

ВПЛИВ БЛОКАТОРА НІКОТИНОВИХ АЦЕТИЛХОЛІНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ НА ЗБУДЖУВАЛЬНІ ПОСТСИНАПТИЧНІ СТРУМИ В ГАНГЛІОЗНИХ КЛІТИНАХ СІТКІВКИ ЩУРА

Надїйшла 25.05.14

Ми перевїряли залучення нїкотинових ацетилхолїнових рецепторів (нАХР) до фонової синаптичної активностї гангліозних клїтин сїткївки (ГКС) ока щура. Експерименти проводили *in vitro* на ГКС ізольованої цїлої сїткївки щурів віком 21 день з використанням методу петч-клемп у конфїгурації «цїла клїтина» в режимі фіксації потенціалу. Вивчали нейрони, не піддані ферментній обробці, що забезпечувало збереження властивостей клїтин нативної сїткївки. Пасивні електрофізіологічні показники були досліджені у 15 клїтин; мембранний потенціал спокою становив у середньому -62 ± 2 мВ, вхїдний опір мембрани 573 ± 68 МОм, ємність мембрани 34 ± 5 пФ. Для вивчення ефектів блокування нАХР використовували бензогексонїї (БГ) у концентрації 450 мкМ. Реєстрували збуджувальні постсинаптичні струми, які в контрольних умовах наших експериментів виникали із середньою частотою 3.1 ± 0.8 с⁻¹ ($n = 10$). Аплїкація БГ призводила до пригнїчення струмів у шести клїтинах, причому виявлялася значна селективність дії цього блокатора: він впливав переважно на струми порівняно високої амплїтуди (40–100 пА). Дїя БГ була значною мірою оборотною. З отриманих даних випливає, що активація нАХР модулює електричну активність ГКС; ці рецептори, ймовїрно, опосередковують певні види синаптичної передачі. Загальна популяція ГКС є досить гетерогенною в аспектах наявностї/відсутностї нАХР та наявностї окремих підтипів останніх.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гангліозні клїтини сїткївки (ГКС), збуджувальні постсинаптичні струми (ЗПСС), нїкотинові ацетилхолїнові рецептори (нАХР).

ВСТУП

У функціонування нейронної мережі сїткївки ссавців залучені рїзні нейротрансмітери, в тому числі ацетилхолїн. Холїнергічна сигналізація забезпечується в даному разі передачею через нейронні нїкотинові ацетилхолїнові рецептори (нАХР). Цї рецептори опосередковують швидко синаптичну передачу та деякі модуляційні процеси, що сприяють вивільненню таких нейротрансмітерів, як ГАМК, глутамат та, можливо, дофамїн [1]. нАХР беруть участь у рїзних фізіологічних процесах, пов'язаних із розвитком сїткївки; їх активність

впливає на вміст кальцію в цитозолї гангліозних клїтин сїткївки (ГКС) та амакринових клїтин [2]. Іонні струми через канали нАХР істотно залучені у формування фонової імпульсної активностї, генерованої клїтинами сїткївки, в тому числі ГКС [3, 4].

Серед загальної сукупностї нАХР рецептори одного з їх підтипів складаються з альфа2-альфа6- та бета2-бета4-субодиниць, тоді як рецептори іншого підтипу включають в себе альфа7-, альфа8- або альфа9-субодиниці (гомомерні рецептори) або є гетеромерними пентамерами (поєднанням альфа7-, альфа8-, альфа9- чи альфа10-субодиниць). У сїткївках курчат, мишей, кролів та щурів за допомогою їмуногістохімічних досліджень були виявлені певні субодиниці нАХР, що підтвердило залучення цих рецепторів у синаптичну передачу [5, 10]. Задачею нашої роботи було з'ясувати, як впливає блокатор нАХР бензогексонїї (БГ) на фонову синаптичну активність ГКС.

¹ Міжнародний центр молекулярної фізіологїї НАН України, Київ (Україна).

² Інститут фізіологїї їм. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).
Ел. пошта: nmartyniuk@biph.kiev.ua (Н. Я. Мартинюк).

