

ВИВЧЕННЯ ЕЛЕКТРИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ МЕМБРАНИ ГАНГЛІОЗНИХ КЛІТИН СІТКІВКИ

Веселовська Н. М.

*Міжнародний центр молекулярної фізіології НАН України
Київський міський офтальмологічний центр*

Ключові слова: гангліозні клітини сітківки, потенціал дії, електрична активність, кальцієві сигнали, блокатори потенціалкерованих каналів, глаукома.

Сучасні дослідження в області нейрофізіології дозволили кардинально змінити уяву про природу ішемічних уражень нейронів та отримати вагомі докази про механізм клітинної смерті, який спрацьовує і при нейродегенеративних захворюваннях. В наших попередніх роботах проведені електрофізіологічні дослідження ізольованих гангліозних клітин сітківки [1, 2]. Проте в літературі обмежена кількість робіт присвячена вивченню їх електрофізіологічних особливостей в умовах цілісного препарату сітківки. З посиланням на те, що гангліозні клітини сітківки (ГКС), як вихідні нейрони, що забезпечують передачу аферентної інформації від сітківки до вищих мозкових центрів, вивчення електрофізіологічних механізмів їх функції на рівні внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації, мають особливе значення для пошуку нових підходів профілактики сліпоти при нейродегенеративних процесах, зокрема глаукоми [3, 4, 8].

Мета роботи: вивчити потенціал-керовані кальцієві струми та зміни внутрішньоклітинного кальцію гангліозних клітин сітківки на ізольованому препараті сітківки.

Матеріал та методи

Дослідження були виконані за правилами роботи з піддослідними тваринами в установах НАН України на цілісних препаратах сітківки щурів віком 4–6 тижнів із застосуванням методики фіксації потенціалу/струму у конфігурації «ціла клітина». Препарат сітківки ока фіксували в експериментальній камері з постійною перфузією 1 мл/хв оксигенованим фізіологічним розчином, який вміщав NaCl 140, KCl 3, CaCl₂, MgCl₂, NERES 10, глюкозу 12 при pH 7,3–7,4. Додатково застосовували блокатори потенціалкерованих натрієвих (тетродотоксин-ТТД), потенціал-керованих калієвих (тетраетиламоній-ТЕА; 4-амінопіридин-4-АП; α -дендротоксин α -ДДТ) та кальцієвих (хлорид кадмію, 200 мкМ) каналів. Реєстрацію потенціалів/струмів здійснювали з використанням спеціальних піпетова-

них електродів, які заповнювали відповідними до реєстрації високочастотної генерації потенціалу дії (ПД), внутрішньоклітинної концентрації кальцію та кальцієвих струмів внутрішньоклітинними розчинами. Потенціал спокою клітин під час реєстрації підтримували на рівні -70 mV, пропускаючи відповідний постійний струм. Реєстрували високочастотну імпульсацію ГКС у відповідь на деполяризуючі імпульси струму з використанням підсилювача Axopatch-200B («Axon Instruments», США). Для аналізу отриманих даних застосовували аналого-цифровий перетворювач Digidata 1332, програмні пакети pClamp 8.2 та Clampfit 8.2 («Axon Instruments», США). Дослідження зміни внутрішньоклітинного кальцію проводили за розробленою нами методикою. Для цього кальцій-чутливий флуоресцентний барвник Indo-1 у концентрації 100 мкМ додавали у внутрішньоклітинний розчин, що надавало можливість після утворення конфігурації «ціла клітина» завантажити барвник у окрему ГКС. Кальцієві сигнали ГКС при деполяризації визначали по зміні відношення інтенсивностей флуоресценції барвника Indo-1 на хвилях довжиною 408 та 480 нм (R) за допомогою спектрофотометричної установки (Carin Research Ltd, Велика Британія) у режимі епіфлуоресценції.

Результати

При дослідженні пасивних електричних властивостей ГКС встановлено, що середні значення потенціалу спокою у ГКС ока щура відповідають значенням, отриманим у попередніх дослідженнях [1, 5]. Вхідний опір, постійна часу мембрани та ємність клітини значно відрізнялись (на порядок величини) для ГКС різного типу [3, 6].

При дослідженні характеру у імпульсації та форми окремого ПД у ГКС нами виявлено, що у 50 з 53 ГКС ока щура (94%) спостерігали тонічний характер імпульсації, тобто ці клітини генерували ПД протягом усього деполяризуючого імпульсу (рис.1, а), при цьому миттєва частота ПД була максимальною на початку деполяризації

та протягом 100–200 мс досягала стаціонарного рівня.

Так при деполяризації ГКС реєстрували тонічну генерацію ПД, яка призводила до лінійного зростання внутрішньоклітинної концентрації кальцію протягом деполяризації, після завершення якої та відповідного припинення генерації ПД внутрішньоклітинна концентрація кальцію експоненційно зменшувалась. Середнє значення постійної часу спаду кальцієвого сигналу склало $5,1 \pm 0,3$ с ($n=5$). Залежність амплітуди кальцієвого сигналу від середньої частоти генерації ПД протягом деполяризації достатньо добре апроксимувалась лінійною функцією. Даний коефіцієнт є оцінкою добутку амплітуди та постійної часу спаду кальцієвого сигналу, викликаного окремим ПД. Лінійна залежність амплітуди сигналу від частоти ПД свідчить, вірогідно, про відсутність за умов проведених нами дослідів ефектів, пов'язаних з кальцій-індукованим викидом кальцію з внутрішньоклітинних депо.

