

УДК 512.17

Н. А. Бурнашев, Ф. А. Эдвардс, А. Н. Верхратский

Применение тонких срезов миокарда для регистрации токов через одиночные ионные каналы

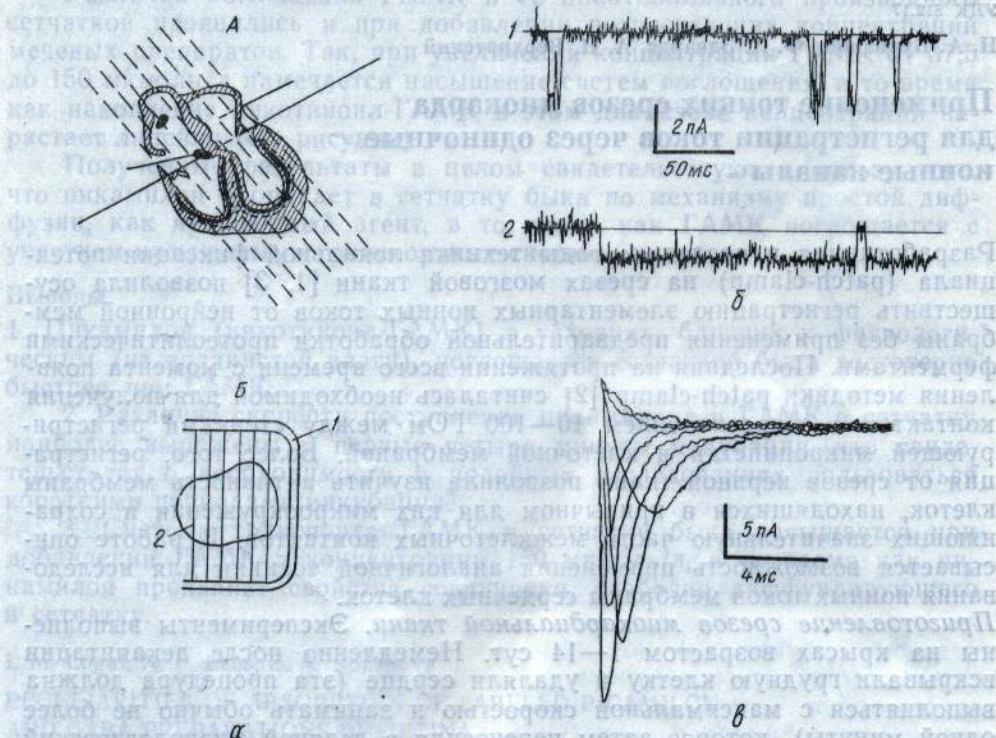
Разработанная в последние годы техника локальной фиксации потенциала (patch-clamp) на срезах мозговой ткани [1, 3] позволила осуществить регистрацию элементарных ионных токов от нейронной мембраны без применения предварительной обработки протеолитическими ферментами. Последняя на протяжении всего времени с момента появления методики patch-clamp [2] считалась необходимой для получения контактов с сопротивлением 10—100 ГОм между стенками регистрирующей микропипетки и клеточной мембраной. Более того, регистрация от срезов нервной ткани позволила изучить активность мембраны клеток, находящихся в привычном для них микроокружении и сохраняющих значительную часть межклеточных контактов. В работе описывается возможность применения аналогичной техники для исследования ионных токов мембраны сердечных клеток.

Приготовление срезов миокардиальной ткани. Эксперименты выполнены на крысах возрастом 1—14 сут. Немедленно после декапитации вскрывали грудную клетку и удаляли сердце (эта процедура должна выполняться с максимальной скоростью и занимать обычно не более одной минуты), которое затем переносили в ледяной физиологический раствор следующего состава (ммоль/л): 125 — NaCl, 2,5 — KCl, 1,0 — CaCl₂, 1,0 — MgCl₂, 26 — NaHCO₃, 1,25 — Na₂HPO₄, 25 — глюкоза, pH 7,4 при постоянной перфузии карбогеном (95 % O₂, 5 % CO₂). Этот же раствор использовали в дальнейшем в качестве основного внеклеточного раствора для проведения электрофизиологических измерений и инкубации приготовленных срезов. При этом одним из необходимых условий для переживания препаратов является наличие постоянной оксигенации, другим — по возможности быстрее охлаждение сердца. После охлаждения сердца и его инкубации в физиологическом растворе на протяжении 3—5 мин удаляли предсердия. После этого желудочки приклеивали с помощью быстро сохнущего клея ко дну препаративной камеры микротомы, и камеру немедленно заполняли холодным физиологическим раствором. При приклеивании препарат ориентировали таким образом, чтобы длинная ось желудочков была параллельна ножу микротомы. Срезы готовили с помощью вибрационного микротомы (марки «DTK-100», Япония) при скорости движения и частоте вибрации ножа 15—20 мм/с и 8 Гц соответственно. Толщина срезов варьировала от 100 до 200 мкм. Первые два среза отбрасывали. Немедленно после приготовления срезы переносили в оксигенированный физиологический раствор, где их выдерживали при комнатной температуре (22—24 °C) до дальнейшего использования. Концентрацию Ca²⁺ в инкубационной среде мы варьировали между 0 и 2 моль/л, наилучшие результаты получены при концентрации Ca²⁺ 1 моль/л. В таких условиях возможно регистрировать ионные токи на протяжении 7—10 ч

© Н. А. БУРНАШЕВ, Ф. А. ЭДВАРДС, А. Н. ВЕРХРАТСКИЙ, 1991

после приготовления срезов. Обычно перед началом электрофизиологических экспериментов срезы выдерживали в инкубационной среде 30—60 мин.

