

О.О. Лунько, Д.С. Ісаєв, О.П. Максимюк, О.О. Кришталь, О.В. Ісаєва

Характеристики постійного натрієвого струму в пірамідальних нейронах CA1 зони гіпокампа щурів після обробки протеолітичними ферментами

*Відомо, що постійний натрієвий струм (I_{NaP}), який відіграє важливу роль у підпорогових коливаннях мембранного потенціалу та підтриманні періодичної нервової активності у відповідь на деполяризацію мембрани, є досить чутливим до впливу деяких протеаз. Метою нашої роботи було дослідження впливу ензимів, які найчастіше використовуються в різних методиках виділення нейронів центральної нервової системи, на електорофізіологічні характеристики I_{NaP} . Вимірювання трансмембранних струмів здійснювали на пірамідальних нейронах CA1 зони гіпокампа з використанням методу patch-clamp у конфігурації "ціла клітина", ізольованих без використання ферментів (контрольна група), з використанням пронази E (*Streptomyces griseus*) або протеази типу XXIII (*Aspergillus oryzae*). Показано, що використання цих ферментів для ізоляції окремих нейронів зі зрізів гіпокампа не призводило до зміни потенціалу напівмаксимальної амплітуди та константи нахилу кривої стаціонарної активації I_{NaP} відносно контрольної групи нейронів, ізольованих без використання ферментів. Статистично достовірне зменшення густини I_{NaP} порівняно з контрольною групою спостерігалось у реєстраціях від нейронів, ізольованих з використанням протеази типу XXIII, але не в експериментальній групі, де нейрони були ізольованими з використанням пронази E. Ензиматична обробка нейронів може впливати на результати електрофізіологічних досліджень, що варто враховувати при виборі методу отримання ізольованих нейронів. Також наші результати свідчать на користь використання пронази E в ензиматичній обробці нейронів для дослідження I_{NaP} .
Ключові слова: гіпокамп, постійний натрієвий струм, ензиматична обробка, протеази.*

ВСТУП

Методика отримання поодиноких ізольованих нейронів, придатних для здійснення експериментальних досліджень за допомогою методу patch-clamp, найчастіше включає механічну та ферментативну обробку [1, 2]. Проте ферменти, які використовуються в різних методиках виділення нейронів, є активними сполуками, котрі можуть впливати на різні характеристики іонних каналів як безпосередньо, так і опосередковано через активацію різних зовнішньо- або внутрішньоклітинних молекулярних механізмів. Широко відомо, що протеази здатні з внутрішнього боку мембрани відщеплювати амінокислотні ланцюги, які відповідають за інактивацію каналів [3]. Нещодавні дослідження показали,

що плазмін і хімотрипсин можуть безпосередньо активувати натрієві канали в епітеліальних клітинах [4]. Колагеназа IV призводить до зменшення об'єму нейронів на 8–12 % у клітинах гліоми C6, що в свою чергу може впливати на роботу трансмембранних каналів. У нейронах *Aplysia Californica*, ізольованих за допомогою трипсину, спостерігається збільшення натрієвого струму у відповідь на дію ацетилхоліну [5]. Було показано, що колагеназа не змінює амплітуду натрієвого струму, але впливає на його кінетику [5]. Нещодавні дослідження продемонстрували зміни кінетики активації постійного натрієвого струму (I_{NaP}) під впливом деяких протеаз [6, 7].

Враховуючи той факт, що для отримання ізольованих нейронів використовуються різні

© О.О. Лунько, Д.С. Ісаєв, О.П. Максимюк, О.О. Кришталь, О.В. Ісаєва

ферменти, актуальним є питання їх впливу на характеристики різних каналів. Метою нашої роботи було дослідження та порівняння характеристик I_{NaP} на поодиноких нейронах гіпокампа, ізольованих за допомогою механічної та комбінованої механічно-ензиматичної дисоціації з використанням різних ферментів, зокрема протеази типу XXIII (*Aspergillus oryzae*), яка широко використовується для дисоціації нейронів молодих щурів, та пронази E (*Streptomyces griseus*), яку використовують для дисоціації нейронів дорослих щурів [8].

