

# Вплив природних отрут на характеристики катіонних каналів великої провідності внутрішньої ядерної мембрани нейронів Пуркіньє мозочка шурів

О.В. Луцько, О.А. Федоренко, О.В. Ісаєва, С.М. Марченко

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: olesia.lunko@gmail.com

*Катіонні канали великої провідності (Large-conductance cationic channels, LCC), які експресуються на мембранах ядер нейронів Пуркіньє мозочка шурів, характеризуються селективністю до одновалентних катіонів, повільною кінетикою і потенціалзалежною активністю. Ідентифікація специфічного блокатора LCC-каналів є першим кроком для визначення їх структури та фізіологічної ролі. Для виявлення компонентів, які б специфічно взаємодіяли з LCC-каналами на внутрішній мембрані ядра, ми дослідили вплив комплексів токсинів п'яти отруйних тварин: скорпіона лісового (Heterometrus laoticus), кобри моноклевої (Naja kaouthia), гадюки степової (Vipera renardi), крайта стрічкового (Bungarus fasciatus), та гадюки шумливої (Bitis arietans) на характеристики цих каналів. Встановлено, що всі досліджені отрути значно знижували ймовірність відкритого стану LCC-каналів у середньому на 76–86%. Аплікація комплексів токсинів H. laoticus та B. fasciatus призводила до зменшення амплітуди струму на 43 і 26% відповідно. Вплив інших сполук як блокаторів досліджуваних каналів був менше вираженим. Отримані результати можуть бути використані для подальшого спрямованого пошуку специфічних та високоафінних блокаторів цих каналів.*

*Ключові слова:* ядерна оболонка; блокатор іонних каналів; природні отрути.

## ВСТУП

Катіонні канали великої провідності (Large-conductance cationic channels, LCC) були вперше зареєстровані на ядерній мембрані нейронів Пуркіньє мозочка шурів [1]. Вони характеризуються повільною кінетикою, селективні до одновалентних катіонів, їх активність залежить від потенціалу і ймовірність відкритого стану ( $P_o$ ) збільшується при більш позитивних його значеннях на мембрані [2]. Провідність LCC-каналів різко зменшується за умови заміни іонів калію на 100 ммоль/л іонів кальцію [1], але при додаванні кальцію у концентрації 1 ммоль/л не виявлено значних змін [3]. Фізіологічна роль цих каналів невідома. Раніше було показано, що LCC-канали колокалізовані з інозитол - 1, 4, 5 - трифосфатними рецепторами (Inositol - 1, 4, 5 - trisphosphate receptor,  $IP_3Rs$ ) на внутрішній

мембрані ядра нейронів Пуркіньє мозочка та пірамідних нейронів зони CA1 гіпокампа шурів [4] і відсутні на мембранах у клітинах, у яких не вдалося зареєструвати  $IP_3Rs$  [5, 6]. Також було припущено, що вони можуть брати участь у регуляції потенціалу на мембрані ядра, підтримуючи його значення близьким до нуля, через компенсацію негативного заряду, який утворюється внаслідок активації інших каналів, наприклад  $IP_3Rs$  [1, 2]. Проте відсутність відомостей про специфічні блокатори і структуру LCC-каналів значно ускладнює дослідження їх фізіологічної ролі.

Природні отрути – це токсичні речовини, що складаються із суміші малих молекул, пептидів та білків, і здатні специфічно впливати на функціонування широкого спектра молекулярних мішеней в організмі, в тому числі, на мембранні рецептори та іонні канали. Властивість природних отрут діяти

© О.В. Луцько, О.А. Федоренко, О.В. Ісаєва, С.М. Марченко

на різноманітні мішені пов'язана з великою кількістю структурно схожих амінокислотних послідовностей, що накопичувалися в процесі еволюції для полювання та захисту, спрямованого на виживання цього виду тварин. Завдяки високій специфічності, токсини часто використовуються як інструмент для характеристики молекулярної структури іонних каналів, а деякі групи токсинів досліджуються в терапевтичних цілях [7].

Для виявлення потенційного блокатора LCC-каналів було досліджено вплив комплексу токсинів із п'яти отруйних тварин: крайта стрічкового (*Bungarus fasciatus*), гадюки шумливої (*Bitis arietans*), гадюки степової (*Vipera renardi*), кобри моноклевої (*Naja kaouthia*) і скорпіона лісового (*Heterometrus laoticus*) на біофізичні властивості LCC-каналів внутрішньої мембрани ядер нейронів Пуркінє.

