

АКТИВНОСТЬ ПЕРВИЧНЫХ АФФЕРЕНТНЫХ НЕЙРОНОВ ТОНКОЙ КИШКИ ПРИ ДЕЙСТВИИ ГИСТАМИНА МОДУЛИРУЕТСЯ ДЕФЕНСИНОМ HNP-1

© 2009 г. Ю. А. Толкунов^{1, 2}, Д. А. Сибаров^{1, 2}, Д. С. Фролов

¹ Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034 Санкт-Петербург,
наб. Макарова, 6

² Санкт-Петербургский государственный университет, 199034 Санкт-Петербург,
Университетская наб., 7/9, E-mail: dima@ds1663.spb.edu

Поступила в редакцию 28.07.2008 г.

Цель данной работы – изучение активности первичных афферентных нейронов тонкой кишки при действии гистамина, модулируемой природным антибиотиком животного происхождения дефенсином HNP-1. Показано, что в ответ на аппликации гистамина (1×10^{-10} моль/л) первичные афферентные нейроны генерируют потенциалы действия (ПД) с длительным генераторным потенциалом и следовой гиперполяризацией. Дефенсин HNP-1 (1×10^{-12} моль/л) и нифедипин (1 мкмоль/л) при внеклеточной аппликации обратимо подавляют генераторный потенциал и быструю фазу следовой гиперполяризации. Эти же вещества не оказывают влияния на медленную фазу следовой гиперполяризации. Внутриклеточная аппликация дефенсина HNP-1 также подавляет генераторный потенциал и быструю фазу следовой гиперполяризации. Предполагается, что внутриклеточное действие дефенсина HNP-1 связано с ингибированием протеинкиназы-С.

Ключевые слова: первичный афферентный нейрон, тонкая кишка, дефенсин, HNP-1, гистамин, протеинкиназа-С.

ВВЕДЕНИЕ

Существуют, как минимум, два класса медиаторов, взаимодействие которых с чувствительными окончаниями первичных афферентных нейронов тонкой кишки вызывает развитие потенциалов действия (ПД). Эти вещества отличаются по активируемому ими внутриклеточным посредникам. Первый класс медиаторов, включающий холецистокинин, гистамин, интерлейкин-1 β , бомбезин, VIP и др., активирует аденилатциклазу и протеинкиназу-А, второй класс медиаторов – серотонин, тахикинины, ацетилхолин и др. – фосфолипазу-С, протеинкиназу-С и IP3-путь освобождения ионов Ca²⁺ из внутриклеточных депо (Furness et al., 2004).

Одним из современных направлений экспериментальных исследований является изучение дефенсинов – природных антибиотиков животного происхождения, представляющих собой группу лизосомных катионных белков небольшой молекулярной массы. Дефенсины содержатся в гранулах фагоцитирующих клеток миелоидного ряда (Кокряков, 1999). Впервые они были описаны в гранулах нейтрофилов. Основное функциональное значение этих пептидов состоит в обеспечении защиты организма от патогенных начал. В тонкой кишке млекопитающих основным источ-

ником дефенсинов являются клетки Панета (Ayabe et al., 2000), расположенные в основании крипты слизистой оболочки. Отличительной особенностью этих клеток является наличие апикальных секреторных гранул. Клетки Панета имеют более длительный, чем у энтероцитов, срок жизни, достигающий 20 дней. Дефенсины секретируются из клеток Панета в полость кишки (Ayabe et al., 2000; Ouelette, 1999) или, в случае нейтрофильных дефенсинов, доставляются к нейронам посредством кровотока (Кокряков, 1999).

В соме первичных афферентных нейронов тонкой кишки ПД характеризуется большой амплитудой (около 80–90 мВ). В его развитии участвуют два типа ионных токов: тетродотоксин-чувствительный Na⁺-ток и тетродотоксин-нечувствительный Ca²⁺-ток. Известно также, что в присутствии блокатора кальциевых ионных каналов никардипина или нифедипина не наблюдается максимальной амплитуды ПД (Furness et al., 2004).

Важную роль в характере возбудимости первичных афферентных нейронов в стенке тонкой кишки играет следовая гиперполяризация, достигающая нескольких сотен мс. При помощи замещения ионов удалось установить, что в основе следовой гиперполяризации лежит Ca²⁺-зависимый K⁺-ток. Было показано, что активизация K⁺-ионных каналов обусловлена Ca²⁺-зависимым

выходом Ca^{2+} из внутриклеточных депо (Budde et al., 2002). Завершение следовой гиперполяризации связано с удалением Ca^{2+} митохондриями, поскольку блокирование митохондриального поглощения Ca^{2+} или митохондриальных дыхательных энзимов ее существенно продлевает (Furness et al., 2004).

Интересно также, что в первичных внутренних афферентных нейронах тонкой кишки длительная (>4 мин) стимуляция синаптических входов приводит к долговременному увеличению их возбудимости, связанному с небольшим сдвигом базового мембранного потенциала в сторону деполяризации (Clerc et al., 1999). Возрастание возбудимости эффективно подавляется различными ингибиторами протеинкиназы-С, в то время как ингибиторы протеинкиназы-А такого влияния не оказывают (Nguyen, 2004).

