

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

ЛУНЬКО ОЛЕСЯ ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 577.352.2

**МОДУЛЯЦІЯ КАТІОННИХ КАНАЛІВ ВЕЛИКОЇ ПРОВІДНОСТІ
ВНУТРІШНЬОЇ МЕМБРАНИ ЯДЕР НЕЙРОНІВ ПУРКІНЬЄ МОЗОЧКА
ЩУРІВ**

03.00.02 – біофізика

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі фізико-хімічної біології клітинних мембран Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України

Науковий керівник:

доктор біологічних наук

Марченко Сергій Михайлович

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України,
завідувач відділу фізіології головного мозку

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук

Савченко Леонід Петрович

старший науковий співробітник

відділу клінічної та експериментальної епілепсії

Інституту неврології Університетського коледжу

Лондона, Великобританія

кандидат біологічних наук

Сидоренко Вадим Геннадійович

старший науковий співробітник

відділу фармакології клітинних сигнальних систем та

експериментальної терапії

Державна установа "Інститут фармакології та

токсикології НАМН України"


Захист дисертації відбудеться «13» квітня 2021 р. о 14:00 на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.0 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 «12» березня 2021 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук



О.П. Любанова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Ядро – найважливіша органела, виникнення якої (разом з ендоплазматичним ретикулумом та мітохондріями) сформувало еволюційно новий домен організмів – еукаріоти. Структурно-функціональна організація ядра задіяна у збереженні та транскрипції генетичної інформації, що забезпечується синтезом РНК і переміщенням невеликих молекул та іонів крізь ядерну оболонку, утворену двома мембранами. Функції ядра здійснюються через різноманітні системи транспорту, які беруть участь у переміщенні молекул крізь оболонку ядра, а також вивільненні та поглинанні іонів, та які мають тонкий механізм взаєморегуляції. До цих транспортних систем належать іонні канали, які опосередковують фундаментальні клітинні процеси, починаючи від поділу клітини та закінчуючи її загибеллю. Зокрема, канали ядерної оболонки беруть участь в регуляції експресії генів, забезпеченні синаптичної пластичності, внутрішньоклітинній сигналізації тощо (Hardingham et al., 1998; Bading, 2013; Gerasimenko et al., 2003). Механізми регуляції цих процесів залежать від закономірностей функціонування залучених іонних каналів та їх структурних особливостей, які визначають чутливість до зміни трансмембранного потенціалу та хімічних модуляторів. Зовнішні стимули викликають конформаційні зміни іонного каналу, які описуються кінетичними моделями з визначеною кількістю станів та константами швидкості переходу між ними. Структура та функції каналів тісно пов'язані між собою. Дослідження біофізичних властивостей каналів та їх модуляції має важливе значення, оскільки формує попередні уявлення про окремі елементи будови певного типу іонних каналів та відкриває можливості для їх подальшого вивчення (Magleby, 2017).

На теперішній час відомо багато різних іонних каналів, які існують в ядерній оболонці. Зокрема, були описані IP_3Rs та $RyRs$, низка катіонних та аніонних каналів, а також потенціал-керовані і кальційактивовані калієві канали (Tabares et al., 1991; Mak & Foskett, 1994; Gerasimenko et al., 1995; Rousseau et al., 1996; Chen et al., 2011; Singh et al., 2012; Jang et al., 2015). Різні типи каналів були виявлені на оболонці ядра ооцитів, кардіоміоцитів, гепатоцитів, ацинарних клітин підшлункової залози, волокнах поперечносмугастих і гладеньких м'язів, нейронів ЦНС та інших клітин (Bustamante, 1992; Maruyama et al., 1995; Assandri & Mazzanti, 1997; Draguhn et al., 1997; Franco-Obregón et al., 2000; Marchenko et al., 2005; Yarotsky & Dirksen, 2014). Фактично лише одиниці з цього різноманіття описаних каналів є детально дослідженими в аспекті їх кінетики, структури та фізіологічної ролі. Відповідно, відсутність такої інформації у достатньому обсязі, ускладнює моделювання та комплексне розуміння процесів, до яких залучена ядерна оболонка та які опосередковують основні функції ядра. Відтак залишаються не з'ясованими механізми розвитку патологічних станів, пов'язаних з порушеннями цих процесів, та потенційні ефективні шляхи усунення цих станів (Ashcroft, 2006).

В нейронах Пуркінє мозочку у внутрішній мембрані ядра найбільш розповсюджені спонтанноактивні Катіонні канали великої провідності (Large conductance cationic channels, LCC) (Marchenko et al., 2005). Ці канали мають провідність ~ 200 пСм, вони селективні до моновалентних катіонів, а щільність їх розташування в середньому складає 3-5 каналів на 1 мкм^2 поверхні мембрани ядра.

У ядерній оболонці клітин ЦНС також були описані канали пірамідних нейронів ділянки CA1 та гранулярних нейронів гіпокампа із подібними характеристиками (Fedorenko et al., 2010). Ні амінокислотна послідовність LCC-каналів, ні їх структура, ні фізіологічна роль дотепер невідомі. Існує гіпотеза що, ці канали залучені до формування балансу іонів калію по обидва боки від зовнішньої та внутрішньої мембрани оболонки ядра. Таким чином, впливаючи на заряд ядерної оболонки, вони можуть впливати на тривалість кальцієвих сигналів в цитоплазмі та нуклеоплазмі клітин – найважливіших феноменів клітинної сигналізації (Marchenko et al., 2005). Гіпотеза про компенсацію негативного заряду ядерної оболонки шляхом зворотного потоку позитивно заряджених іонів, яка пропонується для LCC-каналів не є унікальною, а висувається також для інших типів каналів ядерної оболонки або ендो-/саркоплазматичного ретикулула (Yamashita et al., 2006; Takeshima, et al., 2015). Для підтвердження, спростування чи уточнення цієї гіпотези катастрофічно бракує експериментальних даних щодо біофізичних та фармакологічних характеристик вказаних каналів. Повідомлялося, що LCC-канали мають повільну кінетику (Marchenko et al., 2005), але відповідна модель до цього часу відсутня. Це принципово ускладнює моделювання процесів, до яких можуть бути залучені ці канали, та обмежує можливості визначення механізмів впливу модуляторів різної природи. Окрім цього, раніше не було виявлено жодних блокаторів LCC-каналів, а відсутність інформації про їх фармакологічний профіль є суттєвою перешкодою на шляху до визначення молекулярної ідентичності та фізіологічної ролі, яку вони виконують. Тому, для розвитку подальших фундаментальних досліджень LCC-каналів пошук таких сполук та опис механізму їх дії є виключно актуальною задачею.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано в рамках науково-дослідної тематики відділу Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України “Клітинні та молекулярні механізми функціонування нейронів головного мозку в нормі та патології”, № державної реєстрації 0113U007275, яка входить до зведеного плану НДР НАН України.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було визначити зміни параметрів трансмембранних струмів LCC-каналів під впливом низки модулюючих факторів.

Для досягнення цієї мети необхідно було вирішити наступні завдання:

1. Знайти ефективні блокатори LCC-каналів.
2. Охарактеризувати модулюючий вплив знайдених блокаторів на трансмембранні струми LCC-каналів.
3. Оцінити ефект швидкого блокування з використанням спрощеної кінетичної моделі.
4. Вибрати адекватну кінетичну модель LCC-каналів.
5. Визначити механізм дії швидких блокаторів з використанням встановленої адекватної кінетичної моделі LCC-каналів.

Об'єкт дослідження – LCC-канали внутрішньої ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка щура.

Предмет дослідження – зміни параметрів трансмембранних струмів LCC-каналів, викликані модулюючими факторами.

Методи дослідження: реєстрація струмів поодиноких каналів внутрішньої мембрани ядра з використанням петч-клемпу в режимі фіксації потенціалу в конфігурації inside-out, аналіз β -розподілу амплітудних гістограм струмів LCC-каналів.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше знайдено блокатор LCC-каналів внутрішньої мембрани ядра – d-тубокурарин (dTC), охарактеризовано його вплив на струми цих каналів. Вперше показано та охарактеризовано вплив іонів гадолінію на LCC-канали. Виявлено та детально описано вплив галламіну на струми LCC-каналів. Проаналізовано вплив природних отрут п'яти отруйних тварин та визначено яка із них найбільш перспективна для подальшого фракціонування з метою виділення високоафінного блокатора. Описана кінетика LCC-каналів у стаціонарному та нестаціонарному стані, охарактеризовано повільні та швидкі події в реєстраціях поодиноких каналів. Виявлено конформаційні стани LCC-каналів тривалістю в декілька мікросекунд. Вперше створена адекватна кінетична модель для LCC-каналів та встановлено, що топологія цієї моделі включає в себе один відкритий стан, один підрівень та три закритих стани. На базі отриманої моделі Маркова розкрито механізм дії галламіну та зроблено певні припущення про структурні особливості LCC-каналів.

Теоретичне та практичне значення одержаних результатів. Отримані результати мають, передусім, фундаментальне значення, оскільки вони вперше детально характеризують кількісно кінетику LCC-каналів. Розроблено адекватну кінетичну модель Маркова, що передбачає основні стани, в яких перебуває іонний канал, та переходи між ними з відповідними константами швидкості. Отримані результати надають нові можливості для подальшого аналізу механізмів модуляції LCC-каналів під впливом широкого спектру факторів, в тому числі при взаємодії з різними молекулами та іонами, а також для дослідження ворітного механізму та структурно-функціональних зв'язків. Знайдені блокатори вперше окреслюють фармакологічний профіль LCC-каналів і відкривають нові перспективи для майбутніх досліджень їхньої фізіологічної ролі, а опис механізму дії цих блокаторів дозволяє отримати відомості про структуру цих каналів.

Особистий внесок здобувача. Автором особисто виконані всі електрофізіологічні експерименти, запропонована інтерпретація їх результатів та сформульовані висновки. Аналіз швидких подій проведено разом із співробітником відділу фізико-хімічної біології клітинних мембран Олексієм Луньком. Алгоритм симуляції реєстрації струмів через поодинокі іонні канали та пакет скриптів для аналізу β -розподілу гістограм в програмному забезпеченні MATLAB було розроблено Олексієм Луньком. Визначення мети дослідження, планування роботи, обговорення результатів експериментів проводилися за участі наукового керівника.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації доповідались та обговорювались на V Конгресі Українського товариства нейронаук (Київ, 2011), VII Міжнародному симпозіумі “Актуальні проблеми біофізичної медицини” (Київ, 2012), II Науковій конференції молодих вчених “Фізіологія: від молекули до організму” (Київ, 2012), III Науковій конференції молодих вчених “Фізіологія: від молекули до організму” (Київ, 2013), XIX Конгресі українського фізіологічного товариства, присвяченому 90-річчю академіка П.Г. Костюка (Київ,

2014), Міжнародній конференції “Механізми функціонування фізіологічних систем” (Львів, 2014), Міжнародному науковому конгресі “Шевченківська весна” (Київ, 2016), XX Конгресі українського фізіологічного товариства, присвяченому 95-річчю академіка П.Г. Костюка (Київ, 2019).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 16 наукових робіт, у тому числі 6 статей у фахових наукових журналах та 10 тез доповідей на конгресах, з'їздах і конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, викладення результатів дослідження, обговорення результатів, висновків і списку використаних джерел, який включає в себе 305 посилань. Робота викладена на 155 сторінках машинописного тексту, містить 5 таблиць, проілюстрована 47 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження

Виділення ядер нейронів Пуркінє. Експерименти проводили на щурах лінії Вістар віком 2–3 тижні (P14–21). Після декапітації тварини, мозочок швидко виділяли та промивали розчином для інкубації, який містив (у мМ): калію глюконат 150, NERES-КОН 5 (рН 7,3). Після цього мозочок переносили на холодну пластину і робили зрізи завтовшки приблизно 1 мм. Зрізи поміщали по одному в епандорфи з розчином для інкубації. Зразки залишали в морозильній камері (–25 °С). Перед експериментом зразки розморожували і гомогенізували шляхом пропускання через голку для ін'єкцій із внутрішнім діаметром 0,34 мм (23G). Для отримання фракції, яка містить ядра, гомогенат центрифугували протягом 5 хвилин (1000g) використовуючи центрифугу MiniSpin (Eppendorf, Німеччина). До осаду, який містив ядра клітин, додавали 1 мл базового розчину (у мМ): KCl 150, NERES-КОН 5 (рН 7,3). Отриману суміш додавали до базового розчину в робочій камері, розсташованій на інвертованому мікроскопі Leica DMIRB (Leica Microsystems, Німеччина), де ядра осідали протягом 2–3 хв та щільно прикріплювалися до поверхні скла експериментальної камери. В результаті виконання описаної процедури ядра були придатними для петч-клемп реєстрації струмів.

