

К 40-летию Института физиологически активных веществ РАН**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ****СВОЙСТВА КАЛЬЦИЙ-АКТИВИРУЕМЫХ ХЛОРНЫХ ТОКОВ
В НЕЙРОНАХ ПУРКИНЬЕ МОЗЖЕЧКА КРЫС***В.Л. Замойский*, Е.В. Бовина, В.В. Григорьев*Институт физиологически активных веществ Российской академии наук,
142432, Черноголовка Московской обл., Северный проезд, 1; *эл. почта: v zam@yandex.ru

Методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в конфигурации на целой клетке (whole cell) показано наличие выходящего Ca^{2+} -активируемого хлорного тока в мембране свежеизолированных клеток Пуркинье мозжечка крыс. Хлорные токи появлялись в безнатриевом наружном растворе и обратимо исчезали в отсутствие снаружи ионов Cl^- или ионов кальция. При замене ионов K^+ в микропипетке на ионы Cs^+ (120 мМ) этот ток появлялся при концентрации ионов натрия (140 мМ) снаружи от мембраны. Ток на 80–100% блокировала 25–100 мкМ нифлуминовая кислота. Блокаторы калиевых каналов тетраэтиламмоний (ТЕА) и 4-аминопиридин (4-АП) также блокировали кальций-активируемые хлорные токи. Значение IC_{50} для ТЭА составило 130 мкМ и 110 мкМ для 4-АП. Действие ТЭА было обратимо. 4-АП в концентрации 100 мкМ и выше действовал необратимо, блокируя выходящие калиевые токи и выходящий хлорный ток.

Ключевые слова: метод patch-clamp; клетки Пуркинье мозжечка; кальций-активируемый хлорный ток; тетраэтиламмоний; 4-аминопиридин; нифлуминовая кислота

DOI: 10.18097/BMCRM00034**ВВЕДЕНИЕ**

Кальций-активируемые хлорные токи являются хорошо исследованным объектом в различных органах и тканях млекопитающих: эпителиальных и секреторных клетках, клетках гладкой мускулатуры, в частности гладкой мускулатуры кровеносных сосудов, интерстициальных клетках Кахала и др. [1]. Однако в центральных нейронах млекопитающих они обнаружены сравнительно недавно, и их исследованию посвящены немногочисленные работы. В то же время их роль в регуляции синаптической передачи между центральными нейронами, особенно в гиппокампе, вероятно, весьма значительна, и они могут модулировать когнитивные процессы [2]. Однако применяемые до сих пор методические приемы для их исследования позволяли регистрировать хлорные токи только очень маленькой амплитуды и длительности, что существенно затрудняло проведение их фармакологического изучения.

Целью данной работы была разработка методов, способных обеспечить полноценное фармакологическое исследование кальций-зависимых хлорных токов в нейронах ЦНС млекопитающих, а также изучение их свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ*Электрофизиология*

Исследования осуществляли электрофизиологическим методом на свежевыведенных нейронах Пуркинье из мозжечка самцов крыс линии Вистар 12–15 дневного возраста (30 животных). Выделение единичных нейронов проводили ферментно-механическим способом [3]. Трансмембранные токи отдельных нервных клеток регистрировали методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp)

в конфигурации на целой клетке (whole-cell) с помощью прибора ЕРС-9 (“НЕКА”, Германия) [4]. Данные обрабатывали при помощи программы Pulsfit (“НЕКА”). Деполяризующие ступени длительностью 10 мс подавали от холдингового потенциала -70 мВ с шагом +10 мВ. После прорыва мембраны клетки и стабилизации ответов клетки (2–3 мин) снимали два контрольных ответа, после чего добавляли раствор, содержащий блокатор. При исследовании действия ТЭА и 4-АР начинали работу с каждой клеткой с самой низкой концентрации.

Приготовление растворов

Для проведения экспериментов использовались внешние и внутривиточные растворы с ионным составом, указанным в таблице 1. Для растворов Н1, Н2, Н3, Н4, Н5 (рН=7.36) осмолярность составляла 310–320 мОсм. Для растворов В1, В2 (рН=7.2) осмолярность составляла 280–290 мОсм. В растворы Н1, Н2, Н3, Н4 перед экспериментом добавляли 15 мМ глюкозы.

Растворы с ТЭА и 4-АР готовили непосредственно перед экспериментом из маточных растворов (100 мМ) разведением в растворе Н2. Все реактивы приобретены у компании “Sigma-Aldrich” (США).

