

## ВПЛИВ НЕОСТИГМІНУ, ГЕКСАМЕТОНІЮ І МЕТИЛЛІКАКОНІТИНУ НА ВИСОКОПРОВІДНІ КАТІОННІ КАНАЛИ ЯДЕРНОЇ МЕМБРАНИ НЕЙРОНІВ ПУРКІНЬЄ МОЗОЧКА ЩУРІВ

*Високопровідні катіонні канали (LCC-канали), знайдені в обох ядерних мембранах нейронів Пуркіньє мозочка, є найбільш розповсюдженим типом спонтанно-активних іонних каналів серед інших ідентифікованих. Їхні структура та фізіологічні функції на сьогоднішній день залишаються невідомими, але результати попередніх робіт підтвердили їхню чутливість до низьки речовин класу агоністів/антагоністів нікотинових ацетилхолінових рецепторів. Метою цієї роботи було дослідити вплив інших речовин, що модулюють функціонування холінорецепторів, – неостигміну, гексаметонію, метиллікаконітину на LCC-канали ядерної мембрани нейронів Пуркіньє мозочка щурів. Вплив перелічених речовин оцінювали на основі змін таких біофізичних параметрів: амплітуди струму через канал, імовірності перебування каналу у відкритому стані, виникнення ефекту миготіння каналу. Іонні струми крізь поодинокі канали фіксували з використанням методу петч-клемп у конфігурації nucleus-attached у режимі фіксації потенціалу.*

*Серед досліджених у цій роботі речовин лише MLA і гексаметоній вплинули на функціонування LCC-каналів ядерної мембрани нейронів Пуркіньє мозочка. Гексаметоній у концентрації 2 ммоль/л зменшував Po LCC-каналів на 46 % відносно контролю. Під впливом MLA спостерігали незначний ефект миготіння каналу ("poisson surprise" становив 2,14 у контролі та 3,81 за дії 200 мкмоль/л MLA, відповідно). Достовірної зміни біофізичних характеристик функціонування LCC-каналів за дії неостигміну не виявлено. Незважаючи на незначний ступінь ефективності дії описаних у роботі речовин, відсутність характерного моделюючого впливу є вагомим аргументом на користь їх використання у медицині з огляду на їхній широкий терапевтичний потенціал. Варто зазначити, що встановлення фармакологічної чутливості LCC-каналів, незалежно від ступеня вираженості впливу речовини, є необхідним для комплексного аналізу закономірностей впливу цих речовин на молекулярну динаміку досліджуваних каналів. Отримані результати матимуть також важливе значення для пошуку та синтезу нових і більш ефективних інгібіторів LCC-каналів.*

**Ключові слова:** LCC-канали, неостигмін, гексаметоній, метиллікаконітин, ядерна мембрана.

**Вступ.** Ядерна оболонка містить широкий профіль транспортувальних систем, які забезпечують "перенесення" між цитоплазмою, нуклеоплазмою та перинуклеарним простором. Ядерно-поровий комплекс (далі ЯПК) наскрізно пронизує ядерну оболонку і забезпечує активний та пасивний нуклеоцитоплазматичний транспорт. ЯПК є високоселективним для макромолекул, але неселективним для іонів та метаболітів із  $M_r < 60$  кДа [12]. В обох ядерних мембранах щільно розміщені іонні канали різних типів із різною провідністю, з яких LCC-канали (Large conductance cation channels) є найбільш численними на одиницю площі поверхні серед спонтанно-активних іонних каналів [2]. Ці дані можуть свідчити про те, що така їх кількість обумовлена необхідністю реалізації важливих фізіологічних процесів, які відбуваються у клітині.

LCC-канали є потенціалзалежними іонними каналами з порівняно повільною кінетикою, вони селективні до одновалентних катіонів  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cs^+$  та непроники для двовалентних катіонів  $Ca^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$  і аніонів  $Cl^-$ . Мають високу провідність: у ядерних мембранах нейронів Пуркіньє мозочка  $198 \pm 27$  пСм, за позитивних значень потенціалів демонструють високу ймовірність перебування у відкритому стані [15]. Однак структура цих каналів, а також їх фізіологічна роль у клітині на сьогоднішній день залишаються невизначеними, саме тому ми поставили за мету пошук їх специфічного блокатора, як необхідного інструмента для реалізації поставлених задач.

Раніше було встановлено, що LCC-канали є чутливими до речовин із класу блокаторів і активаторів н-холінових рецепторів. Холінергічні рецептори відповідають за нервово-м'язову передачу сигналів і поділяються на два класи: мускаринові (M-холінорецептори) та нікотинові (N-холінорецептори) відповідно до їх специфічного активатора – мускарину та нікотину. Серед н-холінорецепторів розрізняють два підтипи: N1 та N2, периферичний/м'язовий та центральний/нейрональний рецептор, відповідно. Різний рівень їх експресії може визначати різні шляхи розвитку у головному мозку, впливаючи на міграцію клітин, ріст нейронів та сигнальні шляхи [6]. У ссавців було ідентифіковано 11 субодиниць н-холінорецепторів:  $\alpha 2$ – $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$ ,  $\beta 2$ – $\beta 4$ , хоча про функціональну

значущість багатьох із них на сьогоднішній день відомо мало [24]. Деякі з н-холіномодуляторів, зокрема тубокурарин, нікотин, броміди рокуронію та піпекуронію тощо ефективно інгібували LCC-канали [2, 10], але за відносно високих концентрацій (0,2–2 ммоль/л). Як продовження цих робіт ми обрали декілька наступних речовин для дослідження впливу на LCC-канали, а саме неостигмін (у формі фармакологічного препарату прозерину), гексаметоній та метиллікаконітин (MLA).

