

УДК 576.32

# Влияние модуляторов кальций-активируемых калиевых каналов на активность клеток Пуркинье мозжечка крыс

Т. В. Карелина\*, Ю. Д. Степаненко, П. А. Абушик, Д. А. Сибаров, С. М. Антонов  
 Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223, Санкт-Петербург, просп. Тореза, 44  
 \*E-mail: karelina\_tanja@mail.ru  
 Поступила в редакцию 20.01.2016  
 Принята к печати 30.05.2016

**РЕФЕРАТ** Кальций-активируемые калиевые каналы малой проводимости (SK) широко распространены в тканях ЦНС, однако мало исследованы. Их участие в регулировании пейсмейкерной активности клеток Пуркинье (КП) мозжечка выявлено преимущественно в экспериментах *in vitro*. В опытах *in vivo* на крысах линии Вистар с помощью метода внеклеточной микроэлектродной регистрации нейронной активности мы впервые оценили возрастные особенности изменения частоты простых спайков КП мозжечка при активации SK-каналов веществами NS309 и СуРРА у взрослых (3–6 мес.) и старых (22–28 мес.) животных. Оба вещества вызывали статистически значимое уменьшение частоты простых спайков КП. Максимальная величина снижения частоты простых спайков не зависела от возраста, однако ее значимое отличие от контроля при действии положительных модуляторов SK-каналов достигалось быстрее у старых животных. Регистрация трансмембранных токов в нейронах мозжечка *in vitro* показала, что NS309 и СуРРА действуют непосредственно на SK-каналы клеток Пуркинье, идентифицированных по экспрессии маркера КП – белка кальбиндина, вызывают дополнительный выход калия из КП и усиливают следовую гиперполяризацию потенциала действия. Применение активаторов SK-каналов, возможно, позволит компенсировать возрастные изменения авторитмических функций мозжечка.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** клетки Пуркинье, мозжечок, SK-каналы, старение.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** КП – клетки Пуркинье; кальбиндин – кальбиндин-D28k; СуРРА – N-циклогексил-N-[2-(3,5-диметилпиразол-1-ил)-6-метил-4-пиримидинамин]; NS309 – 6,7-дихлор-1H-индол-2,3-дикетон-3-оксим; SK-каналы – Ca<sup>2+</sup>-активируемые K<sup>+</sup>-каналы малой проводимости; VGCC – потенциал-чувствительные кальциевые каналы.

## ВВЕДЕНИЕ

Мозжечок является важным отделом ЦНС в силу многообразия выполняемых им функций. Осуществляя мониторинг всех двигательных актов и минимизируя ошибку между задуманным и совершенным действием, мозжечок играет ключевую роль в моторной активности [1]. Одно из проявлений дисфункции мозжечка – спиналомозжечковая атаксия – нарушение точности и координации произвольных движений, развитие которой часто связано с гибелью или дисфункцией клеток Пуркинье (КП). При этом дисфункция, выражающаяся в изменении паттерна активности КП, может наступать раньше нарушений двигательной активности. Например, у мышей с генетически обусловленной наследственной спиналомозжечковой атаксией типа 2 двигательная активность начинала ухудшаться с 8 недели, число

КП уменьшалось с 12 недели, тогда как снижение частоты разряда КП было зафиксировано уже на 6 неделе постнатального развития [2]. В исследованиях, выполненных на срезах мозжечка мышей и крыс, установлено, что при таких нейродегенеративных заболеваниях, как спиналомозжечковые атаксии типа 2 и 3, а также при эпизодической атаксии типа 2 изменяется пейсмейкерная активность КП [3–5].

Ca<sup>2+</sup>-активируемые K<sup>+</sup>-каналы экспрессируются многими нейронами ЦНС и представлены тремя типами – каналами большой (BK), малой (SK) и промежуточной (IK) проводимости [6]. SK-каналы – потенциал-независимые каналы, которые напрямую активируются только субмикромольными концентрациями Ca<sup>2+</sup> [7], усиливая в нейронах следовую гиперполяризацию [6]. КП характеризуются выраженной экспрессией Ca<sup>2+</sup>-активируемых K<sup>+</sup>-каналов

малой проводимости подтипа SK2 [8]. Блокирование SK2-каналов апамином в КП, обладающих тримодальным паттерном активности, вызывает укорочение его циклов, а в клетках с тоническим типом разряда приводит к увеличению частоты и появлению взрывного типа разряда [9].

Ранее нами было установлено, что при нормальном старении в КП возрастает частота простых спайков и укорачивается время депрессии после сложного спайка [10, 11]. Аналогичное возрастное увеличение частоты разрядов КП показано в исследовании Kasumi и соавт. у мутантных мышей с моделью спинозжечковой атаксии типа 2 [12].

Практически все работы по изучению SK-каналов в КП мозжечка выполнены в условиях *in vitro*. Однако в этом случае нарушается целостность самой структуры мозжечка, а также афферентных и межнейронных связей. Многочисленные работы, посвященные генетически предопределенным патологиям мозжечка, выполнены, главным образом, на молодых и взрослых животных. Сведения же об изменениях функций КП у старых животных при нормальном старении крайне бедны. Поэтому важным представляется сравнительное изучение особенностей функционирования КП *in vivo* в позднем онтогенезе. Учитывая непосредственное участие SK-каналов в регулировании паттерна активности КП мозжечка и его изменении в ходе старения, а также вклад SK-каналов в развитие различных нейродегенеративных заболеваний, цель данной работы состояла в сравнительном изучении вклада SK-каналов в паттерн активности КП у взрослых и старых крыс.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Внеклеточная регистрация активности КП мозжечка *in vivo*

Исследование проводили на самцах и самках крыс линии Вистар. При проведении эксперимента животные были разделены на две группы: взрослые (от 3 до 6 мес.) и старые (от 21 до 24 мес.). Для наркотизации животных использовали уретан, который вводили внутривентриально из расчета 1300 и 1000 мг/кг веса взрослых и старых крыс соответственно. КП регистрировали и идентифицировали по ранее описанной методике [13]. У наркотизированного животного удаляли скальп, снимали мышечный слой и сверлили отверстие диаметром 1 мм в затылочной кости над червем мозжечка. Затем животное закрепляли в стереотаксической установке. Для регистрации внеклеточной активности КП использовали стеклянные микроэлектроды из боросиликатного стекла (внешний диаметр 1.5 мм, внутренний – 1.10 мм, Sutter Instrument, США), заполненные

