

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**КОТИК ОЛЕНА АДАМІВНА**

УДК 576.315.2 : 577.352.465 : 57.086.862

**ДИСЕРТАЦІЯ**  
**ЕЛЕКТРОФІЗІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ КАТІОННИХ КАНАЛІВ**  
**ВЕЛИКОЇ ПРОВІДНОСТІ ТА ІНОЗИТОЛ-1,4,5-ТРИФОСФАТНИХ**  
**РЕЦЕПТОРІВ ЯДЕРНОЇ МЕМБРАНИ КАРДІОМІОЦИТІВ**

03.00.13 – Фізіологія людини і тварин

Біологічні науки

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ О.А. Котик

Науковий керівник:

**Марченко Сергій Михайлович**

доктор біологічних наук,

**Котлярова Анна-Малгожата Борисівна**

кандидат біологічних наук

Київ – 2020

## АНОТАЦІЯ

*Котик О.А.* Електрофізіологічні властивості катіонних каналів великої провідності та інозитол-1,4,5-трифосфатних рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 «Фізіологія людини і тварин». – Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2020.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню основних електрофізіологічних властивостей катіонних каналів великої провідності (LCC-каналів) та інозитол-1,4,5-трифосфатних рецепторів (IP<sub>3</sub>-рецепторів) ядерної мембрани кардіоміоцитів. У внутрішній та зовнішній ядерних мембранах містяться канали і рецептори, які забезпечують високоселективний транспорт та функціонування перинуклеарного простору як Ca<sup>2+</sup>-депо. Вивільнення депонованого Ca<sup>2+</sup> у кардіоміоцитах відбувається шляхом Ca<sup>2+</sup>-індукованого вивільнення Ca<sup>2+</sup> (CICR) після активації інозитол-1,4,5-трифосфатних та ріанодинових рецепторів [1].

Цікавим є те, що у кардіоміоцитах переважна більшість IP<sub>3</sub>-рецепторів локалізована саме в ділянці навколо ядра [2], що є визначальним для параметрів поширення Ca<sup>2+</sup>-хвилі у цих клітинах, регуляції експресії генів і функціонуванні міокарда загалом. Важливим також є дослідження властивостей LCC-каналів ядерної мембрани, оскільки вони можуть бути залучені у забезпечення локальних змін концентрацій іонів.

Ядра кардіоміоцитів ізолювали модифікованим нами способом, що забезпечує можливість реєстрації іонних струмів крізь їх мембрани. Струми, котрі проходили через канали реєстрували методом *patch-clamp* у конфігурації “*nucleus-attached*” та “*excised-patch*” у режимі фіксації потенціалу. Ідентифікацію другого типу IP<sub>3</sub>-рецепторів (IP<sub>3</sub>R2) здійснювали за допомогою імуногістохімічного фарбування з використанням специфічних до цього підтипу рецепторів поліклональних антитіл.

Вперше зареєстровано струми крізь кілька типів каналів у внутрішній ядерній мембрані з провідністю від 10 до 340 пСм. Серед них найчастіше реєстрували струми через LCC-канали ( $209 \pm 13$  пСм), які характеризуються повільною кінетикою, їх  $P_o$  суттєво залежить від потенціалу. За позитивних значень потенціалу (+40 мВ) – вони практично весь час були відкритими ( $NP_o = 3,11$ ), а на негативних (-40 мВ) – знижувалася ( $NP_o = 0,72$ ). Через LCC-канали добре проникають іони  $K^+$ , в меншій мірі –  $Na^+$ , вони непроникні для аніонів  $Cl^-$  і двовалентних катіонів  $Ca^{2+}$ . Відносно велика щільність розташування, котра поєднується з високою провідністю LCC-каналів в ядерній мембрані свідчить про їх важливу фізіологічну роль у забезпеченні механізмів регуляції функцій ядра.

Пошук специфічного блокатора є важливим з точки зору ідентифікації інструменту для подальшого з'ясування структури і фізіологічної ролі цих каналів. Здійснюючи пошук ефективного блокатора LCC-каналів цікавим є вивчення їх чутливості до дії зміїних токсинів, адже в історичному аспекті багато з них були ідентифіковані як блокатори каналів різного типу [3]. Раніше було показано, що неочищені фракції отрут гадюки *Bitis arietans*, кобри *Naja kaouthia* та гадюки *Vipera renardi* значно зменшують  $P_o$  LCC-каналів ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка [4], ми ж перевіряли вплив токсинів у формі очищених препаратів. Найбільш ефективним виявився нейротоксин II (NT II), амплітуда струму через канали під його впливом (25 мкмоль/л) достовірно зменшувалася на 13 % ( $P \leq 0,05$ ). В той час як  $\alpha$ -кобратороксин ( $\alpha$ -CTX) в концентрації 0,1–1 ммоль/л призводив до незначного «миготіння» (так званий flicker-блок каналу).

Раніше було перевірено вплив значної кількості блокаторів та агоністів інших транспортувальних систем, однак вони виявилися неефективними [5]. У 2016 році було показано, що d-тубокурарин інгібував LCC-канали ядер нейронів [6]. У кардіоміоцитах під його впливом (200 мкмоль/л) амплітуда струму крізь LCC-канали ядерної мембрани зменшувалась на 45 % ( $P \leq 0,001$ ). Для пошуку більш ефективного блокатора нами було перевірено вплив інших інгібіторів та агоністів

н-холінорецепторів на функціональну активність LCC-каналів. Під впливом 25 мкмоль/л дигідро- $\beta$ -еритроїдину (Dh $\beta$ E) спостерігали зменшення амплітуди струму через канал на 40 % ( $P \leq 0,001$ ). За високих концентрацій атракуріуму та дитиліну спостерігали зменшення  $P_o$  та появу «миготіння» каналу, що свідчить про механічне блокування пори каналу у його відкритому стані, однак повного блокування не було навіть при концентрації 2 ммоль/л блокаторів. Недеполяризуючий нервово-м'язовий релаксант рокуронію бромід дозозалежно зменшував амплітуду струму через канали й інгібував їх наполовину за концентрації 2 ммоль/л, а  $P_o$  зменшувалася вдвічі. Подібний вплив на функціональну активність LCC-каналів чинив піпекуронію бромід. Інші перевірені н-холіноблокатори – гексаметоній, метиллікаконітин (MLA),  $\alpha$ -конотоксин PeIA виявилися неефективними. У наступних серіях експериментів було перевірено вплив агоністів н-холінорецепторів. Зокрема, нікотин у концентрації від 10 до 200 мкмоль/л дозозалежно зменшував амплітуду струму через LCC-канали. Після аплікації десформилфлустраброміну (dFBr) в концентрації 200 мкмоль/л, амплітуда струму через канал зменшувалася на 21 % ( $P \leq 0,01$ ) спостерігали «миготіння» каналу. Нікотин виявився найбільш ефективним серед досліджених агоністів н-холінорецепторів, інші агоністи – PNU 282987 та карбахолін не спричиняли статистично достовірних змін функціонування LCC-каналів.

Ефекти усіх досліджуваних речовин були зворотними, оскільки після відмивання робочим розчином KCl, струм через LCC-канали повертався до контрольних значень. Відмінностей між властивостями LCC-каналів у ядерних мембранах кардіоміоцитів з різних частин серця, не зареєстрували.

Найефективнішими з перевірених інгібіторів та агоністів н-холінорецепторів і зміїних отрут були: Dh $\beta$ E > d-тубокурарин  $\approx$  нікотин > NT II > dFBr > дитилін  $\approx$  атракуріум  $\approx$  піпекуронію бромід > рокуронію бромід >  $\alpha$ -СТХ.

Ще у 2005 році Марченко Сергій Михайлович із співавторами висунули гіпотезу, що LCC-канали можуть відігравати роль у регуляції вивільнення  $Ca^{2+}$  через  $IP_3$ -рецептори, шляхом компенсаторного зміщення локального потенціалу

при вивільненні  $\text{Ca}^{2+}$  з перинуклеарного простору за рахунок протилежно спрямованого транспорту  $\text{K}^+$  крізь ядерну мембрану [5]. Тому наступним етапом роботи було вивчення властивостей  $\text{IP}_3$ -рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів.

У ядерній мембрані кардіоміоцитів зареєстровано струм через канал, котрий активується при додаванні  $\text{IP}_3$  у камеру (0,2–20 мкмоль/л) та інгібується 2-APB (50 мкмоль/л), на основі чого зроблено висновок, що цей канал є  $\text{IP}_3$ -рецептором ( $384 \pm 5$  пСм). З даних літератури відомо, що в кардіоміоцитах найбільш експресованим типом є  $\text{IP}_3\text{R2}$  і ми підтвердили це імуногістохімічним методом.  $P_o$   $\text{IP}_3$ -рецепторів є потенціалзалежною, при цьому вищу активність  $\text{IP}_3$ -рецепторів спостерігали за позитивних значень потенціалу (за +40 мВ  $P_o = 0,043$ , за +60 мВ  $P_o = 0,125$ ), в той час як на негативних значеннях цей показник зменшувався (за -40 мВ  $P_o = 0,025$ , за -60 мВ  $P_o = 0,005$ ).  $P_o$  досліджуваних рецепторів зростала зі збільшенням концентрації  $\text{IP}_3$  і досягала максимуму за 10 мкмоль/л  $\text{IP}_3$  у середовищі ( $NP_o = 0,292$ ). У наступних серіях експериментів ми досліджували вплив  $\text{Ca}^{2+}$  різної концентрації на  $\text{IP}_3$ -рецептори. Вони характеризуються різною чутливістю до  $\text{Ca}^{2+}$ : для частини притаманна класична дзвоноподібна залежність від його концентрації (з повним інгібуванням за 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ ), тоді як для іншої частини графік залежності  $P_o$  від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  зміщений праворуч й інгібування починається за 10 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ . Виявлені нами властивості  $\text{IP}_3$ -рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів не збігаються з жодним типом описаних ізоформ  $\text{IP}_3$ -рецептора ні за чутливістю до  $\text{IP}_3$ , ні за впливом  $\text{Ca}^{2+}$  на їх функціонування, а ці властивості є основними у визначенні характеру  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналу, який ними генерується. Слід зазначити, що на властивості рецептора, окрім самого гена, що його кодує, можуть впливати його посттрансляційні модифікації і молекулярне оточення.

Отримані результати показали, що у ядерній мембрані кардіоміоцитів наявні два підтипи  $\text{IP}_3$ -рецепторів, котрі відрізняються за чутливістю до  $\text{Ca}^{2+}$  та LCC-канали, котрі з різною ефективністю інгібуються агоністами і антагоністами н-холінорецепторів.

**Ключові слова:** LCC-канали, IP<sub>3</sub>-рецептори, Ca<sup>2+</sup>-сигналізація, агоністи та інгібітори н-холінорецепторів, ядерна мембрана, кардіоміоцити

## SUMMARY

*Kotyk O.A.* Electrophysiological properties of large conductance cation channels and inositol-1,4,5-trisphosphate receptors of the cardiomyocyte nuclear membrane. – Qualification scientific work, the manuscript.

Thesis for a candidate degree in biological sciences (Doctor of Philosophy), specialty 03.00.13 «Human and Animal Physiology». – Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv, 2020.

The work is devoted to the study of the basic electrophysiological properties of Large Conductance Cationic channels (LCC-channels) and inositol-1,4,5-trisphosphate receptors (IP<sub>3</sub>Rs) in the nuclear membrane of cardiomyocytes. Inner and outer nuclear membranes contain channels and receptors that provide highly selective transport and perinuclear space functioning as a Ca<sup>2+</sup>-store. Release of stored Ca<sup>2+</sup> in cardiomyocytes occurs by calcium-induced calcium release (CICR) after activation of inositol-1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors [1].

Interestingly, the vast majority of IP<sub>3</sub>Rs in cardiomyocytes are localized in the region around the nucleus [2], which may be crucial for the Ca<sup>2+</sup>-wave propagation parameters in these cells, regulation of gene expression and myocardial function in general. It is also important to study the properties of LCC-channels of the nuclear membrane since they can be involved in providing local ion concentration changes.

Cardiomyocyte nuclei were isolated using a customized method that enables the registration of ionic currents through their inner membrane. Currents flowing through the channels were registered by *patch-clamp* in the “*nucleus-attached*” and “*excised-patch*” configurations in voltage-clamp mode. The identification of IP<sub>3</sub>Rs type II (IP<sub>3</sub>R2) in the nuclear membrane of cardiomyocytes was performed by immunohistochemical staining of nuclei using polyclonal antibodies specific to this type.

The currents flowing through several types of channels in the inner nuclear membrane of cardiomyocytes with conductivity ranging from 10 to 340 pS were registered for the first time. Among them, currents through LCC-channels ( $209 \pm 13$  pS) that are characterized by slow kinetics, their  $P_o$  significantly dependent on the potential were the most frequently recorded. At positive potentials (+40 mV) they remained in the open state most of the time ( $NP_o = 3.11$ ), whereas at negative potentials (-40 mV) – decreased ( $NP_o = 0.72$ ). LCC-channels are permeable to  $K^+$ , to a lesser to  $Na^+$ , and impermeable to  $Cl^-$  and divalent  $Ca^{2+}$  cations. Relatively high density combined with high conductance of LCC-channels in the nuclear membrane indicates their important physiological role in regulating nuclear functions.

Identification of a specific blocker is significant in terms of finding a tool to further determine the structure and the physiological role of LCC-channels. While searching for an effective LCC-channel blocker it's interesting to study their sensitivity to the snake toxins since historically many of them were identified as channel blockers for various ion channels [3]. Earlier it was determined that crude venom fractions of *Bitis arietans*, *Naja kaouthia* and *Vipera renardi* significantly reduce  $P_o$  of LCC-channels of the nuclear membrane of the cerebellar Purkinje neurons [4], we were testing the influence of the purified neurotoxins. Purified neurotoxin II (NT II) was proven to be the most effective because at a concentration 25  $\mu$ M it reduced the amplitude of the current flow through these channels by 13 % ( $P \leq 0,05$ ). When applying 1–2 mM of  $\alpha$ -cobratoxin ( $\alpha$ -CTX), a slight channel flickering was observed.

The impact of a large number of blockers and agonists of other transport systems has previously been tested, but they were proven to be ineffective [5]. In 2016 it was proven that d-tubocurarine inhibited neuronal LCC-channels [6]. Under its influence (200  $\mu$ M), the amplitude of the current flow through the nuclear membrane's LCC-channels in cardiomyocytes decreased by 45 % ( $P \leq 0,001$ ). To find a more effective blocker, we tested the effects of other n-cholinoreceptor inhibitors and agonists on the functional activity of LCC-channels. Under the influence of 25  $\mu$ M dihydro- $\beta$ -erythroidine (Dh $\beta$ E), a 40 % ( $P \leq 0,001$ ) decrease in current through the channel was observed. At high concentrations of atracurium and dithylinum,  $P_o$  decreases and

channel flickering is observed, indicating physical blockade of the channel pores in its open state. However, there was no complete blocking even at 2 mM blockers concentration. Non-depolarizing neuromuscular relaxant rocuronium bromide dose-dependently reduced current amplitude through the channels, inhibited them by half at a concentration of 2 mM and reduced them  $P_o$  by half. A similar effect on LCC-channels functional activity was induced by pipecuronium bromide. Other investigated n-cholinoinhibitors – hexamethonium, methyllycaconitine (MLA),  $\alpha$ -conotoxin PeIA were proven ineffective. In the following series of experiments, the effects of n-cholinoreceptor agonists were tested. In particular, nicotine at a concentration of 10 to 200  $\mu$ M dose-dependently decreased current amplitude through LCC-channels. After desformylflustrabromine (dFBr) application at a concentration of 200  $\mu$ M, the amplitude of the current through the channel decreased by 21 % ( $P \leq 0,01$ ) and channel flickering was observed. Nicotine has proven to be the most effective n-cholinoreceptor agonist studied, which has been implicated in LCC channels. Whereas, other agonists – PNU 282987 and carbachol did not cause statistically significant changes in LCC-channels functioning.

The effects of all tested substances were reversible – after washing with the KCl working solution, the current flow through the LCC-channels returned to the control values. No differences were observed between the properties of LCC channels in the nuclear membranes of cardiomyocytes located in the different parts of the heart.

The most effective among tested n-cholinoreceptor agonists and inhibitors and snake toxins were: Dh $\beta$ E > d-tubocurarine  $\approx$  nicotine > NT II > dFBr > dithylinum  $\approx$  atacurium  $\approx$  pipecuronium bromide > rocuronium bromide >  $\alpha$ -CTX.

In 2005, Marchenko S.M. with co-authors hypothesized that LCC-channels may play a role in  $Ca^{2+}$  release regulation via  $IP_3$  receptors, compensating the local potential of perinuclear space during  $Ca^{2+}$  release by counter-directed  $K^+$  transport [5]. Therefore, the next stage of the study was to investigate the properties of the  $IP_3$ Rs in the nuclear membrane of cardiomyocytes.

In the nuclear membrane of cardiomyocytes, current flow was registered through a channel that was activated by the addition of  $IP_3$  to the bath (0.2–20  $\mu$ M) and inhibited



by 2-APB (50  $\mu\text{M}$ ). On this basis, we concluded that the channel is  $\text{IP}_3\text{Rs}$  ( $384 \pm 5$   $\text{pCm}$ ). From the literature, it is known that the most expressed  $\text{IP}_3\text{Rs}$  in cardiomyocytes are  $\text{IP}_3\text{R2}$  and we confirmed it by immunohistochemical analysis.  $P_o$   $\text{IP}_3\text{Rs}$  is potential-dependent, with higher activity of  $\text{IP}_3\text{Rs}$  observed at positive potential values (at +40 mV  $P_o = 0,043$ , at 60 mV  $P_o = 0,125$ ), while at negative values their activity decreased (at -40 mV  $P_o = 0,025$ , at -60 mV  $P_o = 0,005$ ).  $P_o$  of investigated receptors increased with  $\text{IP}_3$  concentration increasing and peaked at a concentration of 10  $\mu\text{M}$   $\text{IP}_3$  in the solution ( $NP_o = 0,292$ ). In the following series of experiments, we investigated the effect of  $\text{Ca}^{2+}$  in different concentrations on  $\text{IP}_3\text{Rs}$  activity. They are characterized by different sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$ : part of which is inhibited by  $\text{Ca}^{2+}$  at high concentrations, which corresponds to the classical pattern of bell-shaped activity dependence on  $\text{Ca}^{2+}$  concentration (with complete inhibition of 1  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ ). The other part of  $\text{IP}_3\text{Rs}$  has a significantly right-shifted activity dependence, their inhibition starts at 10  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . Founded properties of  $\text{IP}_3$  receptors in nuclear membrane of cardiomyocytes do not coincide with any of described types of  $\text{IP}_3\text{Rs}$  isoforms neither in sensitivity to  $\text{IP}_3$  nor in the effect of  $\text{Ca}^{2+}$  on their functioning, and these properties are fundamental in determining the nature of the  $\text{Ca}^{2+}$ -signal generated by them. This may be due to the influence of post-translational modifications and the molecular environment.

The results show us that there are two subtypes of  $\text{IP}_3$  receptors in the nuclear membrane of cardiomyocytes that differ in sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$  and LCC-channels, which are inhibited by agonists and inhibitors of n-cholinoreceptors with different effectiveness.

**Keywords:** LCC-channels,  $\text{IP}_3\text{Rs}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -signaling, n-cholinoreceptor agonists and inhibitors, nuclear membrane, cardiomyocytes

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### **В яких опубліковані основні наукові результати дисертації:**

1. Котлярова АБ, Котик ОА, Юришинець ІВ, Марченко СМ. Функціонування катіонних каналів великої провідності ядерної мембрани кардіоміоцитів та нейронів Пуркінє мозочка під впливом модуляторів нікотинових холінорецепторів. *Фізіол журн.* 2019;65(6):30–7. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні частини експериментальних досліджень, статистичному опрацюванні отриманих даних).*

2. Котик ОА, Котлярова АБ, Ісаєва ОВ, Марченко СМ. Вплив деяких анестетиків та природних отрут на функціонування LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів та нейронів Пуркінє мозочка. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія.* 2019;3(79):43–8. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні частини лабораторних досліджень, аналізі результатів досліджень, оформленні публікації).*

3. Котик ОА, Котлярова АМ, Марченко СМ. Оптимізація методу ізолювання ядер для електрофізіологічних досліджень іонних каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів щура. *Фізіол журн.* 2018;64(2):26–33. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальної частини досліджень, статистичному опрацюванні отриманих даних, підготовці ілюстративного матеріалу).*

4. Котик ОА, Котлярова АБ, Павлова НІ, Марченко СМ. Вплив блокаторів на високопровідні катіонні канали в ядерній мембрані. *Нейрофізіологія.* 2017;49(2):159–61. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальної частини досліджень, формулюванні висновків, написанні публікації).*

5. Котик ОА, Котлярова АБ, Поліщук АО, Марченко СМ. Іонні струми поодиноких каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів щура. *Фізіол журн.* 2016;62(6):3–8. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні частини експериментальних досліджень та аналізі їх результатів).*

### Які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Котик О**, Котлярова А, Марченко С. Властивості  $IP_3$ -рецепторів та LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів. Матеріали чергового VIII з'їзду Українського біофізичного товариства; 2019 листоп. 12–15; Київ-Луцьк, Україна. Київ. 2019. с. 19. *Публікація тез, усна доповідь*

2. **Котик О**, Котлярова А, Скок М, Марченко С. Функціонування LCC-каналів ядерної мембрани за дії блокаторів та агоністів N-холінорецепторів. Матеріали XX з'їзду Українського фізіологічного товариства ім. П. Г. Костюка з міжнар. участю; 2019 трав. 27–30; Київ, Україна. *Фізіол журн.* 2019;65(3):28–9. *Публікація тез, усна доповідь*

3. Pavlova N, **Kotyк О**, Kotliarova A, Marchenko S. Potential-dependence of the functioning of the  $IP_3$ Rs in the native nuclear envelope of cardiomyocytes. XIII IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists; 2019 May 22–25; Kyiv, Ukraine. *Biopolymers and Cell.* 2019;35(5):405. *Публікація тез, усна доповідь*

4. Kotliarova A, **Kotyк О**, Rybachuk O, Sotkis A, Dyskina Yu, Marchenko S.  $IP_3$ Rs in the nuclear envelope - an electrophysiological and immunohistochemical confirmation. “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology – 2019”; 2019 Mar 21–22; Kyiv, Ukraine. Kyiv; 2019. p. 16. *Публікація тез, усна доповідь*

5. Котлярова А, **Котик О**, Марченко С. Рідкісні іонні канали ядерної мембрани кардіоміоцитів. Матеріали XVII Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених «Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини»; 2018 груд. 6–7; Львів, Україна. *Біологія тварин.* 2018;20(4):119.

6. Котлярова А, **Котик О**, Марченко С. Властивості інозитол-1,4,5-трифосфатних рецепторів нативної ядерної мембрани кардіоміоцитів. Матеріали тематичного VII з'їзду Українського біофізичного товариства; 2018 жовт. 29–31; Київ, Україна. Київ; 2018, с. 28. *Публікація тез, постерна доповідь*

7. Pavlova N, **Kotyк О**, Kotliarova A, Marchenko S. Ion channels in the nuclear envelope of cardiomyocytes. International PhD student symposium and career fair for

life sciences 15th horizons in molecular biology; 2018 Sept 10–13; Göttingen, Germany. Göttingen: Cuvillier; 2018, p. 72. *Публікація тез, усна доповідь*

8. Kotliarova A, **Kotyk O**, Pavlova N, Kalnytska O, Kudriashova M, Marchenko S. IP<sub>3</sub>Rs and LCC-channels coexpression in cardiomyocytes' nuclear membrane. Materials of XII annual conference of young scientists institute of molecular biology and genetics NAS of Ukraine; 2018 May 15–16; Kyiv; Ukraine. Biopolymers Cell. 2018;34(2):143–67. *Публікація тез, усна доповідь*

9. **Котик О**, Павлова Н, Тагаві С, Скок М, Котлярова А, Марченко С. Вплив десформилфлустраброміну (dFBr) на функціонування LCC-каналів ядерної мембрани. Збірник тез XVI Міжнар. наук. конф. студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки»; 2018 квіт. 24–7; Київ, Україна. Київ; 2018. с. 33–5. *Публікація тез, усна доповідь*

10. Kotliarova A, **Kotyk O**, Pavlova N, Marchenko S. Kanał chlorowy o wysokiej przewodności w membranie jądrowej kardiomiocytów. International research and practice conference Modern methodologies, innovations, and operational experience in the field of biological science: Conference Proceedings; 2017 Dec. 27–28; Lublin, Poland. Lublin: Izdevnieciba “Baltija Publishing”; 2017. p. 81–4. *Публікація тез*

11. **Котик О**, Котлярова А, Хомин М, Скок М, Марченко С. Вплив агоністів та інгібіторів N-холінорецепторів на функціонування LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів. Тези VIII Міжнар. наук. конф., присвяченої 175-річчю кафедри фізіології та анатомії людини та тварин Київського нац. унів. імені Тараса «Шевченка Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології»; 2017 жовт. 17–20; Київ, Україна. Київ; 2017, с. 61. *Публікація тез, усна доповідь*

12. **Котик О**, Котлярова А, Марченко С. Ідентифікація іонних каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів. матеріали IV Міжнар. наук. конф. «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології»; 2017 жовт. 5–6; Дніпро, Україна. Дніпро: «Ліра», 2017, с. 89–90. *Публікація тез, усна доповідь*

13. **Котик О**, Котлярова А, Павлова Н, Марченко С. Вплив блокаторів на високопровідні катіонні канали ядерної мембрани. Матеріали VII Конгресу Українського товариства нейронаук; 2017 черв. 7–11; Київ, Україна. Київ; 2017, с. 93. *Публікація тез, постерна доповідь*

14. **Kotyк O**, Kotliarova A, Polishchuk A, Marchenko S. The properties of ion channels in the nuclear envelope of cardiomyocytes. 2<sup>nd</sup> Conference for Young Scientists of the Division of Biochemistry, Physiology and Molecular Biology National Academy of Sciences of Ukraine; 2017 June 6–9; Kyiv, Ukraine. Ukr Biochem J; 2017. p. 119. *Публікація тез, постерна доповідь*

15. **Котик О**, Павлова Н, Поліщук А, Котлярова А, Марченко С. Властивості LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів. Збірник тез XIII Міжнар. наук. конф. студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»; 2017 квіт. 25–27; Львів, Україна. Львів: ЛНУ ім. Івана Франка; 2017, с. 13–4. *Публікація тез, усна доповідь*

16. **Котик О**, Павлова Н, Хомин М, Котлярова А, Марченко С. Вплив атракуріума на LCC-канали ядерної мембрани. Збірник тез XV Міжнар. наук. конф. студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки»; 2017 квіт. 18-21; Київ, Україна. Київ: КНУ ім. Тараса Шевченка; 2017, с. 22–3. *Публікація тез, усна доповідь*

17. Kotliarova A, **Kotyк O**, Polishchuk A, Marchenko S. Identification of ion channels in the nuclear envelope of cardiomyocytes. Abstracts of reports of the XV All-Ukrainian Scientific and Practical Conference of Young Scientists Young scientists in solution of actual problems of biology, animal husbandry and veterinary medicine; 2016 Dec. 8–9; Lviv, Ukraine. Біологія тварин. 2016 Dec;18(4):157. *Публікація тез, усна доповідь*

18. Котлярова А, **Котик О**, Поліщук А, Павлова Н, Марченко С. Іонні канали ядерної мембрани кардіоміоцитів. Міжнар. наук.-практ. конф. «Актуальні питання розвитку біології та екології»; 2016 жовт. 3–7; Вінниця, Україна. Вінниця: ДНУ ім. Василя Стуса; 2016, с. 245–8. *Публікація тез, усна доповідь*

19. **Котик О**, Котлярова А, Поліщук А, Плечій М, Хомин М, Марченко С. Ідентифікація високопровідних катіонних каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів. Збірник тез XII Міжнар. наук. конф. студ. та аспір. «Молодь і поступ біології»; 2016 квіт. 19–21; Львів, Україна. Львів: ЛНУ ім. Івана Франка; 2016, с. 299–300. *Публікація тез, усна доповідь*

20. **Котик О**, Котлярова А, Поліщук А, Павлова Н. Оптимізація умов ізолювання ядер кардіоміоцитів для реєстрації іонних каналів методом петч-клемп. Матеріали XIV Міжнар. наук. конф. студ., аспір. та мол. вчених «Шевченківська весна 2016: біологічні науки»; 2016 квіт. 6–8; Київ, Україна. Київ: КНУ ім. Тараса Шевченка; 2016, с. 120. *Публікація тез, усна доповідь*

## ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ .....	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	18
ВСТУП.....	19
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	25
1.1. Структурно-функціональна організація ядер еукаріотів.....	25
1.2. Транспортувальні системи ядерної мембрани .....	27
1.2.1. Будова та властивості ядерної пори .....	29
1.2.2. Різноманітність іонних каналів ядерної мембрани .....	33
1.2.2.1. Властивості LCC-каналів ядерної мембрани .....	33
1.2.2.2. Інші типи каналів ядерної оболонки.....	35
1.2.3. Системи транспортування $\text{Ca}^{2+}$ в ядерній оболонці.....	36
1.3. Ядерна оболонка як кальцієве депо, джерела $\text{Ca}^{2+}$ в ядрі.....	37
1.4. Структура і властивості $\text{IP}_3$ -рецепторів .....	39
1.4.1. Механізми активації $\text{IP}_3$ -рецепторів .....	41
1.4.2. Біофізичні характеристики $\text{IP}_3$ -рецепторів різних типів .....	44
1.4.3. Фізіологічна роль і механізми регуляції функціонування $\text{IP}_3$ -рецепторів .....	45
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	49
2.1. Об'єкт дослідження .....	49
2.2. Оптимізація способу ізолювання ядер кардіоміоцитів .....	49
2.3. Реєстрація іонних струмів крізь ядерну мембрану методом <i>patch-clamp</i> .....	54
2.4. Імуногістохімічна ідентифікація $\text{IP}_3\text{R}_2$ у ядерній мембрані кардіоміоцитів .....	56
2.5. Статистично-математична обробка результатів досліджень .....	58
2.6. Реактиви та розчини.....	59

РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ .....	61
3.1. Властивості LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів.....	62
3.1.1. Провідність LCC-подібних каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів..	62
3.1.2. Селективність LCC-подібних каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів .....	64
3.1.3. Фармакологічна чутливість LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів .....	68
3.1.3.1. Ефекти змінних токсинів на функціонування LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів .....	68
3.1.3.2. Вплив блокаторів н-холінорецепторів на функціональну активність LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів .....	72
3.1.3.3. Вплив агоністів н-холінорецепторів на функціональну активність LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів .....	94
3.2. Властивості IP <sub>3</sub> -рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів.....	105
3.2.1. Підтвердження наявності IP <sub>3</sub> -рецепторів у внутрішній ядерній мембрані кардіоміоцитів .....	106
3.2.1.1. Електрофізіологічна реєстрація IP <sub>3</sub> -рецепторів.....	106
3.2.1.2. Імуногістохімічна ідентифікація IP <sub>3</sub> R2 ядерної мембрани кардіоміоцитів .....	107
3.2.2. Потенціалзалежність функціонування IP <sub>3</sub> -рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів .....	108
3.2.3. Чутливість IP <sub>3</sub> -рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів до IP <sub>3</sub> та Ca <sup>2+</sup> .....	110
3.2.3.1. Залежність функціонування IP <sub>3</sub> -рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів від концентрації IP <sub>3</sub> у середовищі .....	111
3.2.3.2. Залежність функціонування IP <sub>3</sub> -рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів від концентрації Ca <sup>2+</sup> у середовищі.....	112



РОЗДІЛ 4 УЗАГАЛЬНЕННЯ .....	118
ВИСНОВКИ.....	126
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	128
ДОДАТОК 1 СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ .....	149

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

2-APB – 2-аміноетоксидифенілборат

DAG – діацилгліцерол

dFBr – десформилфлустрабромін

Dh $\beta$ E – дигідро- $\beta$ -еритроїдин гідробромід

GEF – (від англ. **G**TPase **E**xchange **F**actor) фактор обміну нуклеотидів

GPCR – (англ. G-protein-coupled receptors) рецептори зв'язані з G-білками

IP<sub>3</sub> – інозитол-1,4,5-трифосфат

IP<sub>3</sub>-рецептори – інозитол-1,4,5-трифосфатні рецептори

IP<sub>3</sub>R1, IP<sub>3</sub>R2, IP<sub>3</sub>R3 – інозитол-1,4,5-трифосфатні рецептори 1, 2 та 3 типу  
відповідно

LCC-канали – (від англ. **L**arge **C**onductance **C**ation channels) катіонні канали  
великої провідності

MLA – метиллікаконітин

NT II – нейротоксин II

NTR – (від англ. nuclear transport receptor) рецептор ядерного транспорту

P<sub>o</sub> – ймовірність перебування каналу у відкритому стані

$\alpha$ -CTX –  $\alpha$ -кобратоксин

АТФ – аденозинтрифосфат

ГДФ – гуанозиндифосфат

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ЕР – ендоплазматичний ретикулум

н-холінорецептори – нікотинові ацетилхолінові рецептори

СР – саркоплазматичний ретикулум

## ВСТУП

### Обґрунтування вибору теми дослідження

Ядра еукаріотів мають великі розміри порівняно з іншими клітинними органелами, що робить їх вдалим об'єктом для електрофізіологічних досліджень. Ядерна оболонка утворена двома мембранами з різними функціональними властивостями. Між зовнішньою та внутрішньою мембранами знаходиться перинуклеарний простір – одне з депо  $\text{Ca}^{2+}$  в клітині. Забезпечення цієї функції можливе через наявність різних транспортувальних систем у зовнішній та внутрішній мембранах, основними з яких є інозитол-1,4,5-трифосфатні рецептори ( $\text{IP}_3$ -рецептори), транспортери кількох типів,  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа, а також спонтанно активні іонні канали. Дослідженню властивостей  $\text{IP}_3$ -рецепторів першого типу ( $\text{IP}_3\text{R1}$ ) присвячена значна кількість праць [5, 7, 8, 9, 10], тоді як про другий ( $\text{IP}_3\text{R2}$ ) тип цих рецепторів наявні лише розрізнені відомості [11, 12, 13]. Згідно з даними літератури,  $\text{IP}_3\text{R2}$  експресуються у великій кількості в астроцитах [14] і кардіоміоцитах [11, 12, 13]. При цьому, переважна їх більшість локалізована саме в ділянці навколо ядра [2], що є визначальним для параметрів поширення  $\text{Ca}^{2+}$ -хвилі у цих клітинах, регуляції експресії генів і функціонуванні міокарда загалом.

Відомо, що експресія  $\text{IP}_3$ -рецепторів змінюється при багатьох патологіях серця, таких як гіпертрофія [15], аритмія [16], фібриляція передсердь [17], інфаркт міокарда [18]. У ядерних мембранах нейронів Пуркін'є мозочка  $\text{IP}_3$ -рецептори коекспресовані зі спонтанно активними іонними каналами, котрі забезпечують локальні зміни концентрацій іонів [10]. Найпоширенішими серед них є катіонні канали великої провідності (LCC-канали), які є селективними до одновалентних катіонів. Згідно з нашим припущенням, вони можуть брати участь у пролонгуванні тривалості вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з депо під час активації каналів вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  шляхом компенсаторного заміщення позитивно заряджених іонів у люмені, що частково запобігає зміщенню мембранного потенціалу до значення  $\text{Ca}^{2+}$ -рівноважного потенціалу. Вивчення фізіологічних та біофізичних властивостей каналів ядерної мембрани є передумовою для розуміння

найважливіших медичних проблем, пов'язаних з порушенням  $\text{Ca}^{2+}$  сигналізації в кардіоміоцитах.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, грантами, планами, темами**

Роботу виконано в рамках наукових тем Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України «Клітинні та молекулярні механізми функціонування нейронів головного мозку в нормі та патології» (2014–2016, № державної реєстрації 0113U007275), «Клітинні та молекулярні механізми функціонування нейронів головного та спинного мозку в нормі та патології» (2017–2021, № державної реєстрації 0116U004473), а також за темою «Біофізичні та молекулярно-генетичні механізми регуляції фізіологічних та патологічних процесів» (2017–2021, № державної реєстрації 0116U004470). Частина роботи виконана за підтримки грантів Президента України для молодих вчених за конкурсними проектами 17884 та 29460 Державного фонду фундаментальних досліджень 2017 і 2018 років.

### **Мета і завдання дослідження**

**Мета** роботи – дослідити електрофізіологічні властивості LCC-каналів та  $\text{IP}_3$ -рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів.

Для досягнення мети дослідження було поставлено такі **завдання**:

1. Оптимізувати спосіб ізолювання ядер кардіоміоцитів для наступної реєстрації іонних струмів крізь їх мембрани.
2. Перевірити наявність іонних каналів у внутрішній ядерній мембрані кардіоміоцитів.
3. З'ясувати основні електрофізіологічні параметри функціонування LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів.
4. Дослідити вплив змієних токсинів (нейротоксину II,  $\alpha$ -кобратороксину) на LCC-канали ядерної мембрани кардіоміоцитів.

5. Вивчити чутливість LCC-каналів до антагоністів н-холінорецепторів: d-тубокурарину, дигідро- $\beta$ -еритроїдину, гексаметонію,  $\alpha$ -коботоксину PeIA, метиллікаконітину, атракуріуму, піпекуронію броміду, рокуронію броміду.

6. Дослідити вплив агоністів н-холінорецепторів: нікотину, десформилфлустраброміну, PNU 282987, карбахоліну на функціонування LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів.

7. З'ясувати базові електрофізіологічні властивості IP<sub>3</sub>-рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів

**Об'єкт дослідження** - іонні канали внутрішньоклітинних мембран.

**Предмет дослідження** – електрофізіологічні властивості і фармакологічна чутливість LCC-каналів та IP<sub>3</sub>-рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів.

### **Методи дослідження**

Метод виділення ізольованих ядер кардіоміоцитів щурів, реєстрація іонних струмів крізь канали внутрішньої ядерної мембрани кардіоміоцитів за допомогою методу *patch-clamp*, імуногістохімічна перевірка наявності IP<sub>3</sub>R2, статистично-математичне опрацювання результатів досліджень.

### **Наукова новизна отриманих результатів**

Адаптовано метод ізолювання ядер кардіоміоцитів, придатних для електрофізіологічних досліджень, а саме підібрано оптимальний склад розчину та спосіб гомогенізації міокарда, скорочено час центрифугування гомогенату до 10 хв, без застосування детергентів. Вперше зареєстровано струми крізь спонтанно активні канали з різною іонною провідністю (10–340 пСм) ядерної мембрани кардіоміоцитів. Серед них ідентифіковано LCC-канали з провідністю  $209 \pm 13$  пСм та описано їхні основні біофізичні характеристики. Перевірено вплив агоністів та антагоністів н-холінорецепторів – дигідро- $\beta$ -еритроїдину (Dh $\beta$ E), десформилфлустраброміну (dFBr), d-тубокурарину, атракуріуму, піпекуронію броміду, рокуронію броміду, гексаметонію, метиллікаконітину (MLA),  $\alpha$ -коботоксину PeIA, нікотину, PNU 282987, карбахоліну, дитиліну і

змінних токсинів: нейротоксину II (NT II),  $\alpha$ -кобрatokсину ( $\alpha$ -CTX) – на функціональну активність LCC-каналів. Ідентифіковано  $IP_3$ -рецептори ядерної мембрани кардіоміоцитів з провідністю  $384 \pm 5$  пСм і різною чутливістю до  $Ca^{2+}$ . Виявлені нами електрофізіологічні властивості  $IP_3$ -рецепторів відрізняються як від характеристик гетерологічно експресованих  $IP_3R2$ , так і від раніше описаних властивостей  $IP_3R1$  та  $IP_3R3$ , а це може мати визначальне значення для параметрів поширення  $Ca^{2+}$ -хвилі у кардіоміоцитах.

### **Практичне значення отриманих результатів**

Робота присвячена вивченню фундаментальних проблем і не переслідує безпосередніх практичних цілей. Багато патологій серця, таких як аритмія, фібриляція шлуночків, інфаркт міокарда, супроводжуються порушенням  $IP_3$ -опосередкованої  $Ca^{2+}$ -сигналізації. Розуміння механізмів цих явищ стає можливим лише на підставі дослідження властивостей транспортувальних систем, котрі беруть участь у  $Ca^{2+}$ -сигналізації в нормі. Результати досліджень можуть бути використані для читання лекцій студентам біологічних спеціальностей закладів вищої освіти.

### **Особистий внесок здобувача**

Дисертанткою у співавторстві з Марченком С. М. та Котляровою А. Б. здійснено розробку мети і завдань дослідження, а також плану роботи та обговорення формулювання висновків. Експериментальну частину роботи виконано спільно з Котляровою А. Б. З іншими співавторами публікацій було виконано окремі частини експериментальної роботи. Автором самостійно було проведено статистично-математичне опрацювання отриманих результатів та графічне їх представлення.

### **Апробація матеріалів дисертації**

Дисертаційну роботу апробовано на таких конференціях:

- VIII з'їзді Українського біофізичного товариства 12–15 листопада 2019, Київ-Луцьк, Україна.
- XX-му з'їзді Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнар. участю, 27–30 трав. 2019, Київ, Україна;
- XIII IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists. Biopolymers and Cell 2019, Kyiv, Ukraine;
- "Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology - 2019"; 21–22 Mar 2019, Kyiv, Ukraine;
- XVII Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених «Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини» 6–7 груд. 2018, Львів, Україна;
- VII З'їзді Українського біофізичного товариства 2018, Київ-Луцьк, Україна;
- International PhD student symposium and career fair for life sciences 15th horizons in molecular biology 10–13 Sept. 2018, Göttingen, Germany;
- XII annual conference of young scientists institute of molecular biology and genetics NAS of Ukraine 2018, Kyiv Ukraine;
- XVI Міжнар. наук. конф. студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки» 24–27 квіт. 2018, Київ, Україна;
- Modern methodologies, innovations, and operational experience in the field of biological science: Conference Proceedings 27–28 Dec. 2017, Lublin, Poland;
- VIII Міжнар. наук. конф., присвяченій 175-річчю кафедри фізіології та анатомії людини та тварин Київського нац. університету ім. Тараса Шевченка «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології» 17–20 жовт. 2017, Київ, Україна;
- IV Міжнар. наук. конф. «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» 5–6 жовт. 2017, Дніпро, Україна;

- VII Конгресі Українського товариства нейронаук 7–11 черв. 2017, Київ, Україна;
- 2<sup>nd</sup> Conference for Young Scientists of the Division of Biochemistry, Physiology and Molecular Biology National Academy of Sciences of Ukraine 6–9 Jun. 2017, Kyiv, Ukraine;
- XIII Міжнар. наук. конф. студ. та аспір. «Молодь і поступ біології» 25–27 квіт. 2017, Львів, Україна;
- XV Міжнар. наук. конф. студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки» 18–21 квіт. 2017, Київ, Україна;
- XV All-Ukrainian Scientific and Practical Conference of Young Scientists Young scientists in solution of actual problems of biology, animal husbandry and veterinary medicine 8–9 Dec. 2016, Lviv, Ukraine;
- Міжнар. наук.-практ. конф. «Актуальні питання розвитку біології та екології» 3–7 жовт. 2016, Вінниця, Україна;
- XII Міжнар. наук. конф. студ. та аспір. «Молодь і поступ біології» 19–21 квіт. 2016, Львів, Україна;
- XIV Міжнар. наук. конф. студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки» 6–8 квіт. 2016, Київ, Україна.

### **Публікації**

Результати досліджень опубліковано у 25 працях: 5 – статті у наукових фахових виданнях та 20 тез доповідей на конференціях, симпозиумах і з'їздах.

### **Структура та обсяг дисертації**

Дисертація складається із вступу, 4 розділів, висновків, списку використаних джерел, 1 додатку, 60 рисунків. Основний текст роботи викладено на 109 сторінках. Загальний обсяг роботи становить 153 сторінки.

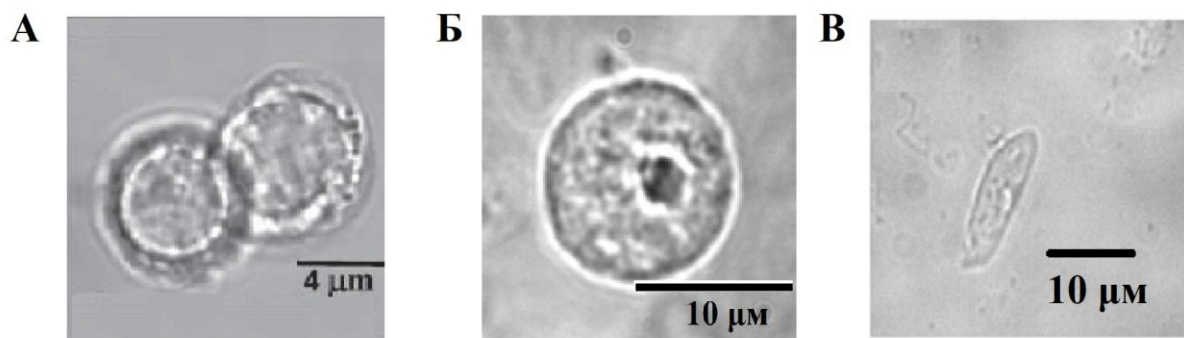


## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Структурно-функціональна організація ядер еукаріотів

Клітини еукаріотів характеризуються наявністю ядра, яке містить генетичний апарат. Залежно від типу клітин ядро може мати круглу або видовжену форму, також різною може бути і кількість ядер у одній клітині. Так, наприклад, нейрони Пуркін'є мають одне ядро круглої форми, розміром  $\sim 10$  мкм з прозорою нуклеоплазмою [5], ядра ж м'язових клітин видовжені. Кардіоміоцити дорослих ссавців зазвичай містять одне чи два центрально розміщених видовжених ядра у відповідності до розміщення міофібрил, розміри таких ядер у дорослих щурів становлять  $\sim 17$  мкм у довжину та  $\sim 5$  мкм завширшки [19]. Приклад ядер різних типів клітин представлено на рис. 1.1.



*Рис. 1.1. Приклад ядер різних типів клітин: А – ядра ацинарних клітин підшлункової залози (Gerasimenko J. et al., 2003); Б – ядро нейрона Пуркін'є (Marchenko S. et al., 2005); В – ядро скелетних м'язових волокон (Yarotskyu V. et al., 2014)*

Ядерна оболонка утворена двома мембранами: зовнішньою та внутрішньою, простір між якими називається перинуклеарним і слугує депо  $\text{Ca}^{2+}$  у клітині [20, 21, 22]. В місцях контакту двох мембран формується отвір – комплекс ядерної

пори [23, 24, 25] через який відбувається прямий обмін між цитоплазмою та нуклеоплазмою клітини (рис 1.2).

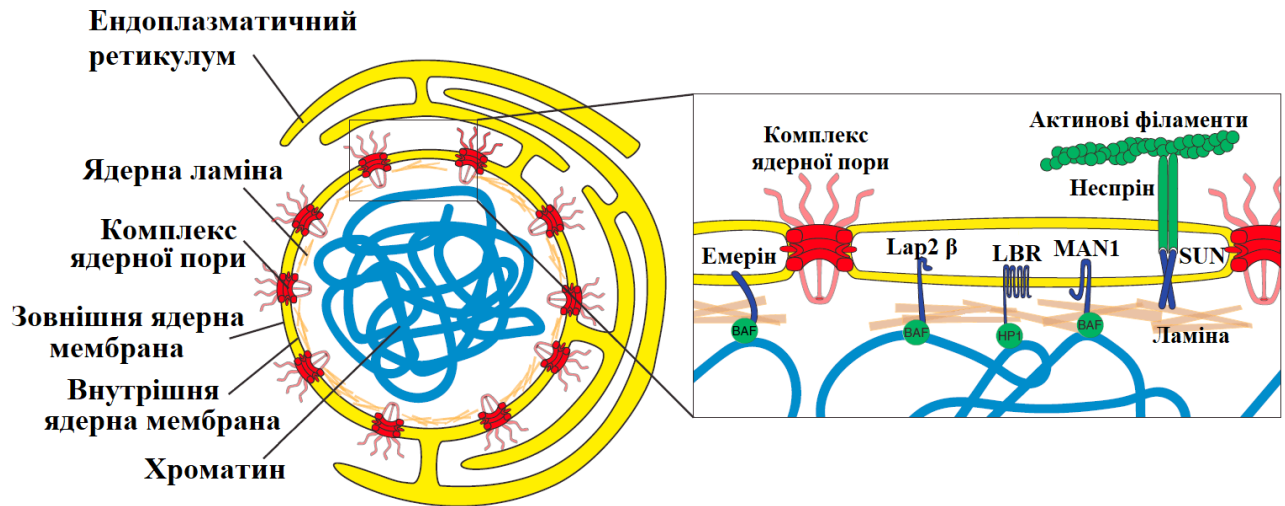


Рис. 1.2. Схематичне зображення структури ядра. Внутрішня мембрана містить характерний набір білків, що з'єднують ядерну оболонку з хроматином, взаємодіючи безпосередньо або опосередковано через хроматин-асоційовані білки: LBR – ламін-В-рецепторний протеїн; LAP2 β – ламін-асоційований поліпептид 2 ізоформа β; MAN1 (також відомий як LEMD3) – інтегральний білок внутрішньої ядерної мембрани. Ядерна ламіна додатково сполучена з цитоскелетом шляхом взаємодії через комплекс LINC (від англ. Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton), що складається з білків несприну і SUN (від англ. Sad1 and UNC-84 homology), що містяться у зовнішній та внутрішній ядерних мембранах відповідно (за De Magistris P. et al., 2018)

Ядерну оболонку можна детально розгледіти за допомогою електронної мікроскопії або після імунофарбування наявних у ній білків з використанням світлової/флуоресцентної мікроскопії. Такі дослідження дають змогу ідентифікувати динамічні глибокі інвагінації ядерної оболонки. Їх поділяють на два типи: I-тип – коли внутрішня ядерна мембрана утворює інвагінації в нуклеоплазму; II-тип – дві мембрани утворюють вгинання. Такі інвагінації в нуклеоплазму отримали назву нуклеоплазматичного ретикулуму, вони

збільшують площу обміну між цитоплазмою та нуклеоплазмою і утворюють контакт з хроматином глибоко всередині ядра [26].