МЕТОДИКА

Експерименти проводили на білих щурах лінії Вістар віком 21 день. Після декапітації у щурів виділяли очні яблука та переносили до камери з фізіологічним розчином. Вздовж межі зубчатого краю (*ora serrata*) робили розріз, видаляли кришталик та скловидне тіло. Після цього зубчатий край відрізали, сітківку відшаровували від судинної оболонки, а зоровий нерв перерізали в ділянці оптичного диска. Сітківку фіксували гангліозним шаром дотори до дна камери, вкритого сілгардом („Silgard”, США). Камеру встановлювали на предметний столик прямого мікроскопа з диференційно-інтерференційним контрастом („Carl Zeiss-Jena”, ФРН); використовували об’єктив водної імерсії. Загальне збільшення становило $\times 400$. Освітленість препарату, заміряна на предметному столику в умовах проведення експерименту, становила 28 лк.

Робочу камеру постійно перфузували зі швидкістю ~ 2 мл/хв зовнішньоклітинним розчином, який вмщував (у мілімолях на 1 л): NaCl – 140, KCl – 3, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 2, HEPES – 10, глюкоза – 12; рН доводили до 7.4 за допомогою NaOH. Склад внутрішньоклітинного розчину був наступним (у мілімолях на 1 л): калію глюконат – 100, KCl – 50, EGTA – 10, MgCl₂ – 5, HEPES – 20 (рН 7.4, доведення КОН). БГ у концентрації 450 мкМ додавали безпосередньо в перфузійний розчин.

Внутрішню обмежувальну мембрану та шар нервових волокон, утворений відростками клітин Мюллера та аксонами ГКС, механічно розривали за допомогою кінчика петч-піпетки безпосередньо над сомою досліджуваного нейрона. Відведення здійснювали в умовах петч-клемп у конфігурації «ціла клітина» в режимі фіксації потенціалу. Підтримуваний потенціал складав -70 мВ. Сигнали оцифровували з частотою 10^4 с⁻¹ за допомогою АЦП Digidata 1200A («Axon Instruments», США), використовуючи програму „pClamp 9.0” («Axon Instruments», США). Обробку та представлення даних виконували із застосуванням програм „Clampfit 9.0” («Axon Instruments», США) та „Origin 8.5” (“Microcal Software Inc.”, США).

Для відведення використовували петч-піпетки з боросилікатного скла з діаметром кінчика 1.3–1.8 мкм (електричний опір 5–7 МОм). Досліджували лише клітини з початковим мембранним потенціалом спокою (МПС), не меншим ніж -55 мВ.

Для визначення дії БГ на ГКС реєстрували фонові збуджувальні постсинаптичні струми

(ЗПСС) клітин протягом 103 с та аналізували зміни значень частоти та амплітуд таких струмів при дії БГ у межах такого самого часового інтервалу.

У роботі використовували реактиви виробництва фірми “Sigma” (США). Числові результати представлені як середні \pm похибка середнього.

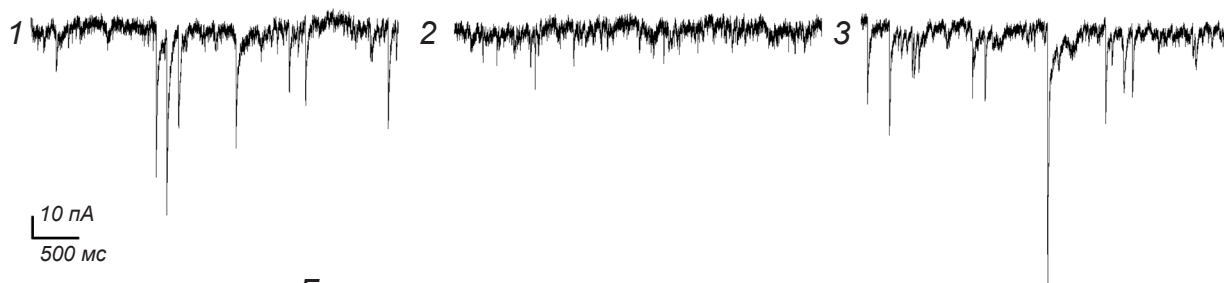
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Пасивні електричні властивості мембрани ГКС. Вказаному вище критерію (вихідному значенню МПС) серед досліджених ГКС задовольняли 15 одиниць. У цих клітинах МПС дорівнював у середньому 62 ± 2 мВ. Вхідний опір мембрани складав 573 ± 68 МОм (діапазон 300 МОм – 1.0 ГОм), а ємність мембрани – 34 ± 5 пФ (діапазон 10 – 65 пФ). Подібні результати в цілому узгоджувалися з даними інших авторів, які досліджували ГКС [6].

