

Н. М. Веселовська, М. С. Веселовський

Іонні струми, що забезпечують електричну збудливість ізольованих гангліозних клітин сітківки ока щурів

Исследованы свойства потенциалзависимых ионных каналов, обеспечивающих электровозбудимость свежеизолированных ганглиозных клеток сетчатки взрослых крыс. Входящие токи протекают по каналам тетрадоксинчувствительной натриевой, низко- и высокопороговой кальцевой проводимостей. Каналы калиевой проводимости представлены, в основном, функциями тетраэтиламмонийчувствительных медленно инактивирующихся и неинактивирующихся выходящих токов. Внеклеточное приложение 10 мкмоль/л ионов кадмия и 10 мкмоль/л нифедипина блокировало высокопороговые кальцевые токи на 28 и 60 % соответственно без заметного влияния на низкопороговые кальцевые, натриевые и калиевые токи.

Вступ

Збільшення численності захворювань, у генезі яких лежать різні форми порушень функції сітчастої оболонки ока, визначає актуальність досліджень властивостей клітин сітківки в нормі, патології та за умов впливу різних фармакологічних препаратів. Основне місце у разі патології сітківки займають захворювання, зумовлені судинними розладами [1]. Пусковим моментом у їх розвитку є ретинальна ішемія, тобто стан, при якому інтенсивність кровообігу в сітківці не відповідає її метаболічним витратам [8]. Відповідно до сучасних уявлень, гіпоксія призводить до накопичення в сітківці глутамату — основного збуджуючого нейротрансмітера у нервовій системі ссавців [10]. При цьому його екзо- й ендогенні впливи виявляються у порушенні електрофізіологічних властивостей усіх клітин сітчастої оболонки ока. А зміни нейронального обміну глутамату і властивостей мембранозв'язаних глутаматних рецепторів неминуче призводять до порушення кальцієвого гомеостазу клітин сітківки [3].

Загальноприйнятий спосіб лікування судинних захворювань — застосування судинорозширюючих препаратів, в основі яких лежить дія блокторів різних типів кальцієвої провідності на гладеньком'язові клітини судин [2]. У зв'язку з цим актуальним є дослідження впливу цих препаратів на основні функції клітин сітківки, особливо на гангліозні клітини сітківки (ГКС), які є останньою ланкою в процесі збору, обробки й передачі в центральну нервову систему зорової інформації.

Метою цієї роботи була розробка методу одержання ізольованих клітин сітчастої оболонки ока щурів та вивчення ізольованих типів іонних струмів, відповідальних за збудливість мембран ГКС, а також впливу на канали вхідного іонного струму відомого судинного препарату — ніфедипіну.

© Н. М. Веселовська, М. С. Веселовський

Методика

Дослідження проведено на свіжоізольованих ретинальних клітинах очей 30-добових щурів лінії Вістар. Тварин наркотизували інтраперитонеальним введенням хлорал гідрату в необхідній концентрації. Потім протягом 5 хв проводили енуклеацію та виділення сітківки.

Тканину сітківки поміщали в нормальний фізіологічний розчин з 0,1% пронази Е (фірма «Sigma», США) і витримували в інкубаторі протягом 5 хв при 36 °С. Після ферментативної обробки сітківку відмивали нормальним фізіологічним розчином. Далі проводили механічну дезагрегацію міжклітинних зв'язків, що залишилися, за допомогою послідовного піпетування Пастеровскими піпетками різного діаметра. Отриману клітинну суспензію поміщали в експериментальну камеру, де протягом 15–20 хв відбувалась адгезія клітин до покривного скла — дна камери.

