

АНОТАЦІЯ

Надтока С.О. Модуляція високопровідних катіонних каналів ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка щурів лігандами адренергічних і холінергічних рецепторів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 09 – «Біологія» за спеціальністю 091 – «Біологія». – Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2026.

Ядра еукаріотичних клітин оточені двошаровою оболонкою, яка складається із зовнішньої та внутрішньої мембран. Крім структурних білків і ядерних пор, у складі ядерної мембрани можна відзначити наявність інозитол-трифосфатних (IP_3R) та ріанодинових каналів (RyR), Ca^{2+} -АТФази, а також калієві та хлорні канали. Опосередковане IP_3R та RyR вивільнення Ca^{2+} з клітинних депо, зокрема, з ендоплазматичного ретикулуму (ЕПР) та перинуклеарного простору, об'єднаних між собою, супроводжується зміною електрохімічного градієнту та наближенням мембранного потенціалу ЕПР до рівноважного потенціалу Ca^{2+} , що протидіє подальшому вивільненню цих іонів. Компенсація зміни заряду мембрани під час руху Ca^{2+} із депо забезпечується одночасним током позитивно заряджених іонів у протилежному напрямку, всередину ретикулуму та перинуклеарного простору. Водночас, попри важливість такого протитоку для Ca^{2+} -опосередкованої внутрішньоклітинної сигналізації, на даний момент залишається дискусійним, які канали його забезпечують. На їх роль було запропоновано тримерні внутрішньоклітинні катіонні канали (TRIC-канали) та високопровідні катіонні канали (LCC-канали). При цьому TRIC-канали є майже непровідними до іонів Cs^+ , що ставить під сумнів їх участь у створенні протитоку позитивних іонів у експериментах із вивільненням Ca^{2+} у середовищі із заміною K^+ в цитозолі на Cs^+ . LCC-канали, водночас, є провідними як до K^+ , так і до Cs^+ , що дозволяло б їм забезпечувати

компенсаторний струм у цих умовах. Крім цього, щільність розташування LCC-каналів у ядерній мембрані корелює зі щільністю IP_3R , додатково наштовхуючи на думку про їх коекспресію та пов'язаність функцій.

Однак, попри можливу участь LCC-каналів у вивільненні Ca^{2+} з клітинних депо, особливості функціонування та модуляції цих каналів залишаються маловивченими. Раніше було показано, що такі н-холіномодулятори, як нікотин та нейротоксин II, можуть проявляти інгібувальний ефект щодо LCC-каналів, тож науковий інтерес становить перевірка того, чи притаманна подібна дія і іншим сполукам цього класу, а також чи є ця здатність унікальною саме для холіномодуляторів, що могло б наштовхувати на припущення про подібність регуляції холінорецепторів і LCC-каналів, чи спостерігається також і в сполук, що належать до інших класів.

Із урахуванням зазначеного, метою цієї роботи було охарактеризувати вплив адреномодуляторів, а також модуляторів нікотинових та мускаринових холінорецепторів на LCC-канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка щурів. Відповідно до наведеної мети, було поставлено завдання дослідити електрофізіологічні властивості LCC-каналів за дії модуляторів нікотинових і мускаринових холінорецепторів, адренорецепторів, а також порівняти вплив досліджених сполук і визначити, які речовини є найбільш ефективними модуляторами LCC-каналів. Об'єктом дослідження були LCC-канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка щурів лінії *Wistar*, а предметом дослідження – електрофізіологічні характеристики LCC-каналів під впливом модуляторів холіно- та адренорецепторів.

Основним методом досліджень був patch clamp у конфігурації nucleus attached та в режимі voltage clamp. Значення потенціалу ядерної мембрани фіксували по чергово при -40 мВ, $+40$ мВ, -60 мВ та $+60$ мВ, та реєстрували іонний струм, що проходив крізь петч-ділянку. На підставі отриманих реєстрацій визначали такі параметри електрофізіологічної активності LCC-каналів, як амплітуда іонного струму крізь них, та їх ймовірність перебування у відкритому стані (P_o) за вказаних значень мембранного потенціалу в умовах

контролю та при додаванні мекаміламін гідрохлориду, ацетилхолін хлориду, карбахолін хлориду, панкуроній броміду, векуроній броміду, атропін сульфату, пілокарпін гідрохлориду, платифілін гідротартату, норепінефрин гідрохлориду, епінефрин гідрохлориду, пропранолол гідрохлориду та ізопреналін гідрохлориду.