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на щурах лінії Вістар віком 12–16 діб. Усі маніпуляції з експериментальними тваринами виконували з дотриманням вимог Європейської конвенції із захисту хребетних тварин (Страсбург, 1986). Після виділення мозок швидко занурювали в холодний розчин такого складу (ммоль/л): NaCl – 130,0, KCl – 5,0, CaCl₂ – 0,1, MgCl₂ – 5,0, NaH₂PO₄ – 1,0, Na₂HPO₄ – 1,0, NaHCO₃ – 26,0, глюкоза – 10,0 (pH 7,35). Зрізи товщиною 400 мкм отримували за допомогою вібратора Campden Instruments та залишали на одну годину (20–22 °C) у базовому розчині, до якого входили (ммоль/л): NaCl – 130,0, KCl – 5,0, CaCl₂ – 2,0, MgCl₂ – 2,0, NaH₂PO₄ – 1,0, Na₂HPO₄ – 1,0, NaHCO₃ – 26,0, глюкоза – 10,0 (pH 7,35). Розчини постійно насичували газовою сумішшю (95% O₂ і 5% CO₂).

У контрольній групі нейрони були ізольовані за допомогою механічної вібродисоціації без використання ферментів [9, 10]. Ензиматичну обробку зрізів проводили протягом 15 хв (32 °C) у цукрозному розчині з додаванням протеази типу XXIII (0,4 мг/мл) або пронази E (2 мг/мл), який містив (ммоль/л): цукрозу – 290,0, KCl – 5,0, CaCl₂ – 0,5, MgCl₂ – 2,0, HEPES – 10,0, глюкозу – 15,0 (pH 7,35). Після цього зрізи декілька разів промивали в базовому розчині для припинення дії ферменту. Механічну дисоціацію нейронів здійснювали в штучній цереброспінальній рідині такого

складу (ммоль/л): NaCl – 140,0, KCl – 5,0, CaCl₂ – 2,0, MgCl₂ – 2,0, HEPES – 20,0 (pH 7,35) з використанням методу вібродисоціації [9].

I_{NaP} реєстрували з застосуванням методу patch-clamp у конфігурації “ціла клітина” на пірамідальних нейронах гіпокампа щурів Зовнішньоклітинний розчин містив (ммоль/л): NaCl – 130,0, CaCl₂ – 2,0, MgCl₂ – 1,3, HEPES – 10,0, tetraethylammonium-Cl – 20,0, CdCl₂ – 0,4 (pH 7,35). Внутрішньоклітинний розчин у patch-піпетках містив (ммоль/л): CsF – 120,0, NaCl – 5,0, tetraethylammonium-Cl – 30,0, ethylene glycol tetraacetic acid – 10,0, tris(hydroxymethyl)aminomethane – 10,0 (pH 7,2–7,3). Заповнені таким розчином піпетки мали опір 3–4 МОм. Активацію I_{NaP} проводили з використанням повільного деполаризуючого ramp-протоколу, який полягає у поступовому збільшенні потенціалу на мембрані досліджуваного нейрона від -80 до 0 мВ зі швидкістю наростання 30 мВ/с. Реєстрацію I_{NaP} -струмів виконували за допомогою диференціального підсилювача (“A-M Systems”, США) поєднаного з системою збору даних (NI PCI-6221, “National Instruments”, США) під керуванням програмного забезпечення “X-Screen”. Обробку результатів здійснювали програмним пакетом ORIGIN 7.5 (“Origin-Labs”, США). Значення потенціалів наведені з урахуванням компенсації потенціалу, що виникає через різницю іонного складу зовнішньо- та внутрішньоклітинного розчинів. Провідність для Na⁺ розраховували за формулою: $G = I / (E - E_{Na})$, де I – значення струму при потенціалі E , а E_{Na} – потенціал Нернста, що дорівнював +82 мВ. В експериментах використовували речовини виробництва фірми “Sigma-Aldrich” (США). Всі значення відображені у вигляді середнього значення ± стандартна похибка середнього значення. Достовірність між групових відмінностей встановлювали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (one-way ANOVA) та нелінійного регресійного аналізу, а відмінності вважали достовірними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для реєстрації I_{NaP} ми використовували гапр-протокол, зображений на рис. 1,а. У відповідь на прикладання пилкоподібної напруги (див. рис. 1,а) до досліджуваного нейрону виникав макроскопічний дзвоноподібний струм, представлений на рис. 1,б, що опосередкований, як активацією I_{NaP} , так і неспецифічними