Електрофізіологічна реєстрація трансмембранних струмів. Струми поодиноких іонних каналів внутрішньої мембрани ядер нейронів Пуркінє реєстрували на ізольованій ділянці мембрани ядра із використанням методу петч-клемп в конфігурації inside-out у режимі фіксації потенціалу. Петч-піпетки виготовляли з боросилікатного скла (Sutter Instruments, США), опір яких варіював від 10 до 15 МОм. Для виготовлення піпеток користувалися пулером PC-10 (Narishige, Токіо, Японія). Діаметр піпеток становив приблизно 1 мкм. Реєстрацію струмів поодиноких каналів здійснювали в симетричному базовому розчині при кімнатній температурі (20–22°C) з використанням підсилювача VP-500 (Bio-Logic, Кле, Франція) з п'ятиполюсним фільтром нижніх частот Бесселя (5 кГц) та оцифровували з частотою 20 кГц, якщо не вказано інше. Реєстрації поодиноких каналів контролювали за допомогою програмного забезпечення Visual-Patch v.1.27. Мембранний потенціал змінювали в діапазоні від –80 до +80 мВ з кроком 20 мВ.

Аналіз трансмембранних струмів. Для аналізу швидких подій LCC-каналів використовували пакет скриптів “ β -dist”, розроблений Олексієм Луньком для MATLAB. Для побудови амплітудних гістограм були відібрані ділянки реєстрацій з відкритим станом і без тривалих закривань каналу. По формі гістограми візуально попередньо оцінювали кількість станів в топології кінетичної моделі LCC-каналів. В матриці переходів ітераційним методом підбирали константи швидкості переходів між станами. Додатково вносили значення амплітуди струму, величини шуму експериментальної установки, а також частоти фільтрування та дискретизації. На основі введених параметрів з використанням алгоритму програми отримували симуляцію реєстрації струму та здійснювали підбір констант швидкості переходів між станами моделі, поки не досягалось оптимальне значення критерію (error sum, суми похибок) за формулою, як це описаною в Schroeder & Hansen, 2007:

$$\sum_{i=1}^{N_I} \frac{(A_{exp,i} - A_{theo,i})^2}{A_{exp,i} + 0.1}, \quad (1)$$

де $A_{exp,i}$ та $A_{theo,i}$ – кількість подій в i -ому інтервалі в експериментальній та теоретичній амплітудній гістограмі відповідно, N_I – кількість інтервалів. Для блокаторів в кінетичну модель вводили додатковий стан блокування з аналогічним визначенням відповідних констант швидкості.

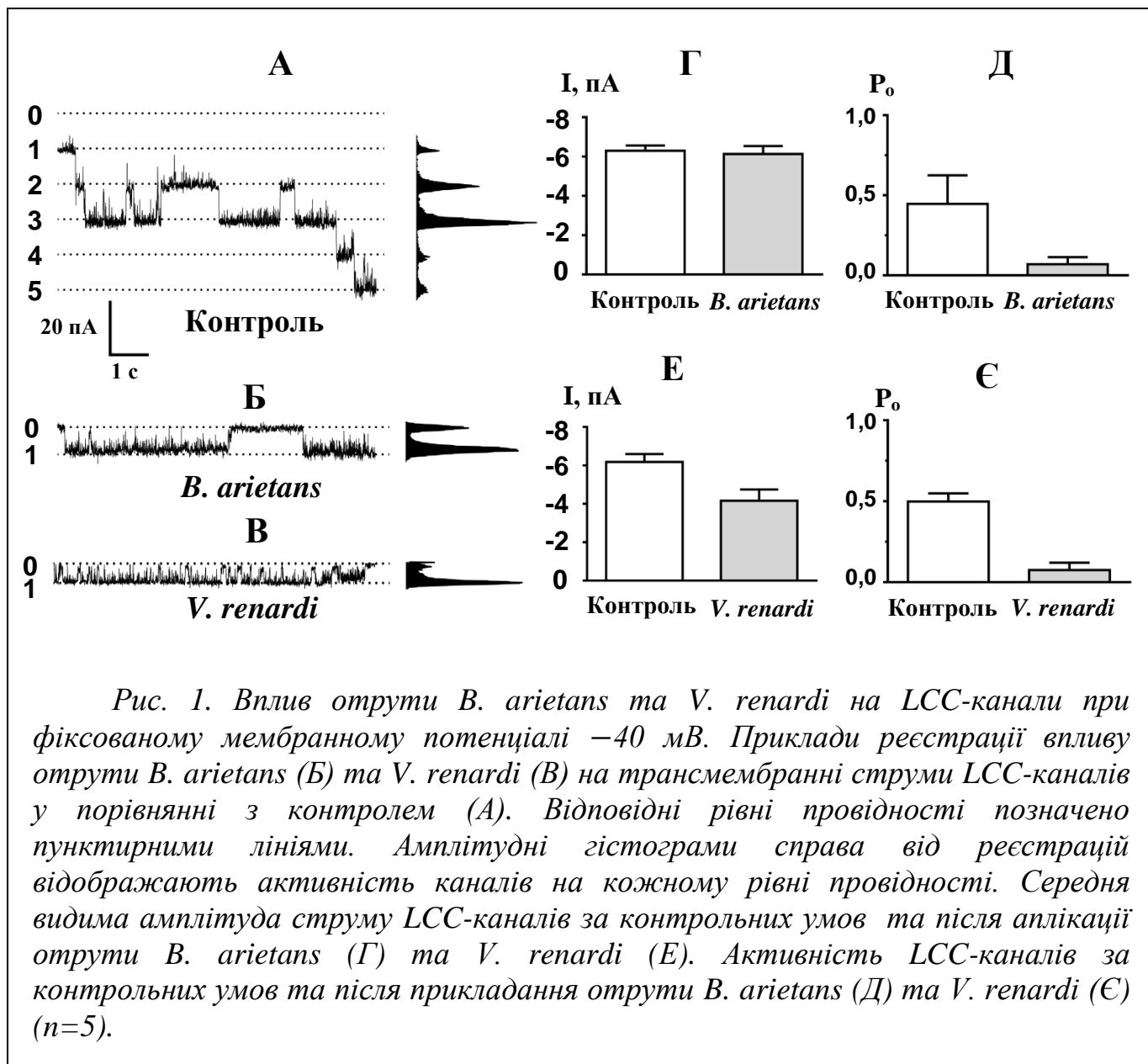
Статистична обробка результатів досліджень. Числові дані були проаналізовані за допомогою пакету скриптів “ β -dist” для MATLAB, “Clampfit 9.0” (Axon Instruments Inc., США) та Origin 8.5 (OriginLab, США). Результати представлено як середні значення \pm стандартна похибка середнього значення у випадку, якщо не зазначено інше. Для визначення впливу гадолінію було використано непарний тест Стьюдента. Різниці між групами вважалися статистично значущими за $p < 0,05$.

Результати досліджень

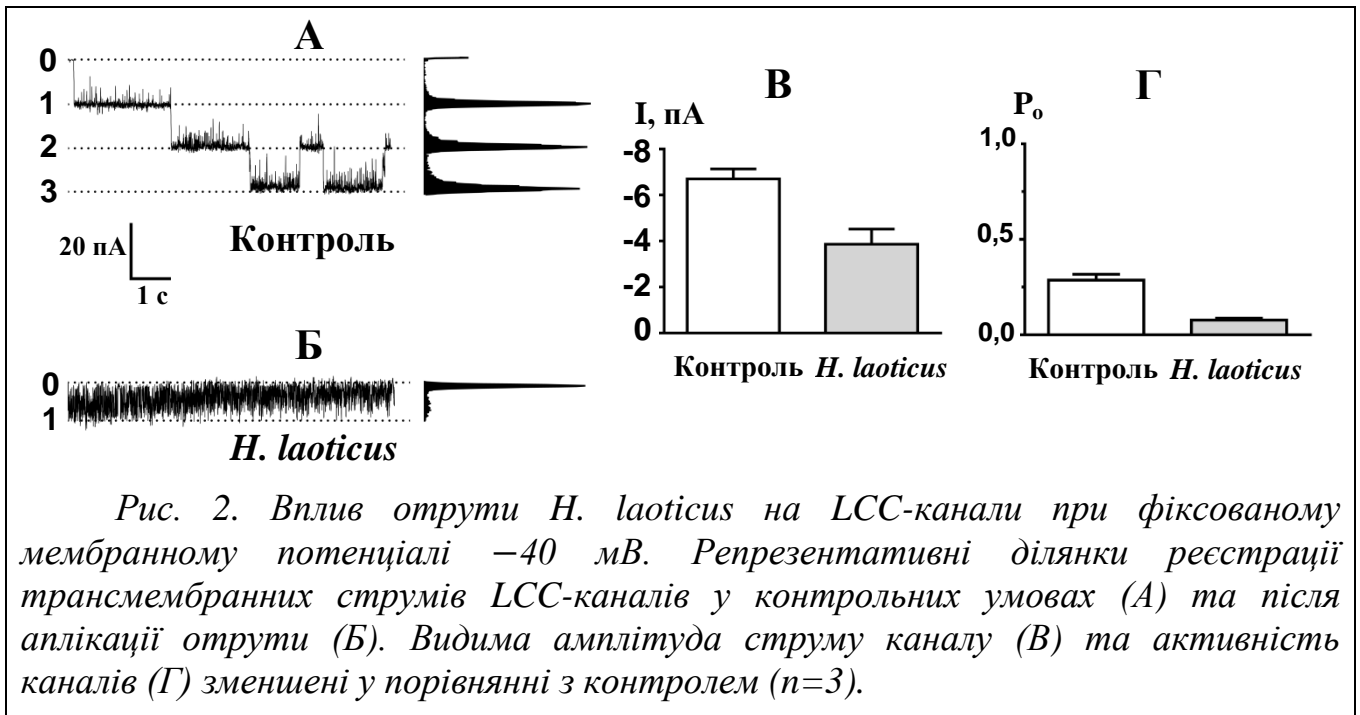
Дослідження впливу екстрактів цілісних природних отрут. Для пошуку потенційного блокатора LCC-каналів було досліджено зміни біофізичних властивостей LCC-каналів внутрішньої мембрани ядер нейронів Пуркінє під впливом комплексу токсинів п’яти отруйних тварин: крайта стрічкового (*Bungarus fasciatus*), гадюки шумливої (*Bitis arietans*), гадюки степової (*Vipera renardi*), кобри моноклевої (*Naja kaouthia*) і скорпіона лісового (*Heterometrus laoticus*). Отрути розводили в деіонізованій воді та додавали через локальну аплікацію в кількості 10 мкл у експериментальну ванночку об’ємом 200 мкл. Експериментально була підібрана умовна концентрація, яка би дозволяла виявити максимальний вплив тієї чи іншої отрути, з можливістю його попередньої оцінки. Так як отрути є сумішами різних компонентів, в тому числі неідентифікованих, визначення точної концентрації в принципі неможливе.

Трансмембранні струми LCC-каналів внутрішньої мембрани ядер нейронів Пуркінє за контрольних умов були охарактеризовані в попередніх роботах Марченка С. М. та Федоренко О. А. (Marchenko et al, 2005; Fedorenko et al, 2010). Провідність цих каналів становила ~ 200 пСм, а ймовірність відкритого стану (P_o) при трансмембранному потенціалі -40 мВ дорівнювала приблизно 0,47.

