

ВПЛИВ ТУБОКУРАРИНУ НА КАТІОННІ КАНАЛИ ВЕЛИКОЇ ПРОВІДНОСТІ У ВНУТРІШНІЙ ЯДЕРНІЙ МЕМБРАНІ НЕЙРОНІВ ПУРКІН'Є МОЗОЧКА ЩУРІВ

Надійшла 15.03.15

В ядерних мембранах нейронів Пуркін'є присутні катіонні канали великої провідності (large-conductance cationic channels – LCC). Канали цього типу характеризуються селективністю щодо одновалентних катіонів, високою унітарною провідністю, повільною кінетикою і потенціалзалежністю. Структурні особливості, амінокислотна послідовність у молекулах та фізіологічна роль даних каналів поки що невідомі. Очевидно, що з'ясування функцій LCC в ядерних мембранах залежить від ідентифікації специфічного блокатора цих каналів. Ми провели експерименти з використанням методу «петч-клемп», у результаті яких було знайдено досить специфічний блокатор LCC-каналів. Таким виявився алкалоїд тубокурарин, який повністю блокує LCC-канали при аплікації в концентрації 1 мМ та більше за умови негативного заряду на ядерній мембрані. На теперішній час це найбільш ефективний блокатор каналів даного типу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ядерна оболонка, іонні канали, катіонні канали великої провідності (LCC), каналний блокатор, тубокурарин.

ВСТУП

Канали ядерної оболонки як самостійні функціональні складові цієї субклітинної структури вперше були описані в пронуклеусах гаплоїдних клітин мишей у 1990 р. [1]. З того часу була накопичена досить істотна інформація про іонні канали різних типів, які існують в ядерних мембранах. Значну увагу було приділено ролі таких каналів у регуляції концентрації іонів кальцію всередині ядра, оскільки кальційзалежні процеси пов'язані з численними життєво важливими подіями в клітинах усіх типів [2–4]. Кальцієві сигнали, які активуються синаптичною активністю, реалізуються всередині клітинного ядра та запускають низку генетичних програм. Дані програми призводять до структурних та функціональних змін як у самій клітині, так і в нейронній мережі, до якої ця клітина належить. Зазначені зміни можуть зумовлювати підвищення ефективності синаптичної передачі, що лежить в основі феноменів, відповідальних за поведінкову адаптацію (таких, як навчання, пам'ять і звикання) [5, 6]. Останні дані показують, що в нейронах

головного мозку в результаті дефіциту нуклеарного кальцію синаптична активність пригнічується; відбувається також посилення активності NMDA-рецепторів, що може лежати в основі етіології низки нейродегенеративних захворювань [7, 8].

Інозитол-1,4,5-трифосфатні рецептори (InsP_3Rs), котрі рядом дослідників інтерпретуються як кальційреалізуючі канали, локалізовані у великій кількості на внутрішніх мембранах ядер нейронів; це відрізняє відповідні канали від таких, належних ріанодиноним рецепторам (RyRs) [9, 10]. У місцях локалізації InsP_3Rs було виявлено катіонні канали великої провідності (large-conductance cationic channels – LCC). Ці канали характеризуються селективністю щодо одновалентних катіонів, високою унітарною провідністю (198 ± 27 пСм) та значною щільністю на ядерних мембранах (у середньому три–п'ять на петч-ділянку) [11–14]. Ми припустили, що дані іонні канали ядерної мембрани залучені до полегшення вивільнення іонів кальцію з люмінального простору. Верифікація запропонованої гіпотези ускладнюється тим, що блокатори LCC поки що були невідомі. Такі блокатори могли б бути важливим фармакологічним інструментом для визначення ролі окремих груп іонних каналів у механізмах процесів перерозподілу іонів через ядер-

¹ Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).
Ел. пошта: olesia.lunko@gmail.com (О. В. Лунько).

ні мембрани. В даній роботі нам вдалося показати, що добре відомий алкалоїд тубокурарин є досить ефективним блокатором LCC-каналів. Як ми встановили, ефект вказаного агента подібний до ефекту типового каналного блокатора, котрий, проникаючи в пору іонного каналу, перешкоджає руху інших іонів.

МЕТОДИКА

Отримання ізольованих ядер нейронів Пуркін'є. Для проведення дослідів використовували самиць щурів лінії Вістар віком 21 день. Після анестезії ефіром щурів декапітували; мозочок виділяли, швидко накладали на охолоджену пластину і промивали розчином, який вміщував (у мілімолях на 1 л): калію глюконат – 150.0, HEPES-KOH – 5.0, рН розчину складав 7.3. Мозочок нарізали на тонкі пластини (до 400 мкм завтовшки). Після цього зразки тканини мозочка гомогенізували, пропускаючи через ін'єкційну голку діаметром 0.6 мм. Гомогенат вміщували в центрифугу, де ядра седиментували протягом 5 хв зі швидкістю обертання 3.8 хв⁻¹. Отриманий гомогенат розміщували в робочій камері; ядра через деякий час осідали та щільно прикріплювалися до дна камери. В результаті описаних операцій ядра ставали придатними для петч-клемп-відведення. Детальніше методика була описана раніше [10–14].