Зовнішня мембрана є безперервною з ендоплазматичним ретикуломом (ЕР) / саркоплазматичним ретикуломом (СР) та містить рибосоми. ЕР являє собою тривимірну мережу каналців і цистерн, яка поширюється в клітині від ядра до плазматичної мембрани. ЕР можна умовно розділити на ядерний та периферійний і він може мати відмінну морфологію у різних ділянках клітини [27]. ЕР є основним депо  $\text{Ca}^{2+}$  в клітині і характеризується наявністю  $\text{Ca}^{2+}$ -насосів (помп), які накопичують  $\text{Ca}^{2+}$  та каналів вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$ . Також ЕР містить  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючі білки, вони утримують іони у просвіті депо [28]. Розгалуження ЕР в клітині дозволяє доставляти  $\text{Ca}^{2+}$  в різні її ділянки і забезпечувати точну регуляцію специфічних клітинних функцій, таких як стимуляція іонних каналів у плазматичній мембрані, регуляція мітохондріального обміну та регуляція експресії генів у ядрі [26, див. 29].

Внутрішня ядерна мембрана тісно взаємодіє з нуклеоскелетом (ламiнами А, В і С) за допомогою мембранних інтегральних білків ламiн-В-рецепторних протеїнів (LBR), білків LAP 1 і 2 (ламiн-асоційованих поліпептидів), несприну, MAN1 (також відомий як LEMD3) – інтегральний білок внутрішньої ядерної мембрани та емерину [25, 30]. Мутації генів, які кодують ламiни А/С та емерин призводять до дистрофії Емері-Дрейфуса [31]. Також у внутрішній ядерній мембрані описані ферментні апарати відповідальні за синтез  $\text{IP}_3$  і циклічного діацилгліцеролу (DAG) [32].

## 1.2. Транспортувальні системи ядерної мембрани

Ядерна оболонка слугує не лише для відмежування генетичного апарату, а також функціонує як  $\text{Ca}^{2+}$ -депо в клітині. Для забезпечення цієї функції у зовнішній та внутрішній ядерних мембранах наявні різні типи транспортувальних систем. Зовнішня ядерна мембрана структурно і функціонально пов'язана з мембраною СР та містить тотожні йому SERCA (від англ. sarco(endo)plasmic

reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) [33, 34, 35]. До родини SERCA належать продукти трьох генів, названих SERCA1, SERCA2 та SERCA3, кожен з яких породжує альтернативний сплайсинг мРНК та білкові ізоформи [35].

Також було показано, що ядерні мембрани містять іонні канали [5, 10, 35, 36], рецептори ангіотензину II [38], ріанодинові [39, 40] та  $\text{IP}_3$ -рецептори [13, 17, 20, 22],  $\text{Cl}^-$  канали [23, 41]. Загальна схема ядерної оболонки з транспортувальними системами у ній представлена на рис. 1.3.

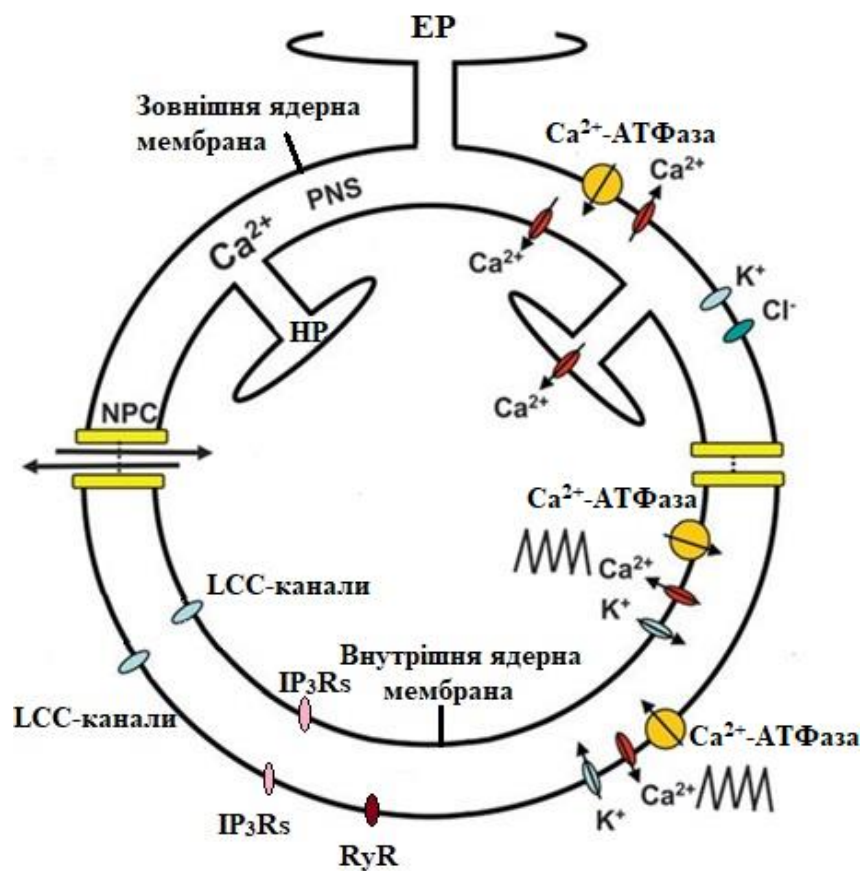


Рис. 1.3. Іонні канали і транспортери ядерної оболонки: PNS – перинуклеарний простір; EP – ендоплазматичний ретикулум; NR – нуклеоплазматичний ретикулум; NPC – комплекс ядерної пори (виділений жовтими лініями);  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  – іонні канали ядерної мембрани;  $\text{Ca}^{2+}$ -ATФаза, зигзагоподібна лінія – вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$ ;  $\text{IP}_3\text{Rs}$  –  $\text{IP}_3$ -рецептори; RyR – ріанодинові рецептори; LCC-канали – катіонні канали великої провідності (модифіковано з Matzke A. et al., 2010)

### 1.2.1. Будова та властивості ядерної пори

В місцях контакту внутрішньої та зовнішньої ядерних мембран утворюється отвір діаметром 100 нм, в якому знаходиться комплекс ядерної пори. Це надмолекулярна структура, що складається з білків нуклеопоринів загальною масою ~ 125 МДа. Незважаючи на великі розміри ядерної пори, вона формуються із лише близько тридцяти різних білків нуклеопоринів, які через 8-ми кратну симетрію ядерних пор присутні у 8, 16, 32 чи більше копіях [42, 43].

Функціонально нуклеопорини можна умовно розділити на три групи. Перша – трансмембранні, що закріплюють комплекс ядерної пори у мембрані. Члени другої групи нуклеопоринів належать до симетрично структурного каркасу комплексу ядерної пори, а третя група це в основному неструктуровані нуклеопорини, які містять велику кількість фенілаланін-гліцинових (FG) повторів та утворюють бар'єр проникності, який необхідний для нуклеоцитоплазматичного транспорту [44].

Структурний каркас ядерної пори утворений із трьох кілець: нуклеоплазматичного та цитоплазматичного, між якими знаходиться внутрішнє кільце, яке забезпечує зв'язок між мембраною пори і бар'єром проникності. До цієї структури зазвичай приєднується ядерний кошик і цитоплазматичні філаменти [44, 45, 46].

У центральній частині пори знаходиться варіабельний канал з діаметром від 10 до 40 нм, через який відбувається транспорт між нуклеоплазмою і цитоплазмою [42, 43]. Проникність ядерних пор неоднакова для різних молекул. Невеликі молекули здатні пасивно дифундувати в ядро, тоді як молекули понад 60–70 кДа проникають шляхом активного транспорту (молекули РНК) [42]. Схематичне зображення комплексу ядерної пори представлено на рис. 1.4.

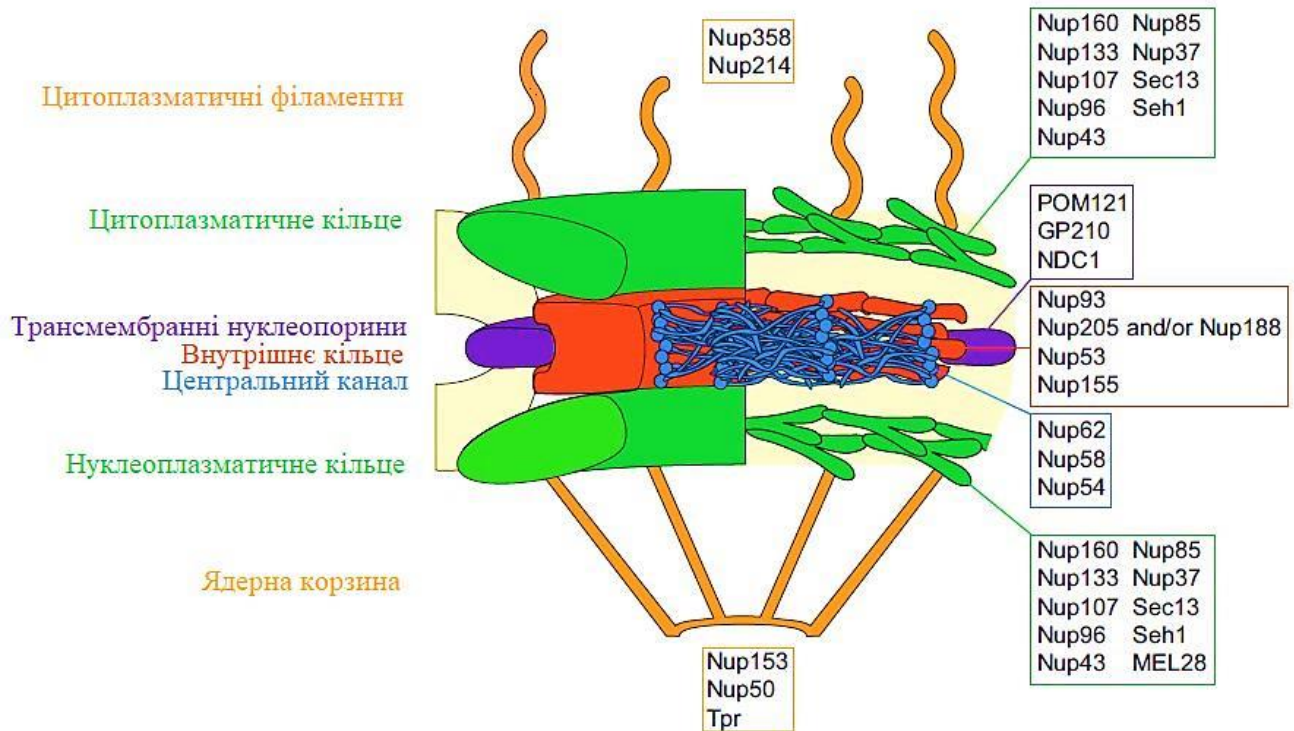


Рис. 1.4. Схематичне зображення організації комплексу ядерної пори та білків нуклеопоринів (Nup), що її утворюють. Цитоплазматичні та нуклеоплазматичні кільця (показані зеленим кольором), кожен з них в основному утворений 16-ма копіями нуклеопоринів, розташованими по двох восьмичленних кільцях. Внутрішнє кільце переважно утворене 32 копіями нуклеопоринів (показано червоним). Трансмембранні нуклеопорини зображені фіолетовим кольором, цитоплазматичні філаменти та ядерний кошик – помаранчевим. До внутрішнього кільця прикріплені комплекси Nup62, Nup58, Nup54 (зображені синім кольором), які утворюють згуртовані сітки в центральному каналі (за Weberruss M. et al., 2016)

Перенесення речовин через ядерну оболонку, долаючи бар'єр проникності мембрани з цитоплазми в ядро і навпаки, відбувається за допомогою рецепторів ядерного транспорту (NTRs), які також називають каріоферини. Розрізняють різні типи рецепторів залежно від напрямку переміщення речовин: імпортини – розпізнають речовини, що несуть сигнали ядерної локалізації (NLSs) і транспортують їх у ядро. Сигнали ядерної локалізації – це специфічні сигнальні

послідовності, які розпізнаються транспортними рецепторами. Тоді як експортини зв'язуються з речовинами, що мають сигнали ядерного експорту (NESs) переносячи їх у цитоплазму. Є і такі рецептори, які здійснюють перенесення речовин у дві сторони [44].

Ключову роль в активному ядерно-цитоплазматичному транспорті відіграє мала ГТФаза Ran (від англ. **R**as-related **n**uclear), яка визначає напрям перенесення імпортинів та експортинів через ядерну пору. ГТФ (гуанозинтрифосфат) та ГДФ (гуанозиндифосфат) утворюють комплекси з Ran, яка складається з невеликого G-домена і має дві поверхневі петлі switch-I і switch-II, котрі здатні змінювати конформацію залежно від нуклеотиду який приєднується. Фактор обміну нуклеотидів GEF (від англ. **G**TPase **E**xchange **F**actor) для Ran-ГДФ, білок RCC1 зв'язаний з хроматином, в той час як активатор ГТФазної активності GAP (від англ. **G**APase **A**ctivation **P**rotein) RanGAP1 знаходиться виключно у цитоплазмі. Така асиметрична локалізація встановлює напрямок нуклео-цитоплазматичного транспорту через градієнт: в ядрі знаходиться переважно ГТФ-зв'язана форма Ran, у цитоплазмі ГДФ-зв'язана. Таким чином Ran забезпечує енергію для імпорту і експорту речовин [44, див. 47].

Після розпізнавання NLS-білків рецепторами, утворений комплекс транспортується через канал пори у ядро, де з ним зв'язується Ran-ГТФ, що призводить до дисоціації комплексу і вивільнення речовин. Після цього імпортини в комплексі з малою ГТФ-Ran повертаються в цитоплазму, де Ran під дією RanGAP1 гідролізує ГТФ до ГДФ. Комплекс Ran-ГДФ повертається в ядро за допомогою власного переносника – димерного білка NTF2. Під впливом білка RanGEF у ядрі ГДФ у активному центрі Ran замінюється на ГТФ і цикл замикається [44, 46, див. 47].

Вивільнення речовин з ядра відбувається за тим самим принципом, але у зворотному напрямку. Спочатку необхідне формування тримерного комплексу речовина–NTR–Ran-ГТФ. Після надходження в цитоплазму цей комплекс дисоціює, вивільняючи речовину [44, див. 47]. На рис. 1.5 представлено схему транспорту речовин через комплекс ядерної пори.



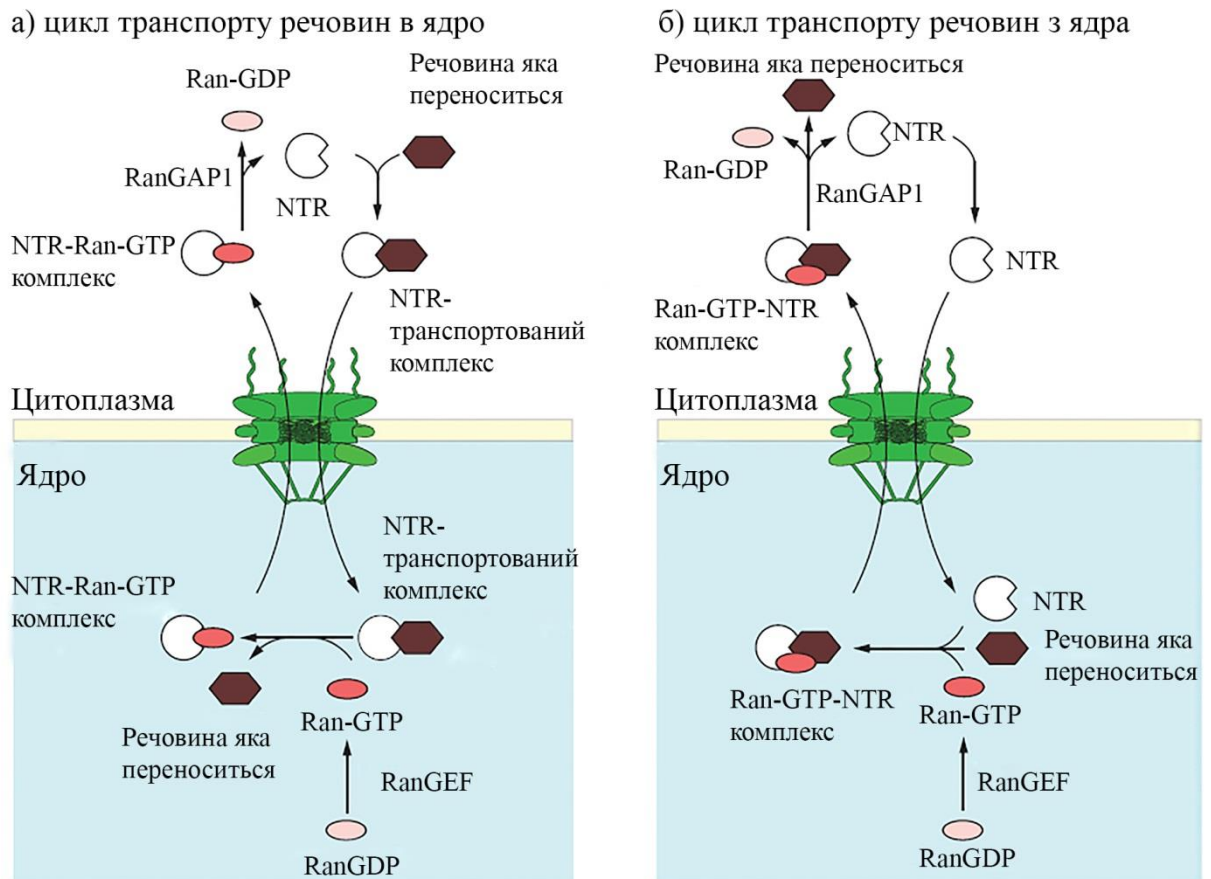


Рис. 1.5. Активний транспорт речовин через комплекс ядерної пори. (а) В цитоплазмі сформований комплекс, що відповідає за переміщення речовин у ядро, він складається з компоненту NLSs (від англ. Nuclear Localization Signals), яка переносить речовину і ядерного транспортного рецептора NTRs (від англ. Nuclear Transport Receptors). Після переміщення через комплекс ядерної пори Ran-ГТФ витісняє речовину з NTR, що приводить до її вивільнення. Ця реакція відбувається завдяки локалізованому у хроматині RanGEF (від англ. Ran Guanine-nucleotide Exchange Factor). Комплекс NTR – Ran-ГТФ повертається у цитоплазму через ядерну пору, де Ran ГТФаз-активуючий білок (RanGAP1) стимулює гідроліз ГТФ вивільняючи NTR для наступного транспорту у ядро. (б) Для вивільнення речовин з ядра необхідне формування у ньому тримерного комплексу речовина–NTR–Ran-ГТФ. Після проходження через ядерну пору цей комплекс дисоціює через гідроліз Ran-ГТФ, вивільняючи речовину в цитоплазму (за Weberruss M. and Antonin W., 2016)



## 1.2.2. Різноманітність іонних каналів ядерної мембрани

Крім ядерних пор, мембрани містять канали і транспортери різних типів, через які постійно відбувається переміщення іонів крізь мембрану. Слід зазначити, що пора пронизує дві мембрани – забезпечуючи транспорт речовин безпосередньо між цитоплазмою та нуклеоплазмою, а канали розміщені на внутрішній і зовнішній ядерних мембранах й через них речовини можуть бути транспортовані із перинуклеарного простору в цитоплазму/нуклеоплазму і у зворотному напрямку [37, 42]. Іншою відмінністю між іонними каналами та ядерними порами є те, що канали є селективними до певних іонів, в той час як перенесення речовин через пори диференціюється по розміру транспортованих молекул. Молекули з розміром до 40 кДа проникають через ядерні пори шляхом пасивної дифузії, а молекули більшого розміру транспортуються спеціальними переносниками [37, 39, 44].

Згідно з даними багатьох авторів у ядерній оболонці ідентифіковані різні типи транспортерів та іонних каналів. Серед них: R-тип  $\text{Ca}^{2+}$  каналів,  $\text{Cl}^-$ -канали, ріанодинові та  $\text{IP}_3$ -рецептори,  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи [див. 37, 39, 41, 48, 49], кілька різновидів  $\text{K}^+$ -селективних каналів: АТФ-залежні  $\text{K}^+$ -канали [50]. TRIC канали (від англ. **T**rimeric **I**ntracellular **C**ation channels) двох підтипів TRIC-A та TRIC-B [51], NMCC (від англ. **N**uclear **M**onovalent **C**ationic **C**hannel) [52], високопровідні  $\text{Ca}^{2+}$ -активовані  $\text{K}^+$ -канали (BK-канали) [53, 54].

### 1.2.2.1. Властивості LCC-каналів ядерної мембрани

За допомогою методу *patch-clamp* було показано наявність в ядерній мембрані нейронів Пуркінє катіонних каналів з великою провідністю (LCC-канали, від англ. **L**arge **C**onductance **C**ation channels). Ці канали є селективними до моновалентних катіонів  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  та  $\text{Li}^+$ , але непроникними для великих катіонів, таких як N-methyl-D-glucamine (NMDG). В наступних експериментах з визначення селективності до двовалентних катіонів було показано, що вони

непроникні до  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{Ba}^{2+}$ . Також канали цього типу є непроникними для  $\text{Cl}^-$  [5, 55].

LCC-канали характеризуються високою щільністю, залежністю від потенціалу, мають повільну кінетику, провідність їх у симетричному розчині KCl (150 ммоль/л) становить  $198 \pm 27$  пСм [5]. Канали такого типу експресуються у зовнішній та внутрішній ядерних мембранах нейронів Пуркінє [5].

У ядерній мембрані CA1-ділянки гіпокампа зареєстровано струм через канали з провідністю 220–260 пСм, які за своїми біофізичними властивостями подібні до LCC-каналів описаних у нейронах Пуркінє. Однак канали внутрішньої мембрани ядер нейронів CA1-ділянки гіпокампа мають більшу чутливість до негативних потенціалів і повністю пригнічуються при потенціалі -40 мВ [56, 57]. Також канали цього типу були ідентифіковані в ядерних мембранах гранулярних нейронів зубчастої звивини гіпокампа [57].

Раніше було перевірено чутливість LCC-каналів до дії специфічних блокаторів  $\text{K}^+$ -каналів 4-амінопіридину (2 ммоль/л), тетраетиламонію (10 ммоль/л), але вони виявились неефективними. Також не впливали на функціональну активність гепарин – блокатор  $\text{IP}_3$ -рецепторів, рутеній червоний – блокатор ріанодинових рецепторів. Фізіологічні концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  (0,05–50 мкмоль/л), АТФ (0,5–5 ммоль/л),  $\text{Mg}^{2+}$  (1–5 ммоль/л) [5]. У 2016 році було показано, що блокатор н-холінорецепторів d-тубокурарин пригнічує активність LCC-каналів, під його впливом виникають швидкі короткочасні спроби відкривання – закривання каналу [6]. Також було перевірено вплив комплексів токсинів крайта (*Bungarus fasciatus*), скорпіона (*Heterometrus laoticus*), гадюки (*Vipera renardi*) та (*Bitis arietans*), кобри (*Naja kaouthia*) на функціональну активність LCC-каналів. Дослідження показали, що  $P_o$  цих каналів зменшується на 76–86 %. Аплікація комплексів токсинів *H. laoticus* та *B. fasciatus* призводила до зменшення амплітуди струму на 43 і 26 % відповідно [4].

### 1.2.2.2. Інші типи каналів ядерної оболонки

В ядрах  $\beta$ -клітин підшлункової залози миші знайдені АТФ-залежні  $K^+$ -канали, які активуються аденозиндифосфатом (АДФ) та блокуються мілімолярними концентраціями аденозинтрифосфату (АТФ). Внаслідок інгібування цих каналів збільшується концентрація  $Ca^{2+}$  в ядрі, що призводить до активації фактору транскрипції генів CREB (від англ. **C**AMP **R**esponse **E**lement-**B**inding) [50].

У 2007 році Takeshima з колегами ідентифікували канали селективні до одновалентних катіонів, названі TRIC каналами (від англ. **T**rimeric **I**ntracellular **C**ation channels), вони локалізовані у CP/EP багатьох типів клітин. TRIC-A підтип експресується переважно у CP збудливих клітин, тоді як TRIC-B ідентифікували у більшості тканин. Автори передбачають, що ці два підтипи каналів виконують різні функції в  $Ca^{2+}$  сигналізації у збудливих та незбудливих клітинах. Нокаут TRIC-B може впливати на вивільнення  $Ca^{2+}$  через  $IP_3$ -рецептори, тоді як TRIC-A модулюють вивільнення  $Ca^{2+}$  крізь р'янодинові рецептори [51, 58].

NMCC (від англ. **N**uclear **M**onovalent **C**ationic **C**hannel) канали були ідентифіковані у внутрішній ядерній мембрані скелетних м'язів дорослих мишей. Вони характеризуються проникністю до  $K^+$ , не пропускають двовалентні катіони та інгібуються іонами  $Ca^{2+}$  [52].

Також  $K^+$ -селективні канали з провідністю 200–250 пСм ідентифіковані у зовнішній ядерній мембрані гепатоцитів і зиготи миші [59]. У ядерних мембранах також було ідентифіковано хлорні канали з провідністю 180, 96 і 58 пСм відповідно [41, 59]. В ядрах гепатоцитів ідентифіковані канали з малою провідністю для  $Ca^{2+}$  та  $Zn^{2+}$  [60].

У ядерній оболонці нейронів гіпокампа виділених з мишей дикого типу, щурів *Sprague-Dawley* та клітинах мікроглії мишей ідентифіковано високопровідні  $Ca^{2+}$ -активовані  $K^+$ -канали (ВК-канали) з провідністю 220 пСм [53, 54], які забезпечують взаємозв'язок між активністю нейронів, ядерною  $Ca^{2+}$  сигналізацією та експресією генів [53].

### 1.2.3. Системи транспортування $\text{Ca}^{2+}$ в ядерній оболонці

Локалізація у ядерній оболонці каналів, що вивільняють  $\text{Ca}^{2+}$  є важливою для генерації просторово складних  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналів. У зовнішній ядерній мембрані є  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФази типу SERCA, що транспортують два іони кальцію в обмін на гідроліз однієї молекули АТФ і діють проти градієнту концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ , щоб відновити рівень  $\text{Ca}^{2+}$  в люмені ЕР [61]. Було продемонстровано, що  $\text{Ca}^{2+}$  помпи зовнішньої ядерної мембрани є тотожними, що і у ЕР [33].

За допомогою імуногістохімічного аналізу було продемонстровано наявність ріанодинових рецепторів другого типу у ядерній оболонці ембріональних клітин серця [34] та міобластах [62]. Окрім ріанодинових рецепторів у зовнішній та внутрішній ядерних мембранах експресуються інші канали вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  –  $\text{IP}_3$ -рецептори [5, 11, 20, 22].

З використанням флуоресцентних міток показано присутність R-типу  $\text{Ca}^{2+}$  каналів (відомий також як  $\text{Ca}_v2.3$ ), який не інактивується під час стійких деполяризуючих потенціалів та має провідність 24 пСм його активація відбувається при тривалій деполяризації або стійкою специфічною стимуляцією GPCR (англ. G-protein-coupled receptors) [39]. Цей тип каналів також експресується в мембранах нервових клітин [63].

У мембрані ізольованих ядер кортикальних нейронів і клітин лінії NG108-15 (лінія гібридних клітин нейробластоми і гліоми) за допомогою імуногістохімічного аналізу ідентифіковано  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  обмінник, який активується гангліозидом (GM1). На основі імуноблот-аналізу виявлено тісний взаємозв'язок GM1 з  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  обмінником у внутрішній ядерній мембрані, що дозволяє припустити, що ця система може функціонувати для передачі  $\text{Ca}^{2+}$  між нуклеоплазмою і перинуклеарним просвітом [64].

Регуляція перинуклеарного і нуклеарного  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу через R-тип  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів і  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи, а також опосередковано через  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  обмінник відіграє важливу роль у функціонуванні ядра, а саме експресії генів, синтезу білків та перенесенні макромолекул через комплекс ядерних пор [39].

### 1.3. Ядерна оболонка як кальцієве депо, джерела $\text{Ca}^{2+}$ в ядрі

Як депо  $\text{Ca}^{2+}$  в клітинах служать: ЕР [65, 66], мітохондрії [67, 68, див. 69], перинуклеарний простір [65, див. 69], комплекс Гольджі [35, див. 69], секреторні гранули [див. 69]. Накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях відбувається найчастіше під час його вивільнення з інших депо, їх часто знаходять в безпосередній близькості до ЕР [65], а вихід  $\text{Ca}^{2+}$  з мітохондрій є спонтанним, тобто не запускається агоністами [див. 69].

Показано, що ядерні оболонки ооцитів, гепатоцитів, нейронів і низки інших клітин є функціональними  $\text{Ca}^{2+}$ -депо [5, 20, 21, 22]. Шляхом вимірювання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у ядерній оболонці з використання флуоресцентних зондів встановлено, що в інтактних клітинах у стані спокою це значення становить 250–350 мкмоль/л [70]. В  $\text{Ca}^{2+}$ -депо багатьох типів тканин, включаючи оцити та ембріони людини, епітеліальні клітини виявлений білок кальретикулін, який здатний зв'язувати  $\text{Ca}^{2+}$  [71, 72, 73, 74]. Наявність білка, що зв'язує  $\text{Ca}^{2+}$  в ядерній оболонці підтверджує її роль як  $\text{Ca}^{2+}$  депо [26].

Регуляція концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у ядрі є прикладом складної форми локальної  $\text{Ca}^{2+}$  сигналізації, яка може мати специфічні ефекти, відмінні від тих, що спостерігаються в цитоплазмі. Наявність  $\text{Ca}^{2+}$  є визначальною для сигнальних шляхів, які регулюють експресію генів, стимулюючи транслокацію факторів транскрипції з цитозолу до ядра [75, 76]. Використання селективних буферів для цитоплазматичного або нуклеоплазматичного  $\text{Ca}^{2+}$  дозволило прямо продемонструвати, що проліферація клітин залежить від  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналів всередині ядра, а не лише у цитоплазмі [26, 77, 78].

У стані спокою концентрація вільного  $\text{Ca}^{2+}$  в ядрі більша ніж у цитоплазмі клітини [79, 80]. У цитоплазмі  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{вільний}}$  коливається в межах від 50 до 100 нмоль/л [81], тоді як у нуклеоплазмі близько 300 нмоль/л. В перинуклеарному просторі  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{вільний}}$  становить  $\sim 600$  нмоль/л [34, 39, 79, 80, 81, 82]. Схематичне зображення розподілу  $\text{Ca}^{2+}$ , а також немітохондріальні  $\text{Ca}^{2+}$ -депо у клітині представлено на рис. 1.6.

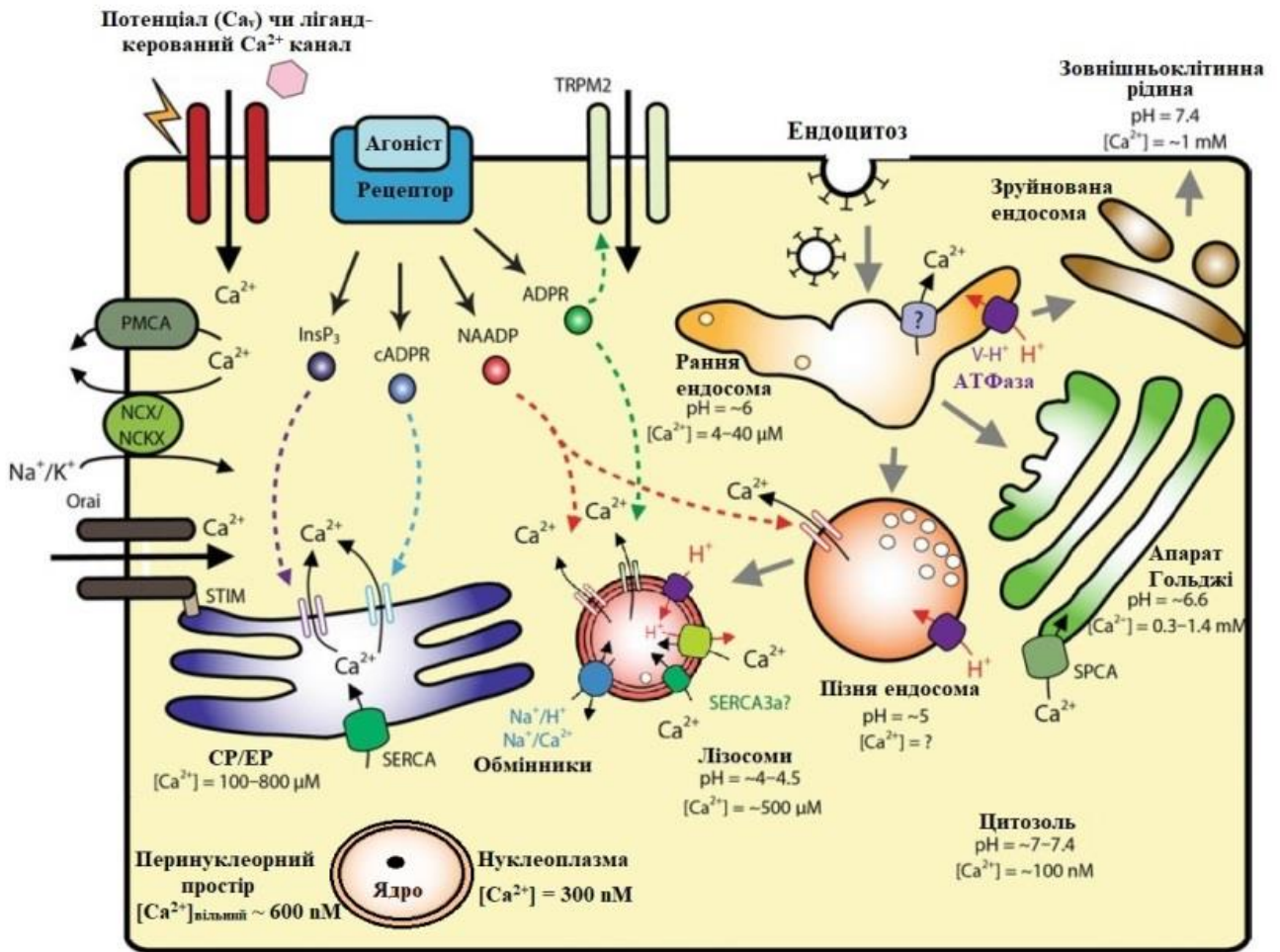


Рис. 1.6. Схематичне зображення немітохондріальних депо  $Ca^{2+}$  в клітині.  $Ca^{2+}$  може надходити в цитозоль із позаклітинного простору через потенціал-чи ліганд-керовані канали плазматичної мембрани або з внутрішньоклітинних депо, таких як ER, перинуклеарний простір, апарат Гольджі (модифіковано з Galione A. et al., 2020)

Залежно від типу клітин концентрація  $Ca^{2+}$  в ядрі регулюється кількома шляхами: по-перше –  $Ca^{2+}$  може потрапляти в нуклеоплазму прямим вивільненням  $Ca^{2+}$  з перинуклеарного простору через канали у внутрішній ядерній мембрані або проникати шляхом пасивної дифузії з цитозолу через численні ядерні пори [83, 84]. Підтримання  $Ca^{2+}$ -гомеостазу в цитозолі забезпечують депокеровані  $Ca^{2+}$ -канали (від англ. store-operated  $Ca^{2+}$ -channels, SOCC), які активуються після спустошення внутрішньоклітинних депо [див. 69, 85].

Основними каналами вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  в ядрі є  $\text{IP}_3$ -рецептори. Збільшення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в ядрі регулює транскрипцію генів шляхом активації ядерних  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливих кіназ та фосфатаз або безпосередньо впливаючи на  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючі фактори транскрипції [26].

#### 1.4. Структура і властивості $\text{IP}_3$ -рецепторів

Інозитол-1,4,5-трифосфатні рецептори ( $\text{IP}_3$ -рецептори) – це ліганд-керовані  $\text{Ca}^{2+}$ -канали в основному локалізовані в ЕР/СР [87]. В деяких типах клітин вони знайдені в апараті Гольджі, секреторних везикулах і ядерній мембрані скелетних м'язових волокон, кардіоміоцитів, нейронів [2, 5, 86].  $\text{IP}_3$ -рецептори також виявлено в нуклеоплазматичному ретикулумі клітин печінки [72], клітин MDCK [74], кардіоміоцитах [88] і клітинах гладкої мускулатури [89].

Родина  $\text{IP}_3$ -рецепторів складається з трьох ізоформ, кодованих різними генами ( $\text{IP}_3\text{R1}$ ,  $\text{IP}_3\text{R2}$ ,  $\text{IP}_3\text{R3}$ ). Кожна ізоформа має приблизно 2700 амінокислот, а їх молекулярна маса становить приблизно 300 кДа. Коекспресуючись в різних тканинах, рецептори формують гомо- і гетеротетрамери [90, 91, 92]. Вперше цілісно клоновані  $\text{IP}_3$ -рецептори були:  $\text{IP}_3\text{R1}$  (1989 р.) [93],  $\text{IP}_3\text{R2}$  (1991 р.) [94],  $\text{IP}_3\text{R3}$  (1993 р.) [95]. Всі три ізоформи  $\text{IP}_3$ -рецепторів мають високу гомологію 60 – 70 %. Білки  $\text{IP}_3$ -рецепторів структурно і функціонально розділені на 5 різних доменів: N-кінцевий домен, з котрим зв'язується ліганд інозитол-1,4,5-трифосфат ( $\text{IP}_3$ ), супресорний домен, внутрішній модулюючий домен, і С-кінцевий домен [96]. Модулюючий домен також є місцем для посттрансляційних модифікацій, які модулюють  $\text{IP}_3$ -індуковане вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$ , а також домен, котрий формує власне канал та ворітний домен [97, 98, 99, 100]. Схематичну структуру  $\text{IP}_3$ -рецепторів на прикладі  $\text{IP}_3\text{R2}$  представлено на рис. 1.7.

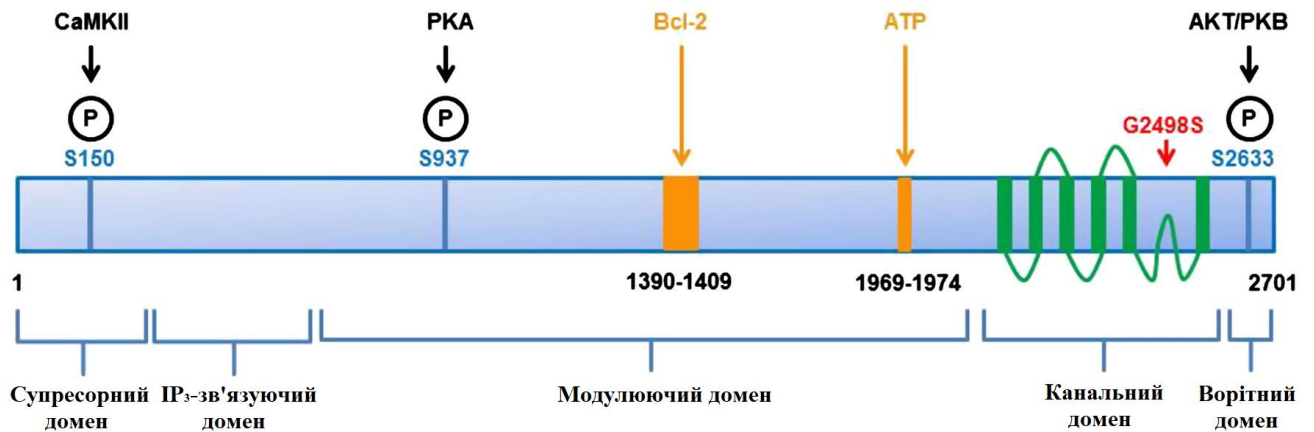
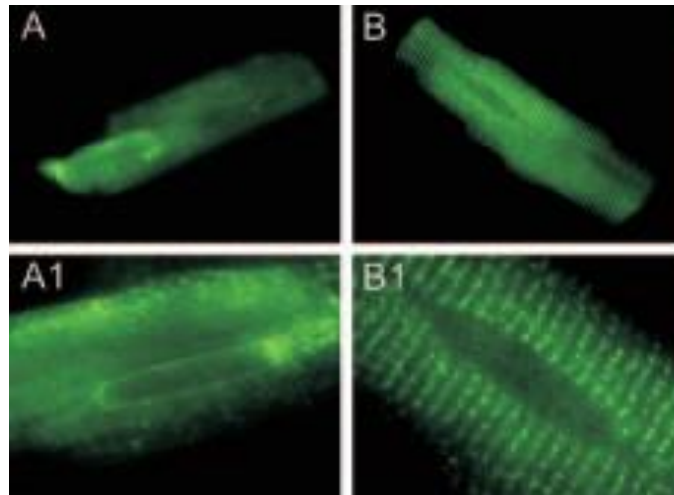


Рис. 1.7. Структура інозитол-1,4,5-трифосфатних рецепторів на прикладі  $IP_3R2$ . Представлено п'ять функціональних доменів – синім кольором. Канальний домен має 6 трансмембранних спіралей, які з'єднані петлями (зображені зеленим кольором). Продемонстровано також місця взаємодії з АТФ та Bcl-2 – виділені оранжевим кольором (Vervloessem T. et al., 2015)

Переважає більшість типів клітин експресують більше однієї ізоформи  $IP_3$ -рецепторів, але їх відносна частка може бути дуже мінливою [101, 102, 103, 104, 105]. У нервовій тканині переважає перший тип  $IP_3$ -рецепторів [5], тоді як у передсердях та шлуночках кардіоміоцитів переважає  $IP_3R2$  [2, 11, 106, 107, 108].

Експресія  $IP_3$ -рецепторів в кардіоміоцитах менш виражена порівняно з ріанодиноним рецептором, їх кількісне співвідношення становить 1:100 [107]. Варе із співав. у 2005 році за допомогою імуногістохімічного дослідження показали, що  $IP_3$ -рецептори в кардіоміоцитах локалізовані в ділянці навколо ядра, в той час як ріанодинові рецептори переважно експресуються в СР (рис. 1.8) [2]. До того ж таке специфічне розташування  $IP_3$ -рецепторів потенційно дозволяє генерувати автономні ядерні  $Ca^{2+}$ -сигнали, що можуть відігравати ключову роль у регуляції транскрипції генів [84].





*Рис. 1.8. Ізольовані міоцити шлуночків, мічені антитілами до  $IP_3R2$  та ріанодинових рецепторів (імунофлуоресцентне фарбування). А –  $IP_3$ -рецептори експресовані навколо ядра, В – локалізація ріанодинових рецепторів у СР. А1, В1 – збільшені зображення відповідно А і В (за Bare D. et al., 2005)*

Також представлено значні докази залучення  $IP_3$ -рецепторів у патології, що призводять до перевантаження  $Ca^{2+}$  та апоптичної смерті кардіоміоцитів. Експресія  $IP_3$ -рецепторів та інших рецепторів, пов'язаних із сигнальним шляхом фосфоліпази С змінюється при захворюваннях міокарду, таких як аритмія [16], фібриляція передсердь [17], інфаркт міокарду [18] та діабетична кардіоміопатія [109] гіпертрофія серця [110, 111, 112]. В цей час функціональна активність  $IP_3$ -рецепторів зростає і це сприяє ремоделюванню серця [15, 18, 87].  $IP_3$ -рецептори можуть брати участь у аритмогенезі, наприклад  $Ca^{2+}$ , що виділяється через  $IP_3$ -рецептори може спровокувати вивільнення  $Ca^{2+}$  через ріанодинові рецептори, спричиняючи тим самим посилення  $Ca^{2+}$ -транз'єнтів [113].

#### **1.4.1. Механізми активації $IP_3$ -рецепторів**

Утворення інозитол-1,4,5-трифосфату ( $IP_3$ ) відбувається шляхом активації GPCR, зокрема, пов'язаних з  $G_{q/11}$  субодиницею, що призводить до активації фосфоліпази С, яка розщеплює фосфатидилінозитол-4,5-біфосфат (PIP2) на інозитол-1,4,5-трифосфат ( $IP_3$ ) та DAG. DAG залишається зв'язаним з мембраною,

а розчинний  $IP_3$  вивільняється в цитозоль. Потім  $IP_3$  активує  $IP_3$ -чутливі рецептори, розташовані на СР/ЕР, сприяючи  $IP_3$ -індукованому вивільненню  $Ca^{2+}$  у цитоплазму (рис. 1.9) [9].

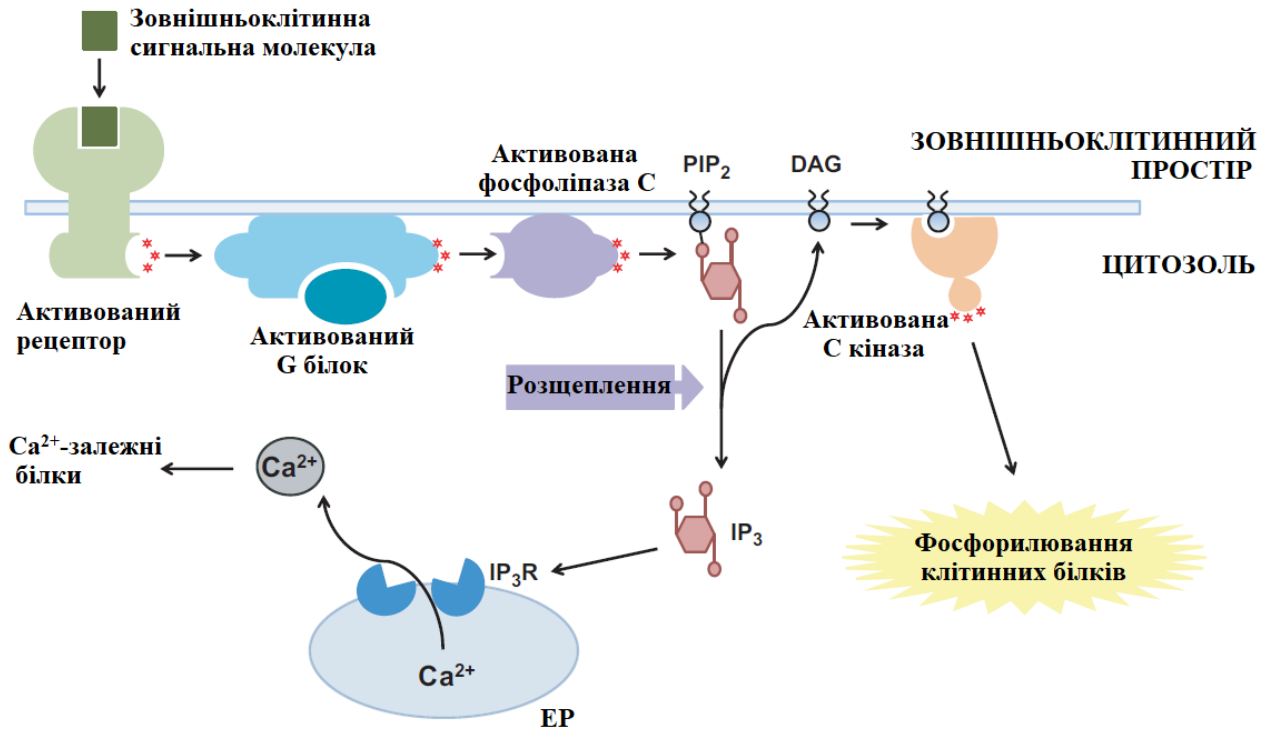


Рис. 1.9. Шлях активації  $IP_3$ -рецепторів. Позаклітинний агоніст активує рецептор, який зв'язується зі специфічним G-білком, що призводить до активації фосфоліпази C і розщеплення  $PIP_2$  до  $IP_3$  та DAG. Молекули  $IP_3$  дифундують через цитозоль та зв'язуються з  $IP_3$ -рецепторами, що призводить до  $IP_3$ -індукованого вивільнення  $Ca^{2+}$  (за Egorova P. et al., 2018)

Збільшення концентрації цитозольного  $Ca^{2+}$  спричиняє каскад внутрішньоклітинних відповідей і тим самим впливає на активність різних білків та ферментів [114]. Схема вивільнення  $Ca^{2+}$  та сайти зв'язування  $IP_3$  та  $Ca^{2+}$  з  $IP_3$ -рецептором представлено на рис. 1.10.