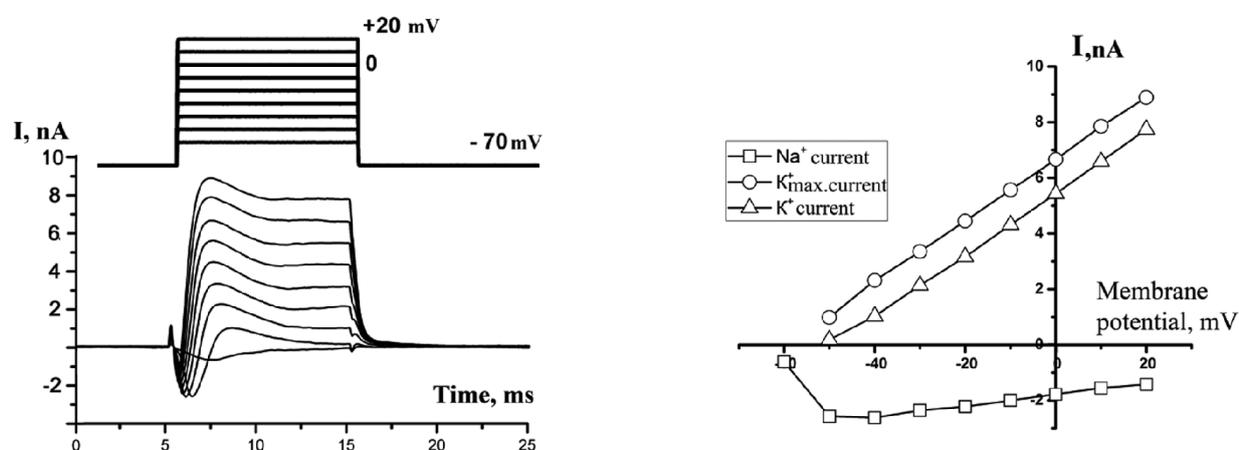
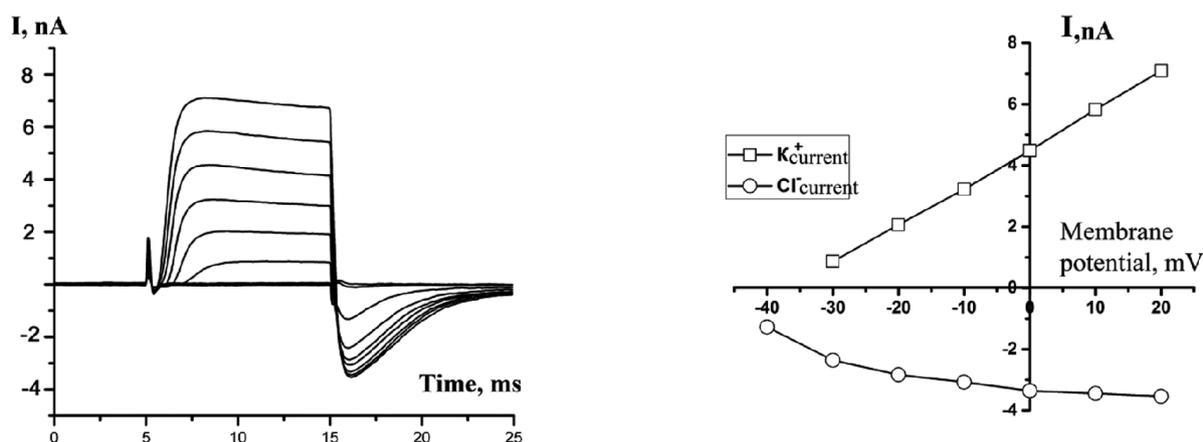
РЕЗУЛЬТАТЫ

В “квазифизиологических” условиях (снаружи физиологический раствор Н1, в микропипетке-электроре – раствор В1) регистрировали ионные токи от целой клетки (рис. 1), состоящие из токов положительной и отрицательной полярности. Такие ответы соответствуют классическим исследованиям и составляют основу потенциала действия – быстрый, входящий в клетку ток ионов натрия, вызывающий деполяризацию мембраны, и выходящие токи,



