



УДК 577.352:612.822.33

© 2010

Н. С. Петренко, О. П. Максимюк, О. О. Палигін, О. А. Голуб,
академік НАН України О. О. Кришталь

Фулерени: новітні модулятори калієвих каналів нейронів ЦНС

Досліджено ефекти фулерену C_{60} на нейноральну збудливість, а саме вплив наноконкомпозиту фулерену C_{60} на активність потенціалкерованих натрієвих та калієвих каналів зони CA1 гіпокампа щурів. Аплікація 0,1 мг/мл наноконкомпозиту протягом 15 хв зворотньо інгібувала амплітуду сумарного потенціалкерованого калієвого струму, що було спричинене інгібуванням струму $I(A)$ -типу, тоді як струм $I(DR)$ -типу був практично не чутливим до цієї сполуки. На противагу потенціалкерованому калієвому струму, натрієвий струм не реагував на наноконкомпозит. Таким чином, наноконкомпозит фулерену C_{60} має різні ефекти на потенціалкеровані натрієві та калієві канали та змінює збудливість нейронів гіпокампа. Отже, фулерени можуть впливати на функціонування нервової системи, вірогідніше за все взаємодіючи з трансмембранними білками. Фулерени формують новий клас фармакологічно активних речовин, що є важливими для модуляції функцій нервової системи.

Останніми роками в наукових виданнях все частіше з'являються повідомлення про вплив наночастинок на живі організми та можливе їх застосування в медицині. Найперспективнішими наноматеріалами на сьогодні є нанотрубки та сферичні фулерени. Атоми вуглецю можуть компонуватися в різноманітні структурні композиції, утворюючи множину стабільних алотропних структур. Зокрема, такими є графіт, діамант та фулерен. Найбільш стабільною молекулою серед фулеренів є молекула C_{60} , що складається з 60 атомів вуглецю, із середнім діаметром 0,72 нм.

Незважаючи на велику кількість проведених досліджень із взаємодії карбонових наноструктур з біологічними об'єктами [1, 2], існує вражаюче мало даних стосовно впливу фулеренів та нанотрубок на електричну активність окремих нейронів та нейрональних мереж. Пошук по реферативних базах даних дав лише чотири посилання на роботи, що пов'язані з цією тематикою. У той самий час поодинокі дослідження вказують на можливість певних змін у розвитку нейрональних клітин, що культивуються на підкладках з карбонових нанотрубок [3, 4]. Є також дані, що за допомогою таких підкладок принципово можливо створювати синаптично зв'язані кластери нейронів довільної геометрії. Більше того, існує

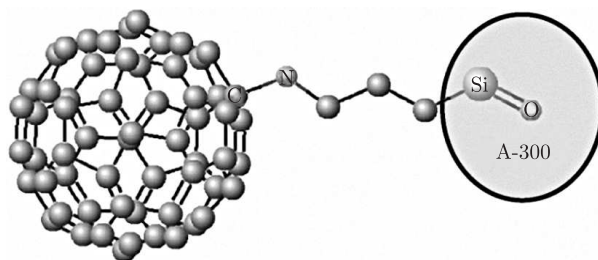


Рис. 1. Структура нанокompозиту фулерену C_{60}

можливість створення тривимірних нейрональних мереж, що в перспективі дозволить одержати найбільш адекватну модель нативних мозкових структур серед існуючих на сьогодні. Загальновідомо, що фулерени є акцепторами електронів, тобто виявляють властивості потужних антиоксидантів, проте дослідження їх впливу на білкові структури плазматичних мембран у нервових тканинах практично не проводились.

Групою вчених з Інституту технологій у Нью-Джерсі було досліджено вплив одностінних нанотрубок та фулерену C_{60} на струми через рекомбінантні калієві (KVS-1, KCNQ-1, Kv.4.4) та хлорні канали (ClC-3), що експресовані в лінії клітин CHO, і виявлено, що нанотрубки та фулерени певних діаметрів здатні пригнічувати струми через HERG калієві канали, які є дуже важливими каналними структурами серцевого м'яза. Наведені дані вказують на те, що фулерени можна використовувати як новий клас іонних блокаторів [5].