**Матеріали та методи.** Дослідження виконано на ядрах нейронів Пуркіньє мозочка 3–4-тижневих щурів лінії Wistar відповідно до положень Європейської конвенції із захисту тварин, яких використовують у експериментах (Страсбург, 1986), а також положень Комітету з біоетики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України. У роботі був застосований електрофізіологічний метод дослідження поодиноких каналів patch-clamp у конфігурації "nucleus-attached" у режимі фіксації потенціалу, мікроелектроди виготовляли з боросилікатного скла ("Sutter Instruments", США), використовуючи вертикальний пуллер, та заповнювали охолодженим розчином такого складу (ммоль/л): KCl – 150; NEPES – 8; NEPES-калієва сіль – 12; EGTA – 1 (pH 7,2) – далі робочий розчин KCl.

Петч-піпетки виготовляли двоетапно з боросилікатних заготовок. На першому етапі за вищої температури (81,6°C) трубочку-заготовку розтягували на центральному відрізку з використанням обмежувача для утворення звуженої ділянки – "шийки". На другому етапі за температури 62–65 °C (залежно від температури навколишнього середовища) після розриву заготовки формувалися дві однакові петч-піпетки з опором 8–14 МОм.

Зрізи мозочка завтовшки приблизно 400 мкм виготовляли вручну на кріо-столику та перенесли в охолоджені розчин такого складу (ммоль/л): калію глюконат – 150; NEPES – 10; NEPES-калієва сіль – 10 (pH 7,2), а також суміш інгібіторів протеаз (cOMplete Protease Inhibitor Cocktail tablets, "Roche", Німеччина) – 1,6 мг/мл, після чого заморожували у пробірках типу Eppendorf за -20 °C. Ядра центральних нейронів ізолювали шляхом механічної гомогенізації розмороженого зразка тканини мозочка шприцем із

затупленою металевією голкою діаметром 0,7 мм. Після процедури гомогенізації зразок осаджували центрифугуванням протягом 5 хв за  $g=2000$  ( $4^{\circ}\text{C}$ ; miniSpin "EppendorfAG", Німеччина). Після осадження супернатант замінювали на робочий розчин KCl. Вміст пробірки з розчином ресуспендували, після чого додавали приблизно 30 мкл зразка у робочу камеру об'ємом 200 мкл, попередньо заповнену робочим розчином KCl. Ядрам необхідно 4-7 хв для того, щоб осісти на дно камери, після чого її промивали охолодженим розчином KCl, щоб позбутися залишків клітин.

Ядра нейронів Пуркінє відрізняються більшим розміром порівняно з ядрами інших нейронів та відсутністю другого ядрця порівняно з ядрами клітин Беца. Методика дозволяє швидко ізолювати інтактні ядра, придатні для проведення електрофізіологічних досліджень із використанням методу *patch-clamp* [15]. Діючі речовини вносили у камеру проточною аплікацією.

Статистично-математичне опрацювання результатів досліджень здійснювали за допомогою програмного забезпечення Clampfit 10.7 та Origin 9.1. Залежно від серії експериментів оцінювали дозозалежність впливу речовини і/або залежність її ефекту від потенціалу. Основними аналізованими біофізичними характеристиками були: амплітуда струму крізь канал, імовірність його перебування у відкритому стані ( $P_o$ ) та виникнення ефекту миготіння каналу. Статистичні результати представлено у вигляді  $M \pm m$ , де  $M$  – середнє,  $m$  – стандартна похибка середнього. Вірогідність різниці оцінювали на основі t-критерію Стьюдента (\* –  $P \leq 0,05$ , \*\* –  $P \leq 0,01$ , \*\*\* –  $P \leq 0,001$ ).

**Результати та їх обговорення.** Базуючись на попередніх даних стосовно фармакологічної чутливості LCC-каналів до речовин із класу n-ацетилхолінових модуляторів, ми продовжили дослідження впливу речовин цього класу на функціонування LCC-каналів. Характер впливу сполук, а також їх ефективність є необхідною

умовою розробки системних підходів для розуміння механізмів та закономірностей дії цих речовин на активність каналів у межах одного класу речовин. Усі обрані сполуки різною мірою знайшли терапевтичне застосування, тому встановлення будь-яких фізіологічних змін під їх впливом становить інтерес із позиції перегляду потенціалу їх подальшого використання.

Першою з досліджуваних у цій роботі речовин став неостигмін. Неостигмін (прозерин,  $M_r=223,296$ )  $C_{12}H_{19}N_2O_2$  – четвертинна амонієва сполука, парасимпатоміметик, інгібітор ацетилхолінерастери, спрощений аналог фізостигміну з більшою ефективністю дії [20]. Холінерастери – група ферментів, які гідролізують нейромедіатор ацетилхолін, попереджуючи подальшу передачу нервового імпульсу. Інгібітори холінерастери пролонгують ефект дії ацетилхоліну, призводячи до гіперстимуляції рецепторів, а також надмірного накопичення нейротрансмітера у синапсах [7]. Неостигмін впливає на обидва класи холінергічних рецепторів, але через особливості хімічної структури не проходить гематоенцефалічний бар'єр. Активно використовується у медицині для поліпшення м'язового тонуусу людей з міастенією [9, 26], лікування глаукоми, псевдообструкції кишечника, у післяопераційному періоді з метою припинення нервово-м'язової блокади, викликані міорелаксантами [9, 13, 26], а також як протидія деяким зміїним отрутам [14, 20]. Має вплив як на нервово-м'язові синапси, так і на синапси вегетативної нервової системи, що нерідко призводить до побічних ефектів [9, 13].