Таблица 1. Ионный состав растворов

Раствор	NaCl, мМ	ТрисCl, мМ	KCl, мМ	CsCl, мМ	MgSO ₄ , мМ	CaCl ₂ , мМ	Na ₂ ATP, мМ	K ₂ ATP, мМ	HEPES, мМ	ЭГТА, мМ	NMDGNO ₃ , мМ
Н1. Стандартный, внешний	140		5		2	2			10		
Н2. Без натрия, внешний		140	5		2	2			10		
В1. Калиевый, внутренний			120		1	1		5	10	11	
В2. Цезиевый, внутренний				120	1	1	5		10	11	
Н3. Без натрия и кальция, внешний		140	5		2				10	1.1	
Н4. Без натрия и хлора					2	2			10		150
Н5. 50% Cl ⁻ , внешний		70	5		2	2			10		70

**Рисунок 1.** Токи, регистрируемые в нейронах Пуркинью в ответ на серии деполяризующих импульсов по 10 мВ (слева), и графики вольт-амперных характеристик зарегистрированных токов (справа). Состав раствора в микропипетке - раствор В1 (см. таблицу 1), снаружи раствор Н1.**Рисунок 2.** Токи, регистрируемые в нейронах Пуркинью в ответ на серии деполяризующих импульсов по 10 мВ (слева), и графики вольт-амперных характеристик зарегистрированных токов (справа). Состав раствора в микропипетке - раствор В1 (см. таблицу 1), снаружи раствор, не содержащий ионов Na⁺ (раствор Н2).

переносимые ионами калия, компенсирующими деполяризацию на мембране. Однако этот ответ существенным образом менялся при замене в наружном растворе ионов Na⁺ на эквивалентное количество ионов ТРИС⁺ (рис. 2). Входящий натриевый ток исчезал, выходящий калиевый ток сохранялся примерно

с той же амплитудой, а по окончании деполяризующего импульса появлялся “хвостовой” ток со сравнительно быстрой инактивацией. При мембранном потенциале +20 мВ величина τ_{50} составляла 4.61 мс (SD=2.6 мс; n=28). Потенциал активации “хвостового” тока составлял -57.1 ± 9.5 мВ (n=31).

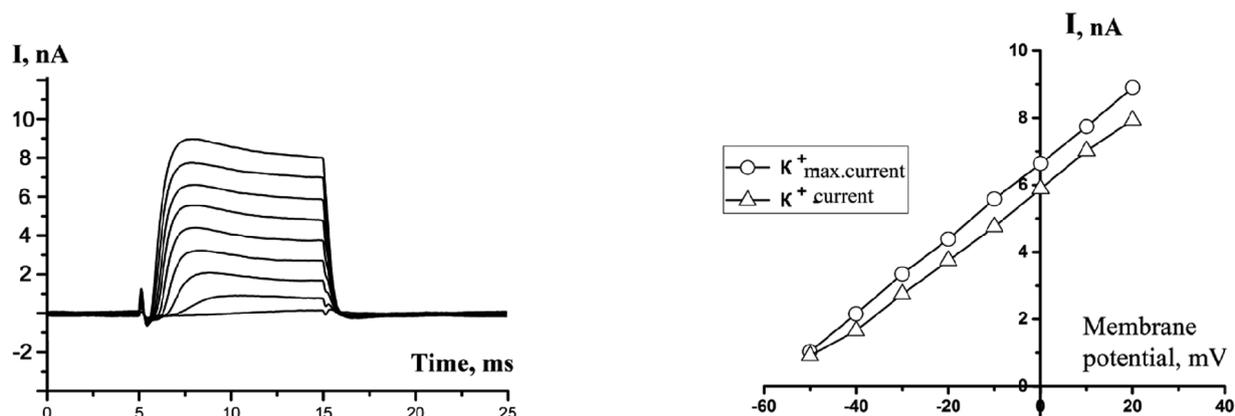


Рисунок 3. Токи, регистрируемые в нейронах Пуркинье в ответ на серии деполаризующих импульсов по 10 мВ (слева), и графики вольт-амперных характеристик зарегистрированных токов (справа). Состав раствора в микропипетке - раствор В1 (см. таблицу 1), снаружи раствор, не содержащий ионов Na^+ и Cl^- (раствор Н4).

