

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

КОТИК ОЛЕНА АДАМІВНА

УДК 576.315.2 : 577.352.465 : 57.086.862

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

03.00.13 – Фізіологія людини і тварин

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2020

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі фізіології головного мозку та відділі фізико-хімічної біології клітинних мембран Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук

Марченко Сергій Михайлович

завідувач відділу фізіології головного мозку

Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України

кандидат біологічних наук

Котлярова Анна-Малгожата Борисівна,

старший науковий співробітник

відділу фізико-хімічної біології клітинних мембран

Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор

Манько Володимир Васильович,

завідувач кафедри фізіології людини і тварин

Львівського національного університету імені Івана Франка

доктор біологічних наук, професор

Жолос Олександр Вікторович,

завідувач кафедри біофізики та медичної інформатики

ННЦ “Інститут біології та медицини”

Київського національного університету

імені Тараса Шевченка

Захист дисертації відбудеться *«21» квітня 2020 р. о 14.00* годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології імені О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ-24, вул. Богомольця, 4.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України та на сайті інституту:

http://biph.kiev.ua/en/Specialized_Scientific_Council

Автореферат розісланий *«19» березня 2020 р.*

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук



О.П. Любанова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. 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 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 (IP_3 -рецептори), транспортери кількох типів, Ca^{2+} -помпа, а також спонтанно активні іонні канали. Дослідженню властивостей IP_3 -рецепторів першого типу ($\text{IP}_3\text{R1}$) присвячена значна кількість праць [Marchenko et al., 2005; Vezprozvanny, 1991, 2005; Egorova et al., 2018; Fedorenko et al., 2014], тоді як про другий ($\text{IP}_3\text{R2}$) тип цих рецепторів наявні лише розрізнені відомості [Perez et al., 1997; Garcia et al., 2016; Ramos-Franco et al., 2000]. Згідно з даними літератури, $\text{IP}_3\text{R2}$ експресуються у великій кількості в астроцитах [Agulhon et al., 2008] і кардіоміоцитах [Perez et al., 1997; Garcia et al., 2016; Ramos-Franco et al., 2000]. При цьому, переважна їх більшість локалізована саме в ділянці навколо ядра [Bare et al., 2005], що є визначальним для параметрів поширення Ca^{2+} -хвилі у цих клітинах, регуляції експресії генів і функціонування міокарда загалом.

Відомо, що експресія IP_3 -рецепторів змінюється при багатьох патологіях серця, таких як гіпертрофія [Harzheim et al., 2010], аритмія [Mohler et al., 2005], фібриляція передсердь [Yamada et al., 2001], інфаркт міокарда [Go L. and Moschella M., 1995]. У ядерних мембранах нейронів Пуркін'є мозочка IP_3 -рецептори коекспресовані зі спонтанно активними іонними каналами, котрі забезпечують локальні зміни концентрацій іонів. 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 Ca^{2+} з депо під час активації каналів вивільнення Ca^{2+} шляхом компенсаторного заміщення позитивно заряджених іонів у люмені, що частково запобігає зміщенню мембранного потенціалу до значення Ca^{2+} -рівноважного потенціалу. Вивчення фізіологічних та біофізичних властивостей каналів ядерної мембрани є передумовою для розуміння найважливіших медичних проблем, пов'язаних з порушенням 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 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 змійних токсинів (нейротоксину II, α -кобратороксину) на LCC-канали ядерної мембрани кардіоміоцитів.

5. Вивчити чутливість LCC-каналів до антагоністів н-холінорецепторів: d-тубокурарину, дигідро- β -еритроїдину, гексаметонію, α -колотоксину 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_3 -рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів.

Об'єкт дослідження – іонні канали внутрішньоклітинних мембран.

Предмет дослідження – електрофізіологічні властивості і фармакологічна чутливість LCC-каналів та IP_3 -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_3R2 , 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 ± 13 пСм та описано їхні основні біофізичні характеристики. Перевірено вплив агоністів та антагоністів н-холінорецепторів – дигідро- β -еритроїдину (Dh β E), десформилфлустраброміну (dFBr), d-тубокурарину, атракуріуму, піпекуронію броміду, рокуронію броміду, гексаметонію, метиллікаконітину (MLA), α -колотоксину PeIA, нікотину, PNU 282987, карбахоліну, дитиліну і змійних токсинів: нейротоксину II (NT II), α -кобратороксину (α -CTX) – на функціональну активність LCC-каналів. Ідентифіковано IP_3 -рецептори ядерної мембрани кардіоміоцитів з провідністю 384 ± 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 гіпертрофія, аритмія, фібриляція передсердь, 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. Результати досліджень та основні положення дисертаційної роботи були представлені на таких конференціях: VII–VIII з'їздах Українського біофізичного товариства, 2018–2019, Київ-Луцьк, Україна; XX з'їзді Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнар. участю, 27–30 травня 2019, Київ, Україна; XII–XIII IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists, 2018–2019, Kyiv, Ukraine; “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology - 2019”, 21–22 March 2019, Kyiv, Ukraine; XV та XVII Всеукр. наук.-практ. конф. молодих учених «Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини» 2016 та 2018, Львів, Україна; International PhD student symposium and career fair for life sciences 15th horizons in molecular biology 10–13 September 2018, Göttingen, Germany; XIV–XVI Міжнар. наук. конф. студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки» 2016–2018, Київ, Україна; «Modern methodologies, innovations, and operational experience in the field of biological science» December 2017, Lublin, Poland; VIII Міжнар. наук. конф. «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології» 17–20 жовтня 2017, Київ, Україна; IV Міжнар. наук. конф. «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» 5–6 жовтня 2017, Дніпро, Україна; VII Конгресі Укр. товариства нейронаук 7–11 червня 2017, Київ, Україна; 2nd Conference for Young Scientists of the Division of Biochemistry, Physiology and Molecular Biology National Academy of Sciences of Ukraine 6–9 June 2017, Kyiv, Ukraine; XII–XIII Міжнар. наук. конф. студ. та аспір. «Молодь і поступ біології» 2016–2017, Львів, Україна; Міжнар. наук.-практ. конф. «Актуальні питання розвитку біології та екології» 3–7 жовтня 2016, Вінниця, Україна.

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

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, 4 розділів, висновків, списку використаних джерел, 1 додатку, 60 рисунків. Основний текст роботи викладено на 109 сторінках. Загальний обсяг роботи становить 153 сторінки. Список цитованих джерел включає 207 найменувань.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи досліджень. Дослідження виконано на ядрах кардіоміоцитів шурів ліній *Fisher* та *Wistar* віком 3–4 тижні, масою 40 ± 5 г ($n = 102$). Оптимізовано методику виділення ядер кардіоміоцитів, а саме підбрано оптимальний склад розчину та спосіб гомогенізації тканини, зменшено час центрифугування до 10 хв. Оскільки з віком змінюється співвідношення між кардіоміоцитами та фібробластами, найдоцільніше такі дослідження проводити на 3–4 тижневих тваринах.

Після декапітації серце відмивали від крові та переносили у розчин такого складу (ммоль/л): цукроза – 300, KCl – 60, HEPES – 10 (pH 7,2, доводили KOH), у якому його подрібнювали та гомогенізували. До розчину додавали суміш інгібіторів протеаз (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail tablets, "Roche", Німеччина) у концентрації, зазначеній виробником. Гомогенізацію тканини проводили за 1–4 °C із застосуванням скляного гомогенізатора об'ємом 2 мл (Dounce "Bellco Glass", США). Отриманий гомогенат центрифугували протягом 10 хв за 1000 g (4 °C) у центрифугі miniSpin "EppendorfAG" (Гамбург, Німеччина). Супернатант зливали, а осад ресуспендували піпетуванням у розчині, що містив (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1 (pH 7,2, доводили KOH) – далі «робочий розчин KCl», яким також заповнювали *patch*-піпетки та камеру, якщо не вказано інше. Детальніше методику виділення ядер кардіоміоцитів описано [Котик та ін. 2018]. Отриману суспензію ядер поміщали в робочу камеру (з прозорим дном) об'ємом 200 мкл. Через 4–7 хв препарат відмивали від залишків інших органел робочим розчином KCl. Візуалізацію ядер проводили з використанням інвертованого мікроскопа ("LEICA DM IRB", Німеччина).