У той самий час досі абсолютно нічого не відомо про взаємодію фулеренів з нейрональними іонними каналами. Нами вперше досліджено вплив фулереновмісних сполук на потенціалкеровані нейрональні іонні канали, що забезпечують генерацію основного прояву електричної активності нейрональної клітини — потенціалу дії.

Синтез композитів фулерену з високодисперсних матеріалів на основі сполук силіцію проводили шляхом сорбції з толуольних розчинів з наступним промиванням толуолом у екстракторі Сокслета. З метою зменшення кількості побічних реакцій усі операції, пов'язані з фулереном, проводили в атмосфері аргону за методиками Шленка. Спрощену структурну формулу нанокompозиту зображено на рис. 1.

Ізольовані пірамідні нейрони CA1 зони гіпокампа щурів виділяли за загальноприйнятою методикою, що описана в роботі [6]. Нейрони ідентифікували візуально за їх характерною формою та залишками дендритного дерева. Дослідження впливу фулеренів на іонні провідності нейронів проводили в умовах фіксації потенціалу за методом patch clamp у конфігурації "ціла клітина". Сумарний калієвий струм викликали за допомогою деполяризації клітинної мембрани від підтримуваного потенціалу -100 мВ до потенціалу $+40$ мВ, а натрієвий — від підтримуваного потенціалу -100 мВ до потенціалу -20 мВ. Відокремлення повільної $I(DR)$ та швидкої $I(A)$ компонент калієвого струму здійснювали за експериментальними протоколами, що описані в [7]. В усіх випадках використовували зовнішньоклітинний розчин такого складу, ммоль/л: NaCl 130, KCl 5, CaCl₂ 2, MgCl₂ 10, HEPES 10. Для усунення впливу натрієвого струму у випадку вимірювання калієвих струмів до зовнішньоклітинного розчину додавали тетродотоксин у концентрації 300 нмоль/л. Внутрішньоклітинний розчин містив, ммоль/л: KF 90, KCl 30 (рН доведений до 7,2 за допомогою KOH) у випадку реєстрації калієвих струмів; або CsF 100, TrisCl 20, NaCl 20 (рН доведений до 7,2–7,3 за допомогою NaOH) — для натрієвих струмів. Нанокompозит фулерену C_{60} розчиняли в стандартному зовнішньоклітинному розчині до концентрації 0,1 мг/мл за допомогою