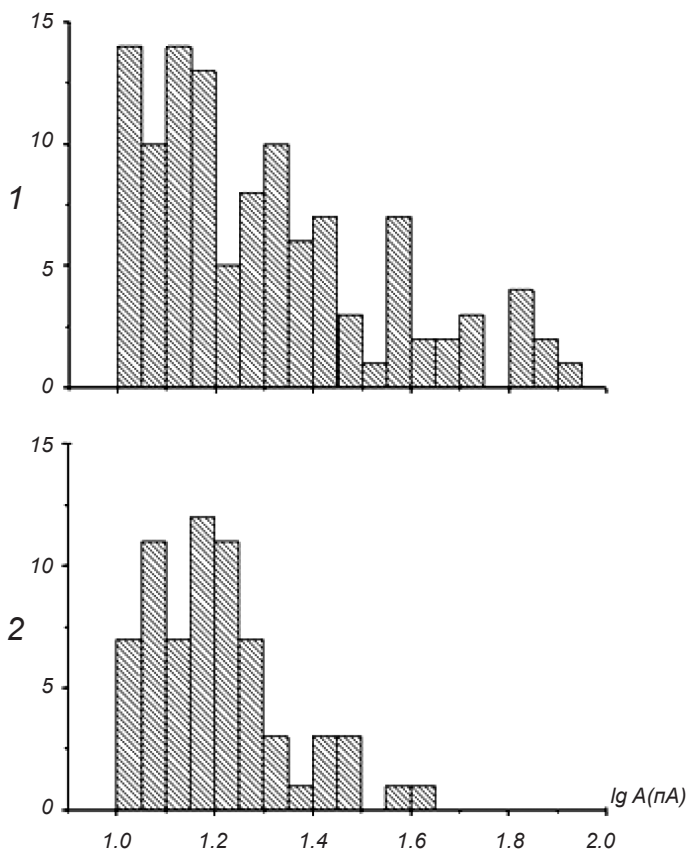
Вплив БГ на ЗПСС, зареєстровані в ГКС. У досліджуваних нейронах спостерігалися ЗПСС, які виникали із середньою частотою 3.1 ± 0.8 с⁻¹ (діапазон 0.3 – 8.9 с⁻¹); при вимірах враховували ЗПСС, які досить добре диференціювалися на тлі шуму і мали амплітуду, більшу за 10 пА. Амплітуди зареєстрованих ЗПСС у контрольних умовах були дуже різноманітними – від 10 до 180–190 пА.

Дія БГ була докладно вивчена на 10 ГКС. Патерн дії цього блокатора на дані клітини виявився досить гетерогенним. У трьох ГКС пригнічення ЗПСС було вельми інтенсивним. У всіх цих клітинах поруч із низькоамплітудними ЗПСС реєструвалися струми порівняно високої амплітуди (-150 ... -190 пА) (рисунк, А 1, 3). Розподіл амплітуд ЗПСС у таких клітинах у контрольних умовах був різко правоасиметричним. Аплікація БГ призводила до практичного зникнення високоамплітудних холінергічних струмів; асиметричність розподілів амплітуд значно зменшувалася, і в умовах таких розподілів залишалися переважно ЗПСС з амплітудою близько -20 пА. У трьох нейронах, у котрих амплітуди ЗПСС у контролі не перевищували -80 ... -85 пА, ступінь гальмування цих струмів був помітно меншим; в умовах впливу БГ струми не перевищували за амплітудою -50 пА (рисунк, Б). Чотири ж ГКС майже не реагували на аплікацію БГ. У цих клітинах у контролі реєструвалися ЗПСС переважно низької амплітуди, а максимальне зменшення даного показника під впливом БГ становило порядку 10 %.

А



Б



Збуджувальні постсинаптичні струми (ЗПСС) у гангліозних клітинах сітківки щура при підтримуваному потенціалі -70 мВ. А – приклад дії бензогексонію (БГ) у концентрації 450 мкМ на окремий нейрон: 1 – контроль; 2 – при дії БГ; 3 – після відмивання. Б – розподіли амплітуд ЗПСС у контролі (1) та при дії БГ (2). Шкала по осі абсцис логарифмічна. Максимальна амплітуда ЗПСС у даній клітині дорівнювала 82 пА.

Вплив БГ був оборотним; після вилучення з розчину БГ і відмивання амплітуда струмів поверталася практично до контрольних значень протягом приблизно 20 хв (див. рисунок, А, 2, 3).