Візуальний контроль клітин і мікрomanipуляції скляними мікропіпетками проводили на електрофізіологічній установці на базі інвертованого мікроскопа Axiovert 35 при збільшенні 1000X. Максимальну здатність забезпечували використанням об'єктива Plan Neoufluar 100X, апертура 1,3, із застосуванням масляної імерсії. Зображення досліджених клітин, отримані з мікроскопа за допомогою ССD-камери (КРС-600ВН, фірма «Sony», Японія), відцифровували за допомогою комп'ютера і зберігали на твердому диску для подальшого аналізу. Іонні струми через різні типи потенціалкероаних іонних каналів реєстрували методом фіксації потенціалу в конфігурації «ціла клітина» [6] за допомогою підсилювача Axopatch 1D, відцифровували АЦ/ЦА перетворювачем Labmaster TL-1 (фірма «Axon Instruments», США), і зберігали в персональному комп'ютері для подальшого аналізу. Аплікацію на мембрани клітин досліджуваних фармакологічних речовин і їх відмивання проводили за допомогою системи швидкої локальної перфузії [14].

Нормальний фізіологічний розчин містив (ммоль/л): NaCl — 140, KCl — 3, CaCl₂ — 2, MgCl₂ — 2, HEPES — 20, глюкози — 20; рН 7,4. У безнатрієвому розчині NaCl заміщали еквімолярною кількістю холіну-хлориду. Зміну позаклітинної концентрації кальцію в межах 0–5 ммоль/л робили без корекції осмотичності розчину. Внутрішньопіпеточний розчин (ммоль/л) для реєстрації вхідних струмів містив: CsCl — 150, MgCl₂ — 3, EGTA — 5, HEPES — 20, для вихідних — калійглюконат — 120, KCl — 30, MgCl₂ — 3, EGTA — 5, HEPES — 20, рН обох розчинів був 7,4 і доводився в першому випадку 1 моль/л CsOH, у другому — 1 моль/л КОН. Опір реєструючих піпеток в обох випадках складав 5–8 МОм і компенсувався електронною схемою підсилювача на 50–70 %. Усі експерименти проводили при кімнатній температурі (20–22 °С).

Обробку результатів здійснювали за допомогою програмного забезпечення pClamp v. 6.0 (фірма «Axon Instruments», США), Origin v. 4.1, 5.0 (фірма «Microcal», США).

Результати та їх обговорення

Отримана суспензія ізольованих клітин сітківки складалася з клітин, подібних за своїми формами і розмірам до типових ретинальних клітин, які

