

Получена: 02 Августа 2024 / Принята: 13 Декабря 2024 / Опубликовано online: 28 Февраля 2025

DOI 10.34689/SH.2025.27.1.004

UDC 616.853;577.352.5



This work is licensed under a
Creative Commons Attribution 4.0
International License

ЭПИЛЕПСИЯЛЫҚ БЕЛСЕНДІЛІК КЕЗІНДЕ ПАРОКСИЗМАЛЬДЫ ДЕПОЛЯРИЗАЦИЯЛЫҚ ЫҒЫСУ КЛАСТЕРЛЕРІНІҢ ҚҰРЫЛЫМЫНА Kv7 ТҰҚЫМДАС КАЛИЙ КАНАЛДАРЫНЫҢ ИНГИБИТОРЛАРЫ МЕН АКТИВАТОРЛАРЫНЫҢ ӘСЕРІН ЗЕРТТЕУ

Султан Т. Тулеуханов¹, <https://orcid.org/0000-0002-9898-0507>

Валерий П. Зинченко², <https://orcid.org/0000-0002-1990-3803>

Бақытжан.Қ.Қайрат¹, <https://orcid.org/0000-0003-1742-2667>

Гульмира А. Тусупбекова¹, <https://orcid.org/0000-0001-9379-4687>

Арайлым Е. Малибаева¹, <https://orcid.org/0000-0002-4759-9087>

¹ Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы қ., Қазақстан;

² Ресей Ғылым Академиясының жасуша биофизика институты, Пущино қ., Ресей.

Түйіндеме

Өзектілігі. Эпилепсия ұстамалары гамма-аминомой қышқылы (ГАМК) тежегіш жүйесінің әлсіреуінің салдары болып табылады, бұл өз кезегінде нейрондарының өліміне әкелуі мүмкін. Эпилепсияны емдеудің күрделілігі 1000-нан астам геннің экспрессиясымен түсіндіріледі. Эпилептиформды белсенділік негізіндегі клеткалық модельдерді қолдану – эпилепсия табиғатын зерттеу міндетін біршама жеңілдетеді сонымен қатар процестің көптеген қатысушыларының рөлін анықтауға, олардың қатысуымен сигнал беру тізбегін құруға, белсенділігін реттеу механизмдерін анықтауға мүмкіндік береді. Эпилептиформды белсенділікке потенциалға тәуелді кальций каналдары (Kv7) каналдары мен кальций-өткізгіш AMPA рецепторларының әсерінің анықталуы, ғылым саласында үлкен бір қадам бола отырып, гиперқозудың фармакологиялық жолдарын ашады.

Зерттеу мақсаты: Эпилептиформды белсенділіктегі пароксизмальды деполяризациялық ығысу (ПДЫ) кластерлерінің құрылымына Kv7 каналдарының ингибиторы мен активаторларының әсерін анықтау.

Материалдар мен зерттеу әдістері: Тәжірибелерде жаңа туған (1-3 күн) Wistar ереуқұйрықтарының миынан алынған гиппокампалық жасушаларының аралас нейроглиялыды культураны қолданылды. Тәжірибелер гиппокампалық нейрондық культурада өсірудің 12-14 күнінде жүргізілді. Барлық зерттеулер *in vitro* жасушалық деңгейде жүргізілді. Жасушаішілік кальций концентрациясының өзгерісін флуоресценттік микроскопия әдісі арқылы тіркелді. Мембраналық потенциалдың өзгеруі Patch-Clamp әдісі арқылы тіркелді. Алынған нәтижелерді талдау және өңдеу жұмыстары Origin 9.1 және Image J бағдарламалары қолданылды.

Зерттеу нәтижелері: Жүргізілген тәжірибелер кластердің ұзақтығы дискретті (ПДЫ бүтін санына өзгереді) және бақылауда бір кластерге азаятынын көрсетті, бұл стохастикалық процестің кластер индукциясына қатысуын көрсетеді. Kv7 каналдар кластерді қалыптастыруға да, ПДЫ-ның өзіне де қатысады.

Қорытынды: Kv7 тұқымдас калий каналдары ПДЫ кластерінің гиперполяризациядан кейінгі жылдамдығын арттыра отырып, эпилептиформды белсенділіктегі әрекет потенциал жиын ұзақтығын және кальций импульстарының ұзақтығын азайтады. Сондай-ақ, Kv7 каналдарының тікелей активаторлары мен ингибиторлары синхронды жиын белсенділік және Ca^{2+} импульстарының параметрлерін олардың ұзақтығын, амплитудасын өзгертеді, алайда эпилептиформалық белсенділіктегі нейрондардағы деполяризациялық ығысу жиілігі өзгеріссіз қалады.

Түйінді сөздер: тежегіш нейрондар, әрекет потенциалы, потенциал тәуелді кальций каналдары, спонтанды синхронды активтілік, AMPA рецептор, гиперқозу, эпилепсия, потенциал тәуелді Kv7 калий каналдары.

Дәйексөз үшін:

Тулеуханов С.Т., Зинченко В.П., Қайрат Б.Қ., Тусупбекова Г.А., Малибаева А.Е. Эпилепсиялық белсенділік кезінде пароксизмальды деполяризациялық ығысу кластерлерінің құрылымына Kv7 тұқымдас калий каналдарының ингибиторлары мен активаторларының әсерін зерттеу // Ғылым және Денсаулық сақтау. 2025. Vol.27 (1), Б. 32-39. doi 10.34689/SH.2025.27.1.004

Abstract

IMPLICATIONS OF Kv7 INHIBITORS AND ACTIVATORS OF POTASSIUM CHANNELS ON THE STRUCTURE OF PAROXYSMAL DEPOLARISATION SHIFT CLUSTERS IN EPILEPTIFORM ACTIVITY**Sultan T. Tuleukhanov**¹, <https://orcid.org/0000-0002-9898-0507>**Valery P. Zinchenko**², <https://orcid.org/0000-0002-1990-3803>.**Bakytzhan K. Kairat**¹, <https://orcid.org/0000-0003-1742-2667>**Gulmira A. Tussupbekova**¹, <https://orcid.org/0000-0001-9379-4687>**Arailym E. Malibayeva**¹, <https://orcid.org/0000-0002-4759-9087>¹ Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan;² Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia.

