

ТЕМПЕРАТУРНАЯ ДЕАКТИВАЦИЯ ДЕПОЛЯРИЗУЮЩЕГО TRP-ТОКА КАК МЕХАНИЗМ ТОРМОЖЕНИЯ НЕЙРОННОЙ АКТИВНОСТИ ПРИ ГИПОТЕРМИИ: МОДЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Поступила 21.02.15

Терапевтическая нейропротекторная гипотермия все шире применяется для подавления очагов аномально высокой нейронной активности в мозгу, возникающей при ишемических и травматических повреждениях, резистентной эпилепсии и др. Это делает особо актуальным исследование факторов, определяющих температурную зависимость интенсивности возбуждения нейронов. В данном аспекте представляют интерес обнаруженные в центральных нейронах термочувствительные каналы TRP-типа, проводящие деполяризационные токи. Мы исследовали подобные каналы и их возможную функциональную роль на компьютерных моделях. TRP-каналы присутствовали в мембране моделируемой гранулярной клетки зубчатой извилины гиппокампа. Моделируемые каналы могли находиться в двух состояниях – открытом и закрытом; вероятности этих состояний были температурозависимыми. Модель адекватно отображала ключевую особенность прототипа – со снижением температуры кривая потенциалуправляемой активации TRP-каналов смещалась в сторону деполяризации, и уровень такой активации при одинаковых потенциалах снижался, т. е. наблюдалась деактивация. Понижение температуры от 37 °С (нормотермия) до 20 °С (глубокая фокальная гипотермия) сопровождалось существенным уменьшением частоты потенциалов действия, генерируемых модельным нейроном в ответ на тоническое синаптическое возбуждение одинаковой интенсивности. Это гипотермическое торможение активности было наиболее выражено в том же диапазоне температур, в котором происходила термозависимая деактивация TRP-каналов. Данный эффект был значительно менее выражен в условиях выключения TRP-каналов, имитировавшего их генетический нокаут. Хотя подобные результаты получены на весьма упрощенных моделях, они раскрывают новые аспекты нейропротекторного действия гипотермии, заслуживающие дальнейшего углубленного исследования.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: компьютерные модели, TRP-каналы, гранулярный нейрон гиппокампа, возбудимость, температурная чувствительность, терапевтическая гипотермия.

ВВЕДЕНИЕ

Гипотермия – понижение температуры тела до субнормальных уровней (<35 °С) – оказывает существенное нейропротекторное влияние при травмах головного и спинного мозга [1–4], резистентной/рефрактерной эпилепсии у взрослых [5], гипоксиче-

ски-ишемической энцефалопатии новорожденных, включая случаи с субклиническими судорожными ЭЭГ-эпизодами (subclinical electrographic seizures) [6–8]. Системная гипотермия квалифицируется как слабая (mild, 36–34 °С), умеренная (moderate, 34–32 °С), умеренно глубокая (moderately deep, 32–30 °С) или глубокая (deep, <30 °С) [5]. В настоящее время начинает достаточно широко использоваться фокальное (локальное) охлаждение мозга до 20 °С с помощью имплантируемых термодов. Такой прием позволяет эффективно подавлять церебральные очаги эпилептической активности, резистентной к фармакологическим препаратам [9, 10].

¹ Международный центр молекулярной физиологии (Днепропетровское отделение) НАН Украины (Украина).

² Государственное учреждение «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины» (Украина).

Эл. почта: dnipro@biph.kiev.ua (С. М. Корогод);
liliya.mailss@gmail.com (Л. Э. Демяненко).

Физиологические и биофизические механизмы нейропротекторного действия терапевтической гипотермии остаются во многом неясными. Согласно доминирующим представлениям, индуцированная гипотермия снижает интенсивность церебрального метаболизма, блокирует каскады, обуславливающие накопление глутамата до нейротоксических уровней, подавляет гиперактивацию глутаматчувствительных рецепторов и избыточное повышение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , а также вызывает церебральную вазоконстрикцию, что снижает внутричерепное давление [11–13]. Роль температурной зависимости интенсивности электрогенеза в нейронах мозга в условиях гипотермии до последнего времени не привлекала особого внимания исследователей, хотя феномен усиления ионных токов через возбудимые мембраны при повышении температуры известен давно [14]. Некоторые аспекты температурной зависимости функционирования ионных насосов и каналов в условиях гипотермии кратко упоминались лишь в единичных обзорах [5, 10, 15].

Мы полагаем, что особого внимания в данном аспекте заслуживают термочувствительные каналы TRP-типа, которые экспрессируются в ряде центральных нейронов, включая нейроны гиппокампа [16–18]. Задачей настоящей работы было выяснить, какова роль функциональных характеристик TRP-каналов в температурной зависимости процессов возбуждения центральных нейронов и каковы биофизические механизмы реализации этой роли. Мы использовали компьютерные модели термочувствительного канала TRP-типа и гранулярной клетки (ГК) зубчатой извилины гиппокампа, в которой экспрессируются такие каналы. Эти клетки (ГК) формируют первое звено в трехзвенных гиппокампальных цепях. Патологическое усиление активности последних рассматривается как один из основных факторов развития эпилепсии.

ОПИСАНИЕ МОДЕЛЕЙ

Исследования были выполнены на двух моделях, разработанных нами в программной среде «NEURON» [19].