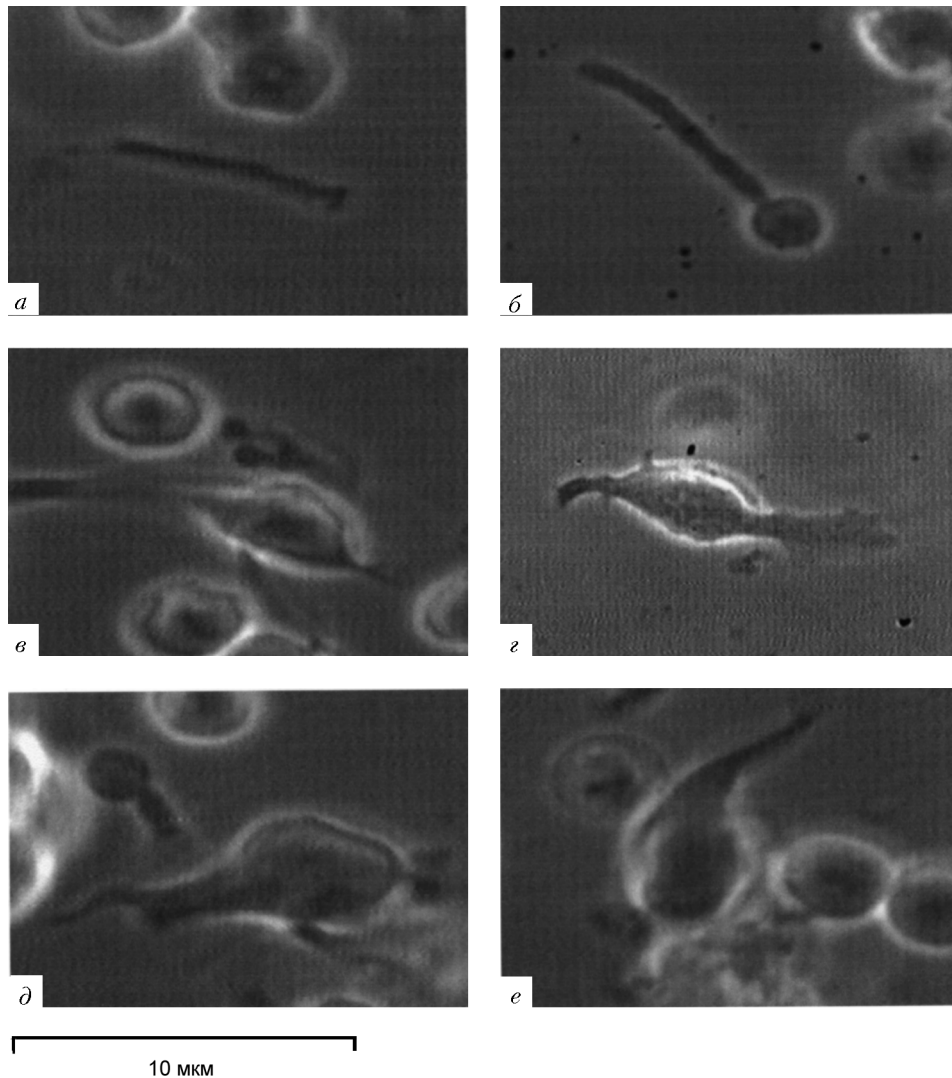


Рис. 1. Морфологічно різні типи ретинальних клітин, ізолюваних із сітчастої оболонки ока дорослих щурів.

відомі з гістологічних досліджень. Так, в отриманій суспензії була наявна велика кількість колбочок і паличок розміром $9,2 \text{ мкм} \pm 4,1 \text{ мкм}$ ($n = 25$), (рис. 1, а, б), біполярних клітин $5,4 \text{ мкм} \pm 3,2 \text{ мкм}$, ($n = 18$; рис. 1, в) і типових гангліозних клітин (рис. 1, г, д, е). Останні мали розміри семи в межах $7,3 \text{ мкм} \pm 3,2 \text{ мкм}$ ($n = 15$) і, як правило, один відросток. Усі клітки зберігали морфологічно характерну форму, що свідчило про цілісність цитоскелету і непошкодження клітинної мембрани.

Після прориву клітинної мембрани й утворення контакту піпеточного розчину з внутрішньоклітинним вмістом ізолюваної ГКС, на мембрані клітини встановлювався підтримуваний потенціал -70 мВ . У нормальному фізіологічному розчині при подачі деполаризуючого зсуву мембранного потенціалу реєструвався інтегральний трансмембранний струм вхідного — вихідного