Регистрация токов в условиях локальной фиксации потенциала. Для электрофизиологических экспериментов срезы помещали в камеру и фиксировали с помощью специальной приготовленной сети из параллельно натянутых на подковообразную основу нейлоновых струн [1]. Камеру постоянно перфузировали оксигенированным физиологическим



Общая схема экспериментов с использованием техники локальной фиксации потенциала на срезах миокарда:

а — схема (А) приготовления срезов (сплошная линия — плоскость отсечения предсердий, пунктирная — плоскость движения ножа микротом) и вид сверху (Б) сети из нейлоновых струн (1), прижимающей срез (2) ко дну экспериментальной камеры, находящейся на предметном столике микроскопа; **б** — примеры оригинальной регистрации деятельности двух типов калиевых каналов аномального выпрямления (проводимостью 41 (1) и 25 (2) пСм соответственно). Срез находился в нормальном физиологическом растворе, внутри пипетки был гиперкалиевый раствор. Поддерживаемый потенциал 0 мВ относительно потенциала покоя, регистрация в «cell-attached»-конфигурации; **в** — семейство натриевых токов, полученных в результате усреднения 50 индивидуальных регистраций, сделанных в «cell-attached»-конфигурации в ответ на тестирующие деполаризации от 50 до 140 мВ (поддерживаемый потенциал —60 мВ относительно потенциала покоя).

раствором при комнатной температуре. Эта камера была укреплена на предметном столике обычного микроскопа «Standard 14» (фирма «Zeiss», ФРГ), снабженного оптикой Номарского и водноиммерсионным объективом (марка «Ахромат» 40X, фирма «Zeiss», ФРГ; рабочее расстояние 1,6 мм). Используя этот микроскоп, можно было идентифицировать поверхность лежащие миокардиальные волокна и отдельные клетки, которые использовали для последующих измерений. В ряде случаев срезы, находящиеся в камере, более или менее регулярно сокращались, эти сокращения, естественно, делали невозможным получение стабильных контактов. Добавление в перфузирующий раствор 2 ммоль/л магния обычно устраняло сокращения. Кроме этого ритмическую активность можно было подавить, заменяя раствор в камере на гиперкалиевую среду, концентрация K^+ в которой составляла 140 ммоль/л. Электрофизиологические измерения выполняли, используя усилитель для локальной фиксации потенциала EPC-7 (фирма «List», ФРГ). Микропипетки изготавливали из боросиликатного стекла (фирма

«Hilgenberg», ФРГ; наружный диаметр 2 мм, толщина стенки 0,3 мм) с помощью общепринятой двухступенчатой процедуры. Сопротивление микропипеток, заполненных солевым раствором, составляло 2—5 МОм. В качестве внутрипипеточных растворов использовали либо гиперкалиевый раствор (состав, ммоль/л: 140 — KCl, 1 — CaCl₂, 1 — MgCl₂, 10 — HEPES/КОН, pH 7,4), либо нормальный физиологический раствор (единственное отличие состояло в том, что в качестве буфера в этом случае использовали 10 ммоль/л HEPES/NaOH). Для получения контактов применяли стандартную технику [2]. Частота их образования резко возрастала, если перед началом эксперимента к внутрипипеточной среде прикладывали относительно высокое (30 мм вод. ст.) положительное давление, сохраняющееся до момента получения контакта с клеточной мембраной. После этого положительное давление снимали и осторожно прикладывали отрицательное; эта процедура приводила к формированию плотного контакта (10—50 ГОм); обычно его формирование занимало 1—5 мин. После этого контакт был достаточно стабилен и позволял проводить измерения ионных токов до 40 мин. Регистрировать ионные токи (некоторые примеры такой регистрации представлены на рис. 1) было возможно в «cell-attached» и в обоих вариантах «excised» конфигурации локальной фиксации потенциала (как «inside-out», так и «outside-out»). В конфигурации «whole-cell», которую также можно было получить на исследуемом препарате, мы измерили потенциал покоя (ПП) исследуемых клеток, колебавшийся в диапазоне —30÷—65 мВ.