Мета нашої роботи – дослідження впливу комплексу білків та пептидів, що містяться в неочищених отрутах чотирьох видів змій та одного виду скорпіона для виділення ефективного блокатора LCC-каналів

## МЕТОДИКА

*Отримання ізольованих ядер нейронів Пуркінє.* Досліди проводили на 2-3-тижневих щурах лінії Вістар (P14-21). Після декапітації тварини мозочок швидко виділяли та поміщали на холодну пластину і промивали розчином, який містив (у ммоль/л): глюконат калію – 150,0, HEPES-КОН – 5,0; рН 7,3. Мозочок нарізали на тонкі зрізи завтовшки до 400 мкм. Після цього зразки тканини гомогенізували пропусканням через голку для ін'єкцій із зовнішнім діаметром 0,6 мм (23G). Для отримання фракції, яка містить ядра, гомогенат центрифугували протягом 5 хв (1000g), використовуючи центрифугу Eppendorf MiniSpin. Отриманий осад додавали до базового розчину в робочій камері на інвертованому мікроскопі Leica DMIRB («Leica Microsystems», Німеччина),

де ядра осідали протягом 2-3 хв та щільно прикріплювалися до поверхні скла експериментальної камери. Після виконання описаної процедури ядра були придатними для реєстрації струмів, використовуючи метод patch-clamp. Всі експериментальні процедури проводилися згідно з Директивою № 2010/63/ЄС про захист тварин, що використовуються з науковою метою.

*Розведення необроблених природних отрут.* Висушені необроблені отрути були надані д.х.н. Юрієм Миколайовичем Уткіним (лабораторія молекулярної токсикології Інституту біоорганічної хімії ім. акад. М.М. Шемякіна і Ю.А. Овчиннікова). Отримані зразки зберігали в сухому темному місці при кімнатній температурі. Отруту *H. laoticus* розводили в концентрації 0,021 г/л, *B. fasciatus* – 0,050 г/л, *B. arietans* – 0,059 г/л, *V. renardi* – 0,054 г/л, *N. kaouthia* – 0,052 г/л у деіонізованій воді та додавали в кількості 10 мкл у робочу камеру об'ємом 200 мкл через локальну аплікацію. Розчинені отрути зберігали при 3-5°C.

*Електрофізіологічні дослідження.* Струми поодиноких іонних каналів на внутрішній мембрані ядер нейронів Пуркінє реєстрували на ізольованій ділянці внутрішньої мембрани ядра із використанням методу patch-clamp у конфігурації inside-out у режимі фіксації потенціалу. Patch-піпетки виготовляли з боросилікатного скла (Sutter Instruments, США), опір яких варіював від 8 до 15 МОм. Реєстрацію струмів поодиноких каналів здійснювали в симетричному базовому розчині, що містив (ммоль/л): KCl – 150,0, Tris – 10,0; рН - 7,3 при кімнатній температурі (20-22°C). Реєстрацію струмів здійснювали з використанням підсилювача VisualPatch VP-500 (Bio-Logic, Франція) з п'ятиполюсним фільтром нижніх частот Бесселя (1 кГц), оцифровували з частотою 5 кГц і зберігали на жорсткому диску комп'ютера. Детальніше методика була описана раніше [6]. Результати були проаналізовані за допомогою програми "Clampfit 9.0" (Axon Instruments Inc., США)

та Origin 8.5 (OriginLab, США) і представлені як середнє значення  $\pm$  стандартна похибка середнього значення.

Для характеристики впливу компонентів неочищених природних отрут ми вимірювали такі параметри поодиноких каналів, як ймовірність відкритого стану каналів ( $P_o$ ) та амплітуду струму ( $I$ ), щоб визначити належність каналу до певного типу і отримати інформацію про можливі механізми взаємодії компонентів отрути із структурними одиницями каналу. Важливо відзначити, що виділяють явну амплітуду (або видиму) «apparent amplitude» та справжню амплітуду струму «true amplitude» поодинокого каналу [17]. Видима амплітуду струму – це різниця амплітуди струму між рівнями відкритих іонних каналів у ділянці реєстрації. В цій роботі вона була визначена за допомогою курсорів у програмі Clampfit. Значення справжньої амплітуди струму може бути отримано при безкінечно великій роздільній здатності підсилювача або методом аналізу розподілу амплітуди струму поодинокого каналу [18, 19]. Для оцінювання впливу природних отрут, до складу яких входить суміш білків та пептидів, що одночасно можуть впливати на різні характеристики каналів, ми користувалися методом визначення видимої амплітуди струму, оскільки на цьому етапі досліджень він найбільш доцільний для кількісної оцінки зміни кінетики каналів.

Кількість каналів під час реєстрації визначали при потенціалі на мембрані +40 мВ, коли ймовірність їх активації, як було показано раніше, сягає стабільно високого рівня [2]. Тоді максимальну кількість каналів ( $N$ ) вираховували за допомогою формули:

$$N = \frac{I_{max}}{I_u},$$

де  $I_{max}$  – максимальна амплітуду струму під час реєстрації;  $I_u$  – амплітуду струму поодинокого каналу при заданому потенціалі. Значення  $N$  приймається незмінним протягом всього часу реєстрації.