Модель 1 соответствовала (с определенными упрощениями) термочувствительному каналу, который, по данным литературы, присутствует в нейронах гиппокампа [17, 18] и активируется при температурах $>15-20$ и $<40-45$ °С. Упроще-

ния основывались на современных представлениях о механизмах температурозависимой активации TRP-каналов [20] и состояли в следующем: 1) канал может находиться в одном из двух состояний – закрытом или открытом; 2) вероятность открытого состояния зависит от мембранного потенциала и температуры; 3) соответствующая функция активации канала имеет вид функции Больцмана $m_{VT} = 1/(1 + \exp(-zF(E - E_{1/2})/RT))$, где F – постоянная Фарадея, R – газовая постоянная, T – абсолютная температура, $z = 0.577$ – эффективный заряд потенциалзависимого сенсора, E – трансмембранный потенциал, $E_{1/2} = (\Delta H - T\Delta S)/zF$ – потенциал половинной активации (т. е. при $E = E_{1/2}$ открыты 50 % всех каналов), $\Delta H = 120$ кДж и $\Delta S = 389$ Дж/К. Две последние величины – это изменения энтальпии и энтропии соответственно при переходе канала из закрытого состояния в открытое. Известная из литературы зависимость активации канала от внутриклеточной концентрации $[Ca^{2+}]_i$ [20–22] характеризовалась функцией m_{Ca} , определяемой дифференциальным уравнением $m_{Ca}' = (m_{Ca} - m_{Ca,\infty})/\tau_{mCa}$, где $m_{Ca,\infty} = 1/(1 + (K_{1/2}/[Ca^{2+}]_i)^H)$ – стационарное значение m_{Ca} , описываемое уравнением Хилла с параметрами $K_{1/2} = 8$ мкМ и $H = 3.2$ [23], а $\tau_{mCa} = 15$ мс – постоянная времени. Плотность проводимого такими каналами неспецифического катионного тока, отнесенного к единице мембранной поверхности, описывалась уравнением: $J_{trp} = G_{trp} \cdot m_{VT} \cdot m_{Ca} \cdot (E - E_{trp})$, где G_{trp} – максимальная проводимость, а $E_{trp} = 0$ мВ – потенциал равновесия.

Модель 2 соответствовала ГК зубчатой извилины гиппокампа; она была построена на основе ранее описанных моделей [24, 25] с рядом модификаций (см. ниже). Моделированная ГК имела представленные мембранными цилиндрами сому (длина $L = 16.8$ мкм, диаметр $d = 16.8$ мкм), аксон и два дендрита. Аксон состоял из четырех секций, соответствующих аксонному холмику и начальному сегменту (секции 1–3) и основному стволу (секция 4). Длины и диаметры секций 1–4 были следующими: L_1 и d_1 равнялись 50.0 и 0.9 мкм, L_2 и d_2 – 50.0 и 0.7 мкм, L_3 и d_3 – 50.0 и 0.5 мкм, а L_4 и d_4 – 1400 и 0.4 мкм соответственно. Каждый дендрит состоял также из секций, из которых первая, отходящая непосредственно от сомы, соответствовала участку, расположенному в пределах гранулярного слоя; она имела длину $L = 50.0$ мкм и диаметр $d = 3.0$ мкм. За ней следовали три секции, представлявшие проксимальный, медиальный и дистальный участки дендрита одинаковой геометрии

($L = 150$ мкм и $d = 3.0$ мкм). Мембрана ГК имела каналы, проводящие ионные токи следующих типов: быстрый инактивирующийся натриевый ток, чувствительный к тетродотоксину (J_{Na}), кальциевые токи Т-, N- и L-типов (J_{CaT} , J_{CaN} и J_{CaL} соответственно), быстрый и медленный калиевые токи задержанного выпрямления (J_{IKDR} и J_{SKDR} соответственно), низкопороговый быстро инактивирующийся калиевый ток А-типа (J_{KA}), кальцийзависимые калиевые токи малой (J_{SK}) и большой (J_{BK}) проводимости (ток J_{BK} был не только кальций-, но и потенциалзависимым), а также ток пассивной утечки (J_{Leak}). Перечисленные парциальные токи описывались уравнениями типа Ходжкина–Хаксли [26]. Распределение парциальных проводимостей по структурным частям клетки было таким же, как описанное в упомянутой выше работе ([25], табл. 3).

Используемая нами модификация исходных моделей состояла в следующем: 1) в уравнения констант скоростей активации и инактивации всех ионных каналов был введен температурный множитель $q_{10} = 3^{(t^{\circ}-22)/10}$, где t° – температура ($^{\circ}\text{C}$); 2) в уравнениях констант скоростей активации калиевых токов J_{IKDR} и J_{SKDR} [25] параметры были изменены так, чтобы мембранные потенциалы отсчитывались от нулевого уровня, как и у всех остальных каналов; 3) выделялся отдельный вычислительный модуль для расчета динамики внутриклеточной концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в общем для всех каналов пуле – при мембранном слое (толщина $\delta = 0.2$ мкм); динамика определялась согласно дифференциальному уравнению $[\text{Ca}^{2+}]_i = -J_{Ca}/2F\delta - ([\text{Ca}^{2+}]_o - [\text{Ca}^{2+}]_i)/\tau_r$, где $J_{Ca} = J_{CaT} + J_{CaN} + J_{CaL}$, F – постоянная Фарадея, $[\text{Ca}^{2+}]_o = 50$ нМ – базальная концентрация, а $\tau_r = 9$ мс – постоянная времени возврата $[\text{Ca}^{2+}]_i$ к базальному уровню за счет действия всех механизмов экстррузии кальция (кальциевых насосов, буферов, диффузии вглубь цитозоля); 4) в мембрану дендритов была дополнительно включена однородно распределенная и не зависящая от мембранного потенциала проводимость G_{syn} каналов возбуждающего синаптического тока $J_{syn} = G_{syn} \cdot (E - E_{syn})$ (потенциал равновесия $E_{syn} = 0$ мВ). Величина G_{syn} , имитирующая активность глутаматергических синапсов АМПА-типа в мембране ГК, соответствовала интенсивности (частоте) поступающей к этой клетке пресинаптической импульсации [27]; 5) в сомато-дендритную мембрану была включена равномерно распределенная проводимость каналов TRP-тока (см. описание модели 1).