раствором 2.5 М NaCl. Микроэлектрод погружали в ткань мозжечка с помощью автоматического манипулятора с шагом погружения 5 мкм на глубину до 5 мм. КП идентифицировали по характерному для них паттерну активности: наличию простых и сложных спайков, а также тормозной паузы после сложного спайка перед серией простых. Сигнал от регистрируемой клетки усиливали (AC/DC Differential Amplifier, model 3000, A-M Systems, Inc, США) и оцифровывали с частотой дискретизации 10000 изм./с (АЦП L-791, ЗАО «Л-КАРД», Россия) в оригинальной программе Bioactivity Recorder v.5.3, разработанной Д.А. Сибаровым [http://sibarov.ru/index.php?slab=software] для последующего анализа частоты простых спайков в программе Clampfit 10.2 (Molecular Devices Corp., США). Действующие вещества подавали согласно стандартной методике [14] путем их аппликации на обнаженную поверхность мозжечка в области введения микроэлектрода. Сначала была проведена контрольная серия опытов, в которой осуществляли аппликацию физиологического раствора (0.9% NaCl). Затем, в следующих сериях опытов, использовали позитивный модулятор SK- и IK-каналов – NS309 (Tocris, США), а также селективный активатор кальций-активируемых калиевых каналов малой проводимости подтипов SK2 и SK3 – СуРРА (Tocris, США) (рис. 1). Концентрации действующих веществ, подобранные в зависимости от глубины погружения микроэлектрода, составляли 100–200 мкМ для NS309 и 1–2 мМ для СуРРА. Растворы действующих веществ готовили на 0.9% NaCl. Запись активности КП осуществляли в течение 30 с до аппликации вещества, а затем периодами такой же длительности через 5, 15, 30, 45 и 60 мин после аппликации.

С целью сравнения контрольных данных с экспериментальными определяли частоту простых спайков в каждой клетке в течение 30 с по всем указанным временным отметкам. Затем высчитывали

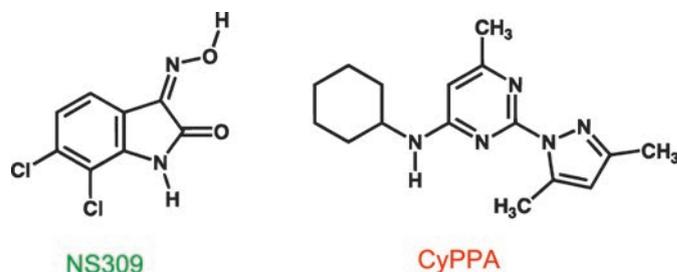


Рис. 1. Химическая структура активаторов или аллостерических модуляторов SK-каналов, увеличивающих их чувствительность к кальцию

относительные частоты для каждой временной отметки, приняв за единицу частоту спайков до аппликации. Для каждой временной отметки рассчитывали среднее значение частоты и стандартную ошибку среднего (SEM). При оценке статистической значимости различий контрольных данных с экспериментальными, т.е. при действии положительных модуляторов, использовали двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с применением пост-теста Бонферрони. В контрольных сериях экспериментов для сравнения исходной частоты со средними значениями в каждой временной точке использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA).

### Приготовление первичной культуры нейронов мозжечка

В первичной культуре нейронов, выделенных из различных отделов эмбрионального мозга, в частности коры больших полушарий [15] и мозжечка [16], происходит дифференцировка основных типов нейронов, характерных для этих отделов во взрослом мозге. Например, первичную культуру нейронов мозжечка ранее успешно применяли для изучения свойств клеток Пуркинью [17]. Первичную культуру получали из мозжечков эмбрионов на 20–21 день пренатального развития (E20–E21). С целью получения суспензии клеток мозжечка выделенную ткань помещали в раствор трипсина (0.04 мг/мл), а затем клетки обрабатывали раствором ДНКазы (0.04 мг/мл), ингибитором трипсина и фетальной сывороткой крупного рогатого скота. После центрифугирования производили диссоциацию клеток путем пипетирования в питательной среде. Диспергированные клетки культивировали на обработанных поли-*D*-лизином 7-мм стеклах в среде Neurobasal (Gibco, США) с добавлением B27 (Gibco, США), *L*-глутамин (Gibco, США) и 20 мМ KCl для увеличения выживаемости нейронов мозжечка, в том числе клеток Пуркинью и зернистых нейронов [18].

### Регистрация нейронных токов методом локальной фиксации потенциала

Непосредственное действие модуляторов SK-каналов на нейроны в первичной культуре нейронов мозжечка подтверждали с использованием метода локальной фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка» в режиме фиксации тока для записи формы потенциала действия и в режиме фиксации напряжения для получения вольт-амперных характеристик SK-каналов.

Эксперименты на клетках культуры мозжечка проводили на 7–8 день *in vitro* (DIV 7–8). В опытах использовали внеклеточный физиологический рас-

твор следующего состава: 140 мМ NaCl, 2.8 мМ KCl, 2 мМ CaCl, 10 мМ HEPES. Внутриклеточный раствор для заполнения микроэлектрода имел следующий состав (мМ): 9 NaCl, 17.5 KCl, 121.5 К-глюконат, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 0.2 EGTA, 2 MgATP, 0.5 NaGTP. Для регистрации токов применяли усилитель MultiClamp 700B с системой сбора данных Digidata 1440A и программное обеспечение pClamp v10.2 (Molecular Devices, США). Частота дискретизации составляла 20000 изм./с. Исходный регистрируемый сигнал подвергали предварительной аналоговой фильтрации (эквивалент ВЧ-фильтра Бесселя 8-го порядка) с частотой среза 200 Гц. Для аппликации тестовых веществ (100 мкМ СуРРА или 10 мкМ NS309) использовали систему быстрой смены растворов на базе BPS-4 (Ala Scientific Instruments, США) с многоканальным перфузионным капилляром, кончик которого располагали в 200–300 мкм от регистрируемой клетки. КП идентифицировали по размеру сомы, существенно большему, чем у нейронов других типов (приблизительно в 4 раза), и ритмической генерации потенциалов действия.