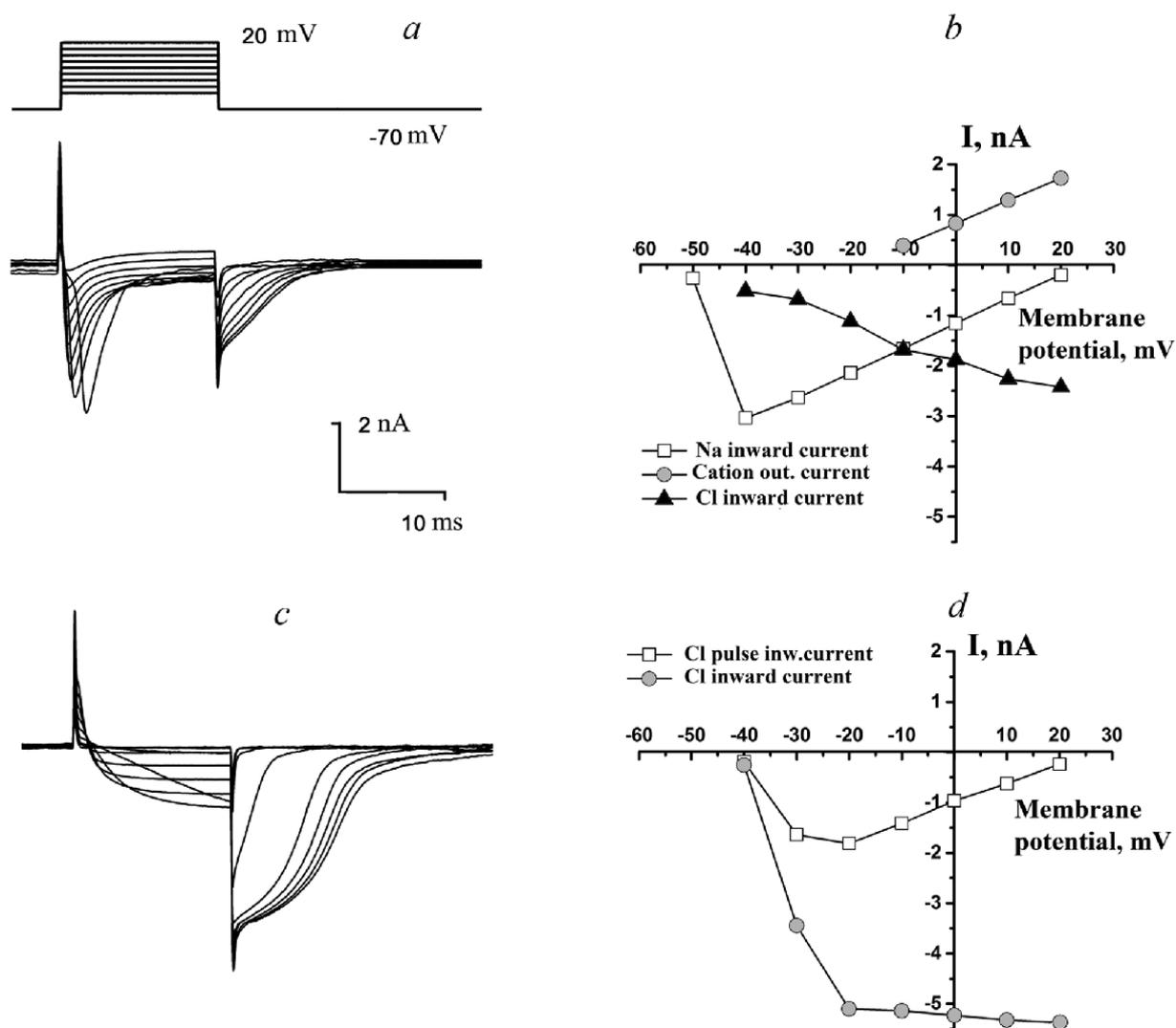


Рисунок 4. Интегральные токи нейрона Пуркинье и их вольт-амперные характеристики при использовании микроэлектродов с раствором В2 (цезий). **a** - Интегральные токи в ответ на серию деполаризующих импульсов от -60 до 20 мВ на мембране клетки с раствором Н1 (натрий) снаружи мембраны. **b** - Вольт-амперные характеристики токов, показанных на рисунке 2а. По оси абсцисс - потенциал на мембране клетки; по оси ординат - регистрируемый ионный ток, нА. **c** - Интегральные токи в ответ на серию деполаризующих импульсов от -60 до 20 мВ в растворе Н2 (без натрия). **d** - Вольт-амперные характеристики токов, показанных на рисунке 2с. По оси абсцисс - потенциал на мембране клетки; по оси ординат - регистрируемый ионный ток, нА.

