

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

## Кальцієві сигнали, викликані тонічною імпульсацією гангліозних клітин сітківки ока щура

*На ізольованому препараті сітківки ока щура в конфігурації “ціла клітина” зареєстровано кальцієві сигнали, викликані тонічною імпульсацією гангліозних клітин сітківки (ГКС), та досліджено модульовальний вплив на ці сигнали Kv3-калієвих каналів. Деполяризація ГКС імпульсами струму тривалістю 500 мс призводила до тонічної генерації потенціалів дії (ПД) і розвитку кальцієвих сигналів, амплітуда яких лінійно залежала від середньої частоти ПД, відповідне значення кутового коефіцієнта становило  $1,4 \text{ с}\cdot\text{нмоль/л} \pm 0,2 \text{ с}\cdot\text{нмоль/л}$  ( $n = 5$ ). Постійна часу спаду кальцієвих сигналів була  $6,8 \text{ с} \pm 1,4 \text{ с}$  ( $n = 5$ ). При аплікації 500 мкмоль/л тетраетиламонію, який у цій концентрації блокує калієві канали Kv3.1/Kv3.2, реєстрували зменшення частоти генерації та збільшення ширини ПД, а також зменшення амплітуди слідової гіперполяризації. Кутовий коефіцієнт залежності амплітуди кальцієвого сигналу від середньої частоти генерації ПД за наявності блокатора зросло до  $2,1 \text{ с}\cdot\text{нмоль/л} \pm 0,3 \text{ с}\cdot\text{нмоль/л}$  ( $n = 5$ ). Постійна часу спаду сигналу достовірно не змінилася ( $8,9 \text{ с} \pm 1,6 \text{ с}$ ;  $n = 5$ ). Таким чином, потенціалкервані калієві канали типу Kv3.1/Kv3.2, які відіграють ключову роль у забезпеченні високочастотної тонічної імпульсації ГКС, також модулюють відповідні кальцієві сигнали та запобігають значному збільшенню внутрішньоклітинної концентрації кальцію та його можливій цитотоксичній дії.*

*Ключові слова:* гангліозні клітини сітківки, тонічна імпульсація, кальцієві сигнали, Kv3-калієві канали.

### ВСТУП

Гангліозні клітини сітківки (ГКС) ока є кінцевими вихідними нейронами, що передають імпульсацію від зорових рецепторів у центральну нервову систему. Однією з їх властивостей є здатність до високочастотної генерації потенціалів дії (ПД). Імпульсація при відносно тривалій (500 мс) деполяризації більшості ГКС є тонічною, при цьому ПД генеруються з достатньо високою частотою, середнє значення якої може перевищувати  $100 \text{ с}^{-1}$  [4, 8]. При розвитку ПД і відповідній деполяризації клітинної мембрани активуються високопорогові потенціалкервані кальцієві канали, що призводить до збільшення внутрішньоклітинної концентрації кальцію. Слід відзначити, що

кальцієва сигналізація ГКС на цілому препараті сітківки залишається практично недослідженою, у літературі нам відома лише одна праця [7], в якій було проведено реєстрацію змін внутрішньоклітинної концентрації кальцію на недисоційованих клітинах. При дослідженні кальцієвих сигналів традиційно основну увагу приділяють внутрішньоклітинним і мембранним механізмам, що регулюють концентрацію кальцію (кальцієві депо, кальційіндукований викид кальцію, кальцієві АТФази тощо), тоді як роль потенціалкерваних каналів у формуванні кальцієвого сигналу залишається дослідженою недостатньо.

Ключову роль у забезпеченні високочастотної генерації як у центральних нейро-

нах [9], так і у ГКС [4] відіграють калієві канали типу  $Kv3.1/Kv3.2$ , активація яких забезпечує швидку реполяризацію мембрани та відповідно виникнення короткотривалого (близько 1 мс) ПД.