За умови наявності одного каналу на ділянці реєстрації,  $P_o$  визначали як співвідношення часу перебування каналів у відкритому стані до загального часу реєстрації, що виражається формулою:

$$P_o = \frac{t_o}{T},$$

де  $t_o$  – проміжок часу, коли канал перебував у відкритому стані;  $T$  – загальний час реєстрації.

Коли каналів у ділянці реєстрації більше одного, ймовірність відкритого стану для всіх каналів в петчі ( $NP_o$ ), тобто для максимальної кількості каналів, вираховували за допомогою формули:

$$NP_o = \sum_{i=0}^n \frac{it_i}{T},$$

де  $n$  – кількість зареєстрованих рівнів струму через ідентичні поодинокі канали, які відкриті на вибраній для аналізу ділянці часу,  $t_i$  – час, протягом якого певна кількість каналів перебувала у відкритому стані на  $i$  рівні. Тоді  $P_o$  визначали відповідно до формули:

$$P_o = \frac{NP_o}{N}.$$

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На цьому етапі роботи, спрямованої на пошук специфічного блокатора, слід було визначити, які із отрут можуть представляти найбільший інтерес для подальших досліджень, а саме для фракціонування та виділення сполуки, яка би виступала ефективним блокатором ЛСС-каналів. Усі з використаних отрут по-різному впливали на характеристики ЛСС-каналів. Так, компоненти отрути *V. arietans* виявляли порівняно слабкий ефект, тому концентрація була збільшена на 10 %. На рис. 1 представлено реєстрацію ЛСС-каналів у контролі (див. рис. 1, а) і після аплікації компонентів цієї отрути (рис 1, б). За контрольних умов амплітуду струму становила  $-6,3 \pm 0,5$  пА при фіксованому потенціалі -40 мВ. Внесення компонентів отрути *V. arietans* не призводило до зменшення амплітуди ЛСС струму ( $-6,1 \pm 0,7$  пА; див. рис. 1, в). Натомість ймовірність

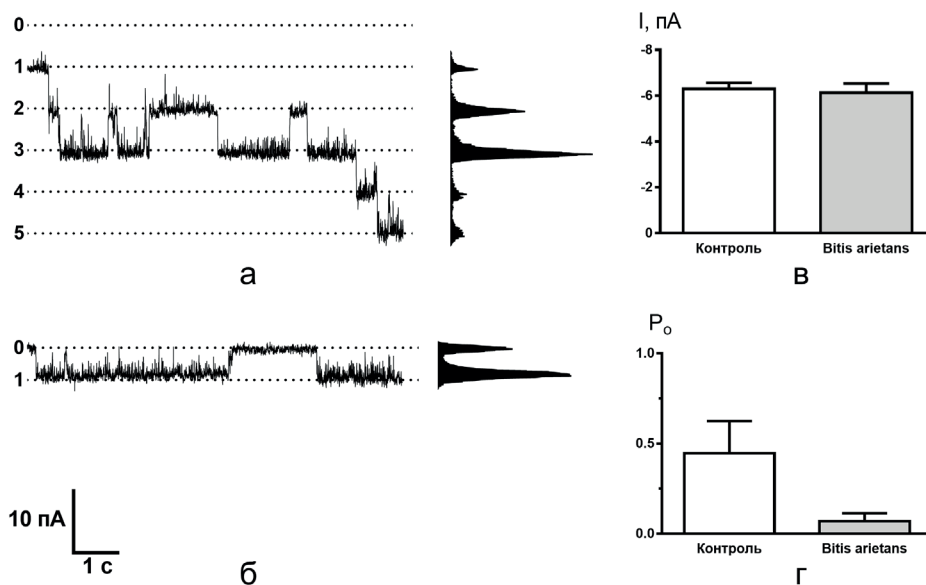


Рис. 1. Вплив компонентів отрути *B. arietans* на поодинокі LCC-канали (n=4). Контрольні умови (а), після аплікації суміші компонентів отрути *B. arietans* (б). Амплітуда струму (в) та ймовірність відкритого стану (г) за контрольних умов та після аплікації *B. arietans* \*

\*Примітка: тут і на рис. 2–5 репрезентативні ділянки реєстрації струму та відповідні гістограми представлені при фіксованому потенціалі -40 мВ. Канали в закритому стані позначені нулем, а у відкритому стані – одиницею і т.д., залежно від кількості відкритих каналів під час окремої реєстрації

перебування каналу у відкритому стані ( $P_o$ ) зменшувалося на 84 % відносно контролю, а саме з  $0,45 \pm 0,31$  у контролі до  $0,07 \pm 0,08$  після аплікації (див. рис. 1, г).

