

ПОТЕНЦИАЛУПРАВЛЯЕМЫЕ КАЛЬЦИЕВЫЕ ТОКИ В ГАНГЛИОЗНЫХ КЛЕТКАХ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА КРЫСЫ

Поступила 25.10.12

С использованием метода фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка» были исследованы потенциалуправляемые кальциевые токи в ганглиозных клетках сетчатки (ГКС) глаза крысы. Во всех исследованных клетках был зарегистрирован высокопороговый кальциевый ток со средними значениями максимальной амплитуды 285 ± 33 пА ($104\text{--}593$ пА; $n = 22$) при мембранном потенциале $-10\text{...}0$ мВ. В значительной части нейронов (10 из 22; 45 %) наблюдался также низкопороговый кальциевый ток (литературные данные о наличии которого в ГКС млекопитающих противоречивы). Средняя максимальная амплитуда низкопорогового кальциевого тока была равна 99 ± 11 пА ($54\text{--}157$ пА; $n = 10$) при мембранном потенциале -35 мВ. Различия свойств потенциалзависимых кальциевых токов в разных ГКС могут быть связаны с функциональной дифференциацией последних.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ганглиозные клетки сетчатки (ГКС), высоко- и низкопороговые кальциевые токи.

ВВЕДЕНИЕ

Ганглиозные клетки сетчатки (ГКС) являются единственными выходными нейронами сетчатки, передающими афферентную информацию в ЦНС в виде относительно высокочастотных серий потенциалов действия (ПД). Характер такой активности определяется пространственно-временной суммацией влияний возбуждающих/тормозных синаптических входов и электрическими свойствами клеточной мембраны ГКС, причем и синаптические эффекты, и мембранные характеристики являются кальцийзависимыми [1]. Это обуславливает необходимость изучения как динамики внутриклеточного кальция при генерации ПД, так и свойств соответствующих кальциевых и кальцийзависимых проводимостей. В наших предыдущих работах с использованием одновременной регистрации вызванной электрической активности ГКС и кальциевых сигналов было установлено, что высокочастотные ($40\text{--}100$ с⁻¹) серии ПД вызывают в данных нейронах относительно небольшие ($100\text{--}400$ нМ)

изменения внутриклеточной концентрации ионов кальция [2, 3]. Для объяснения этого эффекта необходим анализ как механизмов, обеспечивающих защиту нейронов от цитотоксического действия высоких уровней внутриклеточного кальция (быстрая экструзия кальция, его эффективное связывание внутри клетки), так и особенностей кальциевой проводимости мембраны [4]. В настоящей работе представлены результаты исследования свойств потенциалуправляемых кальциевых токов в ГКС глаза сетчатки крысы.

МЕТОДИКА

Эксперименты были проведены на белых крысах линии Вистар (возраст четыре–шесть недель); обеспечивалось соответствие правилам работы с подопытными животными в учреждениях НАН Украины. Методика приготовления препарата целой сетчатки и приемы электрофизиологических отведений не отличались от описанных ранее [2, 3]. Регистрации токов проводили в режиме фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка». Фармакологическую изоляцию потенциалуправляемых кальциевых токов осуществляли с использованием внеклеточного раствора, содержащего в себе (в миллимолях на 1 л):

¹ Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев (Украина).

² Международный центр молекулярной физиологии НАН Украины, Киев (Украина).

