

## Исследование электрофизиологических свойств тромбоцитов методом Patch-Clamp

Научный руководитель – Горудко Ирина Владимировна

*Кохан А.Ю.<sup>1</sup>, Шамова Е.В.<sup>2</sup>, Григорьева Д.В.<sup>3</sup>*

1 - Белорусский государственный университет, Физический факультет, Кафедра биофизики, Минск, Беларусь, *E-mail: rrchypp@gmail.com*; 2 - Белорусский государственный университет, Физический факультет, Кафедра биофизики, Минск, Беларусь, *E-mail: shamova@tut.by*; 3 - Белорусский государственный университет, Физический факультет, Кафедра биофизики, Минск, Беларусь, *E-mail: dargr@tut.by*

Тромбоциты - форменные элементы крови, играющие ключевую роль в процессах гемостаза. Активация тромбоцитов в ответ на различные стимулы включает множество путей внутриклеточной сигнализации, среди которых важную роль играет изменение проводимости ионных каналов плазматической мембраны. Основным методом для изучения характеристик ионных каналов является метод локальной фиксации потенциала «пэтч-кламп» (ПК). Из-за небольших размеров тромбоцитов (2-4 мкм) использование данного метода затруднено. В данной работе был произведен подбор экспериментальных условий (варьирование геометрии «пэтч-кламп» пипеток, состав и осмолярность буферных растворов и т.д.) для изучения электрофизиологических характеристик тромбоцитов.

«Пэтч-клемп» пипетки изготавливали из боросиликатного стекла на пуллере Sutter Р-97. В некоторых случаях выполняли высокотемпературную полировку пипеток. Для работы в конфигурациях «whole cell» (WC) и «cell-attach» (CA) изготавливали пипетки с сопротивлением 5-10 МОм и 14-18 МОм соответственно. Значения гигаомного контакта клетки с пипеткой составляло 5-60 ГОм. Исследования проводили в режимах фиксации тока (CC) или фиксации потенциала (VC) при помощи усилителя НЕКА ЕРС 8, сигнал фильтровали на 0,7 кГц.

Успешное получение гигаомного контакта зависело от осмолярности пипеточного и внеклеточного растворов. Переход в WC из CA был спонтанным через 10-15 минут при использовании пипеток с сопротивлением 5-10 МОм, в то время как пипетки с сопротивлением 14-18 МОм обеспечивали стабильную конфигурацию более чем на 30 минут.

В наших исследованиях кинетики трансмембранного потенциала в конфигурациях CA и WC были идентичными в том случае, когда сопротивление контакта в CA было большим 5 ГОм, и внутрипипеточный раствор был близок по составу к цитозольному, что согласуется с литературными данными для других типов клеток [2].

После получения гигаомного контакта часто наблюдалась обратимая гиперполяризация тромбоцитов при использовании пипеток, прошедших процедуру полировки. Вероятно, данный эффект вызван активацией тромбоцитов вследствие адгезии к стеклу, так как при полировке увеличивается площадь контакта поверхности клетки со стеклом. Средний мембранный потенциал тромбоцитов составил  $-40 \pm 4$  мВ. При добавлении агониста активации АДФ и ионофора кальция иономицина наблюдалось изменения проводимости ионных каналов в соответствии с литературными данными [1].

Таким образом, корректный подбор экспериментальных условий позволяет исследовать электрофизиологические свойства тромбоцитов с помощью метода ПК.

### Источники и литература

- 1) Kawa K. ADP-induced rapid inward currents through Ca(2+)-permeable cation channels in mouse, rat and guinea-pig megakaryocytes: a patch-clamp study // The Journal of Physiology. 1996. Vol. 495 (2). P. 339-352.

- 2) Mason M.J. The Interpretation of Current-Clamp Recordings in the Cell-Attached Patch-Clamp Configuration // Biophysical Journal. 2005. Vol. 88 (1). P. 739-750.