На рис. 2 показано реєстрацію LCC-каналів у контрольних умовах (див. рис. 2, а) і після аплікації розчиненого екстракту отрути *B. fasciatus* (див. рис. 2, б). Компоненти цієї

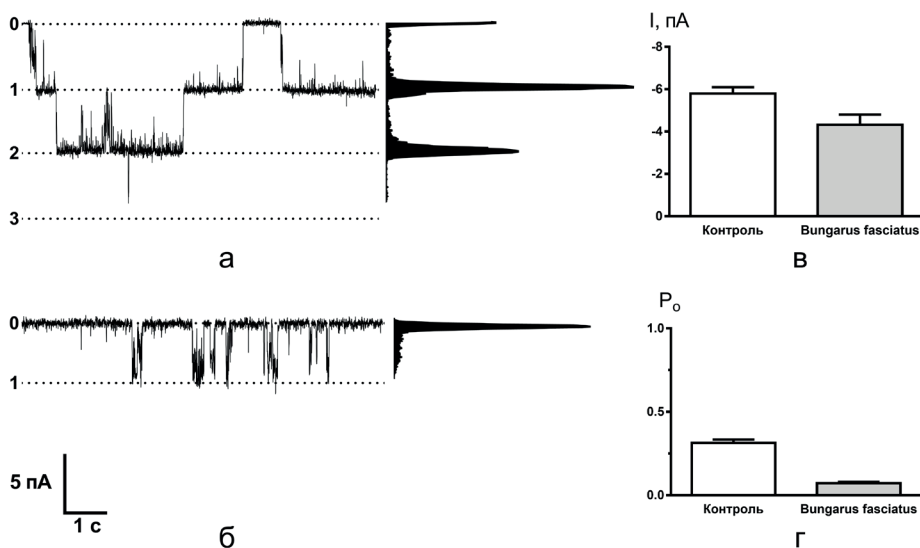


Рис. 2. Вплив компонентів отрути *B. fasciatus* на поодинокі LCC-канали (n=3). Контрольні умови (а), після аплікації суміші компонентів отрути *B. fasciatus* (б). Амплітуда струму (в) та ймовірність відкритого стану (г) за контрольних умов та після аплікації *B. fasciatus*

отрути викликали зменшення амплітуди струму з  $-5,8 \pm 0,5$  пА до  $-4,3 \pm 0,8$  пА, що становило 26 % від контролю (див. рис. 2, б). Такі зміни можуть вказувати на швидке блокування каналу. Ми припускаємо, що певні компоненти отрути проникають до іонної пори каналу, перешкоджаючи проникненню іонам калію, але через низьку афінність блокують його на короткий час. Значення  $P_o$  ЛСС-каналів зменшувалося на 77 % порівняно з контролем, а саме з  $0,32 \pm 0,04$  до  $0,07 \pm 0,01$  (див. рис. 2, г).

У ділянці реєстрації може налічуватися в середньому від трьох до п'яти ЛСС-каналів [1] або більше. Після внесення розчиненого екстракту отрути *V. genardi* із восьми каналів (рис. 3, а), залишився активним лише один (див. рис. 3, б), що перебував переважно у відкритому стані. Дія компонентів цієї отрути призводила до зменшення амплітуди струму з  $-6,2 \pm 0,7$  до  $-4,2 \pm 1,0$  пА (див. рис. 3, в). При цьому значення  $P_o$  зменшувалося на 86 % порівняно з контролем, а саме з  $0,50 \pm 0,09$  до  $0,08 \pm 0,08$  (див. рис. 3, г).

На репрезентативній ділянці реєстрації

ЛСС-каналів у контрольних умовах показано шість каналів (рис. 4, а), а після впливу компонентів отрути *N. kaouthia* були майже повністю відсутні струми, що представлено відповідною амплітудною гістограмою (див. рис. 4, б). Проте при вимірюванні амплітуди струму поодинокого каналу за дії цієї отрути виявляється незначна різниця (5 %) порівняно з контролем. Як показано на рис. 4, в, значення амплітуди струму за контрольних умов становило  $-6,6 \pm 0,5$  пА, а після аплікації дещо зменшувалося до  $-6,3 \pm 0,5$  пА. Компоненти отрути *N. kaouthia* викликали зниження (на 80 %) ймовірності відкритого стану ЛСС-каналів з  $0,35 \pm 0,19$  до  $0,07 \pm 0,06$  (див. рис. 4, г) і незначне зниження амплітуди їх струмів (див. рис. 4, в), що може бути пов'язано з ефектом миготіння (flickering). Це може бути одним з проявів швидкого переходу між відкритим та заблокованим станами каналу.