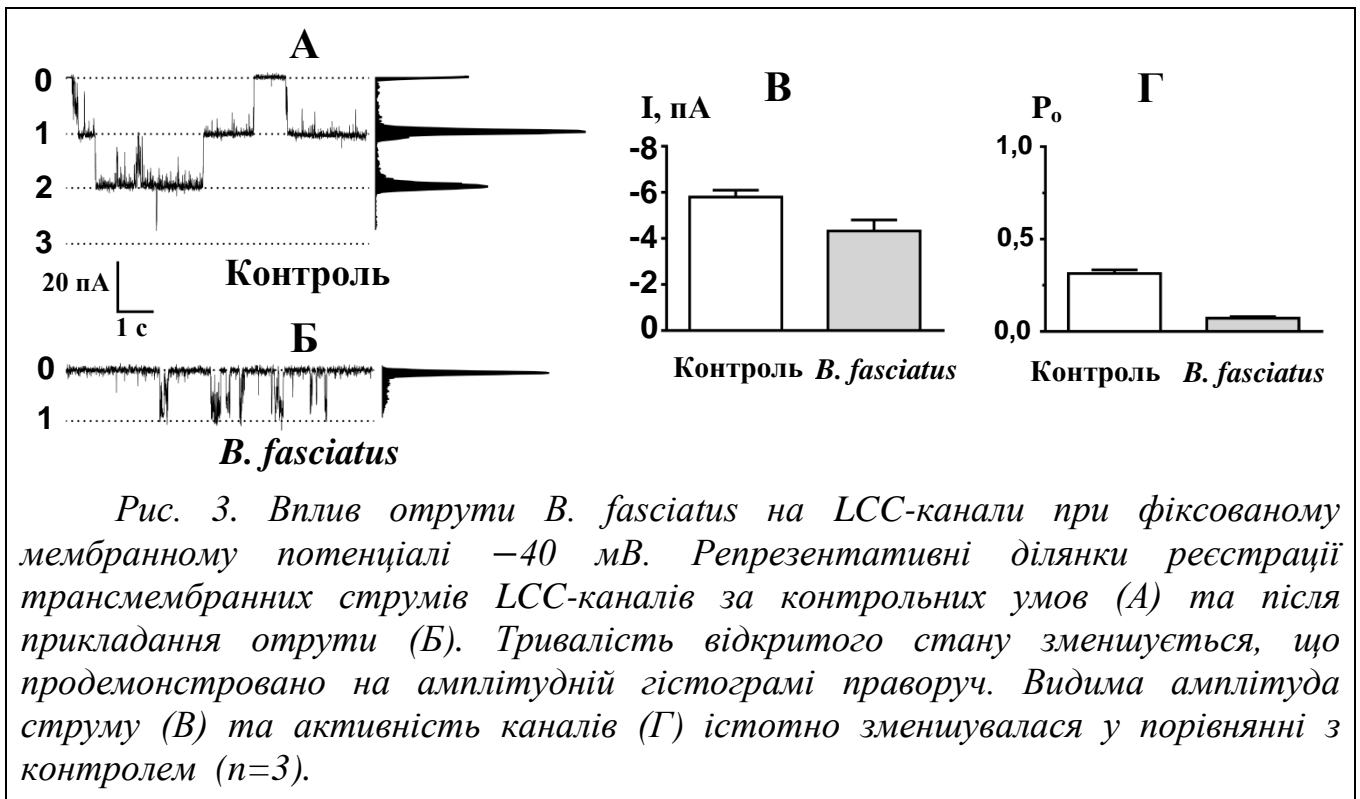
Реєстрації поодиноких LCC-каналів проводили з частотою фільтрування 1 кГц та дискретизацією 2 кГц. Вплив отруту гадюки степової *V. renardi* та шумливої *V. arietans* виявився порівняно малоефективним. Після аплікації відбувалося зменшення видимої амплітуди струму та P_o на 35% і 86% та 3% і 84% (Рис. 1), відповідно.



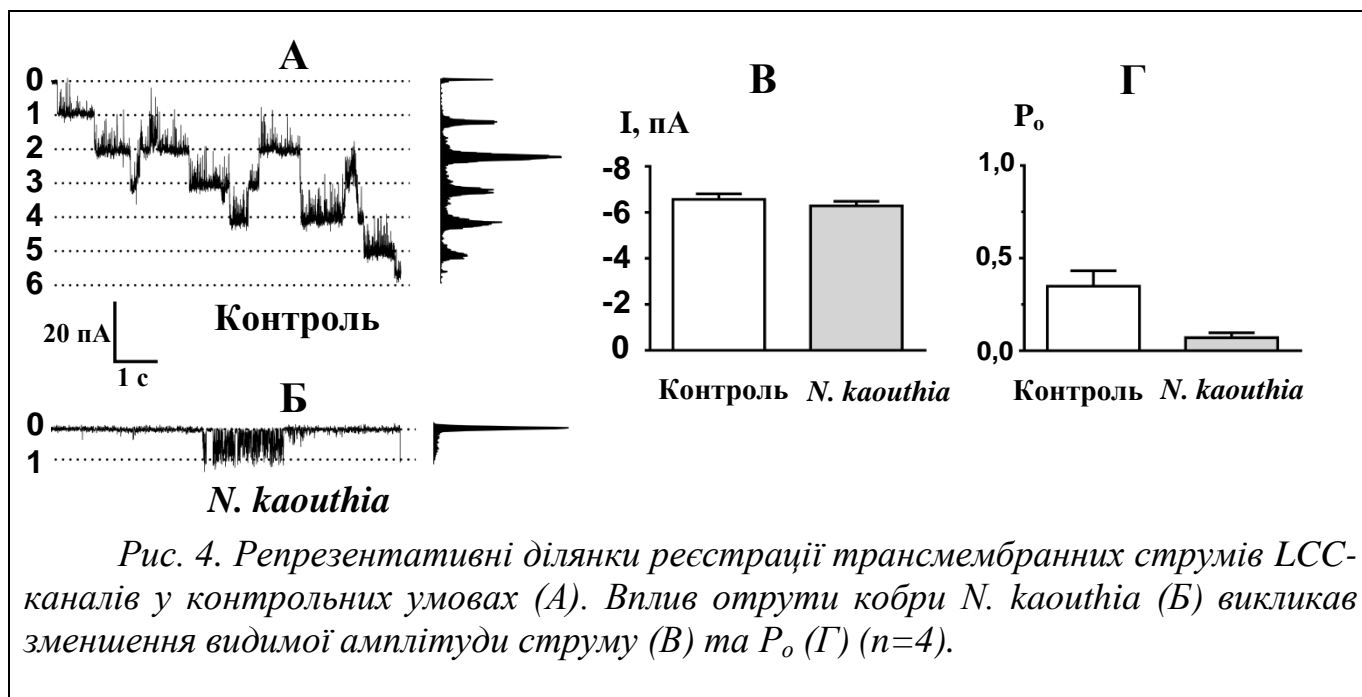
Отрута скорпіона *H. laoticus* викликала виражене швидке блокування з одночасним збільшенням шуму відкритого стану та зменшенням видимої амплітуди струму (Рис. 2). Вплив розвивався приблизно через 4 с після аплікації. Видима амплітуда струму знижувалася на 43%, а ймовірність відкритого стану на 76%.



Отрута крайта *B. fasciatus* (Рис. 3) викликала зменшення видимої амплітуди струму в середньому на 26% і струм був менш спотворений в результаті швидкого блокування. Отже, сукупна дія компонентів цієї отрути зумовлює порівняно більш повільний тип блокування. Величина P_o зменшувалася на 77% порівняно з контролем. Вплив проявлявся приблизно через 10 с після локальної аплікації; це значення було найбільшим серед інших. Дана отрута була однією з найефективніших.



У впливі отрути кобри *N. kaouthia* (Рис. 4) поєднувалися як швидке блокування, при якому видима амплітуда струму змінювалася лише на 5%, так і повільне блокування, якому відповідало тривале закривання каналу та зменшення P_o на 80%. Вплив розвивався через декілька секунд після аплікації.



Оскільки в описаних вище експериментах були задіяні цілісні неочищені отрути, механізм їх дії на LCC-канали швидше за все є комплексним, у зв'язку з тим, що одночасно можуть реалізуватися впливи різних компонентів отрути на структуро-формуєчі частини каналів. Таким чином, аналіз впливу цих речовин дозволяє отримати лише попередню оцінку їх ефективності та сформувані підґрунтя для подальшої роботи по фракціонуванню та виділенню з їх складу окремих білків або пептидів, з визначеною молекулярною структурою і масою. Було встановлено, що потенційно у всіх екстрактах містяться сполуки, які надалі можуть бути використані як блокатори LCC-каналів (Таблиця 1), але за попередньою оцінкою найбільш ефективними виявилися отрути *H. laoticus*, *B. fasciatus* та *N. kaouthia*.

Таблиця 1

Назва тварини (лат.)	Зменшення видимої амплітуди струму (I), %	Зменшення ймовірності відкритого стану (P_o), %
Скорпіон лісовий (<i>Heteromerus laoticus</i>)	43	76
Кобра моноклева (<i>Naja kaouthia</i>)	5	80
Гадюка степова (<i>Vipera renardi</i>)	35	86
Крайт стрічковий (<i>Bungarus fasciatus</i>)	26	77
Гадюка шумлива (<i>Bitis arietans</i>)	3	84

Модуляція активності LCC-каналів іонами гадолінію. Було досліджено вплив іонів Gd^{3+} в концентрації 100 мкМ при трансмембранних потенціалах -40 мВ та $+40$ мВ. Реєстрації проводили з частотою фільтрування 1 кГц та дискретизацією 5 кГц. В умовах впливу Gd^{3+} у заданій концентрації (Рис. 5) блокування проявлялося у збільшенні кількості тривалих інтервалів відсутності струму через іонний канал. Вплив Gd^{3+} змінювався в залежності від потенціалу на мембрані, а ймовірність відкритого стану каналів (P_o) із збільшенням концентрації зменшувалася (Рис. 5). Після аплікації Gd^{3+} в концентрації 100 мкМ активність LCC-каналів зменшувалася на 36 %.

Гадоліній діяв як повільний блокатор LCC-каналів, оскільки амплітуда струму при концентрації 100 мкМ майже не відрізняється від контрольних значень, в той час як його вплив на кінетику каналів ставав достатньо помітним.

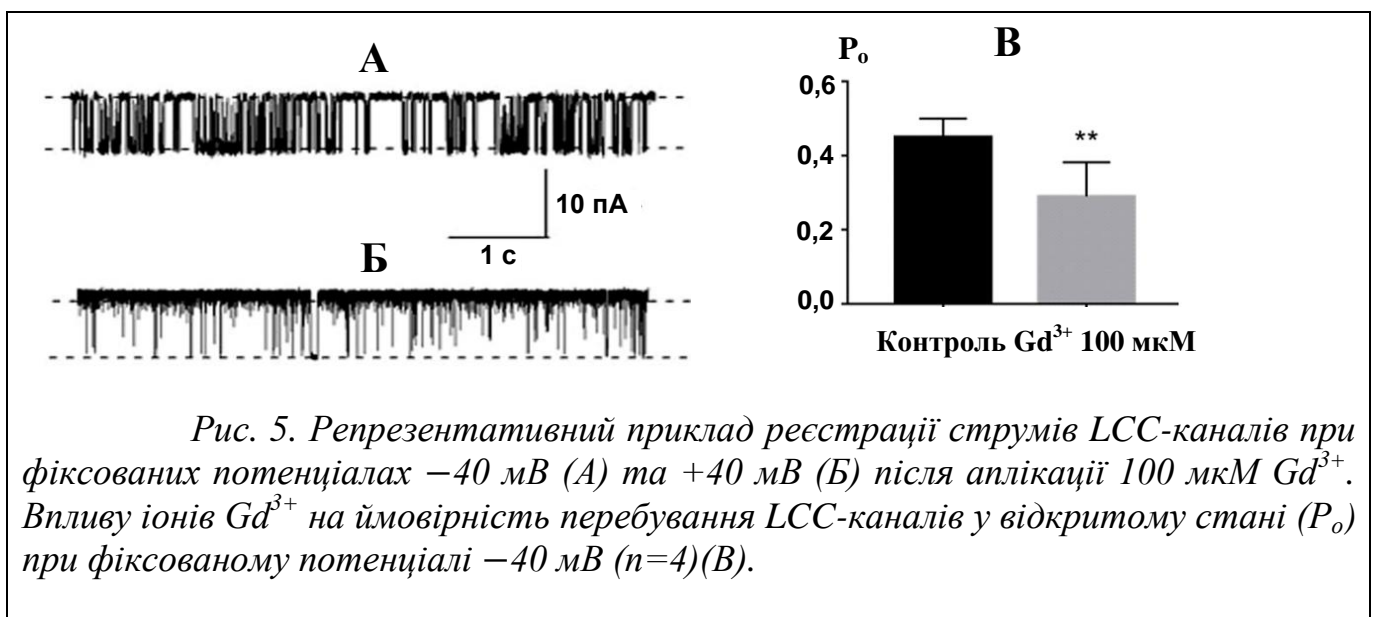


Рис. 5. Репрезентативний приклад реєстрації струмів LCC-каналів при фіксованих потенціалах -40 мВ (А) та $+40$ мВ (Б) після аплікації 100 мкМ Gd^{3+} . Впливу іонів Gd^{3+} на ймовірність перебування LCC-каналів у відкритому стані (P_o) при фіксованому потенціалі -40 мВ ($n=4$)(В).