Для того чтобы определить, какой ион является носителем заряда “хвостового” тока, использовали различные внешние растворы (Н4, Н5). Состав растворов приведён в таблице 1. При подаче наружного раствора, не содержащего ионов натрия и хлора (раствор Н4, таблица 1), токи входящего направления исчезали полностью (рис. 3). При подаче раствора Н5 амплитуда этого тока уменьшалась, что указывает на участие ионов хлора в переносе заряда этим током и, следовательно, ток идет в выходящем направлении (из клетки во внешнюю среду).

Во второй серии экспериментов использовали в пипетке раствор В2, содержащий 120 мМ ионов Cs^+ вместо ионов K^+ . В таких условиях “хвостовой” ток появлялся даже при высокой (140 мМ) концентрации ионов Na^+ с наружной стороны мембраны клетки (рис. 4а,с). При замене стандартного раствора (раствор Н1) на раствор, не содержащий ионов Na^+ (раствор Н2), происходило существенное увеличение амплитуды “хвостового” тока и его τ_{50} (рис. 4б,д). Потенциал активации “хвостового” тока составил -65 ± 9 мВ ($n=12$). Для этого тока при потенциале на мембране $+20$ мВ величина τ_{50} составила 5.46 ± 2.41 мс ($n=19$). На рисунке 4б видно, что при действии деполяризующих импульсов также активируется ток (“внутриимпульсный”). Активация тока начиналась при -50 мВ на мембране и до -40 мВ ток имел ту же амплитуду, что и послеимпульсный “хвостовой” ток. Однако начиная со значения $+30$ мВ на этот “внутриимпульсный” ток накладывается активация входящего катионного тока, придавая его вольтамперной характеристике колоколообразную форму (см. рис. 4д).

При замене наружного раствора Н1 на безнатриевый раствор Н2 (в пипетке раствор В2) ответ клетки на ступенчатую деполяризацию существенно менялся. Исчезал входящий натриевый ток. “Внутриимпульсный” ток увеличивался по амплитуде, однако начиная с -30 мВ его амплитуда, как и в варианте с наружным раствором Н1, содержащим натрий, уменьшалась. Выходящий ток, переносимый ионами цезия, проходил, по-видимому, через низкоселективные калиевые каналы и/или через катионные каналы и маскировал “внутриимпульсный” ток. “Хвостовой” ток в этих условиях значительно увеличивался по амплитуде – на 27–290% с $\Delta I_{\text{сред.}} = 87\%$ ($n=11$). На 5 клетках наблюдалось уменьшение амплитуды на 11–63% с $\Delta I_{\text{сред.}} = -34\%$. При этом на всех клетках кинетика инактивации тока замедлялась: $\tau_{50} = 15.51 \pm 13.13$ мс ($n=16$) при 20 мВ на мембране. Потенциал активации “хвостового” тока в этих условиях составил -57 ± 8 мВ ($n=16$). Аппликация раствора Н2, содержащего нифлуминовую кислоту в концентрациях 25 мкМ ($n=3$) и 100 мкМ ($n=5$), приводила соответственно к ~80% и 100%-ной блокаде как деполяризующих токов во время импульса, так и “хвостовых” токов, по окончании каждой деполяризующей ступени (рис. 5).

При подаче наружного раствора Н3, в котором отсутствовали свободные ионы Ca^{2+} (в присутствии 1.1 мМ EGTA), “хвостовой” ток исчезал почти полностью. В модели, предложенной авторами