Кореляція між нормованими значеннями сту-

пеню пригнічення ЗПСС та середньою частотою слідування цих струмів в окремих клітинах була від’ємною, тобто чим меншою була середня частота ЗПСС, тим істотніше знижувалися амплітуди зазначених струмів при дії БГ (дані не ілюструються).

Повідомлялося, що в умовах тестування впливів холінергічних агентів на ГКС кроля ефекти в окремих нейронах істотно розрізнялись. Аплікація фізостігміну (інгібітора ацетилхолінергезази) призводила до збільшення фонові синаптичної активності ЗПСС, причому ефекти були значнішими в клітинах, в яких середня частота цих струмів була вищою [7].

Показано, що певні процеси в ГКС або безпосередньо зумовлені активацією нАХР, або модулюються при таких впливах. Наприклад, у сітківці кроля активація нАХР призводила до модуляції відповідей ГКС різних типів на світло [8]. Специфічна експресія різних видів нАХР у нейронах сітківки приматів свідчить про те, що вони реалізують свої впливи на різних етапах обробки зорової інформації. Припускають, що холінергічна нікотинова сигналізація в сітківці може впливати не тільки власне на процес передачі зорової інформації, а й на розвиток зорового аналізатора; зміни в такій сигналізації можуть бути задіяні при деяких зорових патологіях [9].

Відомо, що в клітинах сітківки присутні нАХР різного субодиничного складу. У багатьох ГКС та амакринових клітинах деяких типів експресуються бета2-субодиниці нАХР, іноді в комбінації з альфа3-, а може, і з іншими субодиницями [10]. Альфа7- та альфа8-субодиниці нАХР присутні як у біполярних та амакринових клітинах, так і в ГКС кроля [11]. Активація альфа7-нАХР може модулювати обробку зорової інформації в будь-якому шарі сітківки [12] або бути безпосередньо задіяна в синаптичну передачу.

Аплікація БГ призводить до пригнічення холінергічних постсинаптичних струмів та блокує н-холінорецептори в нервово-м'язових синапсах та синапсах ЦНС [13]. Згідно з окремими даними, БГ є інгібітором альфа4-бета2-наАХР ооцитів у щура [14] та альфа7-вмісних наАХР ГКС кроля [15].

Результати наших експериментів показали, що реакції ГКС на прикладання БГ до препарату цілої сітківки щура дуже різноманітні – від досить істотної супресії ЗПСС до практичної відсутності інгібіторних ефектів. Ми припускаємо, що різний вплив блокатора наАХР на фонову синаптичну активність даних нейронів пов'язаний із деякими особливостями структури сітківки та специфікою дії цього агента на відповідні субодиниці наАХР залежно від розташування цих рецепторів. БГ міг подіяти на окремі субодиниці наАХР, присутні на біполярних або амакрінових клітинах ГКС, наприклад бета2-, альфа3- [10], альфа7- або альфа8- [11]. При наявності зв'язку клітин перших двох груп із ГКС у досліджуваному нейроні спостерігатиметься відгук. Крім того, ГКС можуть реагувати на безпосередній вплив БГ, якщо наАХР із відповідним субодиничним складом локалізовані на самій мембрані зазначених клітин. Є можливим варіант, що мембрани ГКС із спостережуванним ефектом вміщували високочутливі до блокатора наАХР, у яких були наявні альфа4-бета2- [14] або альфа7-субодиниці [15]. Існує також імовірність того, що, наприклад, альфа7- чи альфа8-наАХР присутні в кожному шарі сітківки (тобто на біполярних, амакрінових клітинах та ГКС); такі рецептори беруть участь у синаптичній передачі [12] та є чутливими до БГ [15]. Отже, антагоніст наАХР міг подіяти на наАХР лише деяких підтипів, чутливі до нього, але на кожному етапі передачі сигналу, оскільки в умовах наших дослідів були збережені всі наявні зв'язки між клітинами. Очевидно, що зміна амплітуд ЗПСС у ГКС у відповідь на дію БГ може бути різною залежно від субодиничного складу наАХР. Істотне зменшення амплітуд спостерігається у струмів, котрі опосередковуються, скоріш за все, наАХР певного одного субодиничного складу.

