

# Современные тенденции в развитии метода локальной фиксации потенциала: новые возможности для нейрофармакологии и нейробиологии

А.Н. Шуваев, В.В. Салмин, Н.В. Кувачева, Е.А. Пожиленкова, А.Б. Салмина

Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого

*Метод локальной фиксации потенциала (МЛФП) – это золотой стандарт в исследовании процессов, проходящих на мембранах раздражимых клеток, как в физиологическом состоянии, так и при патологии. Однако получение такой уникальной информации связано с определенными трудностями. Этот метод очень трудоемок, требует высококвалифицированных специалистов и дорогостоящего оборудования, что значительно ограничивает его внедрение в широкую практику нейробиологической лаборатории. В статье рассматриваются основные достоинства и недостатки МЛФП, а также тенденции в усовершенствовании техники фиксации клеточной мембраны с помощью электродов и его вклад в развитие нейрофармакологии и нейробиологии.*

**Ключевые слова:** метод локальной фиксации потенциала, нейробиология, нейрофармакология.

## Введение

Метод локальной фиксации потенциала (МЛФП, patch clamp) – это вершина человеческого изобретательства в изучении так называемого «животного электричества». Исторический путь этот метод начал с описания электрических явлений в физиологии животных. В течение долгого времени ничего не было известно об ионных каналах, мембранном потенциале, и запись проводилась с помощью грубых проводящих макроэлектродов на ограниченном числе препаратов, наиболее известным из которых стал гигантский аксон кальмара [8, 15]. К. Коул на основе полученных данных с гигантского аксона кальмара сформулировал основные принципы метода фиксации потенциала, которые в последующем легли в основу многих современных электрофизиологических методик [16]. Однако для регистрации потенциалов с других возбудимых клеток требовались более тонкие электроды. Усовершенствование методов фиксации потенциала с помощью одного или двух тонких (2–5 мкм) стеклянных электродов заняло около 10 лет и блестяще показало себя в опытах на нейронах заднежаберных моллюсков [27]. В этих экспериментах кончик пипетки, содержащей хлор-серебряный электрод и раствор электролита, вводился непосредственно в клетку, а второй электрод размещался внеклеточно, в омывающей жидкости. Данная схема позволяла измерять разность потенциалов при фиксированном токе.

Э. Неер (Neher) и Б. Сакманн (Sakmann) превосходно использовали все достоинства микроэлектродов и фиксации потенциала. Кардинальное отличие их метода заключалось в использовании пипеток с относительно широким отверстием, которые не проникали внутрь клетки, а формиро-

вали с ее мембраной очень плотный (гигаомный) контакт. Данный участок мембраны называется *patch* – (от англ.; «заплата, фрагмент»), а слово *clamp* в названии метода можно интерпретировать как изоляцию (фиксацию) трансмембранного потенциала этого фрагмента или, в других конфигурациях метода, потенциала либо тока целой клетки [24]. Хотя МЛФП нужно рассматривать как усовершенствование разработок Кула, Ходжкина и Хаксли середины XX века, он позволяет регистрировать токи от единичного канала, что значительно расширяет возможности в изучении вовлечения каналов в фундаментальные процессы клетки. За это открытие Неер и Сакманн в 1991 г. получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине [28].

В знаменитой работе О. Хамилла и соавт. были показаны огромные возможности МЛФП, а также его основные конфигурации: «с прикрепленной клеткой», «целая клетка», «наружная сторона снаружи» и «внутренняя сторона снаружи» [14]. За два последних десятилетия были разработаны модификации некоторых конфигураций, такие как «фиксация потенциала с клеточным ядром» [30] и «перфорирование фиксированной мембраны» [23] (рис. 1).

Представлены все основные конфигурации МЛФП и способы их получения. Из конфигурации «с прикрепленной клеткой» получают все остальные конфигурации. При резком увеличении отрицательного давления в пипетке происходит разрыв располагающейся под ней мембраны и образуется конфигурация «целая клетка». При оттягивании кончика пипетки из этой конфигурации можно получить конфигурацию «наружная сторона снаружи», что достигается отрывом части мембраны и самопроизвольным смы-