Згідно з проведеними дослідженнями було встановлено, що з-поміж вивчених модуляторів нікотинових холінорецепторів (мекаміламін, ацетилхолін, карбахолін, панкуроній, векуроній) найбільш виражене зниження амплітуди струму крізь LCC-канали за умови додавання речовини до ванночки має векуроній (зниження параметру на 50,9% при -60 мВ), а при додаванні через петч-піпетку – ацетилхолін (зниження на 25,4% при -40 мВ). Найефективніше зменшує ймовірність відкритого стану цих каналів при додаванні у ванночку мекаміламін (на 44,9% при -40 мВ), а при застосуванні речовин через петч-піпетку жодна зі сполук не знижує значення цього параметру, тоді як ацетилхолін його підвищує (на 106,7% при -60 мВ). Серед вивчених модуляторів мускаринових холінорецепторів (атропін, платифілін, пілокарпін) найефективніше знижує амплітуду струму крізь LCC-канали атропін як при додаванні до ванночки (на 19,8% при -40 мВ), так і до петч-піпетки (на 23,5% при +40 мВ), водночас при аплікації через петч-піпетку платифілін підвищує значення цього параметру (на 20,9% при -40 мВ). Найбільшою мірою P_o LCC-каналів зменшується при додаванні платифіліну у ванночку (на 52,6% при -40 мВ), та пілокарпіну при аплікації розчину сполуки через петч-піпетку (на 68,3% при -40 мВ). Найефективніше зниження амплітуди струму крізь LCC-канали при використанні адреномодуляторів (норепінефрин, епінефрин, пропранолол, ізопреналін) за їх додавання у ванночку спостерігається при застосуванні ізопреналіну (на 52,7% при -60 мВ). Зменшення P_o LCC-каналів при цьому найбільшою мірою зумовлює норепінефрин (на 53,8% при -40 мВ), водночас ізопреналін є єдиною сполукою цього класу, яка підвищує значення вказаного параметра (на 72,7% при -60 мВ). Крім цього, вплив мекаміламіну, атропіну та ізопреналіну на LCC-

канали супроводжується ефектом миготіння цих каналів, особливо вираженим за дії ізопреналіну.

Підсумовуючи і порівнюючи сполуки різних класів між собою, можна констатувати, що з-поміж усіх досліджених речовин найефективніше зменшує амплітуду струму крізь LCC-канали при додаванні у ванночку зі зразком векуроній бромід та ізопреналін, а при додаванні речовини у піпетку – ацетилхолін. Зниження ймовірності відкритого стану цих каналів при додаванні речовини у ванночку є найбільш вираженим при використанні норепінефрину, а при додаванні розчину через піпетку – при використанні пілокарпіну. В той же час підвищення амплітуди струму при додаванні речовини до ванночки спостерігається лише при використанні мекаміламіну, а при додаванні до піпетки – лише платифіліну. Збільшує P_o LCC-каналів при додаванні до ванночки тільки ізопреналін, а при застосуванні через петч-піпетку – тільки ацетилхолін.

Отримані результати роблять можливим підбір модуляторів LCC-каналів відповідно до визначеного завданнями майбутніх досліджень цільового ефекту, розкривають специфічність їх регуляції залежно від сторони мембрани, що може свідчити про гетерогенність будови LCC-каналів з внутрішньоядерного та перинуклеарного боків, а також закладають основу для майбутнього аналізу закономірностей хімічної будови, які забезпечують здатність сполук модулювати окремі властивості цих каналів.

Ключові слова: іонні канали, patch clamp, модуляція, електрична активність, нейрони, кальцієва сигналізація, потенціал-залежний струм, ядерна мембрана, електрофізіологія, модулятори холінорецепторів, модулятори адренорецепторів.

SUMMARY

Nadtoka S.O. Modulation of Large-Conductance Cation Channels in the Nuclear Membrane of Rat Cerebellar Purkinje Neurons by Adrenergic and Cholinergic Receptor Ligands. – Qualification scientific work, the manuscript.

Thesis for a Philosophy Doctor degree in the field of knowledge 09 – “Biology”, specialization 091 – “Biology”. – Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv, 2026.