Детальні дані про роль потенціалкеро-ваних каналів, що забезпечують генерацію тонічної імпульсації та модуляцію викли-каних нею кальцієвих сигналів, є важливими як для фундаментальної нейрофізіології, так і для розробки нових підходів у терапії захворювань органів зору.

Мета нашої роботи – дослідження мо-дулювального впливу потенціалкеро-ваних каналів на характеристики кальціє-вих сигналів, викликаних імпульсацією ГКС ока щура.

## МЕТОДИКА

Препарування сітківки ока щура та елек-трофізіологічна реєстрація сигналів від ГКС принципово не відрізнялася від описаної в літературі [7, 8]. Щурів лінії Вістар віком 4–6 тиж асфіксували за допомогою  $CO_2$  з наступною декапітацією відповідно до правил роботи з дослідними тваринами в установах Національної академії наук України. Препарат сітківки приколювали голками діаметром 25 мкм до дна експе-риментальної камери, вкритої інертним покриттям Sylgard, через яку зі швидкістю близько 1 мл/хв пропускали фізіологічний розчин такого складу (ммоль/л):  $NaCl - 140$ ,  $KCl - 3$ ,  $CaCl_2 - 2$ ,  $MgCl_2 - 2$ ,  $Нерес - 10$ , глюкоза  $-12$ ; рН 7,4. Блокатор потенціалкеро-ваних калієвих каналів тетраетил-амоній (ТЕА) додавали у проточний фізіоло-гічний розчин. Досліди проводили при кімнатній температурі ( $22^\circ C$ ). Реєстрацію потенціалів у конфігурації “ціла клітина” в режимі фіксації струму проводили з вико-ристанням внутрішньоклітинного розчину такого складу (ммоль/л): глюконат калію  $- 100$ ,  $KCl - 50$ ,  $MgCl_2 - 5$ , EGTA  $- 0,2$ ,  $Нерес - 20$ , Na-АТФ  $- 3$ , Na-АДФ  $- 3$ , Na-

ГТФ  $- 0,5$ , кальційчутливий барвник Indo-1 (пентакалієва сіль)  $- 0,1$ , рН 7,4. Потенціал спокою клітин підтримували на рівні 70 мВ. ГКС активували деполяризувальними імпульсами струму тривалістю 500 мс та амплітудою до 300 пА з інкрементом 5–20 пА. Інтервали між стимулами зазвичай становили 60 с, цього було достатньо для відновлення базової внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію. Для ГКС у контролі та за наявності блокатора калієвих каналів визначали максимальне значення середньої частоти генерації ПД і показники окремого ПД (поріг, амплітуда, ширина на половині висоти та амплітуда слідової гіперполяризації) за допомогою програм-ного пакета Clampfit 9.0 («Axon Instru-ments», США)

Зміни концентрації іонів кальцію у нейронах реєстрували з використанням флуоресцентного кальційчутливого барв-ника Indo-1 за допомогою спектрофото-метричної установки («Carin Research Ltd», Велика Британія). У режимі епіфлюо-ресценції світло від ксенонової лампи пропускали через фільтр (360 нм), флюо-ресцентний сигнал від об’єкта за допо-могою системи дихроїчних дзеркал та оптичних фільтрів (408 та 480 нм) розді-ляли на два окремі потоки та реєстрували двома фотоелектронними помножувачами, сигнали від яких подавали на вхід спеціаль-ного підсилювача та при подальшому аналізі визначали їх відношення (R), значення якого відповідає певній концент-рації іонів кальцію [5]. Відповідність значень цього відношення та концентрацій кальцію було визначено експериментально у окремій серії калібрувальних дослідів з використанням внутрішньоклітинних роз-чинів з різною концентрацією кальцію. У цих дослідях було визначено значення R, які відповідають мінімальній ( $R_{min}$ ) та максимальній ( $R_{max}$ ) внутрішньоклітинним концентраціям кальцію, а також ефективне значення константи дисоціації барвника

( $K_d$ ). Відповідні значення становили: 0,58 ( $R_{min}$ ), 4,4 ( $R_{max}$ ) та 1,44 мкмоль/л ( $K_d$ ). З отриманих у досліджах значень  $R$  внутрішньоклітинну концентрацію кальцію визначали за наступною формулою:  $[Ca] = K_d \cdot (R_{min} - R) / (R - R_{max})$  [5].