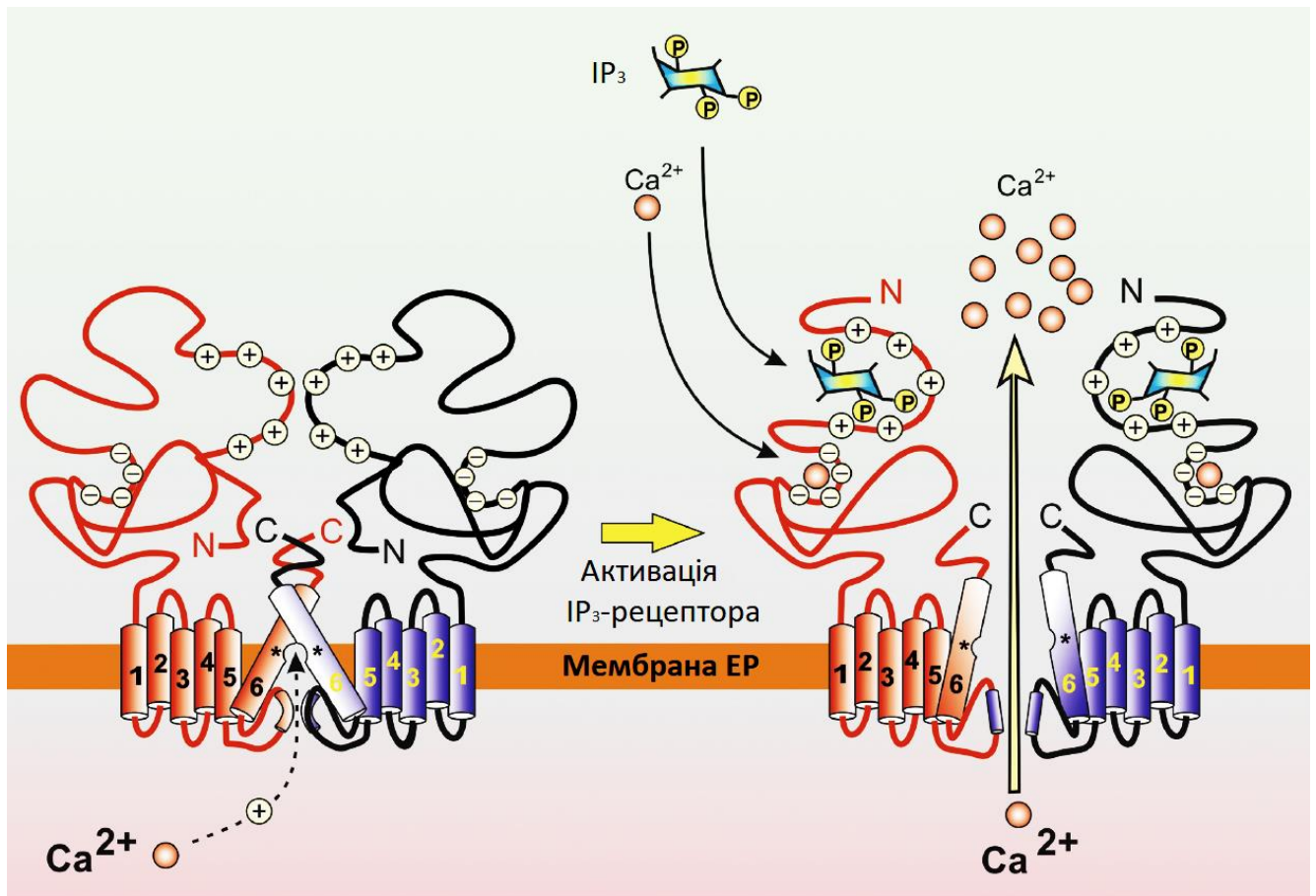


Рис. 1.10. Сайти зв'язування  $IP_3$ -рецептора з  $Ca^{2+}$  та  $IP_3$ .  $IP_3$ -рецептор складається з чотирьох субодиниць, дві з яких проілюстровані тут. Наявні трансмембранні домени з поровою петлею, а також довга  $NH_2$ -кінцева ділянка, яка поширюється в цитоплазму, поблизу неї знаходяться сайти зв'язування  $Ca^{2+}$  та  $IP_3$ . Її конформаційні зміни, що призводять до відкриття пори та вивільнення  $Ca^{2+}$  в цитоплазму (за Berridge M. 2016, базуючись на інформації Taylor et al., 2004)

Експериментально було підтверджено, що збільшення концентрації  $Ca^{2+}$  інгібує  $IP_3$ -індуковане вивільнення  $Ca^{2+}$  у гладком'язових клітинах тонкого кишечника морської свинки [115].

### 1.4.2. Біофізичні характеристики IP<sub>3</sub>-рецепторів різних типів

IP<sub>3</sub>-рецептори утворюють канал, який характеризується великою провідністю та селективністю для Ca<sup>2+</sup>, але також може пропускати одновалентні та двовалентні катіони. P<sub>Ca</sub>/P<sub>K</sub> зазвичай знаходиться між 6 і 8, а одноканальна провідність має наступну послідовність: Ba<sup>2+</sup> > Sr<sup>2+</sup> > Ca<sup>2+</sup> > Mg<sup>2+</sup>. Однак, це не впливає на його функцію як каналу вивільнення Ca<sup>2+</sup>, оскільки Ca<sup>2+</sup> є єдиним іоном, який активно накопичується в ER [116].

Ізоформи IP<sub>3</sub>-рецепторів мають схожу структуру, однак вони відрізняються за чутливістю до модулюючих агентів. Показано, що IP<sub>3</sub>R2 мають вищу афінність до зв'язування IP<sub>3</sub> в порівнянні з двома іншими типами рецепторів. Порядок ранжування за чутливістю до IP<sub>3</sub> виглядає наступним чином: IP<sub>3</sub>R2 > IP<sub>3</sub>R1 > IP<sub>3</sub>R3 (14, 50 та 163 нмоль/л відповідно) [101, 117, 118, 119]. Подібні результати у спорідненості до IP<sub>3</sub> відображаються також у експериментах на клітинах DT40 ТКО (лінія клітин з нокаутом генів трьох типів IP<sub>3</sub>-рецепторів) та Sf9 (лінія клітин виділених з личинки *Spodoptera frugiperda*, яку використовують для експресії рекомбінантних білків [120] в яких експресували один тип IP<sub>3</sub>-рецептора [121, 122]).

Показано, що активність IP<sub>3</sub>-рецепторів може бути двофазно регульована цитозольною концентрацією Ca<sup>2+</sup>. Це означає, що низькі концентрації Ca<sup>2+</sup> (зазвичай менше 0,3 мкмоль/л) активують вивільнення Ca<sup>2+</sup> спричинене IP<sub>3</sub>, тоді як високі призводять до інгібування IP<sub>3</sub>-рецепторів. Графік залежності активності IP<sub>3</sub>-рецепторів від [Ca<sup>2+</sup>] має форму типової дзвоноподібної кривої. Первинні дані були отримані на гладких м'язах [123], нейронах [7, 124] та ооцитах [125], які характеризуються значною експресією IP<sub>3</sub>R1.

Хоча стимулююча дія Ca<sup>2+</sup> на активність IP<sub>3</sub>R ніколи не викликала сумнівів, інгібуюча дія високої концентрації Ca<sup>2+</sup> не завжди чітко спостерігалася. Група під керівництвом Безпрозванного виявила досить вузькі криві залежності активності кожної з трьох ізоформ IP<sub>3</sub>-рецепторів від концентрації Ca<sup>2+</sup>, при цьому як для гетерологічно експресованих у клітинах комах Sf9, так і вбудованих у ліпідних

бішарах [126]. Найбільш чутливими до  $\text{Ca}^{2+}$  виявилися  $\text{IP}_3\text{R}_3$  (з піком 107 нмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ ).  $\text{IP}_3\text{R}_2$  найбільш активні при 154 нмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі, а  $\text{IP}_3\text{R}_1$  при 257 нмоль/л [126].

Чутливість  $\text{IP}_3$ -рецепторів до  $\text{Ca}^{2+}$  за наявності різних концентрацій АТФ у середовищі відрізняється між окремими типами цих рецепторів. При цьому  $\text{IP}_3\text{R}_2$  більш чутливі до АТФ ніж  $\text{IP}_3\text{R}_1$  чи  $\text{IP}_3\text{R}_3$  ( $\text{EC}_{50}$  40, 100 і 50 мкмоль/л відповідно).  $\text{IP}_3\text{R}_1$  має високоафінний (0,13 ммоль/л) алостеричний центр зв'язування АТФ,  $\text{IP}_3\text{R}_2$  є АТФ-незалежним, а  $\text{IP}_3\text{R}_3$  має низькоафінний (2 ммоль/л) алостеричний центр зв'язування АТФ [127]. Чутливість  $\text{IP}_3\text{R}_2$  до  $\text{Ca}^{2+}$  не залежить від наявності АТФ, але АТФ збільшить  $P_o$   $\text{IP}_3\text{R}_2$  [див. 100].

При дослідженні рекомбінантних  $\text{IP}_3$ -рецепторів експресованих у клітинах Sf9 (за наявності 50 ммоль/л  $\text{Ba}^{2+}$ ), встановлено, що для усіх трьох його ізоформ провідність каналу становить 74–80 пСм. Середня тривалість перебування каналу у відкритому стані для всіх типів рецепторів становить 7–8 мс, а у закритому 10 мс [126]. Провідність рекомбінантних  $\text{IP}_3$ -рецепторів становила 250 пСм (реєстрація в розчині з 220 ммоль/л  $\text{Cs}^+$  – в якості носія заряду) [13].  $\text{IP}_3\text{R}_1$  з провідністю  $356 \pm 4$  пСм ідентифіковані у внутрішній ядерній мембрані нейронів Пуркінє (реєстрація у симетричному розчині  $\text{KCl}$  150 ммоль/л) [5].

### **1.4.3. Фізіологічна роль і механізми регуляції функціонування $\text{IP}_3$ -рецепторів**

Кардіоміоцити є одним з типів клітин у якому в значній кількості експресовані  $\text{IP}_3\text{R}_2$ , вони наявні у передсердях та шлуночках і, залучені у сигнальні шляхи як за фізіологічних, так і патологічних умов [див. 100, 87]. На функціональному рівні показано, що  $\text{IP}_3$ -рецептори впливають на процеси збудження–скорочення та розвиток аритмій різного генезу. Вони активуються у відповідь на підвищені концентрації позаклітинних агоністів, наприклад, після ішемії. Індукована ендотеліном-1 активація  $\text{IP}_3$ -рецепторів сприяє виникнення аритмії в міоцитах передсердь [див. 100, 113]. Гіперактивація  $\text{IP}_3$ -рецепторів може

бути спричинена тривалою  $\beta$ -адренергічною стимуляцією, яка виникає під час серцевої гіпертрофії, спричиненої робочим навантаженням на міокард через посилення процесів збудження-скорочення [128]. Надмірна активація  $IP_3$ -рецепторів зовнішньої ядерної мембрани викликана впливом ендотеліну-1 спричиняє підвищене  $IP_3$ -активоване вивільнення  $Ca^{2+}$ , яке під час діастолі може активувати або сенсibiliзувати рiанодинові рецептори, що призведе до спонтанного екстрасистолічного вивільнення  $Ca^{2+}$  та виникнення аритмії [15, 87].

Дослідження Subedi та співавт. показали, що у міоцитах шлуночків через  $IP_3$ -опосередковане вивільнення  $Ca^{2+}$  відбувається активація фактору транскрипції CREB і наступної передачі сигналів PKC/PKD–CaMKII. Автори також припускають, що передача сигналу через  $IP_3Rs$ –PKC–CaMKII–CREB може бути важливим механізмом, за допомогою якого ендотелін-1 та  $\alpha 1$ -адренергічні агоністи регулюють експресію генів у міоцитах шлуночків [129].

Експресія генів більш ефективно ініціюється  $Ca^{2+}$ -спайками, ніж середньою концентрацією  $Ca^{2+}$ , яка підтримується на стабільному рівні. Транскрипційний фактор NF $\kappa$ B активується низькою частотою  $Ca^{2+}$ -спайків, тоді як для активації NF-AT потрібні більш високі частоти. Зміни частоти коливань  $Ca^{2+}$  також можуть регулювати активність протеїнкінази CaMKII [див. 130].

Велика кількість речовин впливає на функціонування  $IP_3$ -рецепторів, основними з яких є  $Ca^{2+}$  та  $IP_3$ . Аденофостин імітує дію  $IP_3$ , також  $IP_3$ -рецептор чутливий до перекису водню ( $H_2O_2$ ) і ця дія може імітуватися тимеросалом [130].

Активність  $IP_3$ -рецепторів також модулюється через різні сигнальні шляхи за допомогою месенджерів, таких як cAMP, cGMP та PtdIns3,4,5P<sub>3</sub> (PIP<sub>3</sub>). Такі білок–білкові взаємодії вказують на те, що сигнальний шлях  $IP_3/Ca^{2+}$  пов'язаний з багатьма іншими сигнальними шляхами для управління різних клітинних процесів. Існує також низка фармакологічних препаратів, які інгібують вивільнення  $Ca^{2+}$  через  $IP_3$ -рецептори. У нейронах  $Ca^{2+}$ -зв'язуючий білок (CaBP1) інгібуює  $IP_3$ -рецептори, стабілізуючи закритий стан каналу. Кофеїн є також інгібітором вивільнення  $Ca^{2+}$  через  $IP_3R1$  та  $IP_3R2$ . Як правило протоонкогени знижують активність  $IP_3$ -рецепторів, тоді як пухлинні супресори посилюють їх

функцію [див. 130]. Низка модуляторів (рис. 1.11) може як пригнічувати, так і активувати  $IP_3$ -рецептори.

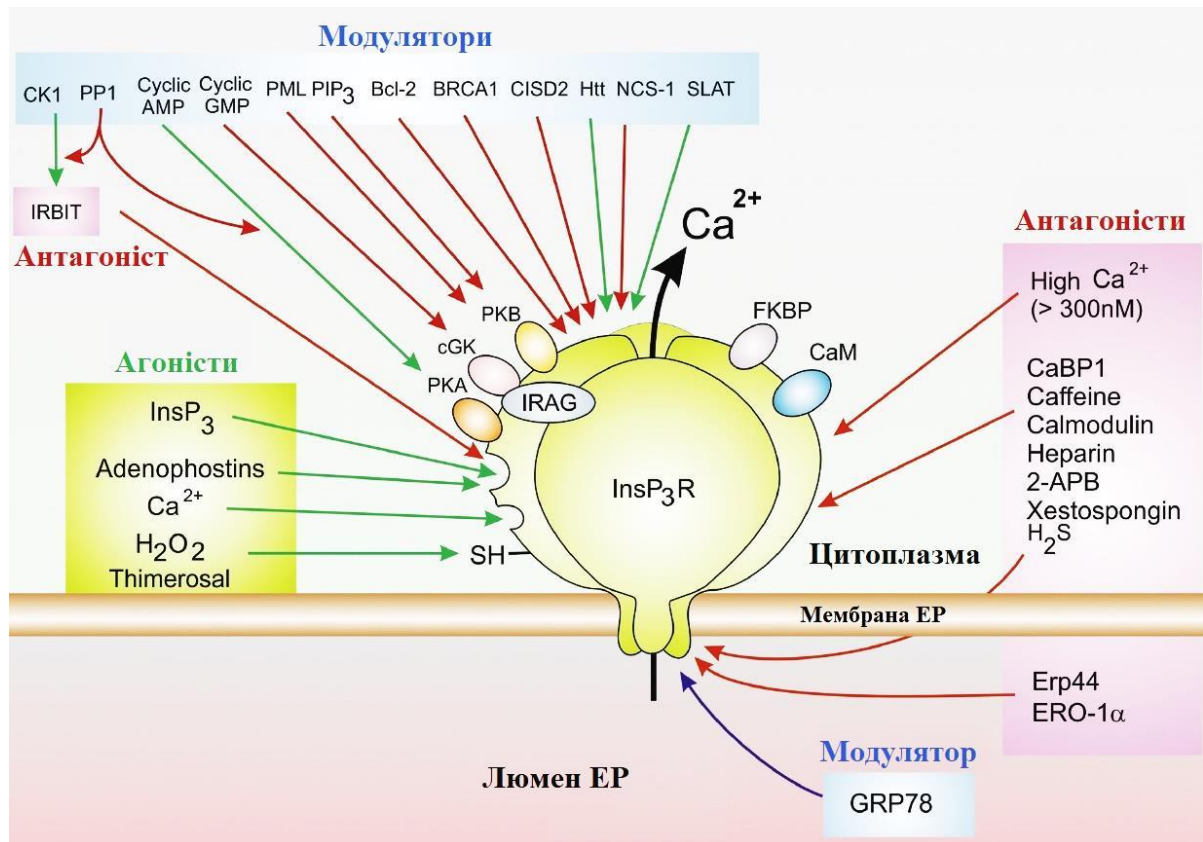


Рис. 1.11. Представлено різні фактори, які можуть регулювати функціонування  $IP_3$ -рецепторів, основними з яких є  $Ca^{2+}$  та  $IP_3$ . Модулятори можуть активувати (зелені стрілки), та пригнічувати (червоні стрілки)  $IP_3$ -рецептори. Високі концентрації  $Ca^{2+}$  (> 300 нмоль/л) пригнічують активність рецепторів, а також деякі речовини такі як  $Ca^{2+}$ -зв'язуючий білок (CaBP1), кофеїн, кальмодулін, гепарин, 2-APB, ксестоспонджин, сірководень. Деякі протоонкогени та супресори пухлин: Bcl-2, BRCA1, PML також взаємодіють з  $IP_3$ -рецепторами (за Berridge M., 2016)

Експресія  $IP_3$ -рецепторів залежить від балансу між їх синтезом шляхом транскрипції та видалення шляхом деградації. Є низка механізмів які регулюють транскрипцію  $IP_3$ -рецепторів. Було показано, що потенціалкеровані канали L-типу, NMDARs, н-холінорецептори, а також рецептори дофаміну D1 діють збільшуючи рівень внутрішньоклітинного  $Ca^{2+}$ , відповідального за підвищення

експресії  $IP_3$ -рецепторів. Незалежно від  $Ca^{2+}$  транскрипція рецепторів регулюється фактором некрозу пухлин (TNF-), що діє через специфічний білок 1 (SP-1). Також ядерний транскрипційний фактор (erythroid 2-Like 2 (NRF2) зменшує транскрипцію  $IP_3R3$  [див. 130].

Рівень експресії мРНК  $IP_3$ -рецепторів може також модулюватися мікроРНК (miRs), які функціонують як посттранскрипційні регулятори. У кардіоміоцитах miR-133a пригнічує експресію  $IP_3R2$ , а зниження рівня miR-133a спричиняє підвищення рівня  $IP_3R2$  і це є головним фактором, що сприяє виникненню гіпертрофії серця [100, 130, 131].

### **Підсумок**

Особлива роль внутрішньоядерної  $Ca^{2+}$ -сигналізації є безсумнівною, але властивості LCC-каналів та  $IP_3$ -рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів залишились нез'ясованими, що стало метою цієї дисертаційної роботи.

Зокрема дослідження спрямовані на вивчення:

- параметрів функціонування LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів та їх чутливості до агоністів та антагоністів н-холінорецепторів, а також змінних токсинів,
- властивостей  $IP_3$ -рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів.



## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Об'єкт дослідження

Дослідження виконано на ядрах кардіоміоцитів щурів ліній *Fisher* та *Wistar* віком 3–4 тижні, масою  $40 \pm 5$  г ( $n = 102$ ). Тварини були вивчені у віварії Інституту фізіології імені О. О. Богомольця НАН України. Всі експерименти виконано з урахуванням положень Європейської Конвенції із захисту тварин, яких використовують в експериментах (Страсбург, 1986) [132], Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.2006 № 3447–IV та положень Комітету з біоетики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

#### 2.2. Оптимізація способу ізолювання ядер кардіоміоцитів

При оптимізації протоколу ізолювання ядер слід враховувати мету експерименту. Оскільки, наприклад, застосування імунологічних методів передбачає виділення чистої фракції ядер без залишків органел [5], а для електрофізіологічних досліджень чистота фракції не є визначальною. Важливим фактором під час дослідження біофізичних властивостей транспортувальних систем ядерної мембрани є структурна та функціональна інтактність ізолюваних ядер.

Початковим етапом роботи став підбір середовища оптимального складу для гомогенізації міокарда, оскільки, для гомогенізації різних типів тканин залежно від їх структури й жорсткості склад розчину може кардинально відрізнятись. Після виділення серця та відмивання від крові розчином Кребса-Хенке такого складу (ммоль/л): NaCl – 118,1; NaHCO<sub>3</sub> – 25; KCl – 4,7; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,4; MgCl<sub>2</sub> – 1,2; CaCl<sub>2</sub> – 1; глюкоза – 11,1 (рН 7,4, доводили NaOH) або розчином

на основі NaCl, який містив (ммоль/л): NaCl – 150; HEPES – 10; EDTA – 1 (рН 7,4 доводили NaOH) його переносили в середовище для гомогенізації.

Найчастіше для гомогенізації тканин використовують розчини на основі цукрози різної концентрації [133, 134] та K-глюконату [5, 10]. Ми тестували середовища різного складу узагальнені з кількох протоколів [2, 5, 41]. Спочатку тканину подрібнювали в розчині, на основі K-глюконату (ммоль/л): K-глюконат – 150; EDTA – 1; HEPES – 10; HEPES-калієва сіль – 10 (рН 7,2 доводили KOH), який раніше пристосовано для виділення ядер нейронів [5]. Однак, м'язова тканина є більш жорсткою, тому з метою збільшення тоничності середовища його виготовляли на основі цукрози різної концентрації (ммоль/л, рН 7,2, доводили KOH):

- 1) цукроза – 150, KCl – 60, HEPES – 10, EDTA – 1;
- 2) цукроза – 250, tris-HCl – 50, MgCl<sub>2</sub> – 5;
- 3) цукроза – 300, KCl – 60, HEPES – 10, EDTA – 2, EGTA – 0,5;
- 4) цукроза – 300, KCl – 60, HEPES – 10.

Наші результати засвідчують, що найкраще для виділення ядер кардіоміоцитів підходить розчин, що містив (ммоль/л): цукроза – 300, KCl – 60, HEPES – 10 (рН 7,2, доводили KOH). На противагу цьому, середовища з цукрозою в концентрації менше ніж 300 ммоль/л виявилися недостатньої густини для повноцінної гомогенізації тканини, суспензії містили мало інтактних ядер (3–4 ядра на робочу камеру) із залишками EP (n = 60). Щоб збільшити густину, досить часто до розчину для гомогенізації тканин додають гліцерин [135, 136]. Поверхня ядер, ізольованих у середовищі з додаванням гліцерину (200 мкл/мл) була достатньо очищена від залишків EP. Відмінностей у якості зразків за додавання гліцерину перед або після заморожування не спостерігали.

Для запобігання активації протеаз до розчину для гомогенізації зразків додавали їх інгібітори. У ядрах зі зразків, виготовлених із додаванням інгібітора трипсину – соєвого (type I-S; 0,1 мг/мл) (n = 15) або з курячого яєчного білка (type II-O; 0,1–2 мг/мл) («Sigma», США) (n = 31) в різних концентраціях, активність іонних каналів спостерігали вкрай рідко, що може свідчити про ушкодження

протеазами білкової фракції ядерної мембрани. Ядра, крізь внутрішню мембрану яких нам вдалося систематично реєструвати іонні струми, виділяли з використанням суміші інгібіторів протеаз («Roche», Німеччина) та 1 ммоль/л DL-дитіотриетолу («Sigma», США) [2, 10], який відновлює дисульфідні зв'язки в молекулах білка.

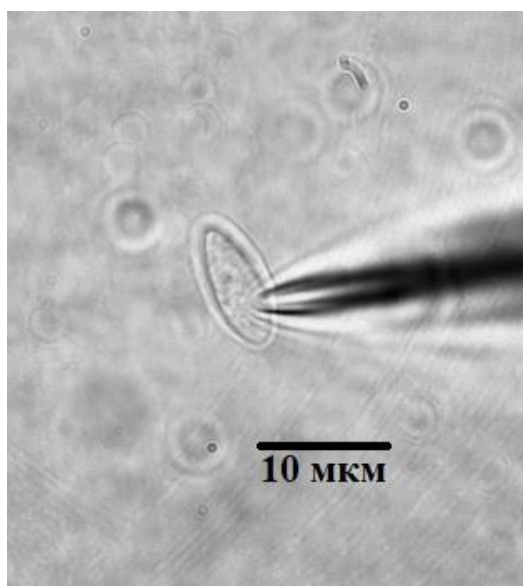
Залежно від процедури ізолювання ядер застосовують гомогенізатори різних типів: скляний гомогенізатор з тефлоновим поршнем [41], T-25 Ultra-Turrax probe (IKA) [137], Dounce (скляний 2 мл із поршнем В) [5, 138] або Duall (скляний 1 мл із поршнем PTFE) [138] та інші моделі. До того ж, Мак і співавт. [138] наголошують, що потрібно спробувати кілька екземплярів однієї і тієї ж моделі гомогенізатора, оскільки навіть серед них можуть бути значні відмінності у ефективності гомогенізації тканини. Для ізолювання ядер з нейронів застосовують металеву голку [10], однак для кардіоміоцитів такий метод не підходить через високу жорсткість міокарда яку надають міофіламенти.

Ми спробували гомогенізувати тканину декількома гомогенізаторами: скляний з притертим поршнем, скляний з тефлоновим поршнем, скляний гомогенізатор Dounce 2 мл. Найкращий результат отримали при використанні скляного ручного гомогенізатора Dounce (4–6 ходів поршня до утворення однорідної суспензії). У разі застосування такого гомогенізатора, мембрана ядер була очищена від залишків CP, легко утворювалися гігаомні контакти та вдалося зареєструвати іонні струми через канали ядерної мембрани.

Потім гомогенат фільтрували крізь нейлонову тканину та центрифугували при 1000 g (4°C) впродовж 10 хв (miniSpin «Eppendorf AG», Гамбург, Німеччина). В протоколах ізолювання ядер часто застосовують багатоетапне диференційне центрифугування, яке може тривати від 25 хв до кількох годин [2, 41]. Скорочення тривалості цієї процедури зменшує ймовірність порушення функціональної інтактності каналів до початку експерименту. Після центрифугування надосадову рідину зливали, а осад ресуспендували в 1 мл розчину, що містив (ммоль/л): KCl – 150, NEMES – 8, NEMES-калієва сіль – 12, EGTA – 1 (рН 7,2, доводили КОН) – далі «робочий розчин KCl». Отриману

суспензію ядер поміщали у робочу камеру з прозорим дном об'ємом 200 мкл і залишали на 4–7 хв, потім препарат відмивали від залишків інших органел робочим розчином KCl, яким заповнювали також і *patch*-піпетки [139].

Помітної різниці між якістю ядер (співвідношенням між кількістю сформованих і не сформованих гігаомних контактів, фактом реєстрації струмів через іонні канали), виділених з кардіоміоцитів щурів ліній *Wistar* і *Fisher* не спостерігали, ізольовані ядра мали видовжену форму з прозорою нуклеоплазмою (рис. 2.1).



*Рис. 2.1. Ізольоване ядро кардіоміоцита з підведеною до нього patch-піпеткою у симетричному розчині такого складу (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1; pH 7,2*

Дослідження при підборі процедури початково проводили на свіжоізольованих та заморожених зразках. В обох випадках вдавалося реєструвати іонні струми через канали експресовані у ядерній мембрані, зокрема LCC-канали та  $IP_3$ -рецептори. Ми вважаємо, що після ізольовання ядер (із процедурою заморожування) залишалась лише внутрішня та фрагменти зовнішньої мембрани, що підтверджується зміною співвідношення реєстрацій від внутрішньої та зовнішньої ядерних мембран.

Узагальнена схема виділення ядер кардіоміоцитів щура для реєстрації іонних струмів методом *patch-clamp* представлена на рис. 2.2 [140].

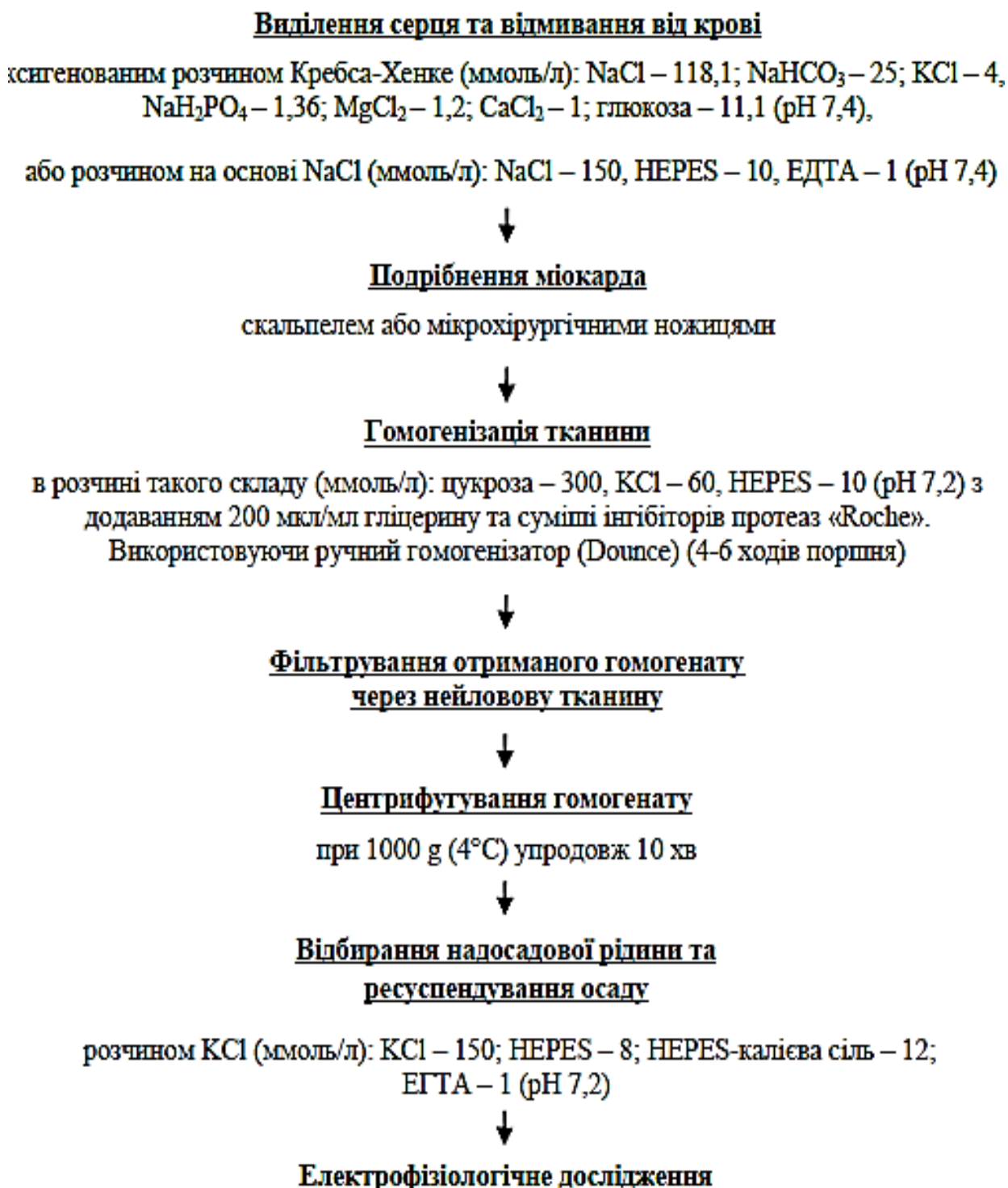


Рис. 2.2. Узагальнена схема виділення ядер кардіоміоцитів щура для реєстрації іонних струмів методом *patch-clamp*

Важливим є встановлення оптимального віку тварин для отримання достатньої кількості не ушкоджених ядер кардіоміоцитів. З'ясувалося, що найкраще виділяти ядра з міокарду щурів віком 3–4 тижні ( $n = 92$ ). У тварин молодшого віку ( $n = 10$ ) недостатньо тканини для виготовлення необхідної кількості зразків. Тоді як у тварин старшого віку ( $n = 12$ ) значно збільшується кількість фібробластів та ендотеліальних клітин у складі міокарда [141, 142, 143], а це позначається на відсотковому співвідношенні ізольованих ядер. З віком також змінюються механічні характеристики тканини серця, а це передбачає застосування більш тривалої механічної обробки, що може позначатись на цілісності отриманих ядер.

### 2.3. Реєстрація іонних струмів крізь ядерну мембрану методом *patch-clamp*

*Patch-clamp* – один з методів електрофізіології, який дає змогу виявляти струми крізь біологічні мембрани, ізолювавши фрагмент мембрани з наявними в ній іонними каналами, задавати різницю потенціалів на мембрані, змінювати розчини та в цих добре контрольованих умовах вимірювати струми, які протікають через канали ізолювані мікропіпеткою [144]. Цей метод відкрив перед фізіологами нові перспективи, які дозволяють вимірювати іонні струми не лише від всієї клітини (whole-cell), але також і проводити реєстрації струмів від одного каналу (single-channel). Однак *patch-clamp* потребує високочутливого обладнання і величезну кількість навичок експериментатора, тому він залишається одним із найскладніших методів дослідження [144].

В сучасному варіанті метод *patch-clamp* було запропоновано Неєром Е. і Сакманом Б. у 1976 році [145], в його основу взято метод фіксації потенціалу мембрани нейронів шляхом внутрішньоклітинної перфузії або діалізу, який описали у 1975 році Кришталь О.О. та Підоплічко В.І. (лабораторія Костюка П.Г.). Метод дає можливість розділяти та реєструвати  $\text{Na}^+$  та  $\text{Ca}^{2+}$  струми і вивчати їх кінетику [146].

Існують різні конфігурації *patch-clamp*, залежно від об'єкту та мети дослідження розрізняють: “*cell-attached*”, “*inside-out*”, “*whole-cell*”, “*outside-out*”. Дослідження можна проводити в режимі фіксації потенціалу або фіксації струму [144].

Реєстрацію іонних струмів крізь канали внутрішньої ядерної мембрани кардіоміоцитів здійснювали методом *patch-clamp* в режимі фіксації потенціалу. Для цього використовували електрофізіологічну установку, що складалася з підсилювача Visual-Patch 500 («Bio-Logic», Франція) за допомогою якого отримували значення показників струму, які піддавали фільтрації за допомогою низькочастотного фільтра Бесселя (частота зрізу 2 кГц), оцифровували з частотою 5 кГц. У всіх записах потенціал розчину камери приймали за 0. Візуалізацію ядер проводили із використанням інвертованого мікроскопа («LEICA DM IRB», Німеччина), об'єктив 20×/0.70, зображення виводили на монітор комп'ютера за допомогою CCD камери VX 45 Microscope (PCO Computer Optics (Німеччина).

*Patch*-піпетки опором від 9 до 14 МОм виготовляли з боросилікатних скляних капілярів з філаментом, внутрішній діаметр 1,5 мм та зовнішній – 0,86 мм (“Sutter Instruments”, США). Виготовлення мікропіпеток здійснювали за допомогою пуллера PP-830 («NARISHIGE SCIENTIFIC INSTRUMENT LAB.», Японія). Піпетки підводили до ядер за допомогою гідравлічного маніпулятора MHW-3 («NARISHIGE», Японія). Індиферентний електрод Ag–AgCl був сполучений із робочою камерою через 0,3 % агаровий місток, заповнений робочим розчином KCl.

Впродовж експерименту ядра знаходились у камері заповненій робочим розчином KCl при кімнатній температурі. Після занурення вимірювального електроду у розчин здійснювали компенсацію дифузійного потенціалу, а потім за рахунок зменшення тиску утворювався гігаомний контакт з мембраною ядра – конфігурація “*nucleus-attached*”. Під час проведення частини експериментів на стадії промивки ядер від залишків інших органел, прикладання фармакологічних речовин та відмивки від них, через дію на ядро потоку рідини з аплікаційної трубки, гігаомний контакт міг зруйнуватися або ядро могло зміститись і на

піпетці лишався відірваний фрагмент мембрани (зі збереженням контакту), утворюючи конфігурацію “*excised-patch*”. Якість реєстрації іонних струмів через канали та ефективність діючих речовин не залежала від утвореної конфігурації.

Після утворення гігаомного контакту і реєстрації іонних струмів за контрольних умов, прикладали тестовані речовини (безпосередньо в камеру), враховуючи кінцеву концентрацію або повністю замінювали розчин проточною аплікацією. За конфігурації “*nucleus-attached*”, тестовані речовини, очевидно, проникали через ядерні пори і діяли на LCC-канали зі сторони нуклеоплазми, в той час як за конфігурації “*excised patch*” речовини мали безпосередній контакт з внутрішньою стороною внутрішньої ядерної мембрани.

Піпетки та камеру з ядрами, якщо не вказано інше, заповнювали робочим розчином KCl такого складу (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1 (pH 7,2, доводили KOH). У серіях експериментів для визначення селективності іонного каналу розчин у піпетці або у камері замінювали на (ммоль/л): K-глюконат – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1 (pH 7,2, доводили KOH) – при визначенні селективності для Cl<sup>-</sup>; або на (ммоль/л): CaCl<sub>2</sub> – 100, HEPES – 20 (pH 7,2, доводили NMDG) – при визначенні селективності для Ca<sup>2+</sup>. Селективність до Na<sup>+</sup> визначали замінюючи робочий розчин KCl на еквімолярний розчин NaCl (ммоль/л): NaCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1 (pH 7,2, доводили NaOH) [140].

Для реєстрації струмів через IP<sub>3</sub>-рецептори до розчину додавали інозитол-1,4,5-трифосфат (IP<sub>3</sub>) у концентрації від 0,2 до 20 мкмоль/л, АТФ – 0,5 ммоль/л і CaCl<sub>2</sub> з розрахунку [Ca<sup>2+</sup>]<sub>(вільний)</sub> від 100 нмоль/л до 1 ммоль/л. Концентрацію вільного Ca<sup>2+</sup> розраховували за допомогою програми *Maxchelator*.

#### **2.4. Імуногістохімічна ідентифікація IP<sub>3</sub>R2 у ядерній мембрані кардіоміоцитів**

Ідентифікацію IP<sub>3</sub>R2 здійснювали за допомогою імуногістохімічного фарбування з використанням специфічних до цього підтипу рецепторів



поліклональних антитіл. На стерильні покривні скельця, попередньо оброблені розчином полі-L-лізину, наносили суспензію ядер кардіоміоцитів і залишали на 30 хв для осідання та адгезування до поверхні. Після цього, зразки промивали 0,1 моль/л фосфатним буфером (на основі  $K_2HPO_4$  та  $KH_2PO_4$ ) та фіксували 4 % розчином параформальдегіду протягом 30 хв, який відмивали 0,1 моль/л фосфатним буфером. Останній виготовляли змішуючи 19 мл (одноосновного  $KH_2PO_4$  0,2 моль/л) та 81 мл (двохосновного  $K_2HPO_4$  0,2 моль/л) розбавлені дистильованою водою до об'єму 200 мл (pH 7,4).

Пермеабілізацію мембрани здійснювали у фосфатному буфері, який додатково містив 0,3 % Triton X-100, та 10 % кінську сироватку.

Наступним етапом виконання дослідження була інкубація зразків з первинними кролячими поліклональними антитілами до  $IP_3R2$  (Rabbit anti-Type II Inositol-1,4,5-Trisphosphate Receptor AB3000 EMD Millipore, Sigma-Aldrich, США) у розведенні 1:15 (середнє розведення, рекомендоване виробником для обробки з метою подальшої реєстрації імуофлюоресценції) протягом 24 годин при температурі 4°C. Ці антитіла є синтетичним пептидом, котрий взаємодіє з C-кінцевим доменом  $IP_3$ -рецепторів виключно другого типу.

Після обробки первинними поліклональними антитілами, зразки промивали протягом 30 хв і блокували 1 % бичачим сироватковим альбуміном (розведеним на основі фосфатного буфера) наносили на них вторинні антитіла Alexa Fluor-647 (розведення 1:1000, Invitrogen, США). Через дві години повторно промивали фосфатним буфером і блокували 1 % бичачим сироватковим альбуміном протягом 30 хв (3 промивки по 10 хв кожна). Постійні препарати виготовляли з використанням Immuno Mount, які сканували лазерним конфокальним мікроскопом з використанням програми FluoView™ FV1000 (Olympus Inc., Японія) на довжині хвилі 633 нм і фотографували цифровою фотокамерою під'єднаною до комп'ютера.

## 2.5. Статистично-математична обробка результатів досліджень

Отримані результати були проаналізовані за допомогою програми *Clampfit 10.7* ("Axon Instruments", США). Досліджуваними характеристиками, на основі яких оцінювали ефективність діючих речовин, є середній струм, який проходить через канал, а також  $P_o$ .

Середній струм визначали як різницю зареєстрованих значень струму, виміряних у інтервалі 200–400 мс під час перебування каналів у відкритому і закритому стані відповідно, та виражали у відносних одиницях (відн. од.).

$P_o$  отримували після ідеалізації реєстрацій у програмі *Clampfit 10.7* за вбудованими алгоритмами (2.1):

$$P_o = \frac{t_o}{T}, \quad (2.1)$$

де  $t_o$  – загальний час перебування каналу у відкритому стані,  $T$  – загальний час запису. Це рівняння може бути застосоване якщо у петчі один канал, якщо у петчі більше одного каналу того самого типу, тоді (2.2):

$$P_o = \frac{t_o}{NT} \quad (2.2)$$

де  $N$  – число каналів у петчі. У випадку наявності у петчі більше, ніж один, каналу того самого типу використовували формулу (2.3):

$$NP_o \left( \sum_{j=1}^N t_{ij} \right) / T, \quad (2.3)$$

де,  $N$  – загальна кількість каналів у петчі,  $j$  – кількість каналів відкритих у будь-який момент часу,  $t_i$  – ймовірність того, що  $i$  каналів з  $N$  відкрито,  $T$  – загальний час запису.

Для графічного зображення результатів використовували *OriginPro 9.0* ("OriginLab Corporation", США). Результати представлено у вигляді репрезентативних фрагментів реєстрацій, амплітудних діаграм, вольт-амперних характеристик і діаграм усереднених значень амплітуди струму через канал. Вольт-амперні характеристики будували, відкладаючи за віссю абсцис – значення прикладеного потенціалу у мВ, а за віссю ординат – значення зареєстрованого за таких умов струму, вираженого у пА. При створенні рисунків репрезентативних реєстрацій струмів через канали, фрагменти спочатку фільтрували низькочастотним фільтром Гауса (1200 Hz = 5 коефіцієнтів) за допомогою програмного забезпечення *Clampfit 10.7*. Для візуального відображення  $P_o$  та амплітуди струму, будували амплітудні діаграми (bin = 1). Узагальнюючу схему створено за допомогою інструменту для створення наукових зображень на сайті *BioRender.com*. Статистичні результати представлено у вигляді  $M \pm m$ , де  $M$  – середнє,  $m$  – стандартна похибка середнього. Вірогідність різниці оцінювали на основі t-критерію Стьюдента (\* –  $P \leq 0,05$ , \*\* –  $P \leq 0,01$ , \*\*\* –  $P \leq 0,001$ ).

## 2.6. Реактиви та розчини

В експериментах використовували такі розчини:

- 1) оксигенований розчин Кребса-Хенке такого складу (ммоль/л): NaCl – 118,1, NaHCO<sub>3</sub> – 25, KCl – 4,7, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,4, MgCl<sub>2</sub> – 1,2, CaCl<sub>2</sub> – 1, глюкоза – 11,1 (pH 7,4, доводили NaOH);
- 2) розчин на основі NaCl, який містив (ммоль/л): NaCl – 150, HEPES – 10, EDTA – 1 (pH 7,4, доводили NaOH);
- 3) розчини для гомогенізації на основі цукрози (ммоль/л): цукроза – 300, KCl – 60, HEPES – 10 (pH 7,2, доводили KOH);
- 4) робочий розчин на основі KCl, такого складу (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1 (pH 7,2, доводили KOH);
- 5) розчин на основі K-глюконату (ммоль/л): K-глюконат – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1 (pH 7,2, доводили KOH);

- 6) розчин на основі NaCl для визначення селективності до Na<sup>+</sup> (ммоль/л): NaCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1 (pH 7,2, доводили NaOH)
- 7) розчин з CaCl<sub>2</sub> (ммоль/л): CaCl<sub>2</sub> – 100, HEPES – 20 (pH 7,2, доводили NMDG).
- 8) фосфатний буфер (0,1 моль/л): 19 мл 0,2 моль/л KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> та 81 мл 0,2 моль/л K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,4, доводили KOH).

Розчини виготовляли на деіонізованій воді з опором не менше 17 MΩ/см, використовуючи реагенти фірми «Sigma» (США) або «Roche» (Німеччина).

### Підсумок

Оптимізовано метод ізолювання ядер кардіоміоцитів, придатних для електрофізіологічних досліджень, а саме підібрано оптимальний склад розчину (цукроза – 300 ммоль/л, KCl – 60 ммоль/л, HEPES – 10 ммоль/л; pH 7,2) та спосіб гомогенізації міокарда (скляним гомогенізатором Dounce – 4–6 ходів поршня до утворення однорідної суспензії), скорочено час центрифугування гомогенату до 10 хв, без застосування детергентів.

### Роботи в яких опубліковані основні наукові результати розділу

#### Статті:

✓ **Котик ОА**, Котлярова АМ, Марченко СМ. Оптимізація методу ізолювання ядер для електрофізіологічних досліджень іонних каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів щура. Фізіол журн. 2018;64(2):26–33.

#### Тези:

➤ **Котик О**, Котлярова А, Поліщук А, Павлова Н. Оптимізація умов ізолювання ядер кардіоміоцитів для реєстрації іонних каналів методом петч-клемп. Матеріали XIV Міжнар. наук. конф. студ., аспір. та мол. вчених «Шевченківська весна 2016: біологічні науки»; 2016 квіт. 6–8; Київ, Україна. Київ: КНУ ім. Тараса Шевченка; 2016, с. 120.

### РОЗДІЛ 3

#### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Після оптимізації способу виділення ядер кардіоміоцитів, придатних для електрофізіологічних досліджень методом *patch-clamp*, у внутрішній ядерній мембрані зареєстровано струми крізь кілька типів каналів з провідністю від 10 до 340 пСм, які мають різні кінетичні параметри функціонування (рис. 3.1) [147, 148].

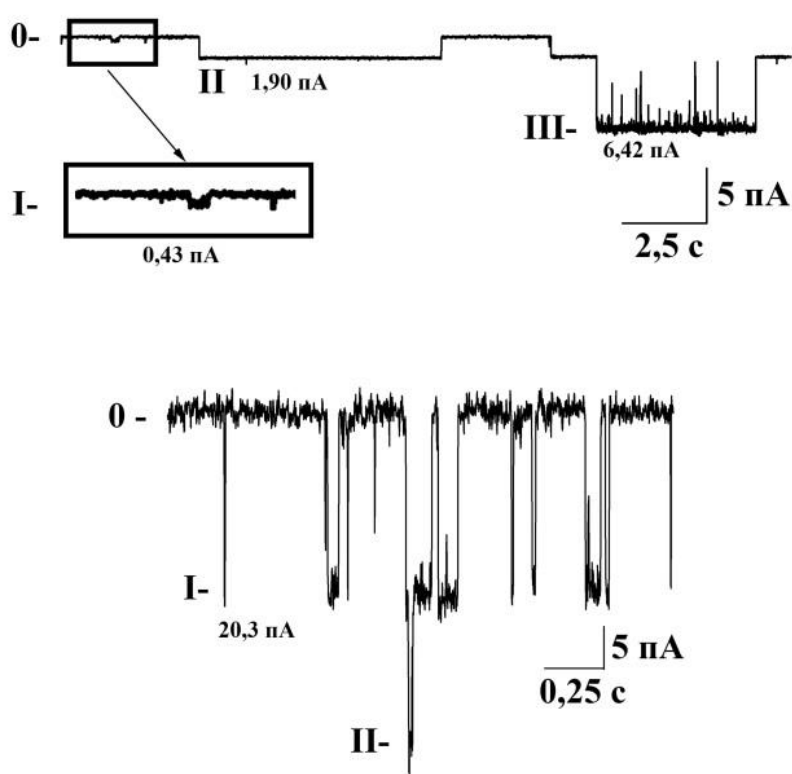


Рис. 3.1. Різноманітність спонтанно активних іонних каналів внутрішньої ядерної мембрани кардіоміоцитів. На рисунку представлено типові фрагменти реєстрацій струмів крізь рідкісні іонні канали (за потенціалу  $-40$  мВ) – амплітуда струму  $0,43$ ,  $1,90$ ,  $6,42$  та  $20,3$  пА відповідно. I, II, III – рівні відкриття каналів. Ці канали характеризуються різною кінетикою та провідністю. Реєстрація у розчині такого складу (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1 (pH 7,2). Потенціал розчину камери у всіх реєстраціях приймали за «0»

Серед них найчастіше спостерігали активність каналів з провідністю  $209 \pm 13$  пСм ( $n = 44$ ). котрі за основними характеристиками (провідність та кінетика) подібні до описаних раніше катіонних каналів великої провідності (LCC-каналів) ядерної мембрани нейронів Пуркін'є [5]. Щоб переконатися, що зареєстрували саме LCC-канали, ми провели низку серій експериментів із заміною робочого розчину на основі KCl на розчин з  $\text{CaCl}_2$  та на еквімолярні розчини з К-глюконатом і NaCl, таким чином визначивши селективність каналів.

Крім спонтанно активних, у ядерній мембрані кардіоміоцитів наявні ліганд-активовані канали. Зокрема, вдалося зареєструвати  $\text{IP}_3$ -рецептори та дослідити їх чутливість до таких модулюючих агентів як  $\text{IP}_3$  та  $\text{Ca}^{2+}$ . Дослідження електрофізіологічних властивостей  $\text{IP}_3$ -рецепторів виконані здебільшого на гетерологічно експресованих рецепторах у клітинах DT40 ТКО [149] та Sf9 [122], однак наявні лише розрізнені дані про їх властивості в нативному стані [2, 150].

Ця робота присвячена дослідженню властивостей LCC-каналів та  $\text{IP}_3$ -рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів.

### **3.1. Властивості LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів**

Досліджено базові властивості LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів такі як провідність, селективність, чутливість до змінних токсинів, а також інгібіторів та агоністів н-холінорецепторів.

