

## **ВПЛИВ БЛОКАТОРІВ НА ВИСОКОПРОВІДНІ КАТІОННІ КАНАЛИ В ЯДЕРНІЙ МЕМБРАНІ**

Надійшла 01.06.17

За допомогою методу петч-клемп були зареєстровані струми через катіонні канали великої провідності (LCC-канали) в ядерній мембрані мозочкових нейронів Пуркін'є та пірамідних нейронів ділянки CA1 гіпокампа; згодом LCC-канали були виявлені в ядерній мембрані кардіоміоцитів та інших клітин. Метою нашої роботи був пошук блокаторів LCC-каналів, що є важливим для визначення фізіологічної функції даних каналів. Було встановлено, що низка N-холіноблокаторів, зокрема дитилін та атракуріум, забезпечують блокування LCC-каналів. Агоністи N-холінорецепторів (ацетилхолін і карбахолін) не впливають на активність цих каналів.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** ядерна мембрана, LCC-канали, петч-клемп, тубокурарин, дитилін, атракуріум.

### **ВСТУП**

В ядерній мембрані існують численні ядерні пори, через які відбуваються транспорт молекул, їх обмін між нуклеоплазмою і цитоплазмою. Комплекс ядерної пори забезпечує пасивне транспортування через мембрану іонів і малих молекул (< ~40 кДа). Високоселективний транспорт макромолекул здійснюється за допомогою спеціалізованих каналів з різними біофізичними властивостями. З використанням методу петч-клемп в ядерній мембрані була також зареєстрована активність катіонних каналів великої провідності (large-conductance cation channels, LCC-channels). Вперше такі канали були виявлені в ядерній мембрані мозочкових нейронів Пуркін'є; пізніше струми через LCC-канали вдалось зареєструвати і в Т-лімфоцитах, а також в ядерній мембрані нейронів ділянки CA1 гіпокампа, нейронів зубчастої звини та кардіоміоцитів [1, 3]. Канали такого типу характеризуються повільною кінетикою, високою провідністю та залежністю від потенціалу (при

позитивних значеннях потенціалу вони більшість часу відкриті, тоді як зміщення потенціалу в бік негативності пригнічує їх функціонування). Подібні канали також є селективними щодо одновалентних катіонів та непроникними для двовалентних катіонів. Було досліджено біофізичні властивості цих каналів та вивчено вплив на них низки блокаторів інших іонних каналів. Виявилось, що LCC-канали ядерної мембрани нейронів є нечутливими до відомих блокаторів калієвих каналів, зокрема до тетраетиламонію (10 мМ) та 4-амінопіридину (2 мМ) [1]. У той же самий час з'ясувалося, що істотний інгібуючий вплив на LCC-канали нейронів чинить алкалоїд тубокурарин [2], який є відомим N-холіноблокатором. У нашій роботі ми дослідили впливи на LCC-канали ядерної мембрани інших блокаторів N-холінорецепторів (атракуріуму та дитиліну), а також агоністів цих рецепторів (ацетилхоліну і карбахоліну).

### **МЕТОДИКА**

*Виділення ізольованих ядер нейронів та кардіоміоцитів.* Дослідження було виконано на щурах ліній Вістар та Фішер віком два-три тижні.

<sup>1</sup> Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

<sup>2</sup> Київський національний університет ім. Тараса Шевченка (Україна).

Ел. пошта: kotuk.lena@gmail.com (О. А. Котик).

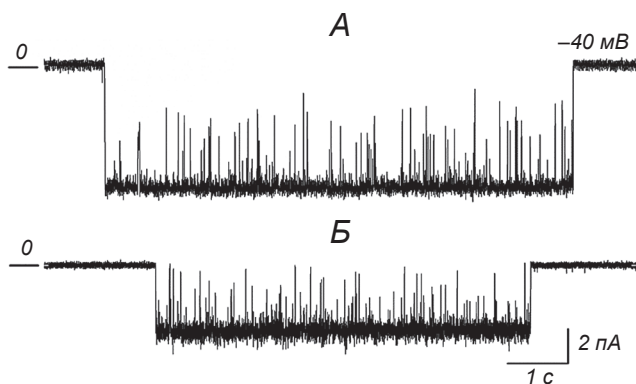
Ядра виділяли з нейронів Пуркін'є мозочка та кардіоміоцитів після гомогенізації тканини з використанням методів, які були описані раніше [2, 3].

*Електрофізіологічні дослідження.* Реєстрацію трансмембранних іонних струмів здійснювали за допомогою методу петч-клемп у конфігурації nucleus-attached або excised patch у режимі фіксації потенціалу. Використовували підсилювачі «Visual Patch VP-500» («Bio-Logic», Франція). Отримані результати були проаналізовані за допомогою програм «Clampfit» та «OriginPro».