У роботі було використано хімічні речовини виробництва «Sigma» (США) та кальційчутливий флуоресцентний барвник Indo-1 (пентакалієва сіль) виробництва «Molecular Probes» (США).

Результати досліджень представлені у вигляді: середнє значення  $\pm$  стандартна похибка середнього, об'єм вибірки ( $n$ ). Достовірність різниці середніх встановлювали з використанням парного тесту  $t$  Стьюдента ( $P < 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

*Пасивні електричні властивості, тонічна імпульсація ГКС і показники окремого ПД.* Середнє значення потенціалу спокою у ГКС ока щура становило  $-56$  мВ  $\pm$  1 мВ ( $n = 11$ ),

що збігається з даними, отриманим у попередніх дослідженнях [4, 7, 8, 10]. Вхідний опір ( $0,8$  ГОм  $\pm$   $0,15$  ГОм, діапазон значень  $0,4$ – $1,4$  ГОм,  $n = 11$ ), постійна часу мембрани ( $20$  мс  $\pm$   $3$  мс, діапазон значень  $9$ – $42$  мс,  $n = 11$ ) та ємність клітини ( $30$  пФ  $\pm$   $4$  пФ, діапазон значень  $11$ – $50$  пФ,  $n = 11$ ) значно відрізнялися для різних клітин. Цей факт узгоджується з літературними даними, отриманими на морфологічно різних ГКС [8] і свідчить про те, що у наших досліджах реєстрація проводилася від різних типів ГКС.

При деполяризації ГКС спостерігалася тонічна генерація ПД (рис. 1), середня частота якої при збільшенні амплітуди деполяризуючого імпульсу зростала, сягала певного стаціонарного рівня, а при наступному збільшенні деполяризації генерація ПД припинялася. Максимальній середній частоті становила  $60$  с<sup>-1</sup>  $\pm$   $13$  с<sup>-1</sup> ( $n=10$ ). Показники окремого ПД були: поріг  $-47$  мВ  $\pm$  1 мВ, амплітуда  $87$  мВ  $\pm$  1 мВ, ширина на половині висоти  $1,1$  мс  $\pm$   $0,04$  мс, амплітуда гіперполяризації  $-17$  мВ  $\pm$  1 мВ.