Таким образом, описанная методика позволяет осуществлять измерения ионных токов мембраны сердечных клеток без сложных процедур изоляции кардиомиоцитов. Устранение в связи с этим ферментативной обработки в значительной мере позволяет избежать возможных артефактов, связанных с повреждением канальных молекул в ходе этих процедур. Конечно, этот метод нельзя считать свободным от ряда недостатков: в частности, при измерении ПП обнаружено, что значительная часть клеток имеет ПП менее —40 мВ. Это, в свою очередь, является свидетельством возможного повреждения клеток при приготовлении срезов миокарда. Однако использование срезов сердечной мышцы в качестве объекта для электрофизиологических измерений может быть полезным при изучении механизмов межклеточных взаимодействий в физиологических и патологических условиях (например, в зонах ишемии). В последнем случае использование стандартной техники изолированных кардиомиоцитов представляется практически невозможным.

N. A. Burnashev, F. A. Edwards, A. N. Verkhratsky

THIN MYOCARDIAL SLICES: NEW TOOL FOR SINGLE-CHANNEL CURRENTS MEASUREMENTS

Thin cardiac slices (100-200 μ m) from newborn (1-14 days old) rat heart ventricles were used for patch clamp recordings. High resistance seals (10-50 GOhms) between patch-clamp pipettes and the membrane of cardiac cells as well as classical patch-clamp configurations can be achieved on this preparation without any enzymatic treatment of tissue. Resting potential for cardiac cells measured in whole-cell configuration ranged between —30 and —65 mV. Averaged sodium currents and single inward rectifying potassium elementary currents recorded in cell-attached mode displayed basic features similar to those previously reported for isolated rat ventricular cells. Application of the method described here in cardiac electrophysiology will allow patch-clamp studies on heart cells without the complicated procedures of cell isolation. In addition, the uncertainty associated with enzyme treatment can be avoided. In future, this technique could be a new tool for studying electrophysiological properties of heart cells in situ.

Institute of Medizinische Forschung, Heidelberg,
Federal Republic of Germany
A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

1. Edwards F. A., Konnerth A., Sakmann B., Takahashi T. A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system // *Pflügers Arch.*—1989.—414.—P. 600—612.
2. Hamill O. P., Marty A., Neher E. et al. Improved patch/clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-tree membrane patches // *Ibid.*—1981.—391.—P. 85—100.
3. Sakmann B., Edwards F., Konnerth A., Takahashi T. Patch clamp techniques used for studying synaptic transmission in slices of mammalian brain // *Q. J. Exp. Physiol.*—1989.—74.—P. 1107—1118.

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

Материал поступил
в редакцию 24.09.90

УДК 611.813:815

В. А. Майский, В. Я. Фридлянский

Заточка микроэлектродов методом вибрации без использования специального генератора

Ранее нами разработан способ заточки микроинструментов с помощью вибрации [2] и описано устройство для заточки стеклянных микроэлектродов этим способом [1]. Для получения максимального размаха колебаний якоря с абразивной пластиной (рабочего инструмента) обмотка электромагнитного вибратора в данном устройстве питалась переменным током частотой, равной частоте механического резонанса рабочего инструмента. Для питания вибратора необходимо было использовать генератор звуковых частот. Уменьшения потерь при перемагничивании сердечника достигали включением в цепь питания обмотки диодного выпрямителя. Опытным путем установлено, что время и качество заточки микроэлектродов зависят от скорости движения абразивной пластины, т. е. удвоенной частоты колебаний рабочего инструмента, умноженной на размах колебаний пластины. Хорошие результаты получены при частоте колебаний 200 с^{-1} и размахе колебаний 1—6 мм [1].

Цель нашей разработки — исключение дорогостоящего генератора звуковых частот. Питание электромагнитного вибратора с учетом частоты механического резонанса рабочего инструмента можно осуществить с помощью формирователя импульсов от сети переменного тока 220 В, 50 Гц. Использование формирователя импульсов позволяет получить частоту вибрации рабочего инструмента, в 4 раза превышающую частоту питающего напряжения. Электрическая схема устройства приведена на рис. 1. В ней используется двухполупериодный мостовой выпрямитель (VD1—VD4). В цепь нагрузки последовательно включены переменный резистор (R), обмотка питания вибратора (L) и два кремниевых стабилитрона (VD5, VD6). Для эффективной работы устройства на резонансной частоте рабочего инструмента, т. е. на удвоенной частоте подаваемого на вибратор напряжения (100 Гц), необходимо обеспечить оптимальный уровень отсечки импульсов напряжения питания обмотки. Отсечку можно осуществить с помощью стабилитронов и получить необходимую длительность импульсов напряжения питания вибратора. Такая отсечка должна составлять $3/4$ длительности каждого полупериода выпрямленного напряжения (рис. 2). Вибратор питается импульсами длительностью 2,5 мс и интервалом между ними 7,5 мс. Другими словами, суммарное напряжение стабилизации двух последовательно соединенных стабилитронов должно составлять 0,924

© В. А. МАЙСКИЙ, В. Я. ФРИДЛЯНСКИЙ, 1991