Під впливом неостигміну не зареєстровано ані зміни амплітуди струму крізь канали, ані їх миготіння ( $n=4$ ). Як видно з амплітудних діаграм до однієї з отриманих реєстрацій, спостерігали лише тенденцію до зменшення  $P_o$  за всіх значень прикладеного потенціалу, але достовірної зміни не зареєстровано (рис. 1).

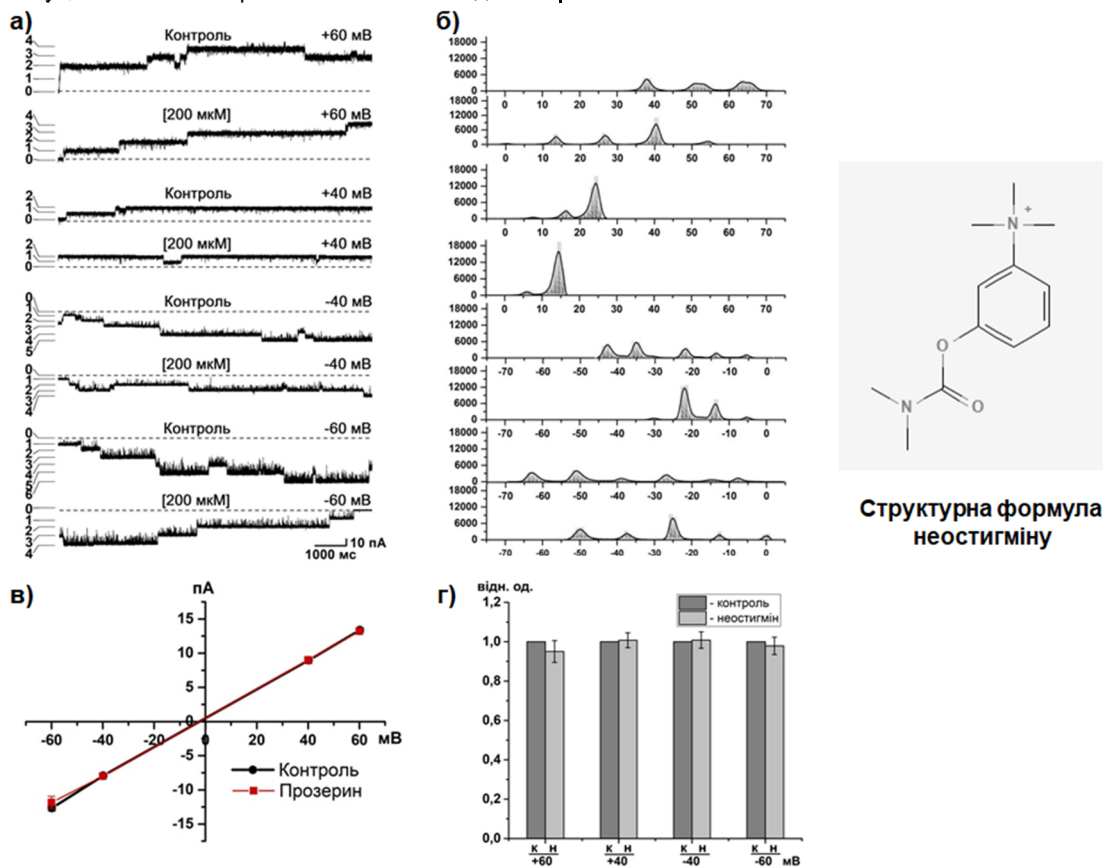


Рис. 1. Типові реєстрації струму крізь LCC-канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє за аплікації неостигміну у концентрації 200 мкмоль/л (а) і його амплітудні діаграми (б); вольт-амперна характеристика (в) та амплітуда струму крізь LCC-канали (г) за дії неостигміну

Раніше нами показано, що гексаметоній не змінював амплітуду струму крізь LCC-канали ядерної мембрани кардіоміоцитів [2]. Продовжуючи вивчення впливу цієї речовини, ми оцінили її вплив на інші біофізичні параметри, такі як  $P_o$  та ефект миготіння каналу.

Гексаметоній (гексану дибензолсульфонат,  $M_r=202,39$ )  $C_{12}H_{30}N_2$  – це четвертинна амонієва сполука, антагоніст нікотинових ацетилхолінових рецепторів [26]. Блокує передачу сигналу в автономних гангліях та нервово-м'язовому синапсі шляхом блокування іонних каналів, асоційованих із ацетилхоліновим рецептором [3]. Основний ефект полягає у блокуванні синаптичної передачі нікотинових рецепторів на постгангліонарних вегетативних нейронах [18]. До того ж відомо, що гексаметоній здатен дозозалежно блокувати калієві канали саркоплазматичного ретикулуму [8]. Він використовувався для терапевтичного лікування важких випадків гіпертензії, але через

широкий спектр дії, включаючи блокування симпатичної та парасимпатичної систем, пізніше був замінений більш специфічними аналогами [16]. Більшість побічних ефектів були безпосередньо пов'язані з гангліоблокуючою дією препарату та призводили до зниження артеріального тиску. Деякі пацієнти під час терапії гексаметонієм скаржилися на труднощі у процесі читання [21, 23]. Сьогодні широко використовується як інструмент у наукових дослідженнях [16].

Гексаметоній у концентрації 0,05-2 ммоль/л не змінював амплітуду струму крізь канал, ефекту миготіння також не виникало ( $n=5$ ). Імовірність перебування у відкритому стані за концентрації 2 ммоль/л достовірно зменшилась на 46 % ( $P \leq 0,01$ ), тоді як у менших концентраціях достовірних змін виявлено не було (рис. 2).