Модуляція струмів LCC-каналів d-тубокурарином. Першим блокатором з відомою молекулярною структурою, який вдалося знайти в процесі скринінгу різних сполук, виявився природний алкалоїд d-тубокурарин (dTC) з молекулярною масою 609,7. При реєстрації струмів LCC-каналів у конфігурації inside-out на ізольованій ділянці внутрішньої мембрани ядра dTC аплікувався з боку нуклеоплазми. При аплікації даного блокатора в концентрації 10 мкМ вплив розвивався в межах 30 с і проявлявся у збільшенні кількості швидких подій в межах відкритого стану та величини шуму відкритого стану (Рис. 6, Б). Ці події можуть відповідати закритим або блокованим станам, які неможливо розрізнити між собою. Видима амплітуда струму у цьому випадку майже не зазнавала змін. Із збільшенням концентрації dTC вплив на LCC-канали посилювався і при аплікації 1,0 мМ (Рис. 6, В) зменшувалася видима амплітуда струму, що проявлялося як зміщенням піку амплітудної гістограми (Рис. 6, Г).

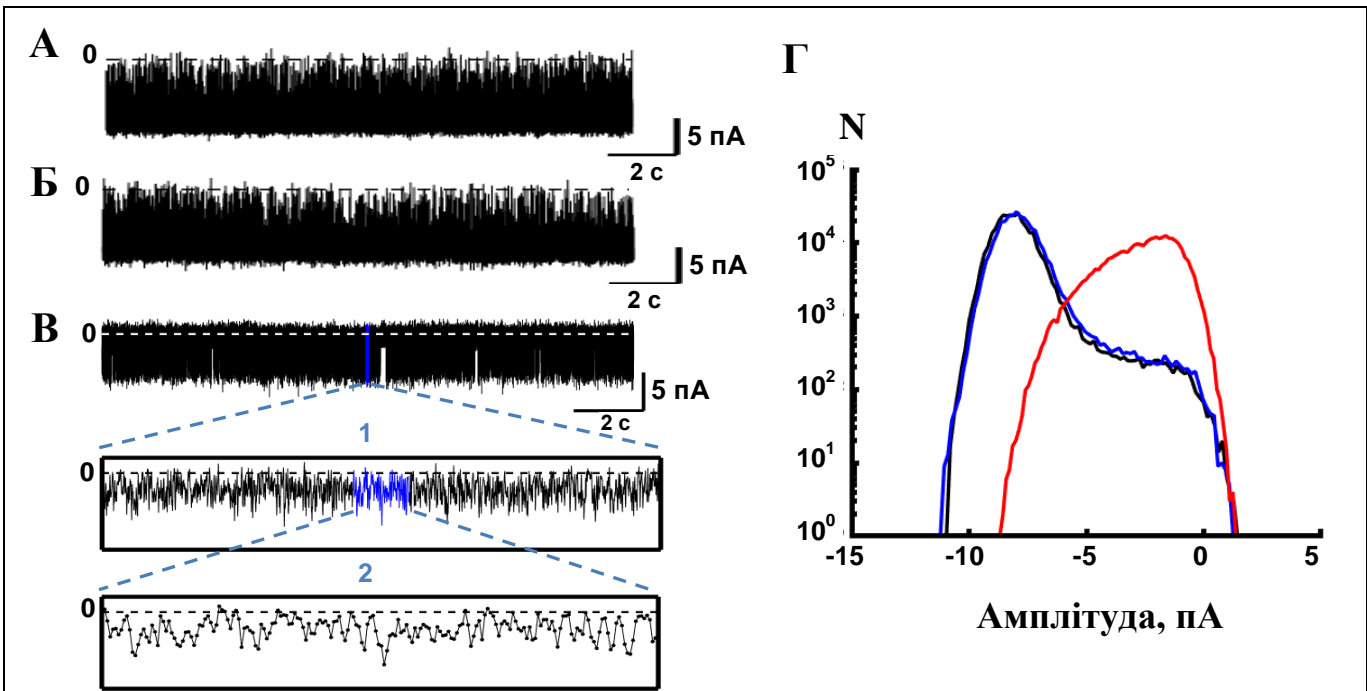


Рис. 6. Репрезентативні приклади реєстрації струмів LCC-каналів у контрольних умовах (А) та при дії dTC в концентрації 10 мкМ (Б) та 1,0 мМ (В). Нульовий рівень провідності позначено пунктирною лінією. Фіксований потенціал на мембрані -40 мВ. У вставці (1) – збільшення ділянки реєстрації струму, виділеної синім кольором на репрезентативних записах (тривалість 100 мс). У другій вставці (2) – збільшення ділянки реєстрації струму виділеної синім кольором у першій вставці (тривалість 10 мс). Показано швидкі неповні відкриття, більшість з яких не досягає ні повністю відкритого, ні закритого стану, що спричиняє зміщення амплітудної гістограми у порівнянні з контролем. Г – відповідні гістограми експериментальних даних у контролі (відображено чорною лінією), при дії dTC 10 мкМ (синьою) та dTC 1,0 мМ (червоною).

Невеликі концентрації dTC, такі як 10 мкМ, майже не впливали на струми LCC-каналів при позитивних потенціалах, але зі збільшенням негативного потенціалу на мембрані ефект проявлявся сильніше (Рис. 7, Б). Це свідчить про потенціал-залежний вплив блокатора. Спостерігалось збільшення кількості швидких подій та величини шуму відкритого стану.

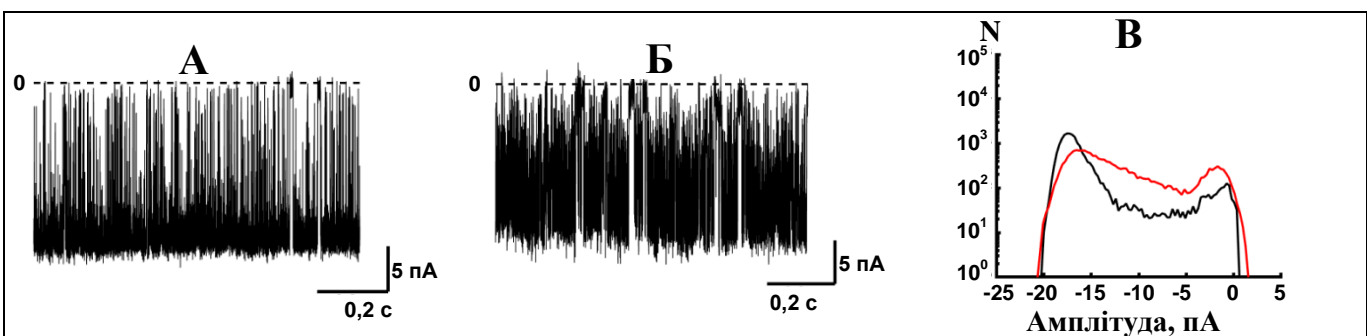
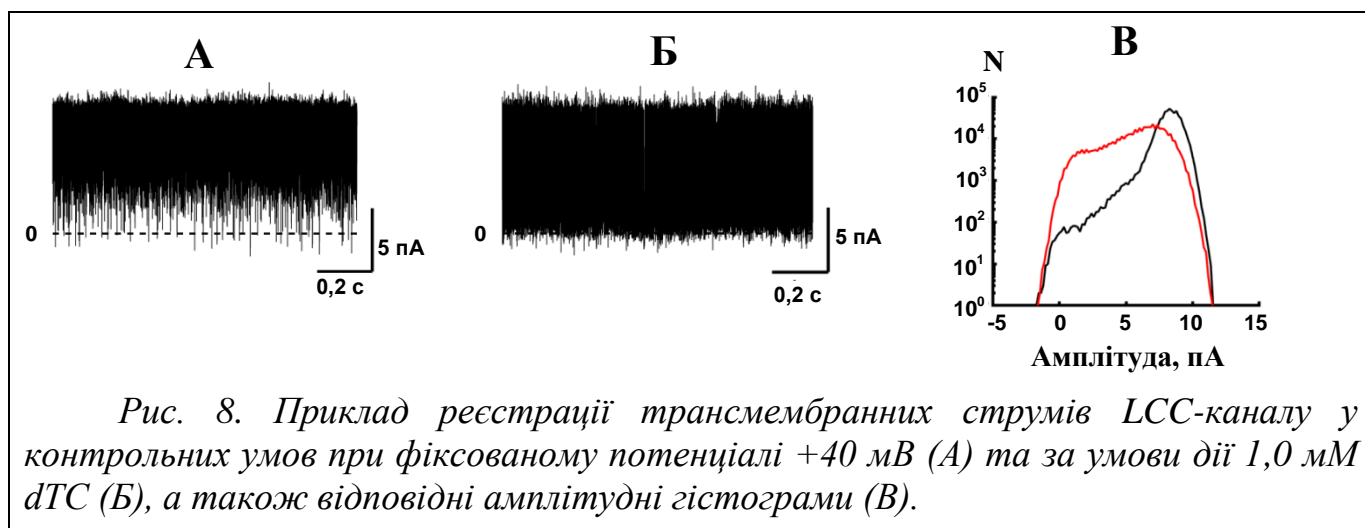
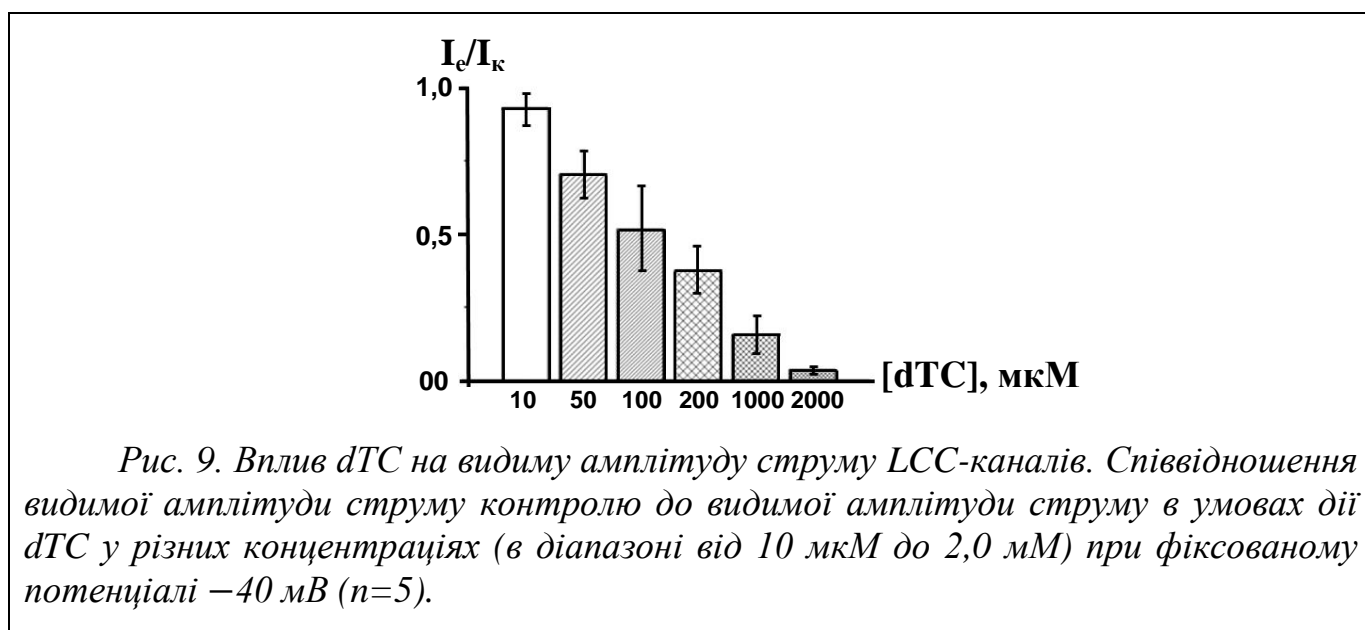


Рис. 7. Приклад реєстрації трансмембранних струмів LCC-каналу у контрольних умовах (А) та при аплікації 10 мкМ dTC (Б) при фіксованому потенціалі -80 мВ, а також відповідні амплітудні гістограми, які демонструють відхилення від нормального розподілу.

За умови збільшення концентрації dTC до 1,0 мМ блокування проявлялося не тільки при негативних потенціалах на мембрані, але також і при позитивних потенціалах. При цьому видима амплітуда струму каналів змінювалася в меншій мірі, ніж в умовах впливу при -40 мВ чи -80 мВ. У порівнянні з контролем у разі прикладеного потенціалу $+40$ мВ шум відкритого стану збільшується, внаслідок чого змінювалися значення видимої амплітуди струму (Рис. 8, Б). Подібне зміщення змінює форму амплітудної гістограми та ускладнює визначення видимої амплітуди струму.