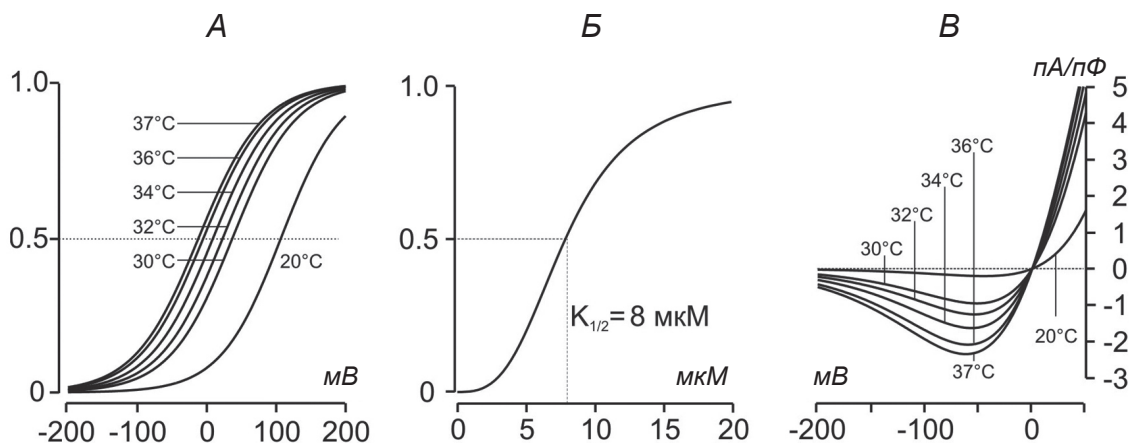
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии вычислительных экспериментов мы исследовали влияние гипотермии на активацию и вольт-амперные характеристики (ВАХ) модельного термочувствительного TRP-канала. Для этого был выбран набор температур, которые, согласно классификации терапевтических температурных воздействий, считаются верхними границами слабой, умеренной, умеренно глубокой и глубокой системной гипотермии, а именно 36, 34, 32 и 30 $^{\circ}\text{C}$ соответственно [5, 6]. Кроме того, аналогичные расчеты были проведены при 20 $^{\circ}\text{C}$ – температуре фокального охлаждения мозговой ткани, применяемого для гипотермического подавления очага эпилептиформной активности [10], а также при 37 $^{\circ}\text{C}$ – температуре, соответствовавшей исходному состоянию (нормотермии). Результаты этого сравнительного исследования (рис. 1) показали, что со снижением температуры функция, описывающая потенциалзависимую активацию и, соответственно, характеризующий потенциал половинной активации $E_{1/2}$, прогрессивно смещаются в направлении деполяризации (A). Так, исходное значение $E_{1/2} = -12$ мВ (при 37 $^{\circ}\text{C}$) существенно изменялось в условиях охлаждения и становилось равным -5 , $+9$, $+23$, $+37$ и $+107$ мВ при 36, 34, 32, 30 и 20 $^{\circ}\text{C}$ соответственно. При этом наклон и сдвиг указанной активационной функции близко соответствовали описанным в литературе данным экспериментальных исследований каналов типа TRPM5 (ср. рис. 1d в работе Талавера и соавт. [28]). Функция кальцийзависимой активации (B) также соответствовала описанной у прототипа, в частности у TRPM5-каналов (ср. рис. 1d у Лю и Лимена [21]). Описанные выше активационные свойства обусловили характерные изменения стационарной ВАХ TRP-тока, происходившие в случае изменения температуры, что также характерно для прототипа (B , ср. рис. 1b в цитируемой работе [28]). Снижение температуры от 37 до 20 $^{\circ}\text{C}$ вело к существенному ослаблению (деактивации) деполяризационного TRP-тока при мембранных потенциалах $E < E_{trp}$ (B). Так, в случаях 36, 34, 32 и 30 $^{\circ}\text{C}$ пиковые значения этого тока, лежащие в диапазоне потенциалов $-61 \dots -52$ мВ, по сравнению с исходным значением -2.35 пА/пФ, наблюдаемым в условиях 37 $^{\circ}\text{C}$, уменьшались до -2.09 , -1.63 , -1.26 и -0.95 пА/пФ соответственно (падение на 11.1, 30.6, 46.4 и 59.6 % соответственно). При 20 $^{\circ}\text{C}$ этот эффект

становился еще более выраженным – ток уменьшался до -0.203 пА/пФ (т. е. более чем на порядок). Таким образом, принятое в настоящей работе упрощенное представление TRP-каналов моделью с двумя состояниями в достаточной мере адекватно отображает ключевой механизм температурной зависимости тока, обеспечиваемого каналами данного типа, – зависимость от температуры существенное изменение диапазона потенциалов активации. Молекулярной термодинамической основой этого эффекта являются значительные изменения энтальпии и энтропии при переходах каналов между закрытым и открытым состояниями [29]. Данное обстоятельство и послужило основанием для включения TRP-каналов с характеристиками, представленными на рис. 1, в модель ГК для исследования того, как работа таких каналов влияет на температурную зависимость процессов клеточного возбуждения.