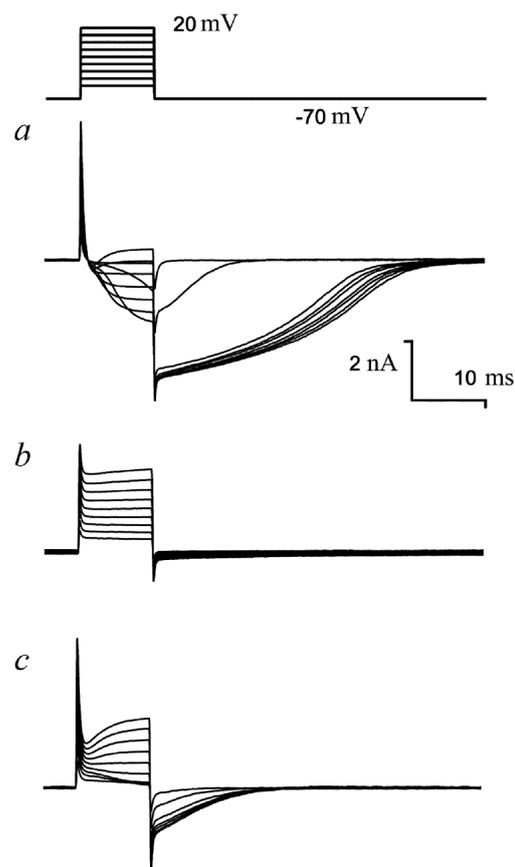


Рисунок 5. Действие нифлуминовой кислоты на хлорный ток в нейроне Пуркинье. Вверху показан протокол подачи прямоугольных деполяризующих импульсов на клетку с шагом в 10 мВ от холдингового потенциала -70 мВ. **а** - Ионные токи клетки в ответ на серию импульсов. Наружу раствор Н2 (без натрия), в пипетке раствор В2 (цезий). **б** - Ионные токи клетки при добавлении в наружный раствор Н2 100 мкМ нифлуминовой кислоты. **с** - Отмывка действия нифлуминовой кислоты на ионные токи клетки раствором Н2 в течение 5 мин.

работы [5], кальций-чувствительные рецепторы хлорных каналов расположены в мембране рядом с кальциевыми каналами, активируясь при входе в клетку ионов кальция с наружной стороны мембраны. С учётом данной модели описываемый хлорный ток является кальций-активируемым (далее в тексте сокращённо СаСС).

Для выделения СаСС без наложения на них ответов калиевых токов были применены известные блокаторы калиевых каналов – тетраэтиламмоний (ТЭА) и 4-аминопиридин (4-АП). В ходе исследований оказалось, что оба вещества блокируют не только выходящие калиевые токи, но и исследуемые выходящие СаСС (рис. 6).

Эффект блокирующего действия ТЭА на СаСС и выходящий калиевый ток имел дозо-зависимый характер (рис. 6а), и “быстро отмывался” на 80–100% для всего диапазона исследованных концентраций (от 50 мкМ до 10 мМ) ($n=16$). Начиная с концентрации 100 мкМ блокирующее действие 4-АП на СаСС и выходящие калиевые токи уже было практически необратимым (рис. 6б): выходящие