Relevance: Seizures of epilepsy are a consequence of a weakening of the inhibitory GABAergic system and, due to the presence of positive feedback, can lead to the death of neurons. The complexity of epilepsy treatment is due to the complexity of the process in which the expression of more than 1,000 genes changes. The presence of cellular models of epileptiform activity somewhat simplifies the task of investigating the nature of the phenomenon and allows us to establish the role of many participants in the process, and to build a chain of signal transmission with their participation and to find out the mechanisms of regulation of their activity. The discovery of the involvement of potential-dependent potassium channels (Kv7) and calcium-permeable AMP receptors in epileptiform activity is a definite step in this direction and opens up new ways of pharmacological correction of hyperexcitation.

Aim: To study the effect of Kv7 channel inhibitors and activators on the structure of clusters of paroxysmal depolarization shift (PDS) in epileptiform activity.

Materials and methods: The experiments used a mixed neuroglial culture of hippocampal cells (12-14 DIV) isolated from the brain of newborn (1-3 days old) Wistar rats. All studies were conducted at the cellular level *in vitro*. Changes in intracellular calcium concentration were recorded using fluorescence microscopy. The Patch-Clamp method in the whole-cell configuration was used to register changes in the membrane potential. The analysis and processing of the obtained results was carried out using the Origin 9.1 and Image J programs.

Results and discussion: The experiments show that the cluster duration is discrete (varies by an integer number of PDS) and varies in the control by one PDS, indicating that a stochastic process is involved in cluster induction. Kv7 channels are involved in both cluster formation and the PDSs themselves.

Conclusion: Kv7 family potassium channels decrease the duration of action potential bursts and the duration of calcium pulses during epileptiform activity, increasing the rate of posthyperpolarisation of the PDS cluster. Also direct activators and inhibitors of Kv7 channels change such parameters of synchronous bundle activity and Ca²⁺ impulses as their duration, amplitude, but not the frequency of depolarisation shifts in neurons during epileptiform activity.

Keywords: *inhibitory neurons, action potential, potential-dependent calcium channels, spontaneous synchronous activity, AMPA receptor, hyperexcitation, epilepsy, potential-dependent potassium channels Kv7.*

For citation:

Tuleukhanov S.T., Zinchenko V.P., Kairat B.K., Tussupbekova G.A., Malibayeva A.E. Implications of Kv7 inhibitors and activators of potassium channels on the structure of paroxysmal depolarisation shift clusters in epileptiform activity // *Nauka i Zdravookhranenie* [Science & Healthcare]. 2025. Vol.27 (1), pp. 32-39. doi 10.34689/SH.2025.27.1.004

Резюме

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ИНГИБИТОРОВ И АКТИВАТОРОВ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ СЕМЕЙСТВА Kv7 НА СТРУКТУРУ КЛАСТЕРОВ ПАРОКСИЗМАЛЬНОГО ДЕПОЛЯРИЗАЦИОННОГО СДВИГА ПРИ ЭПИЛЕПТИФОРМНОЙ АКТИВНОСТИ**Султан Т. Тулеуханов**¹, <https://orcid.org/0000-0002-9898-0507>**Валерий П. Зинченко**², <https://orcid.org/0000-0002-1990-3803>**Бақытжан Қ. Қайрат**¹, <https://orcid.org/0000-0003-1742-2667>**Гульмира А. Тусупбекова**¹, <https://orcid.org/0000-0001-9379-4687>**Арайлым Е. Малибаева**¹, <https://orcid.org/0000-0002-4759-9087>¹ Казахский национальный университет имени аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан;² Институт биофизики клетки Российской Академии Наук, г. Пущино, Россия.

Актуальность: Приступы эпилепсии являются следствием ослабления тормозной ГАМКергической системы и вследствие наличия положительных обратных связей могут приводить к гибели нейронов. Сложность лечения

эпилепсии обусловлена сложностью процесса, в котором меняются экспрессия более 1000 генов. Наличие клеточных моделей эпилептиформной активности несколько упрощает задачу исследования природы явления и позволяет установить роль многих участников процесса, и выстроить цепочку передачи сигнала с их участием и выяснить механизмы регуляции их активности. Обнаружение участия потенциал-зависимых калиевых каналов (Kv7) и кальций-проницаемых AMPA-рецепторов в эпилептиформной активности является определенным шагом в этом направлении и открывает новые пути фармакологической коррекции гипервозбуждения.

Цель исследования: Изучить влияние ингибиторов и активаторов Kv7-каналов на структуру кластеров пароксизмального деполяризационного сдвига (PDS) при эпилептиформной активности.

Материалы и методы исследования: В экспериментах использовали смешанную нейроглиальную культуру клеток гиппокампа (12-14 DIV), выделенных из головного мозга новорожденных (1–3 дня) крыс линии Wistar. Все исследования проводились на клеточном уровне *in vitro*. Изменения концентрации внутриклеточного кальция регистрировали с помощью метода флуоресцентной микроскопии. Для регистрации изменения мембранного потенциала использовали метод Patch-Clamp в конфигурации whole-cell. Анализ и обработку полученных результатов проводили с помощью программ Origin 9.1 и Image J.

Результаты исследования и обсуждение: Проведенные эксперименты показали, что длительность кластера дискретна (изменяется на целое число PDS) и варьирует в контроле на один кластер, что указывает на участие стохастического процесса в индукции кластера. Каналы Kv7 принимают участие как в формировании кластера, так и самих PDS.

Выводы: Калиевые каналы семейства Kv7 уменьшают длительность пачек потенциалов действия и длительность кальциевых импульсов при эпилептиформной активности, увеличивая скорость постгиперполяризации кластера PDS. А также прямые активаторы и ингибиторы Kv7 каналов меняют такие параметры синхронной пачечной активности ПД и Ca^{2+} импульсов, как их длительность, амплитуду, но не частоту деполяризационных сдвигов в нейронах при эпилептиформной активности.

Ключевые слова: тормозные нейроны, потенциал действия, потенциал-зависимые кальциевые каналы, спонтанная синхронная активность, AMPA-рецептор, гипервозбуждения, эпилепсия, потенциал-зависимые калиевые каналы Kv7.