Концентраційна залежність впливу dTC в умовах аплікації у ванночку при потенціалі -40 мВ проілюстрована на Рис. 9. Відмивання dTC тривало більше 5 хв, поки струми LCC-каналів повністю відновлювалися до контрольного рівня. Якщо dTC знаходився всередині піпетки в концентрації 100 мкМ, ніякого впливу не спостерігалось, але при збільшенні концентрації до 1,0 мМ виявлявся ефект, який не залежав від потенціалу і розвивався протягом досить тривалого часу.



Характерною рисою впливу dTC є виникнення швидких закривань в межах відкритого стану (показано на вставці зі збільшенням на Рис. 6, В) з одночасним зменшенням амплітуди струму та збільшенням шуму відкритого стану LCC-каналів, що виникає по мірі збільшення концентрації dTC в зовнішньому розчині. Внаслідок збільшення шуму амплітудна гістограма змінюється таким чином, що нормальний (гауссівський) розподіл зміщується та утворюється так званий β -розподіл. Зменшення видимої амплітуди струму може бути обумовлено швидкою взаємодією блокатора з каналом. Внаслідок цього з'являються швидкі події блокування, які відбуваються поза межами роздільної здатності реєструючої системи. Саме такий вплив зі збільшенням шуму відкритого стану каналу притаманний для швидких блокаторів.

Модуляція струмів LCC-каналів галламіном. Галламін – синтетичний недеполяризуючий блокатор з молекулярною масою 423,6. Це фенольний ефір, хімічна формула якого $C_{30}H_{60}N_3O_3$. Галламін, доданий до експериментальної камери у концентрації 10 мкМ, викликав швидке блокування LCC-каналів при негативних потенціалах на мембрані. У концентрації 100 мкМ при позитивних потенціалах ця сполука викликала лише слабе швидке блокування LCC-каналів (Рис. 10, Б). Проте ефект збільшувався по мірі збільшення рівня негативного потенціалу на мембрані і вже при потенціалі -40 мВ (Рис. 10, Г) шум відкритого стану значно збільшувався з одночасним зменшенням видимої амплітуди струму, порівняно з контролем. Вплив розвивався приблизно через 30 с після аплікації та був подібним до впливу dTC, але більш виражений при дії меншої концентрації. В умовах впливу блокатора у концентрації 1,0 мМ спостерігалось блокування різної ефективності як при позитивних, так і при негативних потенціалах.

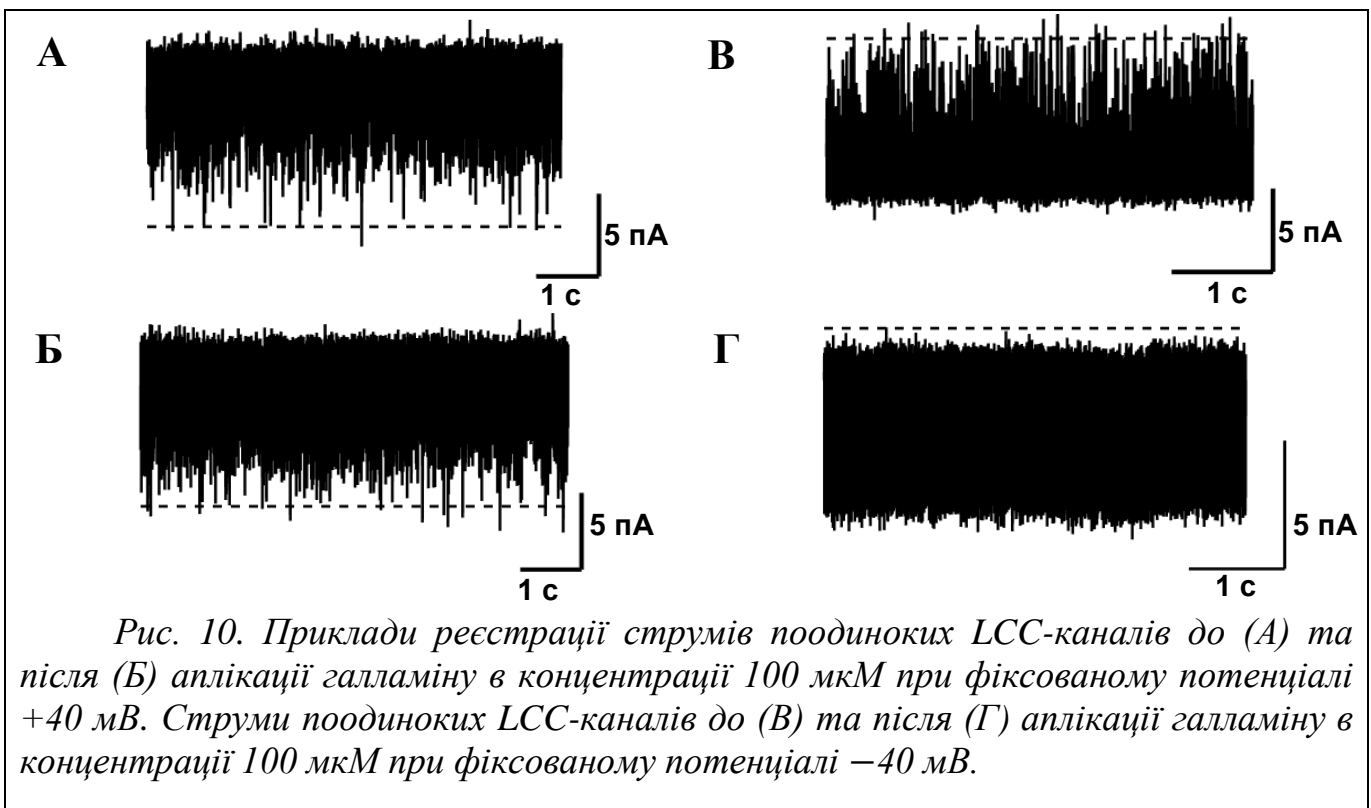


Рис. 10. Приклади реєстрації струмів поодиноких LCC-каналів до (А) та після (Б) аплікації галламіну в концентрації 100 мкМ при фіксованому потенціалі $+40$ мВ. Струми поодиноких LCC-каналів до (В) та після (Г) аплікації галламіну в концентрації 100 мкМ при фіксованому потенціалі -40 мВ.

Визначення константи асоціації та дисоціації галламіну проводили за допомогою аналізу β -розподілу амплітудних гістограм струму LCC-каналів. Для цього спочатку оцінювали величину шуму та амплітуду нульового рівня. На Рис. 11 представлено результати підбору амплітудної гістограми, на основі якої відбувалася генерація симуляції іонних струмів, що у найбільшій мірі відповідали експериментальним реєстраціям, отриманим при фіксованому потенціалі -40 мВ. Відповідність підібраних параметрів визначали за допомогою критерію оцінки суми похибок (розділ “Матеріали та методи”, формула 1). Мінімум цього критерію (Рис. 11, Б) вказував на оптимальні значення параметрів, які забезпечували формування найбільш відповідної експериментальній теоретичній амплітудної гістограми.

Оцінку справжньої амплітуди струму, а також констант асоціації та дисоціації швидкого блокатора проводили, використовуючи спрощену кінетичну модель, яка включає в себе всього два основних стани – один відкритий та один блокований:

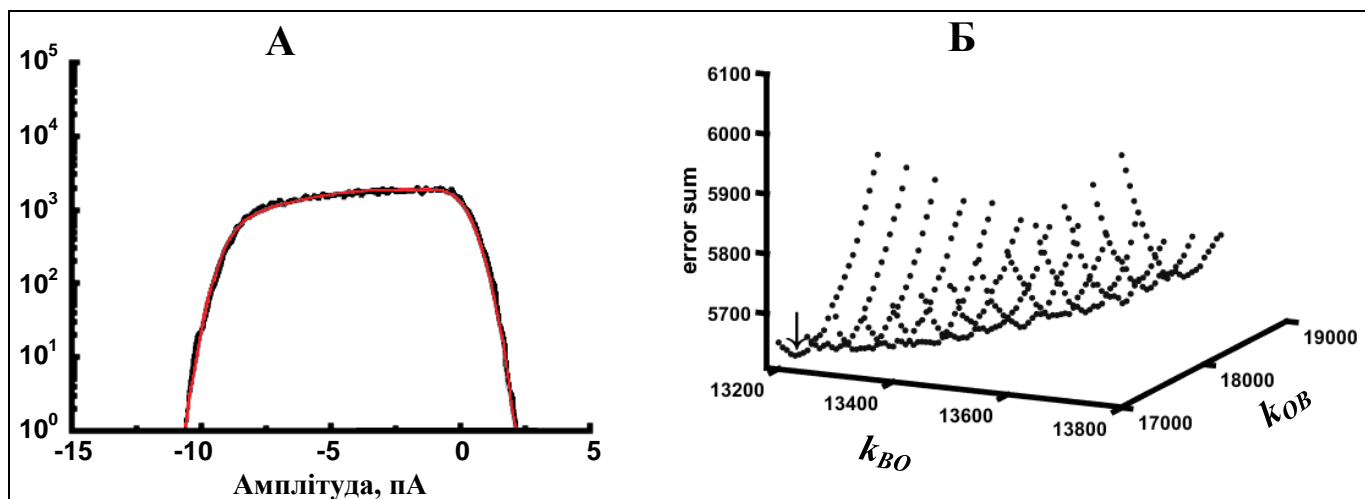
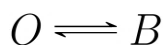
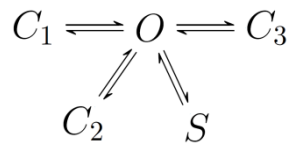


Рис. 11. (А) Результати підбору експериментальної амплітудної гістограми, отриманої при дії галламіну (100 мкМ) на LCC-канали при фіксованому потенціалі -40 мВ (червона лінія). (Б) Залежність критерію відповідності підбору від параметрів симуляції, які використовувалися для побудови теоретичних амплітудних гістограм. Стрілкою вказано значення пари параметрів (швидкості асоціації та дисоціації), яке відповідає мінімальному значенню критерію. Для даної реєстрації константи асоціації і дисоціації становили 17350 та 13200 відповідно.

Така спрощена модель виявилася достатньо адекватною для того, щоб підібрати параметри блокування галламіном у концентрації 100 мкМ при фіксованому потенціалі -40 мВ. Константи асоціації та дисоціації становили 17880 ± 975 і 12790 ± 922 відповідно ($n = 5$). Проте при цій же самій концентрації, але вже при фіксованому потенціалі $+40$ мВ підібрати параметри блокування було неможливо, ймовірно через комплексну топологію LCC-каналів. Тому для адекватної оцінки блокування у широкому діапазоні концентрацій блокатора та при різних значеннях фіксованого потенціалу необхідно у повній мірі встановити кінетичні параметри LCC-каналів у контрольних умовах.

Аналіз кінетики LCC-каналів. Для того, щоб уникнути великого розкиду в результатах аналізу було визначено тривалість стаціонарних та нестаціонарних станів LCC-каналів. Проаналізувавши результати експериментальних даних, ми встановили, що час стабілізації активності іонного каналу в одному напрямку відрізняється від тривалості зміни конформації при переході між тими самими потенціалами, але в зворотному напрямку. При переході від -40 мВ до $+40$ мВ час релаксації (τ) становив $11,10$ с, а при переході у зворотному напрямку був значно коротшим – $2,48$ с. Для переходів від -80 мВ до $+80$ мВ час затримки був $1,58$ с, а для зворотного напрямку – $6,32$ с. Тому для подальшого аналізу характеристик LCC-каналів були вибрані ділянки із стаціонарною кінетикою.

Проаналізувавши амплітудні гістограми для різних потенціалів (від -80 мВ до $+80$ мВ), ми створили кінетичну модель для LCC-каналів:



Топологія моделі складається з п'яти основних станів, а саме з одного відкритого стану, який зв'язаний з одним підрівнем S ("швидкий" підрівень), та трьома закритими станами: C_1 ("швидкий" закритий стан), C_2 ("середній" закритий стан), C_3 ("повільний" закритий стан). Модель Маркова для LCC-каналів, отримана в результаті аналізу швидких та повільних подій, у зразках струмів поодиноких каналів передбачає, що переходи між основними закритими станами та підрівнем відбуваються виключно через відкритий стан і не пов'язані між собою.