Результаты последующих вычислительных экспериментов (рис. 2) продемонстрировали, как именно снижение температуры изменяет уровень возбуждения ГК и какую роль в этих изменениях играют термочувствительные TRP-каналы. Возбуждение ГК имитировали тоническим увеличением проводимости G_{syn} для деполяризующего синаптического тока, однородно распределенной по дендритной мембране. Вызванные действием такого стимула потенциалы действия (ПД) регистрировали при

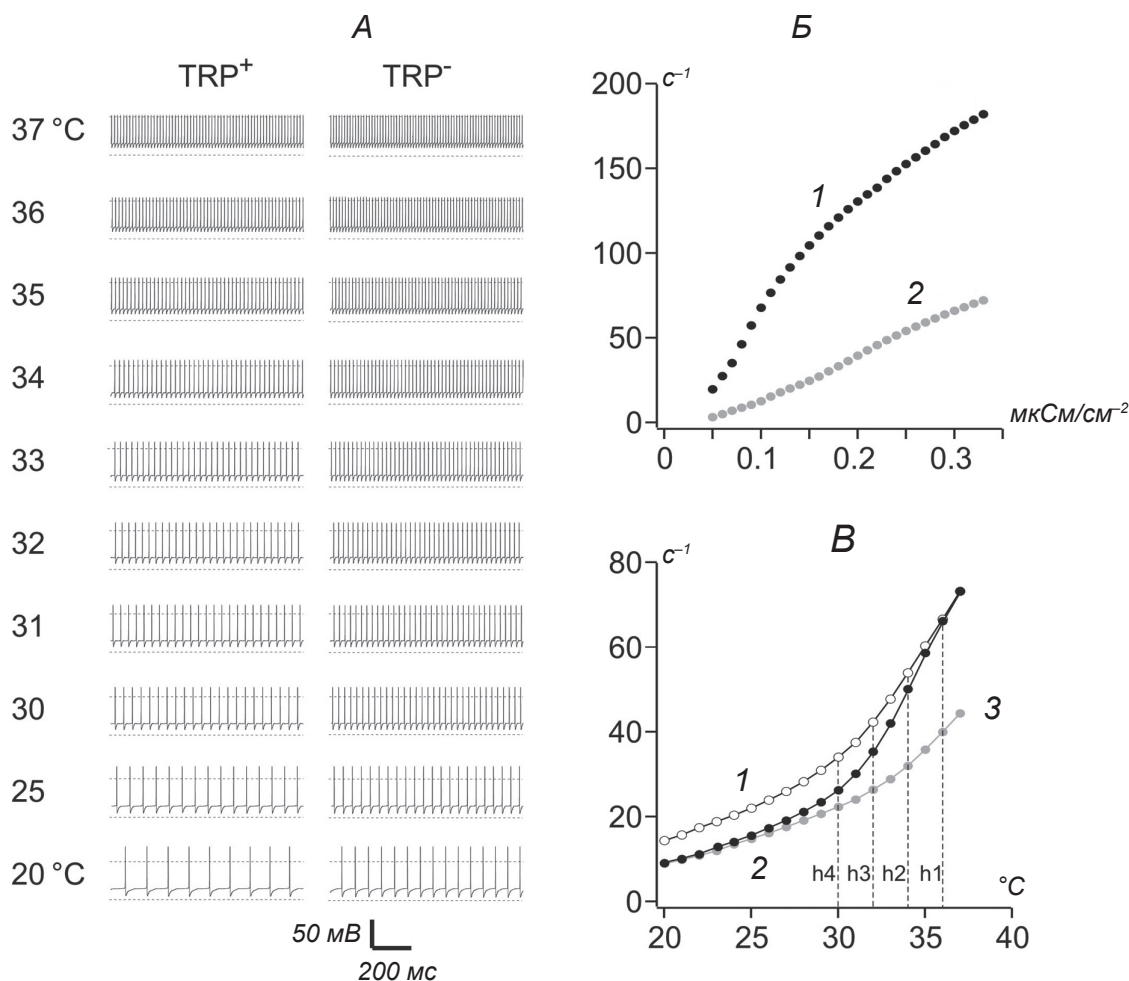
температурах; интенсивность такой активации характеризовали значениями частоты следования ПД в установившемся режиме (B, B). Указанный диапазон включал в себя значения 37, 36, 34, 32, 30 и 20°C , т. е. температуры, при которых ранее были определены характеристики TRP-каналов (рис. 1). Как видно, в число этих значений входят величины, соответствовавшие границам поддиапазонов терапевтической гипотермии (h1–h4). Роль TRP-каналов в рассматриваемых процессах определяли по результатам сравнения частот следования ПД, генерируемых в условиях наличия проводимости для TRP-тока, однородно распределенной по соматодендритной мембране, или выключения данной проводимости, имитирующего подавление экспрессии (нокаут) указанных каналов в генетически модифицированных клетках (условия TRP⁺ или TRP⁻ соответственно). Вначале устанавливали условия TRP⁻ и исследовали зависимость частоты ПД от синаптической проводимости G_{syn} при температурах 20 и 37°C , являвшихся границами рассматриваемого температурного диапазона (рис. 2, B). С увеличением G_{syn} от 50 до 330 мкСм/см² частота разрядов возрастала от 19.65 до 182.01 с⁻¹ при 37°C и от 3.14 до 72.16 с⁻¹ при 20°C . Иными словами, с переходом от 37 к 20°C частота ПД уменьшалась в несколько раз при любой проводимости из указанного диапазона значений. Наблюдаемое в условиях TRP⁻ гипотермическое подавление активности ГК позволило



Р и с. 1. Биофизические характеристики модельного термочувствительного канала TRP-типа.