Для цитирования:

Тулеханов С.Т., Зинченко В.П., Қайрат Б.Қ., Тусупбекова Г.А., Малибаева А.Е. исследование влияния ингибиторов и активаторов калиевых каналов семейства Kv7 на структуру кластеров пароксизмального деполяризационного сдвига при эпилептиформной активности // Наука и Здоровоохранение. 2025. Vol.27 (1), С.32-39. doi 10.34689/SH.2025.27.1.004

Кіріспе

Эпилепсия мыңдаған ми нейрондарының синхронды қозуының жоғары жиілігімен және әдеттен тыс жоғары деңгейімен бірге жүреді. Эпилепсия - бұл нейрондар тобы гиперқозуының ең жарқын көрінісі (өйткені 1000-нан астам ақуыздың экспрессиясы өзгереді) және мидың әртүрлі аймақтарында пайда болуы мүмкін, сонымен қатар басқа аймақтарды да қамтуы мүмкін [1-3].

Төмен шекті Kv7 типті калий каналдары нейрондардың шамадан тыс қозғыштығын бақылайды, сондықтан бұл каналдардың ингибиторлары эпилепсияға қарсы препараттар, ал активаторлары нейропротекторлар болып табылады. Бұл каналдардың ерекше қабілеттері – қозуды тез уақытта тежелу, төмен шекті деңгейден туындайды (деполяризацияның кішігірім сдйсуларында ашылу мүмкіндігі), бұл кішігірім тітіркендіргіштерден қозуды болдырмайды [4, 5].

Қазіргі эпилепсияға қарсы дәрі-дәрмектер жеткіліксіз селективтілікке байланысты күшті жанама әсерлерге ие. Бұл жұмыс белгілі бір нейрондық популяцияларда Kv7 селективті белсендіру жолдарын табуды қамтиды [6-9].

Гиперқозуды тежеуге көптеген әртүрлі калий каналдары қатысады. Әр түрлі калий каналдарының суббірліктерін кодтайтын 90 түрлі ген белгілі. Олардың

ішінде біз әдетте G-белоктарымен белсендірілген каналдар тобын (Kir1–6) және потенциал-сезімтал каналдар (Kv1-12) тұқымдасын бөліп аламыз. Барлық каналдардың ішінде Kv7 нейрондық каналдары айтарлықтай ерекшеленеді, оның мутациялары ерте балалық шақта эпилепсияны тудырады. Kv7 эпилепсияны бақылауда жетекші рөл атқарады деп айтуға негіз бар, өйткені Kv7 дигидрохлорид 10,10-бис(4-пиридинилметил)-9 (10H)-антраценон (XE991) каналдарының жоғары селективті антагонисті пейсмейкерлік нейрондарда жоғары жиілікті разрядтарды (~200-300 Гц) мерзімді генерациялау режимін қосады. Бір қызығы, XE991 пресинаптикалық жол қозғалысы ережесі мен постсинаптикалық жауаптың басталуы арасындағы кідірісті арттырады [10-12].

Эпилепсиялық ұстаманың алдындағы нейрондық желідегі "гиперқозу" автоматты тербеліс режимі (interictal spikes in vivo сәйкес келеді) ГАМК-тәуелді тежелудің тоқтауы/әлсіреуі немесе ГАМКергиялық нейрондарының өлімінен туындайды. Ол гиперсинхрондылықпен, төмен жиілікпен, деполяризация импульстарының жоғары амплитудасымен және Ca^{2+} типті base-line импульстарымен сипатталады. Жалпы мидағы эпилептиформды ырғақтар ашылғаннан кейін көп

ұзамай (interictal spikes), бұл тербелістердің/ырғақтың жасушалық корреляциясы бар екендігі дәлелденді, яғни эпилепсия аймағынан алынған ми аймақтарының бөлімдеріндегідей *in vitro* жасушалық деңгейде байқалады. Бұл режимдегі нейрондар мезгіл-мезгіл (0.5-0.1 Гц төмен жиілікте) синхронды Ca^{2+} импульстарымен бірге жүретін әрекет потенциал (ӘП) жиілігін (ПДЫ кластерлері) жасайды. ӘП жиілігі екі жоғары жиілікті тербелмелі жүйелерден тұрады, олардың бірі әрекет потенциалы, ал екіншісі баяу пароксизмальды деполяризациялық ығысу (ПДЫ) әрекет потенциал (ӘП) жиілігін басқарады. Әрі қарайғы зерттеулер гиперқозудың бұл түрі ингибиторлық ГАМКергиялық жүйесінің әлсіреуі нәтижесінде пайда болатынын және эпилепсияда ғана емес, сонымен қатар ишемияда, инсульттерде, Альцгеймер ауруы және Паркинсон ауруында, нейрондық желінің дамуында, мидың травматикалық зақымдануында, нейрондар арасында әртүрлі байланыстар синхронды түрде пайда болған кезде байқалатынын көрсетті. ПДЫ толық жетілген нейрондық желіде даму процестерінің қайталануын бастауға қабілетті деп саналады, мысалы, зақымдану кезінде, мидың шайқалуы кезінде және т.б. Сонымен, инсульттан кейін, бірінші күні үлкен амплитудасы бар синхронды төмен жиілікті импульстар – эпилепсия ұстама алды белгілері болып тіркеледі. Ал эпилепсия ұстамаларының өзі инсульттан кейін бір күннен бір аптаға дейін ғана байқалады.

Осылайша, ПДЫ-дың пайда болу мәселесі және оны басу/реттеу механизмдері гиперқозудың пайда болуын және оның нейрондық өлімдегі рөлін және әртүрлі аурулардағы мидың әртүрлі физиологиялық қозған күйлерінің пайда болуын зерттеуде маңызды болып табылады.

Kv7 типті калий каналдары эпилептиформды белсенділік кезінде гиперполяризацияны бақылауға қатысады деп саналады. Kv7 каналының блокаторы ХЕ991, CP-AMPARs антагонистінің әрекетін ПДЫ кластерлеріне имитациялады. Екі препаратта ПДЫ кластерінің ұзақтығын ұзартады. Өз кезегінде, Kv7 активаторы ретигабин ПДЫ кластерінің ұзақтығын және Ca^{2+} импульсін азайтады. Сонымен қатар, ретигабин ПДЫ кластерінің соңында постгиперполяризацияға әкелді. Осылайша, CP-AMPARs Экспрессиялайтын ГАМКергиялық нейрондар, басқа ГАМКергиялық нейрондар постсинаптикалық калий каналдарының белсенділігін модуляциялау арқылы иннервацияланатын глутаматергиялық нейрондардың мембраналық потенциалын реттейді.