Стимуляторы протеинкиназы-С, напротив, вызывают деполяризационный сдвиг мембранного потенциала и увеличение возбудимости первичных афферентных нейронов (Nguyen et al., 2004; 2005). Эти исследования подтверждают важность роли протеинкиназы-С в регулировании мембранных процессов в первичных афферентных нейронах. Присутствие дефенсина NP-1 в стенке кишки и вероятность его проникновения внутрь клетки, сопровождающееся подавлением активности протеинкиназы-С, позволяет предположить, что дефенсин NP-1 может регулировать возбудимость первичных афферентных нейронов.

Функциональные свойства дефенсина NP-1, по-видимому, реализуются двумя независимыми путями. Во-первых, известно, что дефенсин NP-1 может встраиваться в мембрану бактерий и формировать потенциал-зависимые ионные каналы (Kagan et al., 1990). При этом остается неясным механизм, позволяющий дефенсину отличать собственные клетки организма от бактерий. Вероятно, NP-1 формирует поры в мембранах, содержащих преимущественно отрицательно заряженные фосфолипиды (Fujii et al., 1993; Hristova et al., 1996; Hristova et al., 1997). Во-вторых, дефенсин NP-1 может функционировать как ингибитор метаболизма бактерий. Проникая в цитоплазму клеток, он обратимо снижает синтез ДНК, РНК и белка. Кроме того, NP-1 подавляет деление опухолевых клеток, а также препятствует размножению вируса в инфицированной клетке. Эти эффекты дефенсина скорее всего связаны с тем, что он является одним из сильнейших ингибиторов протеинкиназы-С (Sharp et al., 1988; Nassar et al., 2002; Salvatore, 2007), хотя возможно и прямое взаимодействие с вирусной капсулой (Smith, Nemerow, 2008). Проникновение NP-1 внутрь клетки происходит, вероятно, путем его связывания с рецептором липопротеинов низкой плотности и последующим транспортом внутрь клетки. Этот

процесс приводит к подавлению сокращения гладкомышечных клеток (Nassar et al., 2002).

Исследование эффектов дефенсина NP-1 в различных физиологических системах позволит обосновать необходимость дальнейшего изучения дефенсинов как модуляторов возбудимости различных клеток. Особенно это касается провоспалительных медиаторов, и прежде всего, гистамина, выделяемого из тучных клеток под влиянием токсинов.

Цель работы – изучение активности первичных афферентных нейронов тонкой кишки при действии гистамина, модулируемой природным антибиотиком животного происхождения дефенсином HNP-1.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Опыты проведены на препаратах начального отдела тонкой кишки морской свинки при помощи специально разработанной методики (Толкунов, 2004). Все эксперименты осуществлялись в соответствии с рекомендациями FELASA (категория С) по работе с лабораторными животными. Для внутриклеточной регистрации мембранного потенциала нервных клеток применяли стеклянные микроэлектроды с диаметром кончика менее 1 мкм. Соединение микроэлектрода, заполненного 2.5 моль/л раствором KCl, с входным каскадом операционного усилителя на микросхеме K544УД1А (входное сопротивление 10 ГОм) было обычным, с применением неполяризующихся хлор-серебряных электродов. Регистрацию электрических сигналов в реальном режиме времени проводили на компьютере при помощи аналого-цифрового преобразователя L-791 (фирма "L-Card", Москва) и разработанной нами программы Bioactivity Recorder v5.3.

Наружную поверхность кишки перфузировали аэрированным физиологическим раствором для теплокровных животных следующего состава (ммоль/л): NaCl – 136.7; KCl – 5.6; NaHCO_3 – 1.78; NaH_2PO_4 – 1.0; MgSO_4 – 1.2; глюкоза – 11.1, CaCl_2 – 1.2 (Amresco). Температура обычного перфузионного раствора составляла $+37^\circ\text{C}$, pH 7.2–7.4. С целью удаления существующих в органе собственных дефенсинов все опыты проводили на препаратах тонкой кишки в условиях перфузии ее поверхности физиологическим раствором.

В работе использован синтетический дефенсин HNP-1 человека (Sigma) в концентрациях 1×10^{-12} – 1×10^{-10} моль/л, гистамин дигидрохлорид (Sigma) в концентрациях 5×10^{-12} – 1×10^{-9} моль/л, блокатор Ca^{2+} -ионных каналов – нифедипин (1 мкмоль/л, Stojnic et al, 2007) (Sigma), которые разводили в физиологическом растворе. В части опытов дефенсин HNP-1 добавляли в раствор KCl (1 моль/л) при pH 7.0 из расчета, что его концен-

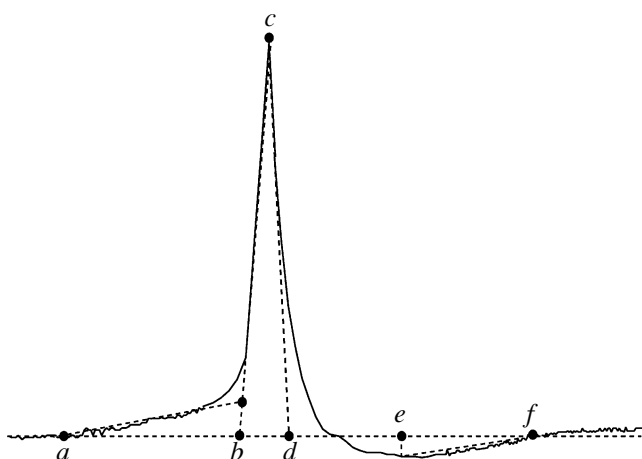


Рис. 1. Измерение параметров ПД методом сегментации его фаз линиями регрессии: *ab* – генераторный потенциал, *bd* – спайк, *df* – следовая гиперполяризация (быстрая компонента), *ab*, *bc*, *cd* и *ef* – линии регрессии для соответствующих сегментов ПД.