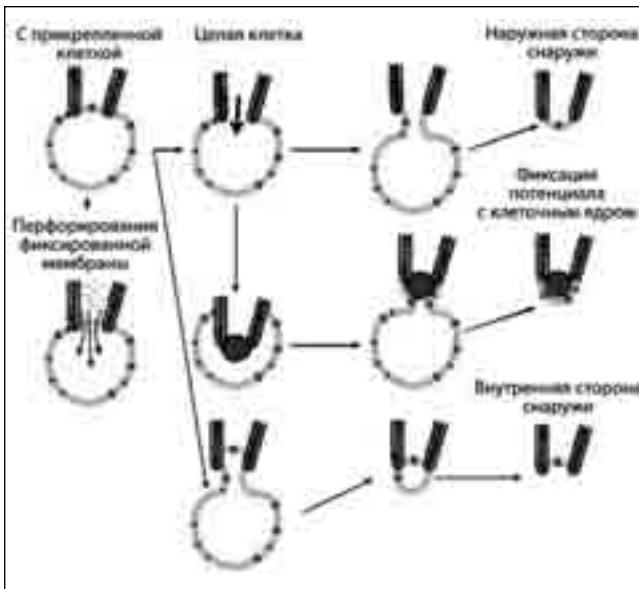


рис. 1: Конфигурации МЛФП.

канием ее концов. Из конфигурации «целая клетка» можно получить конфигурацию «фиксация потенциала с клеточным ядром» при вытягивании клеточного ядра из клетки пипеткой и обертывании вокруг него клеточной мембраны. Из конфигурации «с прикрепленной клеткой» можно получить также конфигурацию «внутренняя сторона снаружи» при простом оттягивании пипетки от клетки. При экспозиции воздухом образующаяся мембранная везикула разрывается, обнажая ее внутренний слой. Если добавить во внутриклеточный раствор пипетки такие перфорирующие мембрану вещества, как амфотерицин В, то из конфигурации «с прикрепленной клеткой» образуется конфигурация «перфорирования фиксированной мембраны».

### Принцип действия и преимущества МЛФП

Предметом электрофизиологических исследований является активность белков, обеспечивающих проводимость через биологические мембраны. К таким белкам относятся ионные каналы, рецепторы трансмиттеров и ионные насосы. Работа каналов, как потенциал-зависимых, так и лиганд-зависимых, отражается в виде изменения проводимости мембраны, что может быть измерено записью мембранных токов при постоянном потенциале мембраны или записи потенциалов при фиксированном токе. При «фиксации потенциала» ток прямо пропорционален исследуемой проводимости. Наиболее часто в экспериментах исследуются суммарные ионные токи при фиксированном потенциале мембраны целой клетки, т.е. в режиме «целая клетка». В режиме фиксации тока исследуется мембранный потенциал при помощи введения тока в клетку через записывающий электрод. Эта техника используется для изучения ответов клетки на вхождение в нее электрического тока. Уникальность режимов «наружная сторона снаружи» и «внутренняя сторона снаружи» заключается в том, что с их помощью можно напрямую измерять открытие, проницаемость, избирательность и потенциал-чувствительность единичных ионных каналов на молекулярном уровне. Все вышеуказанные возможности значительно расширяют область исследований в нейронауке. Именно поэтому МЛФП стал золотым стандартом в исследованиях клеточной электрофизиологии [7].

Неоценимый вклад МЛФП внес в развитие фармакологии, т.к. с помощью этого метода можно наблюдать эффект исследуемого вещества на живой клетке *ex vivo* в реальном времени. МЛФП позволяет изучать взаимодействие конкретного лекарственного вещества с определенным типом ионных каналов или рецепторов, а также исследовать изменение метаболизма клетки на такое воздействие. Так, с помощью МЛФП подбираются оптимальные дозы новых антиконвульсантов [29], исследуются вещества, подавляющие специфические рецепторы, ответственные за тригеминальную и другие типы боли [1]. В психофармакологии МЛФП широко используется для изучения агонистов опиоидных рецепторов, таких как DAMGO и др., влияющих на страх и его угнетение, беспокойство и пр. [3].

Широко известны работы по выделению и изучению влияния природных ядов на ионные каналы клеток животных. Так, было выявлено действие на P/Q-типы кальциевых каналов яда американских воронкообразных водяных пауков – ω-агатаксина [2], а также точно установлено место приложения (быстрые потенциал-зависимые натриевые каналы) яда спинороговых и иглобрюхих рыб – тетродотоксина (знаменитая рыба фугу) [17]. На сегодняшний день эти вещества широко применяются в экспериментальной нейробиологии для выделения и изучения новых ионных каналов.

В нейробиологии МЛФП широко используется для изучения патомеханизмов различных заболеваний, а также выявления потенциальных терапевтических целей. Неоценимый вклад МЛФП внес в изучение патогенетических механизмов цереброваскулярных заболеваний. С помощью МЛФП исследуются факторы повреждающего действия, такие как NOX [31], Tnf-α R1 [22] и др. Пристальное внимание уделяется роли синаптической пластичности нейронов и их регенеративной способности в первые часы инсульта в зоне пенумбры [12].