На рис. 5, а представлено репрезентативну ділянку реєстрації поодиноких струмів, яка відображає наявність трьох активних каналів. Після аплікації розчиненого екст\_

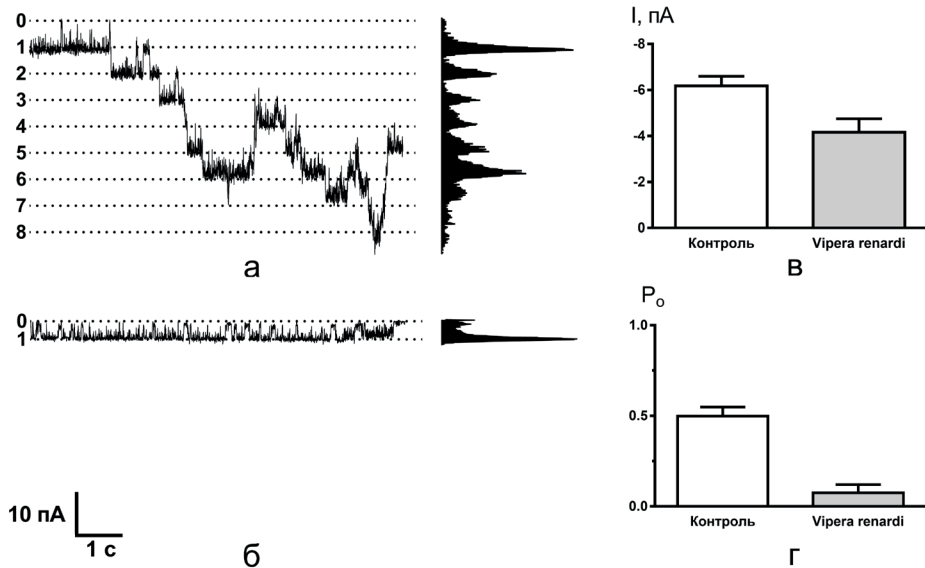


Рис. 3. Вплив компонентів отрути *V. genardi* на поодинокі ЛСС-канали (n=3). Контрольні умови (а), після аплікації суміші компонентів отрути *V. genardi* (б). Амплітуда струму (в) та ймовірність відкритого стану (г) за контрольних умов та після аплікації *V. genardi*

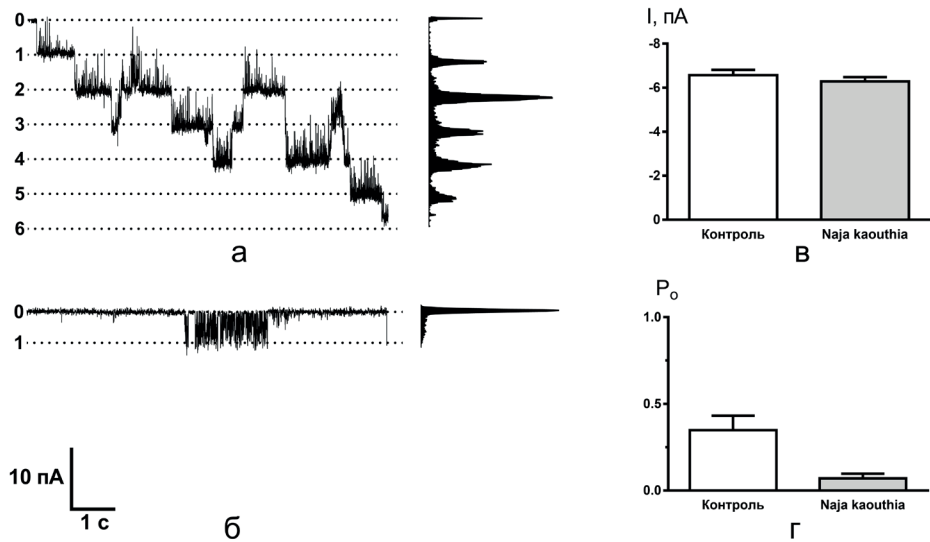


Рис. 4. Вплив компонентів отрути *N. kaouthia* на поодинокі LCC-канали (n=4). Контрольні умови (а), після аплікації суміші компонентів отрути *N. kaouthia* (б). Амплітуда струму (в) та ймовірність відкритого стану (г) за контрольних умов та після аплікації *N. kaouthia*

раку отрути *H. laoticus* амплітуда струму зменшувалася (див. рис. 5, б). Водночас компоненти цієї отрути також викликали миготіння каналу (див. рис. 5, б). Значення амплітуди зменшувалося на 43 % порівняно з контролем, а саме з  $-6,7 \pm 0,6$  до  $-3,9 \pm 0,9$  пА (див. рис. 5, в). Проте як і за

дії отрути *N. kaouthia*, спостерігався дуже виражений ефект миготіння, і тому канал, як видно на амплітудній гістограмі (див. рис. 5, б), перебував переважно у блокованому стані. Показано, що аплікація компонентів отрути *H. laoticus* призводила до зменшення ймовірності відкритого стану LCC-каналів