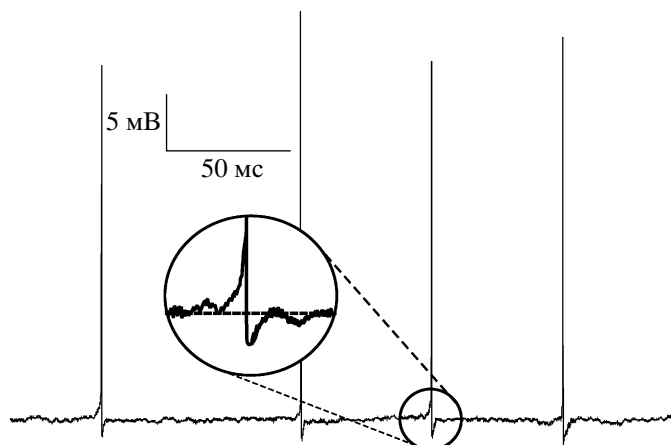


Рис. 2. Импульсная активность первичных афферентных нейронов межмышечных ганглиев тонкой кишки при действии гистамина (1×10^{-10} моль/л). Выделенный фрагмент показывает генераторный потенциал и быструю фазу следовой гиперполяризации.

трация внутри канала микроэлектрода для внутриклеточной регистрации была бы равна 1×10^{-12} моль/л. Для фармакологического анализа действия гистамина применяли блокатор H1-гистаминовых рецепторов димедрол (1×10^{-8} моль/л) и блокатор H2-гистаминовых рецепторов ранитидин (1×10^{-8} моль/л).

Измерение параметров ПД выполняли в программе Bioactivity Recorder при помощи специального алгоритма (рис. 1). Проводили разбиение ПД на фрагменты: *ab* – генераторный потенциал, *bd* – спайк, *df* – следовая гиперполяризация (быстрая компонента); *ab*, *bc*, *cd* и *ef* – линии регрессии для соответствующих сегментов ПД. Точка *a* (начала генераторного потенциала) и точка *f* (окончания следовой гиперполяризации) определялись как пересечения линий регрессии *ab* и *ef* с базовой линией (средний мембранный потенциал). Статистическую обработку результатов с использованием критериев достоверности Стьюдента проводили при помощи компьютерной программы NCSS.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При действии гистамина в первичных афферентных нейронах развивались характерные длительные ПД с продолжительными генераторным потенциалом и следовой гиперполяризацией. Пороговые концентрации гистамина, вызывающие ПД, находились в диапазоне от 1×10^{-9} – 1×10^{-12} моль/л, что может свидетельствовать об их высокой чувствительности к действию гистамина. ПД в первичных афферентных нейронах возникали при применении гистамина каудальнее тела ней-

рона, а также при его нанесении непосредственно на сому клетки. Следовательно, рецепторы, чувствительные к действию гистамина, могут располагаться в области дендритов и на соме самого сенсорного нейрона.

Гистамин вызывал развитие ПД сложной формы с выраженным генераторным потенциалом и следовой гиперполяризацией, в которой присутствовали быстрая и медленная составляющие (рис. 2). Длительность генераторного потенциала была равна 7.2 ± 1.2 мс, длительность спайка – 1.2 ± 0.3 мс, длительность быстрой фазы следовой гиперполяризации – 13.7 ± 1 мс ($n = 30$), медленной фазы – десятки миллисекунд. Эти результаты хорошо согласуются с данными других авторов, показавших, что аппликации гистамина на нейроны подслизистого сплетения дистальной части толстой кишки морской свинки вызывают деполяризацию мембраны и развитие ПД. При длительном же применении гистамин приводит к развитию периодических серий ПД (Frieling et al., 1993). Наши исследования показали, что количество ПД в пачках импульсов, развивающихся при непрерывном подведении гистамина, не превышает 7–8 шт. Амплитуда ПД могла достигать 100 мВ и была существенно неодинакова у отдельных ПД в пределах пачки (рис. 2). Эффективными средствами для предотвращения действия гистамина оказались аппликации блокатора H1-гистаминовых рецепторов – димедрола (1×10^{-8} моль/л) и блокатора H2-гистаминовых рецепторов ранитидина (1×10^{-8} моль/л). Это указывает на наличие у нейронов межмышечного сплетения двенадцатиперстной кишки H1 и H2 рецепторов гистамина, которые в равной степени участвуют в его рецепции (Poli et al., 2004).

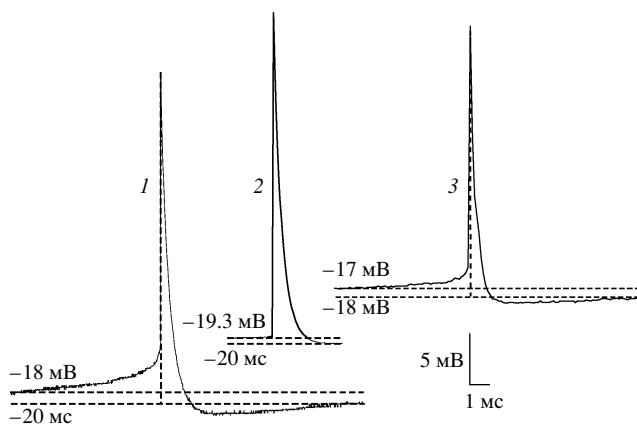


Рис. 3. Влияние дефенсина HNP-1 (1×10^{-12} моль/л) на форму ПД при действии гистамина (1×10^{-11} моль/л): 1 – контроль, имеется фаза быстрой следовой гиперполяризации (ФБСГ, косая штриховка) и генераторный потенциал (ГП, вертикальная штриховка); 2 – после предварительного применения дефенсина ФБСГ и ГП отсутствуют; 3 – после отмывания дефенсина физиологическим раствором в течение 15 мин ФБСГ и ГП восстанавливаются.

