

Н. Я. МАРТИНЮК^{1,2}, В. Ю. МАСЛОВ^{1,2}, О. Е. ПУРНИНЬ²,
С. А. ФЕДУЛОВА^{1,2}, М. С. ВЕСЕЛОВСЬКИЙ^{1,2}

ОСОБЛИВОСТІ БЛОКУВАННЯ КАЛІЄВИХ СТРУМІВ У ГАНГЛІОЗНИХ КЛІТИНАХ СІТКІВКИ ЩУРА ТЕТРАЕТИЛАМОНІЄМ

Надійшла 15.04.15

Досліджували чутливість інтегральних калієвих струмів у гангліозних клітинах сітківки (ГКС) щурів віком 21 день до блокуючої дії тетраетиламонію (ТЕА) у концентраціях 0.25 та 1.0 мМ. Струми відводили з використанням методики patch-clamp у конфігурації «ціла клітина» в режимі фіксації потенціалу; препарати сітківки ферментній обробці не піддавалися. Калієві струми викликали прикладанням тривалих (400 мс) деполяризаційних поштовхів струму зростаючої інтенсивності. В умовах дії 0.25 мМ ТЕА блокувалося в середньому 18 ± 5 % інтегрального калієвого струму; амплітуда ТЕА-чутливого (блокованого) компонента при потенціалі на мембрані +40 мВ складала 0.75 ± 0.02 нА ($n = 6$). Під дією 1.0 мМ ТЕА блокувалося в середньому 32 ± 5 % струму; середня амплітуда згаданого ТЕА-чутливого компонента дорівнювала 1.12 ± 0.02 нА ($n = 9$). Вплив ТЕА був оборотним; відносна інтенсивність ТЕА-чутливого компонента в різних клітинах варіювала в широких межах (від 3 до 38 % при 0.25 мМ ТЕА та від 12 до 54 % при 1.0 мМ). Співставлення з даними попереднього дослідження вказувало на те, що залежність інтенсивності блокування з підвищенням концентрації ТЕА від 0.25 до 1.0 мМ була нелінійною; значення концентрації 0.5 мМ виявилось досить близьким до насичуючого. Результати аналізу отриманих даних свідчать на користь того, що ТЕА у використаних концентраціях блокує в основному компонент інтегрального калієвого струму, що йде через Kv3.1/Kv3.2-канали; дія цього блокатора на канали інших типів (Kv3.3/Kv3.4, Kv1.1 та BK) є в усякому разі відносно незначною.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гангліозні клітини сітківки (ГКС), калієві інтегральні струми, калієві канали, тетраетиламоній, петч-клемп у конфігурації «ціла клітина».

ВСТУП

Обробка інформації в зоровій системі, як і в інших сенсорних системах, залежить від кількості і типів синаптичних зв'язків між нейронами, а також від властивостей окремих нервових клітин як таких. Таким чином, для адекватного розуміння механізмів передачі зорової інформації необхідні детальні відомості не тільки про міжклітинні зв'язки, а й про властивості іонних струмів у клітинах зорової системи, зокрема нейронах сітківки.

Потенціалкеровані калієві канали (Kv) відіграють важливу роль у визначенні електрофізіоло-

гічних властивостей нейронів. У всіх гангліозних клітинах сітківки щурів присутні кальційнезалежні калієві канали, струми яких залишаються без істотних змін із 17–18-го ембріонального дня до кінця першого постнатального тижня. Сталі значення потенціалу спокою (ПС) цих нейронів формуються на восьмий день постнатального розвитку [1]. Вказані струми істотною мірою визначають величину ПС на мембрані нейрона та перебіг її реполяризації після збудження [2].

До родини потенціалкерованих калієвих каналів Kv3 належать канали чотирьох підтипів (Kv3.1-Kv3.4) [3–5]. Результати досліджень, проведених на різних центральних нейронах, показали, що Kv3.1/Kv3.2-канали є чутливими до тетраетиламонію (ТЕА) у відносно низьких концентраціях ($IC_{50} = 0.15$ мМ) [6]. В разі аплікації ТЕА в концентрації 0.5 мМ Kv3.1/Kv3.2-провідність значною мірою

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

² Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).
Ел. пошта: pmartyniuk@biph.kiev.ua (Н. Я. Мартинюк).

блокується. При цьому, проте, не можна виключати можливості впливів даного блокатора на калієві канали інших типів – потенціалкеровані Kv1.1, Kv3.3/Kv3.4 та кальційактивовані калієві канали (ВК). Всі зазначені канали є присутніми в гангліозних клітинах сітківки (ГКС) [3, 5, 6]. Аналіз отриманих раніше даних дозволив припустити, що при використанні конфігурації експериментів вивчався вплив саме на Kv3.1/Kv3.2-канали [7].