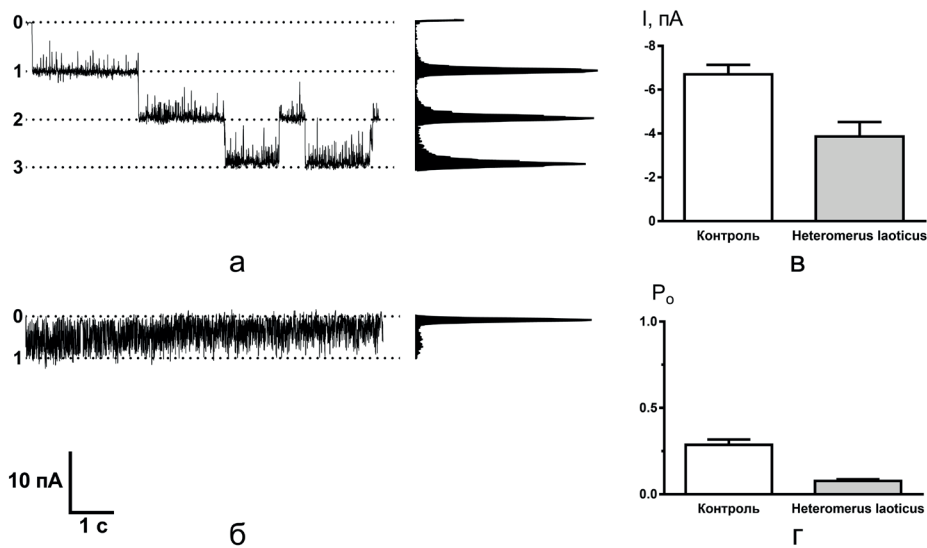


Рис. 5. Вплив компонентів отрути скорпіон *H. laoticus* на поодинокі LCC-канали (n=5). Контрольні умови (а), після аплікації суміші компонентів отрути *H. Laoticus* (б). Амплітуда струму (в) та ймовірність відкритого стану (г) за контрольних умов та після аплікації *H. laoticus*



з  $0,29 \pm 0,05$  до  $0,08 \pm 0,02$ , що становило 76 % від контролю (див. рис. 5, г).

Швидкість дії екстрактів різних отрут була різною. Компоненти отруту *N. kaouthia* та *H. laoticus* впливали на характеристики ЛСС-струмів через 2-4 с, в той час як *B. arietans* та *V. genardi* – приблизно через 7 с, а *B. fasciatus* через 10 с після аплікації. Через 15-30 с після аплікації компонентів отрути *H. laoticus* втрачається щільний контакт з мембраною ядра. Неможливість тривалої реєстрації струмів за наявності цієї отрути, очевидно, пов'язана з високим вмістом у її складі протеолітичних компонентів, які можуть сприяти роз'єднанню амінокислотних послідовностей білків мембрани.

Завдяки своїй високій афінності та специфічності зв'язування у низьких концентраціях, компоненти природних отрут використовуються як фармакологічний інструмент для ідентифікації структури нових типів іонних каналів [7]. Виділяють два основні, найбільше досліджені та описані, механізми блокування іонних каналів токсинами [8]. Один з них полягає у взаємодії його амінокислотних залишків зі селективним фільтром пори каналу, яка знаходиться у його внутрішній частині, що перешкоджає руху іонів, до яких селективний певний тип каналу. В основі іншого механізму задіяна здатність токсину впливати на сенсор потенціалу іонних каналів і порушувати характерну кінетику каналу, тобто стабільність балансу відкритого, закритого або інактивованого станів. Токсин, що зв'язується з сенсором потенціалу каналу, може стабілізувати його у будь-якому стані, при якому виявляється найбільша афінність до діючої речовини. Задіяні в експериментах отрути не були фракціоновані і не виділено білок чи пептид, який би специфічно впливав на канал. Суміш компонентів, що входить до складу отрути може взаємодіяти із різними елементами структури іонних каналів, одночасно викликаючи різні зміни параметрів струму, але в цілому можна

виявити зміну біофізичних властивостей каналу з перспективою дослідження вже очищених токсинів, тому ми провели кількісну оцінку впливу та на основі цього вибрали отрути, в яких з найбільшою ймовірністю може міститися така сполука.

Серед досліджених речовин отрути чотирьох змій (*N. kaouthia*, *B. fasciatus*, *V. genardi*, *B. arietans*) містять токсини, які є ефективними блокаторами ацетилхолінових рецепторів нікотинового типу (nicotinic acetylcholine receptors, nAChRs) [9–12]. Вони відносяться до рецепторів м'язового типу і їх блокування у ссавців компонентами отрути призводить до зупинки дихання та смерті. Найчастіше як блокатори AChRs використовуються нейротоксини кобри та крайта. Цікаво, що тубокурарин, антагоніст nAChRs у нервово-м'язових синапсах, також виявився ефективним блокатором ЛСС-каналів [13]. На відміну від зміїних отрут, які було використано в наших дослідженнях, отрута *H. laoticus* не несе фатальних наслідків для людини. Природний ареал цього скорпіона охоплює Індонезію, південно-західний В'єтнам та Лаос. Цей вид часто тримають в домашніх тераріумах через його вражаюче великий розмір (до 10 см). У комплексі отрути містяться переважно пептиди та білки, декілька з яких були охарактеризовані як блокатори потенціалзалежних калієвих каналів [14, 15]. Локальна аплікація екстракту отрути *H. laoticus* на ЛСС-канали в межах до 10 с призводила до різкої зміни їх кінетики. Вже в перші секунди після аплікації ефект виявлявся як виражене миготіння зі зменшенням амплітуди струму. Такий ефект діючої речовини класично характеризується як вплив швидкого блокатора [16]. Реєстрація миготіння (швидкі флуктуації між відкритим і закритим або блокованим станами) виникає тоді, коли частота переходу між станами більша за частоту зрізу фільтра системи, за допомогою якої здійснюється реєстрація струмів. Тому при швидких константах асоціації та