#### **3.1.1. Провідність LCC-подібних каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів**

Серед спонтанно активних іонних каналів, зареєстрованих у ядерній мембрані кардіоміоцитів, найчастіше спостерігали активність LCC-подібних каналів з провідністю  $209 \pm 13$  пСм ( $n = 44$ ). Типову реєстрацію іонних струмів через канали представлено на рис. 3.2 [151, 152, 153].

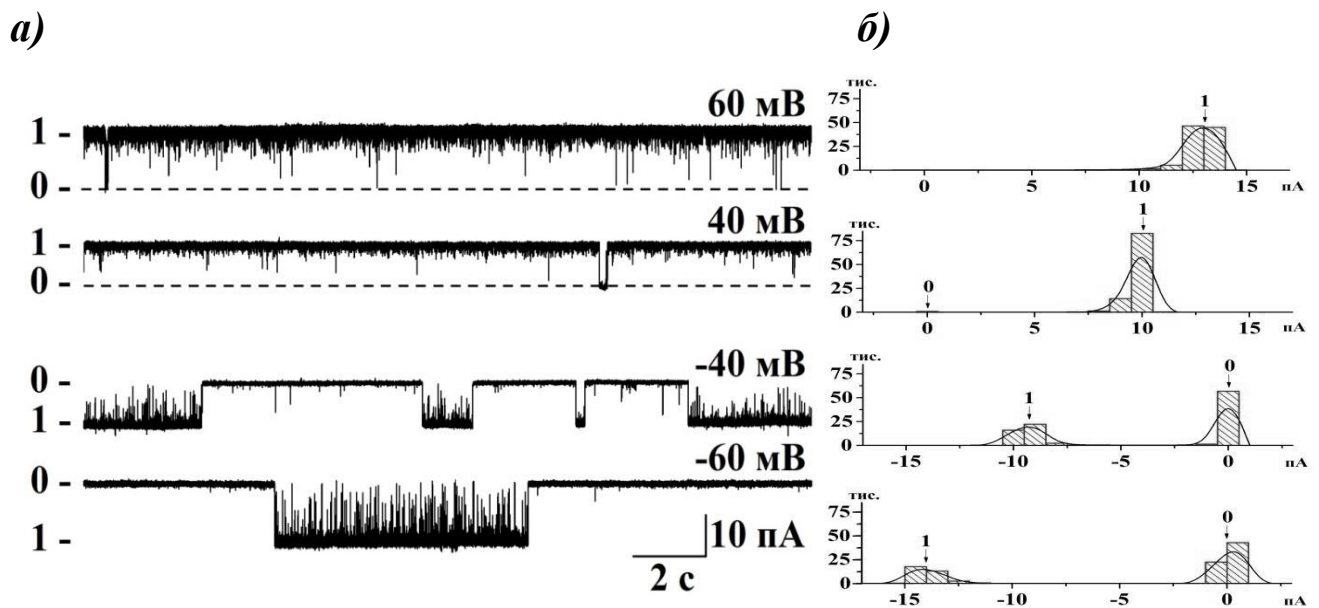


Рис. 3.2. Приклад реєстрації іонного струму через LCC-подібний канал внутрішньої ядерної мембрани кардіоміоцитів при потенціалі  $\pm 40$ ,  $\pm 60$  мВ (а) та його амплітудні діаграми (б). Реєстрація в розчині такого складу (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1 (pH 7,2)

Канали цього типу характеризуються повільною кінетикою, їх активність суттєво залежить від потенціалу. За позитивних значень ( $+40$  мВ) – вони практично весь час були відкритими ( $NP_o = 3,11$ ), а на негативних ( $-40$  мВ) – їхня активність знижувалася ( $NP_o = 0,72$ ) [154].

Більшість реєстрацій (99 %) здійснено від внутрішньої ядерної мембрани. Іноді вдавалося також зареєструвати іонні струми через зовнішню мембрану, про що свідчить протилежно спрямований струм, ніж під час його реєстрації крізь внутрішню мембрану за однакових умов. Оскільки значно частіше вдавалося зареєструвати струми від внутрішньої ядерної мембрани, результати усіх наступних серій експериментів представлено саме на реєстраціях від неї. Типова вольт-амперна характеристика LCC-подібного каналу представлена на рис. 3.3.

### 3.1.2. Селективність LCC-подібних каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів

Характеристики ідентифікованих нами каналів дуже подібні до тих, які були описані для LCC-каналів ядерної мембрани нейронів Пуркінє [5]. Зокрема вони також характеризуються повільною кінетикою та залежністю від потенціалу, провідність LCC-каналів нейронів становить  $198 \pm 27$  пСм. На основі цих даних ми припустили, що зареєстровані канали є LCC-каналами. Для встановлення чи ідентифікований нами канал та вже раніше описані LCC-канали є одним і тим же типом каналів необхідно визначити їх селективність. З літератури відомо, що LCC-канали є селективними до моновалентних катіонів  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Rb^+$ ,  $Cs^+$  та  $Li^+$ , однак не пропускають великі катіони, такі як N-methyl-D-glucamine (NMDG), а також є непроникними для  $Ca^{2+}$  та  $Ba^{2+}$ ,  $Cl^-$  [5].

Тому, щоб перевірити чи зареєстрували струм саме через LCC-канали ядерної мембрани кардіоміоцитів, ми провели низку серій експериментів із заміною робочого розчину KCl на еквімолярні розчини з K-глюконатом і NaCl та на розчин з  $CaCl_2$ , таким чином визначивши селективність каналів.

Спочатку ми замінили робочий розчин KCl в піпетці на еквімолярний розчин K-глюконату. За цих умов спостерігали струми вхідного і вихідного напрямку, що свідчить про непроникність цього каналу для  $Cl^-$  ( $n = 10$ ). Вольтамперна характеристика була такою самою, як і у контролі (рис. 3.3).



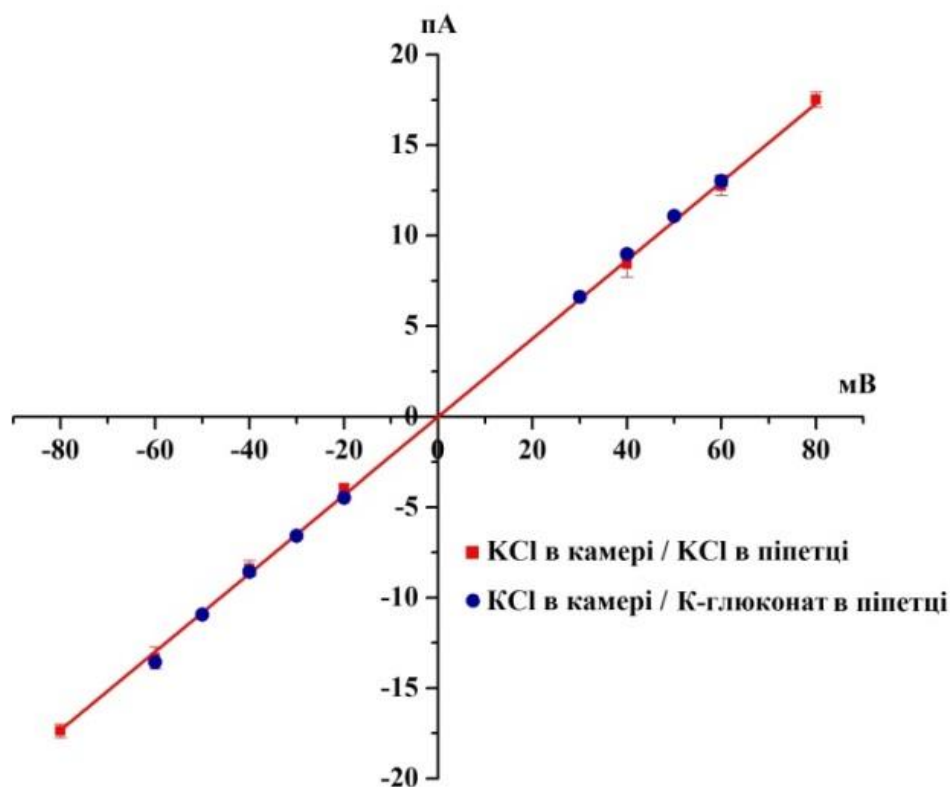


Рис. 3.3. Вольт-амперна характеристика LCC-подібних каналів при заміні розчину KCl (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1 (pH 7,2) в піпетці на еквімолярний розчин з K-глюконатом (ммоль/л): K-глюконат – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1 (pH 7,2). Вольт-амперні характеристики є ідентичними, що свідчить про непроникність каналів цього типу для Cl<sup>-</sup>

Після заміни розчину в камері, за допомогою проточної аплікації, на еквімолярний розчин NaCl спостерігали струми вхідного та вихідного напрямку, але меншої амплітуди (рис. 3.4), що вказує на меншу проникність каналу для Na<sup>+</sup>, ніж для K<sup>+</sup> (n = 4) [154].

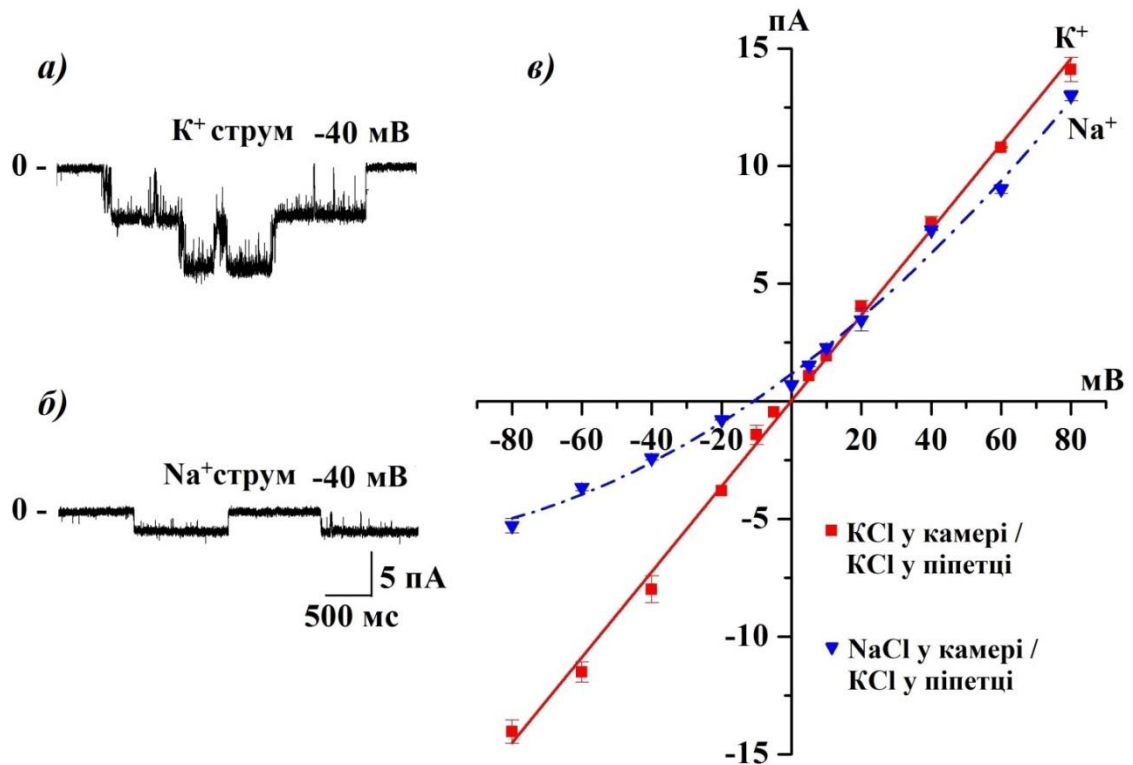


Рис. 3.4. Приклад реєстрації  $K^+$ -струму через LCC-подібний канал в симетричному розчині KCl (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1 (рН 7,2) (а).  $Na^+$ -струм при заміні розчину у камері на еквімолярний розчин NaCl (ммоль/л): NaCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1 (рН 7,2) (б) та їх вольт-амперні характеристики (в)

За наявності у піпетці розчину з високою концентрацією  $Ca^{2+}$  ( $CaCl_2$  – 100 ммоль/л, HEPES – 20 ммоль/л, рН 7,2) струм через канали вдалося зареєструвати лише за негативних значень потенціалу, що є підтвердженням їхньої непроникності для  $Ca^{2+}$  ( $n = 4$ ). Крім того,  $CaCl_2$  (100 ммоль/л) призводить до зменшення  $K^+$ -струму через ці канали, оскільки амплітуда струму через них за таких умов була меншою, ніж за наявності у піпетці KCl чи K-глюконату (рис. 3.5) [154, 155].

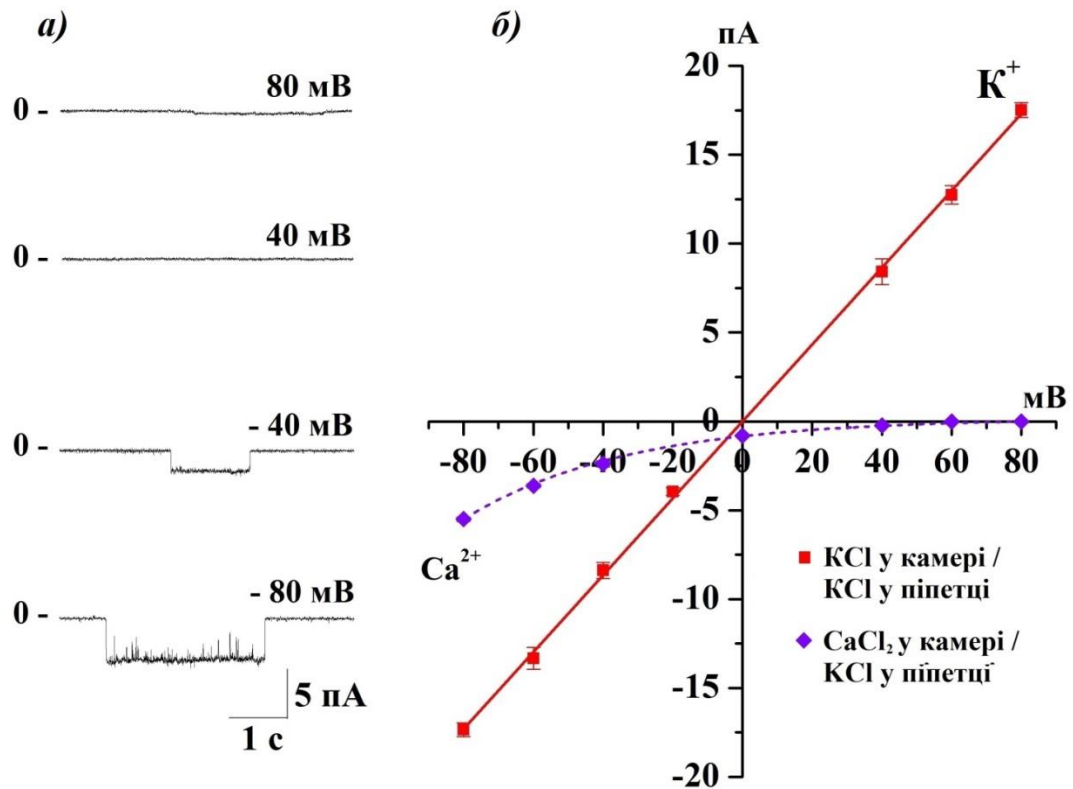


Рис. 3.5. Приклад реєстрації  $Ca^{2+}$ -струму через LCC-подібний канал при заміні розчину у піпетці на розчин  $CaCl_2$  (ммоль/л):  $CaCl_2$  – 100, HEPES – 20 (pH 7,2) за потенціалу +/- 40, +/- 80 мВ (а) та вольт-амперна характеристика (б). Відсутність струму за позитивних значень потенціалу при заміні розчину свідчить про непроникність LCC-каналів для  $Ca^{2+}$

Оскільки провідність та селективність у досліджуваних каналів подібні, як у LCC-каналів ядерної мембрани нейронів Пуркінє [5], зроблено висновок, що вони є саме LCC-каналами.

### 3.1.3. Фармакологічна чутливість LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів

Здійснюючи пошук ефективного інгібітора LCC-каналів раніше, було перевірено вплив багатьох блокаторів на функціональну активність LCC-каналів ядерної мембрани нейронів Пуркінє. Неefективними виявилися блокатори K<sup>+</sup>-каналів: тетраетиламоній (10 ммоль/л) та 4-амінопіридин (2 ммоль/л). Також не впливали на активність LCC-каналів блокатор ріанодинових рецепторів рутеній червоний (10 мкмоль/л), ріанодин (1–10 мкмоль/л), блокатор IP<sub>3</sub>-рецепторів гепарин, фізіологічні концентрації АТФ (0,5–5 ммоль/л), Ca<sup>2+</sup> (0,05–50 мкмоль/л), Mg<sup>2+</sup> (1–5 ммоль/л) [5].

Оскільки фармакологічна чутливість LCC-каналів до кінця не з'ясована, цікавим аспектом є дослідження впливу на них зміїних отрут, які часто були ідентифіковані як блокатори того чи іншого типу каналів. Так, наприклад,  $\alpha$ -бунгаротоксин, який виділяють з яду змії *Bungarus multicinctus* є блокатором нікотинових ацетилхолінових рецепторів (н-холінорецепторів) [156], тетродотоксин блокує потенціалкеровані Na<sup>+</sup>-канали [157], багато з природних токсинів блокують K<sup>+</sup>-канали [3]. Цікавим є також вивчення чутливості LCC-каналів до деяких агоністів та антагоністів н-холінорецепторів, оскільки недавні дані свідчать про пригнічення функціональної активності LCC-каналів ядерної мембрани нейронів під впливом блокатора н-холінорецепторів d-тубокурарину [6].

#### 3.1.3.1. Ефекти зміїних токсинів на функціонування LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів

Зміїні отрути і на сьогоднішній день використовують для виготовлення препаратів з анальгезивною і спазмолітичною дією. Вплив деяких фракцій отрут на LCC-канали нейронів Пуркінє мозочка раніше вже був досліджений. Зокрема, встановлено, що фракції отрути кобри *Naja kaouthia*, гадюк *Vipera renardi* та *Bitis*

*arietans* значно (до 85 %) зменшували  $P_o$  LCC-каналів, а отрута крайта *Bungarus fasciatus* (на четвертину) і скорпіона *Heterometrus laoticus* (вдвічі) зменшували значення  $K^+$ -струму через ці канали [4]. Однак, досліджені речовини були у формі неочищених фракцій, що унеможлиблює однозначну оцінку частки впливу тої чи іншої їх складової. Крім цього, за таких умов складно оцінити концентрації діючих речовин у фракційній суміші.

Продовжуючи дослідження впливу природних отрут на функціональну активність LCC-каналів, ми подіяли на них, виділеним з отрути кобри *Naja oxiana*, очищеним препаратом нейротоксину II (NT II), який здатний інгібувати н-холінорецептори. Представлено типову реєстрацію струмів через LCC-канали при аплікації 25 мкмоль/л NT II, а також амплітудні діаграми ( $n = 3$ ; рис. 3.6) [158].

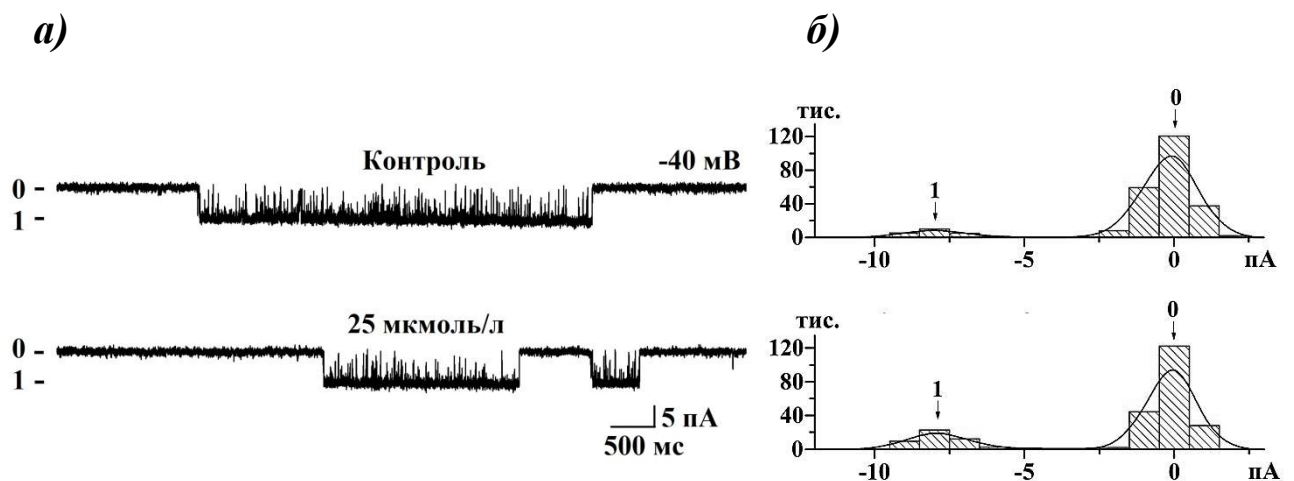


Рис. 3.6. Функціональна активність LCC-каналів ядерної мембрани за дії NT II. Оригінальні реєстрації струму через LCC-канали ядерної мембрани кардіоміоцитів при потенціалі -40 мВ (а) та амплітудні діаграми (б): 0 – всі канали закриті, 1 – один канал відкритий. Реєстрацію проводили в розчині такого складу (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1; NT II – 0,025 (pH 7,2)

У концентрації 25 мкмоль/л NT II достовірно зменшував амплітуду струму через LCC-канали на 13 % ( $P \leq 0,05$ ) порівняно з контролем (рис. 3.7) [158].

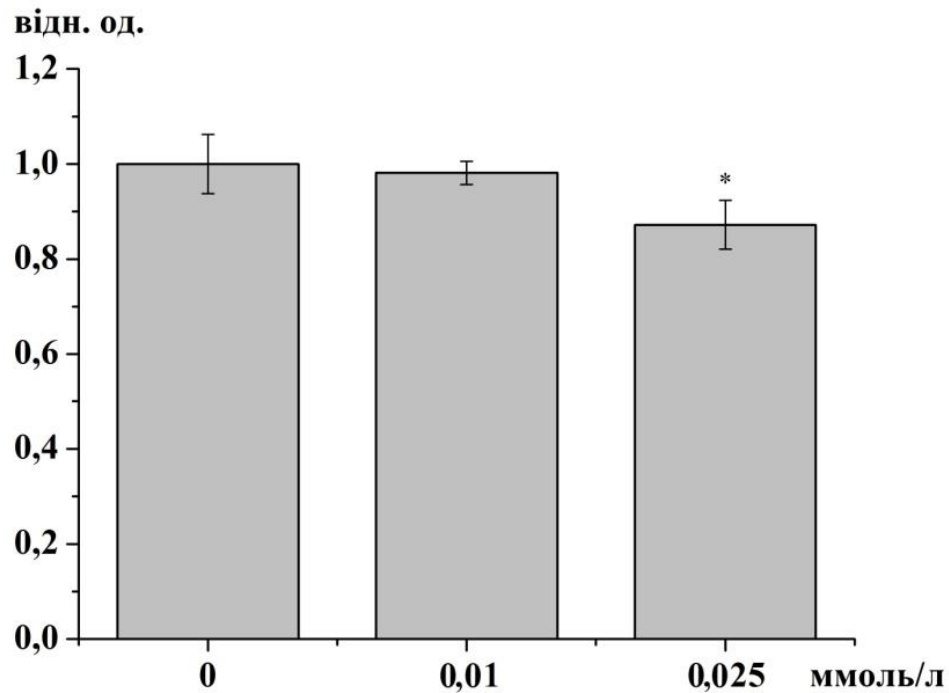


Рис. 3.7.  $K^+$ -струм через LCC-канал, в присутності NT II у робочій камері в концентрації 0,01–0,025 ммоль/л, нормалізовані показники. В концентрації 25 мкмоль/л NT II достовірно зменшує середню амплітуду струму через досліджувані канали (\* $P \leq 0,05$ )

У наступній серії експериментів ми досліджували біофізичні характеристики функціонування LCC-каналів ядерної мембрани при аплікації  $\alpha$ -кобратоксину ( $\alpha$ -СТХ). Останній є основним компонентом фракції отрути кобри *Naja kaouthia cobra*, це довголанцюговий  $\alpha$ -нейротоксин, що специфічно взаємодіє з  $\alpha 7$  і  $\alpha 9(\alpha 10)$  субодиницями н-холінорецепторів ссавців [159]. Вплив  $\alpha$ -СТХ призводить гальмує іонний потік через постсинаптичну мембрану, призводячи до паралічу через конкурентне зв'язування з н-холінорецепторами нейронального і м'язового типів.

За дії  $\alpha$ -СТХ у концентрації 1–2 ммоль/л спостерігали незначний ефект «миготіння» каналу ( $n = 3$ ; рис. 3.8).

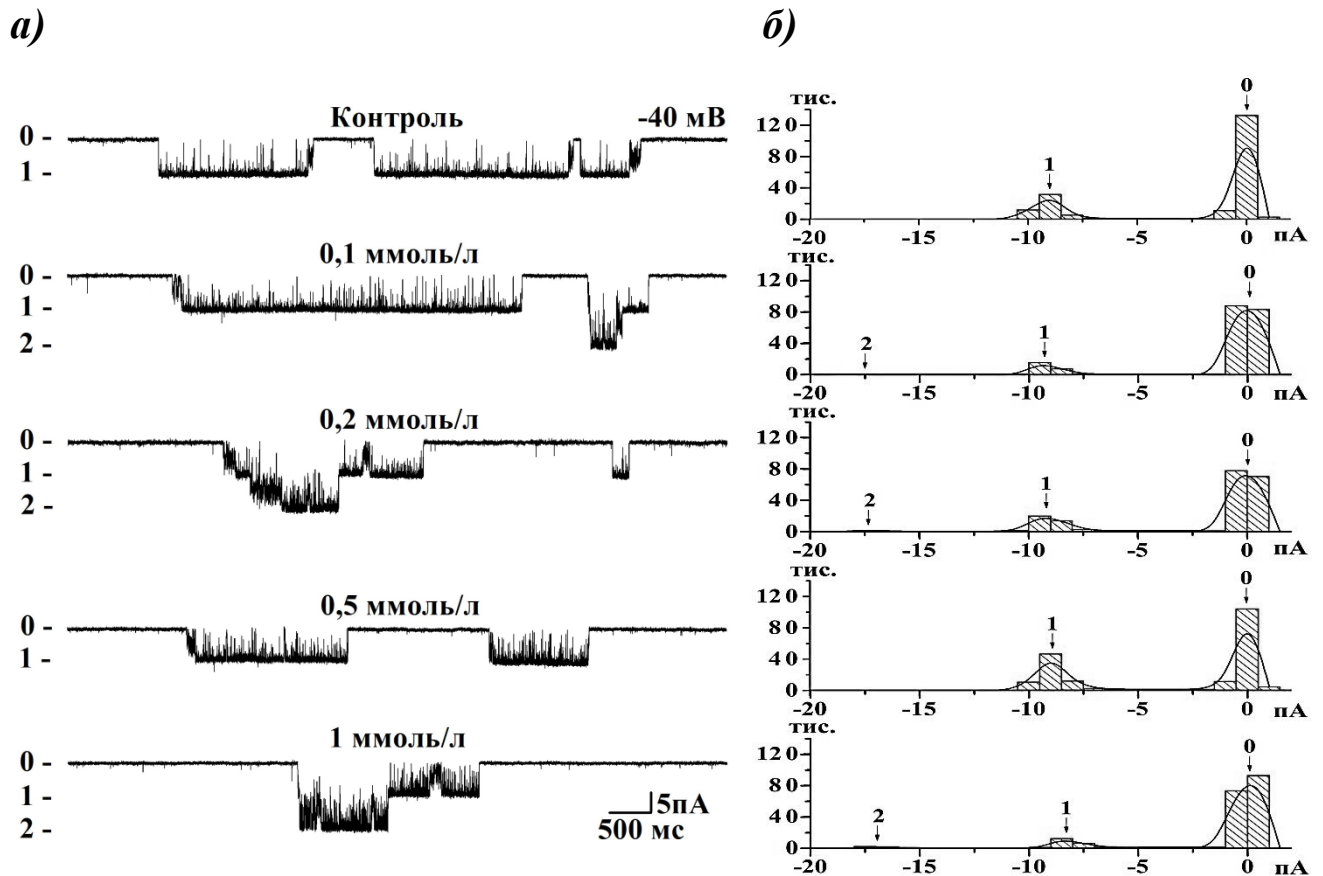
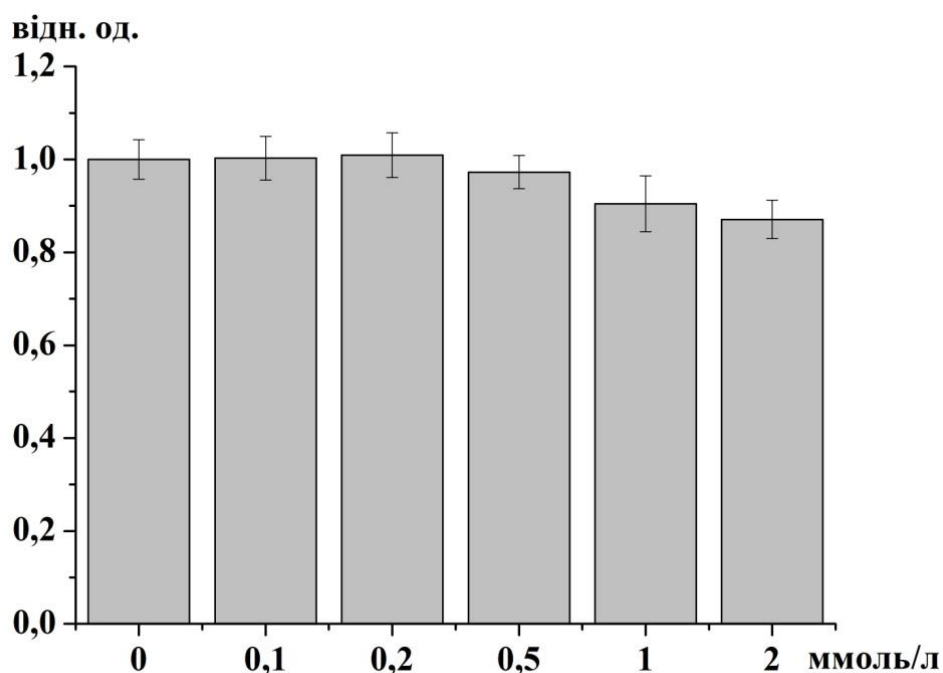


Рис. 3.8. Функціонування LCC-каналів ядерної мембрани під впливом  $\alpha$ -СТХ, реєстрація при потенціалі -40 мВ (а) та амплітудні діаграми (б): 0 – всі канали закриті, 1, 2 – відповідна кількість відкритих каналів. Реєстрацію проводили в розчині такого складу (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1;  $\alpha$ -СТХ – 0,1–2 (рН 7,2). Як видно з рисунка амплітуда струму через LCC-канали залишилась без змін за наявності блокатора  $\alpha$ -СТХ в середовищі, та з'являлось незначне «миготіння» каналу

Статистично достовірних змін амплітуди струму через LCC-канали в присутності  $\alpha$ -СТХ не відмічали (рис. 3.9).



*Рис. 3.9.  $K^+$ -струм через LCC- канали після аплікації  $\alpha$ -СТХ (0,1–2 ммоль/л) нормалізовані показники. Амплітуда струму через LCC-канали достовірно не змінилась після додавання блокатора*

### Підсумок

Вивчаючи вплив деяких зміїних отрут на LCC-канали встановили, що відносно ефективним є NT II, в той час як  $\alpha$ -СТХ спричиняє лише незначне «миготіння» досліджуваних каналів.

#### **3.1.3.2. Вплив блокаторів н-холінорецепторів на функціональну активність LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів**

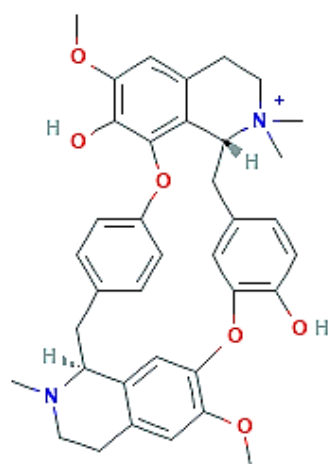
Роботами співробітників нашої лабораторії у 2016 році було показано, що антагоніст н-холінорецепторів d-тубокурарин є доволі ефективним блокатором LCC-каналів ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка [6]. Оскільки фармакологічна чутливість може відрізнятися залежно від типу клітин/тканин, ми вирішили перевірити чи має він вплив також на LCC-канали експресовані в



ядерній мембрані кардіоміоцитів, а також дослідити вплив інших блокаторів н-холінорецепторів на функціональну активність LCC-каналів.

До речовин, що блокують н-холінорецептори належать гангліоблокатори та міорелаксанти периферичної дії. Гангліоблокатори – це речовини, що блокують передачу збудження у вегетативних гангліях (наприклад, гексаметоній). Міорелаксанти – речовини, що блокують н-холінорецептори скелетних м'язів і переривають нервово-м'язову передачу збудження. Залежно від механізму дії міорелаксанти розрізняють: деполаризуючі та недеполаризуючі (антидеполаризуючі). Препарати, які зв'язуючись з холінорецепторами перешкоджають впливу ацетилхоліну, внаслідок чого нервовий імпульс не призводить до деполаризації м'язового волокна називають недеполаризуючими або антидеполаризуючими (наприклад, рокуронію бромід). Натомість деполаризуючі міорелаксанти (наприклад, дитилін) зв'язуючись з н-холінорецептором збуджують його, спричиняючи стійку деполаризацію, в результаті м'язове волокно після короткого скорочення розслаблюється [160].

Тубокурарин – класичний конкурентний неселективний антагоніст н-холінорецепторів, природний алкалоїд кураре, вперше виділений з Південноамериканської рослини *Chondodendron tomentosum*. Тубокурарин конкурентно зв'язується з н-холінорецепторами в нервово-скелетном'язових синапсах, блокуючи передачу імпульсу без деполаризації постсинаптичної мембрани. Це призводить до розслаблення і паралічу скелетних м'язів. Молекулярна формула тубокурарину  $C_{37}H_{41}N_2O_6^+$ , хімічна структура молекули тубокурарину (3.1) [161]:



(3.1)

Ця речовина має два сайти зв'язування з н-холінорецептором дорослих мишей: високоафінний локалізований на межі  $\alpha$ - і  $\varepsilon$ -субодиниць рецептора та низькоафінний розміщений між сусідніми  $\alpha$ - та  $\delta$ -субодиницями. Тубокурарин інгібує м'язові холінорецептори з  $IC_{50} = 18$  нмоль/л, тоді як нейрональні – в концентрації  $IC_{50}$  від 1 до 20 мкмоль/л, високі концентрації блокують також ГАМК<sub>A</sub>-рецептори [156].

Було показано, що після аплікації d-тубокурарину в камеру у концентрації 1 ммоль/л і вище, струми через LCC-канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє майже зникали, в цьому випадку тубокурарин проявляв властивості блокатора каналу [6]. Подібний, але дещо менш виражений ефект d-тубокурарин мав і на LCC-канали ядерної мембрани кардіоміоцитів: 200 мкмоль/л – зменшення амплітуди струму через канали на 45 % ( $P \leq 0,001$ ), в той час як збільшення концентрації блокатора в камері до 1 ммоль/л спричиняло появу швидких короткочасних спроб відкривання – закривання каналу (так званий flicker-блок каналу) ( $n = 4$ ; рис. 3.10).

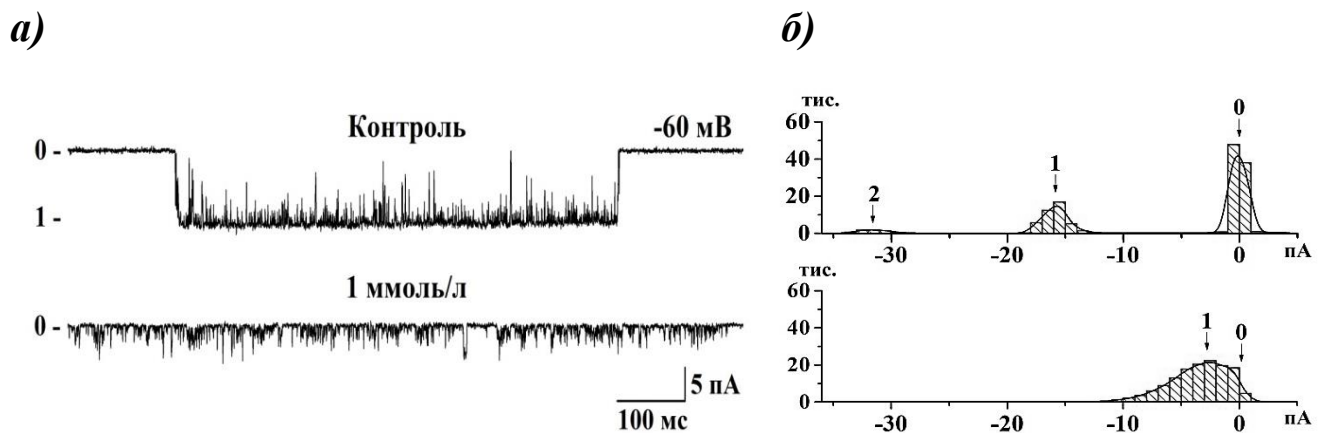
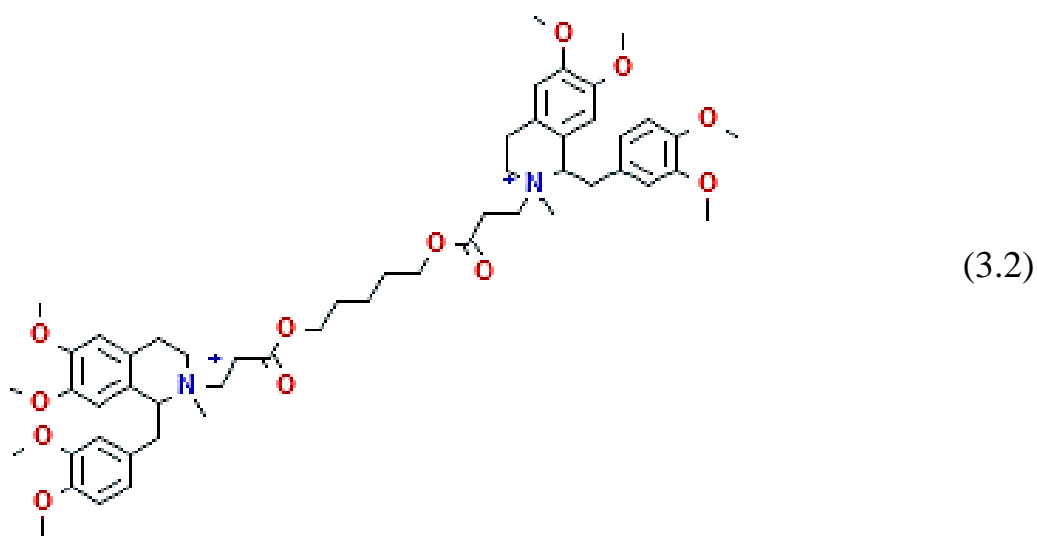


Рис. 3.10. Репрезентативна реєстрація струму через LCC-канали за дії d-тубокурарину при потенціалі -60 мВ (а) та його амплітудні діаграми (б): 0 – всі канали закриті, 1 – відповідна кількість відкритих каналів. Реєстрацію проводили в розчині такого складу (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1; d-тубокурарин – 1 (рН 7,2). Зменшення амплітуди струму через LCC-канали та поява «миготіння» каналу є свідченням блокування пори каналу у його відкритому стані

Оскільки d-тубокурарин є інгібітором н-холінорецепторів, ми вирішили перевірити вплив інших блокаторів цих рецепторів на LCC-канали, досліджуючи їх вплив за низьких концентрацій, – для того, щоб ідентифікувати більш ефективні, ніж d-тубокурарин, інгібітори LCC-каналів. Наступним перевіреним нами блокатором був атракуріум – міорелаксант недеполяризуючого конкурентного типу середньої тривалості дії. Молекулярна формула атракуріуму  $C_{53}H_{72}N_2O_{12}^{+2}$ , його хімічна структурна формула (3.2) [162]:



Він інгібує н-холінорецептори кінцевих пластинок скелетних м'язів, перешкоджаючи деполаризуючій дії ацетилхоліну, як наслідок виникає пригнічення нервово-м'язового збудження на рівні постсинаптичної мембрани [163].

Атракуріум додавали в робочу камеру в концентрації від 0,5–2 ммоль/л шляхом проточної аплікації ( $n = 6$ ). За наявності блокатора в середовищі спостерігали появу «миготіння» каналу, що є доказом блокування пори каналу у його відкритому стані (рис. 3.11) [164].

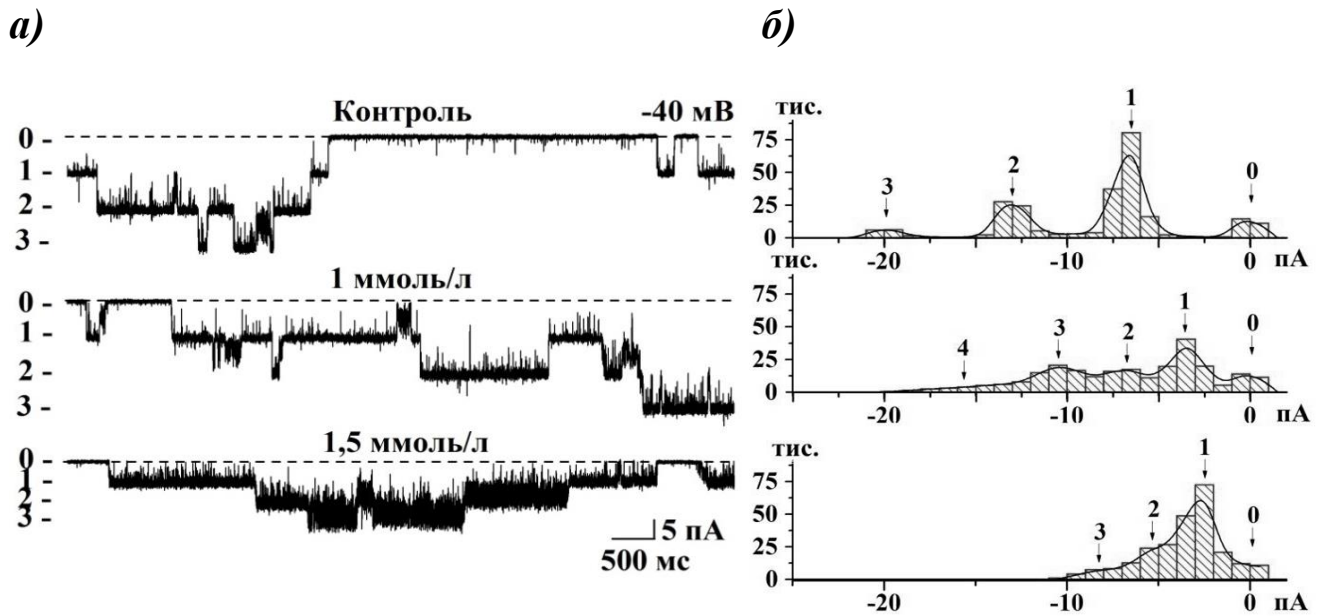


Рис. 3.11. Приклад реєстрації струмів через LCC-канали ядерної мембрани кардіоміоцитів за дії атракуріуму при потенціалі -40 мВ (а) та амплітудні діаграми (б): 0 – всі канали закриті, 1, 4 – відповідна кількість відкритих каналів. Реєстрацію проводили в розчині такого складу (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1; атракуріум – 0,5–2 (рН 7,2). За дії блокатора зменшується амплітуда струму через канали

Як свідчать отримані дані, функціонування LCC-каналів ядерної мембрани дозозалежно пригнічується атракуріумом, однак повного блокування не було навіть при концентрації 2 ммоль/л, при цьому амплітуда струму зменшилась на 60 % ( $P \leq 0,001$ ), на рисунку представлено графік залежності зменшення амплітуди струму від концентрації тестованої речовини (рис. 3.12) [165, 166].

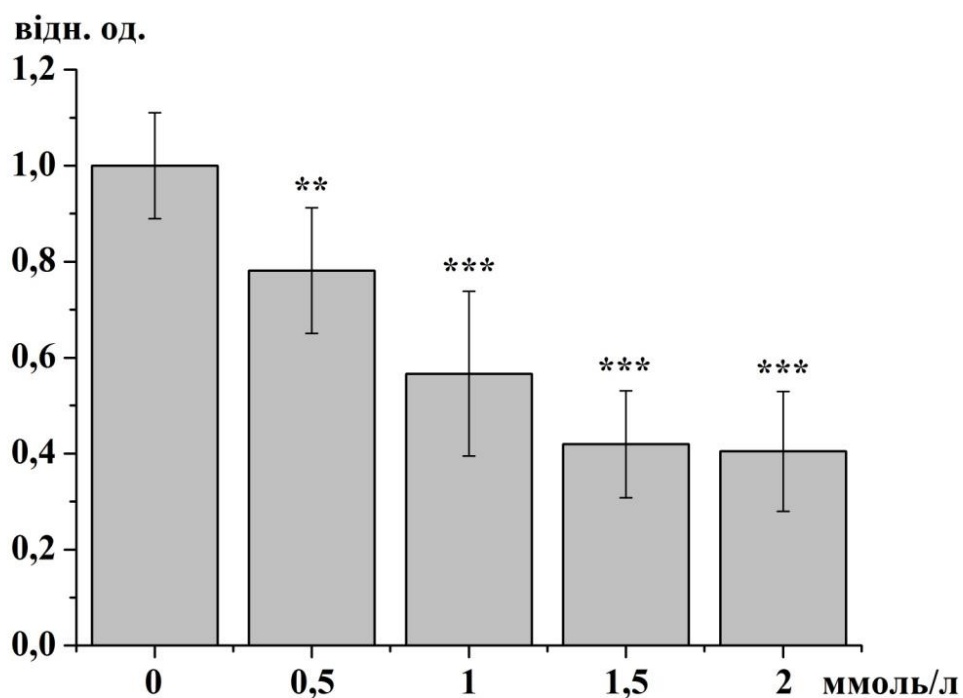
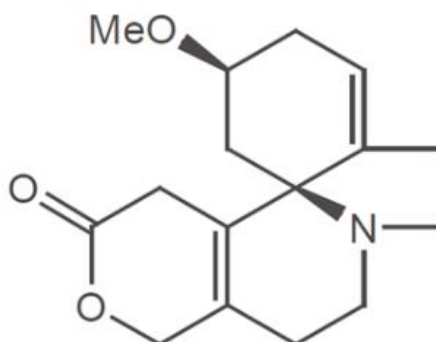


Рис. 3.12. Вплив атракуріуму на середню амплітуду струму крізь LCC-канали ядерної мембрани кардіоміоцитів. Діаграма ілюструє достовірне зменшення амплітуди струму через LCC-канал за дії блокатора н-холінорецепторів атракуріуму в концентрації від 0,5 до 2 ммоль/л, усереднені показники (\*\* $P \leq 0,01$ , \*\*\* $P \leq 0,001$ )

Наступною перевіреною речовиною був дигідро- $\beta$ -еритроїдин (Dh $\beta$ E) – алкалоїд, який виділяють із насіння коралового дерева (*Erythrina*), конкурентний антагоніст нейрональних холінорецепторів, молекулярна формула якого  $C_{16}H_{21}NO_3HBr$ . Структурна формула Dh $\beta$ E представлена [167] (3.3)



(3.3)

За різними даними Dh $\beta$ E в концентрації від 0,82–1 мкмоль/л блокує рекомбінантні  $\alpha$ 4 $\beta$ 2-вмісні н-холінорецептори [167, 156], але він у 10–50 разів менш ефективний до інших підтипів, в тому числі  $\alpha$ 3 $\beta$ 4-,  $\alpha$ 7- та  $\alpha$ 9-вмісні н-холінорецептори.

Зазвичай Dh $\beta$ E використовують в концентрації 1–10 мкмоль/л для селективного блокування  $\beta$ 2-вмісних н-холінорецепторів *in vitro* [156]. Також є дані про застосування препаратів на основі Dh $\beta$ E в якості перорального міорелаксанта при лікуванні хвороби Паркінсона, спастичних розладів та м'язових спазмів, пов'язаних з правцем [167].

Аплікацію Dh $\beta$ E здійснювали безпосередньо в камеру, враховуючи кінцеву концентрацію. Після аплікації блокатора зменшувалася амплітуда струму через LCC-канали, що може бути пов'язано з конформаційними змінами у порі каналу. Приклад реєстрації струмів та амплітудні діаграми за дії Dh $\beta$ E представлено на рис. 3.13 [168].