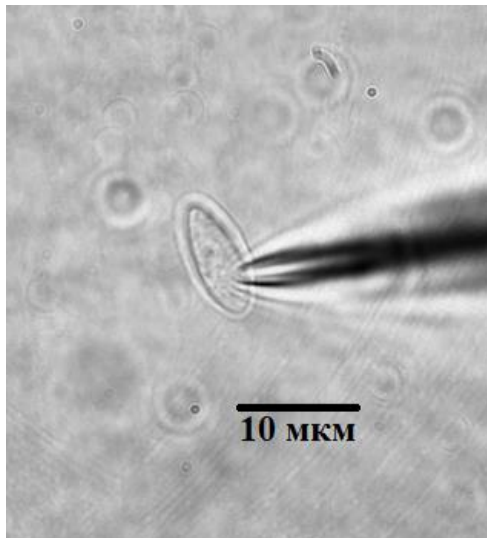


Рис. 1. Ізольоване ядро кардіоміоцита з підведеною до нього *patch*-піпеткою у симетричному розчині такого складу (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1 (pH 7,2)

Струми через поодинокі канали внутрішньої ядерної мембрани кардіоміоцитів реєстрували, використовуючи метод *patch-clamp* у конфігурації *nucleus-attached* або *excised patch* у режимі фіксації потенціалу. Значення показників струму отримували за допомогою підсилювача Visual-Patch 500 ("Bio-Logic", Франція), 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 нуль. *Patch*-піпетки з опором від 9 до 14 МОм виготовляли з боросилікатного скла ("Sutter Instruments", США). Індиферентний електрод Ag–AgCl був сполучений із робочою камерою через 0,3 %-й агаровий місток, заповнений робочим розчином. Після утворення гігаомного контакту реєстрували іонні струми за контрольних умов, а потім 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. У серіях експериментів для визначення селективності досліджуваних каналів KCl у робочому розчині замінювали на еквімолярне значення K-глюконату, NaCl або ж CaCl₂ (100 ммоль/л); рН до 7,2 доводили KOH, NaOH і NMDG відповідно. Для реєстрації струмів через IP₃-рецептори до розчину додавали інозитол-1,4,5-трифосфат (IP₃) у концентрації від 0,2 до 20 мкмоль/л, АТФ – 0,5 ммоль/л і CaCl₂ з розрахунку [Ca²⁺]_(вільний) від 100 нмоль/л до 1 ммоль/л. Концентрацію вільного Ca²⁺ розраховували за допомогою програми *Maxchelator*.

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 ймовірність перебування каналу у відкритому стані (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.

Ідентифікацію IP₃R2 здійснювали за допомогою імуногістохімічного фарбування з використанням специфічних до цього підтипу рецепторів поліклональних антитіл. Зразки 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.

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. 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 ± m, де M – середнє, m – стандартна похибка середнього. Вірогідність різниці оцінювали на основі t-критерію Стьюдента (* – P ≤ 0,05, ** – P ≤ 0,01, *** – P ≤ 0,001).

Основні результати досліджень та їх обговорення

1. Властивості LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів

Після оптимізації методу виділення ядер кардіоміоцитів, нами зареєстровано струми крізь кілька типів каналів у внутрішній ядерній мембрані з провідністю від 10 до 340 пСм. Серед них найчастіше спостерігали активність каналів з провідністю 209 ± 13 пСм ($n = 44$). Канали цього типу 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) – їхня активність знижувалася ($NP_o = 0,72$). Типову реєстрацію іонних струмів через ці канали та їх вольт-амперну характеристику представлено на рис. 1.

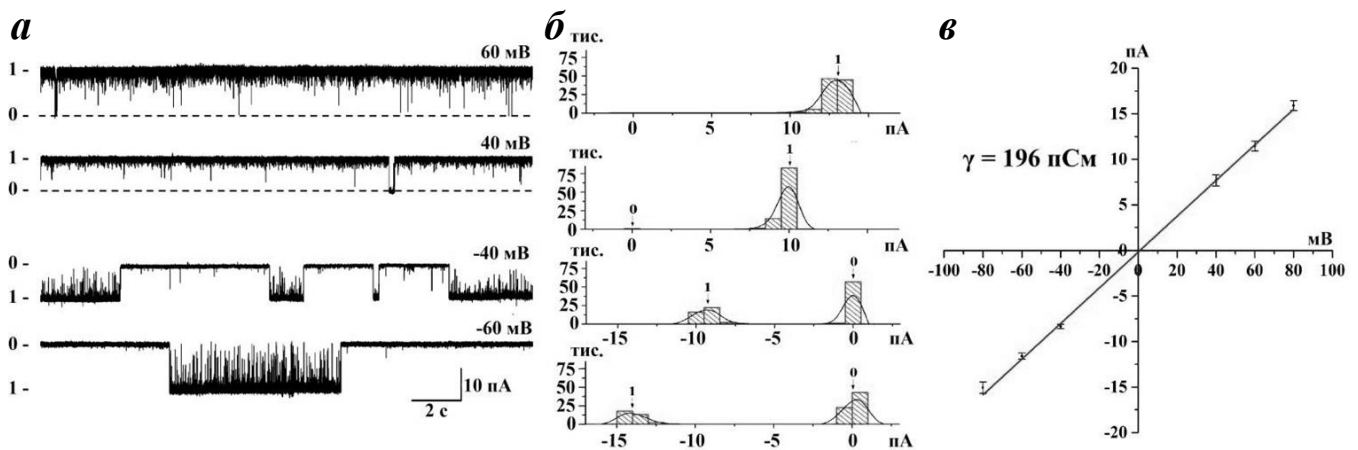


Рис. 1. Приклад реєстрації іонного струму через LCC-подібний канал ядерної мембрани кардіоміоцитів за потенціалу +/-40, +/-60 мВ (а), амплітудні діаграми (б) та типова вольт-амперна характеристика (в). Реєстрацію проводили в розчині такого складу (ммоль/л): KCl – 150, NERES – 8, NERES-калієва сіль – 12, EGTA – 1 (рН 7,2). Потенціал розчину в камері у всіх реєстраціях приймали за нуль

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.

Щоб перевірити чи зареєстрували струм саме через LCC-канали, ми провели низку серій експериментів із заміною робочого розчину на основі KCl на еквімолярні розчини з K-глюконатом і NaCl та на розчин з CaCl₂, таким чином визначивши селективність каналів. Канал виявився непроникним для Cl⁻, оскільки після заміни робочого розчину KCl у піпетці на еквімолярний розчин K-глюконату, спостерігали струми вхідного і вихідного напрямку. Вольт-амперна характеристика була такою самою, як і у контролі. Після заміни розчину в камері, за допомогою проточної аплікації, на еквімолярний розчин NaCl спостерігали струми двох напрямів, але меншої амплітуди (рис. 2), що вказує на меншу проникність каналу для Na⁺, ніж для K⁺.

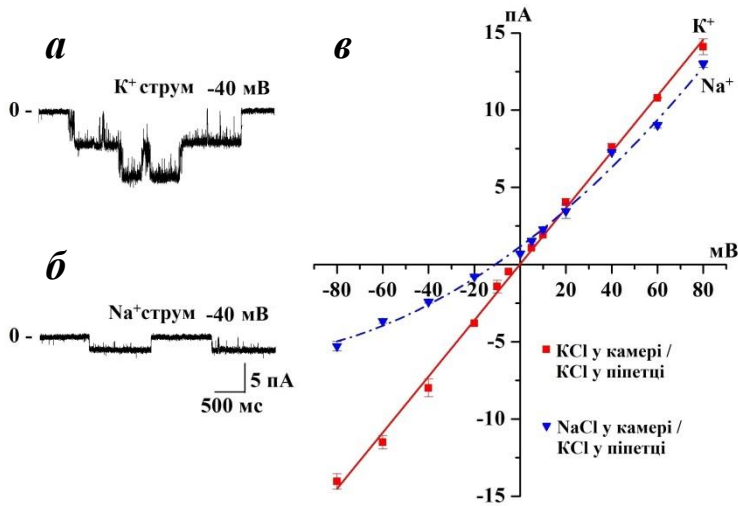


Рис. 2. Приклад реєстрації K^+ -струму через LCC-подібний канал у симетричному робочому розчині (ммоль/л): KCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1 (pH 7,2) (а), Na^+ -струм при заміні розчину у камері на еквімолярний розчин NaCl (ммоль/л): NaCl – 150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1 (pH 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) 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).