Зерттеу материалдары мен әдістері: гиппокамп жасуша культурасы. Тәжірибелерде жаңа туған Sprague–Dawley егеуқұйрықтың миынан (1-3 күн) бөлінген гиппокамп жасушаларының аралас нейроглиальды культурасы қолданылды. Тәжірибе жұмыстары гиппокамп нейрондық культурада өсірудің 12-14 күнінде жүргізілді. Эксперимент алдында жасушалар 30 минут ішінде 28 °C температурада құрамында 156 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM MgSO_4 , 1,25

mM KH_2PO_4 , 2 mM CaCl_2 , 10 mM глюкоза HBSS ерітіндісі және 10 mM HEPES Fura 2 AM (6 мкМ) флуоресцентті зондпен ерітіндісінде жүктелді; pH 7.35. Флуоресценция 0.2 mM L-аргинин қосылған Хенкс ерітіндісінде тіркелді. Жасуша тығыздығы 15000 кл/см² болды [13-16].

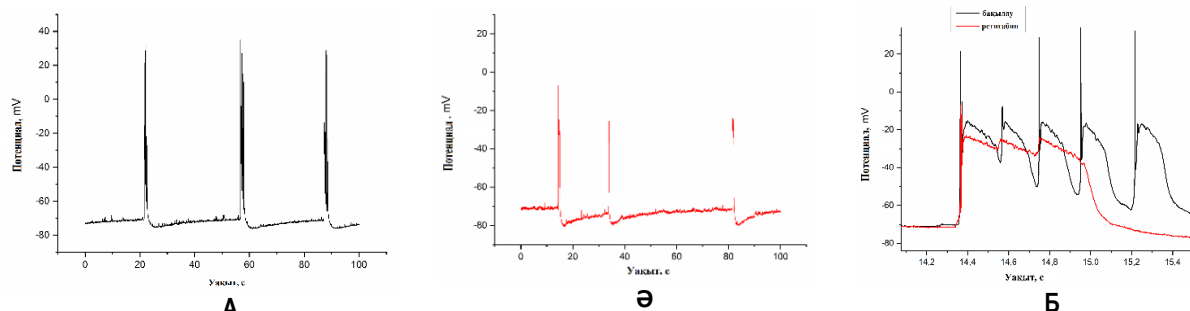
$[\text{Ca}^{2+}]_i$ өлшеу үшін HAMAMATSU C9100 жоғары жылдамдықты монохромды CCD камерасымен жабдықталған Leica DMI6000B инверттелген моторлы микроскопқа негізделген кескінді талдау жүйесі, Leica's ultra-Fast filter Wheels (ауысу уақыты 10-30 мс) қоздырғыш жарық сүзгілерінің жоғары жылдамдықты ауысу жүйесі қолданылды. Leica HC PL apo 20× / 0.7 IMM линзасын қолданды. Флуоресценцияны қоздыру көзі ретінде HBO 103 w/2 жоғары қысымды сынап шамы бар Leica el6000 жарықтандырғышы пайдаланылды. Нейрондардың кальций сигналдары екі толқынды Ca^{2+} сезімтал Fura 2 зондының флуоресценция қарқындылығымен тіркелді. Fura 2 флуоресценциясын қоздыру және тіркеу үшін BP340/30 және BP387/15 қоздыру сүзгілері, FT410 жарық бөлгіші және BP510/84 эмиссиялық сүзгісі бар FU2 (Leica, Германия) жарық сүзгілерінің жинағы пайдаланылды. Екі түрлі каналда алынған уақытша кескіндер сериясы Image J бағдарламасында Time Series Analyzer және RatioPlus бағдарламаларын қолдана отырып өңделді [15-17].

Кескін серияларын өңдеу кезінде толқын ұзындығы 340 және 380 нм жарықпен қозған кезіндегі Fura 2 флуоресценция сигналдарының қатынасы ретінде көрсетілген жасушаның кальций реакцияларының амплитудасы бағаланды. Графиктер мен статистикалық өңдеу үшін Origin 9.1 бағдарламасы қолданылды. Бір күндік эксперименттер сериясы 5-6 қайталаудан тұрды. Бір тәжірибеде өлшенген жасушалар саны 150-ден 200-ге дейін болды. Жасушалардағы сигналдың бастапқы деңгейі әдетте 0.23 ± 0.07 болды (мұнда және одан әрі орташа $\pm$ стандартты ауытқу). Нейрондар астроциттерден синхронды белсенділігі және эксперимент соңында 35 mM KCl деполяризациясына жылдам Ca^{2+} жауабымен ерекшеленді. Амплитудасы флуоресценция қарқындылығының орташа мәніне сүйене отырып есептелді. Бұл жағдайда орташа өлшеу қателігі 0,04 болды [18-20].

Реагенттерді камерадағы барлық ерітіндіні тез ауыстыруға мүмкіндік беретін арнайы перфузиялық жүйемен қосты, ол камерадағы барлық ерітіндіні толығымен ауыстыруға мүмкіндік береді. Жазу жылдамдығы-секундына 1 кадр. Барлық эксперименттер 28-30 °C температурада орындалады.

Жұмыста: Хенкс ерітінділері, HEPES және бұзау эмбриональды сарысуы (MP Biomedicals, АҚШ); Fura 2/AM, B 27 қоспасы, пропиций йодиді, Hoechst 33342, (Invitrogen, АҚШ); 2-APB, биккуллин, домой қышқылы, GYKI 52466, UBP302, АТРА, SYM2081, D-AP5, фторвиллардин (FW), гуанфацин (Tocris Bioscience, Ұлыбритания); BCA, PBS, DMEM, форсколин, (Sigma, АҚШ); NH_4Cl ("Химмед", Ресей). Рецепторлардың лигандыларын қанықтыру концентрациясында қолданылған.

Статистикалық талдау. Нәтижелер орташа $\pm$ стандартты орташа қателік (SEM) немесе жеке жасушалардағы кальций сигналдарының репрезентативті жазбалары ретінде ұсынылған. Суреттерге жазулар: N – белгілі бір экспериментте талданған жасушалар саны, n-тәуелсіз эксперименттер саны. Origin 9.1 бағдарламасы нәтижелерді сызу және статистикалық өңдеу үшін пайдаланылды. Деректер Краскел-Уоллис критерийі арқылы өңделді немесе жұптық салыстырулар (t-тест) қолданылды, айырмашылықтар $P \leq 0.05$ статистикалық мәнімен есептелді.



Сурет 1. Kv7 каналдарының активаторы ретигабиннің ПДЫ кластерінің құрылымына әсері.