Кроме того, МЛФП идеально работает в сочетании с другими методами и позволяет исследовать такие сложные структуры, как нейроваскулярная единица. К примеру, в конфигурации «целая клетка» можно получить суммарные токи или паттерн импульсов от отдельного превазкулярного интернейрона, оценить его размер при исследовании емкости мембраны. Также содержимое этой клетки при заборе с помощью присасывающейся пипетки может быть исследовано с помощью ПЦР на интересные гены в пределах конкретного нейрона без контаминации генами окружающих структур. Более того, внутриклеточная окраска исследуемого интернейрона и использование маркеров к другим компонентам нейроваскулярной единицы позволяет четко визуализировать данные структуры [6].

МЛФП также можно использовать на живых срезах человеческого мозга, полученных при заборе биоптатов во время нейрохирургических операций. Такие эксперименты вносят неоценимый вклад в изучение формы, проводимости и возбудимости единичных клеток – нейронов и клеток глии, таких как астроциты, при опухолевых процессах головного мозга [4].

### Запись данных в режиме «целая клетка» *in vivo*

Вживление внутримозговых электродов у человека и животных используется достаточно давно. Здесь применяются специальные внутримозговые макроэлектроды, кото-

рые могут регистрировать потенциалы определенных зон мозга, а также производить сложную стимуляцию этих зон.

Однако научным интересом нейробиологов уже давно являются не зоны головного мозга, а группы и единичные нейроны. Именно МЛФП позволяет записывать информацию непосредственно с единичной клетки. Поэтому реалии современной нейробиологии вынуждают исследователей применять МЛФП, несмотря на все сложности работы с материалом *in vivo*. Более того, запись в режиме «целая клетка» позволяет очень точно описать морфофизиологические свойства отдельных нейронов, а также динамику постсинаптических сигналов [32] и различные виды синаптической пластичности [18]. Данные процессы регистрируются только в режиме «целая клетка» в препаратах с сохраненной сложной структурой нейронных цепей. Долгое время запись таких данных с помощью МЛФП была возможна лишь с культур клеток *in vitro* или срезов *ex vivo*, т.к. это требовало высокого уровня механической стабильности для обеспечения физического контакта между стеклом записывающего электрода и мембраной нейрона. Для преодоления этих ограничений исследования в конфигурации «целая клетка» *in vivo* стали проводиться на анестезированных [5] или бодрствующих животных, которые обездвиживались или у которых фиксировалась голова [13]. В последнее время появились техники, позволяющие проводить исследования в режиме «целая клетка» на бодрствующих животных с нефиксированной головой и свободой их передвижения [20]. Ключевым техническим принципом здесь является жесткая фиксация пипетки к черепу с внутренней стороны, что позволяет животному свободно передвигаться без потери контакта пипетки с исследуемой клеткой мозга. С помощью этой методики производят пространственный анализ внутриклеточных событий малой амплитуды, которые невозможно определить с помощью внеклеточной записи или срезах мозга [9], а также выявляют различия между работающими и молчащими клетками [10].

### Основные направления в усовершенствовании МЛФП

Несмотря на все описанные преимущества, существуют недостатки и внутренние ограничения МЛФП. Это в первую очередь низкая производительность, сложность в исполнении и сверхчувствительность к изменению условий эксперимента. Данные недостатки мешают широкому введению его в перечень рутинных исследований клеточной физиологии и фармакологии. Поэтому ведется непрерывная работа по усовершенствованию методики. Немаловажная роль уделяется автоматизации и усовершенствованию основных электрофизиологических приборов — усилителей, цифровых преобразователей и т.д. Так, современные усилители совмещают свои непосредственные функции с функциями цифрового преобразователя и осциллоскопа,

что значительно упрощает эксплуатацию данного прибора и снижает уровень шума из-за уменьшения количества соединений и проводов [25].

Перспективным направлением в усовершенствовании МЛФП являются также компьютерная визуализация и автоматизация наложения электрода на исследуемую клетку. Один из таких автоматизированных методов называется «Flip-Tip» и значительно облегчает образование гигаомного контакта [21]. Настоящим прорывом в производительности метода можно считать появление прибора на основе технологии «Flip-Tip» с одновременной фиксацией нескольких клеток. В этом приборе используется отрицательное давление или статическое электричество, которые помогают каждой клетке занять отдельную лунку в горизонтально расположенном планшете. Далее отрицательное давление помогает образовать гигаомный контакт между клеткой и кончиком пипетки [11]. Данный прибор имеет множество фиксирующих электродов и может записывать информацию сразу с нескольких клеток. На сегодняшний день существуют приборы для автоматизированной записи данных одновременно с нескольких тысяч разобренных клеток [26].