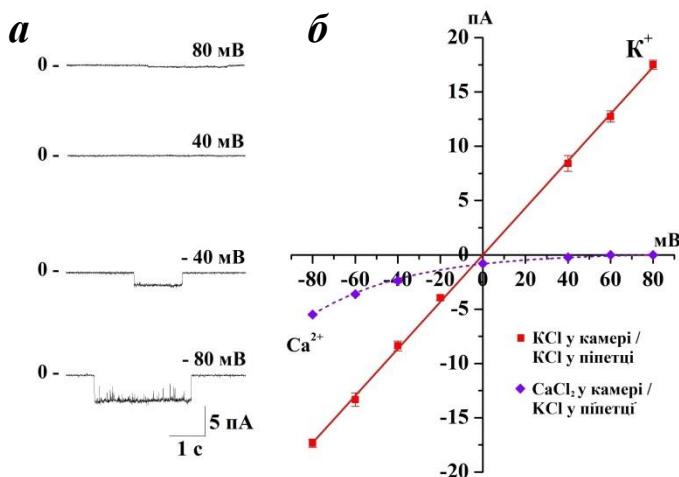


Рис. 3. Приклад реєстрації струму через LCC-подібний канал при заміні розчину у піпетці на розчин $CaCl_2$ (ммоль/л): $CaCl_2$ – 100, HEPES – 20 (pH 7,2) (а) та вольт-амперна характеристика (б). Відсутність струму за позитивних значень потенціалу свідчить про непроникність каналів для Ca^{2+}

Оскільки провідність та селективність у досліджуваних каналів така сама, як у LCC-каналів ядерної мембрани нейронів Пуркінє [Marchenko et al., 2005], зроблено висновок, що вони є саме LCC-каналами.

Багато зміїних отрут в історичному плані були ідентифіковані як блокатори каналів різного типу. Показано, що деякі фракції отрут зменшували P_o LCC-каналів нейронів Пуркінє, зокрема це отрути кобри монокленової, гадюки шумлиивої та степової, а також скорпіона степового [Луцько та ін., 2018]. Тому цікавим є вивчення впливу інших отрут на LCC-канали. Очищений препарат NT II (виділений з яду кобри *Naja oxiana*) у концентрації 25 мкмоль/л на 13 % зменшував амплітуду струму через ці канали ($P < 0,05$, $n = 5$). При аплікації 1 та 2 ммоль/л α -СТХ ($n = 3$), який є основним компонентом яду кобри *Naja kaouthia cobra*, спостерігали незначне «миготіння» каналу – швидкі короточасні спроби його відкриття та закривання (так зване «миготіння» або flicker-блок каналу).

Роботами співробітників нашої лабораторії у 2016 р. було показано, що конкурентний неселективний антагоніст нікотинових холінорецепторів d-тубокурарин є ефективним блокатором LCC-каналів ядерної мембрани нейронів Пуркінє [Lunko et al., 2016]. Оскільки фармакологічна чутливість каналів одного типу може бути відмінною у різних клітинах чи тканинах, ми перевірили, чи впливає d-тубокурарин також на LCC-канали, які експресовані в ядерній мембрані кардіоміоцитів. У концентрації 200 мкмоль/л d-тубокурарин зменшував амплітуду струму через досліджувані канали на 45 % ($P < 0,001$, $n = 4$), виникало «миготіння» каналу.

Дію інших інгібіторів н-холінорецепторів досліджували за низьких концентрацій, – для того, щоб ідентифікувати більш ефективні, ніж d-тубокурарин, інгібітори LCC-каналів. Ми дослідили вплив таких антагоністів н-холінорецепторів як атракуріум, дитилін, Dh β E, піпекуронію та рокуронію броміди, MLA, α -конотоксин PeIA, гексаметоній. Найбільш ефективним виявився Dh β E – алкалоїд, який виділяють із насіння коралового дерева (*Erythrina*). Після його аплікації у камеру в концентрації 12,5 та 25 мкмоль/л амплітуда струму через LCC-канали зменшувалася на 21 % ($P \leq 0,01$) і на 40 % ($P < 0,001$) відповідно ($n = 3$; рис. 4).

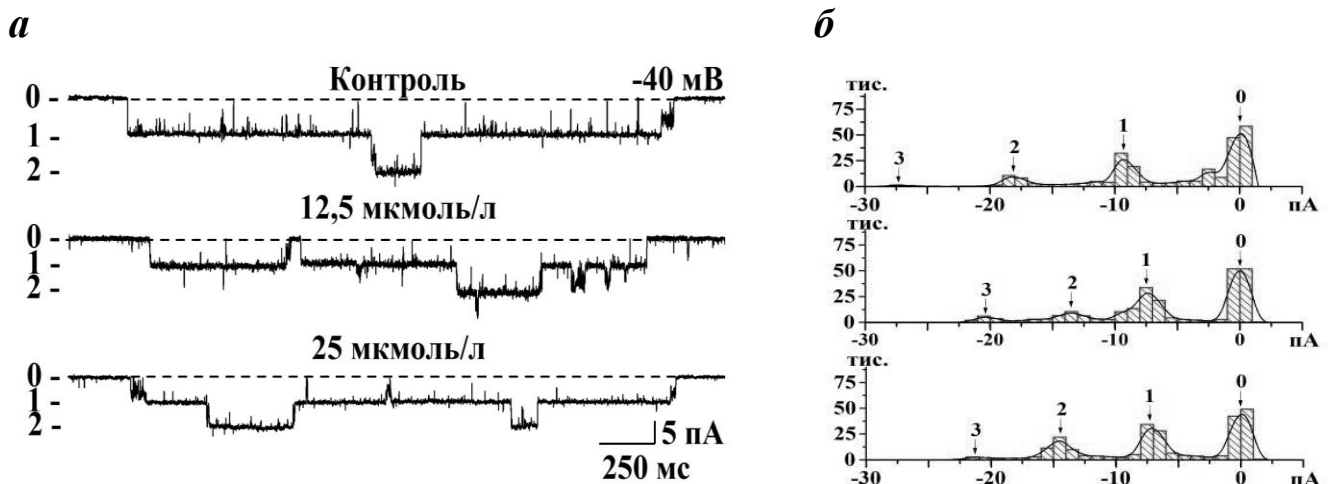


Рис. 4. Репрезентативний запис іонних струмів через LCC-канали ядерної мембрани кардіоміоцитів (а) та амплітудні діаграми (б) під впливом Dh β E за потенціалу -40 мВ. Реєстрацію проводили в розчині такого складу (ммоль/л): KCl – 150, NEPEs – 8, NEPEs-калієва сіль – 12, EGTA – 1; Dh β E – 12,5 та 25 мкмоль/л (pH 7,2). Чітко виражено зменшення амплітуди струму за наявності блокатора у середовищі: 0 – всі канали закриті, 1, 2, 3 – відповідна кількість відкритих каналів

Недеполяризуючий нервово-м'язовий релаксant рокуронію бромід, дозозалежно зменшував амплітуду струму через LCC-канали й інгібував їх наполовину за концентрації 2 ммоль/л, а P_o цих каналів зменшувалася вдвічі ($P < 0,001$, $n = 4$). Подібний вплив на функціональну активність LCC-каналів чинив також піпекуронію бромід (рис. 5). Інші перевірені н-холіноблокатори – гексаметоній, MLA, α -конотоксин PeIA виявилися неефективними.