Електрофізіологічні дослідження. Струми через поодинокі іонні канали внутрішньої мембрани ядер нейронів Пуркін'є були зареєстровані із використанням методу петч-клемп у режимі фіксації потенціалу в конфігурації “excised patches”. Струми через такі канали відводили при негативних та позитивних потенціалах на мембрані (від –80 до 80 мВ). Досліди проводили в умовах кімнатної температури (20–22 °С). Петч-піпетки виготовляли з боросилікатного скла; опір мікропіпеток варіював від 8 до 15 МОм. Усі реєстрації струмів поодиноких каналів були отримані в симетричному базовому розчині, що вміщував 150.0 мМ КСІ та 5.0 мМ HEPES-KOH (рН 7.3). Всі реактиви, використані в досліді, були вироблені фірмою «Sigma» (США).

Застосовували підсилювач VisualPatch VP-500 («Bio-Logic, Claix» Франція). Сигнали з виходу підсилювача піддавали фільтрації (низькочастотний фільтр Бесселя, 2 кГц), оцифровували з частотою 10⁴ с⁻¹ і зберігали на жорсткому диску комп'ютера.

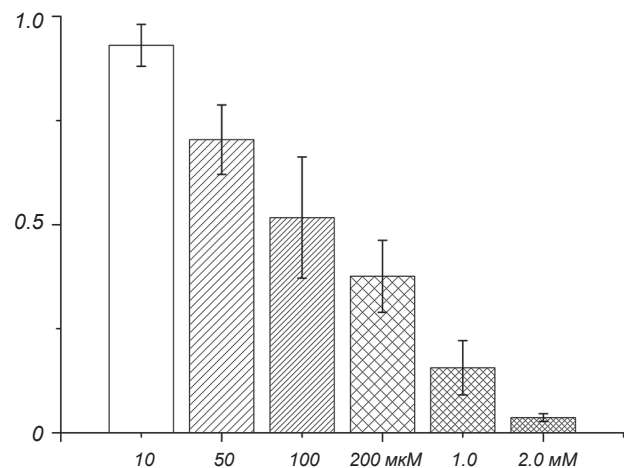
Аналіз даних. Отримані результати аналізували з використанням програм “pClamp 9.0” («Axon Instruments, Inc.», США) та «Origin 8.5» («OriginLab», США).

Числові результати наведені нижче як середні значення ± похибка середнього.

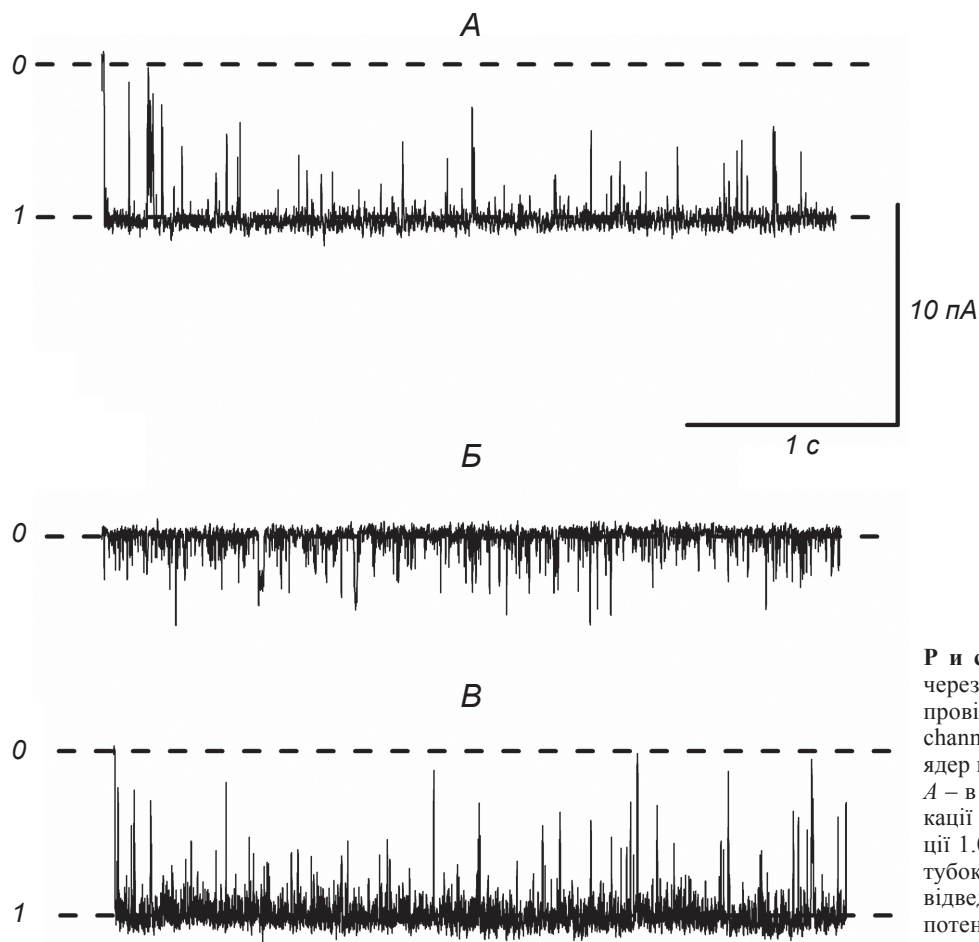
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ми досліджували вплив аплікації алкалоїду d-тубокурарину (d-ТС) у концентрації від 10 мкМ до 5 мМ на струми через LCC-канали, наявні у внутрішній ядерній мембрані нейронів Пуркін'є щура. d-ТС є широко відомим блокатором нікотинових ацетилхолінових рецепторів, котрий блокує нервово-м'язову передачу та викликає параліч м'язів [15, 16]. За своєю молекулярною структурою це моночетвертинна сполука із позитивним зарядом.