У нашій роботі ми дослідили чутливість калієвого струму у ГКС щурів до ТЕА, прикладеного в різних концентраціях. Досліджувані клітини не піддавали ензиматичній обробці. В експериментах використовували щурят у такому віці, коли вони починають бачити, але сітківка ще продовжує дозрівати.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили на білих щурах лінії Вістар віком 21 день. Після декапітації тварин очні яблука виділяли та переносили до камери з фізіологічним розчином. Вздовж межі зубчастого краю (*ora serrata*) робили розріз та видаляли кришталік та склоподібне тіло. Після цього зубчастий край відрізали, сітківку відшаровували від судинної оболонки, а зоровий нерв перерізали в ділянці оптичного диска. Сітківку механічно фіксували гангліозним шаром догори до дна камери, вкритого сілгардом. 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, виміряна на предметному столику в перебігу експерименту, становила 28 лк.

Робочу камеру постійно перфузували зі швидкістю 2 мл/хв зовнішньоклітинним розчином, який вміщував (у мілімолях на 1 л) NaCl – 140, KCl – 3, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 2, NEPES – 10, глюкозу – 12. Рівень 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, NEPES – 20 (рН 7.4, доведення за допомогою КОН). ТЕА в концентрації 0.25 або 1.0 мМ додавали в перфузійний розчин.

Внутрішню обмежувальну мембрану та шар нервових волокон над сомою досліджуваного нейрона, утворений відростками клітин Мюллера та аксонами ГКС, механічно розривали за допомогою кінчи-

ка петч-піпетки. Ензиматичну обробку не застосовували. Відведення від ГКС 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). 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 ПС не меншим, ніж -55 мВ.

Параметри потенціалкерованих калієвих струмів вимірювали в умовах прикладання командних деполаризуючих поштовхів тривалістю 400 мс, наростаючих із інкрементом 10 мВ до $+40$ мВ. Окремо для кожної клітини додатково безпосередньо перед прикладанням деполаризуючого поштовху подавали преімпульс тривалістю 200 мс, що гіперполяризував її мембрану до -100 мВ; це робилося з метою усунення інактивації калієвих струмів. Характеристики струму, чутливого до ТЕА, визначали за допомогою поточкового віднімання значень струму при наявності блокатора від контрольних значень. Ємнісні артефакти не компенсували; вони слугували індикатором коректності розрахунку змін струмів під впливом блокаторів. Однакові амплітуда та часовий хід ємнісних артефактів свідчили про стабільність значень послідовного опору та опору мембрани. Для побудови усередненої вольт-амперної характеристики відповідні дані нормували щодо контрольного значення струму при потенціалі $+40$ мВ.

У роботі використовували реактиви виробництва «Sigma» (США). Числові результати представлені як середні значення \pm похибка середнього.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Пасивні електричні властивості мембрани ГКС. У досліджених нами клітинах значення ПС становило в середньому -59 ± 2 мВ ($n = 14$). Середній вхідний опір мембрани складав 475 ± 65 МОм (діапазон од 0.2 до 1.2 ГОм), ємність мембрани дорівнювала 39 ± 5 пФ (діапазон од 15 до 80 пФ), а постійна часу мембрани – 1.8 ± 0.2 мс ($n = 14$). Досить широ-