Константи швидкості переходів від відкритого до закритого стану демонстрували залежність від потенціалу. Для "повільного" закритого стану C_3 константа переходу зменшувалася при зміні потенціалу від -80 мВ до $+80$ мВ, у той час як константа переходу для C_2 не змінювалася. Константа переходу для підрівня при позитивних значеннях потенціалу збільшувалося зі збільшенням мембранного потенціалу (Рис. 12).

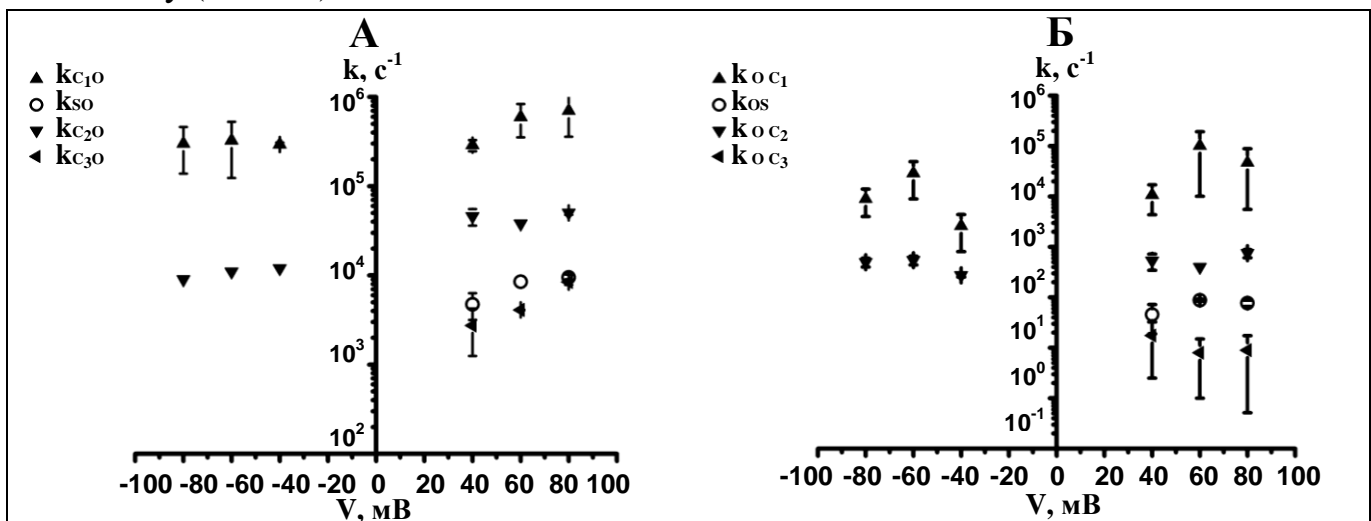
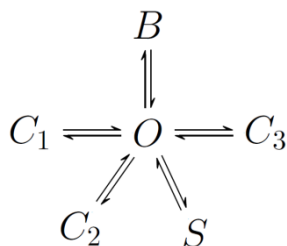


Рис. 12. Константи переходів LCC-каналів від закритого до відкритого стану (А) та від відкритого до закритого стану (Б), які відповідають трьом закритим станам (C_1 , C_2 , C_3) та підрівню (S) в моделі Маркова в діапазоні потенціалів від -80 мВ до $+80$ мВ ($n=3$).

Константи в цій моделі також дозволяють визначити тривалість станів, в яких перебуває LCC-канал. Так, тривалість стану C_2 при потенціалі -80 мВ складала в середньому 111 мкс, а при потенціалі $+80$ мВ – 20 мкс. Повільний стан C_3 при потенціалі $+80$ мВ характеризувався середнім часом життя 119 мкс, але вже при потенціалі -40 мВ це значення різко зростало (до 5,56 с). Така тривалість стану C_3 разом із частотою переходів в цей стан в значній мірі обумовлює ймовірність відкритого стану LCC-каналів в межах усього діапазону потенціалів. При позитивних значеннях потенціалу з'являється підрівень, константа переходу якого до відкритого стану теж збільшувалася з потенціалом. Середній час перебування LCC-каналів в підрівні складає 105 мкс. Параметри, які відповідають переходам у стан C_1 та у зворотному напрямку свідчать про дуже коротку тривалість стану C_1 . Остання за розрахунками в середньому становить всього 1,4 мкс при $+80$ мВ та 3,3 мкс при -80 мВ.

Тривалість відкритого стану (відповідно до вибраної в даній роботі моделі Маркова) визначається переважно швидкістю переходу в стан C_1 , в той час як інші стани не роблять значного внеску в тривалість часу життя основного стану O . За підрахунками середній час тривалості основного відкритого стану LCC-каналу при -80 мВ становить 104 мкс, а при позитивних потенціалах від $+40$ мВ – в межах від 10 до 25 мкс.

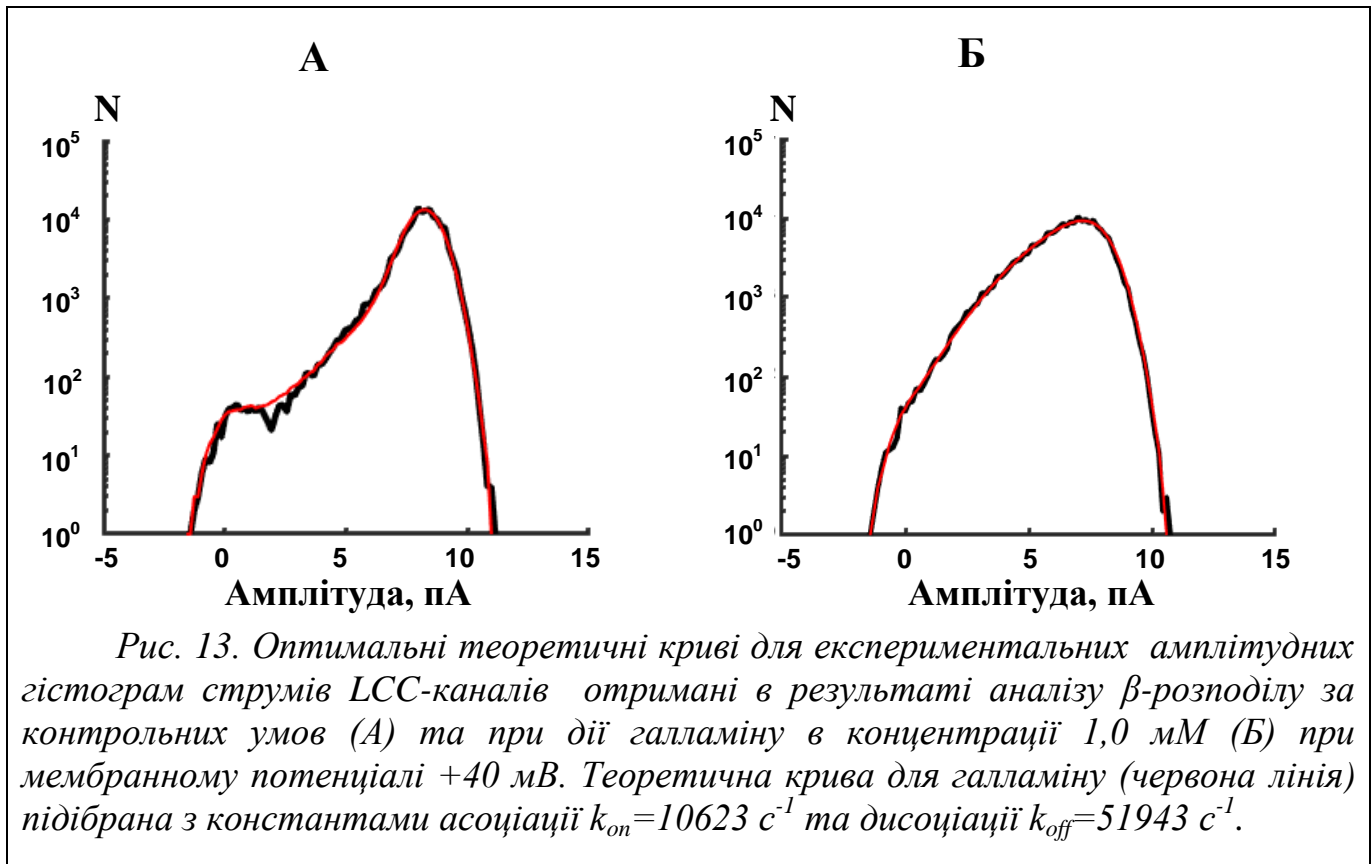
Механізм впливу галламіну на струми LCC-каналів. Наявність адекватної кінетичної моделі надає можливість оцінити вплив галламіну в межах всього діапазону використаних потенціалів. З урахуванням цього до основної моделі Маркова LCC-каналів внесли стан блокування (B):



Дана модель передбачає, що блокований канал не може закритися до тих пір, поки блокатор не від'єднається. На Рис. 13, Б показано симульовану амплітудну гістограму для впливу галламіну в концентрації 1,0 мМ при потенціалі $+40$ мВ. Підібравши оптимальну теоретичну криву для експериментальної гістограми, ми отримали оцінку швидкості асоціації та дисоціації блокатора.

Використовуючи адекватну кінетичну модель LCC-каналів, в даній роботі було встановлено, що дія галламіну характеризується високими значеннями константи швидкості асоціації та дисоціації. Аналіз блокування був проведений із застосування підбраної моделі Маркова LCC-каналів до якої було додано блокований стан. Теоретичні криві амплітудних гістограм з підібраними константами асоціації та дисоціації блокатора співпадають з положенням точок експериментальних амплітудних гістограм (Рис. 13) за умови оптимального значення суми похибок. Це свідчить про те, що вибрана модель з додаванням одного стану блокування до відкритого стану відповідає механізму дії галламіну. Такий механізм впливу вказує, що молекула галламіну приєднується до відкритої пори

LCC-каналу, і канал не може перейти в звичайні конформаційні закриті стани, поки галламін не від'єднається. Таким чином, враховуючи розмір молекули галламіна, можна припустити, що поря LCC-каналу з боку нуклеоплазми має відповідно досить великий розмір.



На Рис. 14, А представлені криві залежності констант швидкостей асоціації та дисоціації від концентрації галламіну при потенціалі -40 мВ ; у точці перетину цих кривих визначено рівноважну константу дисоціації. Для експериментальних значень рівноважних констант дисоціації, обчислених в умовах різних трансмембранних потенціалів (Рис. 14, Б) була підібрана залежність у вигляді функції потенціалу з параметрами $K_d(0)=390 \text{ мкМ}$ (Рис. 14) та $z\delta=0,922$, що апроксимує чутливість блокатора до потенціалу.

Значення $z\delta$ для галламіну складає 0,922. Дана обставина вказує на те, що вплив цього блокатора досить чутливий до зміни мембранного потенціалу. Оскільки заряд галламіну дорівнює 3+, то зі збільшенням негативного потенціалу на мембрані молекула цього агента сильніше притягується до каналу, а зі збільшенням позитивного потенціалу – сильніше відштовхується. В даній роботі було встановлено, що величина рівноважної константи дисоціації ($K_d(0)$) галламіну відносно велика (390 мкМ), проте завдяки високій чутливості до дії трансмембранного потенціалу константа дисоціації при потенціалах менше -80 мВ стає меншою за 10 мкМ.

Отримані результати аналізу кінетики блокування свідчать, що механізм блокування галламіном є класичним блокуванням пори LCC-каналу.