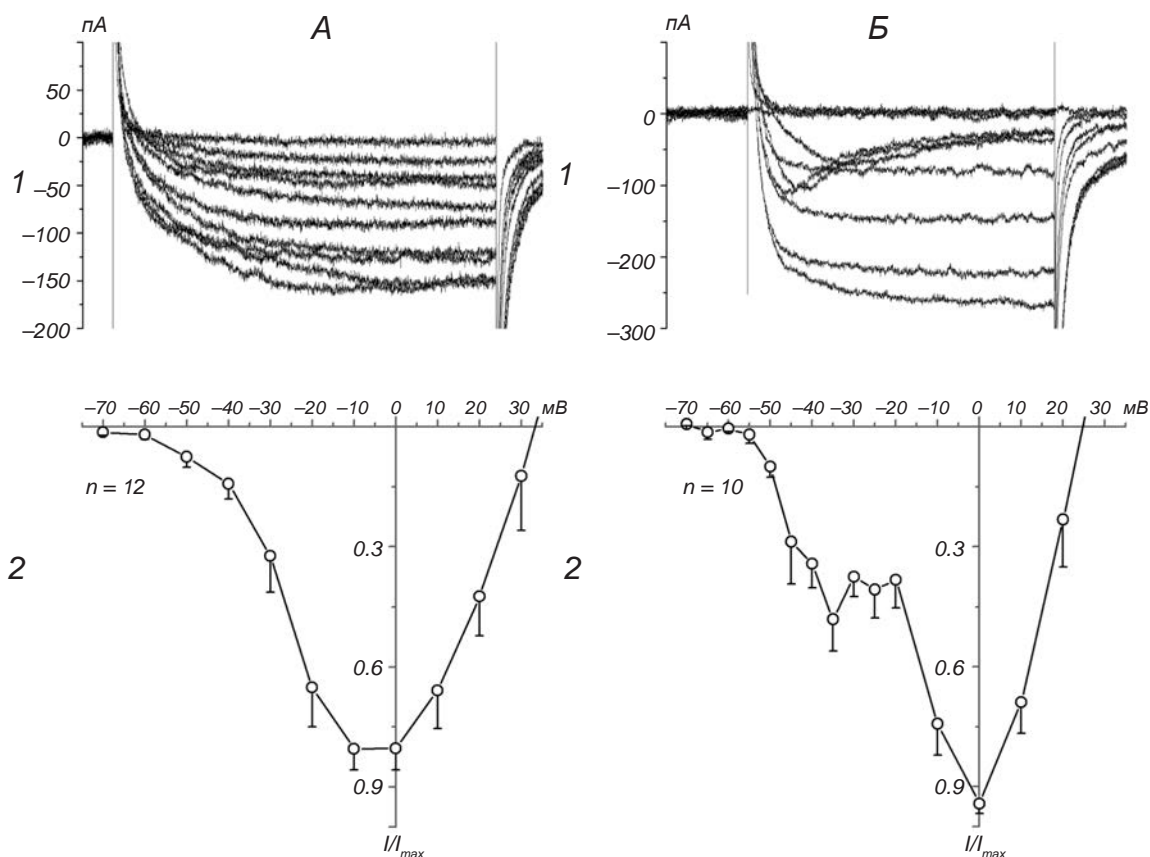
Эл. почта: kir.kuznet@gmail.com (К. И. Кузнецов).

NaCl – 120, ТЭА-Cl – 20, 4-АП – 3, KCl – 3, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 2, HEPES – 10, глюкозу – 12, TTX – 0.001 (pH доводили до 7.4 путем добавления NaOH), и внутриклеточного раствора следующего состава (в миллимолях на 1 л): цезия ацетат – 90, CsCl – 40, ТЭА-Cl – 20, MgCl₂ – 5, EGTA – 0.1, HEPES – 20, Na₂ATP – 3, NaADP – 0.5, NaGTP – 0.5 (pH доводился до 7.4 с помощью CsOH). Поддерживаемый потенциал на мембране нейронов составлял –70 мВ. Кальциевые токи активировали путем приложения командных толчков потенциала длительностью 200 мс с инкрементом амплитуды 5–10 мВ (от –70 до +40 мВ), предварительно гиперполяризуя мембрану ГКС до уровня –100 мВ в течение 3 с с целью выведения низкопороговых кальциевых каналов из состояния стационарной инактивации [4].

В работе были использованы реактивы производства «Sigma» (США). Данные представлены в виде средних значений ± ошибка среднего; указаны также диапазоны значений и объемы выборок (*n*).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Во всех 22 протестированных клетках инициировался высокопороговый кальциевый ток с максимальной амплитудой при поддерживаемом потенциале –10...0 мВ. Среднее значение амплитуды тока в таких условиях составляло 285 ± 33 пА (диапазон значений 104–593 пА; *n* = 22). Эти результаты согласуются с данными, полученными в экспериментах на ГКС кошки и крысы [5, 6]. В значительной части исследованных ГКС (10 из 22; 45 %) регистрировали и низкопороговый компонент кальциевого тока, максимальное значение амплитуды которого наблюдали при мембранном потенциале –35 мВ. Среднее значение амплитуды такого низкопорогового тока составляло 99 ± 11 пА (диапазон 54–157 пА; *n* = 10). На рисунке приведены примеры регистрации и усредненные вольт-амперные характеристики потенциалуправляемых кальциевых токов в различных ГКС.



Потенциалуправляемые кальциевые токи в ганглиозных клетках сетчатки (ГКС) глаза крысы.

1 – кальциевые токи в двух различных ГКС с наличием только высокопорогового кальциевого тока (А) и низко- и высокопорогового кальциевых токов (Б); 2 – соответствующие усредненные нормированные вольт-амперные характеристики; за единицу приняты максимальные амплитуды токов.

Потенціалкервані кальцієві струми в гангліозних клітинах сітківки ока щура.

В случае добавления во внеклеточный раствор 0.2 мМ CdCl₂, который, как известно, в указанной концентрации неселективно блокирует высоко- и низкопороговые потенциалуправляемые кальциевые каналы, входящие токи при деполяризации клетки отсутствовали ($n = 5$).

