

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

## Електричні властивості гангліозних клітин сітківки ока щура при стрептозотоциніндукованому діабеті

*На препараті ізольованої сітківки ока щурів зі стрептозотоциніндукованим діабетом у конфігурації "ціла клітина" досліджено основні електричні властивості гангліозних клітин сітківки (ГКС). Показано, що в ГКС на 8-й тиждень після ін'єкції стрептозотину у порівнянні зі значеннями у нормі зменшується максимальна частота викликаного тонічного імпульсації та збільшується постійна часу спаду кальцієвого сигналу, викликаного високочастотною стимуляцією клітин. Отримані результати свідчать про функціональні зміни у ГКС щурів при стрептозотоциніндукованому діабеті, обговорюються механізми, що можуть лежати у їх основі.*

*Ключові слова: гангліозні клітини сітківки, стрептозотоциніндукований діабет, потенціалзалежні струми, імпульсна активність, кальцієвий сигнал.*

### ВСТУП

Діабетична ретинопатія є одним з найпоширеніших ускладнень при діабеті та характеризується численними дегенеративними змінами у сітківці. З досліджень на лабораторних тваринах з використанням моделі стрептозотоциніндукованого діабету відомо, що патологічні зміни в гангліозних клітинах сітківки (ГКС) включають нейродегенерацію [3] та апоптоз [8], підсилення експресії глутаматних рецепторів і кальційзв'язуючих білків [10] тощо. Дисфункція ГКС також виявляється при електрофізіологічних дослідженнях з використанням мультиполярної електроретинографії (ЕРГ) [11]. При цьому дані, отримані на сітківці ока людини, свідчать, що така модель адекватно відображує відповідні процеси у пацієнтів, хворих на діабет [4].

Наші попередні електрофізіологічні дослідження ізольованих ГКС ока щурів дали змогу описати властивості потенціалкеро-ваних іонних каналів, відповідальних за електричну збудливість їх соматичних мембран [1]. Було також показано, що ГКС діляться на дві популяції за типом електричної активності – фазної та тонічної [2].

Оскільки саме ГКС, здатні до тонічної генерації потенціалів дії (ПД) з високою частотою [12], є заключною ланкою при передачі імпульсації від ока в центральну нервову систему, то дослідження електрофізіологічних властивостей мембран цих клітин є важливим для розуміння механізмів передачі зорової інформації у нормі та їх порушень при патології. Характеристики потенціал- та лігандкеро-ваних мембранних струмів ГКС у нормі є достатньо дослідженими [1, 2, 9], проте дані електрофізіологічного відведення від окремих ГКС тварин з діабетом у літературі відсутні. Мета нашої роботи – визначення електричних властивостей окремих ГКС ока щурів зі стрептозотоциніндукованим діабетом.

### МЕТОДИКА

У роботі використовували дорослих щурів з хронічною гіперглікемією (вміст глюкози в крові був не менше ніж 30 ммоль/л), яку викликали стрептозотоциніндукованим діабетом за загальноприйнятою схемою [3]. Експерименти виконували через 8 тиж після ін'єкції стрептозотину на ізольованому пре-

параті цілої сітківки, в якому всі гангліозні клітини знаходяться у відповідному шарі і не потребують додаткової ідентифікації [12].

Всі експериментальні процедури було проведено згідно з правилами роботи з дослідними тваринами в установах Національної академії наук України. Тварин умертвляли за допомогою  $\text{CO}_2$ -асфіксії з наступною декапітацією. Очні яблука виділяли та препарували по границі зубчастого краю, відділяли рогівку, видаляли кришталик і склоподібне тіло. Сітківку обережно відлущували від шару пігментного епітелію та робили переріз зорового нерва біля оптичного диска. Відділену сітківку фіксували на дні реєстраційної камери, вкритого біоінертним покриттям "Sylgard", гангліозним шаром догори. Внутрішню обмежувальну мембрану, утворену відростками мюллеровських гліальних клітин, та шар оптичних волокон, утворений аксонами ГКС, видаляли за допомогою кінчика patch-піпетки, як було описано раніше [9, 12], після чого електрофізіологічну реєстрацію здійснювали від ГКС з однорідною, гладенькою поверхнею та негранульованою цитоплазмою.