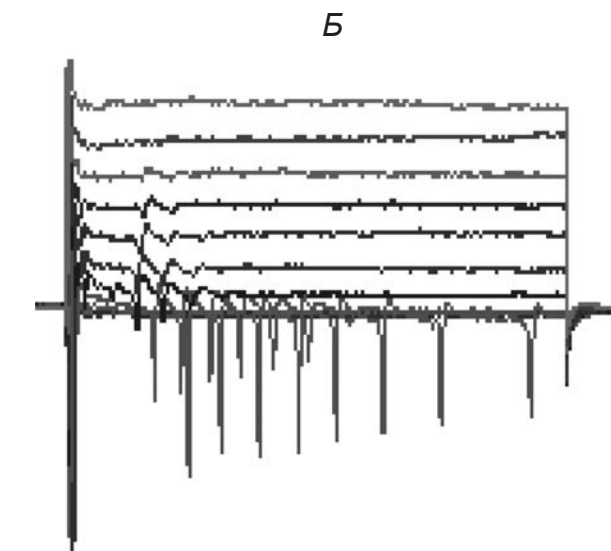
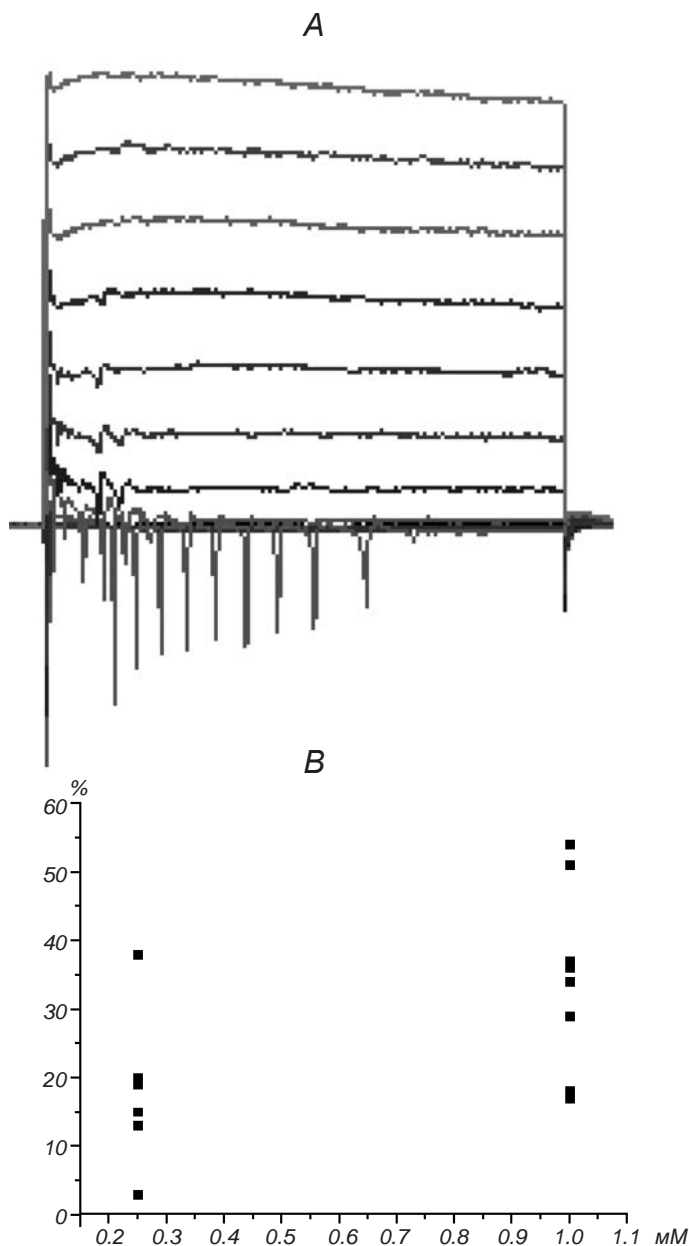


Рис. 1. Вплив блокатора калієвих каналів тетраетиламонію – ТЕА (1.0 мМ) на інтегральний калієвий струм у гангліозних клітинах сітківки (ГКС) ока щура.

A – інтегральні калієві струми, викликані серією деполяризаційних поштовхів струму зростаючої інтенсивності в контрольних умовах; *Б* – калієві струми в тій же самій клітині після аплікації 1.0 мМ ТЕА (підтримуваний потенціал –70 мВ); *В* – нормовані інтенсивності (%) чутливого до блокуючої дії ТЕА компонента інтегральних калієвих струмів у різних ГКС щура при додаванні у зовнішньоклітинний розчин ТЕА в концентраціях 0.25 ($n = 6$) та 1.0 ($n = 9$) мМ. Амплітуди інтегральних калієвих струмів у контрольних умовах у всіх випадках прийняті за 100 %.

кий діапазон наведених вище індивідуальних значень узгоджується з результатами морфологічних досліджень ГКС різних типів [8].

Потенціалкеровані калієві струми в ГКС щура. Як вже вказувалося, при відведенні інтегрального калієвого струму в конфігурації «ціла клітина» останню спочатку гіперполяризували до –100 мВ протягом 200 мс, після чого повертались до фіксованого рівня потенціалу –70 мВ та деполяризували мембрану тест-поштовхами. У разі деполяризації мембрани до –40 мВ і більше спостерігали вихід-

ний калієвий струм з повільною інактивацією або практично без неї (рис. 1). Середня амплітуда максимального інтегрального калієвого струму при потенціалі +40 мВ у наших експериментах становила 3.5 ± 0.3 нА ($n = 12$).