Результаты наших экспериментов не согласуются с данными некоторых авторов, сообщавших об отсутствии низкопорогового кальциевого тока в ГКС взрослых крыс [6]. Подобный кальциевый ток был, однако, зарегистрирован в дендритах ГКС взрослых мышей [7]. При этом указанный ток был выявлен исключительно в дендритах так называемых *off*-клеток, которые генерируют серии ПД в отсутствие светового раздражения и тормозятся при освещении сетчатки [7]. Таким образом, низкопороговый компонент кальциевого тока, обнаруженный нами почти в половине (45 %) ГКС, может соответствовать принадлежности данных нейронов к группе *off*-клеток.

Длительная регистрация кальциевых токов (40 мин и более) не показала достоверных изменений амплитуд кальциевых токов по сравнению с таковыми в начале отведения. Следует упомянуть, что в наших предыдущих работах зарегистрированные кальциевые сигналы сохраняли стабильную амплитуду на протяжении 1–1.5 ч [2, 3]. Очевидно, относительно небольшая амплитуда кальциевых сигналов при генерации высокочастотной импульсации ГКС, наблюдавшаяся в наших предыдущих работах, не может быть объяснена эффектом «*gun-down*» кальциевого тока и связана с другими причинами, требующими дальнейшего изучения [4]. Наиболее информативными для решения данного вопроса могут стать результаты исследования механизмов связывания кальция в ГКС.

Настоящая работа является частью проекта НАН Украины «Функциональная геномика межнейронных взаимодействий и субнейронных процессов при нормальных и патологических условиях» (номер регистрации 0112U001476) и проекта совместных украинско-российских исследований НАН Украины и Российского Фонда фундаментальных исследований «Выяснение природы нейротропных эффектов пептидов группы глипролинов в норме и на моделях повреждения нейронов» (номер регистрации 0112U004111).

К. И. Кузнецов¹, В. Ю. Маслов^{1,2}, С. А. Федулова^{1,2},
М. С. Веселовский^{1,2}

ПОТЕНЦІАЛКЕРОВАНІ КАЛЬЦІЄВІ СТРУМИ В ГАНГЛІОЗНИХ КЛІТИНАХ СІТКІВКИ ОКА ЩУРА

¹ Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

² Міжнародний центр молекулярної фізіології НАН України, Київ (Україна).

Резюме

З використанням методу фіксації потенціалу в конфігурації «ціла клітина» були досліджені потенціалкервані кальцієві струми в гангліозних клітинах сітківки (ГКС) ока щура. В усіх досліджених клітинах було зареєстровано високопороговий кальцієвий струм із середнім значенням максимальної амплітуди 285 ± 33 пА ($104\text{--}593$ пА; $n = 22$) при мембранному потенціалі $-10\text{...}0$ мВ. У значній частині нейронів (10 із 22; 45 %) спостерігався також низкопороговий кальцієвий струм (літературні дані щодо наявності якого в ГКС ссавців є суперечливими). Середня максимальна амплітуда низкопорогового кальцієвого струму дорівнювала 99 ± 11 пА ($54\text{--}157$ пА; $n = 10$) при мембранному потенціалі -35 мВ. Відмінності властивостей потенціалзалежних кальцієвих струмів у різних ГКС можуть бути пов'язані з функціональною диференціацією останніх.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. A. Akopian and P. Witkovsky, "Calcium and retinal function," *Mol. Neurobiol.*, **25**, No. 2, 113-132 (2002).
2. К. И. Кузнецов, В. Ю. Маслов, С. А. Федулова, Н. С. Веселовский, "Роль чувствительного к низким концентрациям ТЭА компонента калиевого тока в генерации высокочастотной тонической импульсации ганглиозных клеток сетчатки крысы," *Нейрофизиология/Neurophysiology*, **43**, № 1, 11-17 (2011).
3. К. И. Kuznetsov, O. O. Grygorov, V. Y. Maslov, et al., "Kv3 channels modulate calcium signals induced by fast firing patterns in the rat retinal ganglion cells," *Cell Calcium*, **52**, No. 2, 405-411 (2012).
4. S. A. Fedulova, P. G. Kostyuk, and N. S. Veselovsky, "Calcium channels in the somatic membrane of the rat dorsal root ganglion neurons, effect of cAMP," *Brain Res.*, **214**, No. 1, 210-214 (1981).
5. M. Kaneda and A. Kaneko, "Voltage-gated calcium currents in isolated retinal ganglion cells of the cat," *Jpn. J. Physiol.*, **41**, No. 1, 35-48 (1991).
6. S. Schmid and E. Guenther, "Voltage-activated calcium currents in rat retinal ganglion cells in situ: changes during prenatal and postnatal development," *J. Neurosci.*, **19**, No. 9, 3486-3494 (1999).
7. D. J. Margolis, A. J. Gartland, T. Euler, and P. B. Detwiler, "Dendritic calcium signaling in *on* and *off* mouse retinal ganglion cells," *J. Neurosci.*, **30**, No. 21, 7127-7138 (2010).