Препарування та експериментальні дослідження проводили у фізіологічному розчині, що містив (ммоль/л):  $\text{NaCl}$  – 140,  $\text{KCl}$  – 3,  $\text{CaCl}_2$  – 2,  $\text{MgCl}_2$  – 2,  $\text{HEPES}$  – 10, глюкозу – 12; pH 7,4 (доведений  $\text{NaOH}$ ) при кімнатній температурі (22 °C). Реєстраційну камеру постійно перфузували зовнішньоклітинним розчином зі швидкістю близько 1 мл/хв. Внутрішньоклітинний розчин містив (ммоль/л): калію глюконат – 100,  $\text{KCl}$  – 40,  $\text{MgCl}_2$  – 5,  $\text{EGTA}$  – 0,1,  $\text{HEPES}$  – 20,  $\text{Na}_2\text{ATP}$  – 3,  $\text{NaADP}$  – 0,5,  $\text{NaGTP}$  – 0,5; pH 7,4 (доведений  $\text{KOH}$ ) з додаванням кальційчутливого барвника Indo-1 у концентрації 0,1 ммоль/л.

Реєстрації відбувалися при підтримуваному потенціалі -70 мВ, для чого через клітину пропускали струм відповідної амплітуди. Пасивні електричні характеристики мембрани ГКС (вхідний опір, стала часу та ємність клітини) вимірювали в режимі фіксації струму за усередненим електротонічним потенціалом, викликаним гіперполярую-

чим імпульсом струму амплітудою -10 пА та тривалістю 500 мс. Тонічну генерацію ПД у ГКС викликали деполяризуючими прямокутними імпульсами тривалістю 500 мс та інкрементом амплітуди 5-10 пА, також серії ПД імітували в режимі фіксації потенціалу прикладанням короткотривалих (3 мс) командних потенціалів (від -70 до +10 мВ) з частотою  $50 \text{ c}^{-1}$ . Для визначення параметрів окремого ПД (амплітуда, поріг, ширина на половині висоти, амплітуда гіперполяризації) аналізували імпульси, викликані мінімальним надпороговим стимулом.

Зміни внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію реєстрували з використанням флуоресцентного кальційчутливого барвника Indo-1 за допомогою спектрофотометричної установки (Carin Research Ltd, Велика Британія). У режимі епіфлуоресценції світло від ксенонової лампи пропускали через фільтр (360 нм), флуоресцентний сигнал за допомогою системи дихроїчних дзеркал та оптичних фільтрів (408 нм та 480 нм) розділявся на два окремі потоки та реєструвався двома фотоелектронними помножувачами, відношення інтенсивності яких ( $R$ ) відповідає певній концентрації іонів кальцію [7]. Відповідність значень цього відношення та концентрацій кальцію було визначено експериментально у окремій серії калібрувальних дослідів. Значення  $R$ , які відповідають мінімальній ( $R_{\min}$ ) та максимальній ( $R_{\max}$ ) внутрішньоклітинним концентраціям кальцію, а також ефективне значення константи дисоціації барвника ( $K_d$ ) становили 0,58 ( $R_{\min}$ ), 4,4 ( $R_{\max}$ ) та 1,44 мкмоль/л ( $K_d$ ) відповідно. З отриманих у досліді значень  $R$  внутрішньоклітинну концентрацію кальцію визначали за наступною формулою:  $[\text{Ca}] = K_d \cdot (R_{\min} - R) / (R - R_{\max})$  [7].

Параметри ПД та характеристики імпульсної активності ГКС, потенціалзалежних струмів та кальцієвих сигналів визначали та аналізували за допомогою програмного пакету Clampfit 9.2. Експериментальні результати представлені як середнє значення  $\pm$  стандартна похибка середнього. Для їх статистичного

аналізу використовували критерій  $t$  Стьюдента. Різницю середніх вважали статистично достовірною при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Значення пасивних електричних характеристик мембрани ГКС щурів зі стрептозотозиндукованим діабетом становили ( $n=4$ ): потенціал спокою  $-58 \text{ мВ} \pm 8 \text{ мВ}$ , вхідний опір  $0,54 \text{ ГОм} \pm 0,05 \text{ ГОм}$ , стала часу мембрани  $21 \text{ мс} \pm 6 \text{ мс}$ , ємність  $62 \text{ пФ} \pm 23 \text{ пФ}$ .