Спостережуваний нами факт інтенсивного селективного пригнічення саме високоамплітудних ЗПСС, вірогідно, заслуговує на особливу увагу. Існує, проте, ймовірність того, що деякі ГКС взагалі позбавлені наАХР або внесок останніх у передачу та обробку інформації не є істотним для даної клітини та зв'язаних з нею нейронів. Подальші

дослідження причин різної чутливості ГКС щурів до дії одного з гангліоблокаторів (БГ) із застосуванням інших блокаторів наАХР, специфічних щодо різних субодиниць цих рецепторів, може допомогти зрозуміти, наАХР яких саме підтипів залучені у формування фонові активності ГКС. Застосування блокаторів інших рецепторів допоможе інтерпретувати природу низькоамплітудних ЗПСС, що не піддаються дії БГ.

Дана робота є частиною теми „Фармакологічна модуляція електричної активності ГКС у нормі та при моделюванні патологічних станів” (номер державної реєстрації 01140000908).

Дослідження було виконано згідно з положеннями Міжнародної конвенції із захисту тварин, які використовуються в експериментах, а також у відповідності до правил роботи з дослідними тваринами Комітетів із біоетики Міжнародного центру молекулярної фізіології НАН України та Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

Автори даної роботи – Н. Я. Мартинюк, О. Е. Пурниць та С. А. Федуллова – підтверджують, що в них немає конфлікту інтересів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. M. J. Neal, J. R. Cunningham, and K. L. Matthews, “Activation of nicotinic receptors on GABAergic amacrine cells in the rabbit retina indirectly stimulates dopamine release,” *Vis. Neurosci.*, **18**, No. 1, 55-64 (2001).
2. R. O. Wong, A. Chernjavsky, S. J. Smith, and C. J. Shatz, “Early functional neural networks in the developing retina,” *J. Nature*, **374**, 716-718 (1995).
3. G. Y. Wang, G. Ratto, S. Bisti, and L. M. Chalupa, “Functional development of intrinsic properties in ganglion cells of the mammalian retina,” *J. Neurophysiol.*, **78**, No. 6, 2895-2903 (1997).
4. M. B. Feller, D. P. Wellis, D. Stellwagen, et al., “Requirement for cholinergic synaptic transmission in the propagation of spontaneous retinal waves,” *J. Sci.*, **272**, No. 5265, 1182-1187 (1996).
5. M. B. Feller, “The role of nAChR-mediated spontaneous retinal activity in visual system development,” *J. Neurosci.*, **53**, No. 1, 556-567 (2002).
6. E. Guenther, S. Schmid, and D. Reiff, “Maturation of intrinsic membrane properties in rat retinal ganglion cells,” *Vis. Res.*, **39**, No. 15, 2477-2484 (1999).
7. M. Ariel and N. W. Daw, “Effects of cholinergic drugs on receptive field properties of rabbit retinal ganglion cells,” *J. Physiol.*, **324**, 135-160 (1982).
8. B. T. Reed, F. R. Amthor, and K. T. Keyser, “Rabbit retinal ganglion cell responses mediated by alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors,” *Vis. Neurosci.*, **19**, No. 4, 427-438 (2002).
9. J. Liu, A. M. McGlenn, A. Fernandes, et al., “Nicotinic acetylcholine receptor subunits in Rhesus monkey retina,”

- Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **50**, No. 3, 1408-1415 (2009).
10. K. T. Keyser, M. A. MacNeil, N. A. Dmitrieva, et al., "Amacrine, ganglion, and displaced amacrine cells in the rabbit retina express nicotinic acetylcholine receptors," *Vis. Neurosci.*, **17**, No. 5, 743-752 (2000).
 11. K. T. Keyser, L. R. Britto, R. Schoepfer, et al., "Three subtypes of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors are expressed in chick retina," *J. Neurosci.*, **13**, No. 2, 442-454 (1993).
 12. N. A. Dmitrieva, C. E. Strang, and K. T. Keyser, "Expression of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors by bipolar, amacrine, and ganglion cells of the rabbit retina," *J. Histochem. Cytochem.*, **55**, No. 5, 461-476 (2007).
 13. P. Ascher, W. A. Large, and H. P. Rang, "Studies on the mechanism of action of acetylcholine antagonists on rat parasympathetic ganglion cells," *J. Physiol.*, **295**, 139-170 (1979).
 14. P. Charnet, C. Labarca, B. N. Cohen, et al., "Pharmacological and kinetic properties of alpha4 beta2 neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus oocytes*," *J. Physiol.*, **450**, 375-394 (1992).
 15. C. E. Strang, M. E. Andison, F. R. Amthor, and K. T. Keyser, "Rabbit retinal ganglion cells express functional {alpha}7 nicotinic acetylcholine receptors," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **289**, No. 3, 644-655 (2005).