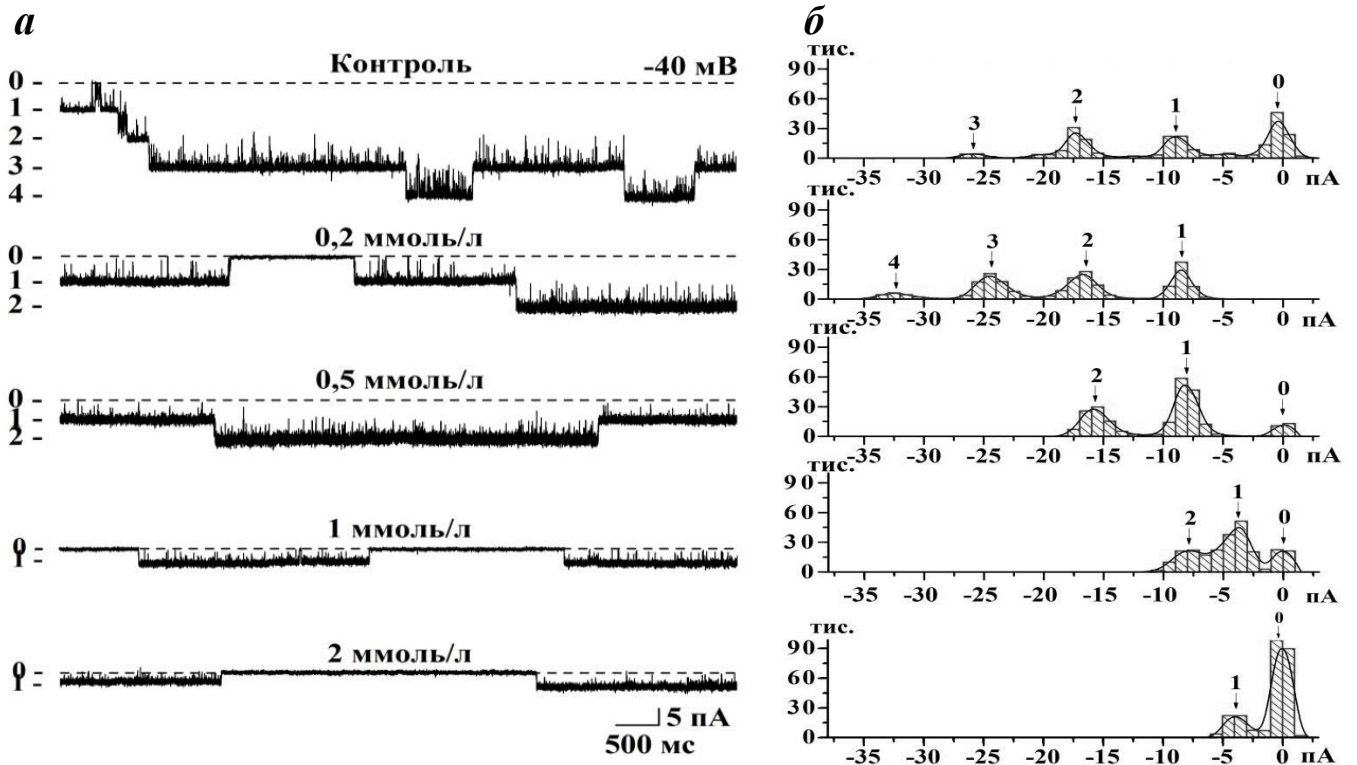


Рис. 5. Репрезентативна реєстрація іонних струмів через LCC-канали (а) та амплітудні діаграми (б) за дії піпекуронію броміду при потенціалі -40 мВ: 0 – всі канали закриті, 1–4 – відповідна кількість відкритих каналів. Реєстрацію проводили в розчині такого складу (ммоль/л): КСІ – 150, НЕРЕС – 8, НЕРЕС-калієва сіль – 12, ЕГТА – 1; піпекуронію бромід – 0,1–2 (рН 7,2). Простежується чітка залежність зменшення амплітуди струму через канал від концентрації фармакологічної речовини

У наступних серіях експериментів було перевірено вплив агоністів н-холінорецепторів. Найефективнішим серед них виявився нікотин, що у концентрації від 10 до 200 мкмоль/л дозозалежно зменшував амплітуду струму через LCC-канали (рис. 6). За дії 0,2 ммоль/л нікотину амплітуда струму зменшилася на 50 % ($n = 3$, $P < 0,001$) (порівняно з контролем). Після аплікації алостеричного модулятора н-холінорецепторів dFBr у концентрації 200 мкмоль/л, амплітуда струму через канал зменшувалася на 21 % ($P < 0,01$, $n = 3$), спостерігали «миготіння» каналу. За високих концентрацій атракуріуму та дитиліну (1–2 ммоль/л) зменшувалася P_0 та з'являлося «миготіння» каналу, що свідчить про механічне блокування пори каналу у його відкритому стані. Однак повного блокування не було навіть за концентрації 2 ммоль/л блокатора. Інші агоністи н-холінорецепторів – PNU 282987 та карбахолін не спричиняли статистично достовірних змін функціонування LCC-каналів.

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

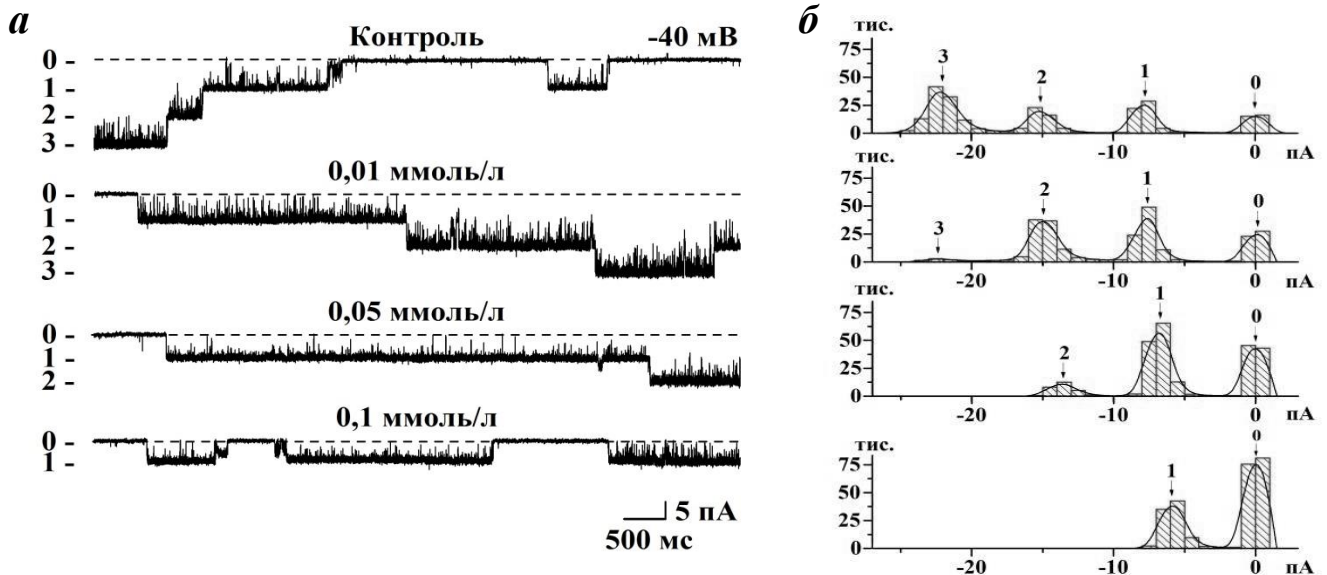


Рис. 6. Типова реєстрація струму через LCC-канали (*a*) та амплітудні діаграми (*б*) за дії нікотину при потенціалі -40 мВ: 0 – всі канали закриті, 1–3 – відповідна кількість відкритих каналів. Реєстрацію проводили в розчині такого складу (ммоль/л): KCl – 150, NERES – 8, NERES-калієва сіль – 12, EGTA – 1; нікотин – 0,01–0,1 (рН 7,2). З реєстрації видно зменшення амплітуди струму через канал після аплікації нікотину у досліджуваних концентраціях

2. Властивості IP_3 -рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів

Ca^{2+} – ключовий сигнальний іон, потрібний для багатьох внутрішньоклітинних процесів. Він бере участь у скороченні міокарду, транскрипції генів та апоптичній загибелі клітин [Bootman et al., 2009, Garcia et al., 2016]. Значну роль у Ca^{2+} сигналізації відіграють IP_3 -рецептори, котрі поряд з ріанодиновими рецепторами, забезпечують вивільнення Ca^{2+} з депо [Guatimosim et al., 2008].