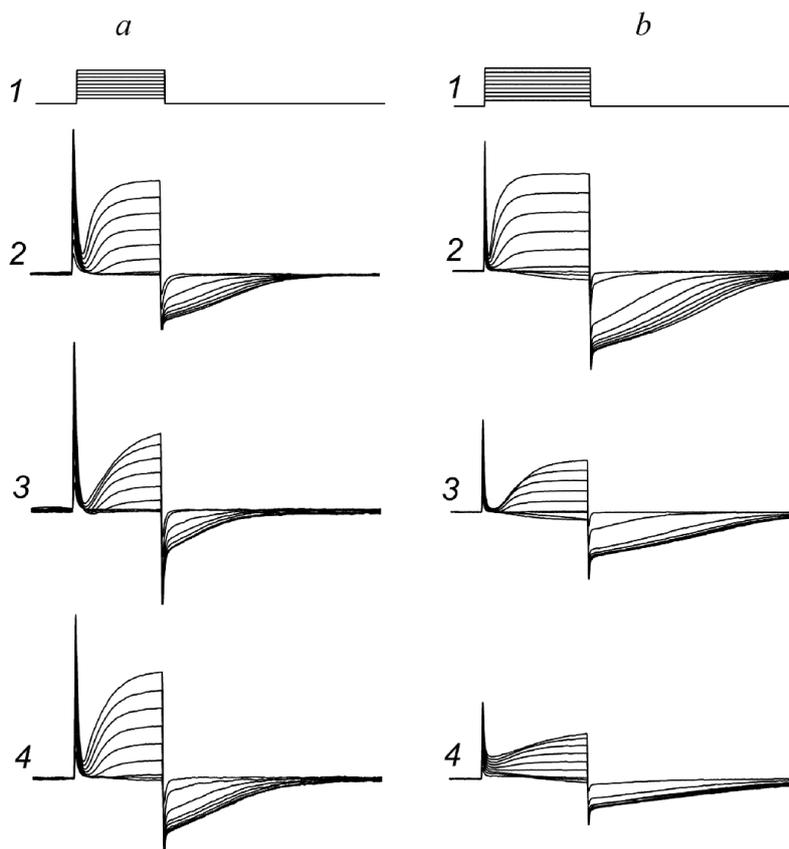


Рисунок 6. Действие тетраэтиламмония (ТЭА) и 4-аминопиридина (4-АП) на хлорный ток. **а** - Ответы клетки на серию прямоугольных импульсов с шагом 10 мВ от -70 до +20 мВ на мембране (трек 1). В пипетке раствор В1; снаружи раствор Н2 (безнатриевый). В контроле (трек 2) в ответ на деполяризацию мембраны видны нарастающие выходящие токи. При сбросе импульса и возвращении потенциала на мембране к -70 мВ видна активация выходящего кальций-зависимого хлорного тока. При действии 1 мМ ТЭА (трек 3), видна блокада выходящих токов и хлорного тока при потенциале +20 мВ на мембране на 17% и 20% соответственно. Действие ТЭА было обратимо: трек 4 - ответы клетки после отмывки. **б** - В тех же условиях, описанных выше (см. рис. 4а), на другой клетке (трек 2 - контроль) исследовалось действие 100 мкМ 4-АП (трек 3). Блокада выходящих токов и хлорного тока на 47% и 44% при потенциале +20 мВ на мембране соответственно. Эффект действия 4-АП был практически необратим (трек 4 - отмывка).

калиевые токи и входящие хлорные токи не восстанавливались при отмывке ($n=11$). Значение IC_{50} для действия ТЭА на CaCC составило 130 мкМ ($n=16$), для 4-АП – 110 мкМ ($n=6$).

Поскольку нифлуминовая кислота, ТЭА и 4-АП в одинаковой степени блокировали “внутриимпульсные” и “хвостовые” токи, можно предположить, что в обоих случаях мы имеем дело с CaCC. Просто в первом случае их активацию вызывает нарастающая деполяризация при подаче очередного импульса, а во втором – сброс потенциала на мембране с текущего уровня деполяризации до уровня потенциала холдинга (-70 мВ).

Таким образом, в представленной работе убедительно доказано наличие кальций-активируемого хлорного тока в нейронах Пуркинне.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведённые исследования впервые показали, что амплитуда и кинетика исследованных кальций-активируемых хлорных токов существенно зависит от наличия во внешнем растворе ионов натрия.

Удаление ионов натрия приводит к существенному увеличению амплитуды этих токов, а также увеличивает время нахождения их в открытом состоянии. Амплитуда и кинетика CaCC зависят от того, какой ион преобладает с внутренней стороны мембраны (калий или цезий). Все это указывает на то, что в регуляции работы кальций-активируемых хлорных каналов возможную роль играют $Na^+K^+Cl^-$ белки-переносчики, которые, как известно, участвуют не только в регуляции клеточного объема и прямом транспорте ионов через мембрану [6], но и в секреции калия и регуляции внутриклеточной концентрации ионов Cl^- в нейронах [7]. Можно предположить, что как и в случае нейронов гиппокампа [8], этот ток может играть значительную роль в регуляции возбудимости и передачи синаптического сигнала в нейронах Пуркинне.

Полученные результаты показали, что применение описанных выше методических приемов (безнатриевый внешний раствор, цезиевый внутрипипеточный раствор) делает CaCC удобным объектом для исследования фармакологического воздействия на них.

В представленной работе показано, что известные блокаторы калиевых каналов ТЭА и 4-АП способны эффективно блокировать CaCC с наружной стороны мембраны в нейронах Пуркинье. Блокирующий эффект для ТЭА с внутренней стороны мембраны ранее показали Sanchez и Blatz [9] на нейронах коры крыс. Принимая во внимание, что этот тип токов присутствует в клетках многих тканей организма, включая нейроны ЦНС и мышечные клетки, установленный факт блокады ТЭА и 4-АП кальций-зависимых хлорных токов должен учитываться при дальнейших исследованиях. Особенно важно его учитывать при разработке лекарственных препаратов на основе 4-АП и его аналогов, поскольку блокада CaCC может существенно влиять на частоту генерации потенциалов пейсмекерными клетками в организме.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена по теме 48.8. “Поиск и исследование механизмов действия нейропротекторов и стимуляторов когнитивных функций” в рамках Государственного задания ИФВ РАН (тема по ГЗ № 0090-2017-0019) В работе использовано оборудование ЦКП ИФВ РАН (Соглашение № 14.621.21.0008, идентификатор работ RFMEFI62114X0008).