Какие же изменения могут возникать в генерации ПД в первичных афферентных нейронах под влиянием дефенсина HNP-1? Наши исследования показали, что нанесение дефенсина HNP-1 в концентрации 1×10^{-12} – 1×10^{-11} моль/л на поверхность препарата за 5 мин приводило к изменению фаз развития ПД в первичных афферентных нейронах при действии гистамина, что выражалось в подавлении генераторного потенциала и быстрой фазы следовой гиперполяризации. Уменьшалась также амплитуда регистрируемых ПД. Вместе с тем, длительность спайка не изменилась и составила 1.2 ± 0.3 мс ($n = 40$, $p < 0.05$).

Отмывание дефенсина физиологическим раствором в течение 15 мин приводило к полному восстановлению исходной формы генераторного потенциала и быстрой фазы следовой гиперполяризации (рис. 3). Применение дефенсина HNP-1 в более высоких концентрациях сопровождалось полным подавлением развития ПД в первичных афферентных нейронах, для восстановления которых необходимо повышение концентрации гистамина на 1–2 порядка. Кроме того, восстановление развития ПД при действии минимальных (1×10^{-11} – 1×10^{-12} моль/л) концентраций гистамина имело место только после длительного (более 15 мин) отмывания препарата кишки физиологическим раствором.

Таким образом, под влиянием дефенсина происходит общее снижение чувствительности первичных афферентных нейронов и модуляция отдельных фаз ПД этих клеток при действии гистамина.

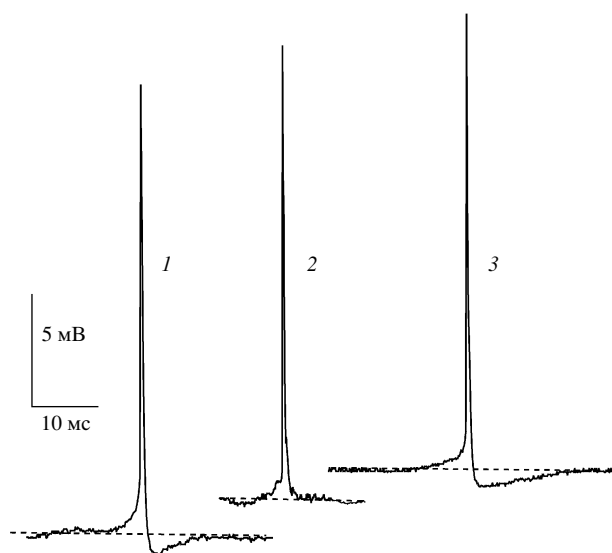


Рис. 4. Влияние нифедипина (1 мкмоль/л) на форму ПД при действии гистамина (1×10^{-11} моль/л): 1 – контроль, имеется фаза быстрой следовой гиперполяризации (ФБСГ, заштрихована); 2 – после предварительного применения нифедипина ФБСГ отсутствует; 3 – после отмывания нифедипина физиологическим раствором в течение 5 мин ФБСГ восстанавливается.

Известно, что основными входящими возбуждающими токами в some первичных афферентных нейронов межмышечного и подслизистого сплетений тонкой кишки являются тетродотоксин (ТТХ)-чувствительный Na^+ -ток и ТТХ-нечувствительный Ca^{2+} -ток. Оказалось, что в присутствии ТТХ Ca^{2+} -ток еще достаточен для развития ПД в some первичного афферентного нейрона. Как было ранее установлено (Vanden Berghe et al., 2000; Furness et al., 2004), амплитуда ПД в первичных афферентных нейронах уменьшается в присутствии блокаторов L-типа кальциевых ионных каналов нифедипина (1 мкмоль/л) или никардипина (3 мкмоль/л). Однако специальных исследований влияния блокаторов кальциевых ионных каналов на развитие отдельных фаз ПД в первичных афферентных нейронах межмышечного сплетения тонкой кишки при действии гистамина не проводилось.

Наши исследования показали, что нифедипин в концентрации 1 мкмоль/л вызывал обратимое подавление генераторного потенциала и фазы быстрой следовой гиперполяризации в ПД, вызываемых применением гистамина (рис. 4). В то же самое время необходимо отметить, что в развитии фазы длительной следовой гиперполяризации существенных изменений не происходило. Отмывание нифедипина физиологическим раствором приводило к восстановлению генераторного потенциала и фазы быстрой следовой гиперполяризации. Следовательно, длительный гене-

ракторный потенциал при действии гистамина обусловлен входящим Ca^{2+} -ионным током, в то время как фаза быстрой следовой гиперполяризации, определяется поступлением ионов Ca^{2+} из внутриклеточных депо в цитоплазму.

Вероятно, влияние дефенсина HNP-1 на первичные афферентные нейроны зависит от содержания его в окружающей среде. При применении низких (1×10^{-12} моль/л) концентраций HNP-1 происходит модуляция отдельных фаз развития ПД в ответ на аппликацию гистамина, а при более высоких концентрациях – резкое снижение чувствительности нейронов к данному медиатору.