За фізіологічних умов активація IP_3 -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^{2+} з депо) [De Mello et al., 2000]. IP_3 -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 $[Ca^{2+}]_i$, посилення потенціалу дії, спричиненого Ca^{2+} -транзієнтами, та виникнення спонтанних аритмогенних подій вивільнення Ca^{2+} в результаті активації IP_3 -рецепторів. На відміну від цього, ендотелін-1 не спричиняв спонтанного вивільнення Ca^{2+} у передсердних міоцитах з дефіцитом IP_3R2 [Li et al., 2005]. Відомо також, що Ca^{2+} -транзієнт у ядрі, спричинений інсуліноподібним фактором росту-1, є значно меншим у міоцитах, в яких відсутній нейронний Ca^{2+} -сенсор-1 (NCS-1) – Ca^{2+} -зв'язуючий білок, котрий залучений у IP_3 -опосередкований шлях трансдукції сигналу [Nakao et al., 2015]. Крім цього, активація IP_3 -рецепторів стимуляцією $\alpha 1$ -адренергічного рецептора або безпосередньо IP_3 (у клітинах, пермеабілізованих сапоніном) збільшує частоту Ca^{2+} -спарків у ділянці навколо ядра у кардіоміоцитах шлуночків новонароджених щурів [Luo et al., 2007].

Дослідження електрофізіологічних властивостей IP_3 -рецепторів виконані здебільшого на гетерологічно експресованих рецепторах у клітинах DT40 ТКО [Wagner, Yule, 2012] та Sf9 [Huiping Tu et al., 2005], однак наявні лише розрізнені дані про їх властивості в нативному стані [Bare et al., 2005, Zima et al., 2007].

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-APB (50 мкмоль/л; $n = 2$), на основі чого зроблено висновок, що цей канал є IP_3 -рецептором (384 ± 5 пСм). З даних літератури відомо [Bare et al., 2005], що в кардіоміоцитах найбільш експресовані IP_3R2 і ми підтвердили це імуногістохімічним методом (рис. 7).



Рис. 7. Ізольоване ядро кардіоміоцита, оброблене поліклональними антитілами до IP_3R2 з вторинною міткою Alexa Fluor 647: у проникаючому світлі (*a*), об'єднані зображення (*б*), реєстрація флуоресценції при $\lambda = 633$ нм (*в*)

P_o IP_3 -рецепторів є потенціалзалежною (рис. 8). За позитивних значень потенціалу (+40 і +60 мВ) вона становила 0,043 та 0,125 відповідно. Коли значення прикладеного потенціалу були негативними, P_o цих рецепторів зменшувалася і становила 0,025 за -40 мВ та 0,005 за -60 мВ.

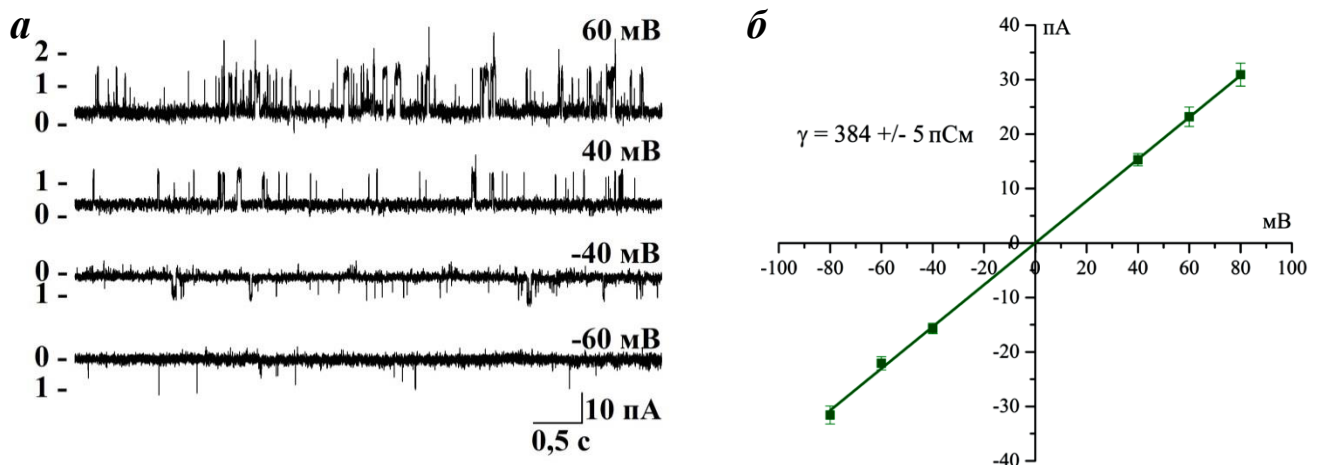


Рис. 8. Залежність активності IP_3 -рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів від прикладеного потенціалу (*a*). З рисунку видно, що P_o IP_3 -рецепторів збільшувалась за позитивних значень потенціалу, в той час як негативні пригнічували їх активність. Типова вольт-амперна характеристика струму крізь IP_3 -рецептори ядерної мембрани кардіоміоцитів (*б*). Реєстрації у розчині такого складу (ммоль/л): KCl–150, HEPES – 8, HEPES-калієва сіль – 12, EGTA – 1, АТФ – 0,5; $[Ca^{2+}]_{\text{вільний}} \approx 100$ нмоль/л; IP_3 – 10 мкмоль/л (*a*) та IP_3 – 3 мкмоль/л (*б*) (рН 7,2)

Нами було зареєстровано струми через два види IP_3 -рецепторів з різною чутливістю до Ca^{2+} . Перший – із класичною дзвоноподібною залежністю, який інактивується внаслідок додавання 1 мкмоль/л Ca^{2+} (рис. 9 *а*) найчастіше виявляли у лівому ($n = 5$) та правому ($n = 3$) шлуночках, тоді як у передсердях їх спостерігали вкрай рідко ($n = 1$). Інша частина рецепторів мала також дзвоноподібну залежність P_o від концентрації Ca^{2+} у середовищі, але значно зміщену праворуч, інгібування починалось за концентрації Ca^{2+} 10 мкмоль/л у середовищі (рис. 9 *б*). 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 ($n = 1$).

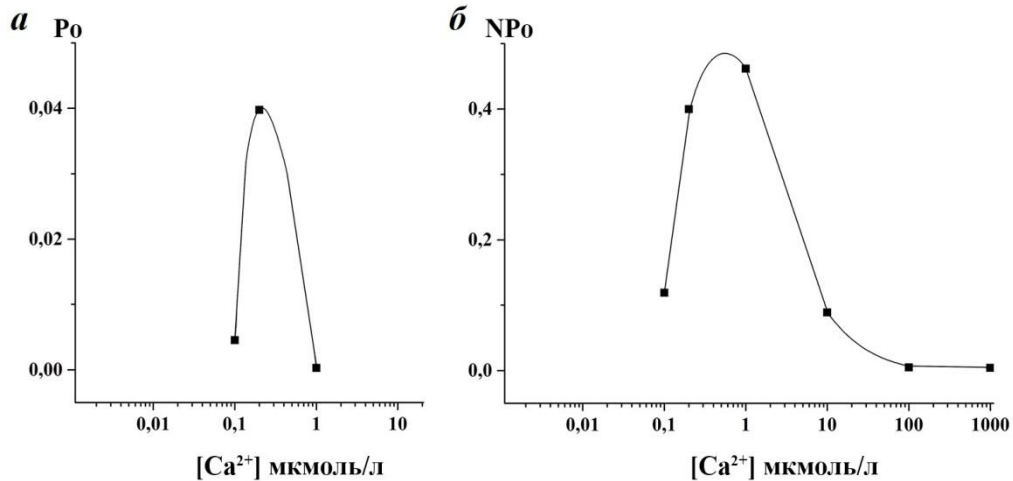


Рис. 9. Графік залежності P_o IP_3 -рецепторів від концентрації Ca^{2+} у середовищі: з типовою дзвоноподібною залежністю (реєстрація від ядра ізолюваного з лівого шлуночка) (*а*) та з нетиповою чутливістю до Ca^{2+} (реєстрація від ядра ізолюваного з правого передсердя) (*б*). Реєстрації проводили у розчині такого складу (ммоль/л): КСІ – 150, НЕРЕС – 8, НЕРЕС-калієва сіль – 12, ЕГТА – 1, АТФ – 0,5; $[Ca^{2+}]_{\text{вільний}}$ від 100 нмоль – 1 ммоль; IP_3 – 20 мкмоль/л. Один тип рецепторів блокувався Ca^{2+} у концентрації 1 мкмоль/л (*а*), в той час як інший продовжував функціонувати за цих умов (*б*)