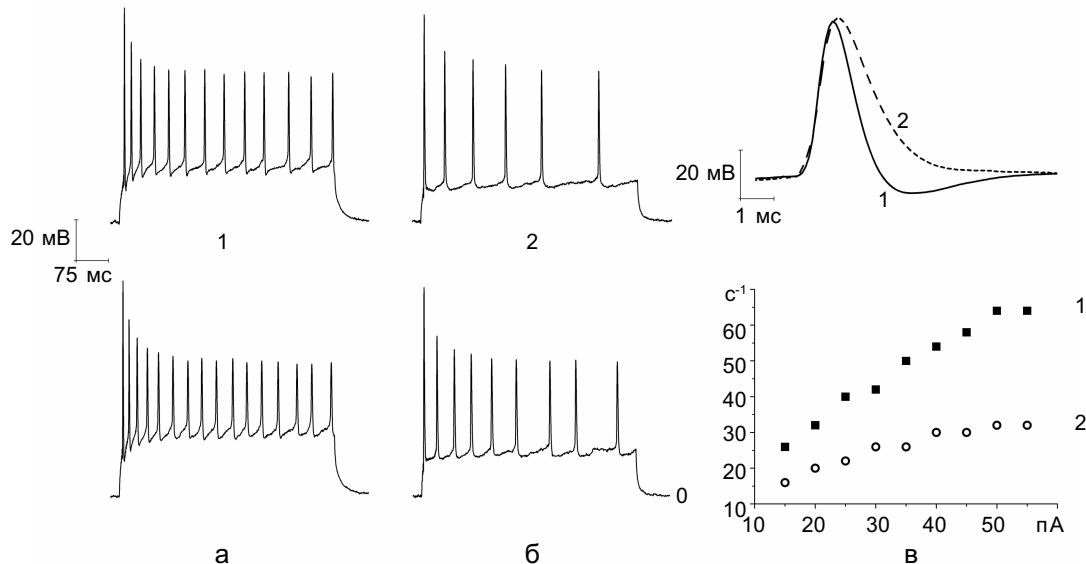


Рис. 1. Дія тетраетиламонію (ТЕА) на тонічну імпульсацію та форму окремого потенціалу дії (ПД) гангліозних клітин сітківки (ГКС) ока щура. Серії ПД, викликані деполяризацією мембрани ГКС, амплітуда деполяризуючих імпульсів  $30$  пА (верхній ряд) та  $50$  пА (нижній ряд), у контролі (а) та після аплікації  $500$  мкмоль/л ТЕА (б); в (верхня панель) – форма окремого ПД у контролі (1) та після аплікації  $500$  мкмоль/л ТЕА (2); в (нижня панель) – залежність середньої частоти генерації ПД від амплітуди деполяризуючого імпульсу у контролі (1) та після аплікації  $500$  мкмоль/л ТЕА (2)

Дія ТЕА на частоту імпульсації ГКС та параметри окремого ПД. З літературних даних відомо, що ключову роль у забезпеченні височастотної імпульсації як центральних нейронів [9], так і ГКС [4] відіграють потенціалкеровані калієві канали типу  $Kv3.1/Kv3.2$ . Для них характерною є чутливість до відносно низьких концентрацій ТЕА, значення  $IC_{50}$  становить 100–200 мкмоль/л [6]. Аплікація блокатора потенціалкерованих калієвих каналів ТЕА (500 мкмоль/л) суттєво зменшувала частоту генерації ПД у всіх 10 протестованих клітинах (див. рис. 1,б,в). При цьому максимальна частота ПД достовірно зменшувалася до середнього значення  $29 \text{ с}^{-1} \pm 7 \text{ с}^{-1}$  ( $P < 0,05$ ,  $n = 10$ ). Також після аплікації блокатора достовірно змінювалися середні значення показників окремого ПД (див. рис. 1,в): ширина на половині висоти ( $1,8 \text{ мс} \pm 0,1 \text{ мс}$ ,  $P < 0,05$ ,  $n = 10$ ) та амплітуда гіперполяризації ( $-6 \text{ мВ} \pm 2 \text{ мВ}$ ,  $P < 0,05$ ,  $n = 10$ ). При цьому значення порога та амплітуди ПД достовірно не змінювались, а ширина ПД збільшувалася внаслідок

уповільнення фази реполяризації.

Таким чином, у ГКС ока щура потенціалкеровані калієві канали типу  $Kv3.1/Kv3.2$  є основними каналами, що забезпечують височастотну тонічну імпульсацію.

Кальцієві сигнали, викликані імпульсацією ГКС, та їх модуляція потенціалкерованими калієвими каналами. При використанні внутрішньоклітинного розчину з додаванням кальційчутливого флуоресцентного барвника Indo-1 після утворення конфігурації “ціла клітина” спостерігали зростання інтенсивності флуоресценції, яке протягом 5–10 хв сягало стаціонарного рівня, при цьому значення  $R$  відповідало середній концентрації кальцію  $114 \text{ нмоль/л} \pm 18 \text{ нмоль/л}$  ( $n = 5$ ).