На ізольованому препараті цілої сітківки ока щура було досліджено потенціалкеровані кальцієві струми гангліозних клітин сітківки. Кальцієві струми ізолювали за допомогою блокатора натрієвих та блокаторів калієвих каналів, які додавали у зовнішній фізіологічний розчин. Хлориду цезію входив до складу внутрішньоклітинного розчину. Кальцієві струми активували деполяризуючими імпульсами від потенціалу спокою (-70 мВ) до рівня $+40$ мВ з інкрементом $5-10$ мВ.

Максимальний кальцієвий (високопороговий) струм спостерігали при мембранному потенціалі -10 мВ, його середнє значення склало -207 ± 27 пА ($n=15$). При цьому у частині (40%) досліджених нейронів був наявний низькопороговий кальцієвий струм, максимальне значення якого спостерігали при мембранному потенціалі -40 мВ, середнє значення склало -99 ± 18 пА ($n=9$). Вперше на ізольованому препараті сітківки було одночасно зареєстровано потенціал-керовані кальцієві струми та зміни внутрішньоклітинного кальцію, який вони викликають, визначено характеристики відповідних кальцієвих сигналів. При деполяризації мембрани ГКС до рівня -10 мВ (значення мембранного потенціалу, при якому спостерігали максимальний кальцієвий струм) реєстрували зміни внутрішньоклітинної концентрації кальцію. При цьому залежність амплітуди кальцієвих сигналів від тривалості деполяризуючого імпульсу у діапазоні $0,5-2,5$ с

достатньо добре апроксимувалась лінійною функцією, а спад сигналів мав експоненційний характер з постійною часу, середнє значення якої склало $6,5 \pm 0,5$ с ($n=8$). Середнє значення відповідного коефіцієнта пропорційності склало $0,61 \pm 0,26$ нМ/с ($n=5$). Проведена нами одночасна реєстрація серій ПД або кальцієвих струмів та викликаних ними кальцієвих сигналів надає можливість докладніше дослідити мембранні механізми, які впливають на кальцієвий гомеостаз ГКС, що є надзвичайно важливим як для вивчення важливих для фундаментальної нейрофізіології процесів передачі та кодування зорової інформації, так і для аналізу патологічних змін, що відбуваються у сітківці ока при різних захворюваннях [6, 7].

Висновки

1. Вперше на ізольованому препараті сітківки ока щура методом фіксації потенціалу/струму у конфігурації «ціла клітина» з одночасною реєстрацією внутрішньоклітинного кальцію визначено характеристики високочастотної тонічної імпульсації ГКС, встановлено роль потенціалкерованих каналів, що забезпечують її генерацію, зареєстровано кальцієві сигнали, викликані імпульсацією ГКС.

2. Потенціал-керовані кальцієві канали модулюють форму окремого ПД у ГКС, проте їх блокування не впливає на здатність даних клітин генерувати високочастотну імпульсацію.

3. Вперше на ізольованому препараті сітківки зареєстровано та визначено характеристики кальцієвих сигналів, викликаних імпульсацією ГКС, виявлено лінійну залежність амплітуди кальцієвих сигналів від частоти генерації ПД, визначено характеристики потенціал-залежних кальцієвих струмів недисоційованих ГКС, встановлено наявність низькопорогового кальцієвого струму у частині даних клітин.

4. Вперше на ізольованому препараті сітківки одночасно зареєстровано потенціал-керовані кальцієві струми та зміни внутрішньоклітинного кальцію, який вони викликають.

5. Проведені дослідження властивостей і функцій іонних каналів ГКС створюють теоретичну основу для пошуку селективно діючих фармакологічних препаратів та нових підходів до ефективної цілеспрямованої корекції нейро-дистрофічних захворювань зорового аналізатора.

Література

1. Веселовська Н. М., Веселовський М. С. «Іонні струми, що забезпечують електричну збудливість ізольованих гангліозних клітин сітківки ока щурів» *Фізіологічний журнал*, № 2, 2001, Київ, Україна, с. 32–40.
2. Веселовська Н. М., Веселовський М. С. «Механіз-

мы электрической активности изолированных ганглиозных клеток сетчатки крыс» *Архив клинической и экспериментальной медицины*, том 10, № 2, 2001, с. 134–135

3. O'Brien B. J., Isayama T., Richardson R., Berson, D.M. «Intrinsic physiological properties of cat

- retinal ganglion cells», *J.Physiol.*, 538, 787–802 (2002).
4. Cheung W., Guo L., Cordeiro M.F. «Neuroprotection in glaucoma: drug-based approaches», *Optom Vis Sci.*, 85, 406–416 (2008)
 5. Grienkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. «A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties», *J.Biol.Chemistry*, 260, 3440–3450 (1985).
 6. Wang, G. Y., Robinson, D. W., Chalupa, L. M. «Calcium-activated potassium conductances in retinal ganglion cells of the ferret», *J.Neurophysiol.*, 79, 151–158 (1998).
 7. Gutman G A, Chandy K G, Grissmer S et al. «International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels» *Pharmacol Rev*, 57, 473–508 (2005)
 8. Mann M., Haq W., Zabel T., Guenter E., Zrenner E., Ladewig T. «Age-dependent changes in the regulation mechanisms for intracellular calcium ions in ganglion cells of the mouse retina» *Eur. J. Neurosci.* 22, 2735–2743 (2005)

STUDY OF ELECTRIC PROPERTIES OF MEMBRANE OF RETINA GANGLION CELLS

Veselovska N. M.

International Center of molecular Physiology NANU, Kyiv Ophthalmological Center, Kiev, Ukraine

Investigations of the intrinsic electrical properties of RGCs are essential for further understanding the mechanisms of processing, coding and transmitting of visual information as well as in intracellular calcium signalling. In the first time on retinal preparation firing-induced calcium signals were recorded and their characteristics were determined.

Keywords: retinal ganglion cells, voltage-gated channels blockers, action potential, firing activity, calcium signal, glaucoma.