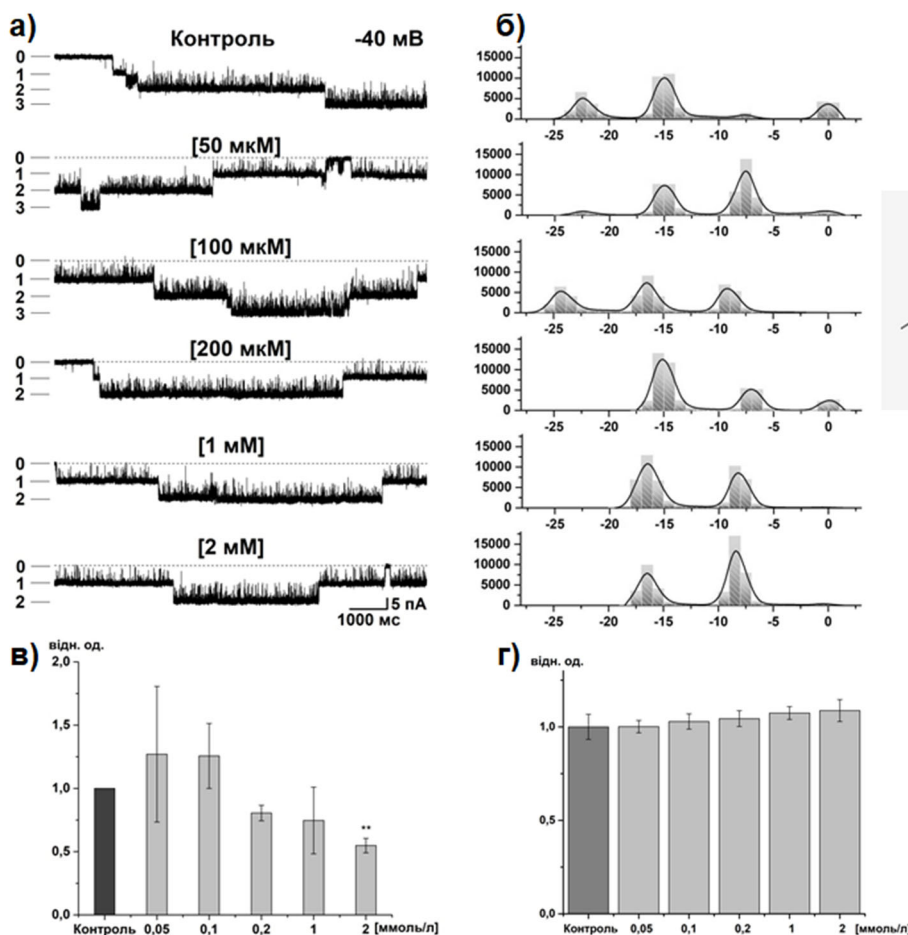


Рис. 2. Репрезентативні фрагменти реєстрацій струму крізь LCC-канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє в контролі та після аплікації гексаметонію в різних концентраціях за потенціалу -40 мВ (а) та його амплітудні діаграми (б); зміна параметра  $P_o$  (\*\* –  $P \leq 0,01$ ) (в) за дії речовини 0,05-2 ммоль/л та її вплив на амплітуду струму крізь канал (г)

У наступній серії експериментів продовжували досліджувати вплив MLA на функціонування LCC-каналів ядерної мембрани [1].

MLA (метиллікаконітин,  $M_r=682,811$ )  $C_{37}H_{50}N_2O_{10}$  – знайдений у рослинах дельфінію (рід *Delphinium*) погано розчинний у воді дитерпеноїдний алкалоїд [4, 19]. Є селективним літиком  $\alpha 7$ - [5] та  $\alpha 3$ -субодиниць н-холінорецепторів із приблизною афінністю 1 нМ та 20-40 нМ, відповідно [24], діє як потенційний антагоніст альфа-бунгаротоксину [5]. Блокує АТФ-керовані струми з більшою ефективністю, але меншою селективністю по-

рівняно з деякими іншими речовинами із класу блокаторів н-холінових рецепторів [11]. У електрофізіологічних експериментах, імітуючих умови *in vivo*, було зареєстровано значне посилення відповіді  $\alpha 7$ -н-холінорецепторів при введенні пікомолярних концентрацій MLA. Під час досліджень із використанням методу мікродіалізу було встановлено властивість речовини впливати на відтік глутамату з гіпокампу, що, у свою чергу, корелює із процесами пам'яті. Цей факт підкреслює потенціал використання MLA для поліпшення когнітивного сприйняття при неврологічних та психічних розладах [25]. Фармакологі-

чна дія MLA аналогічна курареподібним речовинам: блокує синаптичну передачу у вегетативних гангліях, нікотинних синапсах ЦНС та скелетних нервово-м'язових синапсах [17, 19]. Також метиллікаконітин здатний знижувати залежність організму від нікотину та каннабіноїдів, але питання про його терапевтичне застосування все ще залишається відкритим через суперечливі дані щодо його токсичності [22]. Володіє інсектицидною дією проти деяких комах [19]. Нітроген та С<sub>18</sub> Оксиген у молекулі MLA є визначальними для її розпізнавання ацетилхоліновими рецепторами [17].

Додавання MLA (50–500 мкмоль/л) до середовища супроводжувалося виникненням слабкого ефекту миготіння каналу. Зокрема, у контролі середня кількість подій в одній пачці спрацьовувань (burst) становить 4, а ефект "poisson surprise" 2,14. Аналогічні показники за дії MLA у концентрації 200 мкмоль/л становили 4 та 3,81, відповідно. У досліджуваних концентраціях MLA не впливав на амплітуду струму кризь досліджувані канали. Виявлено тенденцію до зменшення P<sub>o</sub>, але через низьку вибірку з повною концентраційною залежністю (n=1) не можемо стверджувати про статистичну достовірність цього ефекту (рис. 3).