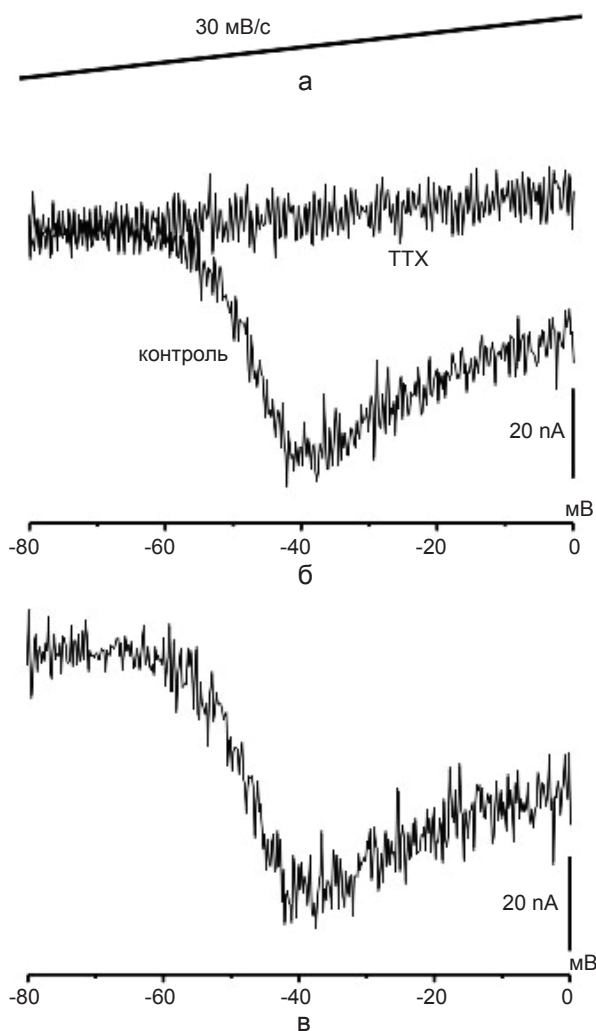


Рис. 1. Постійний натрієвий струм в ізольованих пірамідальних нейронах CA1 зони гіпокампа щура: а – гапр-протокол зміни потенціалу зі швидкістю 30 мВ/с; б – реєстрації струмів у контролі та під впливом тетродотоксину, зареєстровані від нейрону щура, що ізольований без використання ензимів. Криві отримані у результаті усереднення п'яти реєстрацій; в – постійний натрієвий струм, отриманий у результаті віднімання значень кривих, що наведені на рис. 1,б

провідностями. Додавання тетродотоксину у концентрації 1 мкмоль/л призводило до зміни форми струму внаслідок блокування потенціалчутливих натрієвих каналів, в результаті чого залишався лише неспецифічний компонент. Різниця цих струмів відображає натрієву провідність, зумовлену активацією I_{NaP} (див. рис. 1,в). Активація I_{NaP} починалася при значеннях підтримуваного потенціалу близько -70 мВ, сягаючи свого максимуму між -40 та -30 мВ.

На рис. 2,а показано порівняння провідності, отриманої за допомогою гапр-протоколу

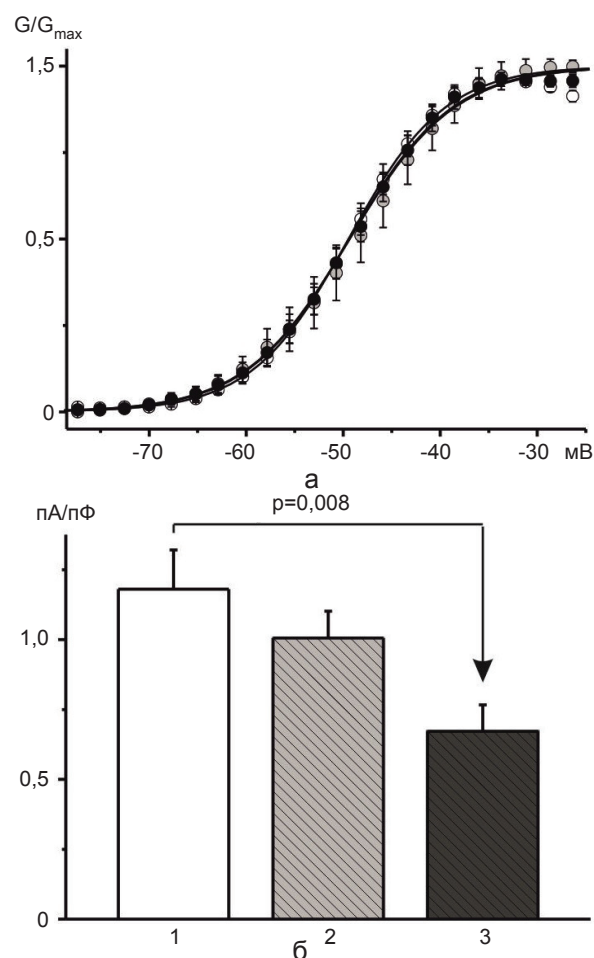


Рис. 2. Вплив ензиматичної обробки на властивості постійного натрієвого струму. Усереднені криві стаціонарної активації G/G_{max} (а) та густина (б) постійного натрієвого струму в нейронах, ізольованих без використання ензимів (1), з використанням пронази Е (2) або протеази типу XXIII (3)