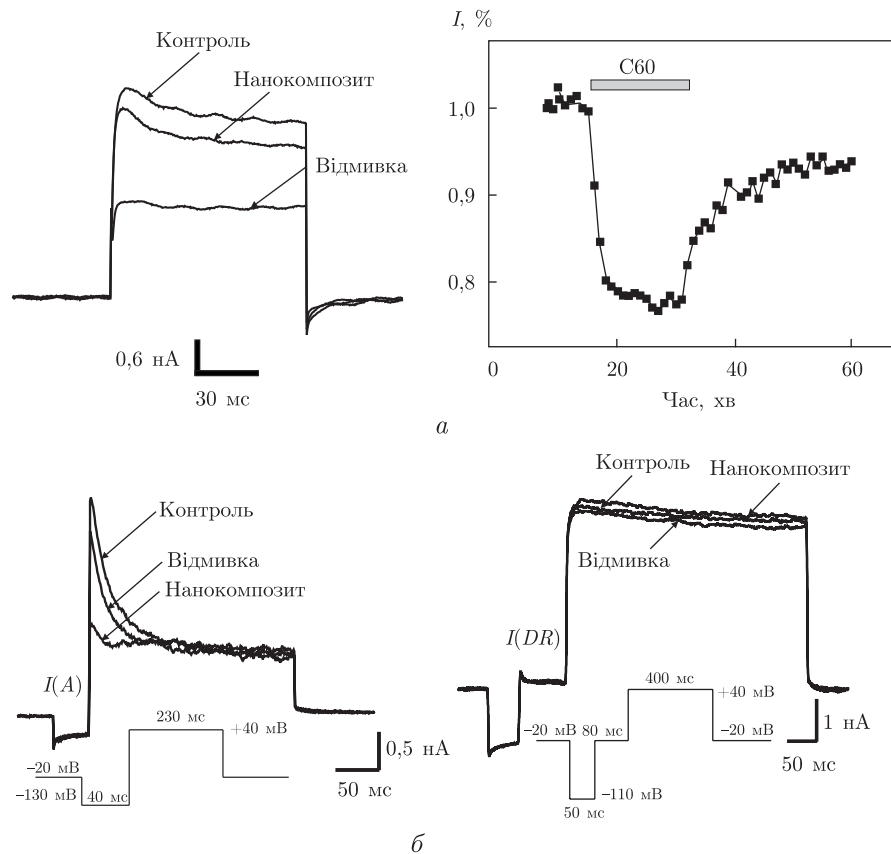


Рис. 2. Вплив наноккомпозиту фулерену C_{60} на потенціалкервані калієві канали: *a* — наноккомпозит C_{60} зворотно пригнічує активність калієвих каналів у нейронах гіпокампа щурів ($n = 10$); *б* — диференційний вплив наноккомпозиту на швидку ($I(A)$ -струм, $n = 5$) та повільну ($I(DR)$ -струм, $n = 5$) компоненти калієвого струму

лабораторного ультразвукового соніфікатора УЗДН-А. Отримані таким чином водні розчини наноккомпозиту зберігали стійкість протягом 6–8 год, що було цілком достатньо для проведення експериментів. Усі експерименти проводили при 21–23 °С.

У відповідь на деполяризацію досліджуваного нейрону від підтримуваного потенціалу -100 мВ до $+40$ мВ спостерігалися сумарні калієві струми амплітудою 1–5 нА (рис. 2, *a*). Аплікацію наноккомпозиту C_{60} та відмивку клітини від речовини проводили протягом 30 хв. Реєстрацію струму здійснювали щохвилини. Наноккомпозит фулерену C_{60} в концентрації 0,1 мг/мл спричиняв повільне ($\tau = (5,2 \pm 2)$ хв, $n = 10$) пригнічення амплітуди сумарного калієвого струму на $(65,90 \pm 8,1)\%$ ($n = 10$). Після вилучення наноккомпозиту з позаклітинного розчину відбулося повільне відновлення струму ($(86,0 \pm 2,5)\%$, $n = 10$) (див. рис. 2, *a*). На підставі наведених даних (див. рис. 2, *a*) можна зробити висновок, що наноккомпозит пригнічує активність швидкої компоненти сумарного калієвого струму. У нейронах гіпокампа сумарний калієвий струм можна розділити, використовуючи відповідні протоколи, на дві домінуючі компоненти: швидку, що обумовлена активацією А-струму, та повільну, що обумовлена активацією каналів затриманого випрямлення [6]. За контрольних умов калієві струми досягали стаціонарних значень протягом 5 хв. Одержані дані (див. рис. 2, *б*, 3, *a*) свідчать про пригнічувальний вплив фулерену на $I(A)$ -струм ($(50,91 \pm 6,1)\%$, $n = 5$). Після