Eucaryotic cells' nuclei are enclosed by a two-layer envelope, which consists of the outer and the inner nuclear membranes. Besides structural proteins and nuclear pores, inositol triphosphate (IP₃Rs) and ryanodine receptors (RyRs), Ca²⁺-ATPases, potassium, and chloride channels can also be present in the nuclear membrane. IP₃R- and RyR-mediated Ca²⁺ release from the cellular stores, specifically from the interconnected endoplasmic reticulum (ER) and perinuclear space, is accompanied by the change of the electrochemical gradient, shifting the membrane potential of ER to the Ca²⁺ equilibrium potential and hindering further release of these ions. Compensation of the charge changes during the movement of Ca²⁺ from the stores is provided by the simultaneous flow of positively charged ions in the opposite direction, into the reticulum and perinuclear space. At the same time, despite the importance of this countercurrent for Ca²⁺-mediated intracellular signaling, it is still debatable which channels may provide it. Trimeric intracellular cation channels (TRIC-channels) and large-conductance cation channels (LCC-channels) were proposed for this role. However, TRIC-channels are almost nonconductive to Cs⁺ ions, making their involvement in the cation countercurrent arguable in the experiments where Ca²⁺ release was observed under conditions in which cytosolic K⁺ was substituted with Cs⁺. LCC-channels, meanwhile, are conductive for both K⁺ and Cs⁺, allowing these channels to provide compensatory current under the described conditions. Moreover, the density of LCC-channels in the nuclear membrane corresponds with the density of IP₃R, suggesting the possibility of coexpression and functional connection.

But, despite the probable involvement of LCC-channels in Ca^{2+} release from the intracellular stores, the functioning and modulation of these channels remain understudied. It was previously shown that such n-choline receptor modulators as nicotine and neurotoxin II exhibit an inhibitory influence on LCC-channels, thus, there is a scientific interest in verifying whether such effect is intrinsic to the other compounds of this class, and whether this feature is unique to cholinergic receptor modulators, which could suggest possible similarities in regulation of cholinergic receptors and LCC-channels, or it may be found among the compounds that belong to other classes too.

Taking it into account, this study aims to assess the impact of adrenergic, as well as nicotinic and muscarinic cholinergic receptor modulators on LCC-channels of the nuclear membrane of the rats' cerebellar Purkinje neurons. In accordance with this goal, the tasks were set to study the electrophysiological properties of LCC-channels under the effects of nicotinic and muscarinic cholinergic receptor modulators, adrenergic receptor modulators, to compare the influence of the studied substances, and to identify the most effective LCC-channels modulators. The objects of the study were LCC-channels of the nuclear membrane of *Wistar* rat's Purkinje neurons, and the subject of the study – electrophysiological properties of LCC-channels under the impact of cholinergic and adrenergic receptor modulators.

The main method employed in the study was patch clamp technique in the nucleus attached configuration and voltage clamp mode. The nuclear membrane potential was consecutively fixed at -40 mV, +40 mV, -60 mV and +60 mV, and the currents through the patch site were recorded. Such parameters of the electrophysiological activity of LCC-channels as the current amplitude and the probability of the channels being in an open state (P_o) were evaluated at the aforementioned membrane potentials under control conditions and after the application of mecamylamine hydrochloride, acetylcholine chloride, carbachol chloride, pancuronium bromide, vecuronium bromide, atropine sulfate, pilocarpine hydrochloride, platyphylline hydrochloride, norepinephrine hydrochloride,

epinephrine hydrochloride, propranolol hydrochloride and isoprenaline hydrochloride.