Результаты исследований, осуществленных в последние несколько лет разными исследователями, свидетельствуют о том, что нервные клетки, расположенные в ганглиях тонкой кишки, в значительной степени отличаются от нейронов центральной нервной системы. Например, чтобы вызвать развитие медленного возбуждающего (генераторного) потенциала необходимо провести электрическую стимуляцию межганглионарных коннектив при частоте 10–20 Гц в течение 1 с (Furness et al., 2004). Замедление проводимости между нейронами в этом случае происходит, вероятно, потому, что аксоны первичных афферентных нейронов образуют плотные сети варикозных расширений, которые окружают нервные клеточные тела в своих собственных и смежных ганглиях (Furness et al., 1990; 2003; Bornstein et al., 1991) и медиаторы, выделяемые ими, действуют на значительном расстоянии (дистантная иннервация). Поэтому существуют некоторые ограничения в передаче возбуждения от первичных афферентных нейронов к вставочным и двигательным нейронам.

Следует также заметить, что в тонкой кишке морской свинки, все дендриты межмышечных первичных афферентных нейронов проецируются к слизистой оболочке (Song et al., 1998). Как показали специальные исследования, 1 мм длины тонкой кишки морской свинки содержит около 650 первичных афферентных нейронов. Поскольку стимулы, вызывающие рефлексы (люминальные химические вещества, растяжение, деформация поверхности слизистой оболочки), не являются пространственно ограниченными до субмиллиметрового расстояния, можно предположить, что рефлексы обычно вызываются активизацией популяции нескольких сотен первичных афферентных нейронов. Кроме того, многие первичные афферентные нейроны, которые были активизированы непосредственно или опосредованно, должны возбуждаться синаптически (Furness et al., 2004). Известно также, что первичные афферентные нейроны имеют значительные перекрытия своих рецептивных областей. Ретроградная (обратная) трассировка показывает, что

каждая из ворсинок слизистой оболочки кишки снабжена аксонами около 65 первичных афферентных нейронов с клеточными телами в ганглиях межмышечных сплетений (Song et al., 1994).

Таким образом, можно предположить, что ансамбль из нескольких тысяч первичных афферентных нейронов отвечает одновременно при изменениях в мышечном напряжении и в химическом составе полости кишки. Простейший внутренний рефлекс в стенке этого органа может быть осуществлен с участием только первичных афферентных нейронов, поскольку их аксоны могут проецироваться непосредственно к исполнительным клеткам. Важно отметить, что первичные афферентные нейроны взаимодействуют друг с другом, и поэтому могут выполнять функции интернейронов (Furness et al., 2004; Furness, 2006).

Возникает вопрос, почему же первичные афферентные нейроны в стенке тонкой кишки по своим функциональным свойствам отличаются от нейронов центральной нервной системы и в чем состоят эти отличия?

Известно, что первичные афферентные нейроны преобразуют и кодируют информацию в основном о химической среде и физическом состоянии тканей, которые они иннервируют. Эти функции они осуществляют благодаря наличию двух необычных типов нейронов: первичных внутренних афферентных и кишечно-фугальных. Первичные внутренние афферентные нейроны включены в сеть местных рефлексов стенки кишки, в то время как кишечно-фугальные нейроны, вероятно, являются частью проводящих путей рефлексов, замыкающихся между различными частями желудочно-кишечного тракта (Furness, 2006).

Наши исследования и результаты опытов других авторов показали, что ПД в первичных нейронах кишки характеризуются наличием длительных генераторных потенциалов и фаз следовой гиперполяризации (быстрой и медленной), количество импульсов в пачках не превышает 7–8, а интервалы между импульсами достигают нескольких сотен мс. Для восстановления импульсной активности нейронов после применения того или иного медиатора необходимо отмывание препарата физиологическим раствором в течение 5–15 мин. Возможно, эти особенности обусловлены тем, что первичные афферентные нейроны в стенке кишки находятся в исключительно неблагоприятных условиях. Из всех интерорецепторов они наиболее подвержены воздействию внешних факторов. Специализация этих нейронов, а также их выживаемость, вероятно, накладывает отпечаток на их морфологию.

В частности, у этих нейронов не происходит формирования обычных синаптических контак-

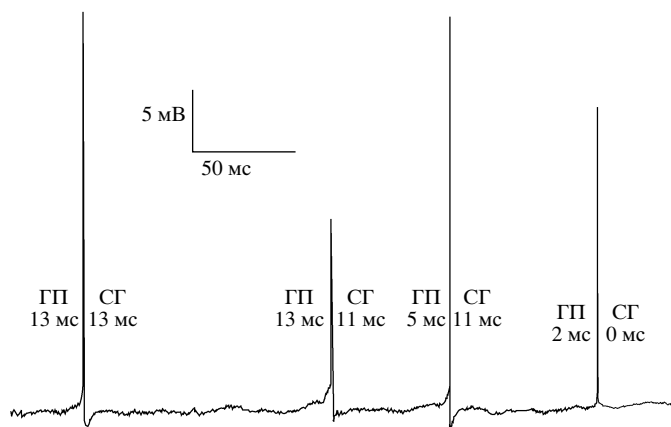


Рис. 5. Влияние внутриклеточной аппликации дефенсина HNP-1 (1×10^{-12} моль/л) на форму ПД при действии гистамина (1×10^{-11} моль/л). Отмечено быстрое уменьшение длительностей генераторного потенциала (ГП) и следовой гиперполяризации (СГ).