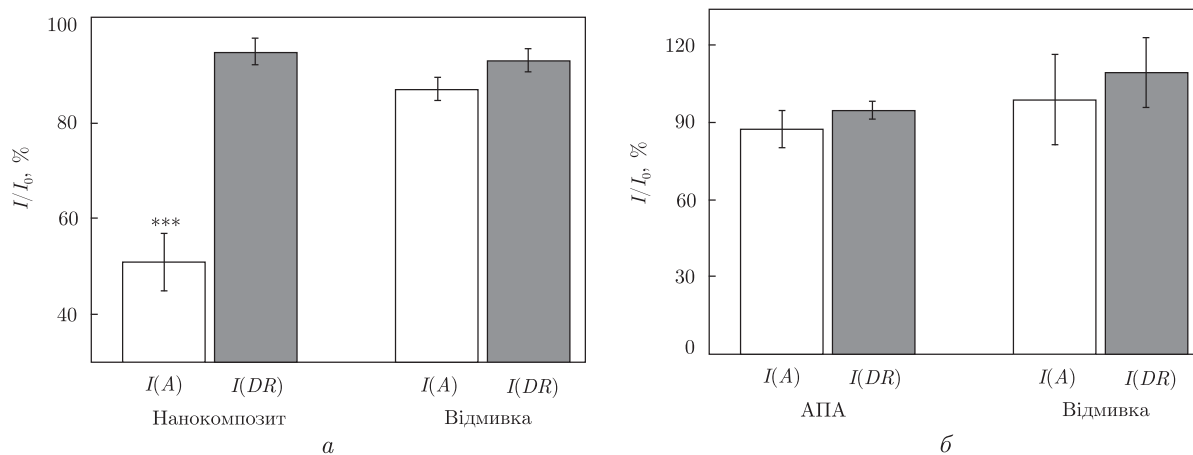


Рис. 3. Статистичний аналіз впливу наноккомпозиту фулерену C_{60} (а) та гідрофілізуючого залишку наноккомпозиту АПА (б) ($n = 7$) на основні підтипи потенціалкерованих калієвих каналів нейронів гіпокампа щурів

відмивання наноккомпозиту струм частково відновлювався ($(87,07 \pm 2,5)\%$, $n = 5$). У присутності тієї ж концентрації C_{60} та за таких самих умов пригнічення повільної компоненти калієвого струму $I(DR)$ не спостерігалось (див. рис. 2, б, 3, а).

Динаміка пригнічення та відновлення від дії наноккомпозиту була досить повільною, про що свідчать досить погані дифузійні характеристики фулереновмісних сполук. Треба зауважити, що в окремій групі клітин спостерігалось значно слабкіше пригнічення досліджуваних струмів. Імовірним поясненням цього може бути: а) клітини із незначним пригніченням мали більшу чи меншу частку окислених зв'язків у зовнішній частині каналу; б) гетерогенність експресованих каналів. На жаль, на даному етапі досліджень дуже складно точно визначити механізм взаємодії досліджуваних наноккомпозитів фулеренів з калієвими каналами. Існують дві робочі гіпотези: 1) пряма електростатична взаємодія із зарядженими амінокислотами пори каналу; 2) вплив на редокс-сайти каналного комплексу.

На наступному етапі було досліджено вплив наноккомпозиту C_{60} на потенціалкеровані натрієві струми клітин гіпокампа щурів. За контрольних умов натрієві струми, так само як і калієві, досягали стаціонарних значень протягом 5 хв. Аплікація наноккомпозиту в концентрації 0,1 мг/мл, на відміну від калієвих каналів, не спричиняла будь-яких помітних змін в амплітудних та кінетичних характеристиках струму через потенціалкеровані натрієві канали. Отже, наноккомпозит фулерену C_{60} діє селективно поміж двох основних провідностей, що формують потенціал дії.

Гідрофілізований наноккомпозит фулерену C_{60} складається з гідрофобних фулеренів C_{60} та гідрофільного амінопропілаеросильного залишку (АПА) (див. рис. 1). Таким чином, є ймовірність того, що пригнічення калієвих струмів наноккомпозитом може бути опосередковане не самим фулереном, а гідрофілізуючими залишками наноккомпозиту. Проведені нами дослідження переконливо доводять, що пригнічення викликано саме наявністю молекули C_{60} в наноккомпозиті, оскільки ні сам аеросил (А-300), ні АПА не справляли будь-якого статистично достовірного пригнічення калієвих струмів, у той час як наноккомпозит C_{60} призводив до вищевказаного пригнічення $I(A)$ -струму (див. рис. 3, б).

