

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

На правах рукопису

Болдирєв Олексій Ігорович

УДК. 577.352:577.218

**ЕКСПРЕСІЯ ТА ФУНКЦІЯ НИЗЬКОПОРОГОВИХ КАЛЬЦІЄВИХ
КАНАЛІВ В ТАЛАМУСІ ТА СОМАТОСЕНСОРНІЙ КОРІ
ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ В ОНТОГЕНЕЗІ ТА В
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ МОДЕЛІ АБСАНСНОЇ ЕПІЛЕПСІЇ**

03.00.02 – біофізика

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник –

доктор біологічних наук.,
професор **Я. М. Шуба**

Київ - 2016

ЗМІСТ

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| ЗМІСТ | 1 |
| ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ У РОБОТІ СКОРЧЕНЬ | 3 |
| ВСТУП | 4 |
| Розділ 1. Огляд літератури | 12 |
| 1.1 Різноманіття низькопорогових кальцієвих каналів | 12 |
| 1.1.1. Потенціалзалежні кальцієві канали серед біорізноманіття іонних каналів | 12 |
| 1.1.2. Молекулярна структура T-каналів | 14 |
| 1.1.3 Біофізичні властивості та фармакологія T-каналів | 18 |
| 1.1.4. Регуляція експресії генів T-каналів | 20 |
| 1.1.5. Фізіологічна роль T-каналів | 21 |
| 1.2. Експресія та функція низькопорогових кальцієвих каналів у нейронах різних відділів нервової системи | 23 |
| 1.2.1. Загальний огляд | 23 |
| 1.2.2. НПКК у таламусі | 25 |
| 1.2.3. НПКК у корі великих півкуль | 26 |
| 1.3 Абсансна епілепсія | 28 |
| 1.3.1 Дитяча абсансна епілепсія людини | 28 |
| 1.3.2 Тваринні моделі | 30 |
| 1.3.3. Характеристика експериментальної моделі абсансної епілепсії у щурів лінії WAG/Rij | 32 |
| 2.1 Об'єкт дослідження | 39 |
| 2.2 Молекулярно-біологічні методи дослідження | 41 |
| 2.2.1 Полімеразна ланцюгова реакція поодиноких клітин (методика "single-cell RT-PCR") | 41 |
| 2.2.2 Виділення РНК з тканин мозку | 42 |
| 2.2.3 Зворотна транскрипція | 44 |
| 2.2.4 Полімеразна ланцюгова реакція | 45 |
| 2.2.5 Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі | 46 |
| 2.2.6 "Вестерн-блот" | 47 |
| 2.3. Електрофізіологічний експеримент | 49 |
| 2.4. Математичні методи аналізу даних і програмне забезпечення | 50 |
| РОЗДІЛ 3 Результати власних досліджень | 52 |
| 3.1 Розробка методу полімеразної ланцюгової реакції для оцінки експресії генів у окремих нейронах | 52 |
| 3.2 Експресія генів низькопорогових кальцієвих каналів у таламусі щурів | 60 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.2.1 Нейрон-специфічна експресія генів α 1-субодиниць низькопорогових кальцієвих каналів в таламусі | 60 |
| 3.2.2. Онтогенетичний аспект експресії мРНК альфа1-субодиниць низькопорогових кальцієвих каналів в таламусі | 67 |
| 3.3 Низькопорогові кальцієві канали у мозку щурів лінії WAG/Rij | 73 |
| 3.3.1 Кількісна оцінка експресії мРНК альфа1-субодиниць низькопорогових кальцієвих каналів у сітчастому ядрі таламусу та соматосенсорному кортексі | 73 |
| 3.3.2 Експресія білка альфа1-субодиниць низькопорогових кальцієвих каналів у соматосенсорній корі | 78 |
| 3.3.3. Порівняння Т-кальцієвого струму в таламусі щурів лінії WAG/Rij і Wistar | 82 |
| 3.4. Роль мікроРНК в регуляції експресії низькопорогових кальцієвих каналів | 86 |
| 3.4.1. Біоінформаційний пошук мікроРНК, що взаємодіють із мРНК кальцієвих каналів Т-типу | 86 |
| 3.4.2 Кількісна оцінка експресії мікроРНК-1 (rno-miR-1) у таламусі та соматосенсорній корі щурів із експериментальною абсанс-епілепсією та на різних етапах онтогенезу | 89 |
| 3.5. Аналіз та узагальнення результатів | 93 |
| ВИСНОВКИ | 100 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ | 102 |