Аналіз блокування калієвих струмів під дією ТЕА проводили на основі поточкового цифрового віднімання величини струму в присутності блокатора від контрольного значення струму; це дозволяло отримати характеристики ТЕА-чутливого (блокованого) компонента. Додаван-

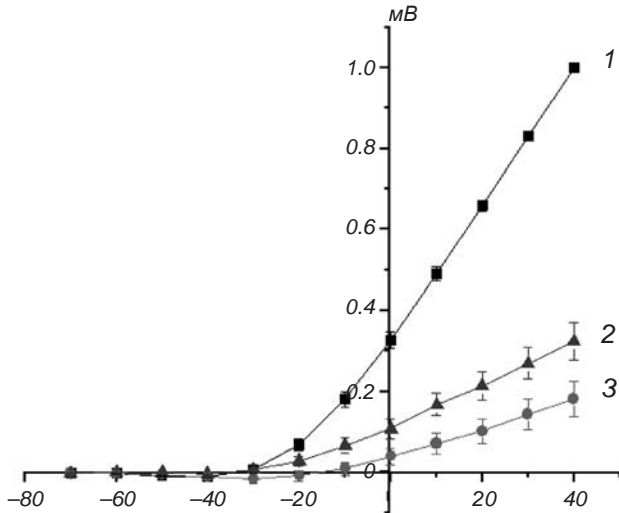


Рис. 2. Усереднені вольт-амперні характеристики інтегральних калієвих струмів (1) та їх чутливих до тетраетиламонію (TEA) компонентів (2, 3) при дії TEA в концентраціях 0.25 (2) та 1.0 мМ (3).

Значення амплітуд струмів нормовані щодо їх контрольних значень при командному потенціалі +40 мВ (I_{\max}). Значення представлені як середні \pm похибка середнього.

ня у внутрішньоклітинний (перфузійний) розчин 0.25 мМ TEA призводило до досить відчутного, але в цілому помірному зменшення амплітуди інтегрального калієвого струму (в середньому по групі 18 ± 5 %). Середня максимальна (при потенціалі +40 мВ) амплітуда заблокованого TEA компонента калієвого струму (розрахованого як різниця між амплітудою калієвого струму в умовах TEA-блокування та контрольним значенням амплітуди) складала 0.75 ± 0.02 нА ($n = 6$). Якщо концентрація TEA дорівнювала 1.0 мМ, нормована інтенсивність блокування ставала більшою (в середньому 32 ± 5 %) (рис. 1). У таких умовах величина TEA-чутливого (заблокованого) компонента становила 1.12 ± 0.02 нА ($n = 9$). Графіки вольт-амперної характеристики інтегрального калієвого струму та його TEA-чутливого компонента при різних концентраціях TEA наведені на рис. 2. Діапазон нормованої інтенсивності пригнічення інтегральних калієвих струмів у різних досліджених ГКС у разі дії 0.25 мМ TEA варіював від 3 до 38 %, а в разі 1.0 мМ – від 12 до 54 % (В). Отже, індивідуальна варіабельність TEA-чутливого компонента інтегрального калієвого

струму була досить високою. Той факт, що різні ГКС демонструють різну чутливість до блокатора, прикладеного в однаковій концентрації та з однаковою швидкістю, ймовірно є пов'язаним із варіабельністю морфологічних характеристик ГКС та різним розподілом каналів на мембранах цих нейронів [1].

На трьох ГКС ми тестували дію TEA в обох використаних концентраціях. Спочатку у внутрішньоклітинний розчин додавали TEA в меншій концентрації – 0.25 мМ, а згодом, після ретельного відмивання, – 1.0 мМ. Різниця в інтенсивності блокування інтегрального калієвого струму в усіх трьох випадках становила приблизно 15 %. Іншими словами, залежність інтенсивності блокування від концентрації TEA демонструвала помітні відхилення від лінійності. В нашій попередній роботі [7] ми тестували ефекти блокування інтегрального калієвого струму в тому ж самому об'єкті (ГКС) із концентрацією TEA 0.5 мМ. Відносне зменшення амплітуди вказаного струму за таких умов блокування складало в середньому 25 %. Отже, збільшення концентрації TEA від 0.5 до 1.0 мМ призводить до відносно незначного посилення інтенсивності блокування ($P > 0.05$), і концентрація 0.5 мМ виявляється досить близькою до насичуючої.

Вплив TEA був оборотним; після вилучення з розчину блокатора і відмивання амплітуда струмів поверталася практично до контрольних значень протягом приблизно 20 хв.