Різна чутливість IP_3 -рецепторів до концентрації Ca^{2+} може мати визначальне значення для часових параметрів поширення Ca^{2+} -сигналу у кардіоміocyтах. Концентрація Ca^{2+} в спокої у більшості клітин становить близько 100 нмоль/л і рідко перевищує 1 ммоль/л навіть у невеликих локальних ділянках [Foskett et. al., 2007]. 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. Це 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.

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. Також їм притаманна вибіркова проникність для одновалентних катіонів (K^+ , Na^+) та непроникність для двовалентних (Ca^{2+} , Br^{2+}). Канали такого типу раніше були ідентифіковані у ядерній мембрані нейронів Пуркінє [Marchenko et al., 2005] та CA1-ділянки гіпокампа [Fedorenko et al., 2007].

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 [Луцько та ін., 2018], 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 % ($P \leq 0,05$). В той час як α -СТХ (0,1–1 ммоль/л) призводив лише до незначного «миготіння» каналів.

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 [Marchenko et al., 2005]. Єдиним блокатором, який знижував функціональну активність LCC-каналів ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка та викликав «миготіння», був d-тубокурарин [Lunko et al., 2016]. Струм через LCC-канали внутрішньої ядерної мембрани кардіоміоцитів зменшувався на 45 % за наявності 200 мкмоль/л d-тубокурарину в середовищі. 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 β E, d-тубокурарин, тоді як рокуронію бромід, піпекуронію бромід, дитилін та атракуріум пригнічували їх у концентраціях на порядок більших. Не змінювали активність досліджуваних каналів гексаметоній, MLA та α -колотоксин PeIA.

У серіях експериментів з агоністами н-холінорецепторів найбільш виражений вплив мав нікотин (на 50 % зменшувався струм через канал у концентрації 200 мкмоль/л) та dFBr (за концентрації 200 мкмоль/л, амплітуда струму через канал зменшувалася на 21 %). Агоністи ацетилхолінових рецепторів – карбахолін та PNU 282987 не змінювали функціональної активності LCC-каналів.

Слід зазначити, що дія досліджуваних речовин на LCC-канали проявлялася по різному. Під впливом d-тубокурарину, dFBr, атракуріуму, дитиліну (у тестованих концентраціях) зменшувалась середня амплітуда струму через LCC-канали, а також з'являлося «миготіння» каналу. Ефект «миготіння», тобто дуже швидкі послідовні спроби закривання та відкривання каналу, очевидно, пов'язаний 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 β E, NT II, піпекуронію- та рокуронію бромідів виникало лише зменшення середньої амплітуди струму через канали, що ймовірно пов'язане з конформаційними змінами пори каналу.

На рис. 10 представлено концентраційні залежності впливу цих речовин на струми через LCC-канали.

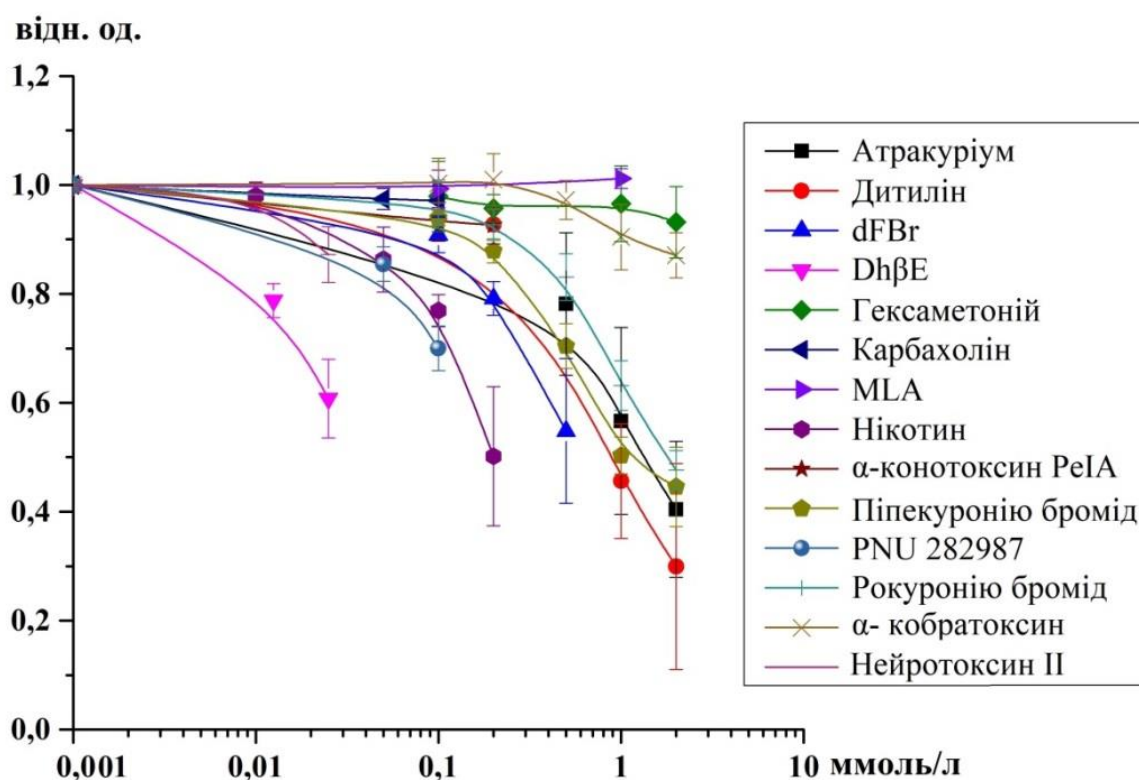


Рис. 10. Усереднені нормовані концентраційні залежності впливу агоністів й інгібіторів н-холінорецепторів на K^+ -струм крізь LCC-канали ядерної мембрани кардіоміоцитів. Середній струм визначали як різницю зареєстрованих значень струму, виміряних у інтервалі 200–400 мс під час перебування каналів у відкритому 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 n-холінорецепторів і зміїними токсинами виглядає так: DhβE > d-тубокурарин ≈ нікотин > NT II > dFBr > дитилін ≈ атракуріум ≈ піпекуронію бромід > рокуронію бромід > α-СТХ.

Показано, що у ядерній мембрані нейронів Пуркінє LCC-канали коекспресуються з IP₃-рецепторами [Fedorenko et al., 2014]. Нашими дослідженнями підтверджено таку ж коекспресію у ядерній мембрані кардіоміоцитів. Оскільки за властивостями ядерна та ендоплазматична мембрани є подібними [Berridge, 2002], LCC-канали можуть бути і у мембранах ендоплазматичного ретикулума. Також важливим є той факт, що LCC-канали та IP₃-рецептори мають однакову потенціалзалежність [Федоренко та Марченко, 2012].