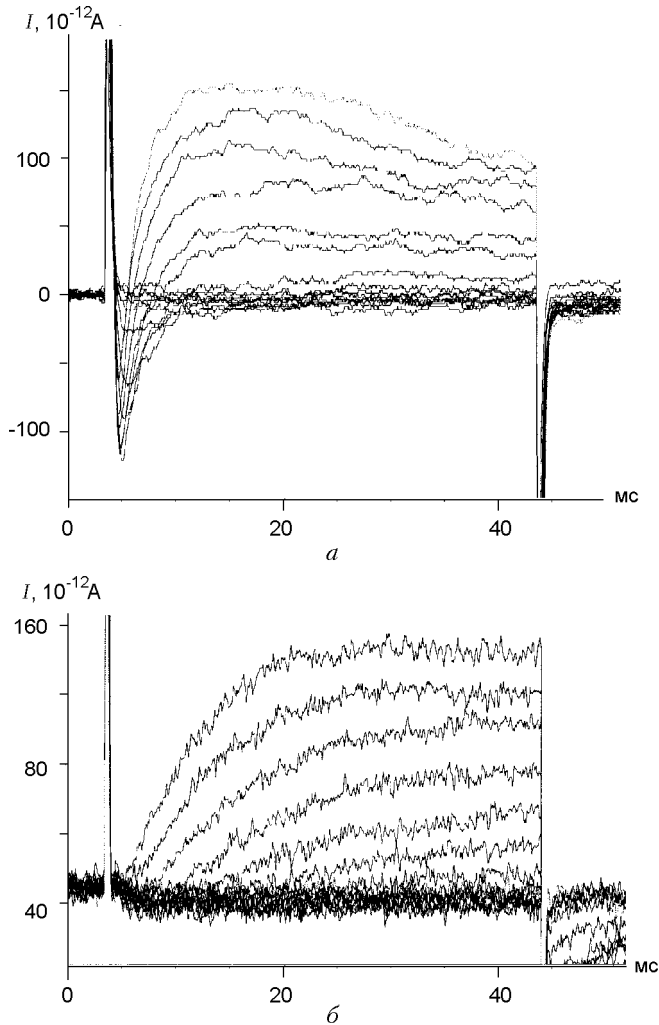


Рис. 2. Інтегральний (а) і вихідний калієвий (б) іонні струми в соматичній мембрані ізолюваних гангліозних клітин сітківки.

напрямок, сімейство якого для різних рівнів деполяризації мембрани показано на рис. 2, а. Видалення з позаклітинного розчину іонів натрію заміщенням їх на іони холіну й зменшення концентрації іонів кальцію до 0,5 ммоль/л призводило до зникнення вхідних струмів. Вихідний струм, який реєстрували за цих умов, являв собою сумарний калієвий струм. Він мав повільну кінетику активації і повільно інактивувався. Зрушення підтримуваного потенціалу до -50 мВ спричинювало ізоляцію вихідного калієвого струму, що не інактивується. Позаклітинна аплікація 10 ммоль/л тетраетил-амонію (ТЕА) блокувала калієвий вихідний струм у ГКС на 25% ($n = 5$).

Для виділення вхідних іонних струмів використовувалися внутрішньоклітинні розчини, у яких іони К еквімолярно були заміщені іонами Cs. При цьому протягом 5–7 хв після прориву клітинної мембрани, калієвий