Вольт-амперные характеристики каналов, активируемых СуРРА и NS309, определяли из разности токов нейрона, записанных при приложении «рампа» – плавного изменения потенциала от –100 до +60 мВ за 5 с до и после аппликации веществ. Статистическую значимость изменений следовой гиперполяризации спайков при действии положительных модуляторов SK- и IK-каналов оценивали с использованием непарного *t*-критерия Стьюдента.

### Иммуноцитохимическое окрашивание клеток Пуркинью

Присутствие КП в первичной культуре клеток мозжечка крыс дополнительно контролировали с помощью иммуноцитохимического анализа экспрессии белка кальбиндина, маркера нейронов данного типа [19]. При подготовке к иммуноцитохимическому окрашиванию стекла с клетками фиксировали 4% раствором формальдегида, после чего обрабатывали хлористым аммонием (0.535 мг/мл), Тритоном X-100 (0.2% раствор) и глицином (15 мг/мл). Неспецифическое связывание антител блокировали, обрабатывая стекла с клетками 2% раствором бычьего сывороточного альбумина. Все растворы готовили на фосфатно-солевом буфере. Для идентификации кальбиндина КП использовали первичные моноклональные антитела мышей к этому белку (Calbindin-D28k, Abcam, ab82812). Иммунопозитивную реакцию визуализировали с использованием вторичных антител, конъюгированных с флуорохромом Alexa 633 (Molecular Probes A21052, Life Technologies, США). Во избежание быстрого выгорания флуорес-

центных красителей стекла, обработанные антителими, фиксировали на предметных стеклах клеем, содержащим соединение Mowiol (Sigma-Aldrich, Германия). Флуоресценцию иммунопозитивных нейронов регистрировали на конфокальном сканирующем микроскопе Leica SP5 MP (Leica Microsystems Inc., Германия), оснащенном иммерсионным объективом  $\times 63$  (HCX APO CS  $63\times/1.4$ ; Leica Microsystems, Inc., Германия). Возбуждение красителя Alexa 633 проводили аргоновым лазером с длиной волны 633 нм. Диапазон эмиссии красителя составлял 640–700 нм. Обработку изображений проводили с помощью программного обеспечения Leica LAS AF (Leica Microsystems Inc., Германия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Влияние положительных модуляторов SK-каналов на частоту простых спайков КП у старых крыс

В нашей работе при регистрации потенциалов действия КП *in vivo*, в отличие от экспериментов, выполненных на срезах, сохранялись все афферентные связи КП, что обуславливало нерегулярность межимпульсных интервалов. Примеры характерной активности КП у старых животных показаны в контроле и при действии NS309, а также в контроле и при действии СуРРА (рис. 2А). Аппликация физиологического раствора не вызывала значимых изменений частоты простых спайков КП у старых животных в течение 60 мин (от 15 до 43 Гц в начале и от 16 до 48 Гц в конце,  $p > 0.95$ ,  $n = 7$ , ANOVA). Повышение среднего значения относительной частоты простых спайков в отдельные периоды регистрации составило 0–3% и было наибольшим через 30 мин после аппликации (рис. 2Б). Эти результаты отчетливо показывают, что процедура аппликации не влияла на картину разряда КП.

NS309 вызывал постепенное снижение частоты простых спайков в разряде КП. Через 15 мин после аппликации выявлены значимые отличия в частоте от контроля в соответствующей временной точке ( $p < 0.05$ ,  $n = 10$ , ANOVA, пост-тест Бонферрони), которые сохранялись до конца периода регистрации. Наименьшее значение частота простых спайков достигала через 60 мин от начала аппликации и была в среднем на 29% ниже контрольного значения в это же время (рис. 2Б).

При действии СуРРА статистически значимое снижение частоты простых спайков в разряде КП ( $p < 0.001$ ,  $n = 11$ , ANOVA, пост-тест Бонферрони) наступало через 30 мин после начала регистрации, т.е. позднее, чем в случае NS309, а максимальное снижение в конце регистрации составило в среднем 21% (рис. 2Б).

### Влияние положительных модуляторов SK-каналов на частоту простых спайков КП у взрослых крыс

На рис. 2В показаны примеры характерной активности КП взрослых животных в контроле и при действии NS309, а также в контроле и при действии СуРРА. В этой возрастной группе при аппликации физиологического раствора наблюдалась тенденция некоторого повышения частоты простых спайков, однако эти изменения не были статистически значимыми ( $p > 0.10$ ,  $n = 8$ , ANOVA).

У взрослых животных снижение частоты простых спайков в разряде КП достигалось через 45 мин после начала аппликации NS309 ( $p < 0.001$ ,  $n = 9$ , ANOVA, пост-тест Бонферрони), т.е. позднее, чем у старых. Максимальное снижение, в среднем на 33%, происходило к концу 60 мин регистрации (рис. 2Г).

