

К.І. Кузнецов, В.Ю. Маслов, С.А. Федулова, М.С. Веселовський

Вплив 4-амінопіридинчутливого компонента калієвого струму на високочастотну тонічну імпульсацію гангліозних клітин сітківки ока щура

Із застосуванням методу фіксації потенціалу/струму у конфігурації “ціла клітина” вивчали характеристики високочастотної імпульсної активності гангліозних клітин сітківки та роль у її генерації компонента інтегрального калієвого струму, чутливого до низьких концентрацій блокатора потенціалкерованих калієвих каналів 4-амінопіридину (4-АП). Аплікація 0,2 ммоль/л 4-АП призводила до зменшення частоти викликаної імпульсації гангліозних клітин на 62% ($n = 7$). При цьому тривалість піка окремих потенціалів дії збільшувалася на 133%, зменшувалися швидкість реполяризації на 63% та амплітуда слідової гіперполяризації на 83%. Також зменшувалась амплітуда інтегрального калієвого струму гангліозних клітин сітківки. 4-АП-чутливий компонент калієвого струму, отриманий відніманням залишкового струму після аплікації блокатора від контрольних значень ($1,61 \text{ нА} \pm 0,22 \text{ нА}$, $n = 6$), становив $0,40 \text{ нА} \pm 0,09 \text{ нА}$ ($n = 6$). Визначено, що помірне (на 25%) зменшення амплітуди калієвого струму суттєво впливає на характер імпульсної активності гангліозних нейронів. 4-АП-чутливий компонент був подібний до калієвого струму, опосередкованого каналами $Kv3.1/Kv3.2$. При цьому ймовірний вплив 4-АП на канали родини $Kv1$ виключали аплікацією специфічного блокатора цих каналів α -дендротоксину (100 нмоль/л), що не спричиняла достовірних змін ані в частоті імпульсної активності гангліозних нейронів, ані в показниках окремих потенціалів дії. Отримані результати вказують на ключову роль 4-АП-чутливого компонента калієвого струму у процесі генерації високочастотної імпульсної активності гангліозним клітинами сітківки ока щура за умов їх деполяризації, а також дають змогу припустити, що 4-АП-чутливий компонент інтегрального калієвого струму опосередковується $Kv3.1/Kv3.2$ -провідністю.

Ключові слова: гангліозні клітини сітківки, високочастотна імпульсація, 4-амінопіридин.

ВСТУП

Гангліозні клітини сітківки (ГКС) – нейрони, розташовані на внутрішній її поверхні. Функціональна активність фоторецепторів передається до ГКС через біполярні та амакринові клітини. Гангліозні нейрони відіграють важливу роль у інтегруванні, обробці, кодуванні та передачі зорової інформації до ЦНС. Тому дослідження їх функціональних властивостей є важливим для подальшого розуміння зазначених процесів. У літературі детально описано характер електричної активності та іонні

провідності ГКС у різних видів тварин [5, 10, 13]. Проте подальшого вивчення потребують механізми високочастотної тонічної генерації потенціалів дії (ПД) ГКС щурів у відповідь на деполяризувальний імпульс.

Нині загально визнаною є теза, що високочастотний характер імпульсної активності багатьох типів нейронів зумовлений експресією калієвих каналів $Kv3.1/Kv3.2$ на мембранах цих клітин [11, 12]. Вони являють собою високотривалі канали затриманого випрямлення з повільною інактивацією [1]. Кінетика активації/

© К.І. Кузнецов, В.Ю. Маслов, С.А. Федулова, М.С. Веселовський

деактивації цих каналів сприяє швидкій реполяризації та короткому перебігу ПД без активації струмів, що своїм внеском збільшували б рефрактерний період [12]. Однак мало відомо щодо внеску каналів Kv3.1/Kv3.2 у формування характеру електричної активності ГКС. Зокрема, була досліджена функціональна роль калієвих каналів Kv3.1 у імпульсації ГКС форелі [5]. Але ці дані не можуть бути прямо екстрапольовані на ГКС щурів внаслідок значної різниці в електрофізіологічних властивостях і мембранних струмах ГКС різних тварин [10, 13]. Відомо, що калієві канали Kv3.1/Kv3.2 мають високу чутливість до блокатора 4-амінопіридину (4-АП; $IC_{50} = 0,029$ та $0,1$ ммоль/л відповідно) [4]. Аплікація $0,2$ ммоль/л 4-АП, має повністю блокувати Kv3.1/Kv3.2-провідність, може впливати на провідність калієвих каналів родини Kv1 та не повинна блокувати канали інших типів [1, 4]. Вивчення дії 4-АП на функціональні властивості ГКС допоможе з'ясувати роль чутливого до нього компонента інтегрального калієвого струму у високочастотній генерації ПД цими нейронами. Для оцінки внеску Kv1-провідності у реалізації високочастотного характеру імпульсації ГКС та впливу на форму окремого ПД ми використовували специфічний блокатор Kv1 каналів α -дендротоксин (α -DTX).