Ми припускаємо, що не лише Ca²⁺-канали можуть брати участь у поширенні Ca²⁺-сигналу. При вивільненні Ca²⁺ 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 Ca²⁺-рівноважного потенціалу і вивільнення Ca²⁺ з депо припиниться. LCC-канали, описані раніше у ядрах нейронів центральної нервової системи, роблять мембрану легко проникною для K⁺ [Марченко et al., 2005]. Можна припустити, що зміна потенціалу люмену, що виникає при вивільненні Ca²⁺ через IP₃-рецептори, компенсується протилежно спрямованим потоком K⁺ через LCC-канали, полегшуючи цим самим подальше вивільнення Ca²⁺ з депо і пролонгуючи Ca²⁺-сигнал.

Для перевірки гіпотези спочатку необхідно дослідити базові електрофізіологічні властивості IP₃-рецепторів. Найкраще охарактеризовані IP₃-рецептори першого типу, тоді як про другий тип є лише розрізнені дані, а саме вони мають найбільшу експресію у кардіоміоцитах. Vare зі співавт. показали, що у кардіоміоцитах IP₃-рецептори локалізовані у ділянці навколо ядра, і така просторова відокремленість, вказує на їх унікальну роль у регулюванні динаміки Ca²⁺-сигналізації у ядрі [Vare et al., 2005].

Виявлені нами властивості IP₃-рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів не збігаються з жодним типом описаних ізоформ IP₃-рецептора ні за чутливістю до IP₃, ні за впливом Ca²⁺ на їх функціонування, а ці властивості є основними у визначенні характеру Ca²⁺-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 IP₃-рецепторів з характерними для клітин конкретного типу посттрансляційними змінами є дуже актуальним і наші дані про властивості IP₃-рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів є яскравим цьому підтвердженням. На даний момент незрозумілими є ні природа таких відмінностей, ні фактори, які до них призводять.

На основі отриманих результатів, а також даних літератури запропоновано схему транспорту іонів крізь LCC-канали та IP₃-рецептори ядерної мембрани кардіоміоцитів, а також вказано речовини, котрі на них впливають (рис. 11).

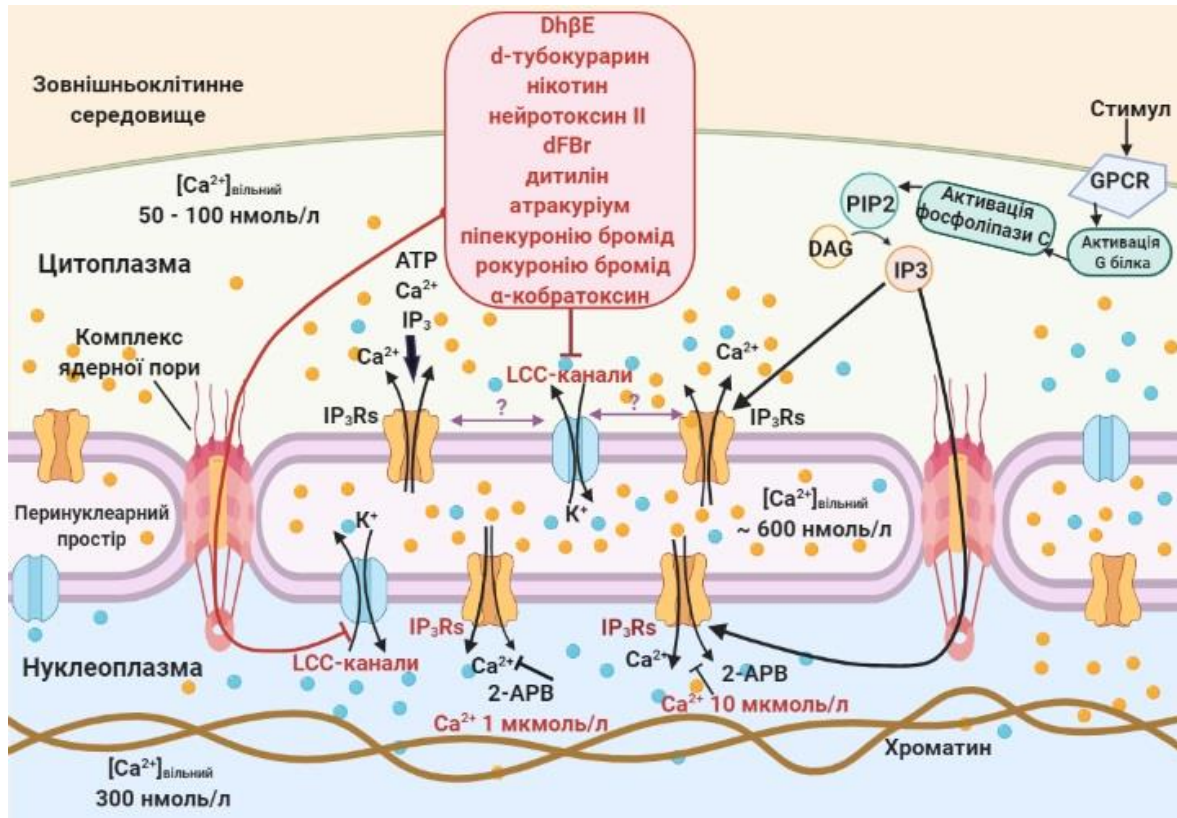


Рис. 11. Схематичне зображення транспорту іонів крізь ядерну мембрану кардіоміоцитів. \blackrightarrow – активація, \top – інгібування, \rightarrow – напрям руху іонів. Іони калію через LCC-канали можуть проникати в перинуклеарний простір з цитоплазми чи нуклеоплазми та у зворотному напрямку. LCC-канали 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

Отже, наші дослідження показали, що найбільш перспективним блокатором LCC-каналів є Dh β E, 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_3 -рецепторів, що стане наступним етапом нашої роботи.

ВИСНОВКИ

У внутрішній ядерній мембрані кардіоміоцитів шурів наявні LCC-канали, які характеризуються спонтанною активністю, вибірковою проникністю для одновалентних катіонів та різною чутливістю до агоністів й інгібіторів н-холінорецепторів та змінних токсинів: DhβE > d-тубокурарин ≈ нікотин > NT II > dFBr > дитилін ≈ атракуріум ≈ піпекуронію бромід > рокуронію бромід > α-СТХ. Ці канали коекспресуються з IP₃-рецепторами, котрим притаманна різна чутливість до Ca²⁺, що може мати важливе значення для поширення Ca²⁺-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 ± 13 пСм, які характеризуються потенціалзалежністю, вибірковою проникністю одновалентних катіонів K⁺ та Na⁺ і непроникністю Cl⁻ та Ca²⁺.

3. На функціональну активність LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів впливають деякі змінні токсини. Найефективнішим серед перевірених є NT II (0,025 ммоль/л), в той час як α-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), DhβE (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), α-колотоксин 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 IP₃-рецепторів з провідністю 384 ± 5 пСм. Залежність ймовірності перебування IP₃-рецепторів у відкритому стані є потенціалзалежною і регулюється концентрацією IP₃ та Ca²⁺ у середовищі.

7. IP₃-рецептори внутрішньої ядерної мембрани кардіоміоцитів характеризуються різною чутливістю до Ca²⁺: для частини з них притаманна класична дзвоноподібна залежність від його концентрації (з повним інгібуванням за 1 мкмоль/л Ca²⁺), тоді як для іншої частини графік залежності їхнього P_o від концентрації Ca²⁺ зміщений праворуч й інгібування починається за 10 мкмоль/л Ca²⁺.

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 IP₃-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 IP₃Rs 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. IP₃Rs 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 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, **Kotyк O**, Pavlova N, Kalnytska O, Kudriashova M, Marchenko S. IP₃Rs 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, **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: Izdawnictwo “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. **Kotyk O**, Kotliarova A, Polishchuk A, Marchenko S. The properties of ion channels in the nuclear envelope of cardiomyocytes. 2nd 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, **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. *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*

АНОТАЦІЯ

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

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин (біологічні науки). – Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2020.

