25)/8)), \\ \alpha_h(E) &= 0.012(1 + \exp(-(E + 43)/10)), \\ \beta_h(E) &= 1.32 / (1 + 0.2 \exp(-(E + 10)/7)), \\ \alpha_n(E) &= 0.13(E + 45) / (1 - \exp(-(E + 45)/12)), \\ \beta_n(E) &= 0.13 \exp(-(E + 45)/30). \end{aligned} \quad (4)$$

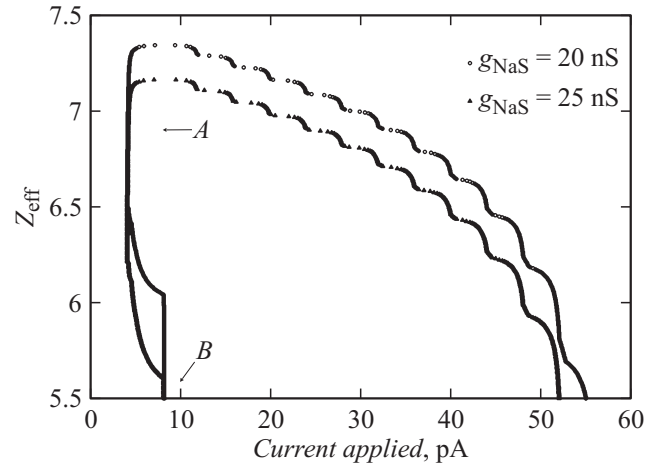


Рис. 1. Области периодических ответов модели ноцицептивного нейрона, построенные на плоскости (Z_{eff}, I) при значениях $g_{\text{Na}s} = 20$ nS (кривая, обозначенная \circ) и $g_{\text{Na}s} = 25$ nS (кривая Δ), Z_{eff} — величина эффективного заряда, I — значение стимулирующего тока. Точки A и B указывают значения параметров Z_{eff} и I , при которых выполнено численное интегрирование системы (3) для представления данных на рис. 2.

Для построения границы области, в которой происходит генерация периодической импульсной активности, применялся метод бифуркационного анализа [8]. Эта граница разделяет множество значений параметров модели на те, при которых наблюдается периодическая импульсация, и значения, при которых колебания отсутствуют или являются затухающими.

На рис. 1 для двух значений параметра $g_{\text{Na}s}$ на плоскости (Z_{eff}, I) представлены границы областей, внутри которых существуют устойчивые периодические колебания, возникающие в результате бифуркации Андронова–Хопфа. Потеря устойчивости стационарного состояния системы происходит скачком в виде „жесткого“ возбуждения, приводящего к возникновению колебаний потенциала большой амплитуды. Повторные ответы ноцицептивного нейрона наблюдаются при значениях стимулирующего тока $5 < I < 55$ (pA) и отсутствуют при значениях $Z_{\text{eff}} > 7.1$ при $g_{\text{Na}s} = 25$ nS и при $Z_{\text{eff}} > 7.4$ при $g_{\text{Na}s} = 20$ nS. В контрольных условиях (при $Z_{\text{eff}} = 6.9$) ритмическая активность мембраны возможна в пределах [5] (pA) при $g_{\text{Na}s} = 20$ nS. После снижения величины эффективного заряда область расширяется и при значении $Z_{\text{eff}} = 5.5$ повторные ответы возможны в интервале стимулирующих токов $8 < I < 55$ (pA). При этом за пределами построенной границы мембрана ноцицептивного нейрона отвечает на внешний стимул только одиночными потенциалами действия.

Численное интегрирование уравнений системы (3) при значениях параметров, соответствующих области периодических решений, показало, что при постоянном значении проводимости и уменьшении Z_{eff} частота периодических ответов падает (рис. 2), что свидетельствует о снижении возбудимости мембраны ноцицептивного