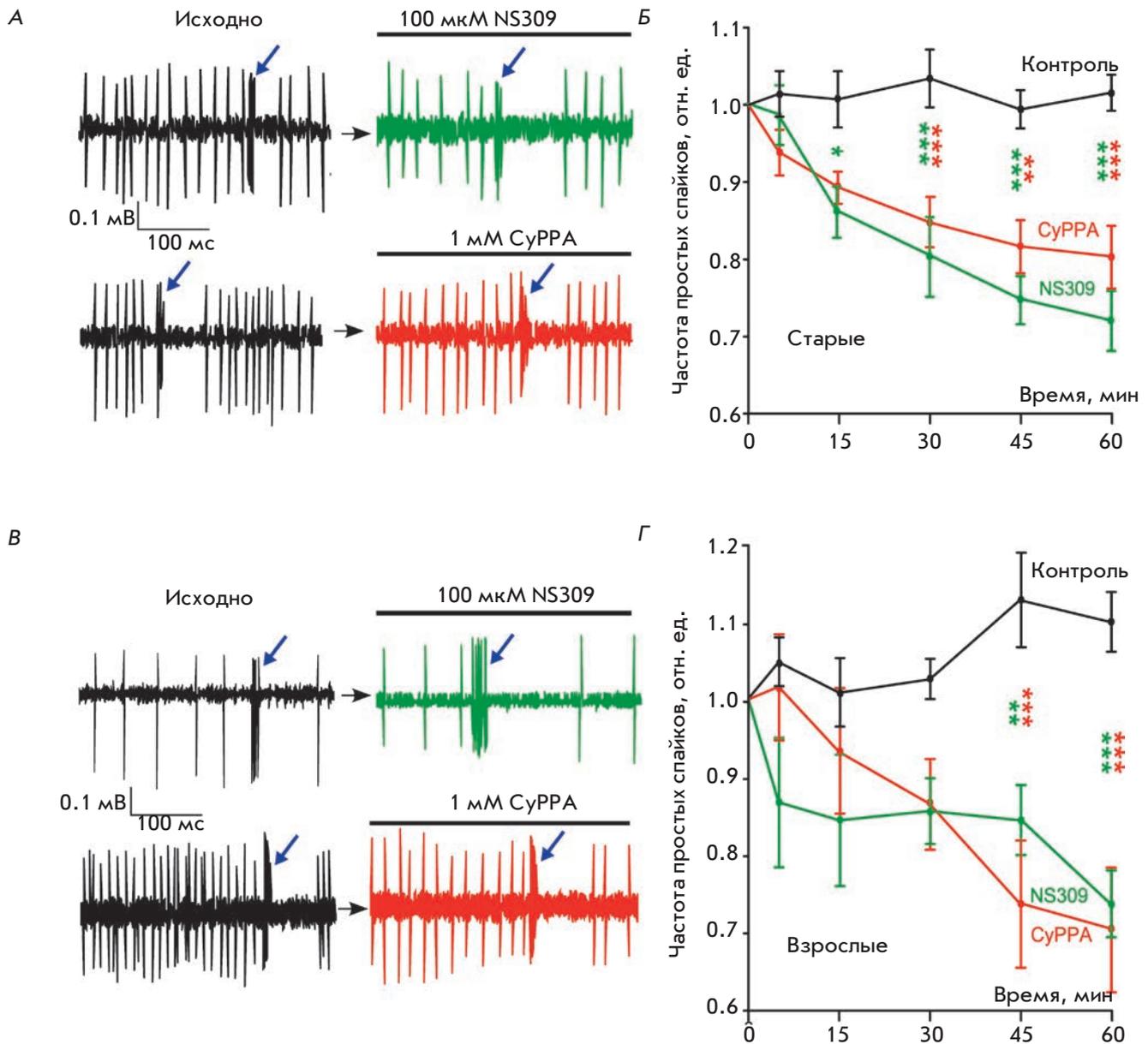
При аппликации СуРРА, как и NS309, статистически значимое снижение частоты простых спайков в разряде КП достигалось через 45 мин после начала ( $p < 0.001$ ,  $n = 8$ , ANOVA, пост-тест Бонферрони). Максимальным снижением было через 60 мин (в среднем на 36%) (рис. 2Г).

Несмотря на то что значимое уменьшение частоты простых спайков при действии обоих положительных модуляторов SK-каналов по сравнению с контролем у старых крыс достигалось раньше, максимальный эффект СуРРА ( $n = 11$ ) и NS309 ( $n = 10$ ) не различался у животных разных возрастов. Кроме того, не удалось выявить статистически значимых отличий эффектов СуРРА и NS309 у старых и взрослых крыс ( $p > 0.8$ , ANOVA).

### Электрическая активность нейронов мозжечка в культуре при действии модуляторов SK-каналов

Клетки мозжечка в первичной культуре на 7 день культивирования образовывали нейронную сеть, в которой иммуногистохимическое окрашивание на кальбиндин-D28k подтвердило присутствие клеток Пуркинье, выделяющихся крупными размерами сомы (рис. 3). При электрофизиологическом исследовании часть «крупных» нейронов характеризовалась спонтанной периодической генерацией потенциала действия (ПД), типичной для клеток Пуркинье.

Из экспериментов *in vivo* невозможно однозначно заключить, действуют ли исследуемые модуляторы непосредственно на КП, или их эффект опосредован сетевыми взаимодействиями через влияние на вставочные нейроны. С целью проверки предположения о непосредственном действии СуРРА и NS309 на нейроны мозжечка изучили их влияние на генерацию спайков нейронами в первичной культуре, используя локальную перфузию. В нейронах со спонтанной генерацией ПД (рис. 4А) аппликация 10 мкМ



**Рис. 2.** Активность клеток Пуркинье мозжечка крыс под влиянием положительных модуляторов кальций-активируемых калиевых каналов. **А** – старые крысы. Фрагменты записи активности отдельных КП до и после аппликации NS309 или CyPPA. Стрелками обозначены эпизоды появления сложных спайков. **Б** – старые крысы. Изменение средней частоты простых спайков КП мозжечка в течение 1 ч после аппликации физиологического раствора или активаторов SK-каналов. **В** – взрослые крысы. Фрагменты записи активности отдельных КП до и после аппликации NS309 или CyPPA. **Г** – взрослые крысы. Изменение средней частоты простых спайков КП мозжечка в течение 1 ч после аппликации физиологического раствора или активаторов SK-каналов. Зелеными звездочками показано статистически значимое отличие от контрольных значений частоты в соответствующие моменты времени при аппликации NS309, красными – CyPPA (ANOVA, пост-тест Бонферрони \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , \*\*\* –  $p < 0.001$ )

CyPPA вызывала кратковременную деполяризацию с последующей гиперполяризацией, сопровождающейся затуханием спонтанной генерации ПД ( $n = 5$ ). На нейронах, не обладающих спонтанной активностью, генерация спайков, вызываемая инъекцией

тока пороговой амплитуды, эффективно подавлялась аппликацией как 100 мкМ CyPPA, так и 10 мкМ NS309 ( $n = 18$ , рис. 4Б). Оба вещества вызывали гиперполяризацию, но эффект NS309 был более выражен. Сравнение формы ПД спонтанно активных