A – зависимость стационарной функции активации (ось ординат, безразмерна) от потенциала (ось абсцисс, мВ) и температуры (см. указатели). B – определяемая уравнением Хилла стационарная функция кальцийзависимой активации (ось ординат, безразмерна); по оси абсцисс – внутриклеточная концентрация кальция ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), мкМ. B – стационарные вольт-амперные характеристики. По оси абсцисс – мембранный потенциал, мВ; по оси ординат – плотность тока, пА/пФ (рассчитана при тех же температурах, которые указаны на A). Максимальная удельная проводимость $G_{\text{тр}} = 300$ мкСм/см². A и B рассчитаны при базальной концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_i = [\text{Ca}^{2+}]_o = 50$ нМ.

Р и с. 1. Біофізичні характеристики модельного термочутливого каналу TRP-типу.



Р и с. 2. Усиление подавления импульсной активности гранулярной клетки при гипотермии, обусловленное деактивацией термочувствительных TRP-каналов.

A – примеры установившейся генерации потенциалов действия (ПД), вызванной тонической активацией (введением возбуждающей синаптической проводимости дендритной мембраны $G_{\text{syn}} = 80 \text{ мкСм/см}^2$), при разных температурах (указаны слева) в условиях включения или выключения (имитирующего генетической нокаут) TRP-каналов (TRP⁺ или TRP⁻ соответственно); на всех записях верхняя и нижняя пунктирные прямые – уровни нулевого потенциала и потенциала покоя (-71.7 мВ). *Б* – зависимость частоты генерации ПД (ось ординат, с^{-1}) от G_{syn} (ось абсцисс, мкСм/см^2) в условиях выключения TRP-каналов при температурах 37 (1) и 20 (2) °C, соответствующих нормотермии и глубокой фокальной гипотермии. *В* – зависимость частоты генерации ПД (ось ординат, с^{-1}) от температуры (ось абсцисс, °C) при выключении (TRP⁻, 1, 3) или включении (TRP⁺, 2) TRP-каналов; вертикальные прямые h1–h4 – верхние границы температурных диапазонов, соответствующих слабой, умеренной, умеренно глубокой и глубокой гипотермии; графики 1 и 2 соответствуют данным, представленным на *A* для TRP⁺ и TRP⁻. В условиях TRP⁺ (*A*, слева; *B*, 2) максимальные проводимости каналов TRP и синаптического тока G_{trp} и G_{syn} равнялись соответственно 300 и 80 мкСм/см^2 . В условиях TRP⁻ ($G_{\text{trp}} = 0$) значение проводимости G_{syn} было прежним – 80 мкСм/см^2 (*B*, 3) или увеличенным – 105.75 мкСм/см^2 (*A*, справа; *B*, 1), что обеспечивало генерацию разрядов ПД с частотой, равной наблюдаемой в условиях TRP⁺ при соответствующих температурах (20 или 37 °C).

Р и с. 2. Посилення пригнічення імпульсної активності гранулярної клітини при гіпотермії, зумовлене деактивацією термочутливих TRP-каналів.

сравнить указанный эффект с аналогичным эффектом, но реализуемым с участием TRP-каналов (условия TRP⁺).

С учетом описанных выше результатов (рис. 2, *Б*) для наглядного представления эффектов гипо-

термии и выяснения их биофизических основ мы выбрали определенные значения проводимости каналов синаптического тока (вызывающего возбуждение) и TRP-тока (обуславливающего температурозависимую модуляцию возбуждения) – G_{syn}

и G_{trp} соответственно. Выбор, диктуемый наличием лишь косвенных экспериментальных данных о подобных процессах в клетках-прототипах, осуществляли следующим образом.

1. Вначале из рассмотренного диапазона (рис. 2, *Б*) выбирали такую проводимость G_{syn} , которая обеспечивала частоту разрядов, близкую к зарегистрированной в биологических экспериментах на ГК-прототипах в условиях температуры 20 °С. При такой температуре активация TRP-каналов минимальна или отсутствует; следовательно, минимальны или отсутствуют различия условий TRP⁺ или TRP⁻. Согласно данным экспериментов такого рода, выполненных на срезах гиппокампа мышей, ГК-прототипы, возбудимость которых не была повышенной, в ответ на приложение ступеньки деполяризующего тока генерировали серию ПД (верхняя запись на рис. 3, *А* в работе Яришкина и соавт. [30]) с частотой следования около 7 с⁻¹. Следовавшие с близкой частотой (8.74 с⁻¹) ПД генерировались исследуемой нами модельной ГК в ответ на тоническую синаптическую активацию интенсивностью $G_{\text{syn}} = 80$ мкСм/см² при 20 °С, т. е. в условиях TRP⁻ (рис. 2, *Б*). Именно это значение G_{syn} было выбрано для последующих сравнительных исследований. Заметим, что в данных условиях (TRP⁻) повышение температуры до 37 °С приводило к увеличению частоты следования ПД до 44.18 с⁻¹ (рис. 2, *В*, 3).

2. Далее, сохраняя выбранное значение $G_{\text{syn}} = 80$ мкСм/см², условие TRP⁻ изменяли на TRP⁺, т. е. включали проводимость TRP-каналов. Величину этой проводимости $G_{\text{trp}} = 300$ мкСм/см² устанавливали так, чтобы при 37 °С получить отчетливо выраженный эффект – увеличение частоты разрядов ГК до 72.98 с⁻¹, т. е. на 65 % (рис. 2, *В*, 2). Заметим, что в данных условиях (TRP⁺) с возвратом температуры к 20 °С частота разрядов падала до 8.7 с⁻¹, т. е. возвращалась практически к тому же исходному уровню, который наблюдался в условии TRP⁻ (графики 2 и 3 на рис. 2, *В* сходились в одну точку).

3. Наконец, снова устанавливали условия TRP⁻ ($G_{\text{trp}} = 0$), но синаптическую проводимость G_{syn} повышали до такого уровня, который при 37 °С позволял получить разряды практически такой же частоты (72.96 с⁻¹), как в описанном выше случае (TRP⁺). Это достигалось, если G_{syn} равнялась 105.75 мкСм/см². В таких условиях понижение температуры до 20 °С приводило к уменьшению частоты разрядов до 14 с⁻¹ (рис. 2, *В*, 1).