Активацію інтегральних струмів (рис. 1, а) в ГКС дослідних щурів проводили деполяризуючими прямокутними командними потенціалами тривалістю 200 мс від потенціалу спокою ( $-70 \text{ мВ}$ ) до рівня  $+40 \text{ мВ}$  з інкрементом 5-10 мВ. Амплітуда натрієвого компонента інтегрального струму (рис. 1,а) сягала свого максимуму при командному потенціалі  $-30 \text{ мВ}$  і становила  $3,15 \text{ нА} \pm 0,41 \text{ нА}$ . Середнє значення максимального калієвого компонента при  $+40 \text{ мВ}$  було  $1,25 \text{ нА} \pm 0,22 \text{ нА}$ .

У всіх досліджених ГКС зберігалася спонтанна активність (див. рис. 1,в), у відповідь на деполяризуючий імпульс струму тривалістю 500 мс клітини проявляли тонічний характер імпульсної активності (див. рис. 1,б), частота якої залежала від амплітуди стимулу. Для кожної стимуляції визначали

середню частоту генерації ПД, максимальне значення якої було обрано як характеристика цієї клітини. Значення максимальної частоти тонічної імпульсації становило  $28 \text{ с}^{-1} \pm 9 \text{ с}^{-1}$ .

Зміни внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію викликали прикладанням у режимі фіксації потенціалу короткотривалих (3 мс) командних потенціалів (від  $-70$  до  $+10 \text{ мВ}$ ) з частотою  $50 \text{ с}^{-1}$ . Це призводило до збільшення значення цього показника, яке починало моноекспоненційно зменшуватись одразу ж після припинення стимуляції. На рис. 2 представлено кальцієвий сигнал, викликаний високочастотною стимуляцією тривалістю 10 с. Значення постійної часу спаду кальцієвого сигналу становило  $14,1 \text{ с} \pm 1,9 \text{ с}$ .

## ОБГОВОРЕННЯ

Електрофізіологічне дослідження окремих ГКС на ізольованому препараті сітківки ока щурів через 8 тиж після ін'єкції стрептозотозину не виявило достовірних змін пасивних мембранних характеристик, параметрів інтегрального потенціалзалежного струму та окремого ПД у порівнянні з нашими даними, отриманими на ГКС тварин у нормі [9]. Статистично достовірним було зменшення вдвічі максимальної частоти тонічної імпульсації, викликаній прикладанням деполяризуючого

