

С. В. Врублевский, А. Е. Валеев, Н. И. Черневская

МЕТОД БЫСТРОЙ СМЕНЫ ТЕСТИРУЮЩИХ РАСТВОРОВ ПРИ ИССЛЕДОВАНИЯХ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК

Применяемые в настоящее время методы изучения хемочувствительных мембран, такие, как ионофоретическая аппликация и аппликация из микропипетки под действием давления, получили широкое распространение [2—4, 7]. Однако эти методы имеют ряд существенных недостатков, так как не позволяют исключить, или по крайней мере свести к минимуму, возможность развития процесса десенситизации рецепторов, контролирующих проницаемость определенных ион-переносящих каналов. Кроме того, ни ионофоретическая аппликация, ни аппликация под действием давления не позволяют с достаточной точностью количественно оценить взаимодействие между рецептором и медиатором, агонистом или антагонистом. Проблемы возникают уже при определении значений констант диссоциации. В принципе, для изучения хемоправляемых каналов идеальными являются экспериментальные возможности, которые позволили бы оперировать с химическим стимулом так же, как фиксация потенциала позволяет оперировать с электрическим стимулом: быстро прикладывать и поддерживать на постоянном уровне заданную концентрацию исследуемого вещества необходимое время.

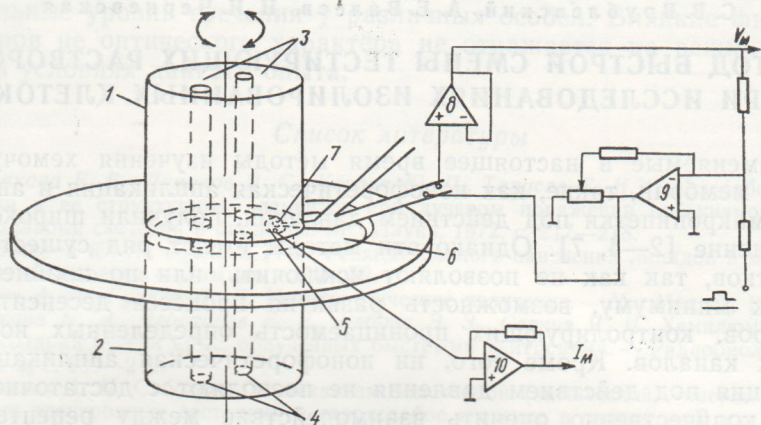
Новым шагом на пути улучшения методов аппликации явился метод быстрой аппликации [6]. В усовершенствованной форме этот метод позволяет производить «прямоугольную» аппликацию растворов к клеточной мембране [1, 5]. Однако этот метод довольно трудоемок и не поддается автоматизации.

Предлагаемый нами метод «быстрой смены растворов», схематически показанный на рисунке, представляет собой новое техническое решение задачи приложения медиатора к нейрональной мембране, позволяющее свести к минимуму большинство перечисленных трудностей.

Устройство состоит из двух цилиндров (верхнего и нижнего), соединенных между собой и синхронно вращающихся на одной оси, а также помещенной между ними пластинки из органического стекла. Аппликационная камера, в которую при помощи микроманипулятора помещается кончик микропипетки с перфузируемой клеткой, находится в толще пластинки, помещенной между верхним и нижним цилиндрами. В верхнем цилиндре сделаны две емкости: одна предназначена для медиатора, другая для нормального физиологического раствора. В нижнем цилиндре сделаны два отверстия, соосных с емкостями верхнего цилиндра, для оттока рабочих растворов из аппликационной камеры.

Аппликация происходит при совмещении одной из емкостей верхнего цилиндра, аппликационной камеры с внесенным в нее на кончике микропипетки нейроном и отверстия нижнего цилиндра для оттока растворов из аппликационной камеры. Вся система приводится в действие при помощи шагового двигателя, на роторе которого закреплен нижний цилиндр устройства. Работой шагового двигателя по заданной программе управляет микро-ЭВМ. Электронная часть устройства, осуществляющая контроль мембранного потенциала нейрона и регистрацию вызываемых аппликацией медиатора ионных токов, не отличается от описанной ранее [1].

Данная система аппликации позволяет: 1) с большой скоростью (10—20 мс) производить полную смену раствора в аппликационной камере, что имеет важное значение для определения констант связывания медиатора с мембранными рецепторами; 2) с высокой точностью контролировать время действия медиатора на нейрональную мембрану; 3) практически исключить развитие процесса десенситизации, затрудняющего изучение свойств хемоправляемых ионных каналов;



Устройство для аппликации нервных клеток.

1 — верхний цилиндр, 2 — нижний цилиндр, 3 — емкости для апплицируемых растворов, 4 — отверстия для оттока растворов из аппликационной камеры, 5 — аппликационная камера, 6 — камера для отбора нейронов, 7 — микропипетка с нейроном, помещенным в аппликационную камеру, 8 — входной усилитель, 9 — усилитель фиксации, 10 — измеритель трансмембранного тока.

лов; 4) обеспечивать последовательное приложение к мембране нейронов ряда веществ по заданной программе.

Использование предлагаемой системы аппликации представляется перспективным для исследования свойств хемоправляемых ионных каналов различных изолированных клеток, доступных для метода внутриклеточной перфузии.

Список литературы

1. Крышталъ О. А., Марченко С. М., Пидопличко В. И. Рецептор АТФ в мембране сенсорных нейронов. — Докл. АН СССР, 1982, 267, № 5, с. 1244—1247.
2. Curtis D. R. Microelectrophoresis. — In: Electrophysiological methods. New York; London: Acad. press, 1964, p. 144—190. (Physical techniques in biological research; Vol. 5).
3. Jahr C. E., Jessell T. N. ATP excites a subpopulation of rat dorsal horn neurones. — Nature, 1983, 304, N 1, p. 102—105.
4. Kelli J. S., Simmonds M. A., Struaghan D. W. Microelectrode techniques. — In: Methods in brain research. London: Willey, 1975, p. 333—377.
5. Krichtal O. A., Marchenko S. M., Pidoplichko V. I. Receptor for ATP in the membrane of mammalian sensory neurones. — Neurosci. Lett., 1983, 35, N 1, p. 41—45.
6. Krichtal O. A., Pidoplichko V. I. A receptor for protons in the nerve cell membrane. — Neuroscience, 1980, 5, N 12, p. 201—210.
7. McCaman R. E., McKenna D. G., Ono J. K. A pressure system for intracellular and extracellular ejections of picoliter volumes. — Brain Res., 1977, 136, N 1, p. 141—147.

Ин-т физиологии им. А. А. Богомольца
АН УССР, Киев

Поступила 25.01.84