Описанный выше выбор проводимостей G_{syn} и

G_{trp} их комбинаций позволил достаточно наглядно продемонстрировать как сам факт влияния функционирования температурозависимых TRP-каналов на вызванные гипотермией изменения уровня возбуждения ГК, так и особый механизм подобного влияния. Сравнивали графики 1–3 на рис. 2, *В*. О существенном влиянии TRP-каналов на уровень возбуждения ГК в условиях нормотермии свидетельствует следующее. При 37 °С и наличии TRP-проводимости (TRP⁺, аналог «нормальной» экспрессии TRP-каналов) частота разрядов существенно превышает частоту, наблюдаемую в условиях выключения этой проводимости (TRP⁻, аналог генетического «нокаута» данных каналов). Траектория графика 2 находится значительно выше таковой графика 3 в верхней части температурного диапазона, особенно в участках, соответствующих уровням слабой и умеренно глубокой гипотермии (h1 и h3). О механизме, посредством которого TRP-каналы реализуют свое значительное влияние, можно судить по наблюдаемым при изменениях температуры трем особенностям изменения частоты ПД. Во-первых, это наблюдаемое в условиях снижения температуры более крутое падение частоты относительно общего исходного уровня в случае наличия проводимости G_{trp} , чем аналогичное падение в случае ее выключения (ср. графики 1 и 2). Во-вторых, это обусловленное повышением температуры более крутое увеличение частоты относительно общего исходного уровня в условиях TRP⁺ по сравнению с таковым в условиях TRP⁻. Два данных наблюдения свидетельствуют о том, что вместе с включением TRP-каналов включается специфический, присущий именно указанным каналам механизм температурной чувствительности. Данный механизм отличается от иных, присущих всем остальным каналам механизмов, которые основываются на изменениях скоростей кинетик активации/инактивации соответствующих токов и их нернстовского потенциала равновесия. В-третьих, это диапазон температур, в пределах которого из-за различий крутизны температурной зависимости происходит наиболее выраженное уменьшение (ср. графики 2 и 3) или увеличение (ср. графики 1 и 2) описанных выше различий (диапазон температур от нормотермии до нижней границы системной гипотермии – h4). Он является также «рабочим диапазоном» для TRP-каналов, т. е. диапазоном, в котором реализуются температурозависимые изменения потенциала половинной активации каналов.

На основании представленных результатов можно сделать следующее заключение. Поскольку процессы гипотермического снижения возбудимости нейрона существенно различаются в зависимости от наличия или отсутствия деполяризационного тока через TRP-каналы (рис. 2), постольку функциональная роль данных каналов, механизмы реализации этой роли, а также последствия для нейронной активности в норме и при патологии заслуживают углубленного изучения. С учетом общих физиологических и биофизических соображений очевидно, что увеличение интенсивности возбуждения нейрона (как физиологически нормальное, так и патологическое) связано с преобладанием деполяризующих токов над гиперполяризующими. За счет чего же это преобладание может увеличиваться в случае повышения температуры и уменьшаться в случае ее понижения? При прочих равных условиях (распределение плотности каналов, интенсивность пресинаптической импульсации) указанное преобладание деполяризующих токов обусловлено действием трех механизмов. Это опережающая активация данных токов (1), повышение уровня активации на фоне сопоставимых уровней мембранного потенциала (2) и более значительное увеличение движущего потенциала (разности между мембранным потенциалом и нернстовским потенциалом равновесия) по сравнению с аналогичными характеристиками гиперполяризующих токов (3).

Какие механизмы определяют условия 1–3 и какова их специфичность по отношению к де- и гиперполяризующим токам?

Опережающая активация (механизм 1) соответствует большей скорости и, соответственно, меньшей постоянной времени этого процесса. Постоянная времени активации обратно пропорциональна температурному фактору q_{10} . Последний для всех типов каналов, экспрессируемых клеткой, считается одинаковым. Следовательно, изменения температуры однонаправленно изменяют скорости активации каналов всех типов, поэтому механизм 1 температурной чувствительности не является специфическим для деполяризующих токов.

Характер температурной чувствительности движущих потенциалов для упомянутых токов (механизм 3) также не отличается специфичностью. С изменением температуры такие потенциалы для де- и гиперполяризующих токов изменяются однонаправленно, параллельно однонаправленным изменениям абсолютной величины парциальных по-

тенциалов равновесия Нернста, пропорциональных температуре. Это ведет к одновременному увеличению или уменьшению противоположно направленных токов при увеличении или уменьшении температуры соответственно.

Специфичным по отношению к деполяризующим токам и, более того, к таким токам, генерируемым именно термочувствительными каналами TRP-типа, является механизм 2 – зависимое от температуры изменение уровня активации в пределах физиологического диапазона значений мембранного потенциала. Как следует из описанных выше результатов, связанное с понижением температуры смещение активационной кривой вдоль оси потенциалов вправо (рис. 1, А), означающее снижение интенсивности активации (деактивацию) TRP-каналов, существенно ослабляет идущий через них деполяризующий ток (В). Это и является специфическим и существенным фактором, обуславливающим гипотермическое подавление активности нейрона.