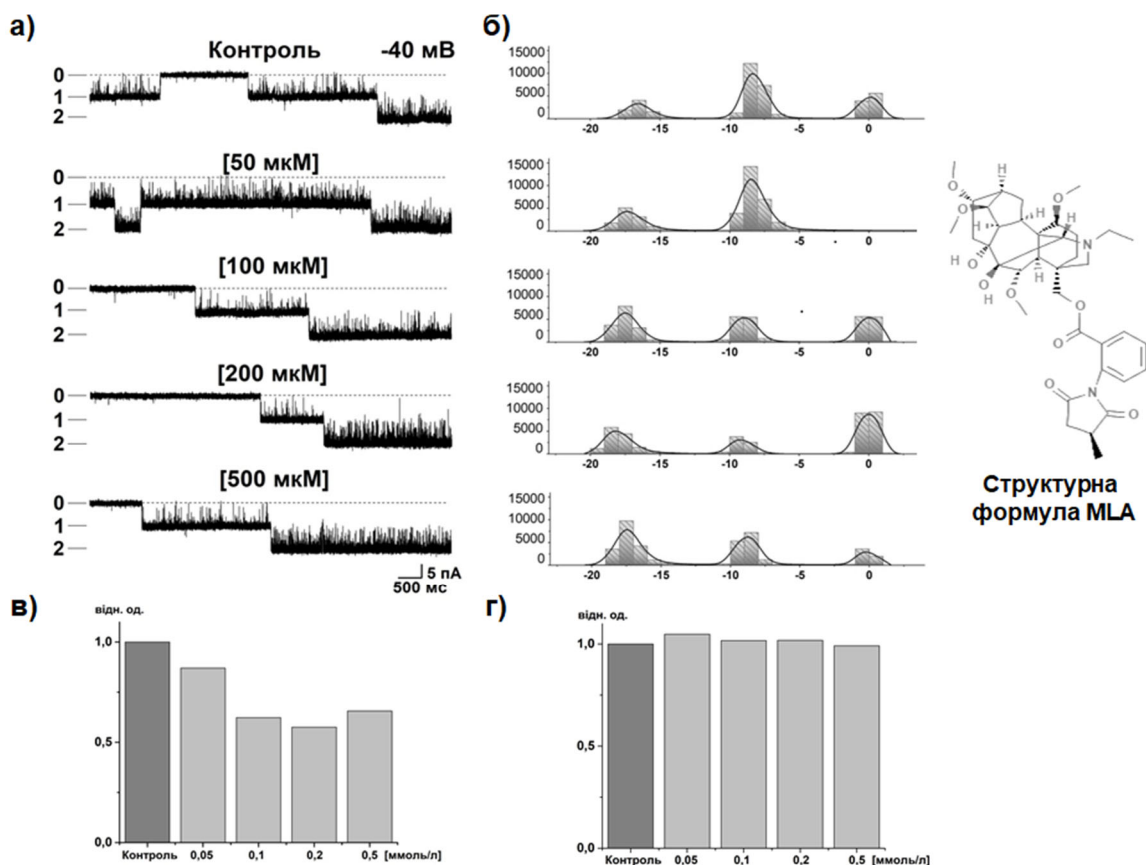


Рис. 3. Оригінальні реєстрації струму кризь LCC-канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє за аплікації MLA (а) та його амплітудні діаграми (б); концентраційно-залежна (0,05-0,5 ммоль/л) зміна показника P<sub>o</sub> (в) та вплив MLA на амплітуду K<sup>+</sup>-струму кризь канал (г)

Таким чином, серед досліджуваних нами речовин лише MLA і гексаметоній вплинули на функціонування LCC-каналів ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка. Гексаметоній у концентрації 2 ммоль/л зменшував P<sub>o</sub> LCC-каналів на 46 % відносно контролю. Під впливом MLA спостерігали незначний ефект миготіння каналу ("poisson surprise" становив 2,14 у контролі та 3,81 за дії 200 мкмоль/л речовини). Достовірної зміни біофізичних характеристик функціонування LCC-каналів за дії неостигміну не виявлено. Незважаючи на незначний ступінь ефективності дії описаних у роботі речовин відсутність характерного моделюючого впливу є вагомим аргументом на користь їх використання у медицині з огляду на їхній широкий терапевтичний потенціал. Варто зазначити, що встановлення фармакологічної чутливості LCC-каналів до речовин із класу регуляторів н-ацетилхолінових рецепторів, незалежно від ступеню вираженості їх впливу, є необхідним для комплексного аналізу закономірностей впливу цих

речовин на молекулярну динаміку досліджуваних каналів. Отримані результати матимуть також важливе значення для пошуку чи синтезу нових та більш ефективних інгібіторів LCC-каналів.

*Подяка. Дослідження виконано за часткової підтримки гранту на виконання проєктів науково-дослідних робіт (НДР) молодих учених НАН України (2021–2022 рр.) (конкурсний проєкт "Фармакологічна чутливість та експресія катіонних каналів великої провідності у ядрах клітин різного типу"); номер держреєстрації 0121U112012.*

#### Список використаних джерел

1. Вплив деяких анестетиків та природних отрут на функціонування LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів та нейронів Пуркінє мозочка / О. Котик, А. Котлярова, О. Ісаєва та ін. // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка: Біологія. – 2019. – Т. 3, № 79.
2. Функціонування катіонних каналів великої провідності ядерної мембрани під впливом модуляторів нікотинних холінорецепторів / А. Котлярова, О. Котик, І. Юришинець, С. Марченко // Фізіологічний журнал. – 2019. – Т. 65, № 6.