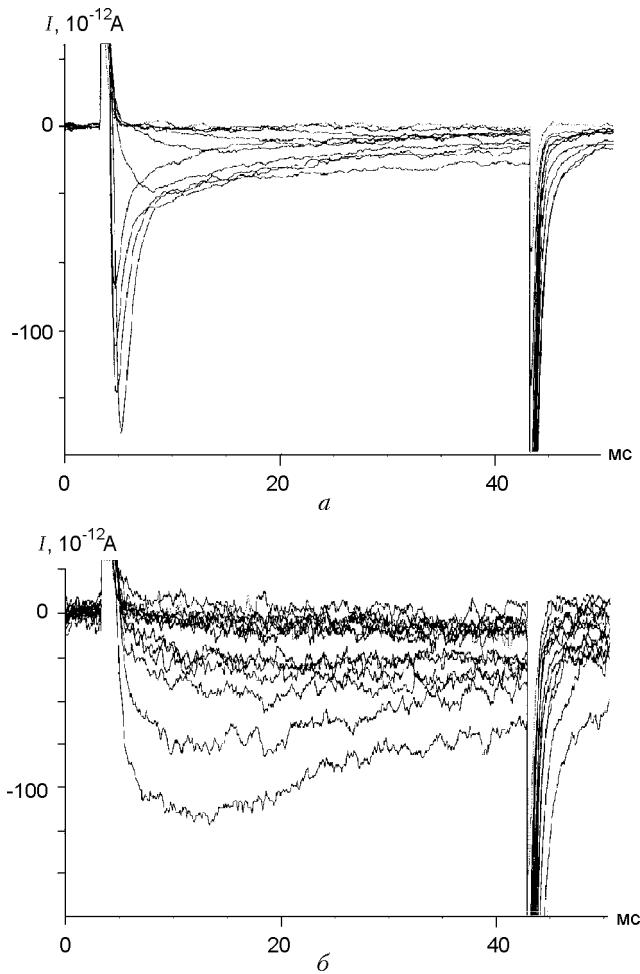


Рис. 3. Натрієві (а) і кальцієві (б) вхідні струми в мембрані ізольованих гангліозних клітин сітківки.

компонент інтегрального струму цілком зникав, що давало можливість реєструвати тільки вхідні іонні струми (рис. 3, а). Останні представляли суму натрієвого й кальцієвого вхідних струмів. Натрієвий компонент вхідного струму цілком і зворотно блокувався позаклітинним прикладанням тетрадоксину (ТТХ) у концентрації 0,25 мкмоль/л. Швидка кінетика активації й інактивації цього струму була типовою для ТТХ-чутливих натрієвих струмів, описаних раніше на інших клітинах [9].

Заміна в позаклітинному розчині іонів натрію на іони холіну призводила до повного зникнення натрієвих вхідних струмів і дозволяла реєструвати вхідні іонні струми через кальцієві потенціалкеровані канали (див. рис. 3, б). На сомі гангліозних клітин сітківки в ТТХ-утримуючому розчині у відповідь на прикладення деполаризуючих зсувів мембранного потенціалу щодо підтримуваного потенціалу -90 мВ виникав вхідний кальцієвий струм, вольт — амперна характеристика якого мала два піки, що відповідають низько- і високوپороговому кальцієвим струмам. Низькопороговий каль-

цієвий струм виникав при деполяризації мембрани від -70 до -35 мВ і досягав максимальної амплітуди при потенціалах -45 — -50 мВ ($n = 10$). У разі деполяризації мембрани понад -35 мВ розвивався неінактивований високопороговий кальцієвий струм, амплітуда якого сягала максимуму при -5 — -20 мВ ($n = 10$). Аналіз потенціалзалежності стаціонарної інактивації, а також кінетики активації й інактивації кальцієвого вхідного струму в ізольованих ГКС показав, що він переноситься по двох системах кальцієвих каналів: низько- і високопороговим (див. рис. 3, б), які подібні до описаних раніше на нейронах різних відділів ЦНС [4].

Висхідна частина низькопорогового кальцієвого вхідного струму могла бути апроксимована однією експонентою, зведеною до другого ступеня. Постійна часу цієї експоненти зменшувалася від $8,1$ до $1,8$ мс при зміні потенціалу мембрани від -80 до -20 мВ ($n = 4$). Інактивація цих струмів була потенціалзалежною і спад низькопорогового струму з вірогідністю 95% міг бути апроксимований однією експонентою з постійною часу, що зменшувалася від 84 до 17 мс при зміні потенціалу на мембрані від -80 до -20 мВ ($n = 4$). Зсув підтримуваного потенціалу до 60 мВ призводив до повної стаціонарної деактивації низькопорогового компоненту кальцієвого струму, що дозволяло реєструвати його високопороговий компонент. Висхідна частина високопорогового кальцієвого струму була також потенціалзалежною і апроксимувалась однією експонентою, але у першому ступені. Постійна часу цієї експоненти зменшувалася від 15 до 2 мс при зміні потенціалу мембрани від -20 до 30 мВ. Інактивація цих струмів не була потенціалзалежною, як було описано раніше на клітинах нервової системи ссавців [4].