тов между клетками, вместо них имеется большое число варикозных контактов аксонов с клеточными телами других нейронов (Furness et al., 2003, 2004). Далее, нейроны в стенке кишки по функциональным свойствам похожи на незрелые нейроны, они характеризуются диффузным (дистантным) типом нейрохимической передачи сигналов (Gascon et al., 2007). В этой связи следует заметить, что аксон, а затем и дендриты, начинают расти от тела нервной клетки лишь после того, как нейроны мигрируют в процессе развития организма на свои, предназначенные для них места. Специальные гистологические методики позволили показать, что на конце растущего отростка нервной клетки имеется своеобразное утолщение неправильной формы, называемое конусом роста, который стремится образовать синапс с соответствующей эффекторной клеткой (Альбертс и др., 1994). Можно предположить, что особенности генерации ПД в первичных афферентных нейронах и нейрохимической передачи сигналов обусловлены тем, что эти нейроны являются незрелыми.

Известно, что дефенсины могут оказывать влияние на ионную проницаемость различных клеточных мембран посредством изменения проницаемости каналов, связанных с мембранными рецепторами. Следовательно, дефенсины могут участвовать в регуляции чувствительности первичных афферентных нейронов (Ноздрачев и др., 2005). Кроме того, под влиянием дефенсинов происходит снижение возбудимости гладких мышц в ответ на действие специфических агонистов, т.е. снижается внутриклеточная мобилизация ионов Ca^{2+} , что и угнетает сократительную реакцию гладких мышц (Nassar, 2002). Таким образом, имеющиеся в настоящее время эксперименталь-

ные данные указывают на возможность изменения функциональных свойств рецепторов в различных по своей природе нервных и мышечных клетках при действии дефенсина.

Известно также, что в первичных афферентных нейронах тонкой кишки воспалительные медиаторы могут вызывать медленно развивающиеся каскадные внутриклеточные реакции, одни из которых активируются через аденилатциклазу, другие – через фосфолипазу-С (Furness et al., 2004). Эти пути имеют важное значение в последующей активизации протеинкиназы-А и протеинкиназы-С, которые могут активироваться при фосфорилировании внутриклеточных белков, включая белки высокопроводимых K^+ ионных каналов. Закрытие высокопроводимых K^+ ионных каналов вызывает деполяризацию и повышение возбудимости нейронов. Открытие K^+ ионных каналов может происходить при освобождении ионов Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Вероятно, ПД в ответ на аппликацию гистамина генерируется не только за счет входящего тока ионов Na^+ , но и за счет входящего тока ионов Ca^{2+} . Кальциевый ток развивается медленнее натриевого и гораздо медленнее инактивируется. Значение этого тока даже при сохранении высокого концентрационного градиента Ca^{2+} чрезвычайно сильно зависит от внутренней концентрации Ca^{2+} (Starodub, Wood, 2000). Активация многих мембранных рецепторов приводит к двухфазному увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} вследствие мобилизации Ca^{2+} из внутриклеточных депо и входа Ca^{2+} по градиенту концентрации из внеклеточной среды. Известно также, что связывание гистамина с H1 -рецепторами вызывает увеличение концентрации ионов Ca^{2+} в клетке (Овсянников, 2003).

Наши опыты показали, что под влиянием дефенсина HNP-1 происходит нарушение двух ионных процессов (вход ионов Ca^{2+} внутрь нервной клетки и выход ионов K^+ из нее). В связи с этим необходимо выяснить, какие изменения в возбудимости первичных афферентных нейронов могут произойти при непосредственном введении дефенсина внутрь клетки. Для этой цели нами было использовано специальное заполнение отводящего микроэлектрода 1 моль/л раствором КСl и растворение в нем дефенсина HNP-1 в концентрации 1×10^{-12} моль/л. Такой способ заполнения микропипетки должен приводить к диффузии дефенсина только внутрь клетки и его взаимодействию с внутриклеточными системами регуляции. Регистрация ПД в первичных афферентных нейронах при действии гистамина начиналась в момент введения микроэлектрода внутрь клетки (рис. 5).

Результаты этих опытов свидетельствуют о том, что при непрерывном подведении раствора

гистамина и введении дефенсина внутрь отводящего микроэлектрода происходят те же изменения в развитии генераторного потенциала и фазы быстрой следовой гиперполяризации, как и в случае внеклеточной аппликации дефенсина. В обоих случаях длительная следовая гиперполяризация не претерпела существенных изменений. Отсюда можно предположить, что дефенсин оказывает модулирующее влияние на возбудимость первичных афферентных нейронов ганглиев межмышечного сплетения тонкой кишки в результате его проникновения через плазматическую мембрану внутрь клетки и последующего уменьшения проводимости возбудимых ТТХ-нечувствительных Ca^{2+} -ионных каналов (блокируются нифедипином) и K^{+} -ионных каналов, открытие которых возможно при освобождении ионов Ca^{2+} из внутриклеточных депо (сопровождается развитием фазы быстрой следовой гиперполяризации). Что касается длительной фазы следовой гиперполяризации, то она, вероятно, обусловлена другим, отличным от Ca^{2+} -активируемого освобождения ионов K^{+} .