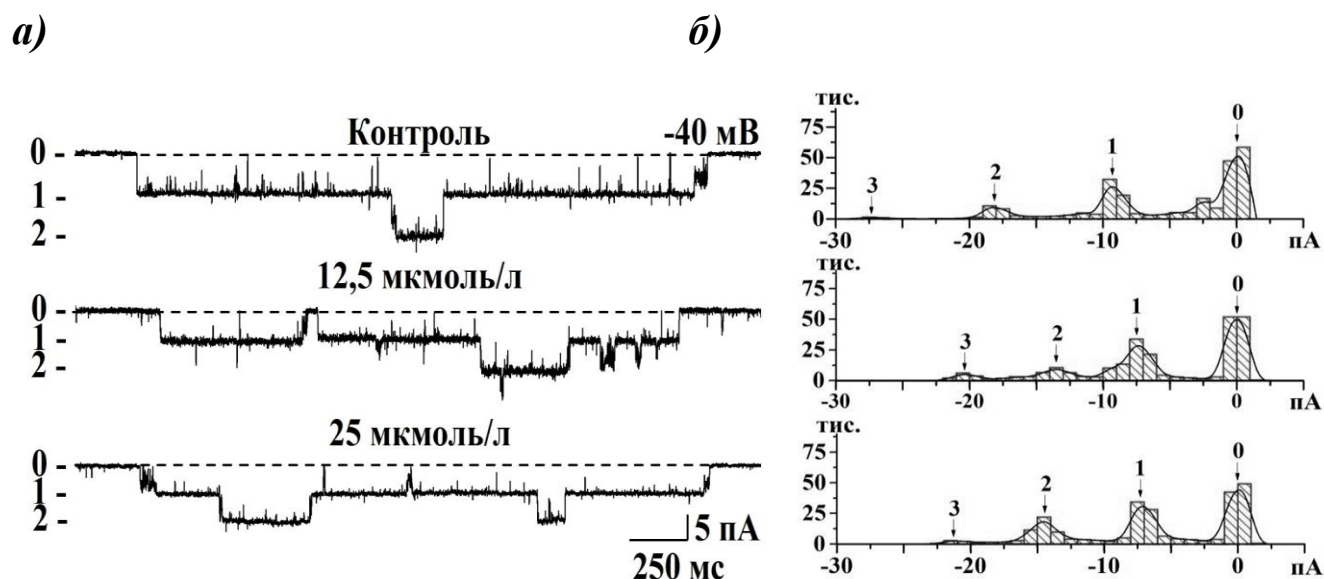


Рис. 3.13. Репрезентативний запис іонних струмів через LCC-канали ядерної мембрани кардіоміоцитів під впливом Dh $\beta$ E при потенціалі -40 мВ (а) та амплітудні діаграми (б). Реєстрацію проводили в розчині такого складу (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1; Dh $\beta$ E – 12,5 та 25 мкмоль/л (рН 7,2). Чітко виражено зменшення амплітуди струму за наявності блокатора у середовищі: 0 – всі канали закриті, 1, 2 – відповідна кількість відкритих каналів

DhβE дозозалежно зменшував амплітуду струму каналів: за концентрації 12,5 мкмоль/л на 21 % ( $P \leq 0,01$ ), а за дії 25 мкмоль/л - 40 % ( $P \leq 0,001$ ) порівняно з контролем (рис. 3.14).

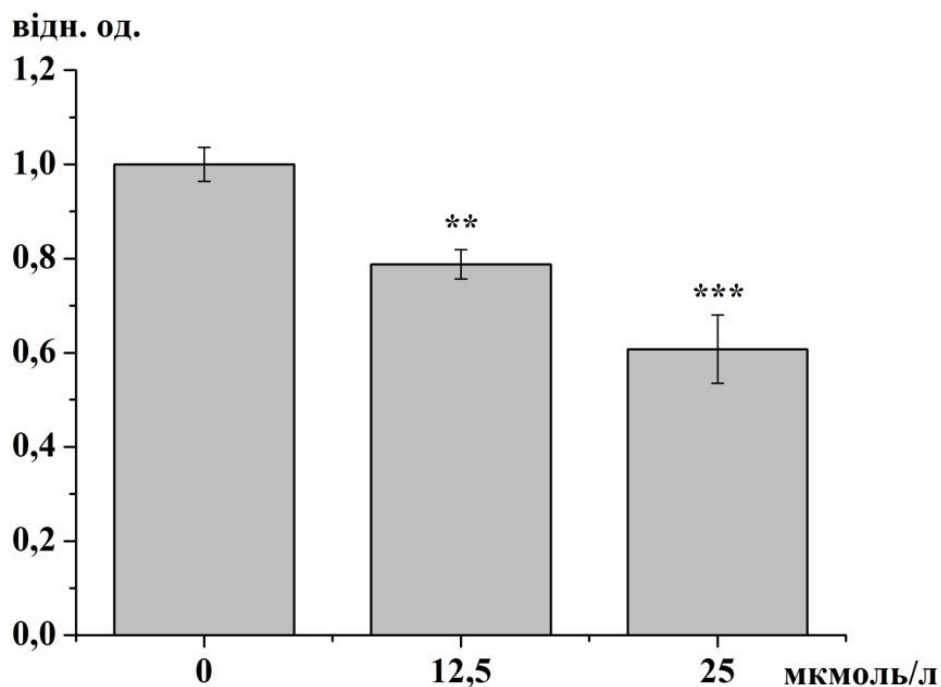
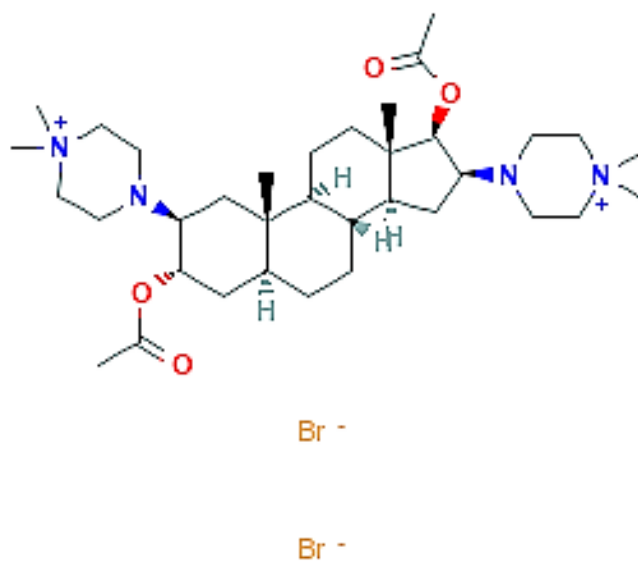


Рис. 3.14. Дозозалежність впливу DhβE на функціонування LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів. З діаграми видно чітку залежність зменшення амплітуди струму через LCC-канали зі збільшенням концентрації блокатора у середовищі (\*\* $P \leq 0,01$ , \*\*\* $P \leq 0,001$ )

Помітний вплив на функціональну активність LCC-каналів чинив піпекуронію бромід ( $C_{35}H_{62}Br_2N_4O_4$ ) – недеполяризуючий м'язовий релаксант, який інгібує нервово-м'язову передачу конкуруючи з ацетилхоліном за н-холінорецептори, зменшуючи тим самим реакцію кінцевої пластинки на ацетилхолін [169]. Піпекуронію бромід входить до складу лікарського засобу ардуану, який застосовують при операціях.

Хімічна структура молекули піпекуронію броміду виглядає так (3.4) [170]:



(3.4)

Піпекуронію бромід аплікували в камеру враховуючи кінцеву концентрацію, за його присутності в середовищі зменшувалася амплітуда струму крізь LCC-канали ядерної мембрани на 12 % при аплікації 0,2 ммоль/л ( $P \leq 0,05$ ) та на 55 % за наявності 2 ммоль/л ( $P \leq 0,001$ ) речовини в камері ( $n = 4$ , рис. 3.15).



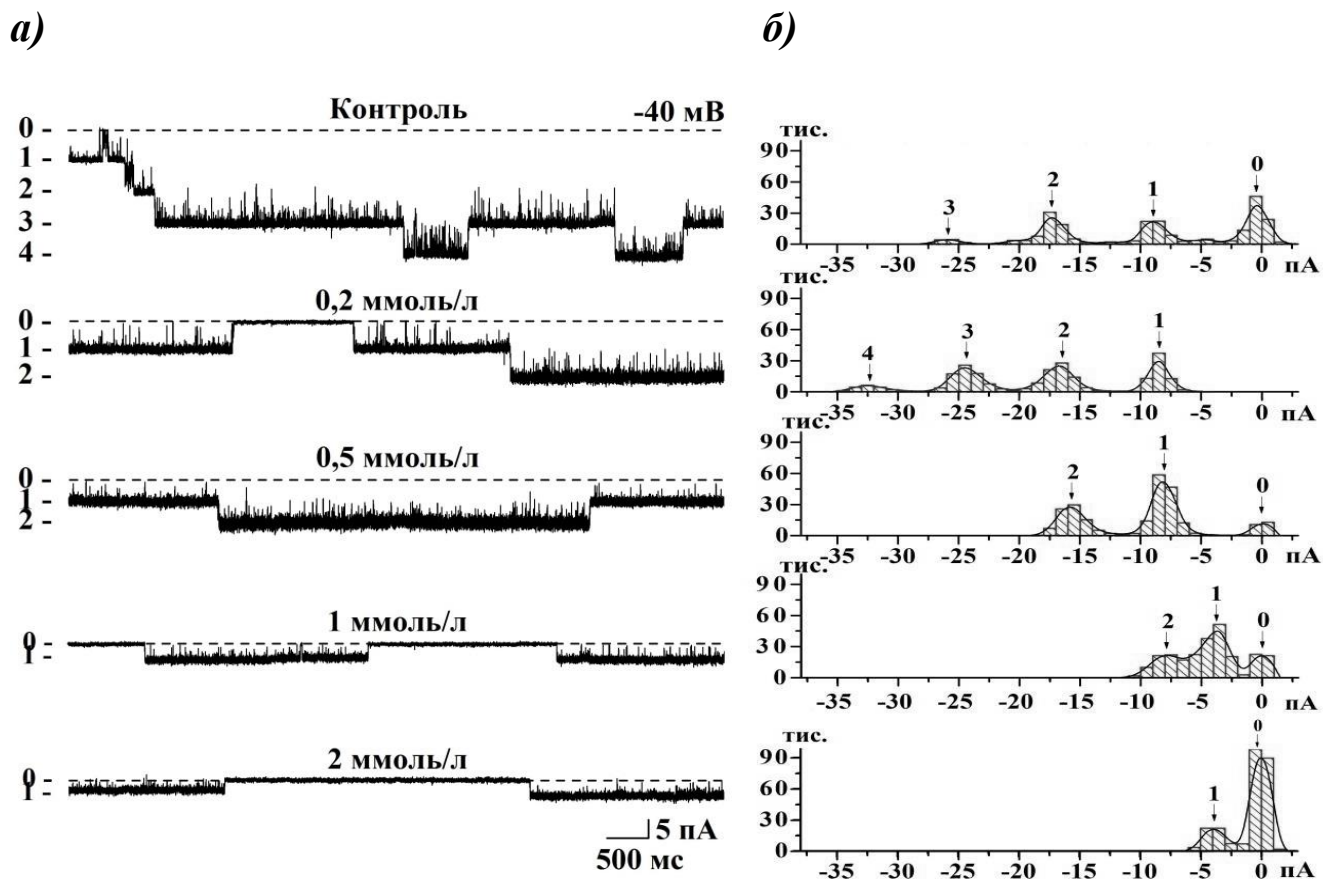


Рис. 3.15. Репрезентативний запис реєстрації іонних струмів через LCC-канали за дії пінекуронію броміду при потенціалі -40 мВ (а) та амплітудні діаграми (б): 0 – всі канали закриті, 1, 4 – відповідна кількість відкритих каналів. Реєстрацію проводили в розчині такого складу (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1; пінекуронію бромід – 0,1 – 2 (рН 7,2). Простежується чітка залежність зменшення амплітуди струму через канал від концентрації фармакологічної речовини

Також удвічі зменшувалася амплітуда струму за дії 1 ммоль/л блокатора у середовищі порівняно з контролем (рис. 3.16).

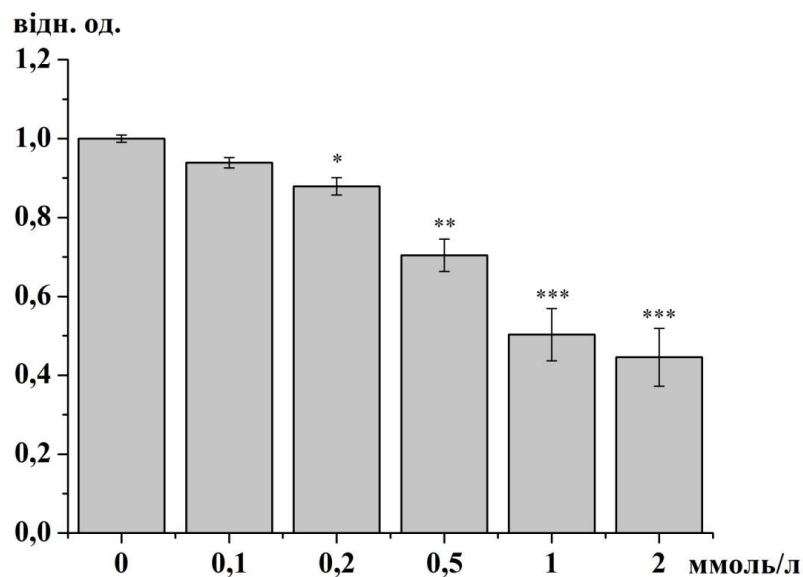
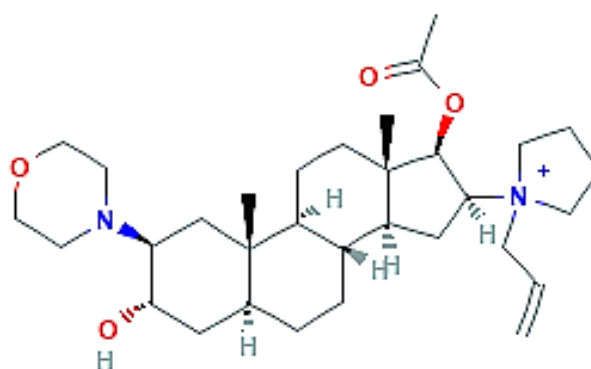


Рис. 3.16. Вплив піпекуронію броміду різної концентрації (0,1–2 ммоль/л) на середній струм через LCC-канали. З графіка видно зменшення середньої амплітуди струму зі збільшенням концентрації піпекуронію броміду у середовищі (\* $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \*\*\* $P \leq 0,001$ )

Наступним ми перевіряли холіноблокатор рокуронію бромід (*Rocuronium Bromide*) – форма бромідної солі рокуронію з властивостями м'язового релаксанта, молекулярна формула якого  $C_{32}H_{53}BrN_2O_4$ . Хімічна структура представлена (3.5) [171]:



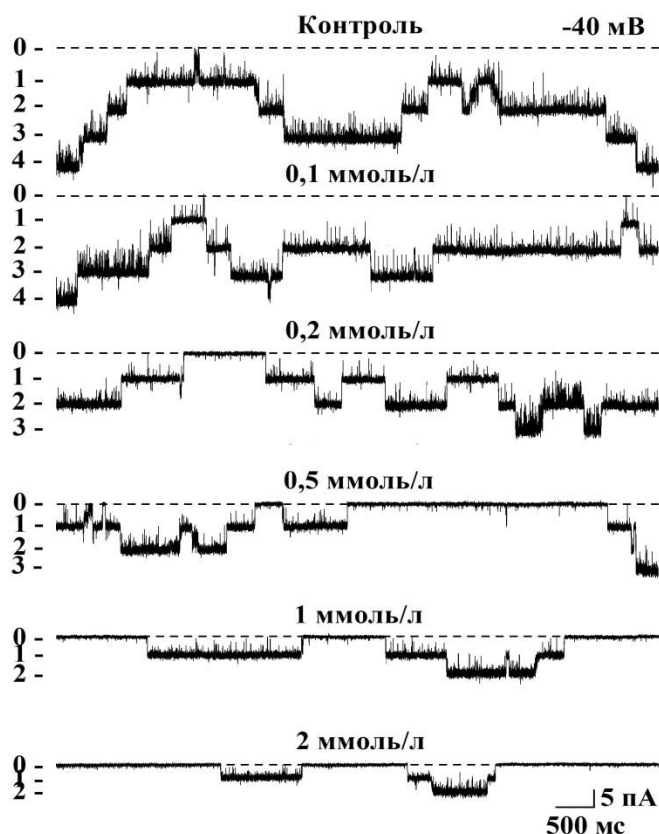
Br<sup>-</sup>

(3.5)

Бромід рокуронію конкурентно зв'язується з н-холінорецепторами кінцевої моторної пластинки в результаті чого відбувається розслаблення м'язів [156, 171].

Після аплікації рокуронію броміду в робочу камеру, враховуючи кінцеве концентрацію, він чинив виражений пригнічуючий вплив на LCC-канали кардіоміоцитів.  $P_0$  зменшувалася за наявності 0,1–2 ммоль/л блокатора у середовищі (рис. 3.17).

а)



б)

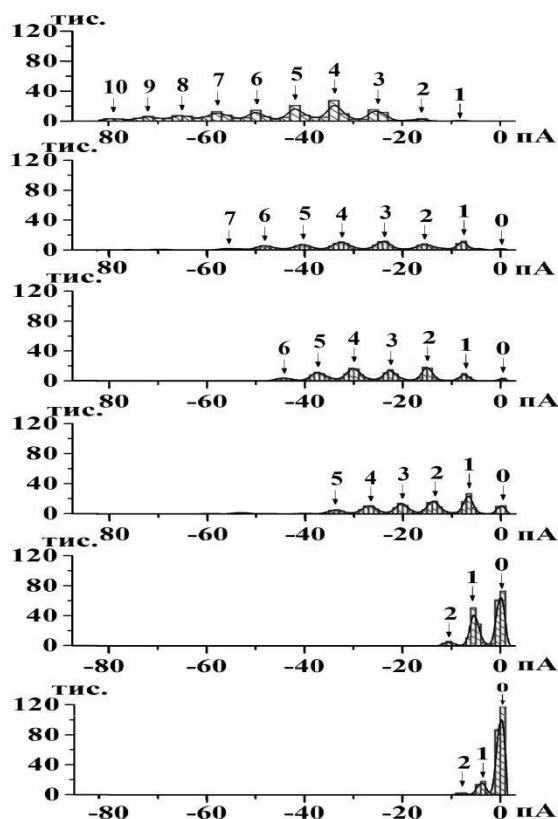
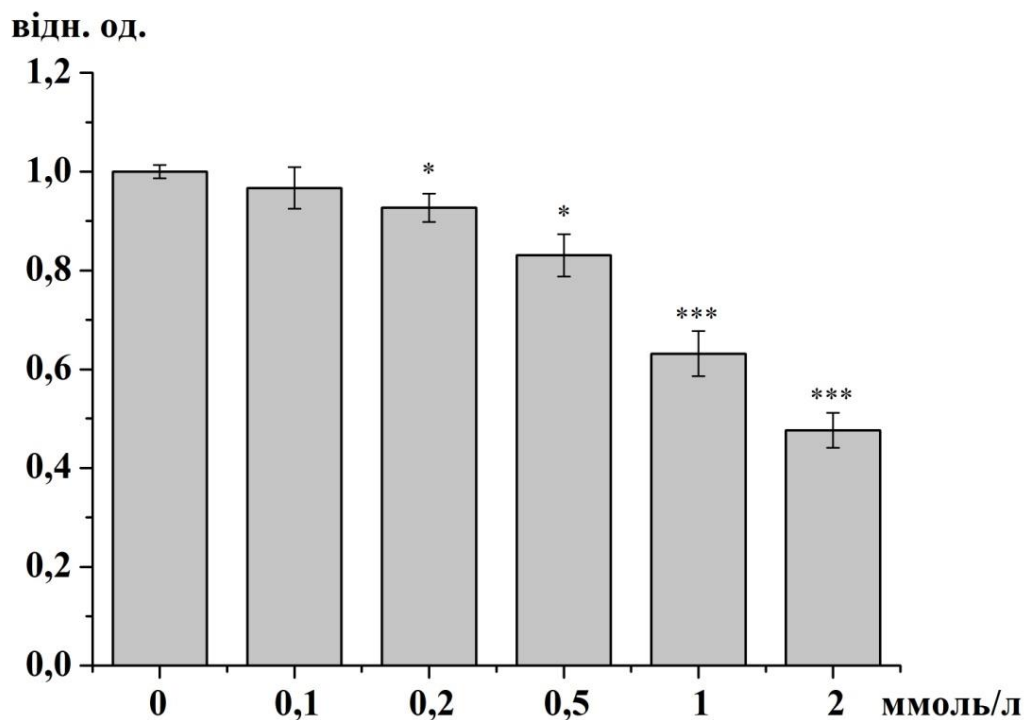


Рис. 3.17. Оригінальні реєстрації струму через LCC-канали ядерної мембрани кардіоміоцитів за наявності рокуронію броміду в середовищі при потенціалі -40 мВ (а) та його амплітудні діаграми (б): 0 – всі канали закриті, від 1 до 4 позначено відповідну кількість відкритих каналів. Реєстрацію проводили в розчині такого складу (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1; рокуронію бромід – 0,1–2 (рН 7,2). Як видно з результатів реєстрацій зі збільшенням концентрації діючої речовини помітно зменшується амплітуда струму через канали

Після аплікації рокуронію броміду простежується чітка тенденція до зменшення амплітуди струму через LCC-канали зі зростанням концентрації блокатора в середовищі (0,2 ммоль/л – 7 % ( $P \leq 0,05$ ), 2 ммоль/л – 52 % ( $P \leq 0,001$ );  $n = 4$ ; рис. 3.18) [172].



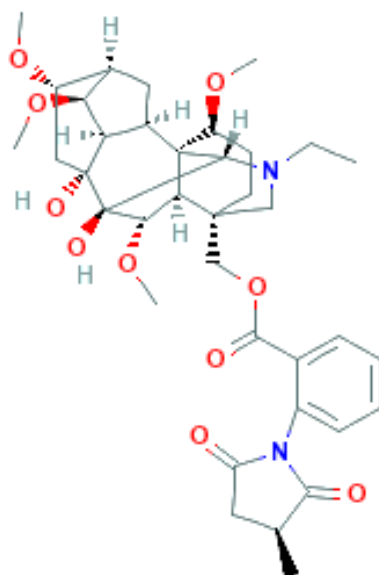
*Рис. 3.18. Ефект рокуронію броміду [0,1–2 ммоль/л] на амплітуду струму крізь LCC-канали ядерної мембрани кардіоміоцитів, нормалізовані показники. Спостерігається зменшення амплітуди струму при додаванні високих концентрацій блокатора в середовище (\* $P \leq 0,05$ , \*\*\* $P \leq 0,001$ )*

Піпекуронію та рокуронію броміди належать до курареподібних речовин, та мають спільні елементи у хімічній структурі. Обидві молекули є нітрогенвмісними полігетероциклічними сполуками, які мають у своєму складі карбонільні групи: рокуроній – 1, піпекуроній – 2, чим можна пояснити аналогічність їх ефектів. Незважаючи на подібний з тубокурарином механізм впливу на н-холінорецептори, хімічна структура рокуронію та піпекуронію має суттєві відмінності від структури тубокурарину. На відміну від нього, що

належить до групи бензилізохінолінових речовин, вони відносяться до аміностероїдів з амінозаміщеним стероїдним кільцем. Крім цього, молекула тубокурарину є значно більшою, чим можна пояснити ефективніше блокування каналу. Але оскільки структура досліджуваних нами LCC-каналів досі залишається невідомою, складно зробити висновок про механізм такого впливу. Однак можна припустити, що ефект «миготіння» тобто дуже швидких послідовних спроб закривання та відкривання каналу під впливом деяких досліджених нами речовин (тубокурарин, дитилін, атракуріум,  $\alpha$ -СТХ) очевидно, пов'язаний з механічним блокуванням пори каналу у його відкритому стані. Але ми не можемо також виключити, що зменшення  $P_o$  та безпосередня зміна амплітуди струму через них під впливом лігандів нікотинових холінорецепторів зумовлена опосередкованим впливом на певну форму нікотинових рецепторів, присутню на ядерній мембрані, подібно до нещодавно відкритих нікотинових рецепторів на зовнішній мембрані мітохондрій [173], однак це припущення потребує окремого дослідження.

Також незмінними залишилися параметри функціонування LCC-каналів за дії конкурентного селективного антагоніста  $\alpha 7$ -вмісного ацетилхолінового рецептора метиллікаконітину (MLA) – алкалоїду, який виділяють з живокосту (*Delphinium*). Дія конкурентних антагоністів полягає в утворенні зв'язку у сайті зв'язування ліганду і цим самим перешкоджає зв'язуванню з природніми агоністами. MLA є високоселективним до  $\alpha 7$ -вмісних н-холінорецепторів порівняно з іншими субтипами цих рецепторів. Його вплив на н-холінорецептори пов'язаний з інгібуванням ним  $\alpha 7$  субодиниці рецептора з  $IC_{50} = 140$  пмоль/л в той час як  $\alpha 4\beta 2$ -вмісні рецептори інгібуються з  $IC_{50} = 200$  нмоль/л [156, 174]. Наявні дані, що MLA блокує АТФ-активований струм зі швидкою десенсибілізуючою кінетикою через  $P2X_3$  рецептори в ізольованих дорзальних корінцях гангліонарних нейронів, концентрація при якій відбувалось половинне блокування становила  $34 \pm 11$  нмоль/л [175].

Молекулярна формула MLA  $C_{37}H_{50}N_2O_{10}$ , структурна формула (3.6) [176]:



(3.6)

MLA аплікували в камеру, враховуючи кінцеву концентрацію, в концентрації 0,1 та 1 ммоль/л (рис. 3.19).

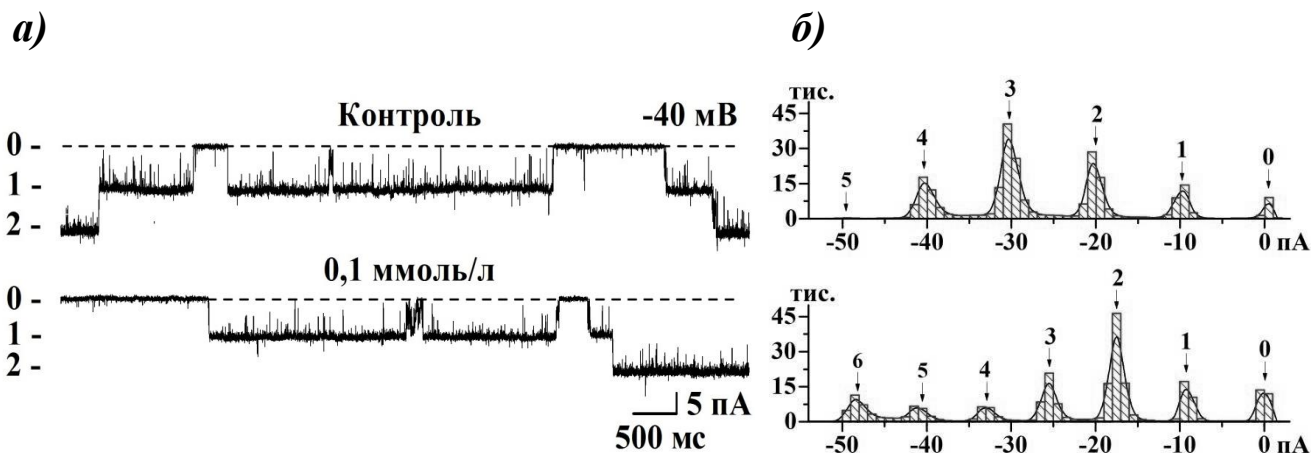


Рис. 3.19. Репрезентативний запис струму через LCC-канали ядерної мембрани кардіоміоцитів після аплікації MLA за потенціалу -40 мВ (а) та його амплітудні діаграми (б): 0 – всі канали закриті, 1, 2 – відповідна кількість відкритих каналів. Як видно із реєстрації активність LCC-каналів за дії блокатора не змінилась. Реєстрацію проводили в розчині такого складу (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1; MLA – 0,1, 1 (pH 7,2)

У тестованих концентраціях MLA не змінював функціональну активність LCC-каналів, усереднені показники амплітуди струму статистично не змінилися ( $n = 3$ ; рис. 3.20).

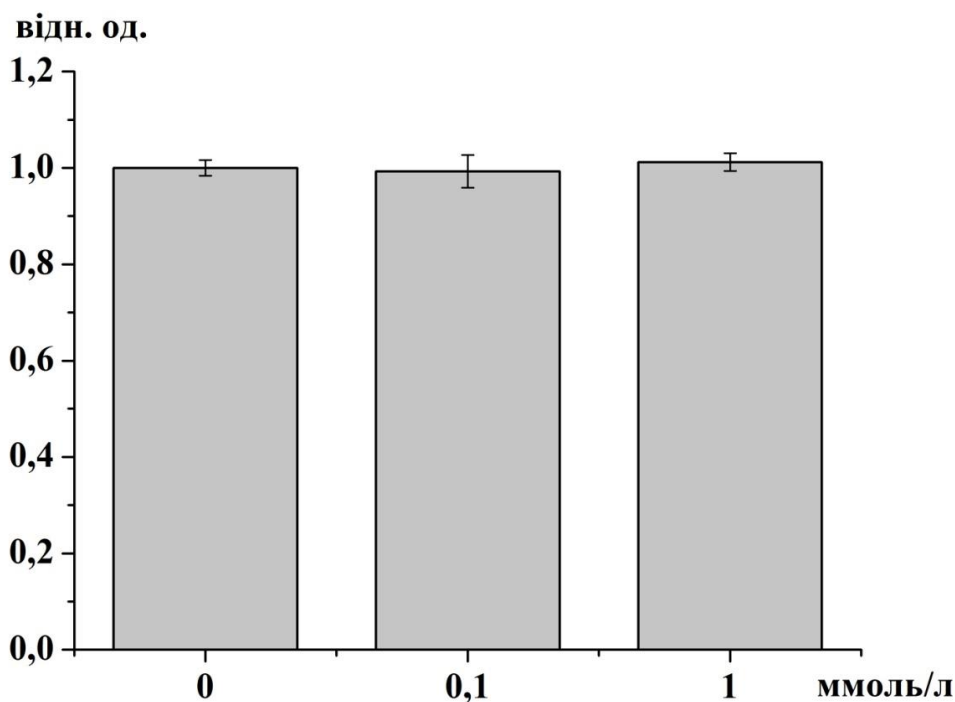


Рис. 3.20. Амплітуда струму через LCC-канали за дії MLA в концентрації 0,1 – 1 ммоль/л. Як видно з графіка усереднені показники амплітуди струму через канали не змінилися за наявності блокатора у середовищі

Неефективним виявився також інгібітор н-холінорецепторів  $\alpha$ -колотоксин PeIA, виділений з морських равликів *Conus pergrandis*. Він селективно інгібує  $\alpha 9\alpha 10$ - і  $\alpha 3\beta 2$ -вмісні н-холінорецептори, а також  $\text{Ca}^{2+}$ -канали N-типу через активацію ГАМК<sub>B</sub>-рецепторів [177]. Через високу селективність до рекомбінантних  $\alpha 9\alpha 10$ -вмісних н-холінорецепторів  $\alpha$ -колотоксин PeIA можна застосовувати для вибіркового розмежування  $\alpha 9\alpha 10$   $\alpha 7$  опосередкованих функцій в тих ділянках, де експресуються обидва типи цих рецепторів [178].

Дію  $\alpha$ -колотоксину PeIA перевіряли в концентрації 0,1–0,2 ммоль/л ( $n = 3$ ), типову реєстрацію струму представлено на рис. 3.21.

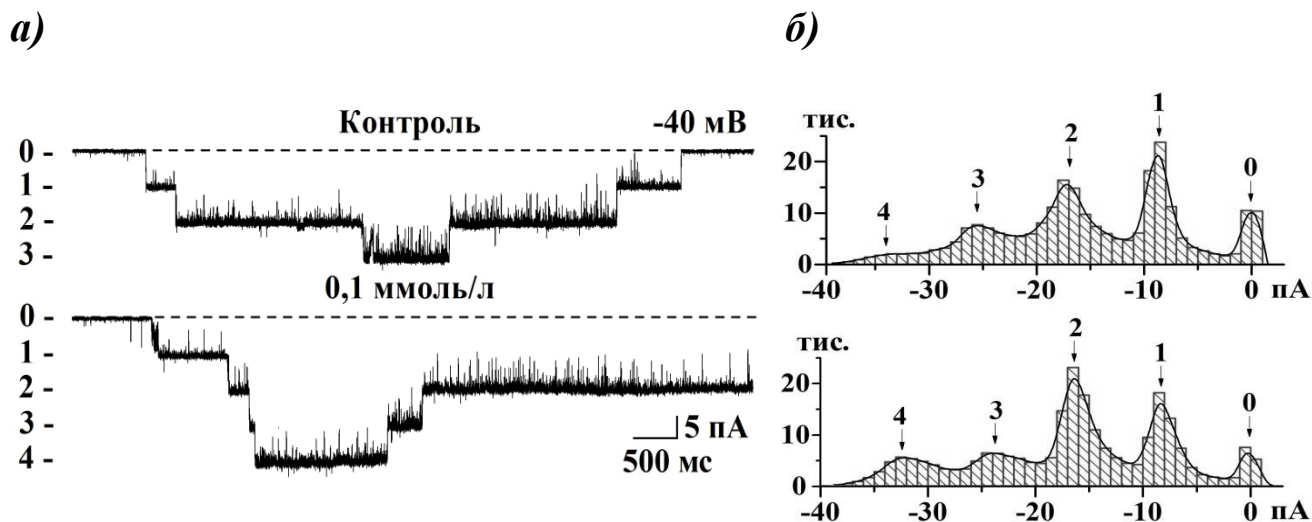


Рис. 3.21. Оригінальні реєстрації струму через LCC-канали ядерної мембрани кардіоміоцитів за аплікації  $\alpha$ -коногоксину PeIA, при потенціалі -40 мВ (а) та амплітудні діаграми (б).  $\alpha$ -коногоксин PeIA не проявляв вираженого впливу на функціональну активність каналів у тестованих концентраціях. Реєстрацію проводили в розчині такого складу (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1;  $\alpha$ -коногоксин PeIA – 0,1 (pH 7,2), 0 – всі канали закриті, від 1 до 4 позначено відповідну кількість відкритих каналів

Амплітуда струму через LCC-канали після аплікації  $\alpha$ -коногоксину PeIA в досліджуваних концентраціях не мала достовірних змін (рис. 3.22).

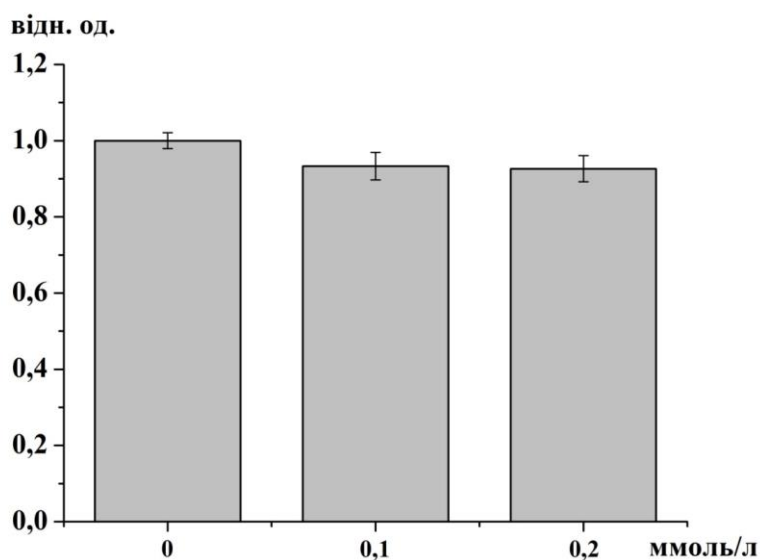
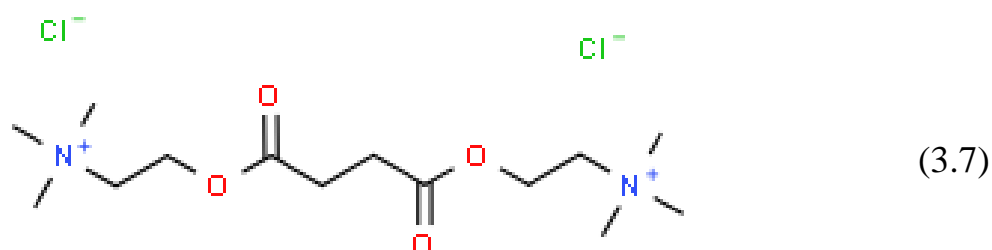


Рис. 3.22. Середня амплітуда  $K^+$ -струму через LCC-канали за наявності у середовищі  $\alpha$ -коногоксину PeIA (0,1–0,2 ммоль/л) була такою ж як і у контролі



Дитилін – препарат на основі суксаметонію хлориду, деполяризуючий міорелаксант короткотривалої дії, за хімічною будовою можна розглядати як подвоєну молекулу ацетилхоліну (3.7), що має високу спорідненість до постсинаптичних нервово-м'язових рецепторів і є конкурентним блокатором і призводить до деполяризації мембрани та короткочасної релаксації скелетних м'язів [179].



Дитилін додавали в камеру шляхом проточної аплікації в концентрації від 0,2 до 2 ммоль/л. За дії блокатора з'являлось «миготіння» каналу або flicker-блок каналу (рис. 3.23).

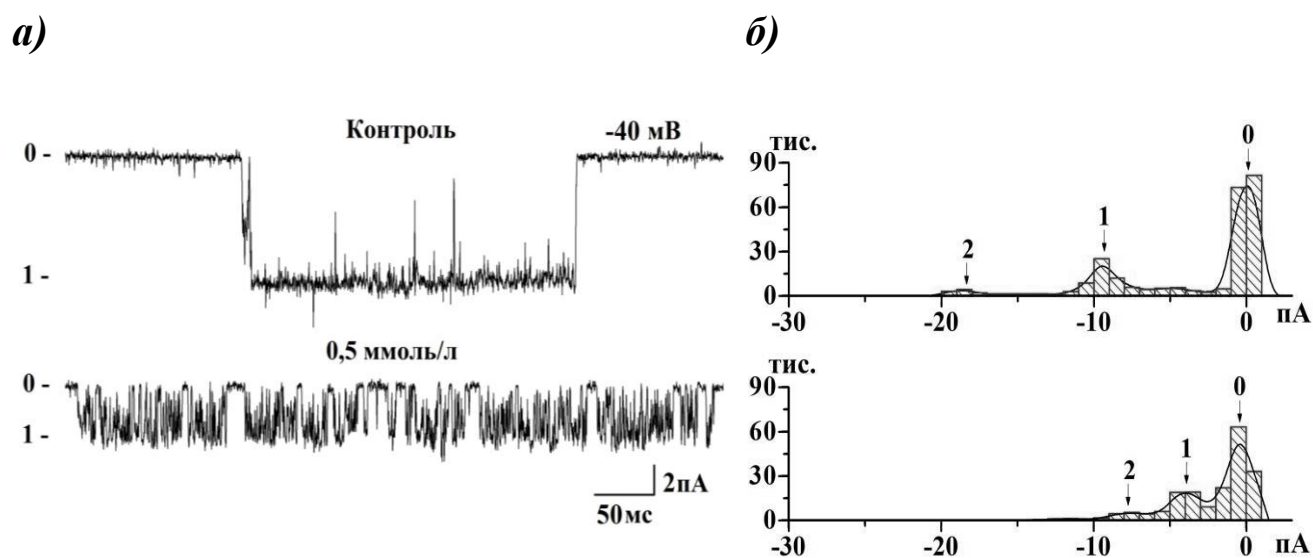


Рис. 3.23. Реєстрація катіонних каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів за дії дитиліну при потенціалі -40 мВ (а) та амплітудні діаграми (б): 0 – всі канали закриті, 1, 2 – відповідна кількість відкритих каналів. Реєстрацію проводили в розчині такого складу (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1; дитилін – 0,5 (рН 7,2). Поява специфічного «миготіння» свідчить про блокування пори каналу у його відкритому стані

Після прикладання дитиліну у концентрації 1–2 ммоль/л достовірно зменшувалася амплітуда струму через LCC-канали ( $***P \leq 0,001$ ; рис. 3.24) [180].

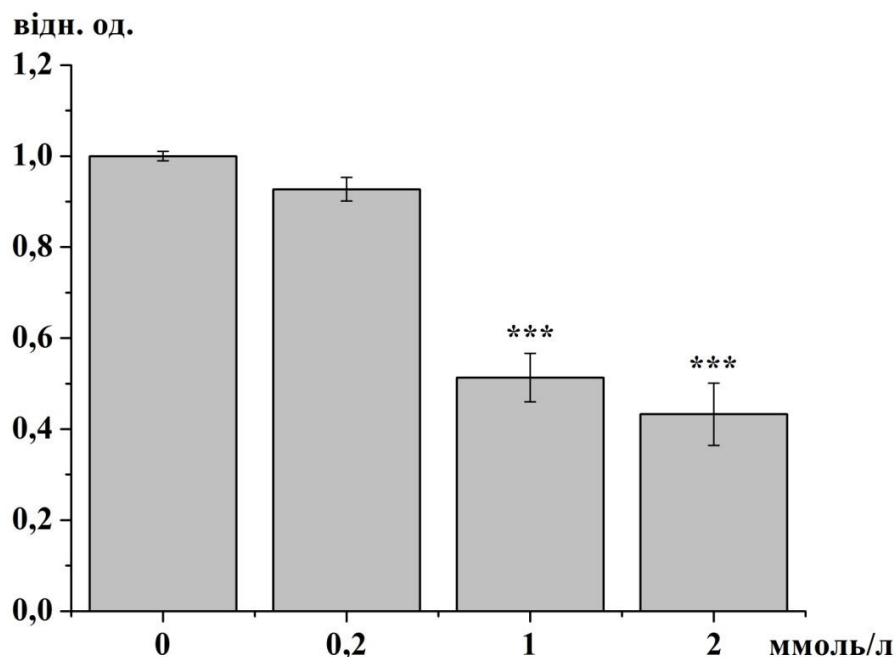
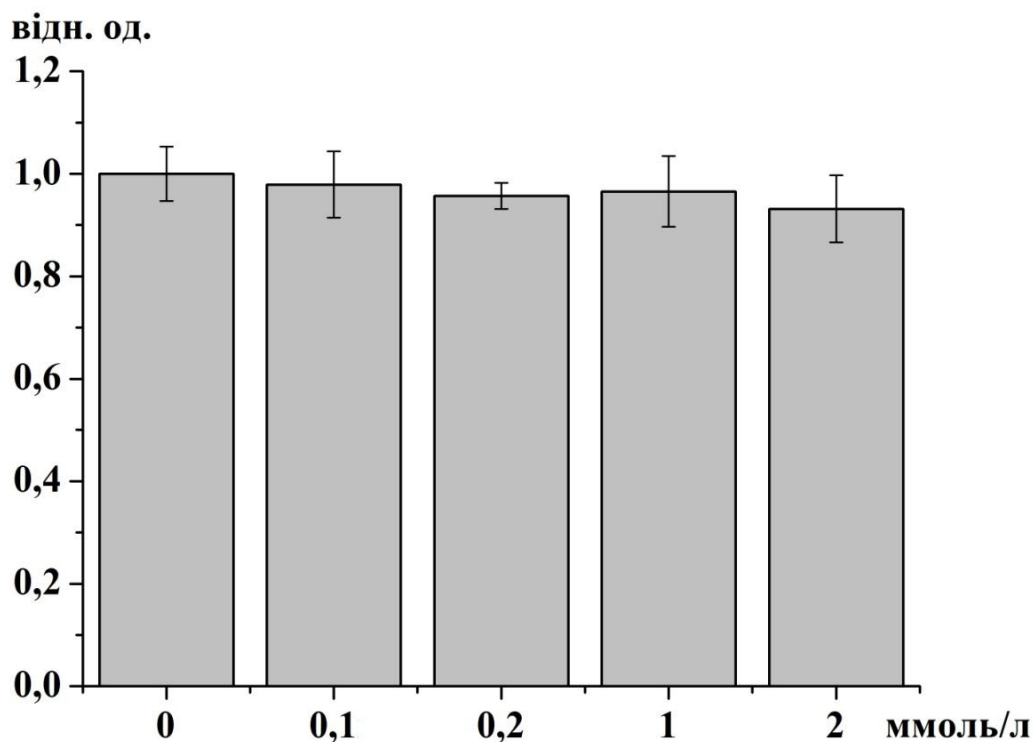


Рис. 3.24. Графік залежності амплітуди струму через LCC-канали від концентрації дитиліну (0,2–2 ммоль/л) у середовищі. Простежується зменшення амплітуди струму через досліджувані канали після збільшення концентрації блокатора у середовищі ( $***P \leq 0,001$ )

Гексаметоній є блокатором пори гангліонарних н-холінорецепторів у його відкритому стані. Гідрофільна природа молекули гексаметонію обмежує його здатність перетинати гематоенцефалічний бар'єр та доступ до мозку. Тому його застосовують у порівняльних дослідах *in vivo* з антагоністом центральної дії, щоб встановити чи певна поведінка опосередкована центрально чи периферично [156]. Гексаметоній відносно неселективний, блокує м'язові і різні комбінації нейрональних субодиниць н-холінорецепторів із значенням  $IC_{50} \sim 10\text{--}20$  мкмоль/л, також застосовується для лікування гіпертонії. В концентрації від 1 – 100 мкмоль/л блокує нейрональні холінорецептори *in vitro*. Є ефективним антагоністом н-холінорецепторів якщо надходить безпосередньо в мозок [156]. Молекулярна формула гексаметонію  $C_{12}H_{30}N_2^{+2}$ , структурна формула (3.8) [181]:



Амплітуда середнього струму через LCC-канали достовірно не змінилася, графік залежності амплітуди струму від концентрації гексаметонію в середовищі представлено на рис. 3.26.



*Рис. 3.26. Усереднена амплітуда калієвого струму через LCC-канали під впливом гексаметонію (0,1–2 ммоль/л) залишилася без змін порівняно з контролем*

Ефекти досліджуваних речовин виявилися зворотними, оскільки після відмивання їх робочим розчином КСІ, струм через LCC-канали повертався до значень, як у контролі, представлено на прикладі дитиліну (рис. 3.27).

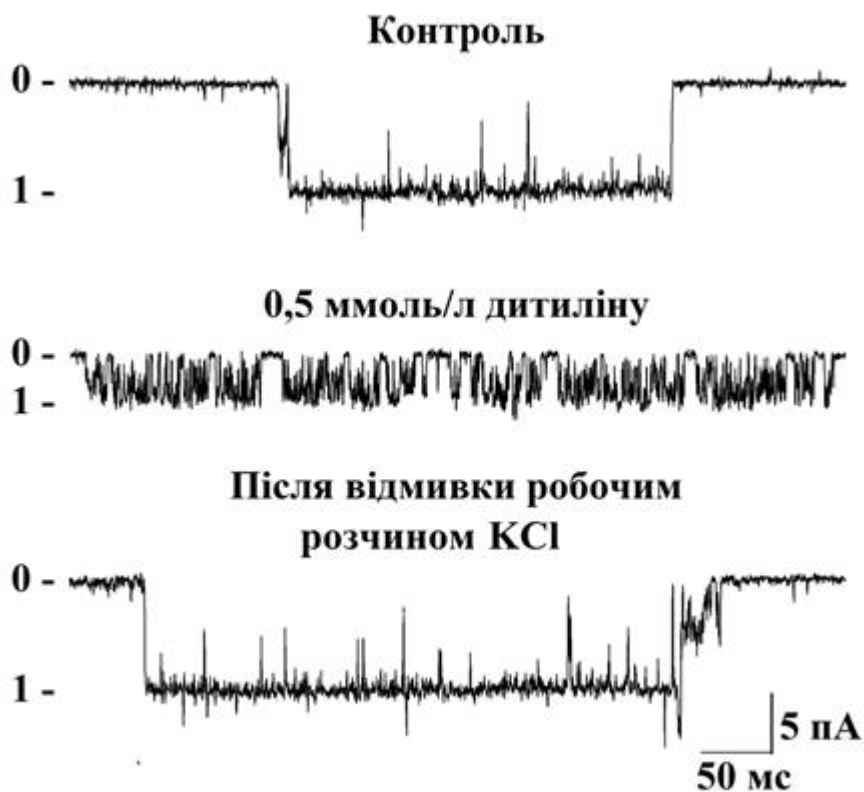


Рисунок 3.27 Оригінальні реєстрації струму через LCC-канали ядерної мембрани кардіоміоцитів за наявності 0,5 ммоль/л дитиліну в середовищі при потенціалі -40 мВ: 0 – всі канали закриті, від 1 – позначено відповідну кількість відкритих каналів. Реєстрацію проводили в розчині такого складу (ммоль/л): КСІ – 150, НЕРЕС – 8, НЕРЕС-калієва сіль – 12, ЕГТА – 1; дитилін – 0,5 (рН 7,2). Як видно з результатів реєстрацій амплітуда струму через канали після відмивки блокатора поверталась до контрольних значень

### Підсумок

Серед перевірених нами інгібіторів н-холінорецепторів найбільш виражений ефект на LCC-канали спостерігали після аплікації DhβE, тубокурарину, тоді як атракуріум, рокуронію- та піпекуронію броміди діяли у концентраціях на порядок більших. Не мали помітного ефекту на активність досліджуваних каналів гексаметоній, MLA, α-конотоксин PeIA.

### 3.1.3.3. Вплив агоністів н-холінорецепторів на функціональну активність LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів

Оскільки значний вплив на функціональну активність LCC-каналів здійснювали блокатори н-холінорецепторів (Dh $\beta$ E, тубокурарин, атракуріум, рокуронію- та піпекуронію броміди) у наступних серіях експериментів було перевірено також дію агоністів цих рецепторів.

Типовим представником холіноміметиків (при цьому одночасно м- та н-холінорецепторів) є карбахолін. Карбахолін має подібний вплив до ацетилхоліну, але ефект триває в рази довше, оскільки він не розкладається холінестеразою. Його часто застосовують для дослідження м'язових н-холінорецепторів, але він має низьку афінність до  $\alpha 4\beta 2$  та  $\alpha 7$ -вмісних холінорецепторів [156].

Карбахолін аплікували в камеру враховуючи кінцеву концентрацію. В концентрації 0,05–0,1 ммоль/л карбахолін не чинив істотного впливу на LCC-канали ядерної мембрани кардіоміоцитів ( $n = 3$ ), на рисунку представлено типову реєстрацію струмів через канали після аплікації карбахоліну (рис. 3.28).