3. Adams D. Modes of hexamethonium action on acetylcholine receptor channels in frog skeletal muscle / D. Adams, S. Bevan, D. Terrar // *Br. J. Pharmacol.* – 1991. – Vol. 102, № 1. – P. 135-145.
4. The principal toxin of Delphinium brownii Rydb., and its mode of action / V. Aiyar, M. Benn, T. Hanna et al. // *Experientia.* – 1979. – T. 35, № 10. – P. 1367-1368.
5. Human alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor responses to novel ligands / C. Briggs, D. McKenna, M. Piattoni-Kaplan et al. // *Neuropharmacology.* – 1995. – Vol. 34, № 6. – P. 583-590.
6. Carlson A. Physiology, Cholinergic Receptors [Electronic resource] / A. Carlson, G. Kraus // *StatPearls.* – Access mode: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30252390/>
7. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology / M. Colovic, D. Krstic, T. Lazarevic-Pasti et al. // *Current Neuropharmacology.* – 2013. – Vol. 11, № 3. – P. 315-335.
8. Coronado R. Decamethonium and hexamethonium block K<sup>+</sup> channels of sarcoplasmic reticulum / R. Coronado, C. Miller // *Nature.* – 1980. – Vol. 288, № 5790. – P. 495-497.
9. Kleinz M. The pharmacology of the autonomic nervous system / M. Kleinz, I. Spence // *Small Animal Clinical Pharmacology.* – 2008. – P. 59-82.
10. Effects of Blockers of Large-Conductance Cation Channels of the Nuclear Membrane / O. Kotyk, A. Kotlyarova, N. Pavlova et al. // *Neurophysiology.* – 2017. – Vol. 49, № 2. – P. 151-153.
11. Methyllycaconitine,  $\alpha$ -bungarotoxin and (+)-tubocurarine block fast ATP-gated currents in rat dorsal root ganglion cells / U. Lalo, Y. Pankratov, O. Krishtal et al. // *British Journal of Pharmacology.* – 2004. – Vol. 142, № 8. – P. 1227-1232.
12. Lange A. Nuclear Pores and Nuclear Import/Export / A. Lange, A. Corbett // *Encyclopedia of Biological Chemistry.* – 2013. – P. 318-323.
13. Liu J. Neostigmine / J. Liu // *Reference Module in Biomedical Sciences.* – 2017.
14. Reevaluation and update on efficacy and safety of neostigmine for reversal of neuromuscular blockade / J. Luo, S. Chen, S. Min et al. // *Therapeutics and Clinical Risk Management.* – 2018. – Vol. 14. – P. 2397-2406.
15. Spontaneously active and InsP<sub>3</sub>-activated ion channels in cell nuclei from rat cerebellar Purkinje and granule neurons / S. Marchenko, V. Yarotsky, T. Kovalenko et al. // *J Physiol.* – 2005. – Vol. 565, № 3. – P. 897-910.
16. Tagliatalata M. Hexamethonium [Electronic resource] / M. Tagliatalata, E. Panza // *Reference Module in Biomedical Sciences.* – 2018. – Access mode: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128012383973124>
17. Larkspur poisoning: toxicology and alkaloid structure-activity relationships / K. Panter, G. Manners, B. Stegelmeier et al. // *Biochemical Systematics and Ecology.* – 2002. – Vol. 30, № 2. – C. 113-128.
18. Hexamethonium [Electronic resource] // *PubChem Substance and Compound databases.* – Access mode: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3604>
19. Methyllycaconitine Perchlorate, Delphinium sp. [Electronic resource] // *PubChem Substance and Compound databases.* – Access mode: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/494471>
20. Neostigmine. [Electronic resource] // *PubChem Substance and Compound databases.* – Access mode: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Neostigmine#section=Computed-Descriptors>
21. Smith K. Hypertension and its Control by Hexamethonium / K. Smith, P. Fowler, V. Edmunds // *BMJ.* – 1954. – Vol. 2, № 4899. – P. 1243-1250.
22. Nicotinic  $\alpha$  7 Receptors as a New Target for Treatment of Cannabis Abuse / M. Solinas, M. Scherma, L. Fattore et al. // *Journal of Neuroscience.* – 2007. – Vol. 27, № 21. – P. 5615-5620.
23. Stuppy L. Hexamethonium and hydralazine hydrochloride for treatment of hypertension / L. Stuppy // *Calif Med.* – 1954. – Vol. 80, № 3. – P. 189-91.
24. Tucci S. Methyllycaconitine (MLA) blocks the nicotine evoked angiogenic effect and 5-HT release in the dorsal hippocampus: possible role of  $\alpha$ 7 receptors / S. Tucci, R. Genn, S. File // *Neuropharmacology.* – 2003. – Vol. 44, № 3. – P. 367-373.
25. Antagonizing  $\alpha$ 7 nicotinic receptors with methyllycaconitine (MLA) potentiates receptor activity and memory acquisition / N. Van Goethem, D. Paes, D. Puzzo et al. // *Cellular Signalling.* – 2019. – Vol. 62.
26. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018 / D. Wishart, Y. Feunang, A. Guo et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2018. – Vol. 46, № D1. – P. D1074-D1082.
3. Adams D.J., Bevan S., Terrar D.A. Modes of hexamethonium action on acetylcholine receptor channels in frog skeletal muscle // *Br J Pharmacol.* 1991; 102(1):135-145. Available from: doi:10.1111/j.1476-5381.1991.tb12144.x.