A – Бикукуллин әсер еткен кездегі (эпилептиформды белсенділік) ПДЫ кластерлері;

Ә – Kv7 активаторы ретигабин 2,5 мкМ мөлшерде қосқаннан кейін ПДЫ кластерлері,

Б – ПДЫ кластерлерін салыстыру эпилептиформдық белсенділік жағдайында (қара қисық) және 2,5 мкМ ретигабин әсерінен кейін (қызыл қисық) /

(Figure 1. The effect of the Kv7 channel activator retigabine on the structure of PDS clusters

A – PDS cluster under the influence of bicucullin (epileptiform activity); Ә – PDS clusters after addition of the Kv7 activator retigabine 2.5 μ m, Б – Comparison of PDS clusters in the case of epileptiform activity (black curve) and after exposure to 2.5 μ m retigabine (red curve)).

Бақылауда кластер 5-6 ПДЫ-тен тұрды, активатор қосылғаннан кейін кластердегі ПДЫ саны үшке дейін азайды. Кластердің амплитудасы да біршама азаяды. 2-суретте бақылаудағы Ca^{2+} импульстары (бикукуллин қосылғаннан кейін) және ретигабин қосылғаннан кейін кальций импульстары берілген. Каналдар активаторы Ca^{2+} импульстарының ұзақтығын азайтады және сигнал амплитудасын азайтады. Осылайша, Kv7 кем дегенде кластер және Ca^{2+} сигналдар терминациясына қатысады және олардың ұзақтығын азайтады.

Кластердің ұзақтығы азаяды, кластердегі ПДЫ саны бестен үшке дейін азаяды, кластерден кейінгі гиперполяризация артады. ПДЫ максималды амплитудасы төмендейді.

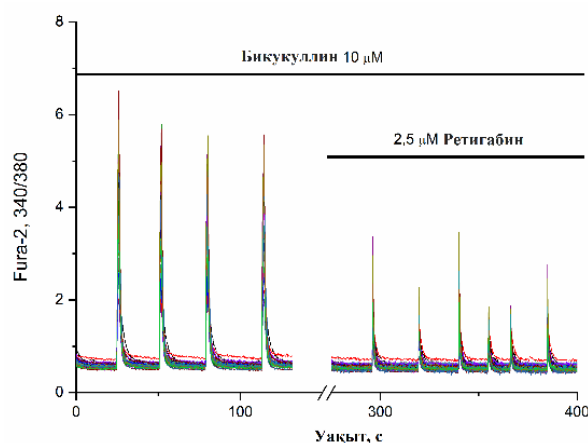
Ретигабин импульстардың ұзақтығын азайтады және олардың амплитудасын төмендетеді. Ретигабин нейрондардағы калий каналдарының ашылуы арқылы әрекет етеді. Бұл мембрананың тыныштық потенциалын тұрақтандырады және нейрондардың шекті қозғыштығын бақылайды, осылайша потенциалды импульстардың эпилептиформалық әсерінің басталуына жол бермейді.

3-суретте бикукуллин тудырған эпилептиформды белсенділік режимінде нейронның мембраналық потенциалының жазбалары берілген. Бақылаудағы ПДЫ кластерлерінде 3-4 ПДЫ-тен тұрады. Kv7 4-пиридинилметил - 9 (10H)-антраценон (XE991) блокаторлары гиперполяризация жылдамдығын

Зерттеу нәтижелері

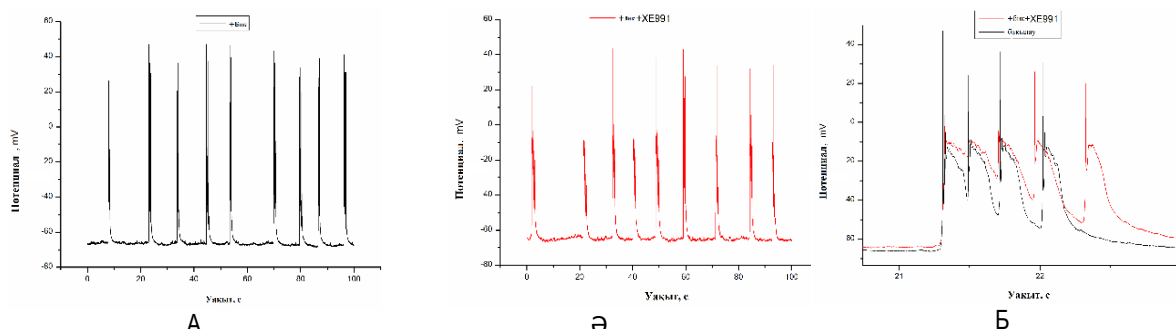
Kv7 калий каналдарының ингибиторлары мен активаторларының әсері. Kv7 каналдары ПДЫ реттеуге қатысатынын көрсету мақсатында каналдардың тікелей ингибиторлары мен активаторларын қолданылды. Kv7 ретигабин агонисті қазіргі уақытта антиконвульсант, анальгетик және қабынуға қарсы агент ретінде сынақтан өтуде. 1-суретте бақылауда (эпилептиформды белсенділік жағдайында) және 2,5 мкМ ретигабин қосқаннан кейінгі кластерлер берілген.

бәсеңдетеді және қосымша ПДЫ (қызыл қисықтар) пайда болу арқылы ПДЫ кластерінің ұзақтығын арттырады. Ингибитор ПДЫ амплитудасына әсер етпейді, яғни деполяризациялық ығысуға әсер етпейді.



Сурет 2. Эпилептиформды белсенділік кезеңіндегі бақылауда және 2,5 мкМ ретигабина әсерінен кейінгі 37 нейрондағы бикукуллин әсерінен туындаған синхронды Ca^{2+} импульстары /

(Figure 2. Synchronous Ca^{2+} impulses caused by the action of bicucullin in 37 neurons during the period of epileptiform activity and after exposure to 2.5 μ m of retigabine under observation.).



Сурет 3. Kv7 каналдарының ингибиторы XE991 ПДЫ кластерінің құрылымына әсері.

А – Бикукуллин әсер еткен кездегі (эпилептиформды белсенділік) ПДЫ кластерлері;

Ә – Kv7 блокаторы XE991 10 мкМ мөлшерде қосқаннан кейін ПДЫ кластерлері;

Б – ПДЫ кластерлерін салыстыру эпилептиформдық белсенділік жағдайында (қара қисық) және 10 мкМ XE991 әсерінен кейін (қызыл қисық) /

(Figure 3. The effect of the Kv7 channel inhibitor XE991 on the structure of PDS clusters.