за різних способів ензиматичної обробки. Потенціал напівмаксимальної амплітуди I_{NaP} ($V_{1/2max}$) у нейронах, що ізольовані з використанням пронази E, становив $-49,3 \pm 0,2$ мВ ($n = 16$), протеази типу XXIII $-49,4 \pm 0,2$ мВ ($n = 13$), та без використання ензимів $-49,5 \pm 0,3$ мВ ($n = 25$), а параметр кривої k : $5,4 \pm 0,1$; $5,3 \pm 0,1$, та $5,0 \pm 0,1$ відповідно. Ємність мембрани нейронів сягала значень: $18,7 \pm 0,7$ пФ ($n = 10$), $19,2 \pm 1,1$ пФ ($n = 9$) та $28,0 \pm 1,4$ пФ ($n = 10$) відповідно. Густина I_{NaP} у реєстраціях від нейронів ізольованих без використання ферментів, при використанні пронази E або протеази типу XXIII становила $2,4 \pm 0,3$ пА/пФ ($n = 10$), $1,9 \pm 0,2$ пА/пФ ($n = 9$), та $1,3 \pm 0,2$ пА/пФ відповідно ($n = 10$, див. рис. 2,б). Критерій значущості (P) для густини струму при використанні протеази типу XXIII становить 0,008 у порівнянні з контрольною групою, тоді як при застосуванні пронази E значення густини струму статистично не відрізнялося від контролю ($P = 0,2$).

У попередніх дослідженнях нами було показано, що деякі протеази, до яких відносяться тромбін, можуть впливати на характеристики I_{NaP} через активацію відповідних рецепторів і внутрішньоклітинних молекулярних процесів, що активують протеїнкіназу C [7]. Також показано, що дія нейрамінідази, ферменту, що відщеплює сіалові кислоти на поверхні мембрани, призводить до зсуву активації натрієвих струмів у бік гіперполяризації [6]. Наші дослідження вказують на те, що ензиматична обробка нейронів протеазою типу XXIII або проназою E, які широко використовуються при дисоціації нейронів для подальших електрофізіологічних досліджень, не призводить до змін характеристик активації I_{NaP} . Це може свідчити про те, що такі типи протеаз не впливають на механізми, задіяні в регуляції кінетики активації I_{NaP} . Проте використання протеази типу XXIII для ензиматичної ізоляції нейронів призводило до зменшення густини I_{NaP} у порівнянні з контролем, тоді як у разі використання пронази E таких ефектів нами не зареєстровано.

Отже, наші дослідження вказують на те, що проназа E не впливає на характеристики I_{NaP} , таким чином, є найбільш релевантним ферментом для здійснення ферментативної обробки нейронів у дослідженнях I_{NaP} .

Методи ензиматичної обробки для отримання ізольованих нейронів широко використовуються в сучасній електрофізіології. Представлені в нашій роботі результати свідчать про важливість врахування того факту, що залежно від вибору методу виділення нейронів або зрізів нервової тканини результати досліджень можуть суттєво відрізнитися.

**А.А. Лунько, Д.С. Исаев, А.П. Максимюк,
О.А. Крышталь Е.В. Исаева**

ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСТОЯННОГО НАТРИЕВОГО ТОКА В ПИРАМИДАЛЬНЫХ НЕЙРОНАХ CA1 ЗОНЫ ГИППОКАМПА КРЫС ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИМИ ФЕРМЕНТАМИ