Мета нашої роботи полягала в дослідженні ефектів низьких концентрацій 4-АП на характер електричної активності ГКС щурів у режимі фіксації струму та на калієві струми у режимі фіксації потенціалу.

МЕТОДИКА

Експерименти були проведені на білих щурах лінії Вістар віком 4–6 тиж. Кожну тварину асфіксували за допомогою CO_2 з наступною декапітацією згідно з правилами роботи з піддослідними тваринами в установах НАН України. Очні яблука виділяли та препарували по границі *ora ser-*

rata, видаляли кришталік, після чого сітківку обережно відлущували від шару пігментного епітелію та робили переріз зорового нерва в ділянці оптичного диска. Сітківку приколювали голками діаметром 25 мкм до дна реєстраційної камери (об'ємом 1 мл), вкритого інертним покриттям Sylgard, гангліозним шаром догори. Всі маніпуляції з препарування здійснювали у зовнішньоклітинному розчині. Камеру встановлювали на предметний столик прямого мікроскопа (Olympus BX 51 WI). Візуалізація препарату відбувалася за допомогою водно-імерсійного об'єктива (Olympus LUMPlan 40X) з робочою відстанню $3,6$ мм.

Внутрішня обмежувальна мембрана, що утворена відростками мюллеровських гліальних клітин, та шар оптичних волокон обмежують доступ до сом ГКС. Ці структури видалялися за допомогою кінчика patch-піпетки, як було описано раніше [10, 13]. Після цієї процедури реєстрацію здійснювали від клітин з однорідною, гладенькою поверхнею та негранулярною цитоплазмою. Всі наведені у роботі результати були отримані при кімнатній температурі (22 °C).

Реєстраційну камеру перфузювали (2 мл/хв) карбогеномізованим зовнішньоклітинним розчином, що містив (ммоль/л): NaCl – 140 , KCl – 3 , $CaCl_2$ – 2 , $MgCl_2$ – 2 , NEPES – 10 , глюкози – 12 ; pH $7,4$ (доведений NaOH). Внутрішньоклітинний розчин містив (ммоль/л): K глюконату – 100 , KCl – 50 , $MgCl_2$ – 5 , EGTA – 10 , NEPES – 20 ; pH $7,4$ (доведений KOH). Необхідні концентрації блокаторів ($0,2$ ммоль/л 4-АП або 100 нмоль/л α -DTX) додавали безпосередньо у перфузійний розчин.

Реєстрації в режимі фіксації струму/потенціалу в конфігурації “ціла клітина” проводили із застосуванням підсилювача Axopatch-200B. Сигнали пропускали через низькочастотний фільтр підсилювача з частотою зрізу 5 кГц. Мембранні струми

та потенціали зберігали для подальшої обробки за допомогою перетворювача Digidata 1322A, підключеного до персонального комп'ютера з програмним забезпеченням pCLAMP 8.2 (Axon Instruments). Сигнали записували з частотою дискретизації 10 кГц та аналізували, застосовуючи програму Clampfit.

Використовували боросилікатні patch-піпетки з діаметром кінчика 1–1,5 мкм, що при наших розчинах визначало початковий електричний опір піпеток у межах 4–7 МОм. Ємнісні артефакти піпеток компенсували безпосередньо перед проривом клітинної мембрани після утворення гігаомного контакту. Клітинну ємність не компенсували, ємнісні артефакти використовували як зручний показник коректного віднімання струмів (див. нижче).

Аналізували лише клітини зі стабільним потенціалом спокою, більш негативним ніж -50 мВ. Висока амплітуда ПД ($87 \text{ мВ} \pm 4 \text{ мВ}$, $n = 12$) була додатковим критерієм реєстрації активності саме від ГКС, а не переміщених амакринових клітин (амплітуда ПД яких у середньому становить 55 мВ) [13]. Всі експерименти з фіксацією струму виконувалися при підтримуваному потенціалі -70 мВ для чого через клітину постійно пропускали відповідний гіперполяризувальний струм.

Вхідний опір, сталу часу мембрани та ємність клітини вимірювали в режимі фіксації струму за формою усередненого електротонічного потенціалу, викликаного аплікацією гіперполяризувального імпульсу малої амплітуди (10 пА).

Генерацію ПД у ГКС викликали серіями деполяризувальних прямокутних імпульсів тривалістю 500 мс та інкрементом амплітуди 5–10 пА. Надто великі струми викликали блокування генерації ПД, тому амплітуда стимулювального імпульсу не перевищувала 50–300 пА (залежно від внутрішнього опору клітини). До аналізу брали тільки тонічні нейрони – ці клітини мають здатність постійно генерувати ПД під час

перебігу деполяризувального імпульсу. Для більшості протестованих клітин миттєва частота імпульсації (1 / міжімпульсний інтервал) мала максимальне значення на початку деполяризувального імпульсу, згодом зменшувалася за експонентою та після 200–300 мс сягала сталого рівня. Як характеристику здатності клітини до високочастотної генерації нами було обрано середню частоту ПД, що вимірювалася у останні 100 мс деполяризувального імпульсу [10].