## Порівняння впливу компонентів отрут на характеристики LCC-каналів.

Назва тварини (лат.)	Зменшення амплітуди струму (I), %	Зменшення ймовірності відкритого стану ( $P_o$ ), %
Скорпіон лісовий ( <i>Heteromerus laoticus</i> )	43	76
Кобра моноклева ( <i>Naja kaouthia</i> )	5	80
Гадюка степова ( <i>Vipera renardi</i> )	35	86
Крайт стрічковий ( <i>Bungarus fasciatus</i> )	26	77
Гадюка шумлива ( <i>Bitis arietans</i> )	3	84

дисоціації блокатора ресструється зменшення амплітуди струму [17].

Порівнюючи ефективність впливу використаних отрут на амплітуду струмів та ймовірність відкритого стану каналів ми визначили в екстрактах яких отрут містяться сполуки, що надалі можуть бути використані як блокатори LCC-каналів (таблиця). Всі протестовані отрути потенційно містять сполуки, що виявляють вплив на властивості цього типу каналів. Найбільш ефективними виявилися отрути *H. laoticus*, і *B. fasciatus*, компоненти яких зменшували амплітуду струму на 43 і 26 % відповідно, та ймовірність відкритого стану LCC-каналів на 80 і 77 %. Отримані результати розширюють фармакологічні можливості дослідження LCC-каналів та можуть бути використані для подальшого спрямованого пошуку специфічних та високоафінних блокаторів цих каналів.

*Висловлюємо подяку керівнику підрозділу лабораторії молекулярної токсикології Інституту біоорганічної хімії ім. академіків М.М. Шемякіна і Ю.А. Овчиннікова, д.х.н. Юрію Миколайовичу Уткіну за надані екстракти отрут.*

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.*

**О.В. Лунько, Е.А. Федоренко, Е.В. Исаева,  
С.М. Марченко**

### ВЛИЯНИЕ ПРИРОДНЫХ ЯДОВ НА КАТИОННЫЕ КАНАЛЫ БОЛЬШОЙ ПРОВОДИМОСТИ ВНУТРЕННЕЙ ЯДЕРНОЙ МЕМБРАНЫ НЕЙРОНОВ ПУРКИНЬЕ МОЗЖЕЧКА КРЫС

Катионные каналы большой проводимости (Large-conductance cationic channels, LCC), которые экспрессируются на мембранах ядер нейронов Пуркинье мозжечка крыс, характеризуются селективностью к одновалентных катионов, медленной кинетикой и потенциалзависимой активностью. Идентификация специфического блокатора LCC-каналов является первым шагом для определения их структуры и физиологической роли. С целью выявления компонентов, которые бы специфически взаимодействовали с LCC-каналами на внутренней мембране ядра, мы исследовали влияние комплексов токсинов пяти ядовитых животных: скорпиона лесного (*Heteromerus laoticus*), кобры моноклевой (*Naja kaouthia*), гадюки степной (*Vipera renardi*), крайта ленточного (*Bungarus fasciatus*), и гадюки шумящей (*Bitis arietans*) на характеристики этих каналов. Мы определили, что все исследованные яды значительно снижают вероятность открытого состояния LCC-каналов в среднем на 76 - 86%. Апликация экстрактов комплекса токсинов *H. laoticus*, и *B. fasciatus* приводит к уменьшению амплитуды тока LCC-каналов на 43 и 26%, соответственно. Влияние других компонентов в качестве блокаторов на токи исследованных каналов было менее выраженным. Полученные результаты могут быть использованы для дальнейшего направленного поиска специфических и высокоафинных блокаторов этих каналов.

Ключевые слова: ядерная оболочка; блокатор ионных каналов; природные яды.