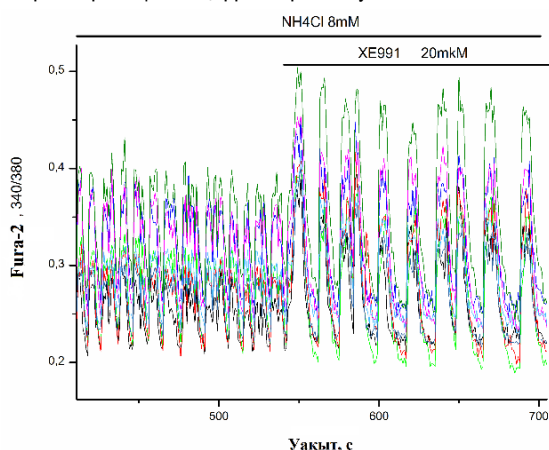
A – PDS clusters during the action of bicuculline (epileptiform activity);

B – PDS clusters after the addition of the Kv7 blocker XE991 at a concentration of 10 μM;

C – Comparison of PDS clusters under epileptiform activity conditions (black curve) and after the effect of 10 μM XE991 (red curve).

Бикукуллин хлор және калий каналдарын блоктайтын, ГАМК рецепторлардың антагонисты болып табылады. Кластердің ұзақтығы 1 ПДЫ-ке артады. Гиперполяризация жылдамдығы баяулайды. Кластердің гиперполяризациясың фронты баяуланады.

гиперполяризация жүйесіне көбірек әсер етеді және деполяризациялық ығысуға әлсіз әсер етеді. Сонымен қатар, каналдар активаторы ПДЫ кластерінің соңында гиперполяризацияны күшейтеді, бұл инактивацияланған Na^+ , Ca^{2+} каналдарын қайта белсендіру үшін қажет.



Сурет 4. 8 мМ NH_4Cl қосқанда туындаған эпилептиформды белсенділік кезінде синхронды Ca^{2+} импульстарына Kv7 каналдарының ингибиторы 20 мкМ XE991 әсері /

(Figure 4. The effect of the Kv7 channel inhibitor XE991 (20 μM) on synchronous Ca^{2+} impulses during epileptiform activity induced by the addition of 8 mM NH_4Cl).

4-суреттен көріп отырғанымыздай, 8 мМ NH_4Cl қосқанда туындаған эпилептиформды белсенділік кезінде синхронды Ca^{2+} импульстарына Kv7 каналдарының ингибиторы XE991 кальций тербелістері импульстарының ұзақтығын арттырады (шамамен, 6 с-тан 10 с-қа дейін).

Жүргізілген тәжірибелер кластердің ұзақтығы дискретті (ПДЫ бүтін санына өзгереді) және бақылауда бір кластерге азаятынын көрсетті, бұл кластер индукциясындағы стохастикалық процестің қатысуын көрсетеді. Kv7 каналдары кластерді, ПДЫ-ті қалыптастыруда қатысады. ПДЫ кластерінің ұзақтығын Kv7 ингибиторы XE991 көбейтеді, ал Kv7 активаторы ретигабин азайтады. Ингибитор да, активатор да

Талқылау: Kv7 каналдары ПДЫ-ны реттеуге қатысуын көрсету үшін, біз осы каналдардың ингибиторлары мен активаторларын қолдандық. Гиппокамп жасуша культурасында ГАМК(A) - тәуелді тежелуді басуға жауап ретінде нейрондық белсенділіктің синхрондалуы жүреді. Синхрондалу ГАМК секрециясының импульстарымен және Cl^- каналдарының ашылуымен байланысты қозудың тежелуінің алынып тасталуы есебінен жүреді. Синхронды деполяризация ГАМК(A) рецепторларын бұғаттау арқылы, Ca^{2+} импульстік амплитудасының жоғарылатады және трансмиттердің бөлінуіне алып келеді. Осылайша, бикукуллин деполяризациялық ығысуды орта есеппен 15 мВ-қа арттырады, бұл тербелістің пайда болуына немесе тербелістерінің синхрондалуына алып келеді. Бұл режимдегі нейронның ӘП өздігінен тоникалық белсенділігі мезгіл-мезгіл ПДЫ кластерлері түріндегі, Ca^{2+} импульсімен бірге жүретін ӘП-ның спонтанды жиынтық белсенділігімен үзіліп отырады. Кластер екі жоғары жиілікті тербелмелі жүйелерден тұрады, олардың бірі әрекет потенциалы, ал екіншісі, баяу (ПДЫ), ол осы ӘП - ның жиілігін басқарады.

Деполяризациялық сәт деполяризациялық ығысу деп аталады, және ол әдеттен тыс үлкен болғандықтан (≈ 40 мВ), пароксизмальды деполяризациялық ығысу деп атайды, ал ӘП спонтанды жиынтық белсенділігінің, классикалық тербелістерден ажырату үшін, пароксизмальды деполяризациялық ығысу кластерлері деп атайды. Пароксизмальды деполяризациялық ығысу потенциалының деполяризациялық ығысуы Na^+ каналының қозу потенциалынан төмен аймақта басталып, инактивацияланған Na^+ каналдарының реактивация потенциалынан жоғары аймақта аяқталатыны көрсетілген. Сондықтан пароксизмальды

деполяризациялық ығысу көбінесе бір әрекет потенциалына генерацияланады. Мұндай гиперполяризациялық канал ретінде эпиптогенді төмен шекті потенциалды тәуелді Kv7 типті калий каналы болуы мүмкін. Аксонның бастапқы бөлігінде (аксональды төбе аймағында) локализацияланған Kv7 типті калий каналы өзінің қасиеттеріне байланысты тек үлкен деполяризациялық ығысуларды өткізеді және ӘП (кластер) спонтанды белсенділік жиынтығының ұзақтығын анықтайды, өйткені ол осы уақытта инактивацияланған басқа потенциалға тәуелді каналдарға қарағанда ұзағырақ жұмыс істейді. Бұл каналдардың бірегейлігі тек потенциалды ғана емес, сонымен қатар химиялық лигандтарды да, яғни PIP2, G белок және Ca²⁺- CaM бета-гамма суббірліктерді басқарудан тұрады. Оның нейрондық қозғыштықты тежеудегі функционалдық маңыздылығы оның KCNQ1, KCNQ4 және KCNQ5 суббірліктеріндегі мутациялар эпипсияны тудыратындығымен расталады, ал Kv7 каналының агонисті ретигабин ұстаманы басады.