Серед спонтанно активних іонних каналів внутрішньої ядерної мембрани кардіоміоцитів, найчастіше реєстрували струм через LCC-канали з провідністю

209 ± 13 пСм. Ці канали характеризуються потенціалзалежністю, вибірковою проникністю одновалентних катіонів K^+ та Na^+ і непроницністю Cl^- та Ca^{2+} . Послідовність ефективності інгібування LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів агоністами та інгібіторами н-холінорецепторів і змінними токсинами виглядає так: Dh β E > d-тубокурарин \approx нікотин > NT II > dFBr > дитилін \approx атракуріум \approx піпекуронію бромід > рокуронію бромід > α -CTX. Не впливають на досліджувані канали: гексаметоній, α -коноксин PeIA, MLA, PNU 282987 і карбахолін.

P_o IP₃-рецепторів внутрішньої ядерної мембрани кардіоміоцитів є потенціалзалежною, зростає зі збільшенням концентрації IP₃ (максимум за 10 мкмоль/л IP₃ у середовищі). IP₃-рецептори також характеризуються різною чутливістю до Ca^{2+} : для частини притаманна класична дзвоноподібна залежність від його концентрації (з повним інгібуванням за 1 мкмоль/л Ca^{2+}), тоді як для іншої частини графік залежності P_o від концентрації Ca^{2+} зміщений праворуч й інгібування починається за 10 мкмоль/л Ca^{2+} .

Отже, у ядерній мембрані кардіоміоцитів наявні два підтипи IP₃-рецепторів, котрі відрізняються за чутливістю Ca^{2+} та LCC-канали, котрі з різною ефективністю інгібуються агоністами й інгібіторами н-холінорецепторів.

Ключові слова: LCC-канали, IP₃-рецептори, Ca^{2+} -сигналізація, агоністи та інгібітори н-холінорецепторів, ядерна мембрана, кардіоміоцити

АННОТАЦІЯ

Котик Е.А. Электрофизиологические свойства катионных каналов большой проводимости и инозитол-1,4,5-трифосфатных рецепторов ядерной мембраны кардиомиоцитов. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.13 – физиология человека и животных (биологические науки). – Институт физиологии имени А.А. Богомольца НАН Украины, Киев, 2020.

Среди спонтанно активных ионных каналов внутренней ядерной мембраны кардиомиоцитов, наиболее часто регистрировали токи через LCC-каналы с проводимостью 209 ± 13 пСм. Эти каналы характеризуются потенциалзависимостью, избирательной проницаемостью одновалентных катионов K^+ и Na^+ , непроницаемостью Cl^- и Ca^{2+} . Последовательность эффективности ингибирования LCC-каналов ядерной мембраны кардиомиоцитов агонистами и ингибиторами н-холинорецепторов и змеиными токсинами выглядит так: Dh β E > d-тубокурарин \approx никотин > NT II > dFBr > дитилін \approx атракуриум \approx пипекурония бромид > рокурония бромид > α -CTX. Не влияют на исследуемые каналы: гексаметоний, α -коноксин PeIA, MLA, PNU 282987 и карбахолін.

P_o IP₃-рецепторов внутренней ядерной мембраны кардиомиоцитов потенциалзависима и растёт с увеличением концентрации IP₃ (максимум за 10 мкмоль/л IP₃ в среде). IP₃-рецепторы также характеризуются разной чувствительностью к Ca^{2+} : для части присуща классическая колоколовидная зависимость от его концентрации (с полным ингибированием при 1 мкмоль/л Ca^{2+}),

тогда как для остальной части график зависимости P_o от концентрации Ca^{2+} смещен вправо и ингибирование начинается за 10 мкмоль/л Ca^{2+} .

Полученные результаты показывают, что в ядерной мембране кардиомиоцитов имеются два подтипа IP_3 -рецепторов, которые отличаются чувствительностью к Ca^{2+} , а также ЛСС-каналы, которые с разной эффективностью ингибируются агонистами и ингибиторами н-холинорецепторов.

Ключевые слова: ЛСС-каналы, IP_3 -рецепторы, Ca^{2+} -сигнализация, агонисты и ингибиторы н-холинорецепторов, ядерная мембрана, кардиомиоциты

SUMMARY

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

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

For the first time, several types of spontaneously active channels with different conductance (from 10–340 pS) have been detected in the inner nuclear membrane of cardiomyocytes. Among them, LCC-channels with conductance 209 ± 13 pS are the most expressed. These channels have relatively slow kinetics; at positive potentials (+40 mV) they remain in the open state most of the time ($NP_o = 3.11$), whereas at negative potentials (-40 mV) their activity decreases ($NP_o = 0.72$). K^+ ions permeate well through LCC-channels, to a lesser extent Na^+ , and LCC-channels are 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.

Purified neurotoxin II at a concentration of 25 μ M reduces amplitude of the current through these channels by 13 %. After applying 1–2 mM of α -cobratoxin, a slight channel flickering is observed. The effects of all tested substances are reversed – after washing with the working solution, current through the LCC-channels returns to the control values.

Under the influence of d-tubocurarine (200 μ M), the amplitude of the current through the nuclear membrane's LCC-channels in cardiomyocytes decreases by 45 %. Under the influence of 25 μ M Dh β E, a 40 % decrease in current through the channel is observed. At high concentrations of atracurium and dithylinum, P_o decreases and channel flickering is observed, indicating physical blockade of the channel pore in its open state. However, there is no complete blocking even at 2 mM blocker concentration. Non-depolarizing neuromuscular relaxant rocuronium bromide dose-dependently reduces current amplitude through the channels, inhibits them by half at concentration of 2 mM and reduces probability of them being in an open state by half.

A similar effect on LCC-channels functional activity is induced by pipecuronium bromide. Other investigated n-cholinoinhibitors – hexamethonium, MLA, α -conotoxin PeIA were proved ineffective. In the following series of experiments, the effects of n-cholinoreceptor agonists are tested. In particular, nicotine at a concentration of 10 to 200 μ M dose-dependently decreases current amplitude through LCC-channels. After dFBr

application at a concentration of 200 μM , the amplitude of the current through the channel decreases by 21 % and channel flickering is observed. Whereas, other investigated n-cholinoreceptor agonists – PNU 282987 and carbachol did not cause statistically significant changes in LCC-channels functioning.

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

In the nuclear membrane of cardiomyocytes, a channel that is activated by IP₃ (0.2–20 μM) and inhibited by 2-APB (50 μM) was detected. On this basis, we concluded that the channel is IP₃Rs. It's known from the literature that the most expressed IP₃Rs in cardiomyocytes are type II and we have confirmed that via immunohistochemical analysis. Probability of IP₃Rs being in open state (P_o) is potential-dependent, with higher activity of IP₃Rs observed at positive potential values (+40 mV $P_o = 0.043$, +60 mV $P_o = 0.125$), while at negative values their activity decreases (-40 mV $P_o = 0.025$, -60 mV $P_o = 0.005$). The probability of an open state of investigated receptors increases with increasing IP₃ concentration and peaks at a concentration of 10 μM IP₃ in the solution ($NP_o = 0.292$). In the following series of experiments, we investigate the effect of Ca²⁺ ions in different concentrations on IP₃Rs activity. In particular, we were able to detect two subtypes of IP₃Rs, one of which is inhibited by high concentrations of Ca²⁺, which corresponds to the classical pattern of bell-shaped activity dependent on Ca²⁺ concentration. This is also confirmed by literature, according to which high Ca²⁺ concentrations inactivate purified cardiac IP₃Rs. The other type of IP₃Rs has a significantly right-shifted activity dependence, their inhibition starts at 10 μM Ca²⁺, but a few single-channel openings remain at 1 mM of Ca²⁺ in the solution.

The properties of IP₃Rs in the nuclear membrane of cardiomyocytes differ sharply from both neuronal IP₃Rs type I receptors and heterologously expressed IP₃Rs type II. This may be explained by the influence of post-translational modifications and the molecular environment. Such heterogeneity contributes significantly to temporal and spatial propagation of the intracellular calcium signal in the nucleus.

The results demonstrate two subtypes of IP₃ receptors in the nuclear membrane of cardiomyocytes that differ in sensitivity to IP₃, Ca²⁺ and LCC-channels, which are inhibited by agonists and inhibitors of n-cholinoreceptors with different effectiveness.

Keywords: LCC-channels, IP₃Rs, Ca²⁺-signaling, n-cholinoreceptor agonists and inhibitors, nuclear membrane, cardiomyocytes