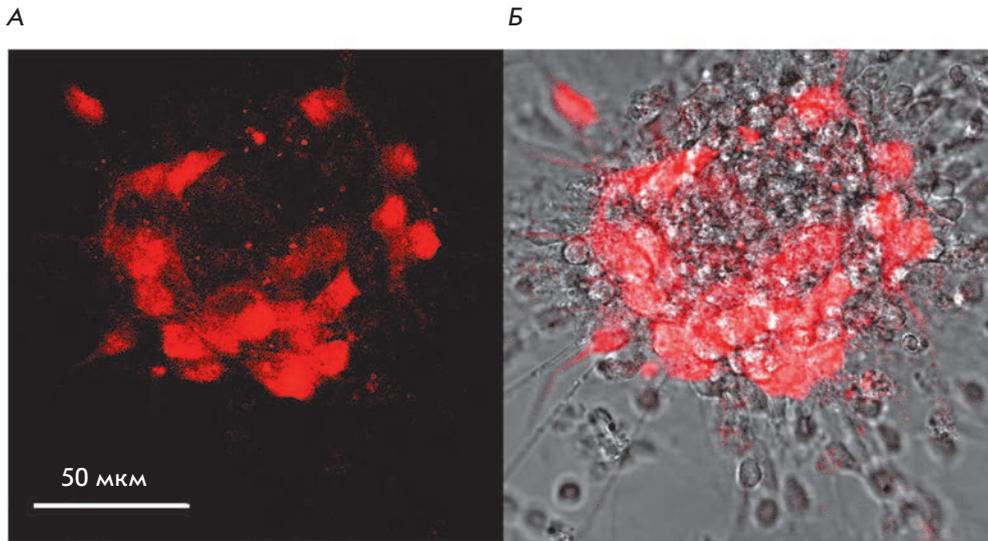


Рис. 3. Клетки Пуркинье в первичной культуре нейронов мозжечка крыс DIV 7. А – флуоресцентное изображение иммунопозитивной реакции на белок кальбиндин, экспрессирующийся только в клетках Пуркинье. Б – результат совмещения изображения в проходящем свете и флуоресценции белка кальбиндин-D28k, полученной с помощью иммунного маркирования соответствующего белка антителами, конъюгированными с флуорохромом Alexa 633

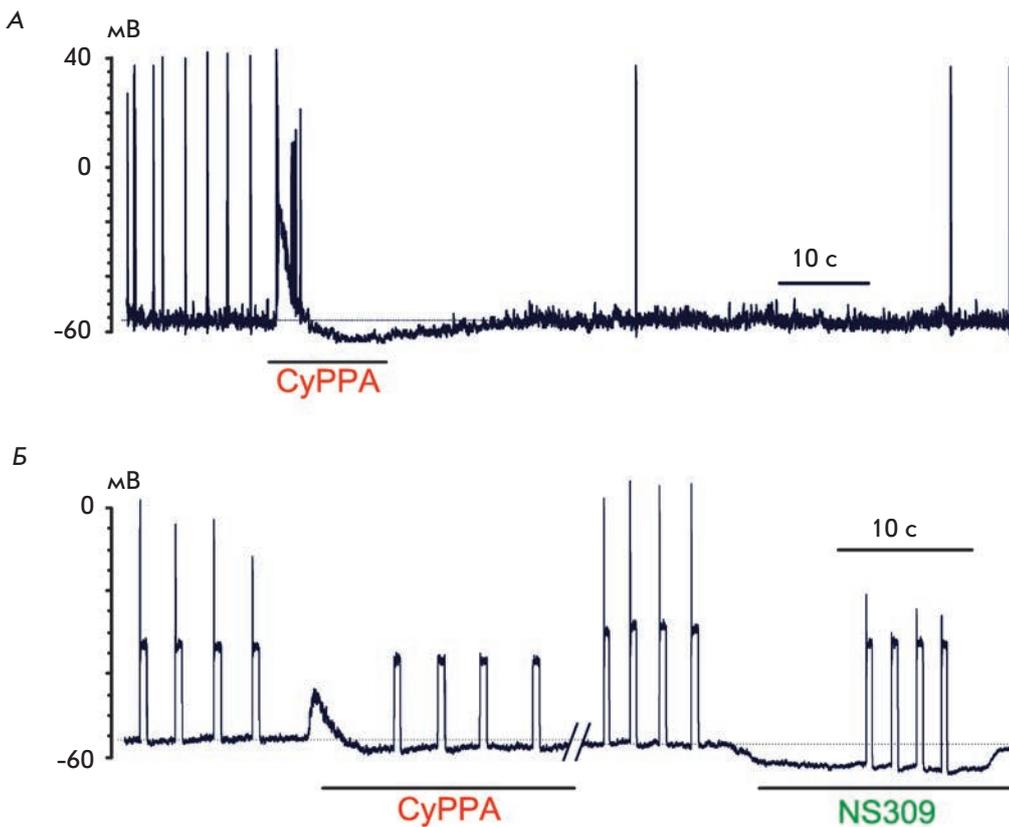
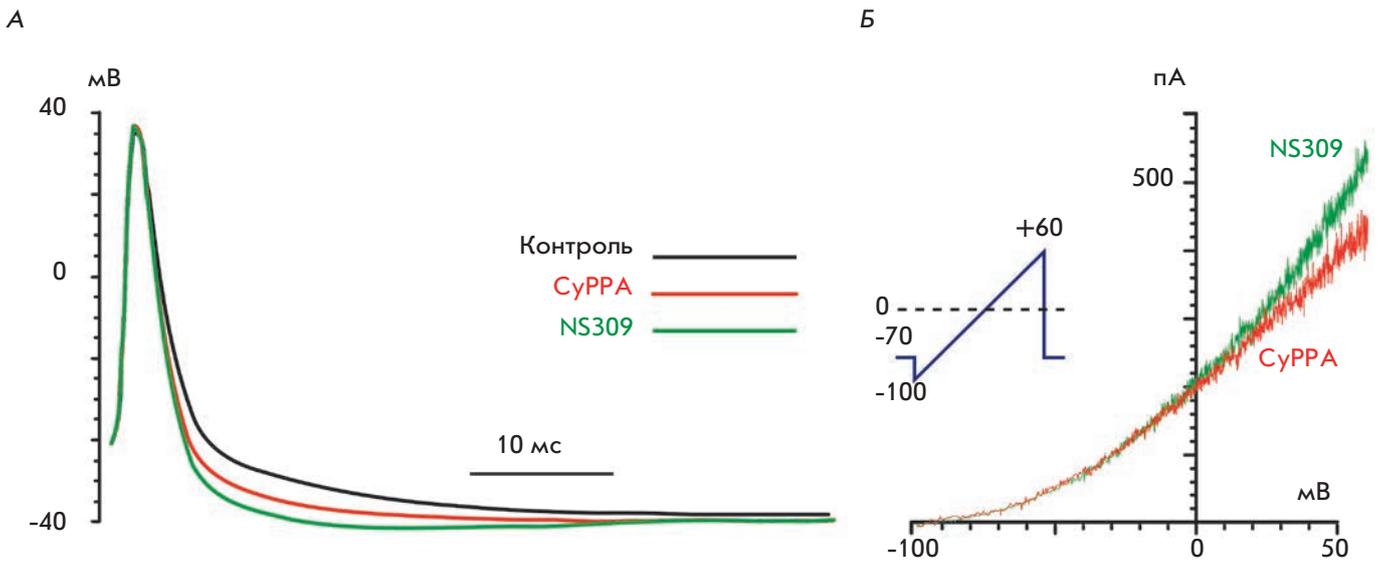