Дія органічних блокаторів на різні компоненти високопорогового кальцієвого струму досліджувалася за умов зрушення підтримуваного потенціалу до -60 мВ для повної стаціонарної інактивації низькопорогового кальцієвого струму, тестуючий зсув мембранного потенціалу -20 мВ, тривалість тестуючого зсуву 400 мс, частота тестуючого стимулу була 600 с $^{-1}$.

Відомо, що Cd^{2+} у високих концентраціях є неселективним блокатором кальцієвих каналів, тоді як до кадмію в низьких концентраціях низькопорогові канали менш чутливі, ніж високопорогові. Аплікація 10 мкмоль/л Cd^{2+} призводила до пригнічення низькопорогового кальцієвого струму всього на $3\% \pm 1\%$, при цьому високопороговий струм пригнічувався на $28\% \pm 7\%$ ($n = 5$). Додавання 20 мкмоль/л Cd^{2+} викликало пригнічення низькопорогового струму на $6\% \pm 2\%$, а високопорогового — на $52\% \pm 4\%$ ($n = 5$; рис. 4, а). Подальше збільшення концентрації Cd^{2+} (50 мкмоль/л) не змінювало максимальну амплітуду високопорогового струму, тоді як низькопороговий зменшався на $18\% \pm 9\%$ ($n = 3$). Для всіх досліджених клітин дія на кальцієві струми іонів кадмію була зворотною.

Ніфедипін, відомий блокатор L-типу кальцієвих каналів, у концентрації 10 мкмоль/л, викликав зворотний ефект зменшення максимальної амплітуди високопорогового кальцієвого струму на $60\% \pm 5\%$ ($n = 6$; див. рис. 4, б).

Ми також досліджували можливий вплив ніфедипіну на інші, описані в даній статті, типи потенціалкерованих іонних каналів. Виявилось, що в концентраціях 5 — 15 мкмоль/л, специфічних для високопорогових

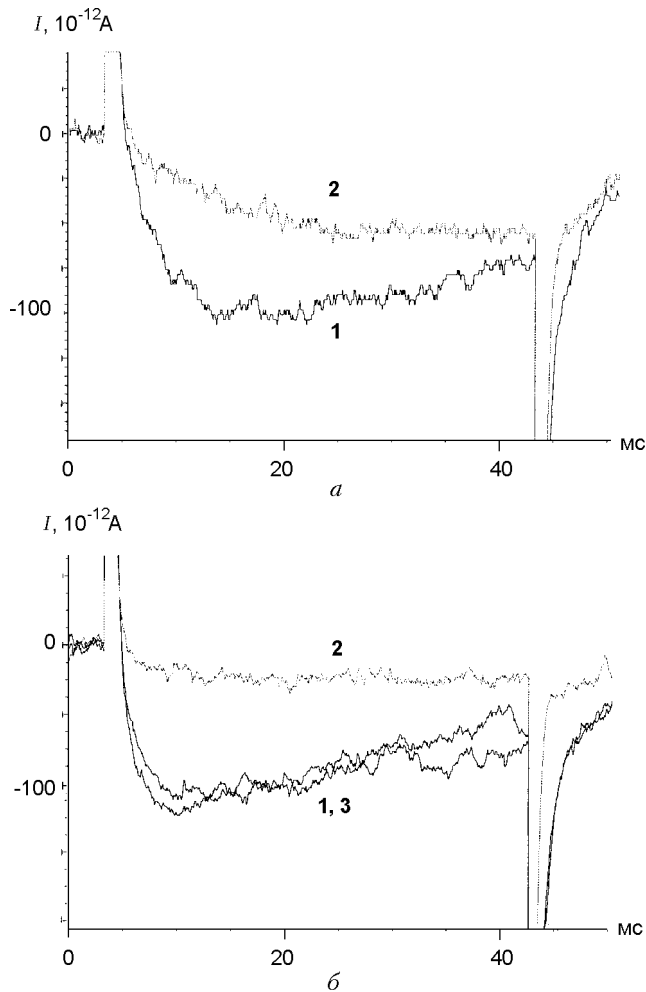


Рис. 4. Вплив кадмію (а) і ніфедипіну (б) на високопорогові кальцієві вхідні іонні струми у соматичній мембрані гангліозних клітин сітківки: 1 — нормальний фізіологічний розчин; 2 — кальцієвий струм під час прикладання блокатора; 3 — відмивка блокатора нормальним розчином.