Kv7 активаторы ретигабин қазіргі уақытта ұстамаға қарсы, анальгетикалық және қабынуға қарсы агент ретінде сыналуда. Ретигабин кластердің ұзақтығын қысқартады және пароксизмальды деполяризациялық ығысу кластерінен кейін гиперполяризацияны арттырады. Кластерлердің ұзақтығы ретигабиннің қатысуымен 1,2±0,2 с-тан 0,5±0,2 с-қа дейін азаяды. Пароксизмальды деполяризациялық ығысу құрылымында гиперполяризация фазасы мүлдем жоқ, бұл Kv7 каналдарының кластерлік гиперполяризация және пароксизмальды деполяризациялық ығысу процестеріне қатысуын көрсетеді. Шамасы, пароксизмальды деполяризациялық ығысуды гиперполяризациялайтын каналдарды белсендіру үшін Na⁺ және K⁺ каналдарын қайта белсендіруді және ретигабиннің қатысуымен белсенді емес болып қалатын ӘП генерациясын қамтитын оқиғалар тізбегі қажет. Кластердің амплитудасы да біршама төмендейді. Kv7 каналының активаторы Ca²⁺ импульстарының ұзақтығын және сигнал амплитудасын азайтады. Kv7 каналдары кем дегенде кластерді және Ca²⁺ сигналын тоқтатуға қатысады және олардың ұзақтығын қысқартады. XE991 кластердің ұзақтығын арттырады және гиперполяризация жылдамдығын төмендетеді. XE991 қатысуымен гиперполяризация жылдамдығы шамамен 3 есе төмендейді. Блокатор пароксизмальды деполяризациялық ығысу амплитудасына әсер етпейді, яғни деполяризациялық ығысуға әсер етпейді. Kv7 канал блокаторы XE991 Ca²⁺ импульстарының ұзақтығын арттырады. Kv7 каналдары пароксизмальды деполяризациялық ығысу кластерінің қалыптасуына ықпал етеді. Kv7 XE991 блокаторы пароксизмальды деполяризациялық ығысу кластерінің ұзақтығын жоғарлатады, ал Kv7 активаторы ретигабин, керісінше, пароксизмальды деполяризациялық ығысу кластерінің ұзақтығын азайтады. Екі препаратта негізінен гиперполяризацияға әсер етеді ал деполяризациялық ығысуға әсері аз. Сонымен қатар, канал активаторы ПДЫ кластерінің соңындағы гиперполяризацияны күшейтеді.

Kv7 каналдарының тікелей блокаторлар мен активаторларының әсері ПДЫ кластерінің ұзақтығын реттейді және посткластерлік реполяризацияға қатысады. Бұл өз кезегінде осы процестерді таңдамалы түрде реттейтін препараттарды іздеудің жаңа жолын ашады (ПДЫ кластерлерінің амплитудасы мен ұзақтығы).

Қорытынды: Осылайша, осы кезеңде біз эпиптиформалық белсенділікті реттеуде Kv7 каналдарының маңызды рөлін көрсеттік. Kv7 тұқымдас калий каналдары ПДЫ кластерінің гиперполяризациядан кейінгі жылдамдығын арттыра отырып, эпиптиформды белсенділікте әрекет потенциалы жиын ұзақтығы және кальций импульстарының ұзақтығын төмендеуі көрсетілген. Kv7 каналдарының тікелей активаторлары мен ингибиторлары синхронды жиын белсенділіктің және Ca²⁺ импульстарының ұзақтығы, амплитудасы сияқты параметрлерін өзгертеді. Алайда эпиптиформды белсенді нейрондардағы деполяризациялық ығысу жиілігі өзгермейді. Kv7 тұқымдас калий каналдарының постсинапстық калий каналдары, нейрондардың эпиптиформды синхронды белсенділігін реттеуге қатысатыны көрсетілген. Kv7 каналдарының эпипсияға қарсы әсер ету механизмі ПДЫ кластерінің, ПДЫ гиперполяризациясының, ПДЫ кластерінің (ӘП жиыны) ұзақтығының және Ca²⁺ сигналының ұзақтығының төмендеуіне байланысты екені көрсетілді.

Авторлық үлестер:

Тұжырымдамасына қосқан үлесі – Тулеуханов С.Т., Зинченко В.П.

Ғылыми дизайн – Тусупбекова Г.А., Қайрат Б.Қ., Малибаева А.Е.

Мәлімделген ғылыми зерттеулерді орындау – Тулеуханов С.Т., Зинченко В.П., Тусупбекова Г.А., Қайрат Б.Қ., Малибаева А.Е.

Мәлімделген ғылыми зерттеулердің интерпретациясы – Тулеуханов С.Т., Зинченко В.П., Тусупбекова Г.А., Қайрат Б.Қ., Малибаева А.Е.

Ғылыми мақаланың құрылуы – Тулеуханов С.Т., Зинченко В.П., Тусупбекова Г.А.

Қаржыландыру: Зерттеу Қазақстан Республикасы Ғылым және жоғары білім министрлігі Ғылым Комитетінің қаржылық қолдауымен орындалды (грант AP19680470 Эпипсиялық белсенділік моделіндегі гиперқозудың реттелуіне фосфоинозитолдифосфаттың (PIP2) және калий каналдарының Kv7 қатысуы).

Мүдделер қақтығысы: Авторлар мүдделер қақтығысының жоқтығы туралы мәлімдемейді.

Зерттеудің ашықтығы: мақаланың мазмұнына авторлар жауапты.

Әдебиеттер:

1. Avoli M., D'Antuono M., Louvel J., Köhling R., Biagini G., Pumain R., D'Arcangelo G., Tancredi V. Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. Progress in neurobiology. 2002. Vol. 68, No 3. P. 167–207.

2. Battefeld A., Tran B.T., Gavrillis J., Cooper E.C., Kole M.H.P. Heteromeric Kv7.2/7.3 Channels Differentially Regulate Action Potential Initiation and Conduction in Neocortical Myelinated Axons. Journal of Neuroscience. 2014. Vol. 34. P. 3719-3732.