Таким чином, у результаті проведених досліджень встановлено, що наноккомпозити фулеренів можуть впливати на іонні канали нервових клітин. Зокрема, фулерени можуть

виконувати роль модуляторів струму типу $I(A)$ калієвих потенціалкерованих іонних каналів гіпокампа, абсолютно не впливаючи на потенціалкеровані натрієві та калієві $I(DR)$ канали. Однак отримані результати не дають можливості достовірно стверджувати, що зазначений наноккомпозит має специфічну дію на певні мембранні білкові структури. На сьогодні не можна виключити ймовірність того, що у високих концентраціях наноккомпозит може абсорбуватися клітинною мембраною та спричиняти цілий спектр неспецифічних ефектів, що потребує ретельного додаткового вивчення. Незважаючи на це, вплив наноккомпозиту в досить низьких концентраціях на електричну збудливість нервових клітин може стати надзвичайно важливим джерелом для генерації принципово нового типу регуляторів клітинної активності. Такі регулятори можуть бути використані для генерації препаратів тривалої дії проти великої кількості неврологічних розладів, що важко піддаються фармакологічному впливу. Проте застосування фулереновмісних сполук як нових лікарських препаратів повинно спиратися на серйозний аналіз можливих побічних реакцій, які на даний час практично не досліджувалися.

1. Smart S. K., Cassady A. I., Lu G. Q., Martin D. J. The biocompatibility of carbon nanotubes // Carbon. – 2006. – **44**, No 6. – P. 1034–1047.
2. Malarkey E. B., Parpura V. Applications of carbon nanotubes in neurobiology // Neurodegener Dis. – 2007. – **4**, No 4. – P. 292–299.
3. Mattson M. P., Haddon R. C., Rao A. M. Molecular functionalization of carbon nanotubes and use as substrates for neuronal growth // J. Mol. Neurosci. – 2000. – **14**, No 3. – P. 175–182.
4. Liopo A. V., Stewart M. P., Hudson J. et al. Biocompatibility of native and functionalized single-walled carbon nanotubes for neuronal interface // J. Nanosci. Nanotechnol. – 2006. – **6**, No 5. – P. 1365–1374.
5. Park K. H., Chhowalla M., Iqbal Z., Sesti F. Single-walled Carbon Nanotubes Are a New Class of Ion Channel Blockers // J. Biol. Chem. – 2003. – **278**, No 50. – P. 50212–50216.
6. Chizhnikov I. V., Kiskin N. I., Tsyndrenko A. Y., Krishtal O. A. Desensitization of NMDA receptors does not proceed in the presence of kynurenate // Neurosci. Lett. – 1990. – **108**. – P. 88–92.
7. Krishtal O., Kirichok Y., Tsintsadze T. et al. New channel blocker BIIA388CL blocks delayed rectifier, but not A-type potassium current in central neurons // Neuropharmacology. – 2001. – **40**, No 2. – P. 233–241.

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 22.07.2009

N. S. Petrenko, O. P. Maximyuk, O. O. Palygin, O. A. Golub,
Academician of the NAS of Ukraine **O. O. Krishtal**

Fullerenes as novel modulators of neuronal potassium channels in CNS

We examine possible effects of C₆₀ fullerenes on the main mechanisms of neuronal excitability and the influence of C₆₀ fullerene nanocomposite on the voltage-gated sodium and potassium channels in hippocampal CA1 pyramidal neurons of rat. Application of 0.1 mg/ml nanocomposite for 15 min reversibly inhibited the amplitude of the whole voltage-gated potassium current (n = 10). Further investigations revealed that the above-mentioned inhibition was due to the inhibition of I(A) current (50.91 ± 6.1% (n = 5)), whereas I(DR) was practically insensitive to C₆₀ derivatives. In contrast to voltage-gated potassium currents, sodium currents were absolutely insensitive to fullerene derivatives. Our data indicate that the C₆₀ fullerene nanocomposite has different effects on voltage-gated sodium and potassium channels and therefore changes the excitability of hippocampal neurons. Thus, fullerenes can affect the neuronal function, most likely by the interaction with transmembrane proteins. Fullerenes form a new class of pharmacologically active substances important for a modulation of functions of the neuronal system.