Для запобігання впливу високочастотної імпульсації на ширину окремого ПД його показники вимірювали при мінімальному надпороговому імпульсі. Для кожної клітини вимірювали поріг і амплітуду ПД, швидкість деполяризації, ширину (на напіввисоті), швидкість реполяризації та амплітуду слідової гіперполяризації.

При аналізі потенціалкерованих калієвих струмів клітини спершу тестували на тонічність у режимі фіксації струму, після чого перемикали підсилювач у режим фіксації потенціалу. Для блокади вхідних натрієвих і кальцієвих струмів використовували тетродотоксин (ТТХ, 0,001 ммоль/л) і хлорид кадмію (0,1 ммоль/л) відповідно. Підтримуваний потенціал становив -70 мВ. Безпосередньо перед аплікацією командного деполяризувального потенціалу прикладали гіперполяризувальний (до значення мембранного потенціалу -100 мВ) преімпульс тривалістю 200 мс для запобігання інактивації калієвих каналів. Інтегральні калієві струми викликали аплікацією потенціалів тривалістю 400 мс та інкрементом +10 мВ (до +40 мВ). 4-АП-чутливі струми отримували цифровим відніманням амплітуди струму за наявності блокатора від контрольного значення. Для побудови усередненого вольт-амперного графіку амплітуди струмів були вноормовані на контрольне значення струму при потенціалі +40 мВ.

У роботі було використано реактиви виробництва фірми „Sigma“ (США). Результати

тати представлені як середнє \pm стандартна похибка середнього. Для їх статистичного аналізу використовували парний критерій т Стьюдента. Різниця середніх вважалася статистично достовірною при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ

Середній потенціал спокою ГКС шурів становив $-57 \text{ мВ} \pm 2 \text{ мВ}$ ($n = 17$), що відповідає значенням, отриманим у попередніх дослідженнях [10, 13]. Вхідний опір ($0,65 \text{ ГОм} \pm 0,07 \text{ ГОм}$), стала часу мембрани ($28 \text{ мс} \pm 3 \text{ мс}$) і клітинна ємність ($47 \text{ пФ} \pm 6 \text{ пФ}$) коливалися в широких межах для різних клітин. Результати узгоджуються з раніше отриманими даними на морфологічно різних ГКС [10], що свідчить про реестрацію нами також ГКС

різних типів.

Ми спостерігали тонічний характер імпульсації у всіх 12 ГКС шурів, тобто ці клітини мали здатність постійно генерувати ПД під час перебігу деполяризувальної команди. Середня максимальна частота імпульсації, виміряна в останні 100 мс командного сигналу, становила $50 \text{ Гц} \pm 5 \text{ Гц}$ ($n = 12$). Ширина окремого ПД тонічних клітин була $1,2 \text{ мс} \pm 0,1 \text{ мс}$ ($n = 12$), поріг $-46 \text{ мВ} \pm 2 \text{ мВ}$, амплітуда $87 \text{ мВ} \pm 4 \text{ мВ}$, швидкість деполяризації $154 \text{ мВ/мс} \pm 14 \text{ мВ/мс}$, швидкість реполяризації $102 \text{ мВ/мс} \pm 11 \text{ мВ/мс}$ та амплітуда слідової гіперполяризації $18 \text{ мВ} \pm 2 \text{ мВ}$.

Аплікація 4-АП істотно зменшувала максимальну сталу частоту імпульсації до $19 \text{ Гц} \pm 2 \text{ Гц}$ ($n = 7$; рис. 1, а). Показники окремого ПД також суттєво змінювалися:

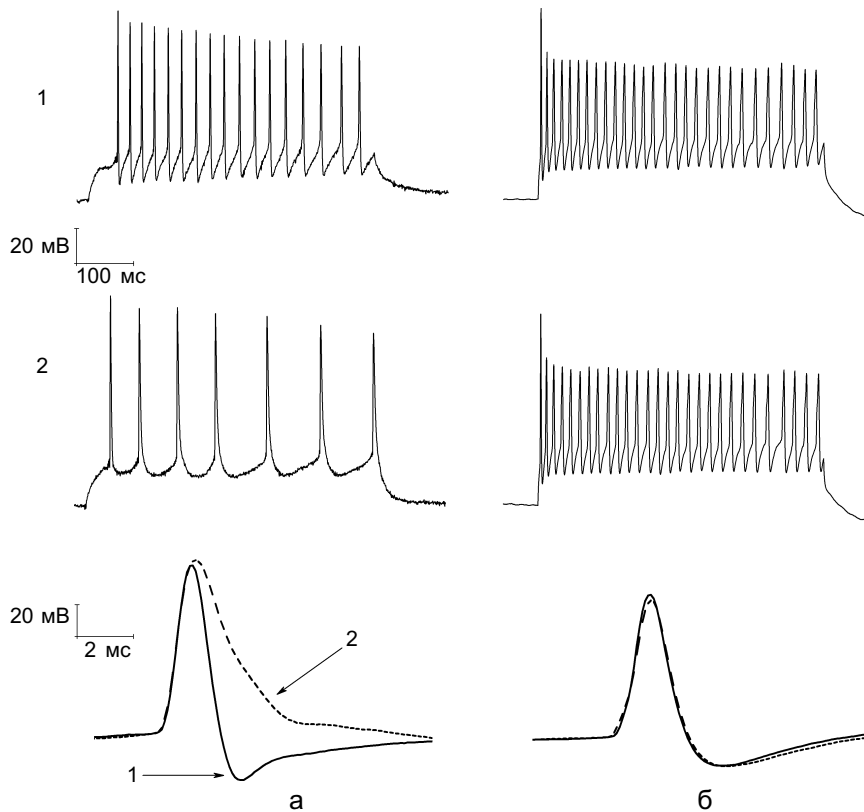


Рис. 1. Дія блокаторів калієвих каналів на характер викликаної імпульсації та форму окремого потенціалу дії у гангліозних клітинах сітківки шурів: а – 4-амінопіридин (0,2 ммоль/л), б – α -дендротоксин (100 нмоль/л); 1 – контрольні записи, 2 – реестрація за наявності відповідного блокатора. Наведені дані в стовбцях отримані з двох різних клітин

ширина становила $2,8 \text{ мс} \pm 0,3 \text{ мс}$, амплітуда слідової гіперполяризації $3 \text{ мВ} \pm 2 \text{ мВ}$ і швидкість реполяризації $38 \text{ мВ/мс} \pm 7 \text{ мВ/мс}$. Разом з тим поріг, амплітуда ПД і швидкість деполяризації достовірно не змінювалися (рис. 2).

Специфічний блокатор каналів Kv1 α -DTX достовірно не впливав на частоту імпульсації ГКС і показники окремого ПД ($n = 5$; рис. 1, б; 2).

Калієві струми виділялися через блокування вхідних потенціалкерованих натрієвих і кальцієвих каналів за допомогою ТТХ

і хлориду кадмію. Деполяризувальні потенціали, позитивніші за -40 мВ , викликали вихідні струми з повільною або відсутньою інактивацією (рис. 3). Максимальна амплітуда струму (при потенціалі $+40 \text{ мВ}$) становила $1,61 \text{ нА} \pm 0,22 \text{ нА}$ ($n = 6$). Для аналізу блокувального ефекту 4-АП на калієві струми, ми використовували таку саму його концентрацію, як і в експериментах з фіксацією струму. Аплікація 4-АП спричиняла помірний (25%), проте достовірний, блок струму. Середнє значення 4-АП-чутливого струму становило $0,40 \text{ нА} \pm$