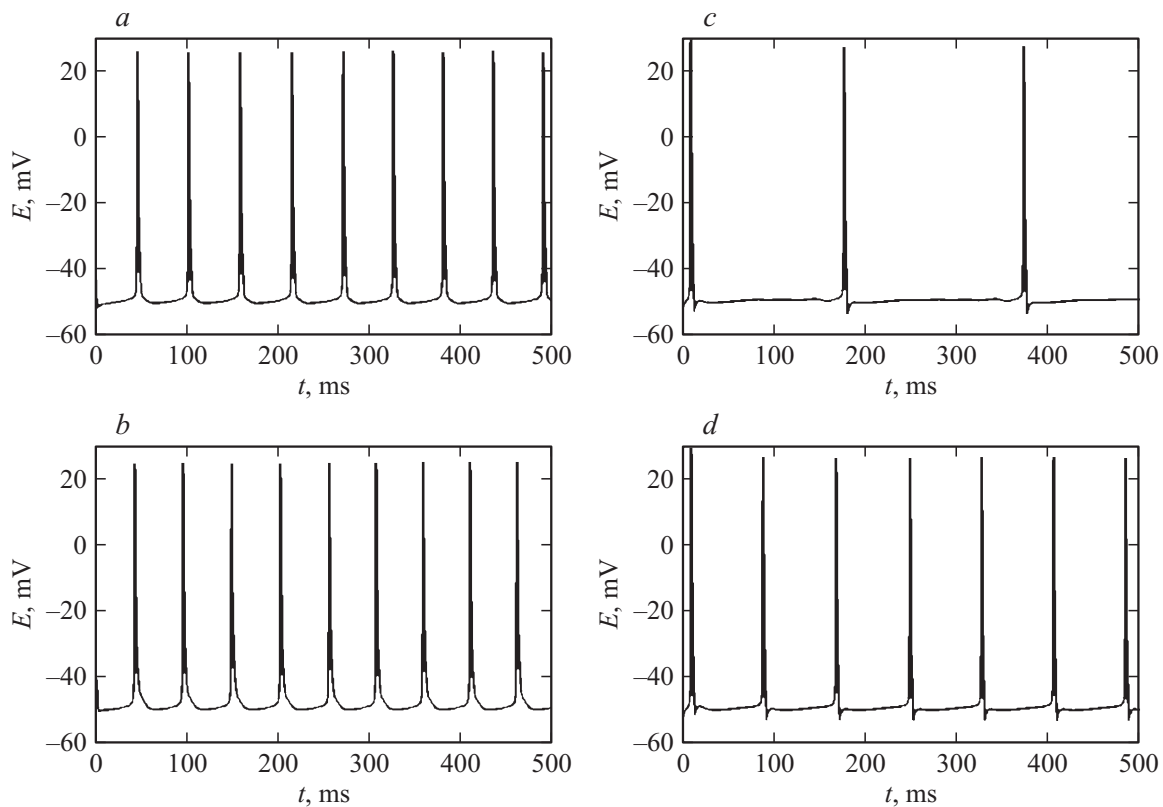


Рис. 2. Эффект уменьшения частоты периодических ответов модели ноцицептивного нейрона при уменьшении величины эффективного заряда Z_{eff} . Значения $g_{\text{NaS}} = 20$ и 25 nS, $I = 10$ pA. В контрольных условиях (a, b) потенциалозависимость констант скоростей активационного воротного устройства каналов $\text{Na}_V1.8$ рассчитана с использованием функций (1). После снижения Z_{eff} благодаря использованию функций (2) частота повторных ответов снижалась (c, d). Небольшое изменение параметра g_{NaS} не влияет на выявленный эффект.

нейрона. Это изменение импульсации получено при изменении величины эффективного заряда, имитирующего специфическое воздействие коеновой кислоты, изменяющее потенциалозависимости констант скоростей переходов. Эффект уменьшения частоты периодических ответов модели ноцицептивного нейрона при уменьшении величины эффективного заряда Z_{eff} не зависит от небольшого изменения максимальной проводимости медленных натриевых каналов (параметра g_{NaS}) (рис. 2).

Таким образом, наши результаты объясняют антиноцицептивный эффект коеновой кислоты. При этом важно отметить, что указанная важнейшая физиологическая функция не блокируется полностью, а лишь модифицируется. Известно, что высокочастотная составляющая импульсного ответа ноцицепторов несет собственно „болевою“ информацию [9], т.е. увеличение частоты ответов ноцицептивных нейронов связано с возникновением боли, а уменьшение этой частоты на фоне сохранения импульсации свидетельствует о выключении составляющей, которая кодирует ноцицептивную компоненту в импульсном ответе. Ноцицептивную функцию могут выполнять рецепторы других модальностей, поэтому неспецифическое выключение болевой компоненты может быть связано с полным прекращением

генерации повторных ответов в том канале связи, который информирует организм еще и о температурных и (или) тактильных стимулах. Именно это происходит в случае применения местных анестетиков. Полученные с помощью наших расчетов данные о том, что вызванное применением коеновой кислоты специфическое снижение величины эффективного заряда Z_{eff} активационной воротной структуры медленных натриевых каналов приводит к уменьшению частоты повторных ответов, а не к полной блокаде импульсации, свидетельствует в пользу высокой специфичности анальгетической активности данной субстанции. Этим также может объясняться отсутствие негативных побочных эффектов при ее применении.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-15-00677.

Список литературы

- [1] Krylov B.V., Plakhova V.B., Rogachevsky I.V. Substance with sedative effect. United States Patent N US 8,476,314 B2, Date of Patent Jul 2, 2013.
- [2] Yachnev I.L., Plakhova V.B., Podzorova S.A., Shelykh T.N., Rogachevsky I.V., Krylov B.V. // Med. Chem. 2012. Vol. 8. P. 14–21.

- [3] *Goldin A.L.* // J. Exper. Biol. 2002. Vol. 205. P. 575–584.
- [4] *Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.* // Pflugers Arch. 1981. Vol. 391. N 1. P. 85–100.
- [5] *Алмерс В.* Мембраны: ионные каналы. М.: Мир, 1981. С. 129–236.
- [6] *Chevrier P., Vijayaragavan K., Chahine M.* // British J. Pharmacol. 2004. Vol. 33. N 3. P. 576–584.
- [7] *Read H.L., Siegel R.M.* // Neuroscience. 1996. Vol. 75. N 1. P. 301–314.
- [8] *Kuznetsov Y.A.* Berlin. Springer. 2004. Applied Mathematical Sciences, Vol. 112. P. 710.
- [9] *Lai J., Porreca F., Hunter J.C., Gold M.S.* // Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2004. Vol. 44. P. 371–397. 44. P. 371-397.