На принципиально новый уровень исполнения МЛФП может быть выведен уже в ближайшие годы. Так, в 2012 г. был разработан робот, который автоматически производит локальную фиксацию потенциала в режиме «целая клетка» *in vivo*, алгоритмически определяя клетки по временной последовательности изменения импеданса электрода [19].

### Заключение

МЛФП радикально изменил современную нейронауку. Он быстро стал методом выбора не только для изучения единичных каналов, но и для мониторинга электрической активности любых типов возбудимых клеток, как изолированных, так и в составе сложной структуры (срезы и мозг *in vivo*). МЛФП заслуженно является золотым стандартом в исследовании процессов, проходящих на мембранах раздражимых клеток, как в физиологическом состоянии, так и при патологии. Однако низкая производительность и сложность исполнения не позволяют широко применять этот метод для рутинных нейробиологических и фармакологических исследований. В связи с этим усовершенствование МЛФП происходит непрерывно. Наиболее важными направлениями являются компьютеризация с автоматизацией техники выполнения, миниатюризация приборов и повышение производительности метода.

**Благодарность.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 14-25-00054). Авторы благодарят профессора Х. Хираи (Университет Гунма, Япония) за методическую помощь.

## Список литературы

1. *Abd-Elseyed A.A., Ikeda R., Jia Z., et al.* KCNQ channels in nociceptive cold-sensing trigeminal ganglion neurons as therapeutic targets for treating orofacial cold hyperalgesia. *Mol. Pain.* 2015; 11: 45.
2. *Adams M.E.* Agatoxins: ion channel specific toxins from the american funnel web spider, *Agelenopsis aperta*. *Toxicon.* 2004; 43: 509–525.
3. *Blaesse P., Goedecke L., Bazzelot M., et al.*  $\mu$ -Opioid Receptor-Mediated Inhibition of Intercalated Neurons and Effect on Synaptic Transmission to the Central Amygdala. *J. Neurosci.* 2015; 35: 7317–7325.
4. *Bordey A., Sontheimer H.* Electrophysiological properties of human astrocytic tumor cells In situ: enigma of spiking glial cells. *J. Neurophysiol.* 1998; 79: 2782–2793.
5. *Bruno R.M., Sakmann B.* Cortex is driven by weak but synchronously active thalamocortical synapses. *Science.* 2006; 312: 1622–1627.
6. *Cauli B., Tong X.K., Rancillac A. et al.* Cortical GABA Interneurons in Neurovascular Coupling: Relays for Subcortical Vasoactive Pathways. *J. Neurosci.* 2004; 24: 8940–8949.
7. *Chen P., Zhang W., Zhou J. et al.* Development of planar patch clamp technology and its application in the analysis of cellular electrophysiology. *Progress in Natural Science.* 2009; 19: 153–160.
8. *Cole K.S.* Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane. *Arch. Sci. Physiol.* 1949; 3: 253–258.
9. *Epsztein J., Brecht M., Lee A.K.* Intracellular determinants of hippocampal CA1 place and silent cell activity in a novel environment. *Neuron.* 2011; 70: 109–120.
10. *Epsztein J., Lee A.K., Brecht M.* Impact of spikelets on hippocampal CA1 pyramidal cell activity during spatial exploration. *Science.* 2010; 327: 474–477.
11. *Fertig N., Blick R.H., Behrends J.C.* Whole cell patch clamp recording performed on a planar glass chip. *J. Biophys.* 2002; 82: 3056–3062.
12. *Greifzu F., Pielecka-Fortuna J., Kalogeraki E., et al.* Environmental enrichment extends ocular dominance plasticity into adulthood and protects from stroke-induced impairments of plasticity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2014; 111: 1150–1155
13. *Haider B., Häusser M., Carandini M.* Inhibition dominates sensory responses in the awake cortex. *Nature.* 2013; 493: 97–100.
14. *Hamill O.P., Marty A., Neher E., et al.* Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 1981; 391: 85–100.
15. *Hodgkin A.L. and Huxley A.F.* Currents carried by sodium and potassium through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* 1952; 116: 449–472.
16. *Huxley A.* Kenneth Sterward Cole 1900 – 1984. A biographical Memoir. Washington D.C. National Academies Press. 1996; 23-45.
17. *Kaneko Y., Matsumoto G., Hanyu Y.* TTX resistivity of Na<sup>+</sup> channel in newt retinal neuron. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 240: 651–656.
18. *Klausberger T., Somogyi P.* Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science.* 2008; 321: 53–57.
19. *Kodandaramaiah S.B., Franzesi G.T., Chow B.Y. et al.* Automated whole-cell patch-clamp electrophysiology of neurons in vivo. *Nature Methods.* 2012; 9: 585–587.
20. *Lee A.K., Manns I.D., Sakmann B., Brecht M.* Whole-cell recordings in freely moving rats. *Neuron.* 2006; 51: 399–407.
21. *Lepple-Wienhues A., Ferlinz K., Seeger A., Schäfer A.* Flip the tip: an automated, high quality, cost-effective patch clamp screen. *Recept. Chan.* 2003; 9: 13–17.
22. *Liguz-Leczna M., Zakrzewska R., Kossut M.* Inhibition of Tnf- $\alpha$  R1 signaling can rescue functional cortical plasticity impaired in early post-stroke period. *Neurobiol. Aging.* 2015; pii: S0197-4580(15)00326-7. [Epub ahead of print]
23. *Molleman A.* Patch-clamping: an introductory guide to Patch-Clamp electrophysiology. 1<sup>st</sup> ed. John Wiley and Sons. 2003; 186.
24. *Sakmann B., Neher E.* Single-channel recording. 2<sup>nd</sup> ed. Springer. 1995; 700.
25. *Sigworth F.J., Affolter H., Neher E.* Design of the EPC-9, a computer-controlled patch-clamp amplifier. 2. Software. *J. Neurosci Methods.* 1995; 56: 203–215.
26. *Tao H., Santa A.D., Guia A., et al.* Automated tight seal electrophysiology for assessing the potential hERG liability of pharmaceutical compounds. *Assay Drug Dev. Tech.* 2004; 2: 497–506.
27. *Tauc L., Frank K.* The central neuron of Mollusca studied with the “voltage clamp” method. *J. Physiol.* 1962; 54: 415–416.
28. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1991. nobelprize.org. Nobel Media AB. Retrieved November 8, 2014.
29. *Torregrosa R., Yang X.F., Dustrude E.T., et al.* Chimeric derivatives of functionalized amino acids and  $\alpha$ -aminoamides: Compounds with anticonvulsant activity in seizure models and inhibitory actions on central, peripheral, and cardiac isoforms of voltage-gated sodium channels. *Bioorg. Med. Chem.* 2015; 23: 3655–3666.
30. *Windhorst U., Johansson H.* Modern techniques in neuroscience research. 1st ed. Springer. 1999; 1328.
31. *Wu L.J., Wu G., Akhavan Sharif M.R., et al.* The voltage-gated proton channel H<sub>v</sub>1 enhances brain damage from ischemic stroke. *Nat. Neurosci.* 2012; 15: 565–573.
32. *Zemanovics R., Kali S., Paulsen O. et al.* Differences in subthreshold resonance of hippocampal pyramidal cells and interneurons: the role of h-current ana passive membrane characteristics. *J. Physiol.* 2010; 588: 2109–2132.