According to the conducted studies, it was found that among the researched modulators of nicotinic cholinergic receptors (mecamylamine, acetylcholine, carbachol, pancuronium, vecuronium), the most prominent decrease of the amplitude of the current through LCC-channels when the substance was added to the bath manifested after the application of vecuronium (a decrease by 50.9% at -60 mV), and after the application of acetylcholine when the substance was added via a patch pipette (a decrease by 25.4% at -40 mV). The most effective compound for decreasing the open-state probability of these channels was mecamylamine when added to the bath (by 44.9% at -40 mV), meanwhile when substances were applied via a patch pipette, none of the compounds reduced P_o , and acetylcholine caused an increase of this parameter (by 106.7% at -60 mV). Among the studied muscarinic cholinergic receptor modulators (atropine, platyphylline, pilocarpine), atropine was the most effective in reducing the amplitude of the currents through LCC-channels both when added to the bath (reduction by 19.8% at -40 mV) and to a patch pipette (reduction by 23.5% at +40 mV), whereas platyphylline increased the amplitude when applied through a patch pipette (by 20.9% at -40 mV). The decrease in P_o of LCC-channels was most prominent under the impact of platyphylline added to the bath (by 52.6% at -40 mV), and under the impact of pilocarpine when the solution was applied through a patch pipette (by 68.3% at -40 mV). The most effective reduction in the amplitude of the currents through LCC-channels during the studies of adrenergic receptor modulators (norepinephrine, epinephrine, propranolol, isoprenaline) was observed when isoprenaline was added to the bath (by 52.7% at -60 mV). The decrease in P_o of LCC-channels was the most pronounced under the effect of norepinephrine (by 53.8% at -40 mV), while isoprenaline was the only compound of this class that increased the value of the mentioned parameter (by 72.7% at -60 mV). Additionally, the influence of mecamylamine, atropine and isoprenaline on LCC-channels was accompanied by the channels' flickering effect, especially prominent under the impact of isoprenaline.

When summarizing the results and comparing the substances with each other, it can be inferred that among all the researched compounds vecuronium bromide and isoprenaline were the most effective in reducing current amplitude when applied to the bath with a sample, and acetylcholine – when applied to the patch pipette. The decrease in open-state probability was the most pronounced in the configuration with the substance added to the bath when norepinephrine solution was applied, and in the case of the application via a patch pipette – under the impact of pilocarpine solution. At the same time, the increase in current amplitude was registered only when mecamlamine was added to the bath or platyphylline was applied via a patch pipette. The increase in P_o was observed when the substance was added to the bath only under the impact of isoprenaline, and when applied via a patch pipette – only under the influence of acetylcholine.

The obtained results make it possible to select a specific LCC-channel modulator with a desired effect according to the needs of future studies, reveal the specificity of their regulation depending on the side of the membrane, suggesting the heterogeneity of the LCC-channels structure between the intranuclear and perinuclear sides, and lay the foundation for future analysis of the chemical patterns that enable compounds to modulate specific characteristics of these channels.

Keywords: ion channels, patch clamp, modulation, electrical activity, neurons, calcium signaling, voltage-dependent currents, nuclear membrane, electrophysiology, cholinergic receptor modulator, adrenergic receptor modulator.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Публікації, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. **Nadtoka S**, Kotyk O, Protsenko K, Kotliarova A. Effects of mecamylamine on the electrophysiological properties of LCC-channels in rat cerebellar Purkinje neurons. *Fiziol Zh.* 2025; 71(5): 22-30. <https://doi.org/10.15407/fz71.05.022>. *(Особистий внесок здобувача полягає в отриманні частини експериментальних даних, їх статистичному опрацюванні, побудові графіків та діаграм, написанні первинного варіанту статті).*
2. **Nadtoka S**, Kotyk O, Tarnopolska O, Kotliarova A. Effects of acetylcholine and carbachol on nuclear large conductance cation channels in rat cerebellar Purkinje neurons. *Fiziol Zh.* 2025; 71(6): 67-77. <https://doi.org/10.15407/fz71.06.067> *(Особистий внесок здобувача полягає у здійсненні частини експериментальної роботи, обробці даних, написанні тексту статті спільно із співавторами).*
3. **Nadtoka S**, Kotyk O, Kotliarova A. Effects of atropine on the electrophysiological properties of LCC-channels of the nuclear membrane of Purkinje neurons. *Neurophysiology.* 2026. <https://doi.org/10.1007/s11062-025-09986-6> *(Особистий внесок здобувача полягає у отриманні частини реєстрацій струму, підготовці рисунків, обробці та аналізі реєстрацій, участь у написанні тексту статті).*
4. Kotyk O, **Nadtoka S**, Kotliarova A. Effects of pilocarpine and platyphylline on nuclear membrane large-conductance cation channels in rat cerebellar Purkinje neurons. *Fiziol Zh.* 2026; 72(1): 83-91. <https://doi.org/10.15407/fz72.01.083> *(Особистий внесок здобувача полягає у отриманні частини експериментальних даних, участь у їх статистично-математичній обробці, підготовці рисунків та написанні початкової версії статті).*

5. Kotyk O, **Nadtoka S**, Vynohradova T, Taghavi A, Marchenko S, Kotliarova A. Effects of adrenergic receptor modulators on nuclear LCC-channels in Purkinje neurons. *Acta Neurobiol Exp.* 2026; 86: 11-21. <https://doi.org/10.55782/j42ygh03> (*Особистий внесок здобувача полягає в отриманні та обробці частини експериментальних даних, їх статистичному опрацюванні, підготовці рисунків та написанні статті спільно із співавторами*).