3. Dwivedi D., Bhalla U.S. Physiology and Therapeutic Potential of SK, H, and M Medium AfterHyperPolarization Ion Channels. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2021. Vol. 14. P. 658435.
4. Dynnik V.V., Kononov A.V., Sergeev A.V., Tankanag A., Zinchenko V.P. To Break or to brake neuronal network accelerated by ammonium ions? *PLoS ONE*. 2015. Vol. 10, No 7. P. e0134145.
5. Fanger C.M., Ghanshani S., Logsdon N.J., Rauer H., Kalman K., Zhou J. et al. Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance K(Ca) channel, IKCa1. *J. Biol. Chem*. 1999. Vol. 274. P. 5746–5754.
6. Gaidin S., Zinchenko V., Teplov I., Tuleukhanov S., Kosenkov A. Epileptiform activity promotes decreasing of Ca²⁺ conductivity of NMDARs, AMPARs, KARs, and voltage-gated calcium channels in Mg²⁺-free model. *Epilepsy Research*. 2019. Vol. 158. P. 106224.
7. Miceli F., Soldovieri M.V., Martire M., Tagliatela M. Molecular pharmacology and therapeutic potential of neuronal Kv7-modulating drugs. *Curr. Opin. Pharmacol*. 2008. Vol. 8. P. 65–74.
8. Nappi P., Miceli F., Soldovieri M.V., Ambrosino P., Barrese V., Tagliatela M. Epileptic channelopathies caused by neuronal Kv7 (KCNQ) channel dysfunction. *Pflugers Arch*. 2020. Vol. 472. P. 881–898.
9. Nikitin E.S., Vinogradova L.V. Potassium channels as prominent targets and tools for the treatment of epilepsy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2021. Vol. 25. P. 223–235.
10. Poduri A. Lowenstein D. Epilepsy Genetics-Past, Present, and Future. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2011. Vol. 21. P. 325–332.
11. Reddy D.S., Kuruba R. Experimental models of status epilepticus and neuronal injury for evaluation of therapeutic interventions. *Int J Mol Sci*. 2013. Vol. 14. P. 18284–18318.
12. Schumacher M.A., Rivard A.F., Bächinger H.P., Adelman J.P. Structure of the gating domain of a Ca²⁺-activated K⁺ channel complexed with Ca²⁺/calmodulin. *Nature*. 2001. Vol. 410. P. 1120–1124.
13. Staley K., Hellier J.L., Dudek F.E. Do interictal spikes drive epileptogenesis? *Neuroscientist*. 2005. Vol. 11. P. 272–276.
14. Zinchenko V.P., Teplov I.Y., Kosenkov A.M., Gaidin S.G., Kairat B.K., Tuleukhanov S.T. Participation of calcium-permeable AMPA receptors in the regulation of epileptiform activity of hippocampal neurons. *Front. Synaptic Neurosci*. 2024. Vol. 16. P. 1349984.
15. Maiorov S.A., Kairat B.K., Berezhnov A.V., Zinchenko V.P., Gaidin S.G., Kosenkov A.M. Peculiarities of ion homeostasis in neurons containing calcium-permeable AMPA receptors. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2024. Vol. 754, P. 109951.
16. Gaidin S.G., Zinchenko V.P., Teplov I.Y., Tuleukhanov S.T., Kosenkov A.M. Epileptiform activity promotes decreasing of Ca²⁺ conductivity of NMDARs, AMPARs, KARs, and voltage-gated calcium channels in Mg²⁺-free model. *Epilepsy Res*. 2019. Vol. 158. P. 106224.
17. Dolgacheva L.P., Tuleukhanov S.T., & Zinchenko V.P. Participation of Ca²⁺-Permeable AMPA Receptors in Synaptic Plasticity. *Biochemistry. Moscow Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 2020. Vol.14.-P.194 - 204.
18. Adelman J.P. SK channels and calmodulin. *Channels* 10, 2016. P.1–6.
19. Brown D.A., Passmore G.M. Neural KCNQ (Kv7) channels. *Br. J. Pharmacol*. 2009. Vol.156. P. 1185–1195.
20. Hansen H.H., Waroux O., Seutin V., Jentsch T.J., Aznar S., Mikkelsen J.D. Kv7 channels: interaction with dopaminergic and serotonergic neurotransmission in the CNS//J. Physiol. -2008.-Vol. 586, -P.1823–1832.

Автор туралы мәліметтер:

Тұлеуханов Султан Тұлеуханович – б.ғ.д., академик, Қазақстан Республикасының Ұлттық Ғылым Академиясының корреспондент-мүшесі, әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті. Алматы қ, Қазақстан Республикасы. тел: 87015501045, e-mail: sultan.tuleuhanov@kaznu.edu.kz, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9898-0507>.

Зинченко Валерий Петрович - биология ғылымдарының докторы, профессор, жасушаішілік сигнализация зертханасының меңгерушісі, Ресей Ғылым Академиясының Клетка биофизикасы институты. Пущино қ, Ресей. тел: +79162354895, e-mail: vvpz@mail.ru . <https://orcid.org/0000-0002-1990-3803>.

Қайрат Бақытжан Қайратұлы - әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, биология және биотехнология факультеті, биофизика және биомедицина және нейроғылым кафедрасының аға-оқытушысы. Алматы қ, Қазақстан Республикасы. тел: 87083200507, e-mail: bakytzhan.kairat@kaznu.edu.kz. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1742-2667>.

Тусупбекова Гүлмира Аблаевна - әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, биология және биотехнология факультеті, биофизика және биомедицина және нейроғылым кафедрасының профессор м.а., Алматы қ, Қазақстан Республикасы. тел: +7 708 110 7679 e-mail: gulmira.tussupbekova@kaznu.edu.kz ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9379-4687>.

Малибаева Арайлым Ержанқызы - әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, биология және биотехнология факультеті, биофизика және биомедицина және нейроғылым кафедрасы, PhD докторант. Алматы қ, Қазақстан Республикасы. тел: 87478760641, e-mail: arai_07_20@mail.ru. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4759-9087>.

Хат алмасуға жауапты автор:

Тұлеуханов Султан Тұлеуханович – б.ғ.д., профессор, Қазақстан Республикасының Ұлттық Ғылым Академиясының академигі, әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті. Алматы қ, Қазақстан Республикасы.

Почталық адрес: Қазақстан Республикасы, Алматы қ., Республика Казахстан, Алматы, 050040 пр. аль-Фараби, 71/19. 426 каб.

E-mail: sultan.tuleuhanov@kaznu.edu.kz

Телефон: 8 701 550 10 45