Рис. 4. Примеры влияния CyPPA и NS309 на спонтанную генерацию (А) и вызванные деполяризующим стимулом (Б) потенциалы действия в нейронах мозжечка. Внутриклеточная регистрация мембранного потенциала при фиксации тока нейрона. Потенциалы действия вызывали инъекцией тока (1.1 пороговой величины) через регистрирующий электрод

нейронов до и после аппликации активаторов калиевых каналов показало, что оба вещества усиливают следовую гиперполяризацию ПД (рис. 5А). Подобная феноменология типична для активации SK-каналов. При этом следовая гиперполяризация в точке минимума усиливалась на  $3.1 \pm 0.3$  мВ при действии CyPPA и на  $6.1 \pm 0.3$  мВ при действии NS309. Эффект NS309 был значимо больше, чем у CyPPA ( $n = 140$ ;

$p < 0.01$ , непарный  $t$ -критерий Стьюдента). Вольт-амперные характеристики каналов, активируемых CyPPA и NS309, представленные на рис. 5Б, также типичны для SK-каналов [20].

Таким образом, CyPPA и NS309 сходным образом подавляют генерацию ПД клетками Пуркинье как *in vivo*, при аппликации на поверхность мозжечка, так и *in vitro*, в первичной культуре нейронов.



**Рис. 5.** Влияние CyPPA и NS309 на следовую гиперполяризацию в нейронах мозжечка. А – усредненные потенциалы действия в контроле и в присутствии 100 мкМ CyPPA или 10 мкМ NS309 (для каждого из условий усреднено не менее 140 ПД), зарегистрированные при фиксации тока нейрона. Б – вольт-амперные характеристики каналов, активируемых CyPPA и NS309 в нейронах мозжечка, зарегистрированные при фиксации потенциала нейрона. Вставка иллюстрирует протокол «рампа», использованный для измерения вольт-амперных характеристик SK-каналов

### ОБСУЖДЕНИЕ

Существуют данные, указывающие на то, что NS309 и CyPPA, положительные модуляторы SK-каналов, изменяют паттерн активности нейронов. В опытах, выполненных на срезах мозжечка, показано снижение частоты разряда КП после подачи NS309 в ванночку с омывающим раствором [3]. Сходные результаты получены в опытах *in vivo*, которые показали, что применение NS309 и CyPPA вызывает снижение частоты разряда дофаминергических нейронов черной субстанции [21, 22]. В наших экспериментах, проведенных *in vitro* на первичной культуре нейронов мозжечка, CyPPA и NS309 также эффективно подавляли генерацию спонтанных и вызванных спайков (рис. 4А,Б) за счет усиления следовой гиперполяризации (рис. 5А), вызываемой активацией SK-каналов (рис. 5Б) непосредственно на исследованных нейронах. CyPPA является селективным активатором SK2- и SK3-каналов, при этом в позднем пренатальном и постнатальном периоде в коре мозжечка лишь клетки Пуркинью характеризуются высокой экспрессией SK2 [8], что делает именно эти клетки основной мишенью действия активаторов SK-каналов. В силу анатомической структуры мозжечка активаторы SK-каналов при аппликации на поверхность, в первую очередь, проникают в молекулярный слой, где могут взаимодействовать с дендритным деревом КП и, по мере диффузии, с соматами КП (рис. 6А). Роли

дендритных и соматических SK-каналов различны. У молодых крыс (10–90 дней) блок соматических SK-каналов увеличивает частоту авторитмической активности КП, в то время как блок дендритных SK-каналов не только увеличивает частоту простых спайков, но и снижает ток утечки и улучшает передачу в синаптических входах на КП [9]. При этом блок SK-каналов только дендритов имел существенно меньший эффект, чем блок SK-каналов дендритов и сомы [9]. Вероятно, в наших экспериментах постепенная диффузия NS309 или CyPPA со стороны дендритов КП в сторону сомы определяет плавное усиление эффекта этих активаторов SK-каналов со временем. В проведенных нами экспериментах *in vivo* активация SK-каналов с помощью положительных модуляторов CyPPA и NS309 приводила к изменению паттерна активности КП. В группе как взрослых, так и старых крыс частота простых спайков была статистически значимо снижена по сравнению с контрольной серией. Несмотря на то что снижение частоты простых спайков, вызванное модуляторами SK-каналов, было практически одинаковым в группах взрослых и старых крыс, снижение частоты простых спайков у старых крыс в сопоставлении с контролем наступало раньше – через 30 мин после аппликации CyPPA и через 15 мин после аппликации NS309. У взрослых крыс снижение частоты простых спайков под влиянием обоих веществ наблюдалось через 45 мин.