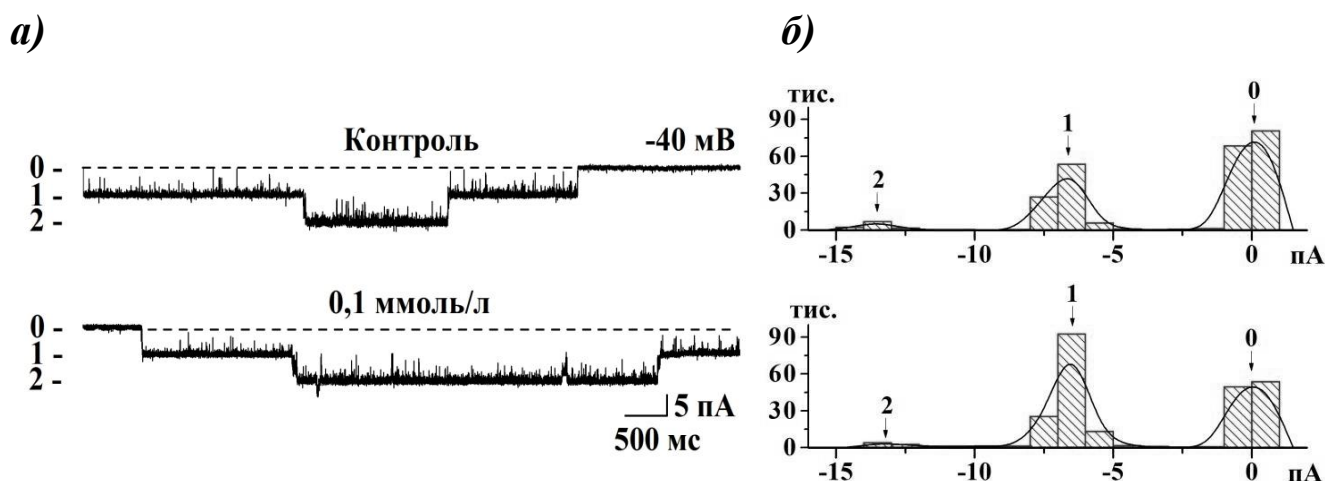


Рис. 3.28. Репрезентативна реєстрація струмів через LCC-канали ядерної мембрани кардіоміоцитів за аплікації карбахоліну у камеру, при потенціалі -40 мВ (а) та амплітудні діаграми (б): 0 – всі канали закриті, 1, 2 – відповідна кількість відкритих каналів. Реєстрацію проводили в розчині такого складу (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1; карбахолін – 0,1 (pH 7,2).

Середня амплітуда струму через LCC-канали залишилася незмінною після аплікації в середовище карбахоліну в концентраціях 0,05 та 0,1 ммоль/л (рис. 3.29).

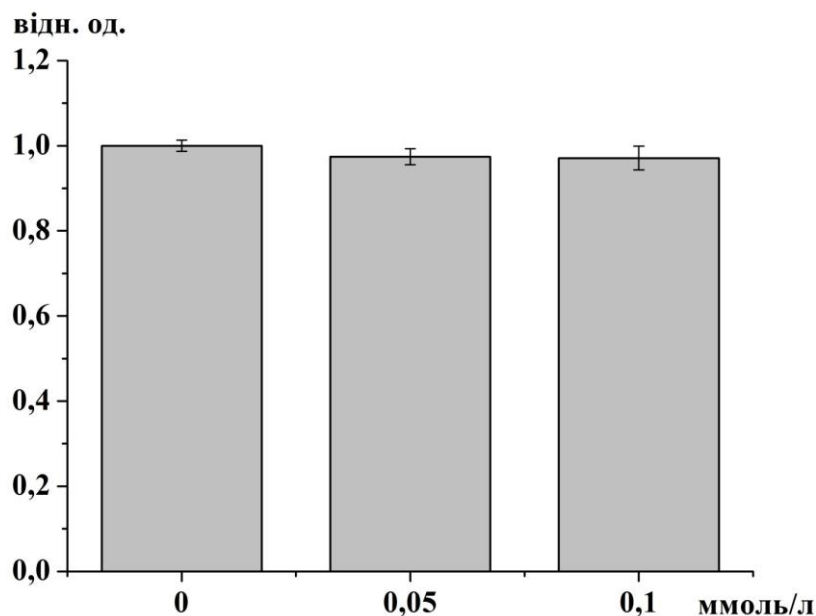
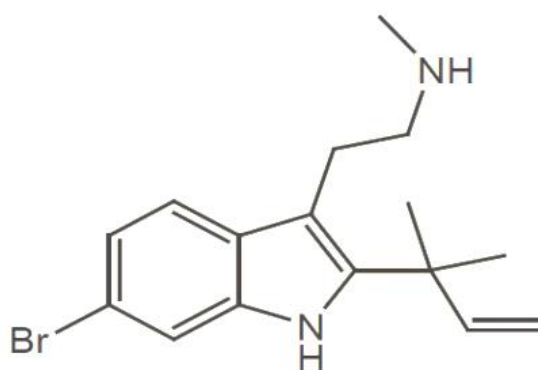


Рис. 3.29. Усереднена амплітуда  $K^+$ -струму через LCC-канали під впливом карбахоліну (0,05–0,1 ммоль/л). Достовірних змін амплітуди струму за наявності карбахоліну в середовищі не виявлено

Наступною речовиною, вплив якої ми перевіряли на LCC-канали, був десформилфлустрабромін (dFBr), який вперше був виділений як активний метаболіт морської тварини *Flustra foliacea* (колоніальна тварина, яку часто приймають за морські водорості, зустрічається на півночі Атлантичного океану). Структурна формула молекули представлена (3.9) [156]:



(3.9)



dFBr є позитивним алостеричним модулятором  $\alpha 4\beta 2$ -вмісних н-холінорецепторів. Дія алостеричних модуляторів полягає у підсиленні ефекту (позитивні модулятори) або зниженні ефекту (негативні модулятори) агоністів та має відмінний від агоніста сайт зв'язування з рецептором. У дослідженні на рекомбінантних н-холінорецепторах в ооцитах *Xenopus* показано відсутність модуляції у  $\alpha 3\beta 2$ -,  $\alpha 3\beta 4$ -,  $\alpha 4\beta 4$ - та  $\alpha 7$ -вмісних холінорецепторів при тестуванні в концентраціях від 10 до 100 мкмоль/л. Також є дані, що в концентраціях  $> 10$  мкмоль/л dFBr інгібує  $\alpha 4\beta 2$ - та  $\alpha 7$ - вмісні н-холінорецептори [156]. Оскільки у високих дозах dFBr проявляє властивості блокатора цікаво було перевірити його вплив на LCC-канали ядерної мембрани кардіоміоцитів. dFBr аплікували в камеру враховуючи кінцеву концентрацію. В тестованих концентраціях 0,2–0,5 ммоль/л він дозозалежно зменшував час перебування каналу у відкритому стані, а також спостерігалось «миготіння» каналу ( $n = 3$ ; рис. 3.30).

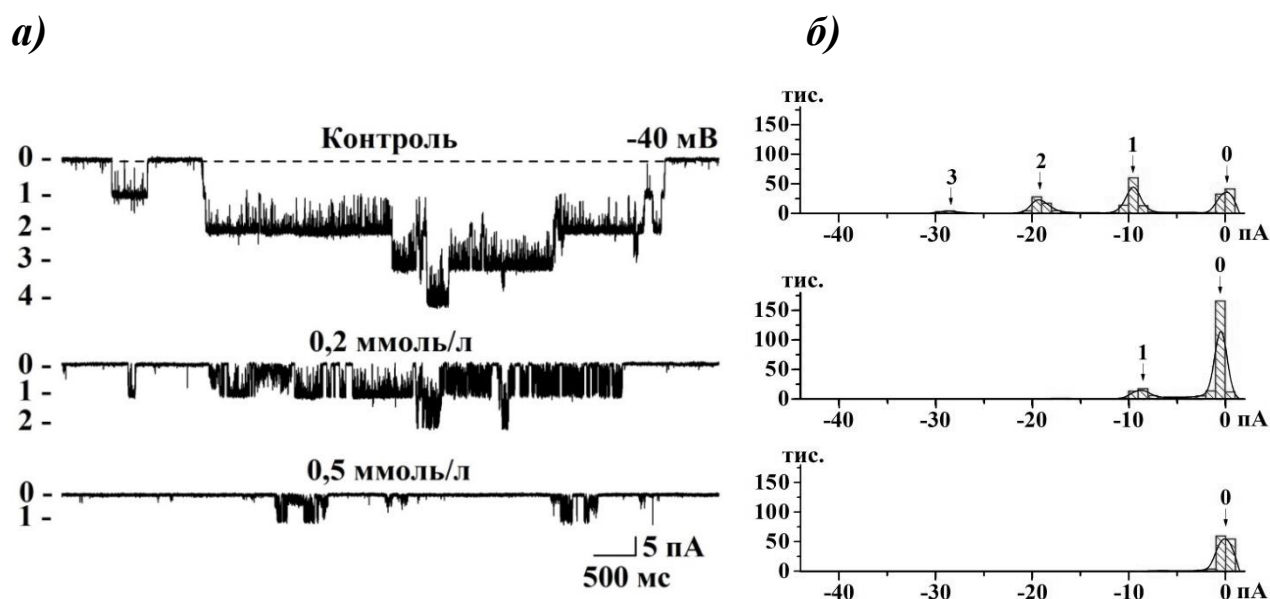


Рис. 3.30. Приклад реєстрації струмів через LCC-канал за дії dFBr при потенціалі -40 мВ (а) та амплітудні діаграми (б): 0 – всі канали закриті, 1, 4 – відповідна кількість відкритих каналів. Реєстрацію проводили в розчині такого складу (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1; dFBr – 0,2–0,5 (рН 7,2) З реєстрації видно, що збільшення концентрації блокатора у середовищі призводить до появи «миготіння» каналу та зменшення  $P_o$ , що може свідчити про блокування пори каналу у його відкритому стані



Також достовірно зменшувалася амплітуда струму через LCC-канали на 10 % – 0,1 ммоль/л ( $P \leq 0,05$ ), 21 % – 0,2 ммоль/л ( $P \leq 0,01$ ) та 46 % за дії 0,5 ммоль/л ( $P \leq 0,001$ ) dFBr. Його недоліком є швидке руйнування гігаомного контакту майже одразу після аплікації, тому в подальшому ми не розглядаємо його в якості блокатора для досліджень фізіологічної ролі LCC-каналів (рис. 3.31) [182].

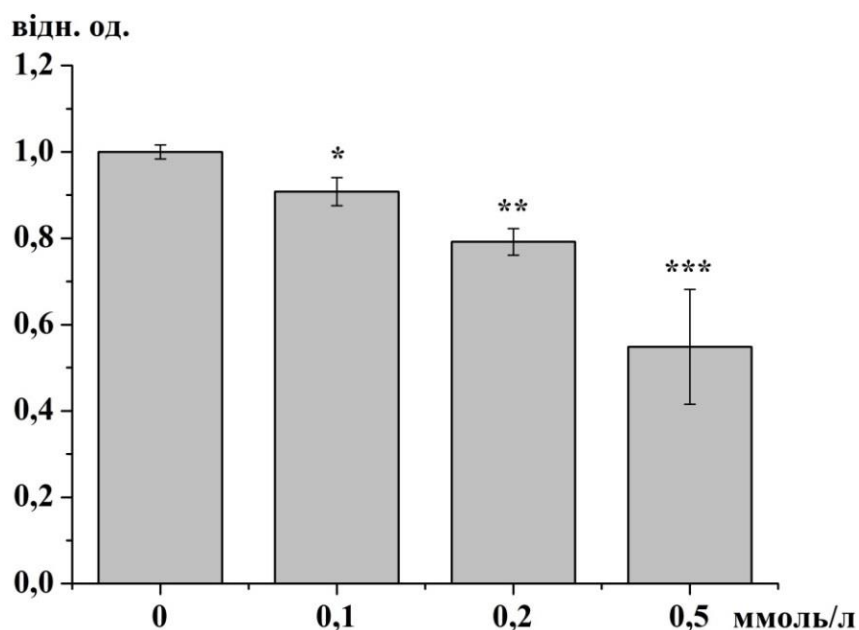
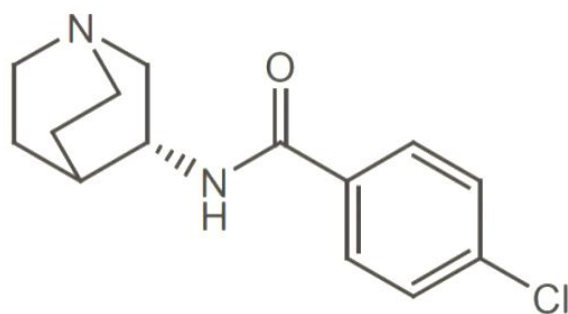


Рис. 3.31. Амплітуда  $K^+$ -струму через LCC-канали за наявності у середовищі dFBr в концентрації 0,1–0,5 ммоль/л, нормалізовані показники. Простежується чітка залежність зменшення амплітуди струму через канали ( $*P \leq 0,05$ ,  $**P \leq 0,01$ ,  $***P \leq 0,001$ )

Штучно синтезований високоселективний активатор  $\alpha 7$ -вмісного холінорецептора PNU 282987 діє на холінорецептори в наступних концентраціях:  $K_i = 27$  нмоль/л;  $EC_{50} = 150$  нмоль/л, менш виражена дія на 5-HT<sub>3</sub> рецептори (підтип рецепторів серотоніну)  $K_i = 0,9$  мкмоль/л [156, 183].

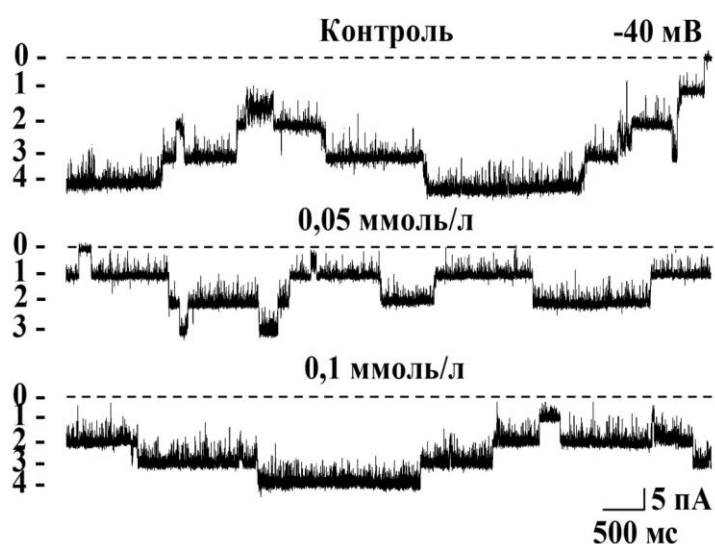
Молекулярна формула PNU 282987 –  $C_{14}H_{17}ClN_2O$ , також представлено структурну формулу цієї речовини [156] (3.10):



(3.10)

PNU 282987 аплікували в камеру враховуючи кінцеву концентрацію (0,05 та 0,1 ммоль/л), у досліджуваних концентраціях не спричиняв статистично достовірних змін функціонування LCC-каналів ядерної мембрани ( $n = 3$ ; рис. 3.32).

а)



б)

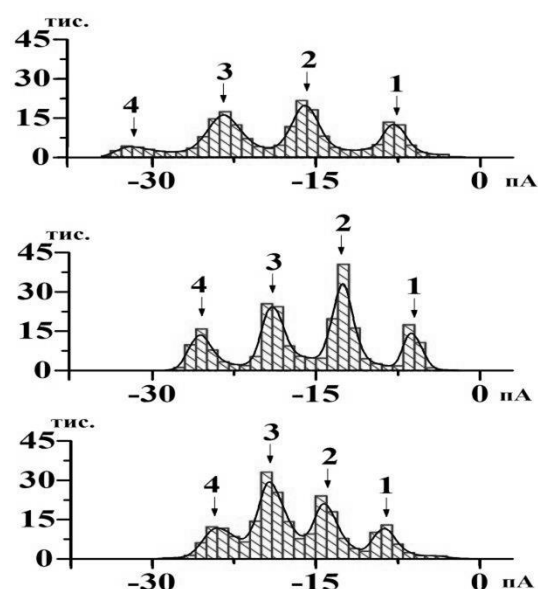


Рис. 3.32. Реєстрації струмів через LCC-канали ядерної мембрани кардіоміоцитів за аплікації PNU 282987, при потенціалі -40 мВ (а) та амплітудні діаграми (б): 0 – всі канали закриті, 1–4 – відповідна кількість відкритих каналів. Реєстрацію проводили в розчині такого складу (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1; PNU 282987 – 0,05 та 0,1 (pH 7,2)

Достовірних змін амплітуди струму через LCC-канали не спостерігали після додавання в середовище PNU 282987 в концентрації 0,05 та 0,1 ммоль/л (рис. 3.33).

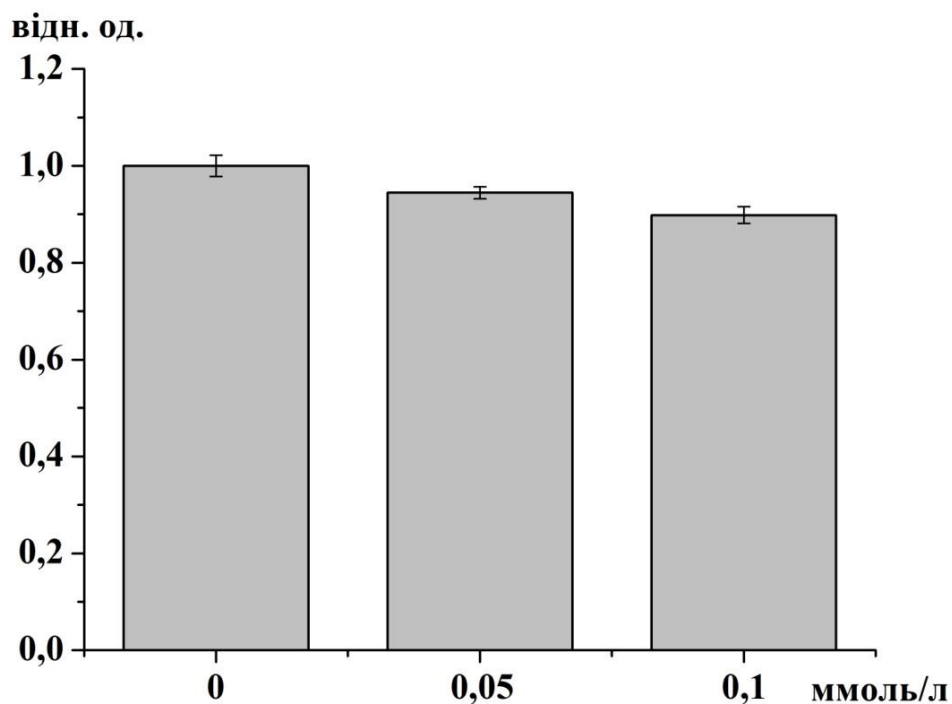
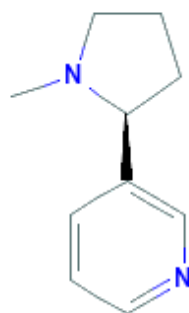


Рис. 3.33. Амплітуда  $K^+$ -струму через LCC-канали ядерної мембрани кардіоміоцитів за наявності в середовищі PNU 282987 (0,05–0,1 ммоль/л)

Нікотин – рослинний алкалоїд, міститься в тютюні та спричиняє звикання центральної нервової системи. В низьких дозах чинить гангліонарну стимуляцію, у високих – блокаду. Нікотин діє як агоніст н-холінорецепторів у вегетативних гангліях, нервово-м'язових синапсах, мозковій речовині наднирників та головного мозку, є агоністом н-холінорецепторів плазматичної [156] та мітохондріальної мембран [173].

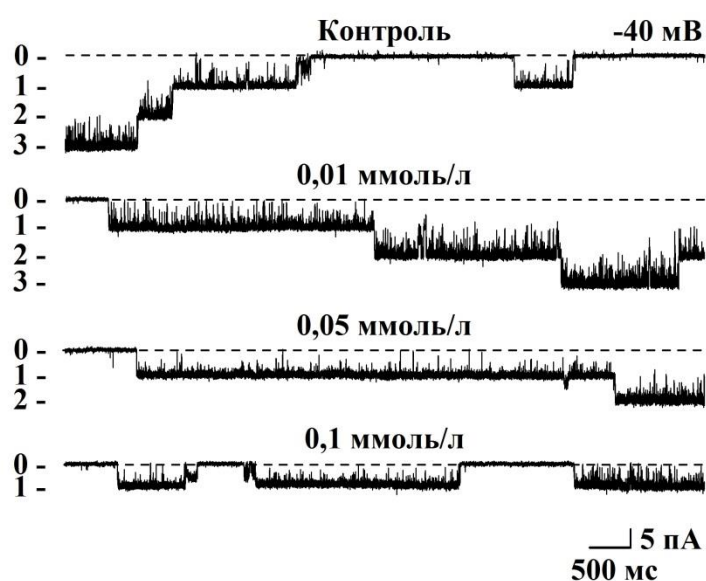
Молекулярна формула нікотину  $C_{10}H_{14}N_2$ , хімічну структуру представлено (3.11) [184]:



(3.11)

Аплікацію нікотину у роботу камеру у концентрації 0,01–0,2 ммоль/л здійснювали враховуючи кінцеву концентрацію. Під його впливом зменшувалася  $P_o$  LCC-каналів ядерної мембрани ( $n = 3$ ) (рис. 3.34).

а)



б)

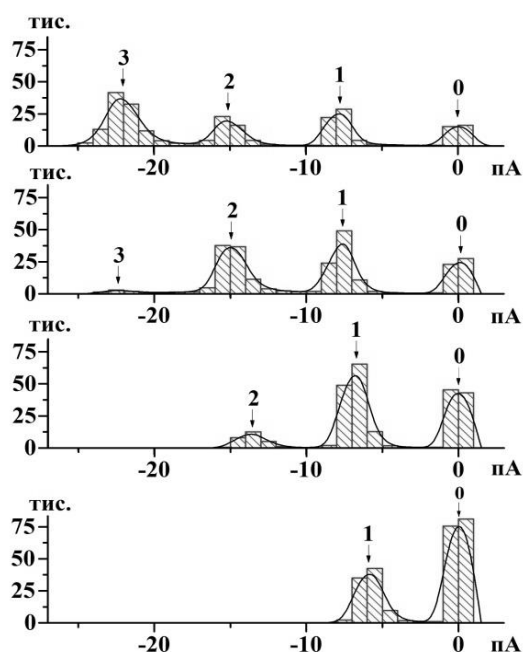


Рис. 3.34. Типова реєстрація струму через LCC-канали за дії нікотину, при потенціалі  $-40$  мВ (а) та амплітудні діаграми (б): 0 – всі канали закриті, 1–3 – відповідна кількість відкритих каналів. Реєстрацію проводили в розчині такого складу (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1; нікотин – 0,01–0,1 (pH 7,2). З реєстрації видно зменшення амплітуди струму після аплікації нікотину у досліджуваних концентраціях в робочу камеру

Середня амплітуда струму через LCC-канали ядерної мембрани зменшилася на 50 % за дії нікотину в концентрації 0,2 ммоль/л ( $P \leq 0,001$ ) порівняно з контролем (рис. 3.35) [184].

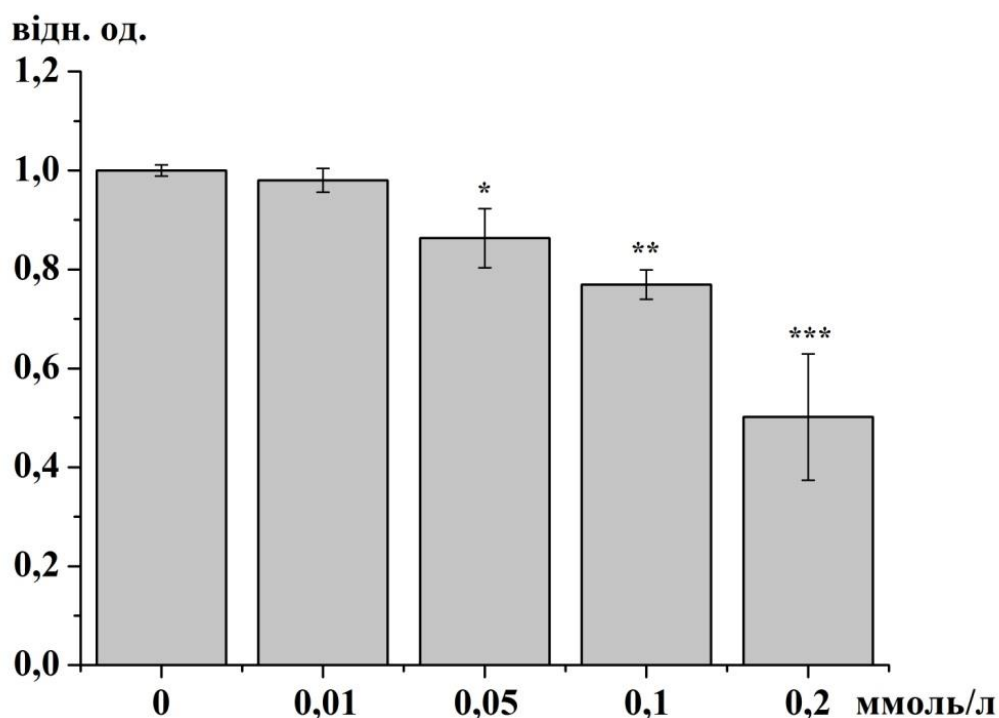


Рис. 3.35. Дозозалежність функціонування LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів під впливом нікотину (0,01–0,2 ммоль/л). Як видно з діаграми, амплітуда струму через LCC-канали достовірно зменшилася (\* $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \*\*\* $P \leq 0,001$ )

Різниці між властивостями LCC-каналів, які експресуються в ядрах з різних частин серця, а також у впливі на них блокаторів та агоністів н-холінорецепторів не відмічали.

### Підсумок

Серед перевірених агоністів н-холінорецепторів найбільш ефективним виявився нікотин, меншу ефективність мав dFBγ під їх впливом зменшувалася амплітуда струму через LCC-канали, тоді як карбахолін та PNU 282987 не проявляли видимих ефектів.

## Роботи в яких опубліковані основні наукові результати підрозділу

### Статті:

✓ Котлярова АБ, **Котик ОА**, Юришинець ІВ, Марченко СМ. Функціонування катіонних каналів великої провідності ядерної мембрани кардіоміоцитів та нейронів Пуркінє мозочка під впливом модуляторів нікотинових холінорецепторів. Фізіол журн. 2019;65(6):30–7.

✓ **Котик ОА**, Котлярова АБ, Ісаєва ОВ, Марченко СМ. Вплив деяких анестетиків та природних отрут на функціонування LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів та нейронів Пуркінє мозочка. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія. 2019;3(79):43–8.

✓ **Котик ОА**, Котлярова АБ, Павлова НІ, Марченко СМ. Вплив блокаторів на високопровідні катіонні канали в ядерній мембрані. Нейрофізіологія. 2017;49(2):159–61.

✓ **Котик ОА**, Котлярова АБ, Поліщук АО, Марченко СМ. Іонні струми поодиноких каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів щура. Фізіол журн. 2016;62(6):3–8.

### Тези:

➤ **Котик О**, Котлярова А, Скок М, Марченко С. Функціонування LCC-каналів ядерної мембрани за дії блокаторів та агоністів N-холінорецепторів. Матеріали XX з'їзду Українського фізіологічного товариства ім. П. Г. Костюка з міжнар. участю; 2019 трав. 27–30; Київ, Україна. Фізіол журн. 2019;65(3):28–9.

➤ Котлярова А, **Котик О**, Марченко С. Рідкісні іонні канали ядерної мембрани кардіоміоцитів. Матеріали XVII Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених «Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини»; 2018 груд. 6–7; Львів, Україна. Біологія тварин. 2018;20(4):119.

➤ **Котик О**, Павлова Н, Тагаві С, Скок М, Котлярова А, Марченко С. Вплив десформилфлустраброміну (dFBr) на функціонування LCC-каналів ядерної мембрани. Збірник тез XVI Міжнар. наук. конф. студентів та молодих вчених

«Шевченківська весна: досягнення біологічної науки»; 2018 квіт. 24–7; Київ, Україна. Київ; 2018. с. 33–5.

➤ Kotliarova A, **Kotyк O**, Pavlova N, Marchenko S. Kanał chlorowy o wysokiej przewodności w membranie jądrowej kardiomiocytów. International research and practice conference Modern methodologies, innovations, and operational experience in the field of biological science: Conference Proceedings; 2017 Dec. 27–28; Lublin, Poland. Lublin: Izdevnieciba “Baltija Publishing”; 2017. p. 81–4.

➤ **Котик O**, Котлярова А, Хомин М, Скок М, Марченко С. Вплив агоністів та інгібіторів N-холінорецепторів на функціонування LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів. Тези VIII Міжнар. наук. конф., присвяченої 175-річчю кафедри фізіології та анатомії людини та тварин Київського нац. унів. імені Тараса «Шевченка Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології»; 2017 жовт. 17–20; Київ, Україна. Київ; 2017, с. 61.

➤ **Котик O**, Котлярова А, Павлова Н, Марченко С. Вплив блокаторів на високопровідні катіонні канали ядерної мембрани. Матеріали VII Конгресу Українського товариства нейронаук; 2017 черв. 7–11; Київ, Україна. Київ; 2017, с. 93.

➤ **Котик O**, Павлова Н, Поліщук А, Котлярова А, Марченко С. Властивості LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів. Збірник тез XIII Міжнар. наук. конф. студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»; 2017 квіт. 25–27; Львів, Україна. Львів: ЛНУ ім. Івана Франка; 2017, с. 13–4.

➤ **Котик O**, Павлова Н, Хомин М, Котлярова А, Марченко С. Вплив атракуріума на LCC-канали ядерної мембрани. Збірник тез XV Міжнар. наук. конф. студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки»; 2017 квіт. 18-21; Київ, Україна. Київ: КНУ ім. Тараса Шевченка; 2017, с. 22–3.

- Kotliarova A, **Kotyk O**, Polishchuk A, Marchenko S. Identification of ion channels in the nuclear envelope of cardiomyocytes. Abstracts of reports of the XV All-Ukrainian Scientific and Practical Conference of Young Scientists Young scientists in solution of actual problems of biology, animal husbandry and veterinary medicine; 2016 Dec. 8–9; Lviv, Ukraine. Біологія тварин. 2016 Dec;18(4):157.
- Котлярова А, **Котик О**, Поліщук А, Павлова Н, Марченко С. Іонні канали ядерної мембрани кардіоміоцитів. Міжнар. наук.-практ. конф. «Актуальні питання розвитку біології та екології»; 2016 жовт. 3–7; Вінниця, Україна. Вінниця: ДНУ ім. Василя Стуса; 2016, с. 245–8.
- **Котик О**, Котлярова А, Поліщук А, Плечій М, Хомин М, Марченко С. Ідентифікація високопровідних катіонних каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів. Збірник тез XII Міжнар. наук. конф. студ. та аспір. «Молодь і поступ біології»; 2016 квіт. 19–21; Львів, Україна. Львів: ЛНУ ім. Івана Франка; 2016, с. 299–300.



### 3.2. Властивості IP<sub>3</sub>-рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів

Ca<sup>2+</sup> – це ключовий сигнальний іон, потрібний для багатьох внутрішньоклітинних процесів. Важливим є вивчення змін внутрішньоклітинної концентрації Ca<sup>2+</sup>, оскільки він бере участь у скороченні міокарда, транскрипції генів та апоптичній загибелі клітин [12, 185], порушення Ca<sup>2+</sup> сигналізації пов'язане з багатьма патологіями. Значну роль у Ca<sup>2+</sup> сигналізації відіграють IP<sub>3</sub>-рецептори, котрі поряд з ріанодиновими рецепторами забезпечують вивільнення Ca<sup>2+</sup> з депо [88].

За фізіологічних умов активація IP<sub>3</sub>-рецепторів у кардіоміоцитах відбувається, зокрема, за дії на їх плазматичну мембрану ангіотензину II (активація AT1-підтипу рецепторів призводить до активації фосфоліпази C і наступного вивільнення Ca<sup>2+</sup> з депо) [186]. IP<sub>3</sub>-рецептори відіграють важливу роль у модуляції зв'язку збудження–скорочення у тканинах передсердь та генерації аритмій, зокрема хронічних фібриляцій передсердь. Стимуляція ендотеліном-1 міоцитів передсердь мишей дикого типу (WT) спричиняла збільшення базального рівня [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, посилення потенціалу дії, спричиненого Ca<sup>2+</sup>-транзієнтами та виникнення спонтанних аритмогенних подій вивільнення Ca<sup>2+</sup> в результаті активації IP<sub>3</sub>-рецепторів. На відміну від цього, ендотелін-1 не спричиняв спонтанного вивільнення Ca<sup>2+</sup> у передсердних міоцитах з дефіцитом IP<sub>3</sub>R2 [187]. Відомо також, що Ca<sup>2+</sup>-транзієнт у ядрі, спричинений інсуліноподібним фактором росту-1, є значно меншим у міоцитах, в яких відсутній нейронний Ca<sup>2+</sup>-сенсор-1 (NCS-1) – Ca<sup>2+</sup>-зв'язуючий білок, котрий залучений у IP<sub>3</sub>-опосередкований шлях трансдукції сигналу [188]. Крім цього, активація IP<sub>3</sub>-рецепторів стимуляцією α1-адренергічного рецептора або безпосередньо IP<sub>3</sub> (у клітинах, пермеабілізованих сапоніном) збільшує частоту Ca<sup>2+</sup>-спарків у ділянці навколо ядра кардіоміоцитів шлуночків новонароджених щурів [128].

### 3.2.1. Підтвердження наявності $IP_3$ -рецепторів у внутрішній ядерній мембрані кардіоміоцитів

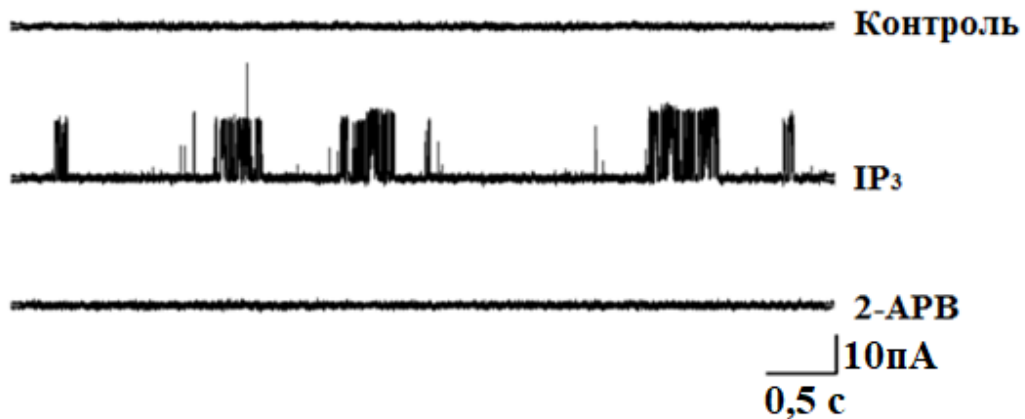
Дослідження електрофізіологічних властивостей  $IP_3$ -рецепторів виконані здебільшого на гетерологічно експресованих рецепторах у клітинах DT40 ТКО [149] та Sf9 [126], однак наявні лише розрізнені дані про їх властивості в нативному стані [2, 150]. Перевірку наявності  $IP_3$ -рецепторів у ядерній мембрані кардіоміоцитів проводили з використанням методу імуногістохімічного аналізу та *patch-clamp* реєстрацій іонних струмів крізь їх мембрану.

#### 3.2.1.1. Електрофізіологічна реєстрація $IP_3$ -рецепторів

Досить часто для вивчення біофізичних характеристик  $IP_3$ -рецепторів за допомогою методу *patch-clamp* як носіїв заряду використовують  $K^+$  або  $Cs^+$ , оскільки вони забезпечують великі струми і на відміну від  $Ca^{2+}$  не регулюють активність  $IP_3$ -рецепторів, тому є дуже зручними інструментами для таких експериментів. До того ж використання одновалентних катіонів як носіїв струму за відсутності 500 мкмоль/л  $Ca^{2+}$  на люмінальній стороні, хоч і не є фізіологічним, але гарантує, що концентрація  $Ca^{2+}$  біля воріт каналу не зміниться коли, канал відкриється. Таким чином можна вивчати регуляцію каналу  $Ca^{2+}$  в добре контрольованих умовах [див. 81, 16].

У ядерній мембрані кардіоміоцитів нами зареєстровано струм через канал, котрий активується при додаванні  $IP_3$  у камеру (0,2–20 мкмоль/л;  $n = 50$ ) та інгібується 2-АРВ (2-аміноетоксидифенілборат) (50 мкмоль/л;  $n = 2$ ). Довгий час 2-АРВ використовують в експериментальних дослідженнях як інгібітор  $IP_3$ -рецепторів [189, 190].

За відсутності  $IP_3$  у середовищі струми через цей канал не реєстрували, на основі чого зроблено висновок, що цей канал є  $IP_3$ -рецептором (рис. 3.36).

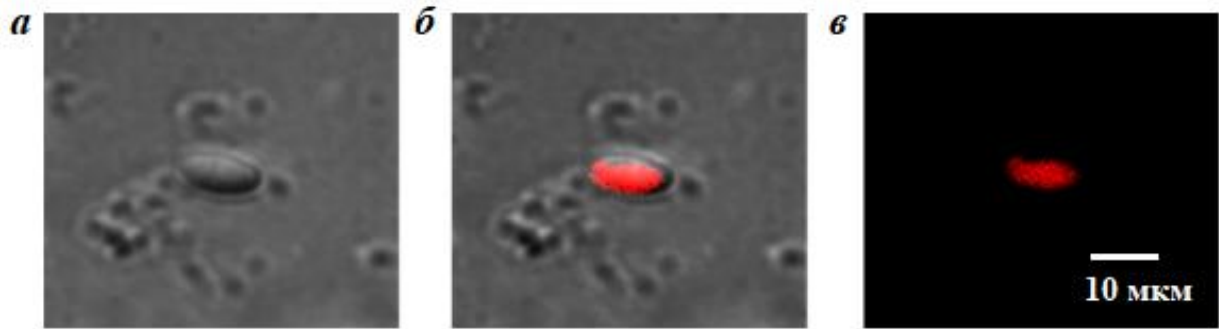


*Рис. 3.36. Підтвердження наявності  $IP_3$ -рецепторів в ядерній мембрані кардіоміоцитів. З рисунку видно, що в контролі (за відсутності  $IP_3$  в середовищі) струмів зареєстровано, після додавання  $IP_3$  в камеру реєстрували струми через  $IP_3$ -рецептори, а аплікація їх блокатора 2-АРВ призводила до зникнення струмів. Реєстрацію здійснювали в розчині такого складу (ммоль/л):  $KCl$  – 150,  $HEPES$  – 8,  $HEPES$ -калієва сіль – 12,  $EGTA$  – 1,  $AT\Phi$  – 0,5;  $IP_3$  – 20 мкмоль/л; 2-АРВ – 50 мкмоль/л;  $[Ca^{2+}]_{вільний}$  – 100 нмоль/л (рН 7,2)*

### **3.2.1.2. Імуногістохімічна ідентифікація $IP_3R2$ ядерної мембрани кардіоміоцитів**

Переважаюча більшість типів клітин експресують більше одного типу  $IP_3$ -рецепторів, однак їх відносна частка може бути дуже мінливою [див. 100]. З даних літератури відомо [2], що в кардіоміоцитах найбільш експресовані  $IP_3R2$ .

У наступній серії експериментів ми імуногістохімічним методом підтвердили наявність у ядерній мембрані кардіоміоцитів  $IP_3R2$  використовуючи специфічні до них поліклональні антитіла (рис. 3.37).

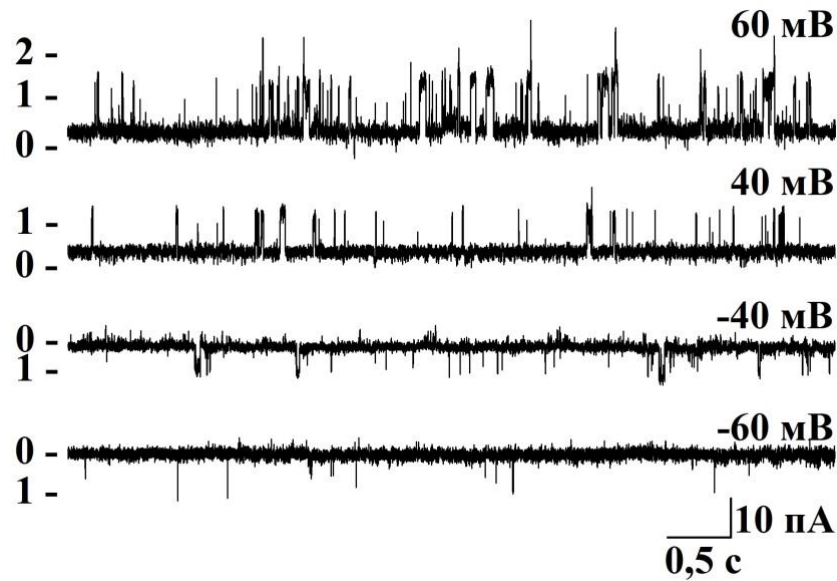


*Рис. 3.37. Ізольоване ядро кардіоміоцита, оброблене поліклональними антитілами до  $IP_3R2$  з вторинною міткою Alexa Fluor 647: у проникаючому світлі (а), об'єднані зображення (б), реєстрація флуоресценції при  $\lambda = 633$  нм (в)*

Також  $IP_3R2$  є переважаючим у астроцитах [14], та у значній кількості експресуються у клітинах AR42J (лінія клітин панкреатоми), глії, гепатоцитах, інтеркальованих клітинах збірної протоки нирки, RBL-2H3 (лінія тучних клітин слизової оболонки). В ацинарних клітинах підшлункової залози співвідношення між  $IP_3R2$  та  $IP_3R3$  є приблизно рівним [див. 100].

### **3.2.2. Потенціалзалежність функціонування $IP_3$ -рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів**

Ідентифіковані нами  $IP_3$ -рецептори проявляли чітку залежність активності від прикладеного потенціалу. За позитивних значень потенціалу їх активність збільшувалась (+40, +60 мВ,  $P_o = 0,043$  та  $0,125$  відповідно) в той час як на негативних значеннях – помітно зменшувалася (-40, -60 мВ,  $P_o = 0,025$  та  $0,005$  відповідно). Час перебування  $IP_3$ -рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів у відкритому стані становить від 2 до 22 мс. Приклад реєстрації струму через  $IP_3$ -рецептори за різних значень потенціалу представлено на рис. 3.38 [154].



*Рис. 3.38. Залежність активності  $IP_3$ -рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів від прикладеного потенціалу Реєстрація у розчині такого складу (ммоль/л):  $KCl$  – 150,  $HEPES$  – 8,  $HEPES$ -калієва сіль – 12,  $EGTA$  – 1,  $AT\Phi$  – 0,5;  $[Ca^{2+}]_{вільний} \approx 100$  нмоль/л;  $IP_3$  – 10 мкмоль/л (рН 7,2). З рисунку видно, що активність  $IP_3$ -рецепторів збільшувалась за позитивних значень потенціалу, в той час як негативні пригнічували їх*

Зареєстровані нами струми через  $IP_3$ -рецептори ядерної мембрани кардіоміоцитів в симетричному робочому розчині з додаванням  $AT\Phi$  – 0,5;  $[Ca^{2+}]_{вільний} \approx 100$  нмоль/л; інозитол-1,4,5-трифосфат – 0,003; рН 7,2, мали лінійну вольт-амперну характеристику, а провідність цих каналів становила  $384 \pm 5$  пСм (рис 3.39).

За даними різних авторів провідність  $IP_3$ -рецепторів може істотно відрізнятись залежно від того, які іони були використані в якості носіїв заряду ( $K^+$ ,  $Cs^+$ ,  $Ba^{2+}$ ), а також чи це були гетерологічно експресовані у лінію клітин (Sf9 чи TD40 ТК0). У клітинах Sf9 (за наявності 50 ммоль/л  $Ba^{2+}$ ) провідність усіх ізоформ становить 74–80 пСм [126], в той час як провідність  $IP_3R1$  у ядерній мембрані нейронів мозочка становить  $356 \pm 4$  пСм (150 мМ  $K^+$ ) [5], а рекомбінантних  $IP_3R2$  250 пСм (реєстрація в розчині з 220 ммоль/л  $Cs^+$ ) [13].

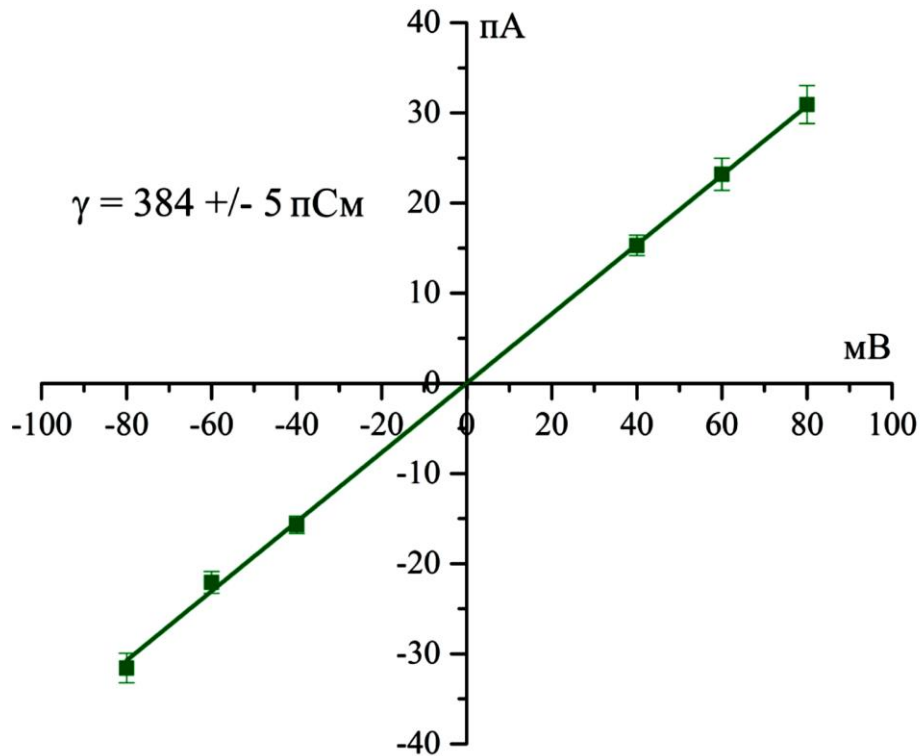


Рис. 3.39. Типова воль-амперна характеристика струму крізь  $IP_3$ -рецептори ядерної мембрани кардіоміоцитів, реєстрація у симетричному середовищі (ммоль/л):  $KCl$  – 150,  $HEPES$  – 8,  $HEPES$ -калієва сіль – 12,  $EGTA$  – 1,  $ATP$  – 0,5;  $[Ca^{2+}]_{\text{вільний}} \approx 100 \text{ нмоль/л}$ ;  $IP_3$  – 3 мкмоль/л (рН 7,2)

### 3.2.3. Чутливість $IP_3$ -рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів до $IP_3$ та $Ca^{2+}$

Різні типи  $IP_3$ -рецепторів мають відмінну чутливість до модулюючих агентів, таких як  $Ca^{2+}$ ,  $IP_3$ ,  $ATP$ . За чутливістю до  $IP_3$  послідовність виглядає наступним чином:  $IP_3R2$  (14 нмоль/л) >  $IP_3R1$  (50 нмоль/л) >  $IP_3R3$  (163 нмоль/л) [100]. Залежність функціонування  $IP_3$ -рецепторів від  $[Ca^{2+}]$  має вигляд дзвоноподібної кривої, найбільш чутливими до  $Ca^{2+}$  є  $IP_3R3$ . Найменшу чутливість до  $ATP$  мають  $IP_3R2$ , за насичуючої концентрації  $IP_3$   $ATP$  збільшує  $P_o$   $IP_3$ -рецепторів [100].

### 3.2.3.1. Залежність функціонування $IP_3$ -рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів від концентрації $IP_3$ у середовищі

З'ясувалося, що  $P_0$   $IP_3$ -рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів істотно залежить від концентрації  $IP_3$  у середовищі (рис. 3.40). При цьому  $P_0$  досліджуваних рецепторів зростала зі збільшенням концентрації  $IP_3$  ( $NP_0 = 0,080$  за концентрації  $0,2$  мкмоль/л  $IP_3$ ) і досягала максимуму за концентрації  $10$  мкмоль/л  $IP_3$  у середовищі ( $NP_0 = 0,292$ ) [191, 192].