Публікації, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Котик О.А., **Надтока С.О.**, Котлярова А.Б. Модуляція високопровідних катіонних каналів ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка: ефекти атропіну, платифіліну та пілокарпіну. Матеріали чергового ІХ з'їзду Українського біофізичного товариства; 2023 жов. 30 – лист. 2; Київ, Україна. Київ; 2023, с. 40 – 41. *Публікація тез.*
2. **Nadtoka S.**, Kotliarova A., Kotyk O. Identification of LCC channels' conductivity in different types of cells. Молодь і поступ біології: збірник тез доповідей ХІХ Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів; 2023 кві 26 – 28; Львів, Україна. Львів; 2023, с. 189 – 190. *Публікація тез, усна доповідь.*
3. Котик О., **Надтока С.**, Котлярова А. Вплив пілокарпіну на LCC-канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка щурів. Тези доповідей ХХІ Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених, присвяченої 100-річчю від дня народження доктора біологічних наук, професора Василя Юхимовича Шавкуна; 2023 тра 18 – 19; Львів, Україна. *Біологія тварин.* 2023;25(2):58. *Публікація тез, усна доповідь.*
4. **Надтока С.**, Котик О., Котлярова А. Вплив ізопротеренолу на LCC-канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка щурів. Тези доповідей Міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини»;

- 2024 жов 3 – 4; Львів, Україна. Біологія тварин. 2024;26(3):95. *Публікація тез, стендова доповідь.*
5. **Надтока С.,** Котик О., Проценко К., Котлярова А. Вплив мекамеламіну на LCC-канали нейронів Пуркінє мозочка щурів. Тези доповідей Міжнародної конференції з нейронаук та Наукових читань, присвячених вісцеральній фізіології та патофізіології; 2024 лис 19 – 21; Київ, Україна. Фізіол. журн. 2024;70(5):68. *Публікація тез, усна доповідь.*
 6. **Надтока С.,** Проценко К., Котик О., Котлярова А. Вплив ацетилхоліну на LCC-канали нейронів Пуркінє мозочка щурів. Молодь і поступ біології: збірник тез XXI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів; 2025 кві 28 – тра 1; Львів, Україна. Львів; 2025, с. 47 – 48. *Публікація тез.*
 7. **Надтока С.,** Котик О., Проценко К., Котлярова, А. Вплив карбахоліну на LCC-канали нейронів Пуркінє мозочка щурів. Тези доповідей XXIII Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених; 2025 тра 15 – 16; Львів, Україна. Біологія тварин. 2025;27(2):63. *Публікація тез, усна доповідь.*
 8. Котик О.А., **Надтока С.О.,** Проценко К.М., Котлярова А.Б., Марченко С.М. Вплив векуронію броміду на високопровідні катіонні канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка. Тези доповідей IX Міжнародної наукової конференції «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології»; 2025 жов 21 – 25; Київ, Україна. Київ; 2025, с. 50. *Публікація тез, усна доповідь.*
 9. **Надтока С.,** Котик О., Котлярова А. Ефект модуляторів холіно- та адренорецепторів на властивості LCC-каналів нейронів Пуркінє мозочка. Школа-воркшоп «Сучасні методи в нейронауках»; 2025 жов 28 – 29; Київ, Україна. Фізіол. журн. 2025;71(5S):1-18. *Публікація тез, усна доповідь.*

10. Котик О.А., **Надтока С.О.**, Котлярова А.Б. Вплив панкуроній броміду на LCC-канали нейронів Пуркінє мозочка. Природничі науки: проєкти, дослідження, перспективи: матеріали VI Міжнародної науково-практичної конференції; 2025 лис 5 – 6; Лубни-Миргород, Україна. Миргород; 2025, с. 27 – 28. *Публікація тез, усна доповідь.*