4. Aiyar V. N., Benn M. H., Hanna T., Jacyno J., Roth S. H., Wilkens J. L. The principal toxin of Delphinium brownii Rydb., and its mode of action // *Experientia.* 1979; 35(10): 1367-1368. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF01964013>.
5. Briggs C. A., McKenna D. G., Piattoni-Kaplan M. Human alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor responses to novel ligands // *Neuropharmacology.* 1995; 34(6): 583–590. Available from: [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(95\)00028-5](https://doi.org/10.1016/0028-3908(95)00028-5).
6. Carlson A. and Kraus G. Physiology, Cholinergic Receptors // In: *StatPearls* [Internet]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30252390/>.
7. Colovic M., Krstic D., Lazarevic-Pasti T., Bondzic A. and Vasic V. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology // *Current Neuropharmacology.* 2013; 11(3): 315-335.
8. Coronado R., Miller C. Decamethonium and hexamethonium block K<sup>+</sup> channels of sarcoplasmic reticulum // *Nature.* 1980; 288(5790):495-497. Available from: doi:10.1038/288495a0.
9. Kleinz M. The pharmacology of the autonomic nervous system // *Small Animal Clinical Pharmacology.* 2008; 59-82.
10. Kotyk O., Kotlyarova A., Pavlova N. and Marchenko S. Effects of Blockers of Large-Conductance Cation Channels of the Nuclear Membrane // *Neurophysiology.* 2017; 49(2):151-153.
11. Lalo U., Pankratov Y., Krishtal O., Alan North R. Methyllycaconitine,  $\alpha$ -bungarotoxin and (+)-tubocurarine block fast ATP-gated currents in rat dorsal root ganglion cells // *British Journal of Pharmacology.* 2004; 142(8): 1227-1232. Available from: doi:10.1038/sj.bjp.0705878.
12. Lange A. and Corbett A. H. Nuclear Pores and Nuclear Import/Export // *Encyclopedia of Biological Chemistry.* 2013; 318–323. Available from: doi:10.1016/b978-0-12-378630-2.00437-0.
13. Liu J. Neostigmine // *Reference Module in Biomedical Sciences.* 2017.
14. Luo J., Chen S., Min S. and Peng L. Reevaluation and update on efficacy and safety of neostigmine for reversal of neuromuscular blockade // *Therapeutics and Clinical Risk Management.* 2018; (14): 2397-2406.
15. Marchenko S., Yarotsky V., Kovalenko T., Kostyuk P., Thomas R. Spontaneously active and InsP<sub>3</sub>-activated ion channels in cell nuclei from rat cerebellar Purkinje and granule neurons // *J Physiol.* 2005; Jun;565(3):897-910.
16. Tagliatalata M. and Panza E. Hexamethonium // *Reference Module in Biomedical Sciences.* 2018. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128012383973124>.
17. Panter K. E., Manners G. D., Stegelmeier B. L., Lee S., Gardner D. R., Ralphs M. H., Pfister J. A. and James L. F. Larkspur poisoning: toxicology and alkaloid structure-activity relationships // *Biochemical Systematics and Ecology.* 2002; 30(2): 113–128. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(01\)00123-5](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(01)00123-5).
18. Hexamethonium // *PubChem Substance and Compound databases.* Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3604>.
19. Methyllycaconitine Perchlorate, Delphinium sp. // *PubChem Substance and Compound databases.* Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/494471>.
20. Neostigmine. // *PubChem Substance and Compound databases.* Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Neostigmine#section=Computed-Descriptors>.
21. Smith K., Fowler P. and Edmunds V. Hypertension and its Control by Hexamethonium // *BMJ.* 1954; 2(4899): 243-1250.
22. Solinas M., Scherma M., Fattore L., Stroik J., Wertheim C., Tanda G. et al. Nicotinic  $\alpha$  7 Receptors as a New Target for Treatment of Cannabis Abuse // *Journal of Neuroscience.* 2007; 27(21): 5615-5620.
23. Stuppy L. Hexamethonium and hydralazine hydrochloride for treatment of hypertension // *Calif Med.* 1954; 80(3):189-91.
24. Tucci S., Genn R. and File S. Methyllycaconitine (MLA) blocks the nicotine evoked angiogenic effect and 5-HT release in the dorsal hippocampus: possible role of  $\alpha$ 7 receptors // *Neuropharmacology.* 2003; 44(3): 367-373.
25. Van Goethem N., Paes D., Puzzo D., Fedele E., Rebosio C., Gulisano V. et al. Antagonizing  $\alpha$ 7 nicotinic receptors with methyllycaconitine (MLA) potentiates receptor activity and memory acquisition // *Cellular Signalling.* 2019; 62:109338.
26. Wishart D.S., Feunang Y.D., Guo A.C., et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018 // *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D1074-D1082. Available from: doi:10.1093/nar/gkx1037.