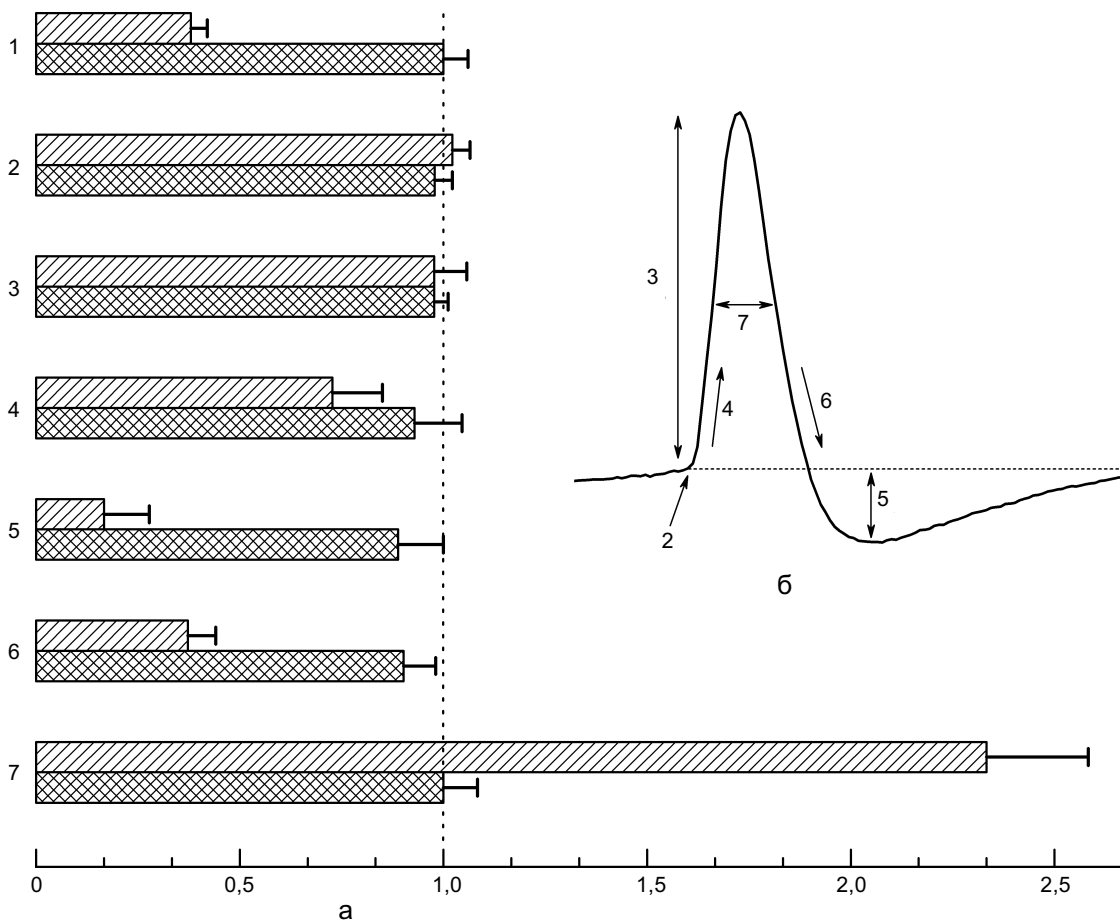


Рис. 2. Статистичне порівняння частоти імпульсації (а, 1) гангліозних клітин сітківки щурів та параметрів окремого потенціалу дії (2 – поріг виникнення, 3 – амплітуда, 4 – швидкість деполяризації, 5 – амплітуда слідової гіперполяризації, 6 – швидкість реполяризації, 7 – ширина) до і після аплікації блокаторів. Заштриховані однією похилою лінією планки – аплікація 0,2 ммоль/л 4-амінопіридину, двома перехресними – аплікація 100 нмоль/л б й α -дендротоксину. Середнє значення у контролі приймали за одиницю, експериментальні дані були знормовані відносно нього. Похибка представлена як стандартна похибка середнього. б – схематичне відображення показників окремого потенціалу дії. Цифрові позначення на вставці відповідають таким для рис.2, а

0,09 нА ($n = 6$). Цей струм за властивостями (потенціал активації, повільна інактивація) був подібний до описаних раніше Kv3.1/Kv3.2-струмів, отриманих як у різних нативних нейронах [2, 3, 8, 9, 11, 12], так і в штучних експресійних системах [11, 12].

ОБГОВОРЕННЯ

За допомогою методів реєстрації в конфігурації “ціла клітина” в умовах фіксації струму/потенціалу ми досліджували мембранні властивості ГКС шурів.

ГКС ссавців відрізняються за морфологією, а також функціональними та електрофізіологічними властивостями [10]. Незважаючи на це, властивості імпульсації більшості цих клітин є схожими: вони

виявляють високочастотний характер генерації ПД у відповідь на тривалу деполяризацію [10].

За електрофізіологічними властивостями ГКС шурів подібні до центральних нейронів з високою частотою імпульсації, наприклад, інтернейронів неокортекса [3] та гіпокампа [8], нейронів *nucleus tractus solitarii* [2] та клітин Пуркінє [9]. Усі досліджені нами клітини генерували швидкі (шириною близько 1 мс) ПД із високою частотою ($50 \text{ Гц} \pm 5 \text{ Гц}$, $n = 12$).

Компонент інтегрального калієвого струму, чутливий до низьких концентрації 4-АП, відіграє ключову роль у забезпеченні характерної електричної активності ГКС шурів. Аплікація цього блокатора значно змінювала частоту генерації та показники окремого ПД та мала помірний вплив на