Таким образом, благодаря своему особому биофизическому механизму температурной чувствительности TRP-каналов, активирующихся при физиологических температурах, токи через данные каналы могут быть важным (если не ключевым) фактором терапевтического действия гипотермии на патологически повышенную возбудимость центральных нейронов. В связи с этим особо актуальным становится вопрос о конкретных типах TRP-каналов, задействованных в указанные процессы. Очевидно, критериями селекции каналов-кандидатов для дальнейшего подробного исследования будут, как минимум, два: 1) температурный диапазон активации (>20 °C и <40 °C), отличный от такового у ноцицепторных каналов, и 2) факт экспрессии таких каналов в центральных нейронах – мишенях для терапевтического гипотермического воздействия. Согласно существующим данным, первому критерию отвечают каналы TRPM2, TRPM4, TRPM5, TRPV1, TRPV3 и TRPV4 [16, 18, 31–34]. Среди них в нейронах головного мозга экспрессируются каналы типов TRPM4 и TRPM5 ([31]; их наличие показано в пирамидных нейронах префронтальной коры [32] и нейронах Пуркинью мозжечка [34]). Кроме того, это каналы TRPV1 (выявленные в гиппокампе, включая ГК зубчатой извилины [33]) и TRPV4 (обнаружены в разных гиппокампальных нейронах [17]).

Описанные в нашей работе модели, идентифицированные с их помощью механизмы и функци-

ональные эффекты гипотермической деактивации TRP-каналов могут послужить основой для дальнейших детальных исследований управляющих температурных влияний на возбудимость центральных нейронов, включая нейроны гиппокампа (с учетом биофизических свойств каналов-кандидатов, отвечающих вышеописанным критериям).

Настоящее исследование не было связано с какими-либо экспериментами на животных или тестами с участием людей; ввиду этого подтверждения соответствия существующим этическим стандартам в данном аспекте не требуется.

С. М. Корогод и Л. Э. Демяненко подтверждают, что в процессе работы отсутствовали конфликты любого рода, касающиеся коммерческих или финансовых отношений, отношений с организациями или лицами, которые каким-либо образом могли быть связаны с исследованием, и взаимоотношений соавторов статьи.

С. М. Корогод¹, Л. Э. Демяненко²

ТЕМПЕРАТУРНА ДЕАКТИВАЦІЯ ДЕПОЛЯРИЗУЮЧОГО TRP-СТРУМУ ЯК МЕХАНІЗМ ГАЛЬМУВАННЯ НЕЙРОННОЇ АКТИВНОСТІ ПРИ ГІПОТЕРМІЇ: МОДЕЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

¹Міжнародний центр молекулярної фізіології (Дніпропетровське відділення) НАН України (Україна).

²Державний заклад «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» (Україна).

Резюме

Терапевтична нейропротекторна гіпотермія все ширше застосовується для пригнічення осередків аномально високої нейронної активності в мозку, що виникає при ішемічних і травматичних пошкодженнях, резистентній епілепсії та ін. Це робить особливо актуальним дослідження факторів, які визначають температурну залежність інтенсивності збудження нейронів. У даному аспекті представляють інтерес виявлені в центральних нейронах термочутливі канали TRP-типу, що проводять деполізаційні струми. Ми досліджували подібні канали та їх функціональну роль на комп'ютерних моделях. TRP-канали були присутні в мембрані модельованої клітини зубчастої звивини гіпокампа. Модельовані канали могли знаходитись у двох станах – відкритому і закритому; імовірності цих станів були температурозалежними. Модель адекватно відображала ключову особливість прототипу – при зниженні температури крива потенціалкеренованої активації TRP-каналів зміщувалась у бік деполізації, і рівень такої активації при однакових потенціалах знижувався, тобто спостерігалася деактивація. Пониження температури від 37 °С (нормотермія) до 20 °С (глибока фокальна гіпотермія) супроводжувалось істотним зменшенням частоти потенціалів дії, генерованих модель-

ним нейроном у відповідь на тонічне синаптичне збудження однакової інтенсивності. Це гіпотермічне гальмування активності було найбільш вираженим у тому ж самому діапазоні температур, у котрому відбувалася термозалежна деактивація TRP-каналів. Даний ефект був значно менш вираженим в умовах виключення TRP-каналів, що імітувало їх генетичний нокаут. Хоча подібні результати отримані на доволі спрощених моделях, вони розкривають нові аспекти нейропротекторної дії гіпотермії, котрі заслуговують на подальше поглиблене дослідження.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. W. D. Dietrich, A. D. Levi, M. Wang, et al., "Hypothermic treatment for acute spinal cord injury," *Neurotherapeutics*, **8**, No. 2, 229-239 (2011).
2. W. D. Dietrich and H. M. Bramlett, "Therapeutic hypothermia and targeted temperature management in traumatic brain injury: Clinical challenges for successful translation," *Brain Res.*, **1640**, 94-103 (2016).
3. M. Wilson and A. D. Penna, "Targeted temperature modulation in the neuroscience patient," *Crit. Care Nurs. Clin. North Am.*, **28**, No. 1, 125-136 (2016).
4. S. Yokobori and H. Yokota, "Targeted temperature management in traumatic brain injury," *J. Intens. Care*, **4**, No. 28, 1-10 (2016).
5. G. K. Motamedi, R. P. Lesser, and S. Vicini, "Therapeutic brain hypothermia, its mechanisms of action, and its prospects as a treatment for epilepsy," *Epilepsia*, **54**, No. 6, 959-970 (2013).
6. K. H. Polderman and I. Herold, "Therapeutic hypothermia and controlled normothermia in the intensive care unit: practical considerations, side effects, and cooling methods," *Crit. Care Med.*, **37**, No. 3, 1101-1120 (2009).
7. R. C. Silveira and R. S. Procianny, "Hypothermia therapy for newborns with hypoxic ischemic encephalopathy," *J. Pediat. (Rio J.)*, **91**, No. 6, 78-83 (2015).
8. S. Shankaran, "Therapeutic hypothermia for neonatal encephalopathy," *Current Treat. Options Neurol.*, **14**, No. 6, 608-619 (2012).
9. S. M. Rothman, "The therapeutic potential of focal cooling for neocortical epilepsy," *Neurotherapeutics*, **6**, No. 2, 251-257 (2009).
10. M. Fujii, T. Inoue, S. Nomura, et al., "Cooling of the epileptic focus suppresses seizures with minimal influence on neurologic functions," *Epilepsia*, **53**, No. 3, 485-493 (2012).
11. M. Luscombe and J. C. Andrzejowski, "Clinical applications of induced hypothermia," *Contin. Educ. Anaesthesia, Crit. Care Pain*, **6**, No. 1, 23-27 (2006).
12. P. P. Drury, L. Bennet, and A. J. Gunn, "Mechanisms of hypothermic neuroprotection," *Semin. Fetal Neonatal Med.*, **15**, No. 5, 287-292 (2010).
13. A. Bregy, R. Nixon, G. Lotocki, et al., "Posttraumatic hypothermia increases doublecortin expressing neurons in the dentate gyrus after traumatic brain injury in the rat," *Exp. Neurol.*, **233**, No. 2, 821-828 (2012).
14. C. A. Collins and E. Rojas, "Temperature dependence of the sodium channel gating kinetics in the node of Ranvier," *Quart. J. Exp. Physiol.*, **67**, No. 1, 41-55 (1982).
15. K. H. Polderman, "Mechanisms of action, physiological