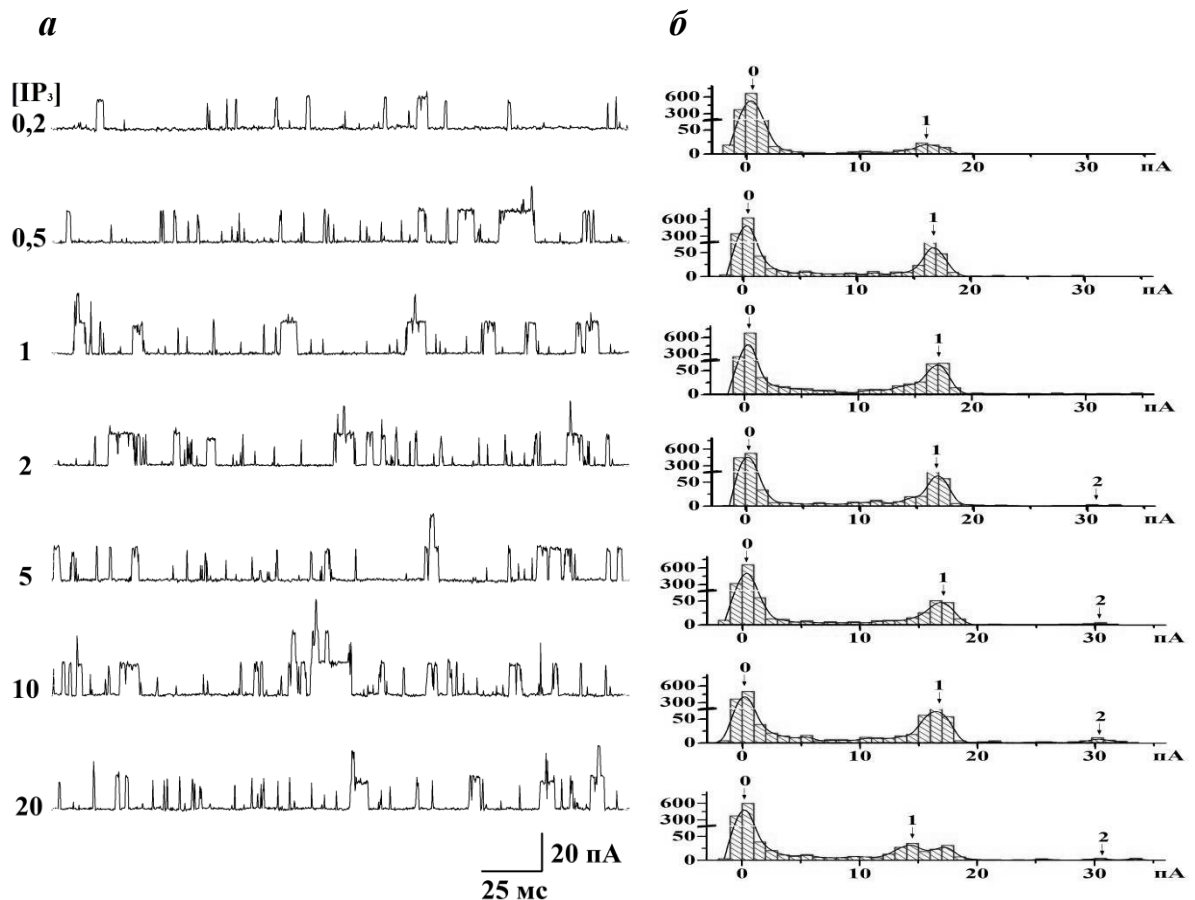


Рис. 3.40. Залежність активності  $IP_3$ -рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів від концентрації  $IP_3$  у середовищі за потенціалу  $+40$  мВ (а) та амплітудні діаграми (б). Реєстрацію здійснювали у розчині такого складу (ммоль/л):  $KCl$  – 150,  $HEPES$  – 8,  $HEPES$ -калієва сіль – 12,  $EGTA$  – 1,  $AT\Phi$  – 0,5;  $[Ca^{2+}]_{\text{вільний}} \approx 100$  нмоль/л;  $IP_3$  – 0,2–20 мкмоль/л (рН 7,2). З рисунку видно, що активність  $IP_3$ -рецепторів збільшується зі збільшенням концентрації  $IP_3$  у середовищі

### 3.2.3.2. Залежність функціонування $IP_3$ -рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів від концентрації $Ca^{2+}$ у середовищі

У наступних серіях експериментів ми досліджували активність  $IP_3$ -рецепторів за різної концентрації  $Ca^{2+}$  у середовищі. Нами зареєстровано струми через  $IP_3$ -рецепторів з різною чутливістю до  $Ca^{2+}$ . Частина характеризується класичною дзвоноподібною залежністю, який інактивується внаслідок додавання 1 мкмоль/л  $Ca^{2+}$  (рис. 3.41; 3.42) [193, 194, 195] і підтверджено літературними даними, згідно яких високі концентрації  $Ca^{2+}$  інактивують очищені кардіальні  $IP_3$ -рецептори [13]. Такі  $IP_3$ -рецептори найчастіше виявляли у лівому ( $n = 5$ ) та правому ( $n = 3$ ) шлуночках, тоді як у передсердях їх спостерігали вкрай рідко ( $n = 1$ ).

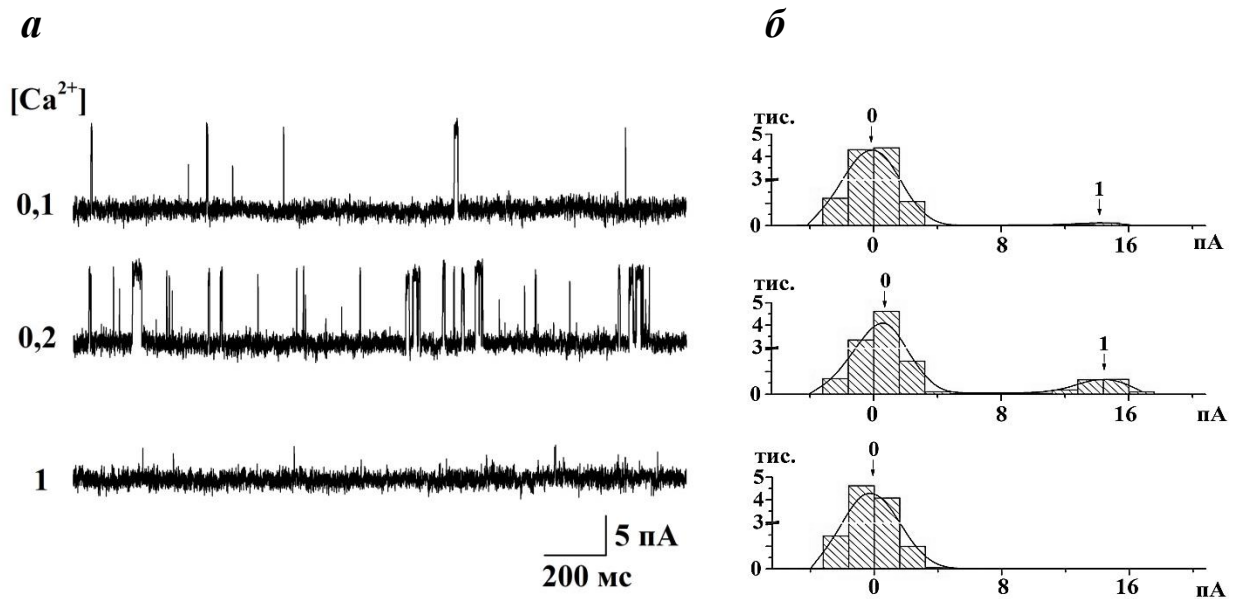


Рис. 3.41. Струми через  $IP_3$ -рецептори з типовою дзвоноподібною залежністю від концентрації  $Ca^{2+}$  за потенціалу +40 мВ (а) та амплітудні діаграми (б). Реєстрацію проводили у розчині такого складу (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1, АТФ – 0,5;  $[Ca^{2+}]_{\text{вільний}}$  – 0,1–1 мкмоль/л;  $IP_3$  – 20 мкмоль (рН 7,2). З реєстрації видно, що за наявності у середовищі 1 мкмоль/л  $Ca^{2+}$   $IP_3$ -рецептори інактивуються



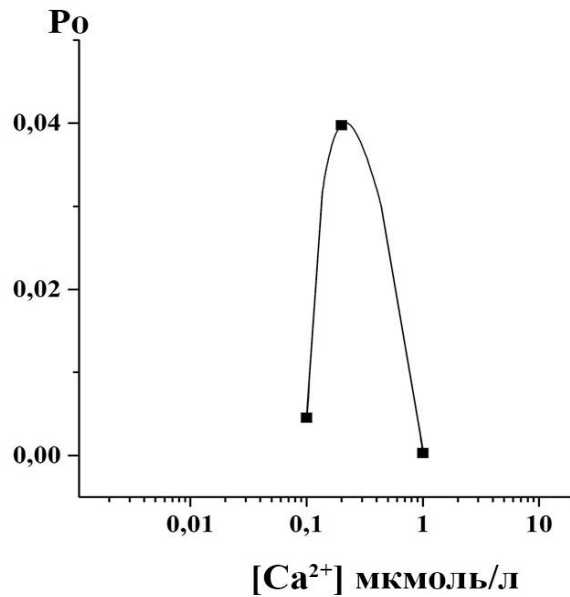


Рис. 3.42. Графік залежності  $P_o$   $IP_3$ -рецепторів (з типовою дзвоноподібною залежністю) від концентрації  $Ca^{2+}$  у середовищі. Реєстрацію проводили від ядра ізольованого з лівого шлуночка у розчині такого складу (ммоль/л):  $KCl$  – 150,  $HEPES$  – 8,  $HEPES$ -калієва сіль – 12,  $EGTA$  – 1,  $ATP$  – 0,5;  $[Ca^{2+}]_{вільний}$  від 0.1 до 1 мкмоль/л;  $IP_3$  – 20 мкмоль/л (pH 7,2)

Інший тип рецепторів мав також дзвоноподібну залежність  $P_o$  від концентрації  $Ca^{2+}$  у середовищі, але значно зміщену праворуч, інгібування починалось за концентрації  $Ca^{2+}$  10 мкмоль/л, але поодинокі відкривання каналу спостерігали навіть за концентрації  $Ca^{2+}$  1 ммоль/л у середовищі (рис. 3.43; 3,44) [196, 197]. Такого типу  $IP_3$ -рецептори наявні в усіх частинах серця: правому шлуночку (n = 3), лівому шлуночку (n = 2), лівому передсерді (n = 3) та у правому передсерді (n = 1).

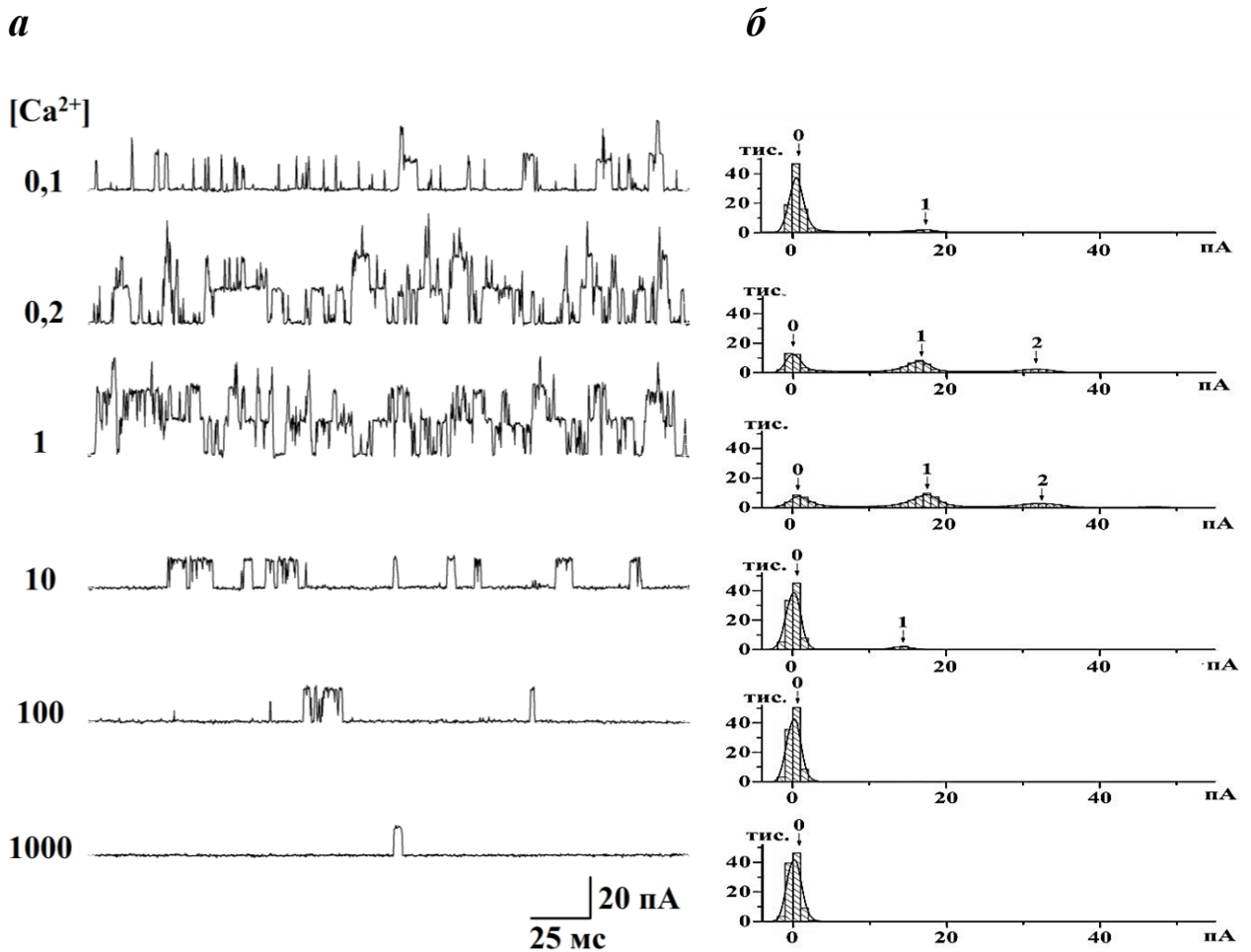


Рис. 3.43. Репрезентативна реєстрація струмів крізь  $IP_3$ -рецептори з низькою чутливістю до високих концентрацій  $Ca^{2+}$  за потенціалу +40 мВ (а) та амплітудні діаграми (б). Реєстрацію проводили у розчині такого складу (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1, АТФ – 0,5;  $[Ca^{2+}]_{\text{вільний}}$  від 100 нмоль/л до 1 ммоль/л;  $IP_3$  – 20 мкмоль/л (рН 7,2)

Різна чутливість  $IP_3$ -рецепторів до концентрації  $Ca^{2+}$  може мати визначальне значення для часових параметрів поширення  $Ca^{2+}$ -сигналу у кардіоміоцитах. Концентрація  $Ca^{2+}$  в спокої у більшості клітин становить близько 100 нмоль/л і рідко перевищує 1 ммоль/л навіть у невеликих локальних ділянках [81]. При таких концентраціях вільного  $Ca^{2+}$  один з типів  $IP_3$ -рецепторів буде функціонувати, тоді як інший не буде активним при досягненні  $[Ca^{2+}]$  10 мкмоль/л.

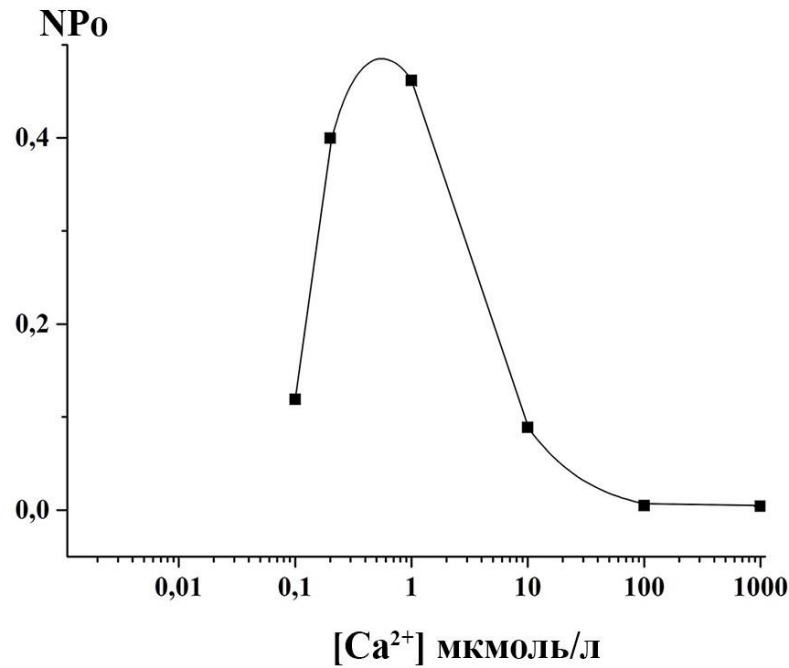


Рис. 3.44. Залежність  $P_o$   $IP_3$ -рецептора з нижчою чутливістю до  $Ca^{2+}$  від концентрації  $Ca^{2+}$  у середовищі. Реєстрації проводили у розчині такого складу (ммоль/л):  $KCl$  – 150,  $HEPES$  – 8,  $HEPES$ -калієва сіль – 12,  $EGTA$  – 1,  $ATP$  – 0,5;  $[Ca^{2+}]_{\text{свободний}}$  від 100 нмоль – 1 ммоль;  $IP_3$  – 20 мкмоль/л (pH 7,2)

Різна чутливість до  $Ca^{2+}$  може вказувати, що два різновиди  $IP_3$ -рецепторів беруть участь у різних типах внутрішньоклітинної  $Ca^{2+}$  сигналізації. Канали з типовою дзвоноподібною залежністю від концентрації  $Ca^{2+}$  будуть давати зворотний зв'язок та інактивуватимуться при досягненні 1 мкмоль/л  $Ca^{2+}$ , тоді як інший тип рецепторів буде продовжувати поширення  $Ca^{2+}$ -сигналу навіть при високій локальній концентрації  $Ca^{2+}$ . Оскільки у більшості клітин наявні різні типи  $IP_3$ -рецептрів, можуть виникати складні паттерни локальної передачі  $Ca^{2+}$ -сигналів і така гетерогенність робить значний внесок у часове і просторове поширення внутрішньоклітинного  $Ca^{2+}$ -сигналу як у цитоплазмі, так і в нуклеоплазмі, а зміни концентрації  $Ca^{2+}$  в ядрі мають вирішальне значення для реплікації генів.

### Підсумок

У внутрішній ядерній мембрані кардіоміоцитів ідентифіковано потенціалзалежні  $IP_3$ -рецептори з провідністю  $384 \pm 5$  пСм,  $P_o$  яких залежить від концентрації  $IP_3$  і  $Ca^{2+}$  у середовищі. За чутливістю до  $Ca^{2+}$ : частині з них притаманна класична дзвоноподібна залежність від його концентрації (з повним інгібуванням за  $1$  мкмоль/л  $Ca^{2+}$ ), тоді як для іншої частини графік залежності їхнього  $P_o$  від концентрації  $Ca^{2+}$  зміщений праворуч й інгібування починається за  $10$  мкмоль/л  $Ca^{2+}$ , однак поодинокі відкриття були навіть за  $1$  ммоль/л  $Ca^{2+}$ .

### Роботи в яких опубліковані основні наукові результати підрозділу

#### Статті:

✓ **Котик ОА**, Котлярова АБ, Поліщук АО, Марченко СМ. Іонні струми поодиноких каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів щура. Фізіол журн. 2016;62(6):3–8.

#### Тези:

➤ **Котик О**, Котлярова А, Марченко С. Властивості  $IP_3$ -рецепторів та LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів. Матеріали чергового VIII з'їзду Українського біофізичного товариства; 2019 листоп. 12–15; Київ-Луцьк, Україна. Київ. 2019. с. 19.

➤ Pavlova N, **Kotyk O**, Kotliarova A, Marchenko S. Potential-dependence of the functioning of the  $IP_3$ Rs in the native nuclear envelope of cardiomyocytes. XIII IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists; 2019 May 22–25; Kyiv, Ukraine. Biopolymers and Cell. 2019;35(5):405.

➤ Kotliarova A, **Kotyk O**, Rybachuk O, Sotkis A, Dyskina Yu, Marchenko S.  $IP_3$ Rs in the nuclear envelope - an electrophysiological and immunohistochemical confirmation. “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology – 2019”; 2019 Mar 21–22; Kyiv, Ukraine. Kyiv; 2019. p. 16.

➤ Котлярова А, **Котик О**, Марченко С. Властивості інозитол-1,4,5-трифосфатних рецепторів нативної ядерної мембрани кардіоміоцитів. Матеріали

тематичного VII з'їзду Українського біофізичного товариства; 2018 жовт. 29–31; Київ, Україна. Київ; 2018, с. 28.

➤ Kotliarova A, **Kotyk O**, Pavlova N, Kalnytska O, Kudriashova M, Marchenko S. IP<sub>3</sub>Rs and LCC-channels coexpression in cardiomyocytes' nuclear membrane. Materials of XII annual conference of young scientists institute of molecular biology and genetics NAS of Ukraine; 2018 May 15–16; Kyiv; Ukraine. Biopolymers Cell. 2018;34(2):143–67.

➤ Kotliarova A, **Kotyk O**, Polishchuk A, Marchenko S. Identification of ion channels in the nuclear envelope of cardiomyocytes. Abstracts of reports of the XV All-Ukrainian Scientific and Practical Conference of Young Scientists Young scientists in solution of actual problems of biology, animal husbandry and veterinary medicine; 2016 Dec. 8–9; Lviv, Ukraine. Біологія тварин. 2016 Dec;18(4):157.

➤ Pavlova N, **Kotyk O**, Kotliarova A, Marchenko S. Ion channels in the nuclear envelope of cardiomyocytes. International PhD student symposium and career fair for life sciences 15th horizons in molecular biology; 2018 Sept 10–13; Göttingen, Germany. Gottingen: Cuvillier; 2018, p. 72.

➤ **Kotyk O**, Kotliarova A, Polishchuk A, Marchenko S. The properties of ion channels in the nuclear envelope of cardiomyocytes. 2<sup>nd</sup> Conference for Young Scientists of the Division of Biochemistry, Physiology and Molecular Biology National Academy of Sciences of Ukraine; 2017 June 6–9; Kyiv, Ukraine. Ukr Biochem J; 2017. p. 119.

➤ **Котик О**, Котлярова А, Марченко С. Ідентифікація іонних каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів. матеріали IV Міжнар. наук. конф. «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології»; 2017 жовт. 5–6; Дніпро, Україна. Дніпро: «Ліра», 2017, с. 89–90.

## РОЗДІЛ 4

### УЗАГАЛЬНЕННЯ

У дисертаційній роботі охарактеризовано основні електрофізіологічні властивості спонтанно активних LCC-каналів та  $IP_3$ -рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів. Також здійснено пошук ефективного блокатора LCC-каналів, що є важливим з точки зору ідентифікації інструменту для подальшого з'ясування структури і фізіологічної ролі цих каналів.

LCC-канали характеризуються повільною кінетикою, їхня активність істотно залежить від прикладеного потенціалу (див. рис. 3.2) [198]. Також їм притаманна вибіркова проникність для одновалентних катіонів ( $K^+$ ,  $Na^+$ ) та непроникність для двовалентних ( $Ca^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ). Канали такого типу раніше були ідентифіковані у ядерній мембрані нейронів Пуркінє [5] та CA1-ділянки гіпокампа [36].

Здійснюючи пошук ефективного блокатора LCC-каналів цікавим є вивчення фармакологічної чутливості катіонних каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів до дії природних токсинів, адже в історичному аспекті багато з них були ідентифіковані як блокатори каналів різного типу. Раніше було показано, що неочищені фракції отрут гадюки шумливої, кобри монокленової та гадюки степової значно зменшують  $P_o$  LCC-каналів ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка [4], ми ж перевіряли вплив токсинів у формі очищених препаратів. Найбільш ефективним виявився NT II (25 мкмоль/л), амплітуда струму через канали під його впливом достовірно зменшувалася на 13 % ( $P \leq 0,05$ ) (див. рис. 3.7). В той час як  $\alpha$ -CTX (0,1–1 ммоль/л) призводив лише до незначного «миготіння» каналів (див. рис. 3.8).

Раніше було перевірено вплив значної кількості блокаторів та агоністів інших транспортувальних систем (тетраетиламонію, 4-амінопіридину, гепарину, рутенію червоного, фізіологічних концентрацій АТФ (0,5–5 ммоль/л),  $Ca^{2+}$  (0,05–50 мкмоль/л),  $Mg^{2+}$  (1–5 ммоль/л)) на LCC-канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка, однак вони виявилися неефективними [5]. Єдиним блокатором,

який знижував функціональну активність LCC-каналів ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка та викликав «миготіння», був d-тубокурарин [6]. Струм через LCC-канали внутрішньої ядерної мембрани кардіоміоцитів зменшувався на 45 % за наявності 200 мкмоль/л d-тубокурарину в середовищі (див. рис. 3.10). Подібність ефектів d-тубокурарину на LCC-канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє і кардіоміоцитів може свідчити про однакову фармакологічну чутливість цих каналів у досліджуваних клітинах. Але оскільки структура LCC-каналів досі залишається невідомою, складно зробити висновок про механізм такого впливу.

Серед перевірених антагоністів n-холінорецепторів найбільш виражений вплив на активність LCC-каналів мали Dh $\beta$ E (див. рис. 3.13; 3.14), d-тубокурарин (див. рис. 3.10), тоді як рокуронію бромід (див. рис. 3.17; 3.18), піпекуронію бромід (див. рис. 3.15; 3.16), дитилін (див. рис. 3.23; 3.24) та атракуріум (див. рис. 3.11; 3.12) пригнічували їх у концентраціях на порядок більших. Не змінювали активність досліджуваних каналів гексаметоній (див. рис. 3.25; 3.26), MLA (див. рис. 3.19; 3.20) та  $\alpha$ -конотоксин PeIA (див. рис. 3.21; 3.22).

У серіях експериментів з агоністами n-холінорецепторів найбільш виражений вплив мав нікотин (на 50 % зменшувався струм через канал у концентрації 200 мкмоль/л) (див. рис. 3.34; 3.35) та dFBr (за концентрації 200 мкмоль/л, амплітуда струму через канал зменшувалася на 21 %) (див. рис. 3.30; 3.31). Агоністи ацетилхолінових рецепторів – карбахолін (див. рис. 3.28; 3.29) та PNU 282987 (див. рис. 3.32; 3.33) не змінювали функціональної активності LCC-каналів.

Слід зазначити, що дія досліджуваних речовин на LCC-канали проявлялася по різному. Під впливом d-тубокурарину (див. рис. 3.10), dFBr (див. рис. 3.30), атракуріуму (див. рис. 3.11), дитиліну (див. рис. 3.23) (у тестованих концентраціях) зменшувалась середня амплітуда струму через LCC-канали, а також з'являлося «миготіння» каналу або так званий flicker-блок каналу. Тобто дуже швидкі послідовні спроби закриття та відкриття каналу, очевидно, пов'язані з механічним блокуванням пори каналу у його відкритому стані. Таким

чином, ефективніше блокування LCC-каналів d-тубокурарином у порівнянні з піпекуронію та рокуронію бромідами можна пояснити значно більшим розміром його молекули. Під впливом інших речовини Dh $\beta$ E (див. рис. 3.13), NT II (див. рис. 3.6), піпекуронію- (див. рис. 3.15) та рокуронію бромідів (див. рис. 3.17) виникало лише зменшення середньої амплітуди струму через канали, що ймовірно пов'язане з конформаційними змінами пори каналу.

На рис. 4.1 представлено концентраційні залежності впливу цих речовин на струми через LCC-канали.

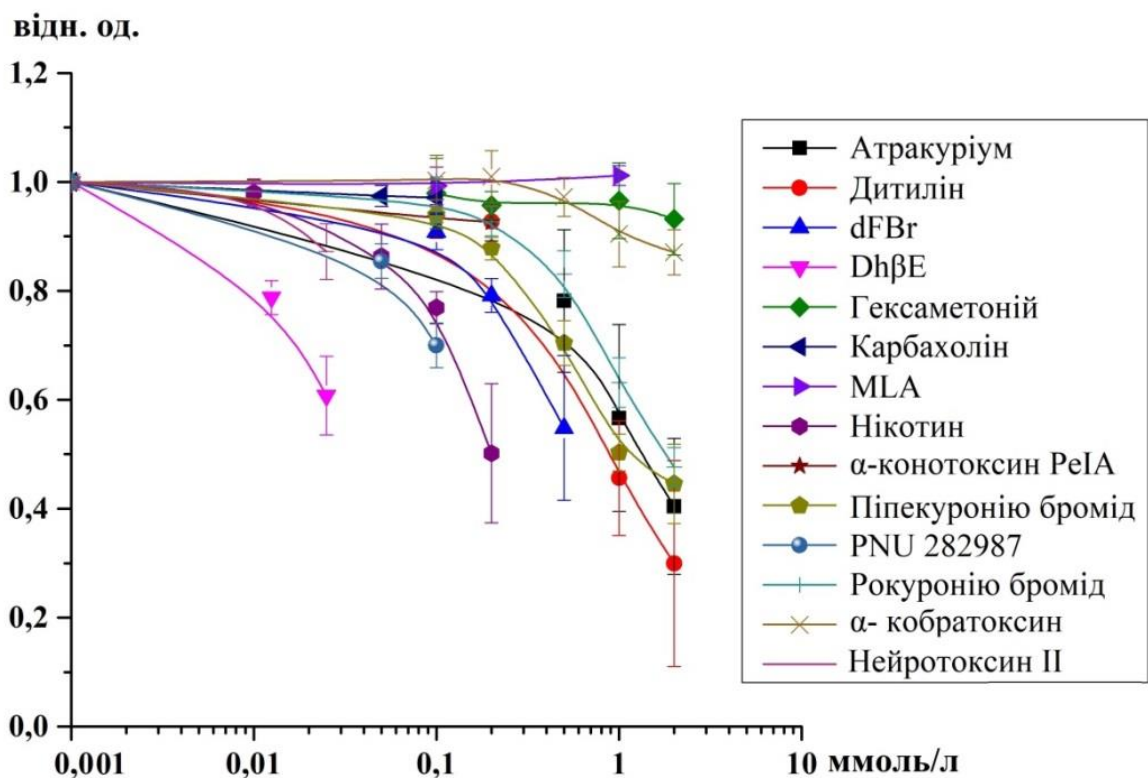


Рис. 4.1. Усереднені нормовані концентраційні залежності впливу агоністів й інгібіторів n-холінорецепторів на  $K^+$ -струм крізь LCC-канали ядерної мембрани кардіоміоцитів. Середній струм визначали як різницю зареєстрованих значень струму, виміряних у інтервалі 200–400 мс під час перебування каналів у відкритому і закритому стані та виражали у відносних одиницях. Значення амплітуди середнього струму у контролі прийнято за 1. За віссю абсцис – концентрація речовин, за віссю ординат – значення амплітуди середнього струму



Таким чином, послідовність ефективності інгібування LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів інгібіторами та агоністами н-холінорецепторів і змінними токсинами виглядає так: Dh $\beta$ E > d-тубокурарин  $\approx$  нікотин > NT II > dFBv > дитилін  $\approx$  атракуріум  $\approx$  піпекуронію бромід > рокуронію бромід >  $\alpha$ -СТХ.

Показано, що у ядерній мембрані нейронів Пуркінє LCC-канали коекспресуються з IP<sub>3</sub>-рецепторами [10]. Нашими дослідженнями підтверджено таку ж коекспресію у ядерній мембрані кардіоміоцитів (рис. 4.2). Оскільки за властивостями ядерна та ендоплазматична мембрани є подібними [199], LCC-канали можуть бути і у мембранах ендоплазматичного ретикулума. Також важливим є той факт, що LCC-канали та IP<sub>3</sub>-рецептори мають однакову потенціалзалежність [200].

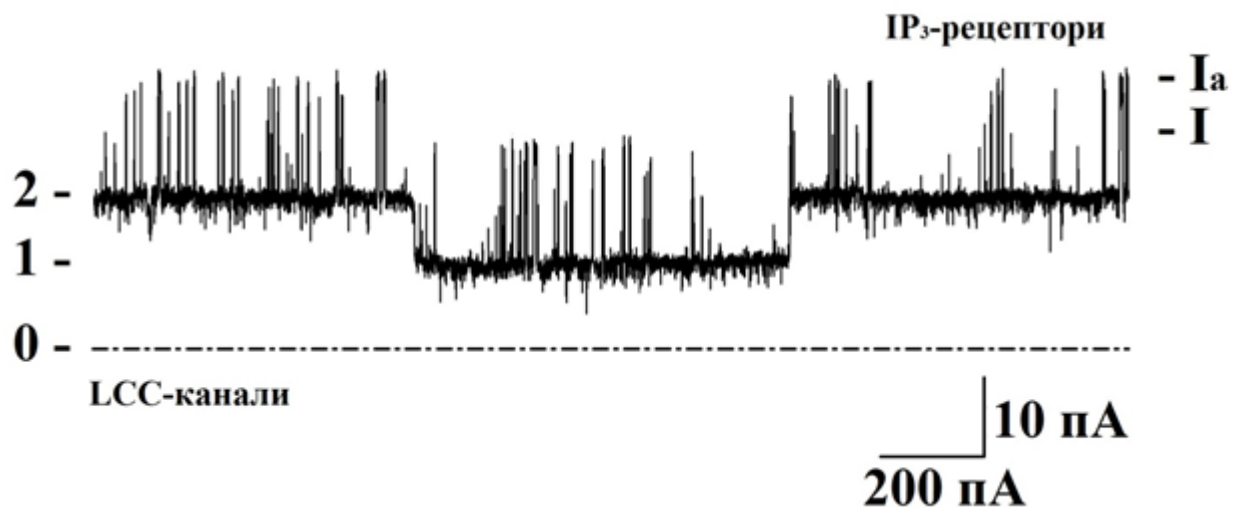


Рис. 4.2. Коекспресія IP<sub>3</sub>-рецепторів та LCC-каналів у ядерній мембрані кардіоміоцитів за потенціалу +40 мВ. 0, 1, 2 – кількість відкритих LCC-каналів, I, I<sub>a</sub> – відкривання каналу IP<sub>3</sub>-рецептора на тлі одного або двох відкритих LCC-каналів відповідно. Реєстрація у симетричному середовищі (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1, АТФ – 0,5; [Ca<sup>2+</sup>]<sub>вільний</sub>  $\approx$  100 нмоль/л; IP<sub>3</sub> – 10 мкмоль/л (рН 7,2)

Ми припускаємо, що не лише Ca<sup>2+</sup>-канали можуть брати участь у поширенні Ca<sup>2+</sup>-сигналу. При вивільненні Ca<sup>2+</sup> з внутрішньоклітинних депо позитивно заряджені частинки з люмену переміщуються у цитоплазму. За відсутності

протилежно спрямованого потоку позитивно заряджених іонів, мембранний потенціал швидко зміститься до значення  $\text{Ca}^{2+}$ -рівноважного потенціалу і вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з депо припиниться. LCC-канали, описані раніше у ядрах нейронів центральної нервової системи, роблять мембрану легко проникною для  $\text{K}^+$  [5]. Можна припустити, що зміна потенціалу люмену, що виникає при вивільненні  $\text{Ca}^{2+}$  через  $\text{IP}_3$ -рецептори, компенсується протилежно спрямованим потоком  $\text{K}^+$  через LCC-канали, полегшуючи цим самим подальше вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з депо і пролонгуючи  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал.

Для перевірки гіпотези спочатку необхідно дослідити базові електрофізіологічні властивості  $\text{IP}_3$ -рецепторів. Найкраще охарактеризовані  $\text{IP}_3$ -рецептори першого типу, тоді як про другий тип є лише розрізнені дані, а саме вони мають найбільшу експресію у кардіоміоцитах. Варе зі співавт. показали, що у кардіоміоцитах  $\text{IP}_3$ -рецептори локалізовані у ділянці навколо ядра, і така просторова відокремленість, вказує на їх унікальну роль у регулюванні динаміки  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналізації у ядрі [2].

Виявлені нами властивості  $\text{IP}_3$ -рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів не збігаються з жодним типом описаних ізоформ  $\text{IP}_3$ -рецептора ні за чутливістю до  $\text{IP}_3$ , ні за впливом  $\text{Ca}^{2+}$  на їх функціонування, а ці властивості є основними у визначенні характеру  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналу, який ними генерується. Слід зазначити, що на властивості рецептора, окрім самого гена, що його кодує, можуть впливати його посттрансляційні модифікації і молекулярне оточення. Тому дослідження  $\text{IP}_3$ -рецепторів з характерними для клітин конкретного типу посттрансляційними змінами є дуже актуальним і наші дані про властивості  $\text{IP}_3$ -рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів є яскравим цьому підтвердженням. На даний момент незрозумілими є ні природа таких відмінностей, ні фактори, які до них призводять.

$\text{IP}_3$ -опосередковане вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  відіграє ключову роль у регуляції цитозольних та ядерних  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналів. Той факт, що в ядрі наявні всі складові каскаду  $\text{IP}_3$ -сигналізації, а також наявність  $\text{IP}_3$ -рецепторів у внутрішній та зовнішній мембранах ядерної оболонки, яка є єдиним суміжним з ER депо  $\text{Ca}^{2+}$ ,

дає змогу припустити, що  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналізація в ядрі відбувається незалежно від цитозольної [201, 202]. Це забезпечує потенційний механізм регуляції, який діє локально і автономно від глобального цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналу. Крім того, ядерна оболонка має власні іонні канали і транспортери [106, 203, 204].

В кардіоміоцитах  $\text{IP}_3$ -рецептори відіграють важливу роль у процесах збудження–скорочення, а також їх експресія зростає за патологічних станів [див. 100]. Збільшення інтенсивності і частоти  $\text{Ca}^{2+}$ -осциляцій може призвести до перевантаження серця та виникнення гіпертрофії, саме тому важливим є вивчення властивостей ідентифікованих нами  $\text{IP}_3$ -рецепторів, особливо тої частини, поодинокі спрацьовування яких спостерігаються навіть за досягнення 1 ммоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі, адже підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в ядрі має специфічні ефекти, які відрізняються від цитозольних [200, 205, 206].

Механізми регуляції  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналізації у ядрі є суперечливими і недостатньо вивченими. На основі досліджень з використанням імунофлюоресценції та імуноелектронної мікроскопії встановлено, що в ядрах ізольованих із м'язевих T-трубочок  $\text{IP}_3\text{R1}$  та  $\text{IP}_3\text{R3}$  переважно локалізовані у внутрішній ядерній мембрані, тоді як  $\text{IP}_3\text{R2}$  обмежувалися CP. Навколоядерна локалізація  $\text{IP}_3$ -рецепторів у кардіоміоцитах вказує на їх важливу роль у функціонуванні цих клітин [2, 201]. У кардіоміоцитах, поряд з  $\text{IP}_3$ -рецепторами, локалізована кальмодулін (CaM) і  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-залежна протеїнкіназа II (CaMKII), які в тій чи іншій мірі беруть участь у передачі сигналів при гіпертрофії серця. Крім цього, гістонові деацетилази класу II (HDAC5) пригнічують транскрипцію генів при цій патології [207].

На основі отриманих результатів, а також даних літератури запропоновано схему транспорту іонів крізь LCC-канали та  $\text{IP}_3$ -рецептори ядерної мембрани кардіоміоцитів, а також вказано речовини, котрі на них впливають (рис. 4.3).

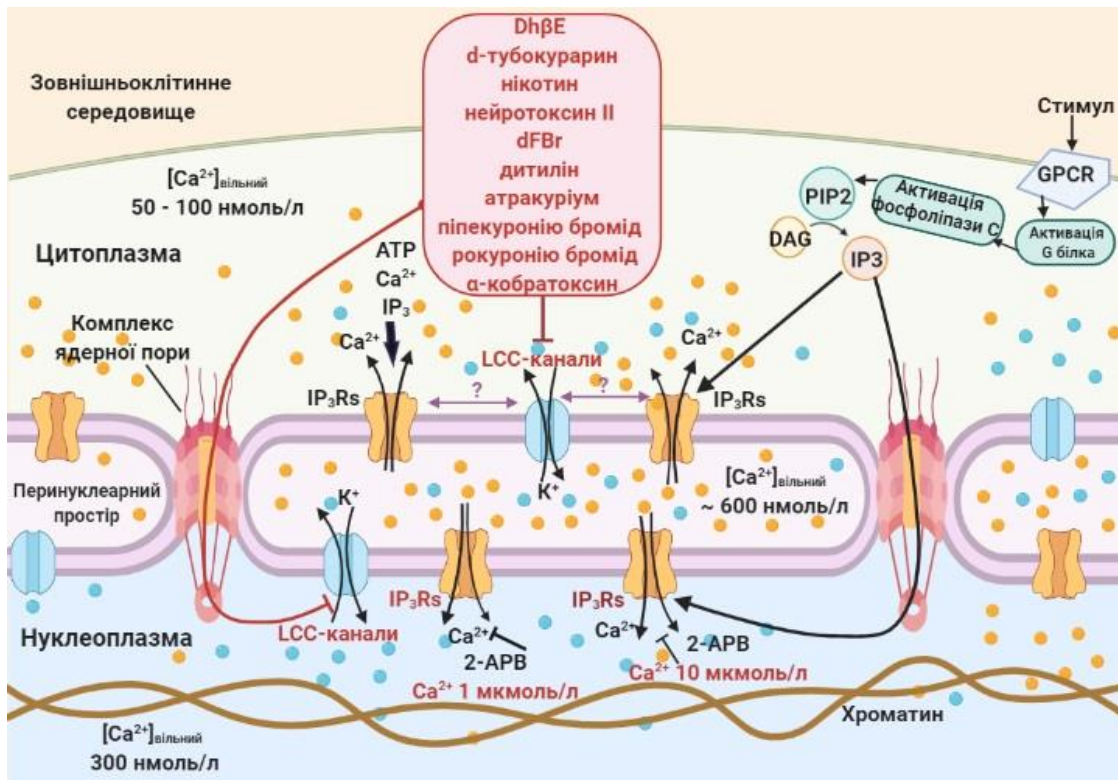


Рис. 4.3. Схематичне зображення транспорту іонів крізь ядерну мембрану кардіоміоцитів.  $\blackrightarrow$  – активація,  $\top$  – інгібування,  $\rightarrow$  – напрям руху іонів. Іони калію через LCC-канали можуть проникати в перинуклеарний простір з цитоплазми чи нуклеоплазми та у зворотному напрямку. LCC-канали є спонтанно активними та з різною ефективністю блокуються агоністами й інгібіторами н-холінорецепторів, а також змінними токсинами.  $Ca^{2+}$  з перинуклеарного простору вивільняється у цитоплазму та нуклеоплазму через  $IP_3$ -рецептори. У ядерній мембрані наявні  $IP_3$ -рецептори з різною чутливістю до  $Ca^{2+}$ . Шлях активації  $IP_3$ -рецепторів у кардіоміоцитах: сигнальна молекула (Стимул) активує GPCR – G-білок пов'язані рецептори (рецептори ангіотензину II, інсуліноподібного фактору росту, ендотеліну-1), що призводить до активації фосфоліпази C, яка розщеплює фосфатидилінозитол 4,5-біфосфат (PIP2) на  $IP_3$  та діацилгліцерол (DAG). Потім  $IP_3$  вивільняється в цитозоль й активує  $IP_3$ -чутливі рецептори, розташовані на мембранах сарко/ендоплазматичного ретикулума і зовнішній ядерній мембрані, викликаючи  $IP_3$ -індуковане вивільнення  $Ca^{2+}$  у цитоплазму, а також проникаючи через пори може активувати  $IP_3$ -рецептори внутрішньої мембрани ядра, крізь які  $Ca^{2+}$  вивільняється з перинуклеарного простору в нуклеоплазму, де може впливати на експресію генів. Чорним кольором шрифту позначено літературні дані, червоним – результати власних досліджень

### **Підсумок**

Отже, наші дослідження показали, що найбільш перспективним блокатором LCC-каналів є DhβE, нікотин і d-тубокурарин, котрі після ретельної перевірки їх специфічності можуть стати інструментами для з'ясування фізіологічної ролі LCC-каналів і верифікації взаємозв'язку функціонування LCC-каналів та IP<sub>3</sub>-рецепторів, що стане наступним етапом нашої роботи.

## ВИСНОВКИ

У внутрішній ядерній мембрані кардіоміоцитів щурів наявні LCC-канали, які характеризуються спонтанною активністю, вибірковою проникністю для одновалентних катіонів та різною чутливістю до агоністів й інгібіторів н-холінорецепторів та зміїних токсинів: Dh $\beta$ E > d-тубокурарин  $\approx$  нікотин > NT II > dFBr > дитилін  $\approx$  атракуріум  $\approx$  піпекуронію бромід > рокуронію бромід >  $\alpha$ -СТХ. Ці канали коекспресуються з IP<sub>3</sub>-рецепторами, котрим притаманна різна чутливість до Ca<sup>2+</sup>, що може мати важливе значення для поширення Ca<sup>2+</sup>-хвилі у цих клітинах.

1. Після оптимізації способу ізолювання ядер кардіоміоцитів встановлено, що у їх внутрішній мембрані наявні кілька типів спонтанно активних каналів з провідністю від 10 до 340 пСм.

2. Серед спонтанно активних каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів найчастіше реєстрували струм через LCC-канали з провідністю  $209 \pm 13$  пСм, які характеризуються потенціалзалежністю, вибірковою проникністю одновалентних катіонів K<sup>+</sup> та Na<sup>+</sup> і непроникністю Cl<sup>-</sup> та Ca<sup>2+</sup>.

3. На функціональну активність LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів впливають деякі зміїні токсини. Найефективнішим серед перевірених є NT II (0,025 ммоль/л), в той час як  $\alpha$ -СТХ (0,2–2 ммоль/л) спричиняє лише незначне «миготіння» досліджуваних каналів.

4. Активність LCC-каналів частково пригнічують інгібітори н-холінорецепторів: d-тубокурарин (0,2–1 ммоль/л), Dh $\beta$ E (12,5 та 25 мкмоль/л), атракуріум (0,5–2 ммоль/л), піпекуронію (0,1–2 ммоль/л) та рокуронію (0,1–2 ммоль/л) броміди і дитилін (0,2–2 ммоль/л). Не мають вираженого впливу на досліджувані канали: гексаметоній (0,05–2 ммоль/л),  $\alpha$ -конокотоксин PeIA (0,1–0,2 ммоль/л), MLA (0,1 та 1 ммоль/л).

5. Серед агоністів н-холінорецепторів нікотин (0,01–0,2 ммоль/л) та dFBr (0,1–0,5 ммоль/л) частково зменшують функціональну активність LCC-каналів,

тоді як PNU 282987 (0,05 та 0,1 ммоль/л), карбахолін (0,05–0,1 ммоль/л) не впливають на них.

6. З використанням електрофізіологічного та імуногістохімічного методів в ядерній мембрані кардіоміоцитів підтверджено наявність  $IP_3$ -рецепторів з провідністю  $384 \pm 5$  пСм. Залежність ймовірності перебування  $IP_3$ -рецепторів у відкритому стані є потенціалзалежною і регулюється концентрацією  $IP_3$  та  $Ca^{2+}$  у середовищі.

7.  $IP_3$ -рецептори внутрішньої ядерної мембрани кардіоміоцитів характеризуються різною чутливістю до  $Ca^{2+}$ : для частини з них притаманна класична дзвоноподібна залежність від його концентрації (з повним інгібуванням за 1 мкмоль/л  $Ca^{2+}$ ), тоді як для іншої частини графік залежності їхнього  $P_o$  від концентрації  $Ca^{2+}$  зміщений праворуч й інгібування починається за 10 мкмоль/л  $Ca^{2+}$ .

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Lines G, Sande J, Louch W, Mørk H, Grøttum P, Sejersted O. Contribution of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger to rapid  $\text{Ca}^{2+}$  release in cardiomyocytes. *Biophys J*. 2006;91(3):779–92.
2. Bare D, Kettlun C, Liang M, Bers D, Mignery G. Cardiac Type 2 Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem*. 2005;280(16):15912–20.
3. Mouhat S, Andreotti N, Jouirou B, Sabatier J. Animal toxins acting on voltage-gated potassium channels. *Curr Pharm Des*. 2008;14(24):2503-18.
4. Lunko O, Fedorenko O, Isaeva E, Marchenko S. Effects of venoms on large-conductance cationic channels on the inner nuclear membrane of rat cerebellum purkinje neurons. *Fiziol Zh*. 2018;64(4):23–31. [Ukrainian].
5. Marchenko S, Yarotsky V, Kovalenko T, Kostyuk P, Thomas R. Spontaneously active and  $\text{InsP}_3$ -activated ion channels in cell nuclei from rat cerebellar Purkinje and granule neurones. *J Physiol*. 2005;565(3):897–910.
6. Lunko O, Grushkovska I, Lun'ko O, Marchenko M. Effect of tubocurarine on large-conductance cationic channels in the inner nuclear membrane of Purkinje neurons of the rat cerebellum. *Neurophysiology*. 2016;48(5):332–5.
7. Bezprozvanny I, Watras J, Ehrlich B. Bell-shaped calcium-response curves of  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ - and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature*. 1991;351(6329):751–4.
8. Bezprozvanny I. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium*. 2005;38(3–4):261–72.
9. Egorova P, Bezprozvanny I. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and neurodegenerative disorders. *FEBS J*. 2018;285(19):3547–65.
10. Fedorenko O, Marchenko S. Ion channels of the nuclear membrane of hippocampal neurons. *Hippocampus*. 2014 Jul;24(7):869–76.
11. Perez P, Ramos-Franco J, Fill M, Mignery G. Identification and functional reconstitution of the type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor from ventricular cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 1997;272(38):23961–9.