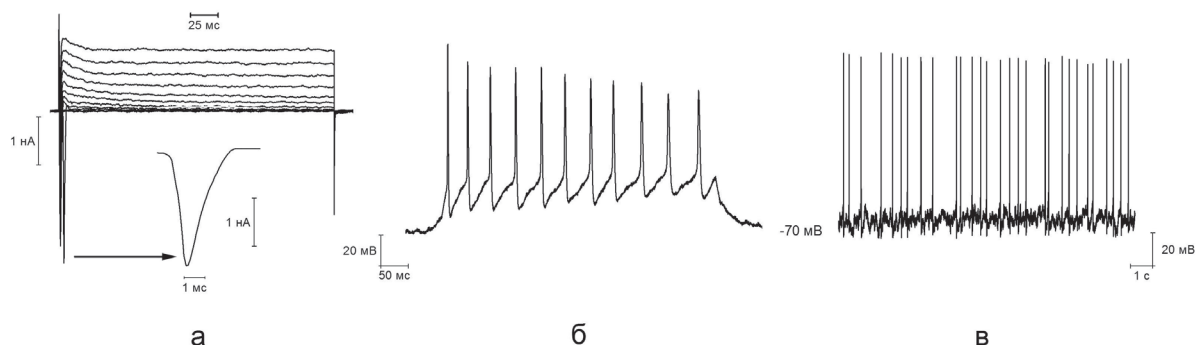


Рис. 1. Електрофізіологічні властивості гангліозних клітин сітківки ока щура при стрептозотозиндукованому діабеті. На а: інтегральні потенціалзалежні струми, викликані деполяризуючими командними потенціалами тривалістю 200 мс від спокою ( $-70$ ) до  $+40 \text{ мВ}$  з інкрементом 10 мВ. На вставці – натрієвий струм у збільшеному часовому масштабі. На б: тонічна генерація потенціалів дії у відповідь на деполяризуючий струм тривалістю 500 мс та амплітудою 50 пА. На в: реєстрація спонтанної імпульсної активності. Реєстрації, представлені на а–в отримані від однієї клітини, підтримуваний потенціал  $-70 \text{ мВ}$

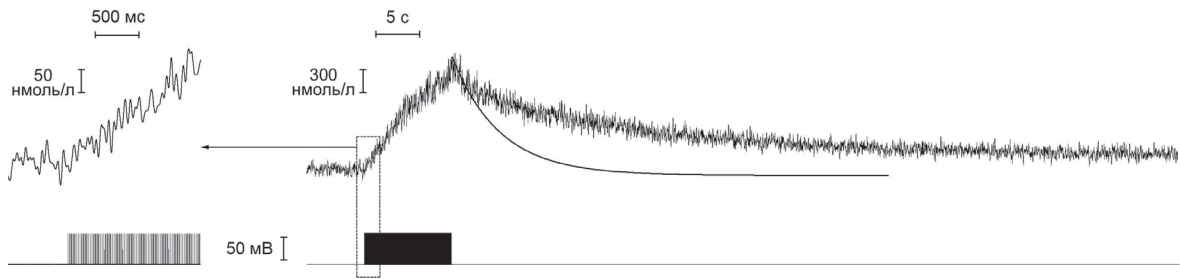


Рис. 2. Кальцієвий сигнал, викликаний високочастотною стимуляцією гангліозної клітини сітківки ока щура при стрептозотозиндукованому діабеті. Клітину в режимі фіксації потенціалу стимулювали протягом 10 с серією короткотривалих (3 мс) командних потенціалів (від  $-70$  до  $+10$  мВ) з частотою  $50 \text{ с}^{-1}$ , що імітують високочастотну генерацію ПД. Ліворуч показано лінійну фазу зростання сигналу у збільшеному часовому масштабі. Стимуляцію схематично зображено під відповідними сигналами. Підтримуваний потенціал  $-70$  мВ. Суцільна лінія – експоненційна функція нормована на амплітуду сигналу з постійною часу  $5,5$  с, що відповідає середньому значенню у нормі

струму, середнє значення якої у ГКС нормальних тварин становило  $60 \text{ с}^{-1}$  [9]. Також слід відзначити зменшення (хоча і статистично недостовірне) калієвого компонента інтегрального потенціалзалежного струму та, вірогідно, відповідного зростання тривалості окремого ПД (середні значення були  $1,7$  мс при діабеті та  $1,5$  мс у нормі).

Зменшення частоти викликані тонічної імпульсації ГКС, що спостерігалось у нашій роботі, узгоджується з даними ЕРГ-дослідження, в якому було зареєстровано зменшення скотопічної порогової відповіді (переважно залежить від імпульсної активності гангліозних та меншою мірою від такої амакринових клітин) у щурів зі стрептозотозиндукованим діабетом у порівнянні з контролем [13]. Подібні зміни частоти та тривалості окремого ПД були зареєстровані нами при блокуванні потенціалкероаних калієвих каналів типу  $Kv3.1/Kv3.2$  [9], при цьому зменшення відповідного струму на  $25\%$  призводило до  $50\%$ -го зниження частоти генерації ПД. Слід відзначити, що амплітуда калієвого компонента інтегрального потенціалзалежного струму ( $1,25$  нА) була нижчою (хоча і статистично недостовірно) за середню амплітуду калієвого струму ГКС щурів у нормі ( $1,61$  нА). Тому можна припустити, що в ГКС саме  $Kv3.1/Kv3.2$ -канали першими зазнають пошкодження при розвитку стреп-

тозотозиндукованого діабету. В літературі відсутні дані про калієві струми ГКС у тварин з діабетом, проте зменшення активності  $Kv$ -каналів при діабетичній нейропатії було показано на первинних сенсорних нейронах [5]. Таким чином, для підтвердження цієї гіпотези необхідні подальші дослідження з використанням електрофізіологічних і фармакологічних методів розділення потенціалзалежних мембранних струмів ГКС тварин з діабетом.