Известно, что постоянный натриевый ток (I_{NaP}), который играет важную роль в подпороговых колебаниях мембранного потенциала и поддержании периодической нервной активности в ответ на деполяризацию мембраны, является весьма чувствительным к воздействию некоторых протеаз. Целью данной работы было исследование влияния ферментов, которые чаще всего используются в различных методах выделения нейронов центральной нервной системы, на амплитудные и кинетические характеристики I_{NaP} . Измерение трансмембранных токов осуществляли с использованием метода patch-clamp в конфигурации “целая клетка” на пирамидальных нейронах CA1 зоны гиппокампа, изолированных без использования ферментов (контрольная группа), с использованием проназы E (*Streptomyces griseus*) или протеазы типа XXIII (*Aspergillus oryzae*). Показано, что использование проназы E и протеазы типа XXIII не приводит к изменению потенциала полумаксимальной амплитуды и константы наклона кривой стационарной активации относительно контрольной группы. Однако в случае использования протеазы плотность I_{NaP} была статистически меньше, чем при контрольных условиях или в случае использования проназы для выделения нейронов. Энзиматическая обработка нейронов может существенно влиять на результаты электрофизиологических исследований, что необходимо учитывать при выборе метода выделения нейронов. Также наши результаты свидетельствуют в пользу использования проназы E при энзиматической обработке нейронов для исследования I_{NaP} .
Ключевые слова: гиппокамп, постоянный натриевый ток, энзиматическая обработка, протеазы.

**O.O. Lunko, D.S. Isaev, O.P. Maximyuk,
O.A. Krishtal, E.V. Isaeva**

**THE EFFECT OF ENZYMATIC TREATMENT
USING PROTEASES ON PROPERTIES
OF PERSISTENT SODIUM CURRENT
IN CA1 PYRAMIDAL NEURONS OF RAT
HIPPOCAMPUS**

We investigated the effect of proteases, widely used for neuron isolation in electrophysiological studies, on the amplitude and kinetic characteristics of persistent sodium current (I_{NaP}) in hippocampal CA1 pyramidal neurons. Properties of I_{NaP} were studied on neurons isolated by mechanical treatment (control group) and by mechanical and enzymatic treatment using pronase E (from *Streptomyces griseus*) or protease type XXIII (from *Aspergillus oryzae*). We show that in neurons isolated with pronase E kinetic of activation and density of I_{NaP} was unaltered. Enzymatic treatment with protease type XXIII did not alter I_{NaP} activation but result in significant decrease in I_{NaP} density. Our data indicates that enzymatic treatment using pronase E for neuron isolation is preferable for investigation of I_{NaP} .

Key words: persistent sodium current, enzymatic treatment, protease, hippocampus.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

REFERENCES

1. Kaneda M, Nakamura H, Akaike N. Mechanical and enzymatic isolation of mammalian CNS neurons. *Neurosci*

Res. 1988 Apr;5(4):299–315.

2. Kay A R, Wong RK. Isolation of neurons suitable for patch-clamping from adult mammalian central nervous systems. *J Neurosci Methods.* 1986 May;16(3):227–38.
3. Armstrong CM, Bezanilla F, Rojas E. Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons perfused with pronase. *J Gen Physiol.* 1973 Oct;62(4):375–91.
4. Kleyman TR, Myerburg MM, Hughey RP. Regulation of ENaCs by proteases: An increasingly complex story. *Kidney Int.* 2006 Oct ;70(8):1391–2.
5. Oyama Y, Hori N, Allen CN, Carpenter DO. Influences of trypsin and collagenase on acetylcholine responses of physically isolated single neurons of *Aplysia californica*. *Cell Mol Neurobiol.* 1990 Jun;10(2):193–205.
6. Isaev D, Isaeva E, Shatskih T, Zhao Q, Smits NC, Shworak NW, et al. Role of extracellular sialic acid in regulation of neuronal and network excitability in the rat hippocampus. *J Neurosci.* 2007 Oct 24;27(43):11587–94.
7. Isaeva E, Hernan A, Isaev D, Holmes GL. Thrombin facilitates seizures through activation of persistent sodium current. *Ann Neurol.* 2012 Aug;72(2):192–8.
8. Lunko O, Isaev D, Maximyuk O, Ivanchick G, Sydorenko V, Krishtal O, Isaeva E. Persistent sodium current properties in hippocampal CA1 pyramidal neurons of young and adult rats. *Neurosci Lett.* 2014 Jan; 559:30-3.
9. Vorobjev VS. Vibrodissociation of sliced mammalian nervous tissue. *J Neurosci Methods.* 1991 Jul;38(2-3):145–50.
10. Isaev D, Ivanchick G, Khmyz V, Isaeva E, Savrasova A, Krishtal O, Holmes GL, Maximyuk O. Surface charge impact in low-magnesium model of seizure in rat hippocampus. *J Neurophysiol.* 2012 107(1):417-423.

*Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ
E-mail: lunko@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до
редакції 25.12.2013*