Той компонент інтегрального калієвого струму, котрий, як ми спостерігали, ефективно блокується TEA, за своїми властивостями (потенціал активації, дуже повільна інактивація) є подібним до струмів в центральних нейронах різних тварин, описаних в літературі як Kv3.1/Kv3.2-струми [3, 9, 10]. Припускали, що TEA у відносно низьких концентраціях може також зумовлювати помітну блокуючу дію на потенціалкеровані калієві канали типів Kv3.3/Kv3.4 та Kv1.1, а також на кальційактивовані калієві канали типу Maxi-K (BK) [3, 5, 6, 10]. Постійна часу інактивації калієвих каналів Kv3.3 та Kv3.4 складає близько 240 та 20 мс відповідно [5]. Той же струм, що був зареєстрований у наших дослідженнях, не демонстрував вираженої інактивації протягом 400 мс (рис. 1). Поріг активації Kv1.1-струму становить –60 мВ, тобто є значно нижчим, ніж такий у TEA-блокованого компонента струму в нашій роботі (різницевого струму). Кальційактивовані калієві канали (BK-канали) представлені в мембранах клітин двома популяціями [10]. Перша популя-

ція таких каналів забезпечує «швидкий» компонент ВК-струму, який активується через 5–10 мс та досягає свого максимуму через 40 мс після входу в клітину іонів кальцію через відносно неселективні потенціалкервані калієві канали. Відсутність АТФ у внутрішньоклітинному розчині в умовах наших експериментів дозволяє виключити даний компонент із числа тих, котрі блокуються ТЕА [7]. Другий же, «повільний», компонент ВК-струму активується приблизно через 50 мс після деполяризації мембрани клітини та цілком блокується в умовах наявності EGTA в концентрації, більшій за 1.0 мМ [10]. У нашій роботі рівень EGTA у внутрішньоклітинному розчині був значно більшим і становив 10 мМ. Отже, згадані вище струми, мабуть, слід виключити з числа тих компонентів інтегрального калієвого струму, котрі блокуються ТЕА у використаних концентраціях. Таким чином, спостережуване нами блокування значної частини інтегрального калієвого суму під дією ТЕА, імовірно за все, пов'язане з дією даного агента саме на струми, що йдуть через Kv3.1/Kv3.2-калієві канали [7].

Усі стадії дослідження відповідали положенням Європейської Конвенції щодо захисту тварин, котрі використовуються в експерименті (86/609/ЄЕС, 1986, Страсбург), та нормативам Комітетів з етики Міжнародного центру молекулярної фізіології НАН України та Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

Автори даної роботи – Н. Я. Мартинюк, В. Ю. Маслов, О. Е. Пурнинь, С. А. Федулова та М. С. Веселовський – підтверджують відсутність будь-яких конфліктів щодо комерційних або фінансових відносин, відносин з організаціями або особами, котрі будь-яким чином могли бути пов'язані з дослідженням, а також взаємовідносин співавторів статті.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. D. F. Reiff and E. Guenther, "Development changes in voltage-activated potassium currents of rat retinal ganglion cells," *J. Neurosci.*, **92**, No. 3, 1103–1117 (1999).
2. B. Hille, *Ion Channels of Excitable Membranes*, Sinauer, Sunderland (2001).
3. B. Rudy, A. Chow, D. Lau et al., "Contributions of Kv3 channels to neuronal excitability," *Ann. New York Acad. Sci.*, **868**, 304-343 (1999).
4. B. Rudy and C. J. McBain, "Kv3 channels: voltage-gated K⁺ channels designed for high-frequency repetitive firing," *Trends Neurosci.*, **24**, No. 9, 517-526 (2001).
5. W. A. Coetzee, Y. Amarillo, J. Chiu et al., "Molecular diversity of K⁺ channels," *Ann. New York Acad. Sci.*, **868**, 233-285 (1999).
6. G. A. Gutman, K. G. Chandy, S. Grissmer, et al., "International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels," *Pharmacol. Rev.*, **57**, No. 4, 473-508 (2005).
7. К. И. Кузнецов, В. Ю. Маслов, С. А. Федулова и др., "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).
8. 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).
9. M. L. Dallas, L. Atkinson, C. J. Milligan, et al., "Localization and function of the Kv3.1b subunit in the rat medulla oblongata: focus on the nucleus tractus solitarii," *J. Physiol.*, **562**, No. 3, 655-672 (2005).
10. A. Erisir, D. Lau, B. Rudy, et al., "Function of specific K(+) channels in sustained high-frequency firing of fast-spiking neocortical interneurons," *J. Neurophysiol.*, **82**, No. 5, 2476-2489 (1999).