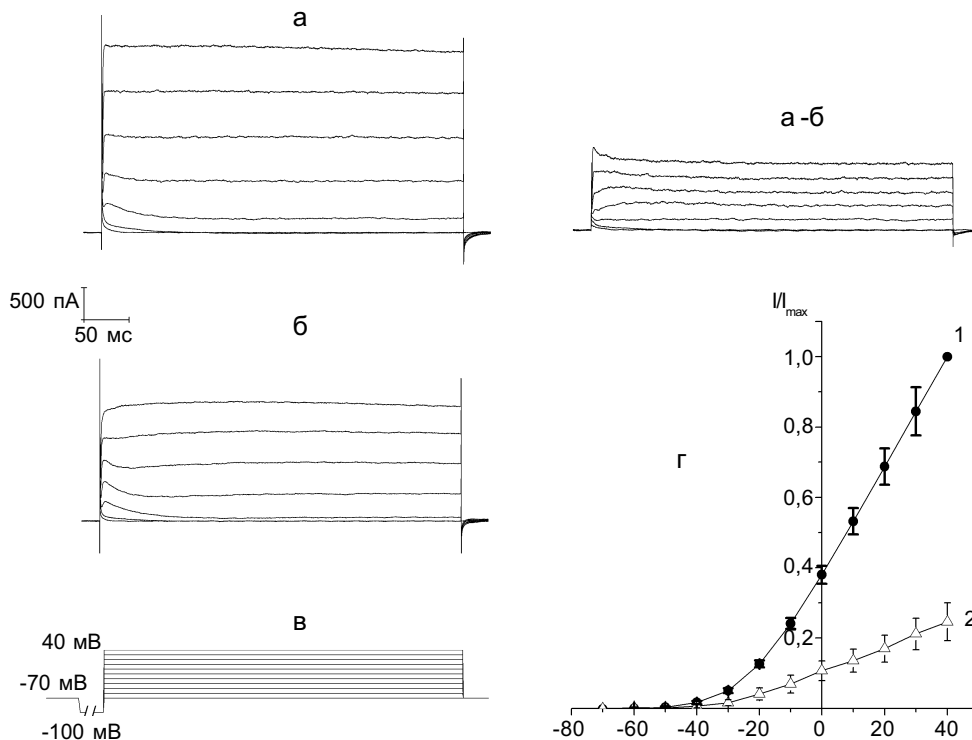


Рис. 3. Викликані деполяризацією калієві струми у гангліозних клітинах сітківки шурів, де а – контрольні записи калієвих струмів в тонічних гангліозних клітинах сітківки; б – калієві струми після аплікації 0,2 ммоль/л 4-амінопіридину; а – б) – чутливий до блокатору компонент інтегрального калієвого струму; в – форма командного сигналу; г – графік нормованої вольт-амперної характеристики усереднених контрольних записів (1) та різницевого струму (2). Значення струмів були знормовані на величину контрольного струму при команді +40 мВ (I_{\max}). Похибка представлена як стандартна похибка середнього

потенціалкеровані калієві струми. Важливим є той факт, що порівняно незначне блокування інтегрального калієвого струму (на 25%) призводить до істотного зниження частоти імпульсації ГКС (на 62%), збільшення ширини окремого ПД (на 133%), зменшення швидкості реполяризації (на 63%) та амплітуди слідової гіперполяризації (на 83%). 4-АП-чутливий компонент інтегрального калієвого струму, зареєстрований в наших експериментах, є подібним до Kv3.1/Kv3.2-зумовлених струмів, що було описано в попередніх працях [2, 3, 8, 9, 11, 12].

Використана концентрація 4-АП (0,2 ммоль/л), крім блокади Kv3.1- ($IC_{50} = 0,029$ ммоль/л) та Kv3.2- ($IC_{50} = 0,1$ ммоль/л) провідностей, певною мірою впливає на канали родини Kv1 [1, 4]. Для оцінки можливої ролі каналів Kv1.1 ($IC_{50} = 0,16-1,1$ ммоль/л), Kv1.2 ($IC_{50} = 0,2-0,8$ ммоль/л) та Kv1.6 ($IC_{50} = 0,3-1,5$ ммоль/л) у реалізації процесів, що за нашим припущенням зумовлюються Kv3.1- та Kv3.2- провідностями, ми використали α -DTX (специфічний блокатор Kv1.1, $IC_{50} = 20$ нмоль/л, Kv1.2, $IC_{50} = 17$ нмоль/л, та Kv1.6, $IC_{50} = 20$ нмоль/л) [1, 4], проте, його аплікація ніколи не призводила як до істотного зменшення частоти імпульсації, так і до змін показників окремого ПД. Стала часу інактивації потенціалкерованих калієвих каналів Kv1.3 ($IC_{50} = 0,2-1,5$ ммоль/л) становила 250–600 мс [1] – 4-АП-чутливий компонент калієвого струму у наших експериментах помітно не інактивувався протягом 400 мс (див. рис. 3, а–б). Калієві канали Kv1.4 ($IC_{50} = 0,013-0,7$ ммоль/л) зумовлюють так званий “транзйентний” струм, що має швидку кінетику інактивації $\approx 20-40$ мс [1] – різницевий струм не мав у своєму складі істотного компонента з подібною кінетикою (рис. 3, а–б). Мало досліджено наявність експресії каналів Kv1.5 ($IC_{50} = 0,27-0,4$ ммоль/л) у ГКС: нам відомо принаймні дві праці, що описують експресію цих каналів у ГКС дорослих щурів [6] та її повну

відсутність [7]. В існуючих літературних даних ми не знайшли жодних свідочств щодо експресії каналів Kv1.7 ($IC_{50} = 0,15-0,25$ ммоль/л) у ГКС або інших клітинах сітківки ока щура. Також слід відмітити електричні властивості калієвих каналів родини Kv1. Для всіх їх типів потенціал активації становить близько -50 мВ [1, 4], проте, потенціал активації 4-АП-чутливого компонента калієвого струму у наших експериментах був значно позитивніший за зазначений (див. рис. 3, в). Це свідчить про відсутність внеску каналів родини Kv1 у реалізацію високочастотної імпульсної активності ГКС та у формування окремого ПД.