Було встановлено, що d-ТС при концентрації 10 мкМ зумовлює незначний блокуючий вплив на властивості досліджених каналів (рис. 1). При прикладанні d-ТС у концентрації 1.0 мМ та більше струми через LCC-канали практично зникали (рис. 2, Б). Вплив тубокурарину розвивався в межах 30-секундного інтервалу після початку аплікації. Даний патерн блокування каналу може вказувати на те, що d-ТС є каналним блокатором.



Р и с. 1. Зміни нормованої амплітуди струму через катіонні канали великої провідності (large-conductance cationic channels – LCC) під впливом тубокурарину в різних концентраціях. Середня амплітуда струму через LCC-канали за відсутності блокатора прийнята за одиницю. Концентрації аплікованого розчину тубокурарину (мкМ, мМ) вказані під стовпчиками.



Р и с. 2. Оригінальні реєстрації струмів через поодинокі катіонні канали великої провідності (large-conductance cationic channels – LCC) у внутрішній мембрані ядер нейронів Пуркін’є. *A* – в контрольних умовах; *B* – після аплікації розчину тубокурарину в концентрації 1.0 мМ; *B'* – після відмивання розчину тубокурарину базовим розчином КСl. Усі відведення виконані при підтримуваному потенціалі –40 мВ.

Проникаючи всередину каналу, d-ТС, імовірно, потрапляє до центру зв’язування, в результаті чого спрацьовує механізм закриття каналу, і канал стає практично непроникним для іонів. У разі наявності розчину d-ТС всередині піпетки в концентрації 1.0 мМ ефекту блокування каналу не спостерігалось ($n = 7$). Ці дані, скоріш за все, вказують на те, що структура каналу є асиметричною і центр зв’язування з блокатором знаходиться ближче до нуклеоплазматичного боку мембрани. Дещо інша картина блокування спостерігалася за умови наявності позитивного потенціалу на мембрані. Блокуючий ефект розвивався в разі аплікації d-ТС у більших концентраціях. Залежність блокування від потенціалу на мембрані може бути пов’язана з тим, що молекула d-ТС несе позитивний заряд. Ймовірно, що позитивний заряд на мембрані перешкоджає потраплянню позитивно заряджених молекул d-ТС до місць зв’язування, які знаходяться в глибині LCC-каналів.

Після відмивання розчину d-ТС провідність LCC-каналів майже повністю поверталася до початкових контрольних значень (рис. 2, *B'*). В умовах відмивання це тривало близько 5–8 хв.

Раніше вже повідомлялося про спроби визначити блокатор LCC-каналів. При цьому використовували в основному відомі блокатори калієвих каналів різних типів, проте жоден із використаних агентів не виявив достатньо ефективних властивостей блокатора [17].