У нашій попередній роботі в ГКС ока щура в нормі було зареєстровано кальцієві сигнали, викликані високочастотною тонічною імпульсацією [9]. Для порівняння з отриманими раніше даними кальцієві сигнали ГКС щурів з діабетом активували прикладанням у режимі фіксації потенціалу короткотривалих (3 мс) командних потенціалів (від  $-70$  до  $+10$  мВ) з частотою  $50 \text{ с}^{-1}$ , що імітувало високочастотну генерацію ПД. Стимуляція ГКС призводила до зростання внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію, початкова фаза якої достатньо добре апроксимувалася лінійною функцією (рис. 2). Відповідний коефіцієнт пропорційності надає можливість оцінити амплітуду кальцієвого сигналу, викликаного окремим стимулом (у цьому разі –  $2,7$  нмоль/л на один імпульс). Це значення більше ніж удвічі нижче за оцінку амплітуди кальцієвого сигналу, викликаного

одним ПД у ГКС тварин у нормі, визначеного нами раніше (7,3 нмоль/л), близьке співвідношення спостерігалось і для постійної часу спаду сигналу, середнє значення якої становило 5,5 с [9]. Такі зміни у характеристиках кальцієвих сигналів узгоджуються з літературними даними про підвищення експресії кальційзв'язуючих білків у ГКС щурів при викликаній діабетичній ретинопатії [10]: підвищення зв'язування іонів кальцію призводить до зменшення амплітуди сигналу, викликаного стимулом, а їх вивільнення у цитоплазму після припинення стимуляції – до зростання постійної часу спаду кальцієвого сигналу [6]. Слід також зазначити, що на зміни характеристик кальцієвих сигналів при діабеті впливатимуть і цілком вірогідні зміни швидкості АТФ-залежної екструзії, адже в літературі є дані про позитивну кореляцію між швидкістю екструзії та кальцієвою буферною ємністю ГКС [6]. Механізми регуляції внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу ГКС при діабетичній ретинопатії потребують подальших досліджень, необхідність яких зумовлена надзвичайно важливою роллю, яку відіграють іони кальцію у регуляції клітинних функцій.

Таким чином, основні електричні властивості та спонтанна активність ГКС ока щура зберігаються через 8 тиж після ін'єкції стрептозотозину, проте зменшується здатність цих клітин до високочастотної тонічної генерації ПД та уповільнюється спад кальцієвого сигналу, викликаного їх високочастотною стимуляцією.

Ця робота є частиною проекту “Ідентифікація молекулярних структур, які забезпечують фонову активність гангліозних клітин сітківки” (№ держ. реєстрації 0106U010932).

Результати, які представлені в роботі були отримані при частковому фінансуванні за проектом “Функціональна геноміка міжнейронної взаємодії та субнейронних процесів за нормальних та патологічних умов” та сумісним російсько-українським проектом “З'ясування природи нейротропних ефектів пептидів групи гліпролінів у нормі та на моделях пошкодження нейронів”.

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

### **ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГАНГЛИОЗНЫХ КЛЕТОК СЕТЧАТКИ ГЛАЗА КРЫСЫ ПРИ СТРЕПТОЗОТОЦИНИНДУЦИРОВАННОМ ДИАБЕТЕ**

На изолированном препарате сетчатки глаза крыс со стрептозотозининдуцированным диабетом в конфигурации “целая клетка” исследованы основные электрические свойства ганглиозных клеток сетчатки (ГКС). Показано, что в ГКС на 8-й неделе после инъекции стрептозотозина по сравнению со значениями в норме, уменьшается максимальная частота вызванной тонической импульсации и увеличивается постоянная времени спада кальциевого сигнала, вызванного высокочастотной стимуляцией клеток. Полученные результаты свидетельствуют о функциональных изменениях в ГКС крысы при стрептозотозининдуцированном диабете, обсуждаются механизмы, которые могут лежать в основе таких изменений.