Отже, 4-АП-чутливий компонент інтегрального калієвого струму відіграє ключову роль у реалізації високочастотної генерації ПД у ГКС дорослих щурів. Досліджені нами клітини мають схожий характер електричної активності з ГКС інших видів тварин. Описані фармакологічні та кінетичні властивості цього компонента подібні до властивостей Kv3.1/Kv3.2-струму у ГКС і центральних нейронах різних тварин [2, 3, 8, 9, 11, 12]. Таким чином, отримані результати свідчать, що 4-АП-чутливий компонент інтегрального калієвого струму забезпечується Kv3.1- та Kv3.2-каналами, проте, для остаточного доведення цього факту бажано провести додаткові дослідження із застосуванням специфічних блокаторів каналів Kv3, методів імуноцитохімії та полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією.

К.И. Кузнецов, В.Ю. Маслов, С.А. Федулова, Н.С. Веселовский

4-АМИНОПИРИДИНЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ КОМПОНЕНТ КАЛИЕВОГО ТОКА И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА ВЫСОКОЧАСТОТНУЮ ТОНИЧЕСКУЮ ИМПУЛЬСАЦИЮ ГАНЛИОЗНЫХ КЛЕТОК СЕТЧАТКИ КРЫС

Используя метод фиксации потенциала/тока в конфигурации “целая клетка” изучали характеристики высокочастотной импульсной активности ганглиозных клеток

сетчатки и роль в ее генерации компонента интегрального калиевого тока, чувствительного к низким концентрациям блокатора потенциалуправляемых калиевых каналов 4-аминопиридина (4-АП). Аппликация 0,2 ммоль/л 4-АП приводила к снижению частоты вызванной импульсации ганглиозных клеток на 62% ($n = 7$). При этом длительность одиночных потенциалов действия увеличивалась на 133%, уменьшались скорость реполяризации на 63% и амплитуда следовой гиперполяризации на 83%. Также снижалась амплитуда интегрального калиевого тока ганглиозных клеток сетчатки. 4-АП-чувствительный компонент калиевого тока, полученный вычитанием остаточного тока после аппликации блокатора из контрольных значений ($1,61 \text{ нА} \pm 0,22 \text{ нА}$, $n = 6$), был равен $0,40 \text{ нА} \pm 0,09 \text{ нА}$ ($n = 6$). Определено, что умеренное (на 25%) снижение амплитуды калиевого тока существенно влияет на характер импульсной активности ганглиозных нейронов. 4-АП-чувствительный компонент проявлял сходство с калиевым током, опосредованным каналами Kv3.1/Kv3.2. При этом вероятное влияние 4-АП на каналы семейства Kv1 исключалось аппликацией специфического блокатора этих каналов α -дендротоксина (100 нмоль/л), которая не имела достоверных эффектов ни на частоту импульсной активности нейронов, ни на показатели одиночных потенциалов действия. Полученные результаты свидетельствуют о ключевой роли 4-АП-чувствительного компонента калиевого тока в процессе генерации высокочастотной импульсной активности ганглиозными клетками сетчатки крыс при их деполяризации. Приведенные факты позволяют также предположить, что 4-АП-чувствительный компонент интегрального калиевого тока опосредован Kv3.1/Kv3.2-проводимостью.

Ключевые слова: ганглиозные клетки сетчатки, высокочастотная импульсация, 4-аминопиридин.

**K.I. Kuznetsov, V.Yu. Maslov, S.A. Fedulova,
N.S. Veselovsky**

4-AP-SENSITIVE POTASSIUM CURRENT AND ITS INFLUENCE ON HIGH FREQUENCY TONIC FIRING OF THE RAT RETINAL GANGLION CELLS

High frequency firing properties of the rat retinal ganglion cells and role of 4-AP-sensitive potassium current in firing generation were studied using whole cell patch-clamp techniques. Potassium channel blocker 4-AP (0,2 mM) reduced depolarization-evoked firing rate by 62% (from 50 ± 5 , $n = 12$ to 19 ± 2 Hz, $n = 7$). Single action potential parameters were affected: half-width was increased by 133% (from $1,2 \pm 0,1$, $n = 12$ to $2,8 \pm 0,3$ ms, $n = 7$), decay slope was decreased by 63% (from 102 ± 11 , $n = 12$ to 38 ± 7 mV/ms, $n = 7$) and afterhyperpolarization amplitude by 83% (from 18 ± 2 , $n = 12$ to 3 ± 2 mV, $n = 7$). 4-AP application (0,2 mM) reduced potassium current amplitude of the retinal neurons. 4-AP-sensitive current was obtained by digital subtraction of current that was registered in the presence of the blocker from control