У разі деполяризації ГКС, яка призводила до генерації ПД, підвищувалася внутрішньоклітинна концентрація кальцію, яка експоненційно зменшувалася після припинення імпульсації (рис. 2). Постійна часу спаду кальцієвого сигналу становила  $6,8 \text{ с} \pm 1,4 \text{ с}$  ( $n = 5$ ). Залежність амплітуди

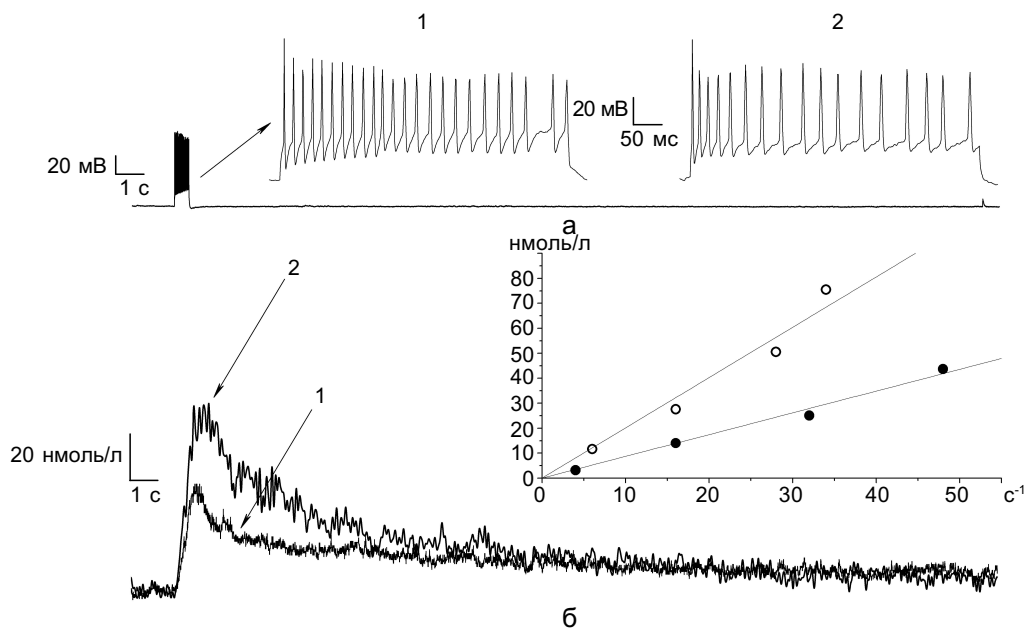


Рис. 2. Дія тетраетиламонію (ТЕА) на кальцієві сигнали, викликані тонічною імпульсацією гангліозних клітин сітківки (ГКС) ока щура. Серії потенціалів дії (ПД) (а), викликані деполяризацією мембрани ГКС, у контролі (1) та після аплікації 500 мкмоль/л ТЕА (2) та відповідні кальцієві сигнали (б), на вставці – залежність амплітуди кальцієвого сигналу від середньої частоти генерації ПД у контролі (1) та після аплікації 500 мкмоль/л ТЕА (2)

кальцієвого сигналу від середньої частоти ПД достатньо добре апроксимувалася лінійною функцією (див. рис. 2,б), відповідний кутовий коефіцієнт був  $1,4 \text{ с} \cdot \text{нмоль/л} \pm 0,2 \text{ с} \cdot \text{нмоль/л}$  ( $n = 5$ ). Лінійна залежність амплітуди кальцієвого сигналу від частоти генерації ПД може свідчити про відсутність за цих умов ефектів, пов'язаних з кальційіндукованим виходом кальцію з внутрішньоклітинних депо.