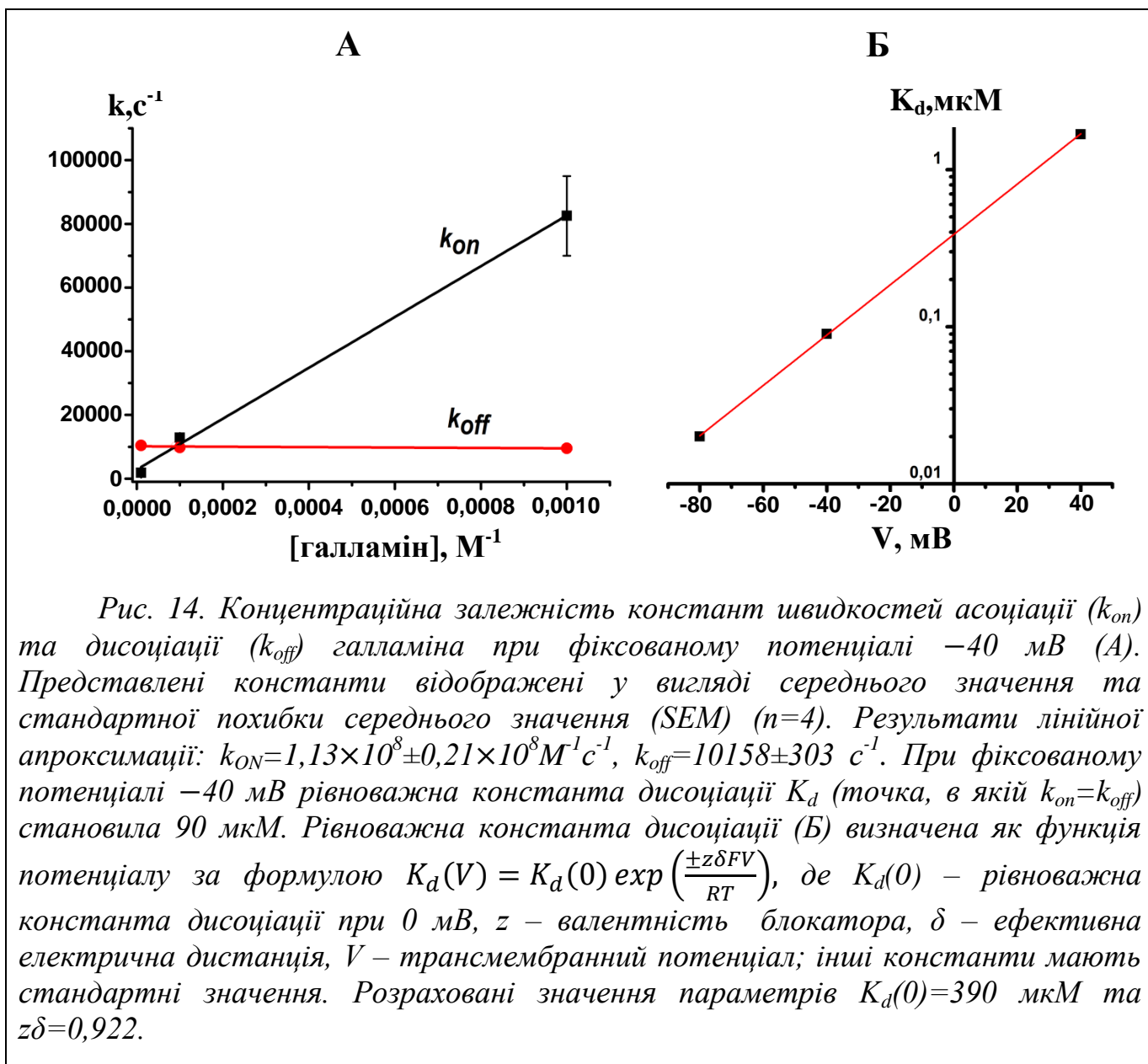


Рис. 14. Концентраційна залежність констант швидкостей асоціації (k_{on}) та дисоціації (k_{off}) галламіна при фіксованому потенціалі -40 мВ (А). Представлені константи відображені у вигляді середнього значення та стандартної похибки середнього значення (SEM) ($n=4$). Результати лінійної апроксимації: $k_{ON}=1,13 \times 10^8 \pm 0,21 \times 10^8 M^{-1} c^{-1}$, $k_{off}=10158 \pm 303 c^{-1}$. При фіксованому потенціалі -40 мВ рівноважна константа дисоціації K_d (точка, в якій $k_{on}=k_{off}$) становила 90 мкМ. Рівноважна константа дисоціації (Б) визначена як функція потенціалу за формулою $K_d(V) = K_d(0) \exp\left(\frac{\pm z \delta F V}{RT}\right)$, де $K_d(0)$ – рівноважна константа дисоціації при 0 мВ, z – валентність блокатора, δ – ефективна електрична дистанція, V – трансмембранний потенціал; інші константи мають стандартні значення. Розраховані значення параметрів $K_d(0)=390$ мкМ та $z\delta=0,922$.

Обговорення результатів

LCC-канали вперше були описані більше 15 років тому, але досі їхня фізіологічна роль залишається невідомою. Тому пошук ефективних блокаторів таких каналів є виключно актуальним. Вирішення цього питання дозволить визначити амінокислотну послідовність та структурні особливості цих іонних каналів. Ефективність блокаторів у якості фармакологічних інструментів для встановлення фізіологічної ролі була продемонстрована для низки інших іонних каналів у ядерній оболонці, таких як калієві канали, ВК-канали та хлорні канали (Valenzuela et al., 2000; Quesada et al., 2002; Li et al., 2014). Проте на момент початку цієї роботи не було відомо жодного блокатора для LCC-каналів. Таким чином, основною метою було протестувати різні хімічні сполуки в якості блокатора. В результаті було знайдено перший блокатор – dTC. Подальші дослідження, проведені в цій дисертаційній роботі, виявили вплив різних діючих речовин та дозволили встановити інші швидкі та повільні блокатори LCC-каналів.

Найбільш потентним блокатором виявився галламін, який, як і dTC, є швидким блокатором для LCC-каналів. Ця особливість створює ряд труднощів для аналізу експериментальних даних. Перш за все, швидкі блокатори характеризуються зменшенням видимої амплітуди струму та збільшенням величини шуму, що відображає спотворення внаслідок обробки аналогового сигналу цифровим перетворювачем. Відповідно, роздільна здатність в реєстраціях прямо залежить від фільтрування та оцифрування сигналу, що проходить через підсилювач. Натомість, повільними блокаторами вважаються такі, що збільшують тривалість перебування поодиноких каналів у стані з нульовою провідністю (Hille, 2001) і таким чином, вплив низької роздільної здатності на точність результатів експериментів в цьому випадку може бути меншим. Механізми дії як швидких, так і повільних блокаторів можуть бути різними, і визначення таких механізмів потребує детального аналізу електрофізіологічних даних. Тому для аналізу швидких подій був використаний такий потужний метод, як аналіз β -розподілу (Schroeder, 2015). Це дозволило з високою точністю оцінити фармакодинамічні параметри швидких блокаторів, що впливають на LCC-канали.

В даній роботі пошук блокаторів згаданих каналів розпочали з дослідження ефектів аплікації екстрактів отрут змій і скорпіона. Такі агенти містять велику кількість компонентів, серед яких були знайдені блокатори та інгібітори для багатьох інших каналів та мембранних рецепторів (Dutertre & Lewis, 2010). Дослідження впливу використаних отрут п'яти тварин виявило, що вони містять компоненти, які характеризуються швидким та повільним блокуванням. Найбільш однорідним видався вплив отрути скорпіона *H. laoticus* (Рис. 2), оскільки в результаті її дії виникало виключно швидке блокування LCC-каналів. Оскільки в отрутах міститься суміш компонентів, які можуть по-різному впливати на LCC-канали і мати різну афінність, то можна припустити, що в отруті *H. laoticus* міститься компонент, який: а) єдиний серед інших компонентів цієї отрути взаємодіє з LCC-каналами, або б) має найбільшу афінність серед усіх інших і, таким чином зв'язуючись з каналом, перекриває можливий вплив всіх інших компонентів. Натомість отрути кобри та крайта, ймовірно, містять декілька компонентів, які по-різному впливають на LCC-канали. У результаті дії отрути кобри (Рис. 4) виникають тривалі стани блокування, що призводить до зменшення P_o . В той же час відкритий стан переривається швидкими подіями блокування, створюючи ефект flicker-блоку, але при цьому видима амплітуда струму змінюється менше ніж у разі впливу інших отрут (Таблиця 1). Отрута крайта (Рис. 3) викликає ефект, схожий на повільне блокування, але одночасно зменшує видиму амплітуду струму. Цікаво, що таке зменшення амплітуди не супроводжується flicker-блоком, тобто не виникає видимих швидких переходів між закритим та блокованим станом, але частково супроводжується деяким збільшенням шуму відкритого стану. Дана ситуація може значити, що певний компонент отрути відрізняється більшою швидкістю асоціації та дисоціації у порівнянні з іншими. Отже, отримані експериментальні дані дають можливість прийти до висновку, що в отрутах скорпіона, кобри та крайта присутні компоненти, які викликають швидке блокування LCC-каналів, але діють із різними кінетичними характеристиками. Додатково в отрутах кобри та крайта можуть міститися компоненти, які викликають повільне блокування. Отрути двох гадюк

виявилися малоефективними в аспекті блокування LCC-каналів, оскільки вплив їх компонентів можна прирівняти до механізму екранування, який, в даному випадку може нагадувати швидке блокування. Оскільки окремі компоненти з цілісних отрут не виділені, то дані щодо їх впливу можуть слугувати лише попередньою оцінкою для подальшої роботи по визначенню високоафінного блокатора LCC-каналів.

На противагу до компонентів отрут, іони гадолінію, галламін та dTC мають визначену молекулярну масу, тому для них може бути обчислена рівноважна константа дисоціації та точно охарактеризовано механізм взаємодії з іонним каналом. Іони Gd^{3+} (як і інші лантаноїди мають іонні радіуси та координаційні числа, подібні до Ca^{2+}) часто використовуються в дослідженнях кальцієвих каналів і подібно до іонів кальцію зв'язуються з групами донорів кисню (Nieboer, 1974). У випадку LCC-каналів, які селективні до моновалентних катіонів, вплив іонів гадолінію виявився ефективним на відміну від іонів кальцію. Вплив гадолінію проявлявся у виникненні подій блокування в межах відкритого стану. Ці події були достатньо тривалими, щоб зареєструватися в повній мірі за умови використання роздільної здатності системи із фільтром 5 кГц та частотою дискретизації 20 кГц. Це може свідчити про те, що іони Gd^{3+} мають порівняно велику константу дисоціації і, потрапляючи до сайту зв'язування, затримуються там на тривалий час, перш ніж від'єднатися. Таким чином іони Gd^{3+} проявляють властивості повільного блокатора.

dTC (молекулярна маса 609,7) та галламін (молекулярна маса 423,633) є великими молекулами на відміну від іонів гадолінію (атомна маса 151,9). Ці сполуки виявилися швидкими блокаторами. Вплив галламіну у порівнянні з усіма іншими сполуками, починав проявлятися при менших концентраціях, а також зумовлював яскраво-виражений flicker-блок. Тому ефект галламіну видався найбільш цікавим як приклад аналізу швидких подій. Для кількісного опису дії цього блокатора ми використали кінетичну модель із двома станами – відкритим і блокованим. Така модель виявилася достатньою лише за обмежених умов, а саме при дії галламіну у великих концентраціях (від 100 мкМ) та при негативних потенціалах на мембрані. Це пов'язано з тим, що кінетика LCC-каналів також включає в себе швидкі конформаційні стани (швидкі закривання), частота переходу в які більша за частоту блокування. Отже, без окремої оцінки тривалості швидких станів та визначення їх констант швидкості обрахувати $K_d(0)$ та ідентифікувати механізм дії галламіну неможливо. Це викликало потребу у виборі адекватної моделі LCC-каналів. Тому в даній роботі ми вперше створили кінетичну модель, яка при мінімальній кількості станів у топології адекватно описує експериментальні електрофізіологічні дані. Вибрана нами модель складається із п'яти станів, що найчастіше виникають при реєстрації поодиноких LCC-каналів.

Галламін виявився найбільш потентним блокатором LCC-каналів. Разом з dTC ця сполука відноситься до ряду недеполяризуючих агентів nAChR. На nAChR кінцевих пластин скелетних м'язів галламін, як і dTC, може діяти і як конкурентний антагоніст, і як поровий блокатор (Colquhoun & Sheridan 1981). Щодо LCC-каналів галламін проявляє потенціалзалежне блокування пори, яке має моноекспоненційну залежність та посилюється зі збільшенням концентрації. В той же час константа дисоціації блокатора не залежить від концентрації, що вказує на відсутність інших сайтів зв'язування. Відомо, що електричне поле розподіляється в товщі біліпідного

шару нерівномірно. Це означає, що електрична дистанція блокування лише приблизно свідчить про локацію сайту зв'язування для блокатора. Тим не менше, наявність явного ефекту галламіну при +80 мВ з великою ймовірністю вказує на те, що він відносно неглибоко проникає в пору ЛСС-каналу, у порівнянні з гадолінієм, який в аналогічній концентрації при потенціалі +40 мВ не впливає на ЛСС-канали. Проте також не можна цілком виключати ймовірності того, що не всі позитивні заряди молекули галламіна потрапляють під дію електричного поля, тому це питання потребує більш детального вивчення в подальших дослідженнях.

ВИСНОВКИ

Відповідно до поставлених мети і завдань встановлено параметри зміни трансмембранних струмів ЛСС-каналів внутрішньої мембрани нейронів Пуркіньє мозочка шурів під впливом модулюючих факторів різної природи. З використанням аналізу β -розподілу створено кінетичну модель ЛСС-каналів та визначено механізм впливу швидкого блокатора галламіна.