кальцієвих струмів, ніфедипін не має помітного впливу на натрієву, калієву і низькопорогову кальцієву провідності.

Дослідження іонних механізмів збудливості ретинальних клітин дозволяє не тільки вивчити їх фундаментальні фізіологічні властивості, але і є найбільш адекватним методом тестування та пошуку фармакологічних препаратів для селективного лікування захворювань сітчастої оболонки ока.

У даній роботі розроблено метод одержання свіжоізольованих ГКС дорослих щурів і досліджено основні типи електрокерованих іонних каналів, що забезпечують їх збудливість.

Однією з основних проблем, що виникають при вивченні клітин сітчастої оболонки ока, є спосіб їх одержання для досліджень *in vitro*. Найбільш простим підходом є вивчення властивостей ретинальних клітин у свіжови-

ділений сітківці. Однак при цьому, завдяки багат шаровій структурі препарату, утруднена візуальна ідентифікація окремих типів клітин і швидка аплікація до їхніх мембран різних фармакологічно активних препаратів. Одержання функціонально нормальної культури ізольованих ретинальних клітин має деякі труднощі, специфічні для клітин сітківки, зокрема, необхідність додавання до культурального середовища окремих нейроростових факторів, що забезпечують нормальне переживання різних типів ретинальних клітин [13].

Вивчення електрофізіологічних властивостей свіжоізольованих ретинальних клітин є найбільш оптимальним експериментальним підходом при вирішенні багатьох задач. У розробленому нами методі ізоляції ретинальних клітин використано ферментативну обробку тканини сітківки, у поєднанні з мінімальним механічним впливом на клітини під час дезагрегації тканини за допомогою її піпетування. Все це дозволило одержати в суспензії окремі клітини (див. рис. 1), ідентичні за своїми морфологічними ознаками відомим типам інтактних ретинальних клітин, у тому числі і гангліозних [5, 12].

Збудливість соматичної мембрани ізольованих ГКС забезпечує специфічний набір електрокерованих іонних каналів: канали швидкого ТТХ-чутливого натрієвого, низько- і високопорогового кальцієвих вхідних струмів і канали калієвих вихідних струмів. При цьому виявилось, що високопорогова кальцієва провідність представлена, в основному, дигідропіридинчутливою фракцією: ніфедипін у малих концентраціях істотно блокував високопороговий кальцієвий струм. Аналогічні дані були отримані також деякими авторами [7, 11], однак, з іншого боку, було показано, що в соматичній мембрані культивованих ГКС щуренят ця фракція каналів становить не більше ніж 30 % [13]. Було відзначено, що наявність даного типу кальцієвих каналів різко збільшується в сомі ГКС у процесі онтогенезу.

Ніфедипін відомий як препарат для лікування захворювань, пов'язаних з порушеннями функції судин. Дигідропіридинчутливий кальцієвий струм був детально описаний у роботах на свіжоізольованих нейронах гіпокампа, його зрізах і культурі високої щільності гіпокампа. Оскільки в наших експериментах також зареєстровано ніфедипінчутливий кальцієвий струм, можна стверджувати, що й у ГКС є кальцієві канали L-типу, які і є основним шляхом входу іонів кальцію до гангліозної клітини сітківки.

У даній роботі на основі різної потенціалзалежності стаціонарних характеристик було показано, що сумарна калієва провідність ГКС представлена двома системами каналів. Одна з них забезпечує компонент калієвого струму, який повільно активується, інша відповідальна за його неіактивуючий компонент.