Слід також відзначити, що у ГКС ока щура достатньо високочастотна імпульсація призводить до відносно невеликих змін внутрішньоклітинної концентрації кальцію. Цей факт зумовлений, вірогідно, саме генерацією ГКС короткотривалих ПД, а не високою буферною ємністю клітин до іонів кальцію [7]. Для перевірки цього припущення нами було досліджено модулювальний вплив ТЕА на показники кальцієвих сигналів. Після аплікації блокатора спостерігали описані вище зміни імпульсації ГКС та параметрів окремого ПД, а також збільшення амплітуди кальцієвих сигналів. Постійна часу спаду сигналу достовірно не змінювалася: значення становило  $8,9 \text{ с} \pm 1,6 \text{ с}$  ( $n = 5$ ; рис. 2,б). Кутовий коефіцієнт залежності амплітуди кальцієвого сигналу від середньої частоти генерації ПД за наявності блокатора становив  $2,1 \text{ с} \cdot \text{нмоль/л} \pm 0,3 \text{ с} \cdot \text{нмоль/л}$ . При цьому відношення коефіцієнта за наявності блокатора до контрольного (1,5), було близьке до значення відповідного відношення ширини ПД (1,6).

Таким чином, потенціалкеровані калієві канали типу  $Kv3.1/Kv3.2$ , які забезпечують високочастотну генерацію ПД у ГКС, водночас модулюють відповідні кальцієві сигнали та запобігають значному зростанню внутрішньоклітинної концентрації кальцію та його можливій цитотоксичній дії при високочастотній імпульсації цих клітин. Підтверджують таке припущення дані клінічних досліджень, у яких було доведено позитивний нейропротекторний вплив застосування блокаторів потенціалкерованих кальцієвих каналів на функціональні

показники зору у хворих на глаукому та діабетичну ретинопатію [1].

Отримані нами результати також свідчать, що побічною дією речовин, що які впливають безпосередньо на кальцієві канали, може бути опосередкований вплив на амплітуду кальцієвих сигналів. Цей факт слід враховувати при розробці нових фармакологічних препаратів і терапевтичних підходів. Так, приміром, з літературних даних відомо, що на калієві канали впливає холіноміметик пілокарпін [2], який використовується при лікуванні глаукоми [3].

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

### **КАЛЬЦИЕВЫЕ СИГНАЛЫ, ВЫЗВАННЫЕ ТОНИЧЕСКОЙ ИМПУЛЬСАЦИЕЙ ГАНГЛИОЗНЫХ КЛЕТОК СЕТЧАТКИ ГЛАЗА КРЫСЫ**

На изолированном препарате сетчатки глаза крысы в конфигурации «целая клетка» зарегистрированы кальциевые сигналы, вызванные тонической импульсацией ганглиозных клеток сетчатки (ГКС), и исследовано модулирующее влияние на данные сигналы калиевых каналов типа  $Kv3$ . Деполяризация ГКС импульсами тока длительностью 500 мс приводила к тонической генерации потенциалов действия (ПД) и развитию кальциевых сигналов, амплитуда которых линейно зависела от средней частоты генерации ПД, соответствующее среднее значение углового коэффициента составило  $1,4 \text{ с} \cdot \text{нмоль/л} \pm 0,2 \text{ с} \cdot \text{нмоль/л}$  ( $n = 5$ ), а среднее значение постоянной времени спада кальциевых сигналов –  $6,8 \text{ с} \pm 1,4 \text{ с}$  ( $n = 5$ ). При аплікації 500 мкмоль/л тетраэтиламмония, который в данной концентрации блокирует калиевые каналы  $Kv3.1/Kv3.2$ , регистрировали снижение частоты генерации и увеличение длительности ПД, а также уменьшение амплитуды следовой гиперполяризации. Значение углового коэффициента зависимости амплитуды кальциевого сигнала от средней частоты генерации ПД в присутствии блокатора составило  $2,1 \text{ с} \cdot \text{нмоль/л} \pm 0,3 \text{ с} \cdot \text{нмоль/л}$ . Постоянная времени спада сигналов достоверно не изменилась и составила  $(8,9 \text{ с} \pm 1,6 \text{ с}; n = 5)$ . Таким образом, потенциал-зависимые калиевые каналы типа  $Kv3.1/Kv3.2$ , которые выполняют ключевую роль в обеспечении высокочастотной тонической импульсации ГКС, также модулируют соответствующие кальциевые сигналы и предохраняют данные клетки от значительного повышения концентрации внутриклеточного кальция и его возможного цитотоксического действия.