Следует отметить, что возбудимость первичных афферентных нейронов во многом определяет длительная следовая гиперполяризация, что подтверждается увеличением числа потенциалов действия в пачке с 4 до 15 шт при инъекциях небольшого деполяризующего тока через микроэлектрод (Ngyuen et al., 2005). В настоящее время известно, что величина длительной следовой гиперполяризации в этих нейронах определяется Ca^{2+} -активируемыми K^{+} -каналами промежуточной проводимости (Neylon et al., 2006). Сильнейшим ингибитором длительной следовой гиперполяризации в первичных афферентных нейронах является протеинкиназа-А, фосфорилирующая область связывания K^{+} -каналов промежуточной проводимости с кальмодулином (Shuster, 1985). Отсутствие влияния дефенсина HNP-1 на длительную фазу следовой гиперполяризации, а также на количество импульсов в пачках, указывает на то, что действие HNP-1, вероятно, не связано с изменением активности протеинкиназы-А.

Наиболее важным, с нашей точки зрения, результатом является то, что под влиянием дефенсина HNP-1 ($1 \times 10^{-12} - 1 \times 10^{-10}$ моль/л) в первичных внутренних афферентных нейронах межмышечных ганглиев угнетаются две фазы ПД: генераторный потенциал и быстрая фаза следовой гиперполяризации. Высокие концентрации дефенсина вызывают сильное и длительное блокирование ПД в первичных афферентных нейронах ганглиев межмышечного сплетения тонкой кишки. Таким образом, весьма вероятно, что, например, в ходе воспалительного процесса в кишке дефенсин, секретируемый нейтрофилами, снижает чувствительность первичных афферентных

нейронов к действию провоспалительного медиатора гистамина.

Работа поддержана грантом Президиума РАН программы “Фундаментальные науки – медицине 2008 г” и грантом РФФИ № 08-04-00524.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж. // Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1994. Т. 3. С. 346–362.
- Кокряков В.Н. Биология антибиотиков животного происхождения. СПб.: 1999. 162 с.
- Ноздрачев А.Д., Толкунов Ю.А., Зимина О.А., Поляков Е.Л. Влияет ли дефенсин HNP-1 на возбудимость первичных афферентных нейронов тонкой кишки морской свинки // ДАН. 2005. Т. 401. № 4. С. 1–4.
- Овсянников В.И. Нейромедиаторы и гормоны в желудочно-кишечном тракте (интегративные аспекты). СПб.: Изд-во СПбГУ, 2003. 315 с.
- Толкунов Ю.А. Сенсорные нейроны метасимпатических (интрамуральных) ганглиев тонкой кишки морской свинки // Российский физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2004. Т. 90. № 2. С. 221–229.
- Ayabe T., Satchell D.P., Wilson C.L., Parks W.C., Selsted M.E., Ouellette A.J. Secretion of microbicidal α -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria // Nature Immunology. 2000. V. 1. № 2. P. 113–118.
- Vanden Berghe P., Tack J., Coulie B., Andrioli A., Bellon E., Janssens J. Synaptic transmission induces transient Ca^{2+} concentration changes in cultured myenteric neurones // Neurogastroenterol. Motil. 2000. V. 12. № 2. P. 117–124.
- Bornstein J.C., Hendriks R., Furness J.B., Trussell D.C. Ramifications of the axons of AH-neurons injected with the intracellular marker biocytin in the myenteric plexus of the guinea pig small intestine // J. Comp. Neurol. 1991. V. 314. № 3. P. 437–451.
- Budde T., Meuth S., Pape H.C. Calcium-dependent inactivation of neuronal calcium channels // Nat. Rev. Neurosci. 2002. № 11. P. 873–883.
- Charp P.A., Rice W.G., Raynor R.L., Reimund E., Kinkade J.M. Jr., Ganz T., Selsted M.E., Lehrer R.I., Kuo J.F. Inhibition of protein kinase C by defensins, antibiotic peptides from human neutrophils // Biochem. Pharmacol. 1988. V. 37. № 5. P. 951–956.
- Clerc N., Furness J.B., Kunze W.A., Thomas E.A., Bertrand P.P. Long-term effects of synaptic activation at low frequency on excitability of myenteric AH neurons // Neuroscience. 1999 V.90. № 1. P. 279–289.
- Frieling T.H., Cooke H.J., Wood J.D. Histamine receptors on submucous neurons in guinea pig colon // Am. J. Physiol. 1993. V. 264. P. G74–G80.
- Fujii G., Selsted M.E., Eisenberg D. Defensins promote fusion and lysis of negatively charged membranes // Protein. Sci. 1993. V. 2. № 8. P. 1301–1312.
- Furness J.B. The organisation of the autonomic nervous system: Peripheral connections // Auton. Neurosci.: Basic and Clinical. 2006. V. 130. P. 1–5.