## Modern tendencies in the development of the patch-clamp technique: new opportunities for neuropharmacology and neurobiology

A.N. Shuvaev, V.V. Salmin, N.V. Kuvacheva, E.A. Pozhilenkova, A.B. Salmina

*V.F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia*

**Keywords:** patch-clamp, neurobiology, neuropharmacology.

The patch-clamp (PC) technique is the gold standard in studying processes that occur on the membranes of excitable cells, both in the physiological condition and in pathology. However, gaining this unique information is associated with certain difficulties. The technique is very labor intensive and requires highly qualified specialists and expensive equipment, which greatly

limits its introduction into routine practice of a neurobiological laboratory. This article discusses the main advantages and disadvantages of PC as well as tendencies in improvement of the technique and its contribution to the development of neuropharmacology and neurobiology.

**Контактный адрес:** Шuvaев Антон Николаевич – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. НИИ молекулярной медицины и патобиохимии Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого. 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка 1. Тел.: +7-391-220-1395, факс: +7-391-228-08-60. E-mail: shuvaevanton@hotmail.com;

Салмин В.В. – зав. каф. мед. и биол. физики;

Кувачева Н.В. – доц. каф. биол. химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии; науч. сотр. НИИ молекулярной медицины и патобиохимии;

Пожиленкова Е.А. – доц. каф. биол. химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии; исполнит. директор НИИ молекулярной медицины и патобиохимии;

Салмина А.Б. – зав. каф. биол. химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии; руководитель НИИ молекулярной медицины и патобиохимии.