Ми припускаємо, що канали даного типу можуть брати участь у виведенні іонів кальцію з депо в нуклеоплазму. Це пов’язано з компенсацією негативного заряду на мембрані, викликаного вивільненням Ca^{2+} при активації $InsP_3Rs$, або з формуванням позитивного заряду, який виникає при потраплянні Ca^{2+} у люмен у результаті роботи Ca^{2+} -АТФази; таким чином відбувається фасилітація кальцієвого сигналу. Оскільки ядерна оболонка фактично є частиною ендоплазматичного ретикулула, здається ві-

рогідним, що аналогічну роль LCC-канали можуть відігравати і в інших частинах останньої структури.

Отримані результати в значній мірі розширюють вибір експериментальних інструментів для подальшого дослідження LCC-каналів з метою вивчення їх структури та фізіологічної ролі.

Всі експериментальні процедури проводилися відповідно до директиви № 2010/63/ЄС про захист тварин, що використовуються з науковою метою, та нормативів Комітету з біоетики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

Автори даної роботи – О. В. Лунько, І. В. Грушківська, О. О. Лунько та С. М. Марченко – підтверджують відсутність будь-яких конфліктів щодо комерційних або фінансових відносин, відносин з організаціями або особами, котрі будь-яким чином могли бути пов'язані з дослідженням, а також взаємовідносин співавторів статті.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. M. Mizzanti, L. J. DeFelice, J. Cohen, and H. Malter, "Ion channels in the nuclear envelope," *Nature*, **343**, 764-767 (1990)
2. M. J. Berridge, P. Lipp, and M. D. Bootman, "The versatility and universality of calcium signaling," *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **1**, 11-21 (2000).
3. J. P. Mauger, "Role of the nuclear envelope in calcium signaling," *Biol. Cell*, **104**, No. 2, 70-83 (2012).
4. R. S. Duncan, D. L. Goad, M. A. Grillo, et al., "Control of intracellular calcium signaling as a neuroprotective strategy," *Molecules*, **15**, No. 3, 1168-1195 (2010).
5. J. A. Kauer and R. C. Malenka, "Synaptic plasticity and addiction," *Nat. Rev. Neurosci.*, **8**, 844-858 (2007).
6. O. A. Fedorenko, D. E. Duzhyu, and S. M. Marchenko, "Spontaneously active ion channels of membranes of the nuclear envelope of hippocampal pyramidal neurons," *Neurophysiology*, **39**, No. 1, 3-8 (2007).
7. M. M. Fan and L. A. Raymond, "N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease," *Prog. Neurobiol.*, **81**, 272-293 (2007).
8. S. Li, M. Jin, T. Koeglsperger, et al., "Soluble A β oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors," *J. Neurosci.*, **31**, 6627-6638 (2011).
9. O. A. Fedorenko, V. V. Yarotskyu, D. E. Duzhyu, and S. M. Marchenko, "The large conductance ion channels in the nuclear envelope of central neurons," *Pflügers Arch.*, **460**, 1045-1050 (2010).
10. S. M. Marchenko, V. V. Yarotskyu, T. N. Kovalenko, et al., "Spontaneously active and InsP3-activated ion channels in cell nuclei from rat cerebellar Purkinje and granule neurons," *J. Physiol.*, **565**, No. 15, 897-910 (2005)
11. О. В. Лунько, О. А. Федоренко, С. М. Марченко, "Вплив на властивості катіонних каналів великої провідності ядерної оболонки нейронів мозочка", *Фізіол. журн.*, **59**, № 4, 28-32 (2013).
12. О. А. Федоренко, С. М. Марченко, "Значення катіонних каналів для функціонування ядерної оболонки нейронів як кальцієвого депо", *Neurophysiology/Нейрофизиология*, **42**, № 4, 281-286 (2010)
13. О. В. Лунько, О. А. Федоренко, С. М. Марченко, "Вплив на властивості катіонних каналів великої провідності ядерної оболонки нейронів мозочка", *Фізіол. журн.*, **59**, № 4, 28-32 (2013).
14. O. A. Fedorenko and S. M. Marchenko, "Spontaneously active ion channels of the nuclear envelope membranes," *Fiziol. Zh.*, **56**, No. 5, 95-105 (2010).
15. J. P. Dilger and I. Wenningmann, "The kinetics of inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by (+)-tubocurarine and pancuronium," *Mol. Pharmacol.*, **60**, No. 4, 790-796 (2001).
16. A. C. Le Dain, B. W. Madsen, and R. O. Edeson, "Kinetics of (+)-tubocurarine blockade at the neuromuscular junction," *Br. J. Pharmacol.*, **103**, No. 2, 1607-1613 (1991).
17. О. А. Федоренко, О. В. Семенова, С. М. Марченко, "Властивості катіонних каналів великої провідності в ядерній оболонці нейронів", *Neurophysiology/Нейрофизиология*, **43**, № 3, 222-224 (2011).