- Furness J.B., Jones C., Nurgali K., Clerc N. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine // *Progr. Neurobiol.* 2004. № 72. P. 143–164.
- Furness J.B., Alex G., Clark M.J., Lal V.V. Morphologies and projections of defined classes of neurons in the submucosa of the guinea-pig small intestine // *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 2003. V. 272. № 2. P. 475–483.
- Furness J.B., Trussell D.C., Pompolo S., Bornstein J.C., Smith T.K. Calbindin neurons of the guinea-pig small intestine: quantitative analysis of their numbers and projections // *Cell. Tissue Res.* 1990. V. 260. № 2. P. 261–272.
- Gascon E., Klauser P., Kiss J.Z., Vutskits L. Potentially toxic effects of anaesthetics on the developing central nervous system // *Eur. J. Anaesthesiol.* 2007. № 3. P. 213–224.
- Hristova K., Selsted M.E., White S.H. Critical role of lipid composition in membrane permeabilization by rabbit neutrophil defensins // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 39. P. 24224–24233.
- Hristova K., Selsted M.E., White S.H. Interactions of monomeric rabbit neutrophil defensins with bilayers: comparison with dimeric human defensin HNP-2 // *Biochemistry.* 1996. V. 35. № 36. P. 11888–11894.
- Kagan B.L., Selsted M.E., Ganz T., Lehrer R.I. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. V. 87. № 1. P. 210–214.
- Nassar T., Akkawi S., Bar-Shavit R., Haj-Yehia A., Bdeir K., Al-Mehdi A.-B., Tarshis M., Higazi A. A.-R. Human α -defensin regulates smooth muscle contraction: a role for low-density lipoprotein receptor-related protein/ α_2 -macroglobulin // *Blood.* 2002. V. 10. № 12. P. 4026–4032.
- Neylon C.B., Fowler C.J., Furness J.B. Regulation of the slow afterhyperpolarization in enteric neurons by protein kinase A // *Auton. Neurosci.* 2006. № 126–127. P. 258–263.
- Nguyen T.V., Stebbing M.J., Clerc N., Kawai M., Harvey J.R., Furness J.B. Evidence for protein kinase involvement in long-term postsynaptic excitation of intrinsic primary afferent neurons in the intestine // *Auton. Neurosci.* 2004. V. 115. № 1–2. P. 1–6.
- Nguyen T.V., Poole D.P., Harvey J.R., Stebbing M.J., Furness J.B. Investigation of PKC isoform-specific translocation and targeting of the current of the late afterhyperpolarizing potential of myenteric AH neurons // *Eur. J. Neurosci.* 2005. V. 21. № 4. P. 905–913.
- Ouelette A.J. Mucosal immunity and inflammation IV. Paneth cell antimicrobial peptides and the biology of the mucosal barrier // *Am. J. Physiol.* 1999. V. 277. P. G257–G261.
- Poli E., Menozzi A., Pozzoli C., Coruzzi G., Kitbunnadaj R., Timmermann H., Leurs R. Functional characterisation of the novel histamine H(3) receptor agonist, VUF 5810, on the guinea-pig isolated ileum // *Inflamm Res.* 2004. № 53 Suppl 1. P. S77–S78.
- Salvatore M., Garcia-Sastre A., Ruchala P., Lehrer R.I., Chang T., Klotman M.E. alpha-Defensin inhibits influenza virus replication by cell-mediated mechanism(s) // *J. Infect. Dis.* 2007. V. 196. № 6. P. 835–843.
- Shuster M.J., Camardo J.S., Siegelbaum S.A., Kander E.R. Cyclic AMP-dependent protein kinase closes the serotonin-sensitive K^+ channels of *Aplysia* sensory neurones in cell-free membrane patches // *Nature.* 1985. № 313. P. 392–395.
- Smith J.G., Nemerow G.R. Mechanism of adenovirus neutralization by Human alpha-defensins // *Cell. Host. Microbe.* 2008. V. 3. № 1. P. 11–19.
- Song Z.M., Brookes S.J., Costa M. All calbindin-immunoreactive myenteric neurons project to the mucosa of the guinea-pig small intestine // *Neurosci. Lett.* 1994. V. 180. № 2. P. 219–222.
- Song Z.M., Costa M., Brookes S.J.H. Projections of submucous neurons to the myenteric plexus in the guinea pig small intestine // *J. Comp. Neurol.* 1998. V. 399. P. 255–268.
- Starodub A.M., Wood J.D. Histamine suppresses A-Type potassium current in myenteric neurons from guinea pig small intestine // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000. V. 294. № 2. P. 555–561.
- Stojnic N., Gojkovic-Bukarica L., Peric M., Grbovic L., Lesic A., Bumbasirevic M., Heinle H. Potassium channel opener pinacidil induces relaxation of the isolated human radial artery // *J. Pharmacol. Sci.* 2007. V. 107. № 2. P. 122–129.

Histamine-evoked Activity of Primary Afferent Neurons of Small Intestine Is Modulated by Defensin HNP-1

Yu. A. Tolkunov, D. A. Sibarov, D. S. Frolov

*Pavlov institute of physiology RAS, 199034, St. Petersburg, Makarova emb., 6
St. Petersburg State University, 199034, St. Petersburg, University emb., 7/9*

Defensin HNP-1 action on electrical activity in histamine-stimulated intrinsic primary afferent neurons (IP-ANs) of the small intestine myenteric plexus has been studied. It was shown that in IPANs application of 1×10^{-10} M histamine evokes long generator potential, followed by action potential and post-spike hyperpolarization. Nifedipine (1×10^{-6} M) and HNP-1 (1×10^{-12} M), while applied to the organ bath, suppressed the generator potential and fast after-hyperpolarization, but had no effect on slow after-hyperpolarization or spike shape. Intracellular application of defensin HNP-1 through the microelectrode also suppressed generator potential and fast afterhyperpolarization, which indicates that defensin HNP-1 action was apparently intracellular. We further hypothesize the action of HNP-1 in IPANs was via protein kinase-C (PKC).

Key words: IPANs, small intestine, duodenum, defensin, HNP-1, histamine, protein kinase, PKC.