- effects, and complications of hypothermia,” *Crit. Care Med.*, **37**, No. 3, 186-202 (2009).
16. C. Harteneck and K. Leuner, “TRP channels in neuronal and glial signal transduction,” in: *Neurochemistry*, T. Heinbokel (ed.), InTech, Rijeka (2014), pp. 1–22.
 17. K. Shibasaki, M. Suzuki, A. Mizuno, et al., “Effects of body temperature on neural activity in the hippocampus: regulation of resting membrane potentials by transient receptor potential vanilloid 4,” *J. Neurosci.*, **27**, No. 7, 1566-1575 (2007).
 18. A. Menigoz, T. Ahmed, V. Sabanov, et al., “TRPM4-dependent post-synaptic depolarization is essential for the induction of NMDA receptor-dependent LTP in CA1 hippocampal neurons,” *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, **468**, No. 4, 593-607 (2016).
 19. N. T. Carnevale and M. L. Hines, *The Neuron Book*, Cambridge Univ. Press, Cambridge (2006).
 20. T. Voets, G. Droogmans, U. Wissenbach, et al., “The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels,” *Nature*, **430**, No. 7001, 748-754 (2004).
 21. D. Liu and E. R. Liman, “Intracellular Ca^{2+} and the phospholipid PIP2 regulate the taste transduction ion channel TRPM5,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, No. 25, 15160-15165 (2003).
 22. D. Prawitt, M. K. Monteilh-Zoller, L. Brixel, et al., “TRPM5 is a transient Ca^{2+} -activated cation channel responding to rapid changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, No. 25, 15166-15171 (2003).
 23. Z. Zhang, Z. Zhao, R. Margolskee, et al., “The transduction channel TRPM5 is gated by intracellular calcium in taste cells,” *J. Neurosci.*, **27**, No. 21, 5777-5786 (2007).
 24. G. L. F. Yuen and D. Durand, “Reconstruction of hippocampal granule cell electrophysiology by computer simulation,” *Neuroscience*, **41**, Nos. 2/3, 411-423 (1991).
 25. I. Aradi and W. R. Holmes, “Role of multiple calcium and calcium-dependent conductances in regulation of hippocampal dentate granule cell excitability,” *J. Comput. Neurosci.*, **6**, No. 3, 215-235 (1999).
 26. A. L. Hodgkin and A. F. Huxley, “A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve,” *J. Physiol.*, **117**, Nos. 1/2, 500-544 (1952).
 27. L. F. Abbott, “Realistic synaptic inputs for model neural networks,” *Network*, **2**, No. 3, 245-258 (1991).
 28. K. Talavera, K. Yasumatsu, T. Voets, et al., “Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste,” *Nature*, **438**, No. 7070, 1022-1025 (2005).
 29. T. Voets, “Quantifying and modeling the temperature-dependent gating of TRP channels,” *Rev. Physiol., Biochem., Pharmacol.*, **162**, 91-119 (2012).
 30. O. Yarishkin, D. Y. Lee, E. Kim, et al., “TWIK-1 contributes to the intrinsic excitability of dentate granule cells in mouse hippocampus,” *Mol. Brain*, **7**, No. 1, 80 (2014).
 31. T. Hofmann, V. Chubanov, T. Gudermann, et al., “TRPM5 is a voltage-modulated and Ca^{2+} -activated monovalent selective cation channel,” *Current Biol.*, **13**, No. 13, 1153-1158 (2003).
 32. Y. Lei, S. J. Thuaud, P. Launay, et al., “Differential contribution of TRPM4 and TRPM5 nonselective cation channels to the slow afterdepolarization in mouse prefrontal cortex neurons,” *Front. Cell. Neurosci.*, **8**, No. 267, 1-14 (2014).
 33. A. E. Chávez, V. M. Hernández, A. Rodenas-Ruano, et al., “Compartment-specific modulation of GABAergic synaptic transmission by TRPV1 channels in the dentate gyrus,” *J. Neurosci.*, **34**, No. 50, 16621-16629 (2014).
 34. Y. Kim, E. Kang, Y. Makino, et al., “Characterizing the conductance underlying depolarization-induced slow current in cerebellar Purkinje cells,” *J. Neurophysiol.*, **109**, No. 4, 1174-1181 (2013).