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати попередніх досліджень показали, що тубокурарин є досить ефективним блокатором LCC-каналів [2]. Оскільки тубокурарин є N-холіноблокатором, ми вирішили перевірити дію інших інгібіторів N-холінорецепторів (атракуріуму і дитиліну) та агоністів цих рецепторів (ацетилхоліну і карбахоліну). Атракуріум аплікували в концентрації 0.4–2.0, а дитилін – 0.5–10 мМ. Як свідчили отримані дані, функціонування LCC-каналів ядерної мембрани нейронів істотно пригнічується атракуріумом (рис. 1) і дитиліном, але при концентраціях цих агентів, що значно перевищують ефективні інгібуючі концентрації тубокурарину.

Константа інгібування  $K_i$  для атракуріуму становила 1.27, а для дитиліну – 1.64 мМ (рис. 2).



**Рис. 1.** Приклад реєстрації активності LCC-каналів в ядерній мембрані нейронів Пуркін'є.

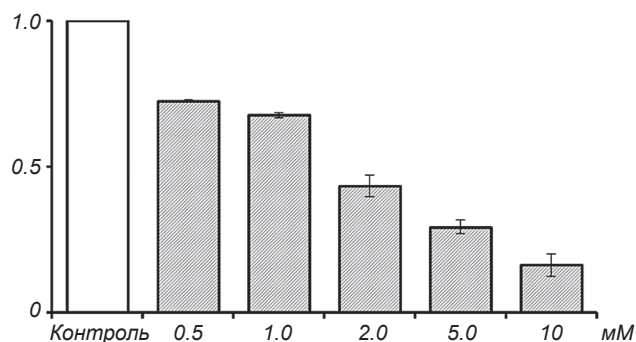
*А* – контроль, *Б* – в умовах дії 2 мМ атракуріуму. Реєстрацію здійснювали в симетричному розчині KCl при потенціалі –40 мВ.

Блокування LCC-каналів в обох випадках було оборотним, що підтверджувалося майже повним відновленням їх функціонування після відмивання блокатора.

У перебігу подібних експериментів нам вперше вдалося зареєструвати струми через LCC-канали в ядерній мембрані кардіоміоцитів щурів [3]. З'ясувалося, що ці канали за провідністю, селективністю та кінетичними параметрами є майже ідентичними LCC-каналам в ядерній мембрані нейронів. Проте вираженість інгібуючого впливу тестованих блокаторів на LCC-канали в ядерній мембрані кардіоміоцитів і нейронів помітно розрізнялася. Так, константа інгібування LCC-каналів кардіоміоцитів тубокурарином на порядок перевищувала відповідний показник для таких каналів в ядерній мембрані нейронів. У свою чергу, ефективність атракуріуму і дитиліну була дещо меншою, ніж відповідний показник для нейронів. Блокування LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів під дією двох тестованих агентів також було оборотним.

Агоністи N-холінорецепторів ацетилхолін і карбахолін не чинили істотного впливу на LCC-канали в ядерній оболонці кардіоміоцитів.

Отже, встановлено, що значний вплив на LCC-канали, крім тубокурарину, здатні здійснювати N-холіноблокатори атракуріум і дитилін. При цьому саме тубокурарин на сьогодні є найбільш ефективним із ідентифікованих блокаторів даних каналів.



**Рис. 2.** Середні нормовані амплітуди струму через LCC-канали в ядерній мембрані нейронів Пуркін'є при дії дитиліну.

Амплітуда струмів у контролі прийнята за одиницю; концентрація дитиліну (мМ) вказана під стовпчиками.

Публікація стосується результатів досліджень, проведених за грантом Президента України за конкурсним проектом (17884) Державного фонду фундаментальних досліджень, а також при підтримці гранту «Молекулярно-генетичні і біохімічні механізми регуляції клітинних та системних взаємодій за фізіологічних та патологічних станів – 2017–2021» НАН України 0116U004470.

Автори висловлюють подяку М. І. Хомин за цінну допомогу у виконанні досліджень.

Дослідження виконували відповідно до положень Європейської Конвенції із захисту тварин, які використовуються в експериментах (86/609/ЕЕС, 1986, Страсбург), а також положень Комітету з біоетики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

Автори цієї роботи – О. А. Котик, А. Б. Котлярова, Н. І. Павлова та С. М. Марченко – засвідчують відсутність будь-яких конфліктів щодо комерційних або фінансових від-

носин, відносин з організаціями або особами, котрі будь-яким чином могли бути пов'язані з дослідженням, а також взаємовідносин співавторів статті.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. 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).
2. O. V. Lun'ko, I. V. Grushkovska, O. O. Lun'ko, and S. M. Marchenko, "Effect of tubocurarine on large-conductance cationic channels in the inner nuclear membrane of Purkinje neurons of the rat cerebellum," *Neurophysiology*, **48**, No. 5, 332-335 (2016).
3. О. А. Котик, А. Б. Котлярова, А. О. Поліщук, С. М. Марченко, "Іонні струми поодиноких каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів щура", *Фізіол. журн.*, **62**, № 6, 3-8 (2016).