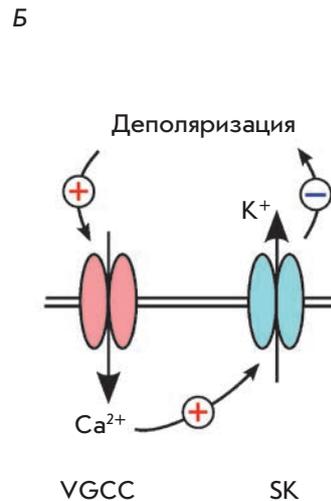
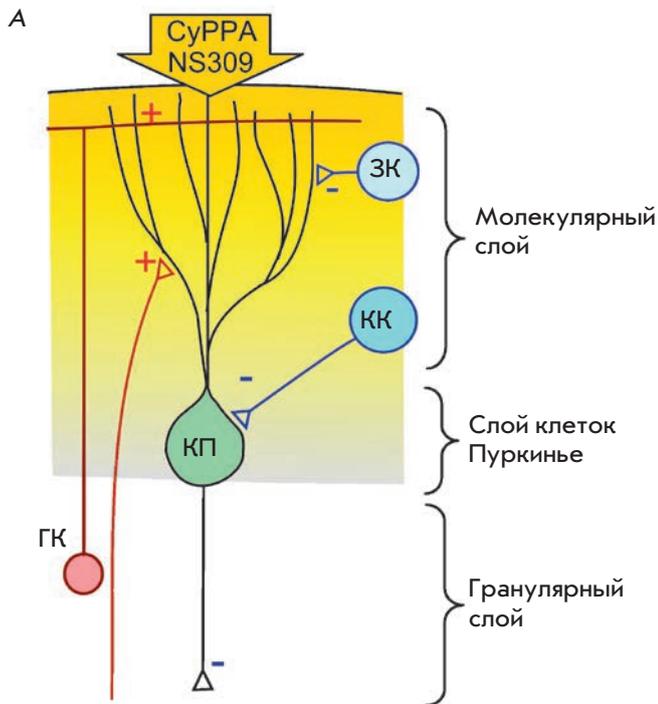


Рис. 6. Схема воздействия модуляторов SK-каналов на клетки Пуркинье (КП) при аппликации на поверхность мозжечка. А – упрощенная схема нервных связей КП в коре мозжечка. (+) – возбуждающие и (-) – тормозные синаптические связи, КП – клетка Пуркинье, ЗК – звездчатая клетка, КК – корзинчатая клетка, ГК – гранулярная клетка. Б – взаимоотношения ключевых ионных каналов КП, регулирующих их авторитмическую активность

CyPPA и NS309 в насыщающих концентрациях многократно увеличивают чувствительность SK-каналов к внутриклеточному кальцию, в результате чего максимальная активация этих каналов реализуется при любой физиологической концентрации внутриклеточного кальция [23]. В наших экспериментах активаторы SK-каналов достигали насыщающих концентраций вблизи КП постепенно по мере диффузии, поэтому скорость наступления эффекта могла зависеть от возрастных особенностей динамики внутриклеточного кальция. Активация SK-каналов в КП определяется входом кальция через потенциал-зависимые кальциевые каналы (VGCC) (рис. 6Б). У старых животных наблюдается снижение экспрессии Cav2.1 (VGCC P/Q-типа) и почти полное исчезновение Cav1.3 (VGCC L-типа) в молекулярном слое мозжечка [24]. Cav1.3 активируются при самых низких значениях мембранного потенциала, т.е. наиболее чувствительны к деполяризации [25]. Дефицит же Cav2.1 может приводить к атакии 2-го типа [26–28], поскольку в КП большая доля кальция, поступающего через VGCC, приходится на Cav2.1 [29]. В условиях возрастной потери части VGCC и связанного с ними кальциевого сигнала может страдать нормальная активация SK-каналов. Кроме того, осцилляции примембранного внутриклеточного кальция модулируют активность и других типов рецепторов, в частности десенситизацию рецепторов глутамата, обеспечивающих глутаматергическую синаптическую передачу [30].

В работе, выполненной *in vivo* на взрослых мышках, показано, что частота простых спайков в разряде КП при аппликации NS309 снижается гораздо сильнее, чем при аппликации CyPPA [13]. Результаты, представленные в данной работе, показывают сходное снижение частоты простых спайков под влиянием позитивных модуляторов SK-каналов, NS309 и CyPPA, у взрослых крыс. В группе старых животных наблюдалась тенденция к более выраженному снижению частоты простых спайков под влиянием NS309, чем CyPPA. При этом снижение частоты простых спайков после аппликации CyPPA было сопоставимым с ранее полученными данными на мышках, а NS309 оказывал более сильное влияние на активность КП мозжечка мышей, чем крыс. Известно, что CyPPA – избирательный модулятор SK-каналов, в то время как NS309 является также активатором IK-каналов [31], экспрессированных в дендритах КП, где они модулируют временную суммацию синаптических входов [32]. Так, в наших экспериментах *in vitro* NS309 усиливал следовую гиперполяризацию КП сильнее, чем CyPPA. Вероятно, поэтому снижение частоты простых спайков в КП при действии NS309 более выражено, чем при действии CyPPA, активирующего только SK2-каналы в КП. Различие в эффективности влияния NS309 на частоту простых спайков в разряде КП мозжечка мышей и крыс, возможно, обусловлено видовыми отличиями в экспрессии и функционировании IK-каналов в мозжечке или особенностями диффузионных барьеров при ис-

пользуемом способе аппликации веществ у этих животных.