12. Garcia M, Boehning D. Cardiac inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Biochim et Biophys Acta (BBA) – Mol Cell Res.* 2016;1864(6):907–14.
13. Ramos-Franco J, Bare D, Caenepeel S, Nani A, Fill M, Mignery G. Single-channel function of recombinant type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Biophys J.* 2000;79(3):1388–99.
14. Agulhon C, Petravicz J, McMullen A, Sweger E, Minton S, Taves S et al. What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology?. *Neuron.* 2008;59(6):932–46.
15. Harzheim D, Talasila A, Movassagh M, Foo R, Figg N, Bootman M et al. Elevated InsP<sub>3</sub>R expression underlies enhanced calcium fluxes and spontaneous extrasystolic calcium release events in hypertrophic cardiac myocytes. *Channels.* 2010;4(1):67–71.
16. Mohler P, Davis J, Bennett V. Ankyrin-B coordinates the Na/K ATPase, Na/Ca exchanger, and InsP<sub>3</sub> receptor in a cardiac T-tubule/SR microdomain. *PLoS Biol.* 2005;3(12):e423.
17. Yamada J, Ohkusa T, Nao T, Ueyama T, Yano M, Kobayashi S et al. Up-regulation of inositol 1,4,5 trisphosphate receptor expression in atrial tissue in patients with chronic atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37(4):1111–19.
18. Go L, Moschella M, Watras J, Handa K, Fyfe B, Marks A. Differential regulation of two types of intracellular calcium release channels during end-stage heart failure. *J Clin Invest.* 1995;95(2):888–94.
19. Gerdes M. *Muscle Fundamental biology and mechanisms of disease.* NY: New York College of Osteopathic Medicine at New York Institute of Technology, Old Westbury; 2012. Chapter 5, Cardiomyocyte ultrastructure; p. 47–55.
20. Nicotera P, Orrenius S, Nilsson T, Berggren P. An inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca<sup>2+</sup> pool in liver nuclei. *PNAS.* 1990;87(17):6858–62.
21. Gerasimenko O, Gerasimenko J, Tepikin A, Petersen O. ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca<sup>2+</sup> from the nuclear envelope. *Cell.* 1995;80(3):439–44.
22. Stehno-Bittel L, Lückhoff A, Clapham D. Calcium release from the nucleus by InsP<sub>3</sub> receptor channels. *Neuron.* 1995;14(1):163–7.

23. Mazzanti M, Bustamante J, Oberleithner H. Electrical dimension of the nuclear envelope. *Physiol Rev.* 2001;81(1):1–19.
24. Guihard G, Proteau S, Payet M, Escande D, Rousseau E. Patch-clamp study of liver nuclear ionic channels reconstituted into giant proteoliposomes. *FEBS Lett.* 2000 Jul;476(3):234–9.
25. De Magistris P, Antonin W. The dynamic nature of the nuclear envelope. *Current Biol.* 2018;28(8):R487–97.
26. Mauger J. Role of the nuclear envelope in calcium signalling. *Biol Cell.* 2012;104(2):70–83.
27. Baumann O, Walz B. Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *Int Rev Cytol.* 2001;205:149–214.
28. Papp S, Dziak E, Michalak M, Opas M. Is all of the endoplasmic reticulum created equal? The effects of the heterogeneous distribution of endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -handling proteins. *J Cell Biol.* 2003;160(4):475–9.
29. Rizzuto R, Pozzan T. Microdomains of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ : molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev.* 2006;86(1):369–408.
30. Barton L, Soshnev A, Geyer P. Networking in the nucleus: a spotlight on LEM-domain proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 2015;34:1–8.
31. Morris G, Manilal S. Heart to heart: from nuclear proteins to Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 1999;8(10):1847–51.
32. Chi T. Signal transduction:inositol phosphates in the nucleus. *Science.* 2000;287(5460):1937-9.
33. Lanini L, Bachs O, Carafoli E. The calcium pump of the liver nuclear membrane is identical to that of endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 1992;267(16):11548–52.
34. Abrenica B, Gilchrist J. Nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  loading is regulated by mobilization of perinuclear  $\text{Ca}^{2+}$ . *Cell Calcium.* 2000;28(2):127–36.
35. Wuytack F, Raeymaekers L, Missiaen L. Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium.* 2002;32(5–6):279–305.

36. Fedorenko E, Duzhii D, Marchenko S. Spontaneously active ion channels of membranes of the nuclear envelope of hippocampal pyramidal neurons. *Neurophysiology*. 2007;39(1):3–8.
37. Matzke A, Weiger T, Matzke M. Ion channels at the nucleus: electrophysiology meets the genome. *Mol Plant*. 2010;3(4):642–52.
38. Merjan A, Kanashiro C, Krieger J, Han S, Paiva A. Ligand-induced endocytosis and nuclear localization of angiotensin II receptors expressed in CHO cells. *Braz J Med Biol Res*. 2001;34(9):1175–83.
39. Bkaily G, Avedanian L, Jacques D. Nuclear membrane receptors and channels as targets for drug development in cardiovascular diseases. *Can J Physiol Pharmacol*. 2009;87(2): 108–19.
40. Gerasimenko J, Maruyama Y, Yano K, Dolman N, Tepikin A, Petersen O et al. NAADP mobilizes  $Ca^{2+}$  from a thapsigargin-sensitive store in the nuclear envelope by activating ryanodine receptors. *J Cell Biol*. 2003;163(2):271–82.
41. Tabares L, Mazzanti M, Clapham D. Chloride channels in the nuclear membrane. *J Membr Biol*. 1991;123(1):49–54.
42. Bustamante J. Nuclear pore ion channel activity in live syncytial nuclei. *Pflügers Arch*. 2002;444(1–2):286–90.
43. Ori A, Banterle N, Iskar M, Andrés-Pons A, Escher C, Khanh Bui H et al. Cell type-specific nuclear pores: a case in point for context-dependent stoichiometry of molecular machines. *Mol Syst Biol*. 2013;9(1):648.
44. Weberruss M, Antonin W. Perforating the nuclear boundary – how nuclear pore complexes assemble. *J Cell Sci*. 2016;129(24):4439–47.
45. Sachdev R, Sieverding C, Flötenmeyer M, Antonin W. The C-terminal domain of Nup93 is essential for assembly of the structural backbone of nuclear pore complexes. *Mol Biol Cell*. 2012;23(4):740–9.
46. Chug H, Trakhanov S, Hülsmann B, Pleiner T, Görlich D. Crystal structure of the metazoan Nup62•Nup58•Nup54 nucleoporin complex. *Science*. 2015;350(6256):106–10.

47. Natalizio B, Wenthe S. Postage for the messenger: designating routes for nuclear mRNA export. *Trends in Cell Biology*. 2013;23(8):365–73.
48. Mak D, Vais H, Cheung K, Foskett J. Patch-Clamp electrophysiology of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Cold Spring Harb Prot*. 2013;2013(9):pdb.top066217.
49. Wagner L, Groom L, Dirksen R, Yule D. Characterization of ryanodine receptor type 1 single channel activity using “on-nucleus” patch clamp. *Cell Calcium*. 2014;56(2):96–107.
50. Quesada I, Rovira J, Martin F, Roche E, Nadal A, Soria B. Nuclear KATP channels trigger nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  transients that modulate nuclear function. *PNAS*. 2002;99(14):9544–9.
51. Zhou X, Lin P, Yamazaki D, Park K, Komazaki S, Chen S, et al. Trimeric intracellular cation channels and sar-coplasmic/endoplasmic reticulum Calcium homeostasis. *Circ Res*. 2014;114(4):706–16.
52. Yarotskyy V, Dirksen R. Monovalent cationic channel activity in the inner membrane of nuclei from skeletal muscle fibers. *Biophys J*. 2014;107(9):2027–36.
53. Li B, Jie W, Huang L, Wei P, Li S, Luo Z et al. Nuclear BK channels regulate gene expression via the control of nuclear calcium signaling. *Nat Neurosci*. 2014;17(8):1055–63.
54. Yang X, Wang G, Cao T, Zhang L, Ma Y, Jiang S, et al. Large-conductance calcium-activated potassium channels mediate lipopolysaccharide-induced activation of murine microglia. *J Biol Chem*. 2019;294(35):12921–32.
55. Fedorenko O, Marchenko S. Spontaneously active ion cannels of the nuclear envelope membrane. *Fiziol Zh*. 2010; 56 (5): 95–105. [Ukrainian].
56. Fedorenko O, Yarotskyy V, Duzhy D, Marchenko S. The large-conductance ion channels in the nuclear envelope of central neurons. *Pflugers Arch*. 2010;460(6):1045–50.
57. Dujyy D, Fedorenko O, Marchenko S. Study of ion channels from the inner nuclear membranes of pyramidal hippocampal neurons. *Fiziol Zh*. 2006;52(2):18. [Ukrainian].

58. Zhou X, Park K, Yamazaki D, Lin P, Nishi M, Ma Z et al. TRIC-A channel maintains store calcium handling by interacting with type 2 ryanodine receptor in cardiac muscle. *Circul Res.* 2020;126(4):417–35.
59. Mazzanti M, DeFelice L, Cohen J, Malter H. Ion channels in the nuclear envelope. *Nature.* 1990;343(6260):764–7.
60. Longin A, Mezin P, Favier A, Verdetti J. Presence of zinc and calcium permeant channels in the inner membrane of the nuclear envelope. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;235(1):236–41.
61. Gensburger C, Freyermuth S, Klein C, Malviya A. In vivo nuclear  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase phosphorylation triggers intermediate size molecular transport to the nucleus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;303(4):1225–8.
62. Marius P, Guerra M, Nathanson M, Ehrlich B, Leite M. Calcium release from ryanodine receptors in the nucleoplasmic reticulum. *Cell Calcium.* 2006;39(1):65–73.
63. Iegorova O, Maximyuk O, Fisyunov A, Krishtal O. Voltage-gated calcium channels: classification and pharmacological properties (part I). *Fiziol Zh.* 2016;62(4):84–94. [Ukrainian].
64. Xie X, Wu G, Lu Z, Ledeen R. Potentiation of a sodium-calcium exchanger in the nuclear envelope by nuclear GM1 ganglioside. *J Neurochem.* 2002;81(6):1185–95.
65. Ibarra C, Vicencio J, Varas-Godoy M, Jaimovich E, Beverly A, Rothermele F et al. An integrated mechanism of cardiomyocyte nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. *J Mol Cell Cardiol.* 2014 Oct;75:40–8.
66. Galione A, Chuang K. Pyridine nucleotide metabolites and calcium release from intracellular stores. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1131:371–94.
67. Pralong W, Spät A, Wollheim C. Dynamic pacing of cell metabolism by intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  transients. *J Biol Chem.* 1994 Nov 4;269(44):27310–4.
68. Budko A, Strutynska N, Okhay I, Semenykhina O, Sagach V.  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation in isolated rat heart mitochondria under maintenance of mitochondrial potential. *Fiziol Zh.* 2015;61(6):17–25. [Ukrainian].

69. Манько В. Системи транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  у секреторних клітинах екзокринних залоз: монографія. Львів: Львівський національний університет імені Івана Франка; 2011:271.
70. Petersen O, Gerasimenko O, Gerasimenko J, Mogami H, Tepikin A. The calcium store in the nuclear envelope. *Cell Calcium*. 1998;23(2–3):87–90.
71. Balakier H, Dziak E, Sojecki A, Librach C, Michalak M, Opas M. Calcium-binding proteins and calcium-release channels in human maturing oocytes, pronuclear zygotes and early preimplantation embryos. *Hum Reprod*. 2002;17(11):2938–47.
72. Echevarria W, Leite M, Guerra M, Zipfel W, Nathanson M Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol*. 2003;5(5):440–6.
73. Bedard K, Szabo E, Michalak M, Opas M. Cellular functions of endoplasmic reticulum chaperones calreticulin, calnexin, and ERp57. *Int Rev Cytol*. 2005;245:91–121.
74. Collado-Hilly M, Shirvani H, Jaillard D, Mauger J. Differential redistribution of  $\text{Ca}^{2+}$ -handling proteins during polarisation of MDCK cells: Effects on  $\text{Ca}^{2+}$  signalling. *Cell Calcium*. 2010;48(4):215–24.
75. Flavell S, Greenberg M. Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 2008;31(1):563–90.
76. Mellström B, Savignac M, Gomez-Villafuertes R, Naranjo J.  $\text{Ca}^{2+}$ -operated transcriptional networks: molecular mechanisms and in vivo models. *Physiol Rev*. 2008;88(2):421–49.
77. Rodrigues M, Gomes D, Leite M, Grant W, Zhang L, Lam W et al. Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation. *J Biol Chem*. 2007;282(23):17061–8.
78. Pusch T, Wu J, Zimmerman T, Zhang L, Ehrlich B, Berchtold M et al. Epidermal Growth Factor-mediated Activation of the ETS Domain Transcription Factor Elk-1 Requires Nuclear Calcium. *J Biol Chem*. 2002;277(30):27517–27.

79. Bkaily G, Gros-Louis N, Naik R, Jaalouk D, Pothier P. Implication of the nucleus in excitation contraction coupling of heart cells. *Mol Cell Biochem.* 1996;154(2):113–21.
80. Bkaily G, D'Orléans-Juste P, Pothier P, Calixto J, Yunes R. Nuclear membrane receptors and channels: Potential therapeutical targets for drug action. *Drug Develop Res.* 1997;42(3–4):211–22.
81. Foskett J, White C, Cheung K, Mak D. Inositol Trisphosphate Receptor Ca<sup>2+</sup> Release Channels. *Physiol Rev.* 2007;87(2):593–658.
82. Bkaily G, Massaad D, Choufani S, Jacques D, D'Orléans-Juste P. Role of endothelin-1 receptors in the sarcolemma membrane and the nuclear membrane in the modulation of basal cytosolic and nuclear calcium levels in heart cells. *Clin Sci.* 2002;103(s2002):141S–7S.
83. Li S, Keung W, Cheng H, Li R. Structural and mechanistic bases of nuclear calcium signaling in human pluripotent stem cell-derived ventricular cardiomyocytes. *Stem Cells Int.* 2019;2019:1–17.
84. Marchenko S, Thomas R. Nuclear Ca<sup>2+</sup> signalling in cerebellar Purkinje neurons. *Cerebellum.* 2006;5(1):36–42.
85. Chorna T, Hasan G, Manko V. Store-operated Ca<sup>2+</sup>-entry into the secretory cells of *Drosophila melanogaster* larval salivary glands. *Studia Biologica.* 2009;3(1):45–56. [Ukrainian]
86. Khan A, Steiner J, Klein M, Schneider M, Snyder S. IP<sub>3</sub> receptor: localization to plasma membrane of T cells and cocapping with the T cell receptor. *Science.* 1992;257(5071):815–8.
87. Harzheim D, Movassagh M, Foo R, Ritter O, Tashfeen A, Conway S et al. Increased InsP<sub>3</sub>Rs in the junctional sarcoplasmic reticulum augment Ca<sup>2+</sup> transients and arrhythmias associated with cardiac hypertrophy. *PNAS.* 2009;106(27):11406–11.
88. Guatimosim S, Amaya M, Guerra M, Aguiar C, Goes A, Gómez-Viquez N et al. Nuclear Ca<sup>2+</sup> regulates cardiomyocyte function. *Cell Calcium.* 2008;44(2):230–42.

89. Avedanian L, Jacques D, Bkaily G. Presence of tubular and reticular structures in the nucleus of human vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;50(1):175–86.
90. Joseph S, Bokkala S, Boehning D, Zeigler S. Factors determining the composition of inositol trisphosphate receptor hetero-oligomers expressed in COS Cells. *J Biol Chem.* 2000;275(21):16084–90.
91. Joseph S, Lin C, Pierson S, Thomas A, Maranto A. Heterooligomers of type-I and type-III inositol trisphosphate receptors in WB rat liver epithelial cells. *J Biol Chem.* 1995;270(40):23310–6.
92. Monkawa T, Miyawaki A, Sugiyama T, Yoneshima H, Yamamoto-Hino M, Furuichi T et al. Heterotetrameric complex formation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subunits. *J Biol Chem.* 1995;270(24):14700–4.
93. Furuichi T, Yoshikawa S, Miyawaki A, Wada K, Maeda N, Mikoshiba K. Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400. *Nature.* 1989;342(6245):32–8.
94. Südhof T, Newton C, Archer B, Ushkaryov Y, Mignery G. Structure of a novel  $\text{InsP}_3$  receptor. *EMBO J.* 1991;10(11):3199–206.
95. Blondel O, Takeda J, Janssen H, Seino S, Bell G. Sequence and functional characterization of a third inositol trisphosphate receptor subtype, IP3R-3, expressed in pancreatic islets, kidney, gastrointestinal tract, and other tissues. *J. Biol. Chem.* 1993 May;268(15):11356–63.
96. Bosanac I, Michikawa T, Mikoshiba K, Ikura M. Structural insights into the regulatory mechanism of  $\text{IP}_3$  receptor. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1742(1–3):89–102.
97. Khan M, Wagner L, Yule D, Bhanumathy C, Joseph S. Akt kinase phosphorylation of Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *J Biol Chem.* 2005;281(6):3731–7.
98. De Souza N, Reiken S, Ondrias K, Yang Y, Matkovich S, Marks A. Protein Kinase A and two phosphatases are components of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor macromolecular signaling complex. *J Biol Chem.* 2002;277(42):39397–400.



99. Komalavilas P, Lincoln T. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem*. 1996;271(36):21933–8.
100. Vervloessem T, Yule D, Bultynck G, Parys J. The type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, emerging functions for an intriguing  $\text{Ca}^{2+}$ -release channel. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Mol Cell Res*. 2015;1853(9):1992–2005.
101. Newton C, Mignery G, Südhof T. Co-expression in vertebrate tissues and cell lines of multiple inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) receptors with distinct affinities for InsP3. *J. Biol. Chem*. 1994;269:28613–19.
102. Smedt H, Missiaen L, Parys JB, Bootman MD, Mertens L, Van Den Bosch L et al. Determination of relative amounts of inositol trisphosphate receptor mRNA isoforms by ratio polymerase chain reaction. *J. Biol. Chem*. 1994;269(34):21691–8.
103. Wojcikiewicz R. Type I, II, and III inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are unequally susceptible to down-regulation and are expressed in markedly different proportions in different cell types. *J Biol Chem*. 1995;270(19):11678–83.
104. Smedt H, Missiaen L, Parys J, Henning R, Sienaert I, Vanlingen S et al. Isoform diversity of the inositol trisphosphate receptor in cell types of mouse origin. *Biochem J*. 1997;322(2):575–83.
105. Ivanova H, Vervliet T, Missiaen L, Parys J, De Smedt H, Bultynck G. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-isoform diversity in cell death and survival. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(10):2164–83.
106. Kockskämper J, Zima A, Roderick H, Pieske B, Blatter L, Bootman M. Emerging roles of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;45(2):128–47.
107. Moschella M. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expression in cardiac myocytes. *J Cell Biol*. 1993;120(5):1137–46.
108. Lipp P, Laine M, Tovey S, Burrell K, Berridge M, Li W et al. Functional InsP3 receptors that may modulate excitation–contraction coupling in the heart. *Curr Biol*. 2000;10(15):939–42.

109. Zhou B, Hu S, Wang G. The analysis of ultrastructure and gene expression of sarco/endoplasmic reticulum calcium handling proteins in alloxan-induced diabetic rat myocardium. *Acta Cardiol.* 2006;61(1):21–7.
110. Arantes L, Aguiar C, Amaya M, Figueiró N, Andrade L, Rocha-Resende C et al. Nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate is a necessary and conserved signal for the induction of both pathological and physiological cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2012 Oct;53(4):475–86.
111. Dent M, Dhalla N, Tappia P. Phospholipase C gene expression, protein content, and activities in cardiac hypertrophy and heart failure due to volume overload. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 2004;287(2):H719–27.
112. Kawaguchi H, Sano H, Okada H, Iizuka K, Okamoto H, Kudo T et al. Increased calcium release from sarcoplasmic reticulum stimulated by inositol trisphosphate in spontaneously hypertensive rat heart cells. *Mol Cell Biochem.* 1993;119(1–2):51–7.
113. Zima A, Blatter L. Inositol-1,4,5-trisphosphate-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  signalling in cat atrial excitation-contraction coupling and arrhythmias. *J Physiol.* 2004;555(3):607–15.
114. Vetter I, Carter D, Bassett J, Deuis JR, Tay B, Jami S et al. High-throughput fluorescence assays for ion channels and GPCRs. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1131:27–72.
115. Zholos A, Komori S, Ohashi H, Bolton T.  $\text{Ca}^{2+}$  inhibition of inositol trisphosphate-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in single smooth muscle cells of guinea-pig small intestine. *J Physiol.* 1994;481(1):97-109.
116. Parys J, De Smedt H. Inositol 1,4,5-Trisphosphate and Its Receptors. *Adv Exp Med Biol.* 2012;740:255-79.
117. Südhof T, Newton C, Archer B, Ushkaryov Y, Mignery G. Structure of a novel InsP3 receptor. *EMBO J.* 1991;10(11):3199–206.
118. Iwai M, Michikawa T, Bosanac I, Ikura M, Mikoshiba K. Molecular Basis of the isoform-specific ligand-binding affinity of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *J Biol Chem.* 2007;282(17):12755–64.

119. Vanlingen S, Sipma H, De Smet P, Callewaert G, Missiaen L, De Smedt H et al.  $\text{Ca}^{2+}$  and calmodulin differentially modulate myo-inositol 1,4,5-trisphosphate ( $\text{IP}_3$ )-binding to the recombinant ligand-binding domains of the various  $\text{IP}_3$  receptor isoforms. *Biochem J.* 2000;346(2):275–80.
120. Growth and maintenance of insect cell lines USER GUIDE [Internet]. Tools.thermofisher.com. 2017 [cited 12 December 2019]. Available from: [http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Insect\\_Cell\\_Lines\\_UG.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Insect_Cell_Lines_UG.pdf)
121. Miyakawa T, Maeda A, Yamazawa T, Hirose K, Kurosaki T, Iino M. Encoding of  $\text{Ca}^{2+}$  signals by differential expression of  $\text{IP}_3$  receptor subtypes. *EMBO J.* 1999;18(5):1303–08.
122. Tu H, Wang Z, Nosyreva E, De Smedt H, Bezprozvanny I. Functional characterization of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms. *Biophys J.* 2005;88(2):1046–55.
123. Iino M. Biphasic  $\text{Ca}^{2+}$  dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced  $\text{Ca}$  release in smooth muscle cells of the guinea pig taenia caeci. *J Gen Physiol.* 1990;95(6):1103–22.
124. Finch E, Turner T, Goldin S. Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release. *Science.* 1991;252(5004):443–6.
125. Parys J, Sernett S, DeLisle S, Snyder P, Welsh M, Campbell K. Isolation, characterization, and localization of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor protein in *Xenopus laevis* oocytes, *J. Biol. Chem.* 1992 Sep;267(26):18776–82.
126. Tu H, Wang Z, Bezprozvanny I. Modulation of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms by calcium: a role of calcium sensor region. *Biophys J.* 2005;88(2):1056–69.
127. Ramos-Franco J, Fill M, Mignery G. Isoform-specific function of single inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channels. *Biophys J.* 1998;75(2):834–9.
128. Luo D, Yang D, Lan X, Li K, Li X, Chen J et al. Nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  sparks and waves mediated by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in neonatal rat cardiomyocytes. *Cell Calcium.* 2007;43(2):165-74.

129. Subedi K, Son M, Chidipi B, Kim S, Wang J, Kim K et al. Signaling pathway for Endothelin-1- and phenylephrine-induced cAMP response element binding protein activation in rat ventricular myocytes: role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and CaMKII. *Cell Physiol Biochem*. 2017;41(1):399–412.

130. Berridge M. The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease. *Physiol Rev*. 2016;96(4):1261–96.

131. Drawnel F, Wachten D, Molkentin J, Maillet M, Aronsen J, Swift F et al. Mutual antagonism between IP3RII and miRNA-133a regulates calcium signals and cardiac hypertrophy. *J Cell Biol*. 2012;199(5):783–98.

132. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg. 1986:48.

133. Wilkie G, Schirmer E. Purification of nuclei and preparation of nuclear envelopes from skeletal muscle. *Methods Mol Biol*. 2008;463:23–41.

134. Brewer O. Isolation of myogenic nuclei from whole muscle tissue. *Undergraduate Honors Theses*. 2015:954.

135. Nabbi A, Riabowol K. Isolation of Nuclei. *Cold Spring Harb Protoc*. 2015 Aug;2015(8):769–72.

136. Ikeda Y, Nakamura T, Takano H, Kimura H, Obata J, Takeda S et al. Angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy and cardiac fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Lab Clin Med*. 2000 Apr;135(4):353–9.

137. Bergmann O, Jovinge S. Isolation of cardiomyocyte nuclei from post-mortem tissue. *J Vis Exp*. 2012 Jul;(65): 4205.

138. Mak D, Vais H, Cheung K, Foskett J. Isolating nuclei from cultured cells for patch-clamp electrophysiology of intracellular Ca(2+) channels. *Cold Spring Harb Protoc*. 2013 Sep;2013(9):880–4.

139. Котик О, Котлярова А, Поліщук А, Павлова Н. Оптимізація умов ізолювання ядер кардіоміоцитів для реєстрації іонних каналів методом петч-клемп. *Матеріали XIV Міжнар. наук. конф. студ., аспір. та мол. вчених «Шевченківська весна 2016: біологічні науки»*; 2016 квіт. 6–8; Київ, Україна. Київ: КНУ ім. Тараса Шевченка; 2016, с. 120.

140. Котик О, Котлярова А, Марченко С. Оптимізація методу ізолювання ядер для електрофізіологічних досліджень іонних каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів щура. *Фізіол журн.* 2018;64(2):26–33.
141. Tirziu D, Giordano FJ, Simons M. Cell communications in the heart. *Circulation.* 2010;122(9):928–37.
142. Banerjee I, Fuseler J, Price R, Borg T, Baudino T. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293(3):H1883–91.
143. Zhou P, Pu W. Recounting cardiac cellular composition. *Circ Res.* 2016 Feb;118(3):368–70.
144. Verkhatsky A, Krishtal O, Petersen O. From Galvani to patch clamp: the development of electrophysiology. *Pflügers Archiv.* 2006;453(3):233–47.
145. Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature.* 1976;260(5554):799-802.
146. Kostyuk P, Krishtal O, Pidoplichko V. Effect of internal fluoride and phosphate on membrane currents during intracellular dialysis of nerve cells. *Nature.* 1975 Oct 23;257(5528):691–3.
147. Kotliarova A, Kotyk O, Pavlova N, Marchenko S. Kanał chlorowy o wysokiej przewodności w membranie jądrowej kardiomiocytów. International research and practice conference Modern methodologies, innovations, and operational experience in the field of biological science: Conference Proceedings; 2017 Dec. 27–28; Lublin, Poland. Lublin: Izdevnieciba “Baltija Publishing”; 2017. p. 81–4.
148. Котлярова А, Котик О, Марченко С. Рідкісні іонні канали ядерної мембрани кардіоміоцитів. Матеріали XVII Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених «Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини»; 2018 груд. 6–7; Львів, Україна. *Біологія тварин.* 2018;20(4):119.
149. Wagner II L, Yule D. Differential regulation of the InsP<sub>3</sub>Receptor type-1 and -2 single channel properties by InsP<sub>3</sub>, Ca<sup>2+</sup> and ATP. *J Physiol.* 2012;590(14):3245–59.

150. Zima A, Bare D, Mignery G, Blatter L. IP<sub>3</sub>-dependent nuclear Ca<sup>2+</sup> signalling in the mammalian heart. *J Physiol.* 2007;584(2):601–11.

151. Kotliarova A, **Kotyk O**, Polishchuk A, Marchenko S. Identification of ion channels in the nuclear envelope of cardiomyocytes. Abstracts of reports of the XV All-Ukrainian Scientific and Practical Conference of Young Scientists Young scientists in solution of actual problems of biology, animal husbandry and veterinary medicine; 2016 Dec. 8–9; Lviv, Ukraine. *Біологія тварин.* 2016 Dec;18(4):157.

152. Котлярова А, Котик О, Поліщук А, Павлова Н, Марченко С. Іонні канали ядерної мембрани кардіоміоцитів. Міжнар. наук.-практ. конф. «Актуальні питання розвитку біології та екології»; 2016 жовт. 3–7; Вінниця, Україна. Вінниця: ДНУ ім. Василя Стуса; 2016, с. 245–8.

153. Котик О, Котлярова А, Поліщук А, Плечій М, Хомин М, Марченко С. Ідентифікація високопровідних катіонних каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів. Збірник тез XII Міжнар. наук. конф. студ. та аспір. «Молодь і поступ біології»; 2016 квіт. 19–21; Львів, Україна. Львів: ЛНУ ім. Івана Франка; 2016, с. 299–300.

154. Котик О, Котлярова А, Поліщук А, Марченко С. Іонні струми поодиноких каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів щура. *Фізіол журн.* 2016;62(6):3–8.

155. Котик О, Котлярова А, Марченко С. Ідентифікація іонних каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів. матеріали IV Міжнар. наук. конф. «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології»; 2017 жовт. 5–6; Дніпро, Україна. Дніпро: «Ліра», 2017, с. 89–90.

156. Wonnacott S. Nicotinic ACh Receptors. *Toxicol Rev.* 2014;1–32.

157. Chen R, Chung S. Mechanism of tetrodotoxin block and resistance in sodium channels. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;446(1):370-4.

158. Котик О, Котлярова А, Ісаєва О, Марченко С. Вплив деяких анестетиків та природних отрут на функціонування LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів та нейронів пуркіньє мозочка. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія.* 2019;3(79):43–8.

159. Tsetlin V, Shelukhina I, Kryukova E, Burbaeva G, Starodubtseva L, Skok M et al. Detection of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors with the aid of antibodies and toxins. *Life Sci.* 2007;80(24–25):2202–05.

160. Чекман І, Горчакова Н, Туманов В. та ін. Фармакологія. Підручник. Київ: Вища школа, 2001. 598 с.: іл. — ISBN 966-642-057-0.

161. Tubocurarine [Internet]. Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. 2005 [cited 28 January 2020]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/d-tubocurarine>

162. Atracurium [Internet]. Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. 2005 [cited 28 January 2020]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Atracurium>

163. Vandembrom R, Wierda J, Agoston S. pharmacokinetics and neuromuscular blocking effects of atracurium besylate and two of its metabolites in patients with normal and impaired renal function. *Clin Pharmacokin.* 1990;19(3):230–40.

164. Котик О, Котлярова А, Павлова Н, Марченко С. Вплив блокаторів на високопровідні катіонні канали в ядерній мембрані. *Нейрофізіологія.* 2017;49(2):159–61.

165. Котик О, Павлова Н, Хомин М, Котлярова А, Марченко С. Вплив атракуріума на LCC-канали ядерної мембрани. Збірник тез XV Міжнар. наук. конф. студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки»; 2017 квіт. 18-21; Київ, Україна. Київ: КНУ ім. Тараса Шевченка; 2017, с. 22–3.

166. Котик О, Котлярова А, Хомин М, Скок М, Марченко С. Вплив агоністів та інгібіторів N-холінорецепторів на функціонування LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів. Тези VIII Міжнар. наук. конф., присвяченої 175-річчю кафедри фізіології та анатомії людини та тварин Київського нац. унів. імені Тараса «Шевченка Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології»; 2017 жовт. 17–20; Київ, Україна. Київ; 2017, с. 61.

167. Jepsen T, Jensen A, Lund M, Glibstrup E, Kristensen J. Synthesis and pharmacological evaluation of DH $\beta$ E analogues as neuronal nicotinic acetylcholine receptor antagonists. *ACS Med Chem Lett.* 2014 Jul;5(7):766–70.

168. Котик О, Котлярова А, Скок М, Марченко С. Функціонування ЛСС-каналів ядерної мембрани за дії блокаторів та агоністів N-холінорецепторів. Матеріали XX з'їзду Українського фізіологічного товариства ім. П. Г. Костюка з міжнар. участю; 2019 трав. 27–30; Київ, Україна. Фізіол журн. 2019;65(3):28–9.

169. Kárpáti E, Bíró K. Pharmacologic effects of pipecuronium bromide (Arduan). *Acta Pharm Hung.* 1992 May;62(3):121–6. [Hungarian].

170. Pipecuronium bromide [Internet]. Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. 2005 [cited 2 February 2020]. Available from:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pipecuronium-bromide>

171. Rocuronium bromide [Internet]. Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. 2005 [cited 28 January 2020]. Available from:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rocuronium-bromide>

172. Котлярова А, Котик О, Юришинець І, Марченко С. Функціонування катіонних каналів великої провідності ядерної мембрани кардіоміоцитів та нейронів Пуркіньє мозочка під впливом модуляторів нікотинових холінорецепторів. Фізіол журн. 2019;65(6):30–7.

173. Skok M, Gergalova G, Lykhmus O, Kalashnyk O, Koval L, Uspenska K. Nicotinic acetylcholine receptors in mitochondria: subunit composition, function and signalling. *Neurotransmitter.* 2016;3(e1290):1–12.

174. Absalom N, Quek G, Lewis T, Qudah T, Arenstorff I, Ambrus J. Covalent trapping of methyllycaconitine at the  $\alpha 4$ - $\alpha 4$  interface of the  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem.* 2013 Sep;288(37):26521–32.

175. 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. *Br J Pharm.* 2004;142(8):1227–32.

176. Methyllycaconitine [Internet]. Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. 2005 [cited 4 February 2020]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5288811>

177. Daly N, Callaghan B, Clark R, Nevin S, Adams D, Craik D. Structure and activity of  $\alpha$ -Conotoxin PeIA at nicotinic acetylcholine receptor subtypes and GABA<sub>B</sub> receptor-coupled N-type calcium channels. *J Biol Chem.* 2011 Mar;286(12):10233–7.



178. McIntosh J, Plazas P, Watkins M, Gomez-Casati M, Olivera B, Elgoyhen A. A Novel  $\alpha$ -Conotoxin, PeIA, cloned from *Conus pergrandis*, discriminates between Rat  $\alpha 9\alpha 10$  and  $\alpha 7$  nicotinic cholinergic receptors. *J Biol Chem*. 2005;280(34):30107–12.

179. Suxamethonium chloride [Internet]. Chemspider.com. 2020 [cited 11 February 2020]. Available from: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.21080.html>

180. Котик О, Котлярова А, Павлова Н, Марченко С. Вплив блокаторів на високопровідні катіонні канали ядерної мембрани. Матеріали VII Конгресу Українського товариства нейронаук; 2017 черв. 7–11; Київ, Україна. Київ; 2017, с. 93.

181. Hexamethonium [Internet]. Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. 2005 [cited 29 January 2020]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hexamethonium>

182. Котик О, Павлова Н, Тагаві С, Скок М, Котлярова А, Марченко С. Вплив десформилфлустраброміну (dFBr) на функціонування LCC-каналів ядерної мембрани. Збірник тез XVI Міжнар. наук. конф. студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки»; 2018 квіт. 24–7; Київ, Україна. Київ; 2018. с. 33–5.

183. Bürgi J, Awale M, Boss S, Schaer T, Marger F, ViverosParedes J et al. Discovery of potent positive allosteric modulators of the  $\alpha 3\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptor Матеріал надійшов до редакції 12.09.2019 by a chemical space walk in ChEMBL. *ACS Chem Neurosci*. 2014 May;5(5):346–59.

184. Nicotine [Internet]. Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. 2004 [cited 4 February 2020]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nicotine>

185. Bootman M, Fearnley C, Smyrnias I, MacDonald F, Roderick H. An update on nuclear calcium signalling. *J Cell Science*. 2009;122(14):2337–50.

186. De Mello W, Danser A. Angiotensin II and the Heart. *Hypertension*. 2000;35(6):1183-1188.

187. Li X, Zima A, Sheikh F, Blatter L, Chen J. Endothelin-1–Induced arrhythmogenic  $Ca^{2+}$  signaling is abolished in atrial myocytes of Inositol-1,4,5-

Trisphosphate(IP<sub>3</sub>)–Receptor Type 2–Deficient Mice. *Circul Res.* 2005;96(12):1274–1281.

188. Nakao S, Wakabayashi S, Nakamura T. Stimulus-dependent regulation of nuclear Ca<sup>2+</sup> signaling in cardiomyocytes: a role of neuronal calcium sensor-1. *PLOS ONE.* 2015;10(4):e0125050.

189. Bootman M, Collins T, Mackenzie L, Roderick H, Berridge M, Peppiatt C. 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry but an inconsistent inhibitor of InsP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release. *FASEB J.* 2002;16(10):1145–50.

190. Lemonnier L, Prevarskaya N, Mazurier J, Shuba Y, Skryma R. 2-APB inhibits volume-regulated anion channels independently from intracellular calcium signaling modulation. *FEBS Lett.* 2004 Jan;556(1–3):121–6.

191. Pavlova N, Kotyk O, Kotliarova A, Marchenko S. Ion channels in the nuclear envelope of cardiomyocytes. International PhD student symposium and career fair for life sciences 15th horizons in molecular biology; 2018 Sept 10–13; Göttingen, Germany. Gottingen: Cuvillier; 2018, p. 72.

192. Kotyk O, Kotliarova A, Polishchuk A, Marchenko S. The properties of ion channels in the nuclear envelope of cardiomyocytes. 2<sup>nd</sup> Conference for Young Scientists of the Division of Biochemistry, Physiology and Molecular Biology National Academy of Sciences of Ukraine; 2017 June 6–9; Kyiv, Ukraine. *Ukr Biochem J*; 2017. p. 119.

193. Pavlova N, Kotyk O, Kotliarova A, Marchenko S. Potential-dependence of the functioning of the IP<sub>3</sub>Rs in the native nuclear envelope of cardiomyocytes. XIII IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists; 2019 May 22–25; Kyiv, Ukraine. *Biopolymers and Cell.* 2019;35(5):405.

194. Котик О, Котлярова А, Марченко С. Властивості IP<sub>3</sub>-рецепторів та LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів. Матеріали чергового VIII з'їзду Українського біофізичного товариства; 2019 листоп. 12–15; Київ-Луцьк, Україна. Київ. 2019. с. 19.

195. Котик О, Котлярова А, Марченко С. Властивості  $IP_3$ -рецепторів та LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів. Матеріали чергового VIII з'їзду Українського біофізичного товариства; 2019 листоп. 12–15; Київ-Луцьк, Україна. Київ. 2019. с. 19.
196. Котлярова А, Котик О, Марченко С. Властивості інозитол-1,4,5-трифосфатних рецепторів нативної ядерної мембрани кардіоміоцитів. Матеріали тематичного VII з'їзду Українського біофізичного товариства; 2018 жовт. 29–31; Київ, Україна. Київ; 2018, с. 28.
197. Kotliarova A, Kotyk O, Pavlova N, Kalnytska O, Kudriashova M, Marchenko S.  $IP_3$ Rs and LCC-channels coexpression in cardiomyocytes' nuclear membrane. Materials of XII annual conference of young scientists institute of molecular biology and genetics NAS of Ukraine; 2018 May 15–16; Kyiv; Ukraine. Biopolymers Cell. 2018;34(2):143–67.
198. Котик О, Павлова Н, Поліщук А, Котлярова А, Марченко С. Властивості LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів. Збірник тез XIII Міжнар. наук. конф. студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»; 2017 квіт. 25–27; Львів, Україна. Львів: ЛНУ ім. Івана Франка; 2017, с. 13–4.
199. Berridge M. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signal organelle. Cell Calcium. 2002;32(5-6):235–49.
200. Fedorenko O, Marchenko S. The voltage-dependence of the intracellular ion channels of neurons a new mechanism of  $Ca^{2+}$  signal regulation. Reports Nat Acad Sci Ukr. 2012;10:160–4.
201. Leite M, Thrower E, Echevarria W, Koulen P, Hirata K, Bennett A et al. Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. Proc Nat Acad Sci. 2003;100(5):2975–80.
202. Wu X, Zhang T, Bossuyt J, Li X, McKinsey T, Dedman J et al. Local  $InsP_3$ -dependent perinuclear  $Ca^{2+}$  signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. J Clin Invest. 2006;116(3):675–82.

203. Hohendanner F, McCulloch A, Blatter L, Michailova A. Calcium and IP<sub>3</sub> dynamics in cardiac myocytes: experimental and computational perspectives and approaches. *Front Pharmacol.* 2014;5:35.

204. Roderick H, Bootman M. Bi-directional signalling from the InsP<sub>3</sub> receptor: regulation by calcium and accessory factors. *Biochem Soc Trans.* 2003;31(5):950–3.

205. Woodcock E, Matkovich S. Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> receptors and inositol phosphates in the heart—evolutionary artefacts or active signal transducers?. *Pharm Therap.* 2005;107(2):240–51.

206. Cooling M, Hunter P, Crampin E. Modeling hypertrophic IP<sub>3</sub> transients in the cardiac myocyte. *Biophys J.* 2007;93(10):3421–33.

207. Cardenas C. Nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate receptors regulate local Ca<sup>2+</sup> transients and modulate cAMP response element binding protein phosphorylation. *J Cell Sci.* 2005;118(14):3131–40.

## ДОДАТОК 1

### СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

#### **В яких опубліковані основні наукові результати дисертації:**

1. Котлярова АБ, Котик ОА, Юришинець ІВ, Марченко СМ. Функціонування катіонних каналів великої провідності ядерної мембрани кардіоміоцитів та нейронів Пуркінє мозочка під впливом модуляторів нікотинових холінорецепторів. *Фізіол журн.* 2019;65(6):30–7. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні частини експериментальних досліджень, статистичному опрацюванні отриманих даних).*

2. Котик ОА, Котлярова АБ, Ісаєва ОВ, Марченко СМ. Вплив деяких анестетиків та природних отрут на функціонування LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів та нейронів Пуркінє мозочка. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія.* 2019;3(79):43–8. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні частини лабораторних досліджень, аналізі результатів досліджень, оформленні публікації).*

3. Котик ОА, Котлярова АМ, Марченко СМ. Оптимізація методу ізолювання ядер для електрофізіологічних досліджень іонних каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів щура. *Фізіол журн.* 2018;64(2):26–33. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальної частини досліджень, статистичному опрацюванні отриманих даних, підготовці ілюстративного матеріалу).*

4. Котик ОА, Котлярова АБ, Павлова НІ, Марченко СМ. Вплив блокаторів на високопровідні катіонні канали в ядерній мембрані. *Нейрофізіологія.* 2017;49(2):159–61. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальної частини досліджень, формулюванні висновків, написанні публікації).*

5. Котик ОА, Котлярова АБ, Поліщук АО, Марченко СМ. Іонні струми поодиноких каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів щура. *Фізіол журн.*

2016;62(6):3–8. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні частини експериментальних досліджень та аналізі їх результатів).*

**Які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

1. **Котик О**, Котлярова А, Марченко С. Властивості  $IP_3$ -рецепторів та LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів. Матеріали чергового VIII з'їзду Українського біофізичного товариства; 2019 листоп. 12–15; Київ-Луцьк, Україна. Київ. 2019. с. 19. *Публікація тез, усна доповідь*

2. **Котик О**, Котлярова А, Скок М, Марченко С. Функціонування LCC-каналів ядерної мембрани за дії блокаторів та агоністів N-холінорецепторів. Матеріали XX з'їзду Українського фізіологічного товариства ім. П. Г. Костюка з міжнар. участю; 2019 трав. 27–30; Київ, Україна. *Фізіол журн.* 2019;65(3):28–9. *Публікація тез, усна доповідь*

3. Pavlova N, **Kotyk O**, Kotliarova A, Marchenko S. Potential-dependence of the functioning of the  $IP_3$ Rs in the native nuclear envelope of cardiomyocytes. XIII IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists; 2019 May 22–25; Kyiv, Ukraine. *Biopolymers and Cell.* 2019;35(5):405. *Публікація тез, усна доповідь*

4. Kotliarova A, **Kotyk O**, Rybachuk O, Sotkis A, Dyskina Yu, Marchenko S.  $IP_3$ Rs in the nuclear envelope - an electrophysiological and immunohistochemical confirmation. “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology – 2019”; 2019 Mar 21–22; Kyiv, Ukraine. Kyiv; 2019. p. 16. *Публікація тез, усна доповідь*

5. Котлярова А, **Котик О**, Марченко С. Рідкісні іонні канали ядерної мембрани кардіоміоцитів. Матеріали XVII Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених «Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини»; 2018 груд. 6–7; Львів, Україна. *Біологія тварин.* 2018;20(4):119.

6. Котлярова А, **Котик О**, Марченко С. Властивості інозитол-1,4,5-трифосфатних рецепторів нативної ядерної мембрани кардіоміоцитів. Матеріали тематичного VII з'їзду Українського біофізичного товариства; 2018 жовт. 29–31; Київ, Україна. Київ; 2018, с. 28. *Публікація тез, постерна доповідь*

7. Pavlova N, **Kotyk O**, Kotliarova A, Marchenko S. Ion channels in the nuclear envelope of cardiomyocytes. International PhD student symposium and career fair for life sciences 15th horizons in molecular biology; 2018 Sept 10–13; Göttingen, Germany. Göttingen: Cuvillier; 2018, p. 72. *Публікація тез, усна доповідь*

8. Kotliarova A, **Kotyk O**, Pavlova N, Kalnytska O, Kudriashova M, Marchenko S. IP<sub>3</sub>Rs and LCC-channels coexpression in cardiomyocytes' nuclear membrane. Materials of XII annual conference of young scientists institute of molecular biology and genetics NAS of Ukraine; 2018 May 15–16; Kyiv; Ukraine. Biopolymers Cell. 2018;34(2):143–67. *Публікація тез, усна доповідь*

9. **Котик О**, Павлова Н, Тагаві С, Скок М, Котлярова А, Марченко С. Вплив десформилфлустраброміну (dFBr) на функціонування LCC-каналів ядерної мембрани. Збірник тез XVI Міжнар. наук. конф. студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки»; 2018 квіт. 24–7; Київ, Україна. Київ; 2018. с. 33–5. *Публікація тез, усна доповідь*

10. Kotliarova A, **Kotyk O**, Pavlova N, Marchenko S. Kanał chlorowy o wysokiej przewodności w membranie jądrowej kardiomiocytów. International research and practice conference Modern methodologies, innovations, and operational experience in the field of biological science: Conference Proceedings; 2017 Dec. 27–28; Lublin, Poland. Lublin: Izdevnieciba “Baltija Publishing”; 2017. p. 81–4. *Публікація тез*

11. **Котик О**, Котлярова А, Хомин М, Скок М, Марченко С. Вплив агоністів та інгібіторів N-холінорецепторів на функціонування LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів. Тези VIII Міжнар. наук. конф., присвяченої 175-річчю кафедри фізіології та анатомії людини та тварин Київського нац. унів. імені Тараса «Шевченка Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології»; 2017 жовт. 17–20; Київ, Україна. Київ; 2017, с. 61. *Публікація тез, усна доповідь*

12. **Котик О**, Котлярова А, Марченко С. Ідентифікація іонних каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів. матеріали IV Міжнар. наук. конф. «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології»; 2017 жовт. 5–6; Дніпро, Україна. Дніпро: «Ліра», 2017, с. 89–90. *Публікація тез, усна доповідь*

13. **Котик О**, Котлярова А, Павлова Н, Марченко С. Вплив блокаторів на високопровідні катіонні канали ядерної мембрани. Матеріали VII Конгресу Українського товариства нейронаук; 2017 черв. 7–11; Київ, Україна. Київ; 2017, с. 93. *Публікація тез, постерна доповідь*

14. **Kotyк O**, Kotliarova A, Polishchuk A, Marchenko S. The properties of ion channels in the nuclear envelope of cardiomyocytes. 2<sup>nd</sup> Conference for Young Scientists of the Division of Biochemistry, Physiology and Molecular Biology National Academy of Sciences of Ukraine; 2017 June 6–9; Kyiv, Ukraine. Ukr Biochem J; 2017. p. 119. *Публікація тез, постерна доповідь*

15. **Котик О**, Павлова Н, Поліщук А, Котлярова А, Марченко С. Властивості LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів. Збірник тез XIII Міжнар. наук. конф. студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»; 2017 квіт. 25–27; Львів, Україна. Львів: ЛНУ ім. Івана Франка; 2017, с. 13–4. *Публікація тез, усна доповідь*

16. **Котик О**, Павлова Н, Хомин М, Котлярова А, Марченко С. Вплив атракуріума на LCC-канали ядерної мембрани. Збірник тез XV Міжнар. наук. конф. студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки»; 2017 квіт. 18-21; Київ, Україна. Київ: КНУ ім. Тараса Шевченка; 2017, с. 22–3. *Публікація тез, усна доповідь*

17. Kotliarova A, **Kotyк O**, Polishchuk A, Marchenko S. Identification of ion channels in the nuclear envelope of cardiomyocytes. Abstracts of reports of the XV All-Ukrainian Scientific and Practical Conference of Young Scientists Young scientists in solution of actual problems of biology, animal husbandry and veterinary medicine; 2016 Dec. 8–9; Lviv, Ukraine. Біологія тварин. 2016 Dec;18(4):157. *Публікація тез, усна доповідь*

18. Котлярова А, **Котик О**, Поліщук А, Павлова Н, Марченко С. Іонні канали ядерної мембрани кардіоміоцитів. Міжнар. наук.-практ. конф. «Актуальні питання розвитку біології та екології»; 2016 жовт. 3–7; Вінниця, Україна. Вінниця: ДНУ ім. Василя Стуса; 2016, с. 245–8. *Публікація тез, усна доповідь*



19. **Котик О**, Котлярова А, Поліщук А, Плечій М, Хомин М, Марченко С. Ідентифікація високопровідних катіонних каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів. Збірник тез XII Міжнар. наук. конф. студ. та аспір. «Молодь і поступ біології»; 2016 квіт. 19–21; Львів, Україна. Львів: ЛНУ ім. Івана Франка; 2016, с. 299–300. *Публікація тез, усна доповідь*

20. **Котик О**, Котлярова А, Поліщук А, Павлова Н. Оптимізація умов ізолювання ядер кардіоміоцитів для реєстрації іонних каналів методом петч-клемп. Матеріали XIV Міжнар. наук. конф. студ., аспір. та мол. вчених «Шевченківська весна 2016: біологічні науки»; 2016 квіт. 6–8; Київ, Україна. Київ: КНУ ім. Тараса Шевченка; 2016, с. 120. *Публікація тез, усна доповідь*