current records ($1,61 \pm 0,22 \text{ нА}$, $n = 6$). 4-AP-sensitive current was equal to $0,40 \pm 0,09 \text{ нА}$ ($n = 6$). Thus, moderate (25%) reducing of potassium current amplitude leads to essential changes in firing properties of retinal neurons. 4-AP-sensitive residual current was similar to Kv3.1/Kv3.2 potassium currents that were described in literature previously. Moreover, we excluded the possibility of 4-AP influence on Kv1 channels by specific blocker α -dendrotoxin (100 nM) application. Such applications significantly affected neither firing frequency nor single action potential parameters. The data obtained suggest that 4-AP-sensitive current plays a key role in high frequency firing generation in the rat retinal ganglion cells. We assume that the 4-AP-sensitive current is mediated by Kv3.1/Kv3.2 conductance.

Keywords: retinal ganglion cell, high frequency tonic firing, 4-AP.

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
International Center Molecular Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Coetzee W. A., Amarillo Y., Chiu J., Chow A., Lau D., McCormack T., Moreno H., Nadal M. S., Ozaita A., Pountney D., Saganich M., Vega-Saenz d. M., Rudy B. Molecular diversity of K⁺ channels // *Ann. N.Y.Acad.Sci.* – 1999. – **868**. – P. 233-285.
2. Dallas M. L., Atkinson L., Milligan C. J., Morris N. P., Lewis D. I., Deuchars S. A., Deuchars J. Localization and function of the Kv3.1b subunit in the rat medulla oblongata: focus on the nucleus tractus solitarii // *J.Physiol.* – 2005. – **562**, № 3. – P. 655-672.
3. Erisir A., Lau D., Rudy B., Leonard C. S. Function of specific K(+) channels in sustained high-frequency firing of fast-spiking neocortical interneurons // *J.Neurophysiol.* – 1999. – **82**, № 5. – P. 2476-2489.
4. Gutman G. A., Chandy K. G., Grissmer S., Lazdunski M., McKinnon D., Pardo L. A., Robertson G. A., Rudy B., Sanguinetti M. C., Stuhmer W., Wang X. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels // *Pharmacol.Rev.* – 2005. – **57**, № 4. – P. 473-508.
5. Henne J., Jeserich G. Maturation of spiking activity in trout retinal ganglion cells coincides with upregulation of Kv3.1- and BK-related potassium channels // *J.Neurosci.Res.* – 2004. – **75**, № 1. – P. 44-54.
6. Holtje M., Brunk I., Grosse J., Beyer E., Veh R. W., Bergmann M., Grosse G., Ahnert-Hilger G. Differential distribution of voltage-gated potassium channels Kv1.1 – Kv1.6 in the rat retina during development // *J.Neurosci.Res.* – 2007. – **85**, № 1. – P. 19-33.
7. Koeberle P. D., Wang Y., Schlichter L. C. Kv1.1 and Kv1.3 channels contribute to the degeneration of retinal ganglion cells after optic nerve transection in vivo //

- Cell Death and Diff. – 2010. – **17**, № 1. – P. 134-144.
8. Lien C. C., Jonas P. Kv3 potassium conductance is necessary and kinetically optimized for high-frequency action potential generation in hippocampal interneurons // J.Neurosci. – 2003. – **23**, № 6. – P. 2058-2068.
 9. Martina M., Metz A. E., Bean B. P. Voltage-dependent potassium currents during fast spikes of rat cerebellar Purkinje neurons: inhibition by BDS-I toxin // J.Neurophysiol. – 2007. – **97**, № 1. – P. 563-571.
 10. O'Brien B. J., Isayama T., Richardson R., Berson D. M. Intrinsic physiological properties of cat retinal ganglion cells // J.Physiol. – 2002. – **538**, № 3. – P. 787-802.
 11. Rudy B., Chow A., Lau D., Amarillo Y., Ozaita A., Saganich M., Moreno H., Nadal M. S., Hernandez-Pineda R., Hernandez-Cruz A., Erisir A., Leonard C., Vega-Saenz d. M. Contributions of Kv3 channels to neuronal excitability // Ann.N.Y.Acad.Sci. – 1999. – **868**. – P. 304-343.
 12. Rudy B., McBain C. J. Kv3 channels: voltage-gated K⁺ channels designed for high-frequency repetitive firing // Trends Neurosci. – 2001. – **24**, № 9. – P. 517-526.
 13. Wang G. Y., Ratto G., Bisti S., Chalupa L. M. Functional development of intrinsic properties in ganglion cells of the mammalian retina // J.Neurophysiol. – 1997. – **78**, № 6. – P. 2895-2903.

*Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ;
Міжнар. центр молек. фізіології НАН України, Київ
E-mail: kir.kuznet@gmail.com*

*Матеріал надійшов до
редакції 27.05.2010р.*