**O. V. Lunko, O. A. Fedorenko, E. V. Isaeva,  
S. M. Marchenko**

**EFFECTS OF VENOMS ON LARGE-  
CONDUCTANCE CATIONIC CHANNELS  
ON THE INNER NUCLEAR MEMBRANE OF  
RAT CEREBELLUM PURKINJE NEURONS**

Large-conductance cationic channels (LCC) expressed on the Purkinje neuron nuclei of the rat cerebellum, characterized by selectivity to monovalent cations, slow kinetics and potential-dependent activity. The identification of a specific LCC channel blocker is the first step in determining their structure and physiological role. In order to identify components that specifically interact with LCC channels on the inner nuclear membrane, we investigated the effects of venoms of five animals: forest scorpion (*Heteromerus laoticus*), monocled cobra (*Naja kaouthia*), steppe viper (*Vipera renardi*), banded krait (*Bungarus fasciatus*), and puff adder (*Bitis arietans*) on the characteristics of these channels. It has been shown that all investigated venoms significantly reduce the open state probability of LCC channels in average by 76 - 86%. The application venoms of *H. laoticus* and *B. fasciatus* leads to a decrease in the currents amplitude of LCC channels, by 43% and 26% respectively. The influence of other compounds as blocker of LCC channels was less pronounced. Obtained data can be used for further direct search of specific and high affinity blockers of these channels.

Key words: nuclear envelope; ion channels blocker; venoms.

*Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv; e-mail: olesia.lunko@gmail.com*

**REFERENCES**

1. Marchenko SM, Yarotskyy V V., Kovalenko TN, Kostyuk PG, Thomas RC. Spontaneously active and InsP3-activated ion channels in cell nuclei from rat cerebellar Purkinje and granule neurones. *J Physiol.* 2005; 565:897-910.
2. Fedorenko O, Yarotskyy V, Duzhy D, Marchenko SM. The large-conductance ion channels in the nuclear envelope of central neurons. *Pflug Arch.* 2010; 460:1045-50.
3. Lun'ko OV, Fedorenko OA, Marchenko SM. The effect of Ca<sup>2+</sup> on the properties of the large conductance cation channels of the nuclear envelope of the cerebellar neurons. *Fiziol Zh.* 2013; 59:28-32.
4. Fedorenko OA, Marchenko SM. Ion channels of the nuclear membrane of hippocampal neurons. *Hippocampus.* 2014; 24:869-76.
5. Fedorenko EA, Semenova OV, Marchenko SM. Properties of Large-Conductance Cationic Channels in the Neuronal Nuclear Envelope. *Neurophysiol.* 2011; 43:192-4.
6. Fedorenko EA, Dyzhii DE, Marchenko SM. Large-conductance cationic channels in the nuclear envelope of Purkinje neurons from the rat cerebellum. *Neurophysiol.* 2007; 39:99-104.
7. Dutertre S, Lewis RJ. Use of venom peptides to probe ion channel structure and function. *J Biol Chem.* 2010; 285:13315-20.
8. Cruz LJ, Luo S. *Toxins and Drug Discovery.* 2017.
9. Nasiripourdori A, Taly V, Grutter T, Taly A. From toxins targeting ligand gated ion channels to therapeutic molecules. *Toxins.* 2011; 3:260-93.
10. Gorbacheva EV, Starkov VI, Tsetlin VI, Utkin YN, Vulfus CA. Viperidae snake venoms block nicotinic acetylcholine receptors and voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels in identified neurons of fresh-water snail *Lymnaea stagnali*. *Biochem Suppl Ser A Membr Cell Biol.* 2008; 2:14-8.
11. Harvey AL, Anderson AJ. Dendrotoxins: Snake toxins that block potassium channels and facilitate neurotransmitter release. *Pharmacol Ther.* 1985; 31:33-55.
12. Vulfus CA, Spirova EN, Serebryakova MV. et al. Peptides from puff adder *Bitis arietans* venom, novel inhibitors of nicotinic acetylcholine receptors. *Toxicon.* 2016; 121:70-6.
13. Lunko O V., Grushkovska I V., Lun'ko OO, Marchenko SM. Effect of Tubocurarine on Large-Conductance Cationic Channels in the Inner Nuclear Membrane of Purkinje Neurons of the Rat Cerebellum. *Neurophysiol.* 2016; 48:332-5.
14. Vandendriessche T, Kopljar I, Jenkins DP, et al. Purification, molecular cloning and functional characterization of HelaTx1 (*Heterometrus laoticus*): The first member of a new  $\kappa$ -KTX subfamily. *Biochem Pharmacol.* 2012; 83:1307-17.
15. Quintero-Hernández V, Jiménez-Vargas JM, Gurrola GB, Valdivia HH, Possani LD. Scorpion venom components that affect ion-channels function. *Toxicon.* 2013; 76:328-42.
16. Hille B. *Ionic Channels of Excitable Membranes* (3rd ed). 2001.
17. Schroeder I. How to resolve microsecond current fluctuations in single ion channels: The power of beta distributions. *Channels.* 2015; 9:262-80.
18. Fitzhugh R. Statistical properties of the asymmetric random telegraph signal, with applications to single-channel analysis. *Math Biosci.* 1983; 64:75-89.
19. Yellen G. Ionic permeation and blockade in Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels of bovine chromaffin cells. *J Gen Physiol.* 1984; 84:157-86.

*Матеріал надійшов  
до редакції 22.12.2017*