ЛИТЕРАТУРА

1. Pedemonte, N. Galletta, L.J.V. (2014) Structure and Function of Tmem16 Proteins (Anoctamins). *Physiological Reviews*, 94(2), 419-459. DOI: 10.1152/physrev.00039.2011
2. Huang, F., Rock, J.R., Harfe, B.D., Cheng, T., Huang, X.Z., Jan, Y.N., Jan, L.Y. (2009) Studies on expression and

function of the TMEM16A calcium-activated chloride channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(50), 21413-21418. DOI: 10.1073/pnas.0911935106

3. Kaneda, M., Nakamura, H., Akaike, N. (1988) Mechanical and Enzymatic Isolation of Mammalian Cns Neurons. *Neuroscience Research*, 5(4), 299-315. DOI: 10.1016/0168-0102(88)90032-6
4. Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J. (1981) Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 391(2), 85-100. DOI: 10.1007/Bf00656997
5. Ferrera, L., Caputo, A., Galletta, L.J.V. (2010) TMEM16A Protein: A New Identity for Ca²⁺-Dependent Cl⁻ Channels. *Physiology*, 25(6), 357-363. DOI: 10.1152/physiol.00030.2010
6. Arroyo, J.P., Kahle, K.T., Gamba, G. (2013) The SLC12 family of electroneutral cation-coupled chloride cotransporters. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2-3), 288-298. DOI: 10.1016/j.mam.2012.05.002
7. Kaila, K., Price, T.J., Payne, J.A., Puskarjov, M., Voipio, J. (2014) Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(10), 637-654. DOI: 10.1038/nrn3819
8. Huang, W.C., Xiao, S.H., Huang, F., Harfe, B.D., Jan, Y.N., Jan, L.Y. (2012) Calcium-Activated Chloride Channels (CaCCs) Regulate Action Potential and Synaptic Response in Hippocampal Neurons. *Neuron*, 74(1), 179-192. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.01.033
9. Sanchez, D.Y., Blatz, A.L. (1994) Block of Neuronal Fast Chloride Channels by Internal Tetraethylammonium Ions. *Journal of General Physiology*, 104(1), 173-190. DOI: 10.1085/jgp.104.1.173

Поступила: 24. 05. 2018.
Принята к публикации: 17. 08. 2018.

PROPERTIES OF CALCIUM-ACTIVATED CHLORIDE CURRENTS IN RAT PURKINJE CEREBELLUM NEURONS

V.L. Zamoyski, E.V. Bovina, V.V. Grigoriev*

Institute of Physiologically Active Compounds of the Russian Academy of Sciences,
1 Severny proezd, Moscow region, Chernogolovka, 142432 Russia; *e-mail: v zam@yandex.ru

The presence of calcium-activated chloride current was shown using on freshly isolated rat Purkinje cerebellum neurons and the patch-clamp method in the whole-cell configuration. Chloride currents appeared in sodium-free external solution and reversibly disappeared in chloride-free or calcium-free external solution. Replacing of K⁺ ions (120 mM) to Cs⁺ ions (120 mM) in micropipette show the chloride currents even with 140 mM Na⁺ in external solution. This current was blocked to 80-100% by niflumic acid (25-100 μM). It was found out that well known blockers of potassium channels tetraethylammonium (TEA) and 4-aminopyridine (4-AP) also effectively blocked chloride channels. The IC₅₀ values for TEA and 4-AP were 130 μM, and 110 μM respectively. The action of TEA was reversible, while 4-AP at concentration 100 μM and above irreversibly blocked chloride channels.

Key words: patch-clamp method; Purkinje cerebellum cells; calcium-activated chloride current; tetraethylammonium; 4-aminopyridin; niflumic acid

ACKNOWLEDGMENTS

The study was conducted in accordance to the Research Topic No. 48.8 “The search and determination of the mechanisms of neuroprotectors and stimulators of cognitive functions” in the framework of the State Task of the Institute of Physiologically Active Compounds of the Russian Academy of Sciences (Topic: No: 0090-2017-0019). The equipment of the Centre of collective usage of IPAS RAS was used in the work (Agreement No. 14.621.21.0008, work identifier RFMEFI62114X0008).