Ключевые слова: ганглиозные клетки сетчатки, стрептозотозининдуцированный диабет, потенциалзависимые токи, импульсная активность, кальциевый сигнал.

**K.I. Kuznetsov, N.N. Veselovskaya, V.Y. Maslov, S.A. Fedulova, M.S. Veselovsky**

### **ELECTRICAL PROPERTIES OF RETINAL GANGLIONIC CELLS OF THE RATS WITH STREPTOZOTOCINE-INDUCED DIABETES**

On isolated retinal preparation from STZ-induced diabetic rats in whole-cell configuration the basic electrical properties of retinal ganglion cells (RGC) were studied. It was shown that on 8<sup>th</sup> week after STZ maximal depolarization-induced firing frequency is reduced and decay time constant of high-frequency stimulation-induced calcium signals is increased as compared to controls. The data obtained suggest functional changes in RGC of STZ-induced diabetic rats, possible mechanisms of such changes are discussed.

Key words: retinal ganglion cells, STZ-induced diabetes, voltage-dependent currents, firing activity, calcium signal.

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Science of Ukraine, Kyiv,*

*International Center of Molecular Physiology National Academy of Science of, Kyiv, Ukraine*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Веселовська Н.М., Веселовський М.С. Іонні струми, що забезпечують електричну збудливість ізольованих гангліозних клітин сітківки ока щурів // Фізіол. журн. – 2001. – 47, № 2. – С. 32–40.
2. Колодин Ю.А., Веселовский Н.С., Веселовская Н.Н.,

- Федулова С.А. Электрическая активность ганглиозных клеток сетчатки глаза крысы // Нейрофизиология. – 2007. – **39**, № 4/5. – С. 382–384.
3. Barber A. J., Lieth E., Khin S. A. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin // J. Clin. Invest. – 1998. – **102**, № 4. – P. 783–791.
  4. Barber A.J., Gardner T.W., Abcouwer S.F. The significance of vascular and neural apoptosis to the pathology of diabetic retinopathy // Inv. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2011. – **52**, №2. – P. 1156–1163.
  5. Cao X.H., Byun H.S., Chen S.R., Cai Y.Q., Pan H.L. Reduction in voltage-gated K<sup>+</sup> channel activity in primary sensory neurons in painful diabetic neuropathy: role of brain-derived neurotrophic factor // J Neurochem. – 2010. – **114**, №5. – P. 1460–1475.
  6. Gartland A.J., Detwiler P.B. Correlated variations in the parameters that regulate dendritic calcium signaling in mouse retinal ganglion cells // J. Neurosci. – 2011. – **31**, №50. – P. 18353–18363.
  7. 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.
  8. Hammes H.P., Federoff H.J., Brownlee M. Nerve growth factor prevents both neuroretinal programmed cell death and capillary pathology in experimental diabetes // Mol. Med. – 1995. – **1**, №5. – P. 527–534.
  9. Kuznetsov K.I., Grygorov O.O., Maslov V.Y., Veselovsky N.S., Fedulova S.A. Kv3 channels modulate calcium signals induced by fast firing patterns in the rat retinal ganglion cells // Cell Calcium. – 2012. – **52**, №5. – P. 405–411.
  10. Ng Y.K., Zeng X.X., Ling E.A. Expression of glutamate receptors and calcium-binding proteins in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats // Brain Res. – 2004. – **1018**, №1. – P. 66–72.
  11. Ng J.S., Bearnse M.A. Jr, Schneck M.E., Barez S., Adams A.J. Local diabetic retinopathy prediction by multifocal ERG delays over 3 years // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2008. – **49**, №4. – P. 1622–1628.
  12. 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.
  13. Wong V.H., Vingrys A.J., Bui B.V. // Glial and neuronal dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats // J. Ocul. Biol. Dis. Infor. – 2011. – **4**, №1–2. – P. 42–50.

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

*Матеріал надійшов  
до редакції 05.03.2013*