1. Виявлено перший блокатор ЛСС-каналів d-тубокурарин (dTC). Також встановлено, що блокатори ЛСС-каналів містяться серед компонентів природних отрут скорпіона лісового (*H. laoticus*), кобри моноклевої (*N. kaouthia*) та крайта стрічкового (*B. fasciatus*). Крім того, ефективними блокаторами ЛСС-каналів є галламін та іони гадолінію.
2. dTC та галламін демонструють характеристики швидких блокаторів, в той час як іони гадолінію є порівняно повільними блокаторами. Дія всіх цих блокаторів на ЛСС-канали залежить від прикладеного трансмембранного потенціалу.
3. Спрощена кінетична модель ЛСС-каналів, яка складається з двох станів, одного відкритого та одного заблокованого, придатна для оцінки фармакодинамічних характеристик молекулярної взаємодії між даним іонним каналом та швидким блокатором лише за умови великих значень константи асоціації блокатора. Доведено, що у випадку блокування галламіном з боку нуклеоплазми ці умови задовольняються при високих концентраціях блокатора та негативних значеннях трансмембранного потенціалу.
4. Вперше створена кінетична модель Маркова для ЛСС-каналів, яка адекватно описує флуктуації струму через канали, що відкриває широкі можливості для подальших фізіологічних та фармакологічних досліджень цих каналів. Основна топологія моделі складається з одного відкритого стану, одного підрівня та трьох закритих станів. Модель передбачає, що переходи між основними закритими станами та підрівнем відбуваються тільки через відкритий стан. Встановлено залежність кінетичних параметрів переходів закритих станів і підрівня до відкритого стану та в зворотному напрямку від прикладеного трансмембранного потенціалу.
5. На прикладі впливу галламіну охарактеризовано модуляцію струмів ЛСС-каналів швидким блокатором. За допомогою аналізу β -розподілу та створеної кінетичної моделі визначено константи швидкості асоціації та дисоціації блокування ЛСС-каналів галламіном; часові характеристики останніх процесів значно перевищують часову роздільну здатність реєструючої системи. Встановлено

залежність рівноважної константи дисоціації галламіну від прикладеного трансмембранного потенціалу. Показано, що галламін блокує LCC-канали за механізмом дії класичного порового блокатора.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ

Публікації, в яких висвітлені основні результати роботи:

1. О.А. Федоренко, **О.В. Семенова (Луцько)**, С.М. Марченко. Властивості Катіонних каналів великої провідності нейронів головного мозку // *Нейрофізіологія* – 2011; 43(3): 192-194.
2. О.А. Федоренко, **О.В. Луцько**, С.М. Марченко. Вплив міжмолекулярних взаємодій на функціональні властивості Інозитол – 1, 4, 5 – трифосфатних рецепторів ядерної оболонки нейронів Пуркінє // *Доповіді НАН України* – 2012; 12: 168-171.
3. **О.В. Луцько**, О.А. Федоренко, С.М. Марченко. Вплив іонів кальцію на властивості Катіонних каналів великої провідності ядерної мембрани нейронів мозочка // *Фізіологічний журнал* – 2013; 59(4); 28-32.
4. **O.V. Lunko**, I.V. Grushkovska, O.O. Lunko, S.M. Marchenko. Effect of dTC on Large-Conductance Cationic Channels in the Inner Nuclear Membrane of Purkinje Neurons of the Rat Cerebellum // *Neurophysiology* – 2016; 48(5), 370-373.
5. **О. В. Луцько**, О.А. Федоренко, О.В. Ісаєва, С.М. Марченко. Вплив природних отрут на Катіонні канали великої провідності на внутрішній ядерній мембрані нейронів Пуркінє мозочка // *Фізіологічний журнал* – 2018; 64(6), 23-31.
6. **O.V. Lunko**, O.O. Lunko. Fast blocking effect of gallamine on LCC channels: analysis using a truncated kinetic scheme // *Neurophysiology* – 2020; 52(4): 250-255.

Публікації, які засвідчують апробацію матеріалів дисертаційного дослідження:

1. Fedorenko O.A., **Semenova O.V.**, Marchenko S.M. Properties of the Large conductance cation channels from the nuclear envelope of neurons // *Theses of the V congress of the Ukrainian Society for Neuroscience*, Kyiv, 2011, p.108.
2. **Semenova O.V.**, Fedorenko O.A., Marchenko S.M. Investigation of activity of Large conductance channels in Purkinje neurons of rat cerebellum // *Fiziol. Zh.* - 2011; 57(5):102.
3. **Lunko O.V.**, Fedorenko O.A., Marchenko S.M. The meaning of allosteric interactions at clusterization of InsP₃Rs in the intracellular signalisation // *Theses of the VII International Symposium “Actual problems of biophysical medicine”*, Kyiv, 2012, p. 86.
4. **Lunko O.V.**, Fedorenko O.A., Marchenko S.M. Effects of venoms on the Large conductance cation channel in the nuclear membrane of central neurons // *Theses of the II Scientific Conference of Young Physiologists “Physiology: from Molecules to the Body”*, Kyiv, 2012, p. 54.
5. Gruskovska I.V., Kalnytska O.V., **Lunko O.V.**, Fedorenko O. A., Marchenko S.M. Voltage-Dependent block by Gd³⁺ ions of Large conduction cation channels from

- inner nucleus membrane of rat Purkinje neurons // Thesis of the III Scientific Conference of Young Physiologists “Physiology: from Molecules to the Body”, Kyiv, 2013, p. 10.
6. **Lunko O.V.**, Lunko O.O., Gruskovska I.V., Marchenko S.M. Effect of dTC on Large conductance cationic channels of nuclei of Purkinje neurons in the cerebellum of rat // Theses of the International Conference “Mechanisms of functioning of physiological systems”, Lviv, 2014.
 7. **Lunko O.V.**, Fedorenko O.A., Marchenko S.M. Gadolinium blocking effect of Large Conductance Cation Channels on inner nuclear membran of Purkinje neurons // Theses of XIX Congress Ukrainian Physiological Society with international participation dedicated to the 90th of Academician P.G. Kostyuk. Fiziol. Zh., 2014, T. 60, № 3, p. 13.
 8. **Lunko O.V.**, Lunko O.O., Hruskovska I.V., Marchenko S.M. Influence of different groups of metals on properties of Large conductance cationic channels of nuclear membrane of rats Purkinje neurons // Theses of the International scientific conference “Shevchenko Spring”, Kyiv, 2016.
 9. **Лунько О.В.**, Лунько О.О., Ісаєва О.В., Марченко С.М. Модуляція Катіонних каналів великої провідності на внутрішній ядерній мембрані нейронів Пуркінє мультівалентними іонами металів // Тези XX-го з’їзду Українського фізіологічного товариства ім.П.Г. Костюка. Фізіол. журн., Vol. 65, No. 3, 19-20, 2019.
 10. Lunko O.O., **Lunko O.V.**, Krishtal O.O. A proposed algorithm for segmenting the single-channel time series // Тези XX-го з’їзду Українського фізіологічного товариства ім.П.Г. Костюка. Фізіол. журн., 2019, Vol. 65, No. 3, 19, 2019.

АНОТАЦІЯ

Лунько О.В. Модуляція Катіонних каналів великої провідності внутрішньої мембрани ядер нейронів Пуркінє мозочка щурів – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика. – Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ, 2021.

В дисертаційній роботі викладені результати дослідження модуляції трансмембранних струмів поодиноких LCC (**L**arge **C**onductance **C**ationic) каналів ядер нейронів Пуркінє. Гіпотетично, ці канали залучені до формування балансу іонів калію по обидва боки від зовнішньої та внутрішньої мембрани ядра, і таким чином, впливаючи на заряд ядерної оболонки, можуть мати значення для тривалості кальцієвого сигналу, проте їх амінокислотна послідовність, структура та фізіологічна роль невідомі. Для підтвердження, спростування чи розвитку цієї гіпотези бракує кількісного опису кінетики, а також ідентифікації фармакологічного профілю LCC-каналів. В цій роботі було знайдено перший блокатор для LCC-каналів – d-тубокурарин (dTC) та виявлено модулюючий вплив трьохвалентних іонів гадолінію, а також вплив галламіну. За допомогою аналізу β -розподілу було охарактеризовано швидкі конформаційні зміни LCC-каналів та вперше створено

кінетичну модель їх опису. Було встановлено, що канал перебуває в одному відкритому стані, який зв'язаний з трьома закритими станами, які мають різні константи швидкості, та одним підрівнем. На прикладі швидкого блокатора LCC-каналів, галламіна, було продемонстровано ефективність використання встановленої моделі Маркова та методу аналізу β -розподілу для дослідження механізму блокування. Визначено, що галламін діє як класичний поровий блокатор, а також обчислено параметри чутливості блокатора до прикладеного мембранного потенціалу.

Ключові слова: ядерна оболонка, LCC-канали, кінетична модель, швидке блокування, аналіз β -розподілу.

АННОТАЦІЯ

Луцько О.В. Модуляція Катионних каналів большой проводимости внутренней мембраны ядер нейронов Пуркинье мозжечка крыс - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.02 – биофизика. – Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев, 2021.

В диссертационной работе изложены результаты исследования модуляции трансмембранных токов через одиночные LCC (Large Conductance Cationic) каналы ядер нейронов Пуркинье. Гипотетически, эти каналы вовлечены в формировании баланса ионов калия по обе стороны от внешней и внутренней мембран ядра, и таким образом, влияя на заряд ядерной оболочки, могут иметь значение для продолжительности кальциевого сигнала, но их аминокислотная последовательность, структура и физиологическая роль неизвестны. Для подтверждения, опровержения или развития этой гипотезы необходимо количественное описание кинетики, а также идентификации фармакологического профиля LCC-каналов. В этой работе было найдено первый блокатор для LCC-каналов – d-тубокурарин (dTc) и выявлено модулирующее влияние трехвалентных ионов гадолиния, а также влияние галламина. С помощью анализа β -распределения были охарактеризованы быстрые конформационные изменения LCC-каналов и впервые создано кинетическую модель их описания. Выявлено, что канал находится в одном открытом состоянии, связан с тремя закрытыми состояниями, которые имеют различные константы скорости, и одним подуровнем. На примере быстрого блокатора LCC-каналов, галламина, было продемонстрировано эффективность использования установленной модели Маркова и метода анализа β -распределения для исследования механизма блокады. Определено, что галламин действует как классический блокатор поры, а также вычислено параметры чувствительности блокатора к трансмембранному потенциалу.

Ключевые слова: ядерная оболочка, LCC-каналы, кинетическая модель, быстрое блокирование, анализ β -распределения.

SUMMARY

Lunko O.V. Modulation of Large conductance cationic channels of the inner nuclear membrane of rat cerebellar Purkinje neurons – Manuscript.

Thesis for candidate's degree by specialty – 03.00.02 – biophysics. – Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv, 2021.

Thesis presents the results of LCC (Large Conductance Cationic) channels modulation of the nuclear membrane of Purkinje neurons. Hypothetically, these channels are involved in the formation of potassium ions balance on the both sides of the inner and outer nuclear membranes. Since these channels might regulate nuclear envelope charge they could be important for calcium signal duration. However, the structure, amino acid sequence and function of LCC channels are still unknown. There is no enough quantitative description of the LCC channels kinetics and identified pharmacological profile, so that we could confirm, refute, or develop the existing hypothesis. In this dissertation, the first blocker of LCC channels was found – d-tubocurarine (dTC). The modulating effect of trivalent gadolinium ions, as well as the effect of gallamine on LCC channels was determined. For the first time, using the β -distribution analysis the rapid conformational changes of LCC channels were characterized and kinetic model was created. It was found that adequate kinetic model for LCC channels consists of one open state associated with three closed states characterized by different rate constants, and one sublevel. The efficiency of selected model and β -distribution analysis method has been proven by using gallamine, the fast blocker of LCC channels. It was determined that gallamine acts as a classical pore blocker. Moreover, the sensitivity parameters of the blocker to applied membrane potential were calculated.

Keywords: nuclear envelope, LCC channels, kinetic model, fast blocking, β -distribution analysis.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

dTC – d-тубокурарин

IP₃Rs – Інозитол – 1, 4, 5 – трифосфатні рецептори

LCC – Катіонні канали великої провідності

nAChR – нікотинові-Ацетилхолінові рецептори

P_o – ймовірність відкритого стану (активність) іонного каналу

RyRs – Ріанодинові рецептори