Применение положительных модуляторов SK-каналов на животных, служащих моделями некоторых видов спинальных атаксий, приводит к восстановлению нарушенного паттерна активности КП, а в некоторых случаях и к исчезновению симптомов атаксии [4, 5, 8, 9], что предполагает наличие у них терапевтического эффекта. Кроме того, применение активаторов SK-каналов позволяет компенсировать возрастные изменения авторитмических функций КП мозжечка. Причины возрастных отли-

чий в эффектах активаторов SK-каналов требуют дальнейшего изучения, поскольку могут быть связаны с дефицитом функций потенциал-чувствительных кальциевых каналов КП. ●

*Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 15-04-08283 и 16-04-00653 (эксперименты in vivo) и Российского научного фонда № 16-15-10192 (дополнительные эксперименты с использованием методов patch-clamp и иммуноцитохимии). Иммуноцитохимические исследования выполнены на базе ЦКП ИЭФБ РАН.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ito M. // Brain Res. 2000. V. 886. № 1–2. P. 237–245.
- Hansen S.T., Meera P., Otis T.S., Pulst S.M. // Hum. Mol. Genet. 2013. V. 22. № 2. P. 271–283.
- Kasumu A.W., Hougaard C., Rode F., Jacobsen T.A., Sabatier J.M., Eriksen B.L., Strøbæk D., Liang X., Egorova P., Vorontsova D., et al. // Chem. Biol. 2012. V. 19. № 10. P. 1340–1353.
- Shakkottai V.G., do Carmo Costa M., Dell’Orco J.M., Sankaranarayanan A., Wulff H., Paulson H.L. // J. Neurosci. 2011. V. 31. № 36. P. 13002–13014.
- Walter J.T., Alvina K., Womack M.D., Chevez C., Khodakhah K. // Nat. Neurosci. 2006. V. 9. № 3. P. 389–397.
- Faber E.S., Sah P. // Neuroscientist. 2003. V. 9. № 3. P. 181–194.
- Adelman J.P., Maylie J., Sah P. // Ann. Rev. Physiol. 2012. № 74. P. 245–269.
- Gymnopoulos M., Cingolani L.A., Pedarzani P., Stocker M. // J. Comp. Neurol. 2014. V. 522. № 5. P. 1072–1101.
- Womack M.D., Khodakhah K. // J. Neurosci. 2003. V. 23. № 7. P. 2600–2607.
- Карелина Т.В., Григорьян Р.А. // Журн. эвол. биохим. физиол. 2010. Т. 46. № 3. С. 218–224.
- Карелина Т.В. Возрастные особенности синаптической активации клеток Пуркинье мозжечка системой лазающих и мшистых волокон. Автореф. дис. СПб.: ИЭФБ РАН, 2010.
- Kasumu A.W., Liang X., Egorova P., Vorontsova D., Bezprozvanny I. // J. Neurosci. 2012. V. 32. № 37. P. 12786–12796.
- Егорова П.А., Карелина Т.В., Власова О.Л., Антонов С.М., Безprozvanny И.Б. // Журн. эвол. биохим. физиол. 2014. Т. 50. № 2. С. 102–108.
- Gao Z., Todorov B., Barrett C.F., van Dorp S., Ferrari M.D., van den Maagdenberg A.M., De Zeeuw C.I., Hoebeek F.E. // J. Neurosci. 2012. V. 32. № 44. P. 15533–15546.
- Abushik P.A., Sibarov D.A., Eaton M.J., Skatchkov S.N., Antonov S.M. // Cell Calcium. 2013. V. 54. № 2. P. 95–104.
- Weber A., Schachner M. // Brain Res. 1984. V. 311. P. 119–130.
- Hirano T., Ohmori H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 1945–1949.
- Hockberger P.E., Tseng H.Y., Connor J.A. // J. Neurosci. 1989. V. 9. № 7. P. 2258–2271.
- Bartschat S., Fieguth A., Könemann J., Schmidt A., Bode-Jänisch S. // Forensic Sci. Int. 2012. V. 223. № 1–3. P. 165–170.
- Nie L., Song H., Chen M.F., Chiamvimonvat N., Beisel K.W., Yamoah E.N., Vázquez A.E. // J. Neurophysiol. 2004. V. 91. P. 1536–1544.
- Herrick K.F., Christophersen P., Shepard P.D. // J. Neurophysiol. 2010. V. 104. № 3. P. 1726–1735.
- Herrick K.F., Redrobe J.P., Holst D., Hougaard C., Sandager-Nielsen K., Nielsen A.N., Ji H., Holst N.M., Rasmussen H.B., Nielsen E.O., et al. // Front. Pharmacol. 2012. № 3. P. 11.
- Hougaard C., Eriksen B.L., Jorgensen S., Johansen T.H., Dyhring T., Madsen L.S., Strobaek D., Christophersen P. // Br. J. Pharmacol. 2007. V. 151. P. 655–665.
- Chung Y.H., Shin C.M., Kim M.J., Shin D.H., Yoo Y.B., Cha C.I. // Brain Res. 2001. V. 903. № 1–2. P. 247–252.
- Tuckwell H.C. // Progr. Neurobiol. 2012. V. 96. № 1. P. 1–31.
- Ophoff R.A., Terwindt G.M., Vergouwe M.N., van Eijk R., Oefner P.J., Hoffman S.M., Lamerdin J.E., Mohrenweiser H.W., Bulman D.E., Ferrari M., et al. // Cell. 1996. V. 87. P. 543–552.
- Rose S.J., Kriener L.H., Heinzer A.K., Fan X., Raikie R.S., van den Maagdenberg A.M.J.M., Hess E.J. // Exp. Neurol. 2014. V. 261. P. 553–562.
- Salvi J., Bertaso F., Mausset-Bonnefont A.L., Metz A., Lemmers C., Anjo F., Fagni L., Lory P., Mezghrani A. // Neurobiol. Dis. 2014. V. 68. P. 47–56.
- Ovsepian S.V., Friel D.D. // Eur. J. Neurosci. 2008. V. 27. № 1. P. 93–103.
- Sibarov D.A., Abushik P.A., Poguzhelskaya E.E., Bolshakov K.V., Antonov S.M. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2015. V. 355. P. 484–495.
- Strobaek D., Teuber L., Jorgensen T.D., Ahring P.K., Kjaer K., Hansen R.S., Olesen S.P., Christophersen P., Skaaning-Jensen B. // Biochim. Biophys. Acta. 2004. V. 1665. P. 1–5.
- Engbers J.D., Anderson D., Asmara H., Rehak R., Me-haffey W.H., Hameed S., McKay B.E., Kruskic M., Zamponi G.W., Turner R.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 2601–2606.