#### Reference (Scopus):

1. O. Kotyk, A. Kotlyarova, O. Isaieva et al. Pplyv deiaktykh anestetikyv ta pryrodnykh otrut na funkcionuvannia LCC-kanaliv yadernoi membrany kardiomyocytiv ta neuroniv Purkinie mozochka // *Visnyk Kyivskoho natsionalnoho universytetu imeni Tarasa Shevchenka: Biologiya.* – 2019. – T. 3, № 79. Ukrainian.
2. A. Kotlyarova, O. Kotyk, I. Yuryshynets et al. Funkcionuvannia kationnykh kanaliv velykoi providnosti yadernoi membrany pid vplyvom modulatoriv nikotyynykh kholinoretseptoriv // *Fiziol. zhurn.* – 2019. – T. 65, № 6. Ukrainian.

Надійшла до редколегії 14.09.2021  
Отримано виправлений варіант 14.10.2021  
Підписано до друку 14.10.2021

Received in the editorial 14.09.2021  
Received version on 14.10.2021  
Signed in the press on 14.10.2021

<sup>1,2</sup> Б.-М. Брянцева, студ.,

<sup>1,2</sup> О. Тарнопольская, студ.,

<sup>1</sup> Е. Котик, канд. биол. наук,

<sup>1</sup> А. Котлярова, канд. биол. наук

<sup>1</sup> Институт физиологии имени О. О. Богомольца НАН Украины, Киев, Украина,

<sup>2</sup> Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

### ВЛИЯНИЕ НЕОСТИГМИНА, ГЕКСАМЕТОНИЯ И МЕТИЛЛИКАКОНИТИНА НА ВЫСОКОПРОВОДИМЫЕ КАТИОННЫЕ КАНАЛЫ ЯДЕРНОЙ МЕМБРАНЫ НЕЙРОНОВ ПУРКИНЬЕ МОЗЖЕЧКА КРЫС

Высокопроводящие катионные каналы (LCC-каналы), найденные в обеих ядерных мембранах нейронов Пуркинье мозжечка, являются наиболее распространенным типом спонтанно-активных ионных каналов среди других идентифицированных. Их структура и физиологические функции на сегодняшний день остаются неизвестными, но результаты предварительных работ подтвердили их чувствительность к ряду веществ класса агонистов/антагонистов никотиновых ацетилхолиновых рецепторов. Целью этой работы было исследовать влияние других веществ, модулирующих функционирование холинорецепторов, – неостигмина, гексаметония, метилликаконитина на LCC-каналы ядерной мембраны нейронов Пуркинье мозжечка крыс. Влияние перечисленных веществ оценивали на основе изменений таких биофизических параметров: амплитуды тока, вероятности нахождения канала в открытом состоянии, возникновения эффекта мерцания канала. Ионные токи через одиночные каналы фиксировали с использованием метода пэтч-клемп в конфигурации *patch-clamp* в режиме фиксации потенциала. Среди исследуемых веществ только MLA и гексаметоний повлияли на функционирование LCC-каналов ядерной мембраны нейронов Пуркинье мозжечка. Гексаметоний в концентрации 2 ммоль/л уменьшал  $P_o$  LCC-каналов на 46 % относительно контроля. Под влиянием MLA наблюдали незначительный эффект мерцания канала (*Poisson surprise* составил 2,14 в контроле и 3,81 при действии 200 мкмоль/л MLA, соответственно). Достоверного изменения биофизических характеристик функционирования LCC-каналов при действии неостигмина обнаружено не было. Несмотря на низкую степень эффективности действия описанных в работе веществ отсутствие характерного модулирующего воздействия является весомым аргументом в пользу их использования в медицине, учитывая их широкий терапевтический потенциал. Следует отметить, что установление фармакологической чувствительности LCC-каналов, независимо от степени выраженности воздействия вещества, необходимо для комплексного анализа закономерностей воздействия этих веществ на молекулярную динамику исследуемых каналов. Полученные результаты также имеют важное значение для поиска или синтеза новых и более эффективных ингибиторов LCC-каналов.

Ключевые слова: LCC-каналы, неостигмин, гексаметоний, метилликаконитин, ядерная мембрана.

<sup>1,2</sup> B.-M. Briantseva, stud.,

<sup>1,2</sup> O. Tarnopolska, stud.,

<sup>1</sup> O. Kotyk, PhD,

<sup>1</sup> A. Kotliarova, PhD

<sup>1</sup> Bogomolets Institute of Physiology NASU, Kyiv, Ukraine,

<sup>2</sup> Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

### THE EFFECT OF NEOSTIGMINE, HEXAMETHONIUM AND METHYLLYCACONITINE ON LARGE-CONDUCTANCE CATION CHANNELS IN THE NUCLEAR MEMBRANE OF CEREBELLAR PURKINJE NEURONS OF RATS

Large-conductance cation channels (LCC-channels) were found in both (inner and outer) nuclear membranes of cerebellar Purkinje neurons. They are the most common type of intracellular spontaneously active ion channels among other identified. Their structure and physiological functions are still unknown, but the previous findings confirmed their sensitivity to a number of agonists/antagonists of nicotinic acetylcholine receptors. The purpose of the investigation was to estimate the effect of other regulators of the N-cholinoreceptors functioning – neostigmine, hexamethonium, and methyllycaconitine (MLA) on the LCC-channels in the nuclear membrane of cerebellar Purkinje neurons of rats. The effect of the agents was estimated based on changes in the following biophysical parameters: current amplitude,  $P_o$ , channel flickering effect. Ion currents through single channels were registered using the patch-clamp technique in a nucleus-attached mode in voltage-clamp configuration.

Among the studied substances, only MLA and hexamethonium influenced the LCC-channels functioning. Hexamethonium at a concentration of 2 mM reduced the  $P_o$  of the LCC-channels by 46%. Under the influence of MLA, a slight effect of channel flickering was observed ("Poisson surprise" was 2.14 in the control and 3.81 under the influence of 200  $\mu$ M of the substance respectively). No significant change of the biophysical characteristics of the LCC-channels under the influence of neostigmine was detected. Despite the low efficiency as LCC-channels blockers, the lack or only slight effect is a strong argument in favor of the substance usage in medicine due to their wide therapeutic potential. The severity of their effects is necessary for a comprehensive analysis of the effect patterns of the abovementioned substances on the molecular dynamics of the studied channels. The results will also be important for the identification or synthesis of new and more effective inhibitors of the LCC-channels.

Keywords: LCC-channels, neostigmine, hexamethonium, methyllycaconitine, nuclear membrane.