Ключевые слова: ганглиозные клетки сетчатки, тоническая импульсация, кальциевые каналы,  $Kv3$ -калиевые каналы.

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

### **CALCIUM SIGNALS INDUCED BY TONIC FIRING IN THE RAT EYE RETINAL GANGLION CELLS**

On rat retinal preparation in whole-cell mode retinal ganglion cells (RGC) tonic firing induced calcium signals were recorded and their modulation by Kv3 potassium channels was studied. RGC depolarization with 500 ms current steps caused tonic action potentials (AP) generation and development of calcium signals which amplitude depended quite linearly on mean AP frequency with mean slope  $1.4 \pm 0.2$  s·nmol/l ( $n = 5$ ). The calcium signals mean tau of decay value was  $6.8 \pm 1.4$  s ( $n = 5$ ). After application of tetraethylammonium (500 mM), which in such concentration blocks Kv3.1/Kv3.2 potassium channels, a decrease in firing frequency, an increase of AP width and a decrease of afterhyperpolarization amplitude were observed. In the presence of the blocker the calcium signal amplitude vs mean AP frequency dependency slope mean value increased to  $2.1 \pm 0.3$  s·nmol/l. The calcium signals tau of decay not changed significantly, the mean value was  $8.9 \pm 1.6$  s ( $n = 5$ ). Thus, voltage-dependent Kv3.1/Kv3.2 potassium channels, which play a key role in tonic firing pattern generation in RGC, also modulate appropriate calcium signals and prevent the cells from significant intracellular calcium increasing and its possible cytotoxic action.

Keywords: retinal ganglion cells, tonic firing, calcium signals, Kv3 potassium channels.

*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. Веселовская З.Ф., Веселовская Н.Н. Сравнительная эффективность норваска и амлодипина по результатам динамических изменений объективных показателей функционального состояния макулярной зоны

*Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ;  
Міжнар. центр молек. фізіології НАН України, Київ  
E-mail: masl@biph.kiev.ua*

сетчатки у больных с открытоугольной глаукомой и непролиферативной диабетической ретинопатией без диабетического макулярного отека // Наук. вісн. нац. мед. ун-ту ім. О.О.Богомольця. Актуальні питання глаукоми і нейроофтальмології. – 2009. – 20 (спец. випуск). – С. 41–44.

2. Лук'янець О.О., Яворський В.А. Дія пілокарпіну на акомодацийні властивості ізольованих фазних нейронів гіпокампа шура // Фізіол. журн. – 1999. – 45, № 4. – С. 35–40.
3. Cheung W., Guo L., Cordeiro M.F. Neuroprotection in glaucoma: drug-based approaches // Optom. Vis. Sci. – 2008. – 85, №6. – P. 406–416.
4. 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. – 75, №1. – P. 44–54.
5. Grienkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties // J.Biol.Chemistry. – 2005. – 260, №6. – P. 3440–3450.
6. 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.
7. 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. – 2005. – 22, № 11. – P. 2735–2743
8. 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.
9. Rudy B., McBain C.J. Kv3 channels: voltage-gated K<sup>+</sup> channels designed for high-frequency repetitive firing // Trends Neurosci. – 2001. – 24, № 9. – P. 517–526.
10. Wang, G. Y., Robinson, D. W., Chalupa, L. M. Calcium-activated potassium conductances in retinal ganglion cells of the ferret // J.Neurophysiol. – 1998. – 79, №1. – P. 151–158.

*Матеріал надійшов до  
редакції 24.02.2010*