N. N. Veselovskaya, N.S. Veselovsky

IONIC CURRENTS RESPONSIBLE FOR EXCITABILITY OF ISOLATED RAT RETINAL ISOLATED GANGLION CELLS

Ionic currents responsible for excitability of retinal ganglion cells (RGC) freshly isolated from eyes of adult rats were studied. Outward potassium currents in RGC represented by populations of slow inactivating and non-inactivating currents. Inward

sodium currents were completely blocked by extracellular application of 0.25 mM TTX. Calcium conductance in freshly isolated RGC has two components: low- and high-threshold. Extracellular application of nifedipine (10 mM) or Cd²⁺ (10 mM) blocked high threshold calcium currents by 28% and 60%, correspondingly, without any significant effect on low threshold calcium currents.

Kiev Center of Eye Pathology;

*A. A. Bogomoletz Institute of Physiology
National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кацнельсон Л.Н., Форофонова Е.И., Бунин А.Я. Сосудистые заболевания глаза. — М. — 1990.
2. Caspar A.Z., Flammer J., Hendrichson P. Influence of nifedipine on the visual fields of patients with optic-nerve-head diseases // *Europ. J. Ophthalm.* — 1994. — **4**, № 1. — P. 24-28.
3. Crosson C.E., Wills J.A., Potter D.E. Effect of the calcium antagonist, nifedipine, on ischemic retinal dysfunction // *J. Ocul. Pharmacology* — 1990. — **6**, № 4. — P. 293-299.
4. Fedulova S.A., Kostyuk P.G., Veselovsky N.S. Two types of calcium channels in the somatic membrane of new born rat's dorsal root ganglion neurones // *J. Physiol.* — 1985. — **359**, Febr. — P. 431-446.
5. Fukuda Y. A three-group classification of rat retinal ganglion cells: histological and physiological studies // *Brain Research.* — 1977. — **119**. — P. 327-344.
6. Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.J. Improved patch clamp techniques for high-resolution current recording from cell and cell-free membrane patches // *Pflugers Arch.* — 1981. — **391**. — P. 85-100.
7. Karschin A., Lipton S.A. Calcium channels in solitary retinal ganglion cells from post-natal rat // *J. Physiol.* — 1989. — **418**. — P. 379-396.
8. Kohner E.V. Retinal ischemia // *Retina* — 1989. — V. II — P. 89-97.
9. Kostyuk P.G., Veselovsky N.S., Tsyndrenko A.Ya. Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons. I. Sodium currents // *Neuroscience*. — 1981. — **6**, № 12. — P. 2423-2430.
10. Kuhrt H., Harting W., Grimm D. Changes in CD44 and Apo E immunoreactivities due to retinal pathology of man and rat // *J. Hirnforsch.* — 1997. — **38**, № 2. — P. 223-229.
11. Lipton S.A., Tauck D.L. Voltage-dependent conductances of solitary ganglion cells dissociated from the rat retina // *J. Physiol.* — 1987. — **385**. — P. 361-391.
12. Perry V.H. The ganglion cell layer of the retina of the rat: a Golgi study // *Proc. Royal Soc., B.* — 1979. — **204**. — P. 363-375.
13. Taschenberger H., Grantyn R. Several types of Ca²⁺ channels mediate glutamatergic synaptic responses to activation of single Thy-1-immunolabeled rat retinal ganglion neurons // *J. Neuroscience.* — 1995. — **15**, № 3. — P. 2240-2254.
14. Veselovsky N.S., Engert F., Lux H.D. Fast local superfusion technique // *Eur. J. Physiol.* — 1996. — **432**. — P. 351-354.

*Київ. міськ. Центр судинно-ендокрин.
захворювань органу зору;*

*Ін-т фізіології ім. О. О. Богомольця
НАН України, Київ*

*Матеріал надійшов
до редакції 1.01.2001*