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ У РОБОТІ СКОРЧЕНЬ

ГАМК – гама-аміномасляна кислота

дНТП – дезоксирибонуклеотидтрифосфати

ЗТ – зворотна транскрипція

кДНК – компліментарна дезоксирибонуклеїнова кислота

ЛД – латеродорзальне ядро таламуса

мРНК – матрична рибонуклеїнова кислота

НКП – низькопороговий кальцієвий потенціал

НПКК – низькопорогові кальцієві канали

ПД – потенціал дії

ПККК – потенціал-керовані кальцієві канали

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

СЯ – сітчасте ядро таламуса

ВСТУП

Актуальність теми

Потенціалкеровані кальцієві канали є родиною іонних каналів, воротний механізм яких спрацьовує під впливом змін трансмембранного потенціалу. Вхід іонів кальцію через ці канали призводить до функціональної відповіді клітин, що виражається в генерації потенціалів дії в нейронах та міоцитах, екзоцитозі, скороченні м'язів, специфічній експресії генів, тощо (Zamponi et al., 2015).

Підродина низькопорогових потенціалкерованих кальцієвих каналів (НПКК) ссавців, яку ще називають каналами Т-типу, кодується трьома генами – *Cacna1g*, *Cacna1h* і *Cacna1i*, які відповідають за експресію трьох ізоформ основної пороформууючої $\alpha 1$ -субодиниці цих каналів – $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ $Ca_v3.3$. Ці канали диференційовано представлені в багатьох типах клітин по всьому організму людини і ссавців, але всі одночасно вони у визначених пропорціях присутні лише у різних нейронах головного мозку. Зокрема, важлива роль Т-каналів виявлена в таламусі, де вони беруть участь у генерації ритмічної електричної активності нейронів, що відповідає за переключення періодів сну й неспання (Bessaïh et al., 2008). Т-канали мають найменшу провідність щодо іонів кальцію серед усіх потенціал керованих кальцієвих каналів, що може вказувати на їх залучення в більш тонку "настройку" кальційзалежних клітинних процесів, порівняно з іншими

"постачальниками" і джерелами внутрішньоклітинного кальцію (Perez-Reyes et al., 2003).

НПКК відзначаються вкрай складним патерном експресії генів, який не тільки є тканиноспецифічним, а і може змінюватися у часі та просторі в залежності від онтогенезу, фізіологічного стану клітини та при патологіях. Більше того, поряд з такими іонними каналами, як серцевий калієвий канал HERG чи потенціалкервані натрієві канали, НПКК привертають до себе все більше уваги, як важливі детермінанти каналопатій – патологічних станів, які специфічно пов'язані з дисфункцією тих чи інших іонних каналів. З того, що вже відомо про функції T-каналів, зрозуміло, що вони задіяні: 1) в тонкій регуляції мембранного потенціалу клітин та ритмогенезі в мозку та серці; 2) у постачанні іонів кальцію в клітину, які в якості вторинних посередників беруть участь у регуляції вивільнення додаткової кількості кальцію з цистерн ендоплазматичного ретикулуму, стимуляції синаптичної передачі, активації експресії генів тощо. Тому вивчення цих каналів є вкрай важливим для розуміння внутрішньоклітинної сигналізації та побудови моделі впливу іонів кальцію на молекулярні процеси в клітині.

Дисфункція НПКК в значній мірі визначає етіологію таких патологічних станів як епілепсія, біль, серцево-судинні захворювання, рак. Мутації в генах T-каналів корелюють з такими захворюваннями як епілепсія з абсансами, аутизм (Splawski et al., 2006), гіперальдостеронізм (Scholl et al., 2015),

патологічний біль (Waxman et al., 2014), деякі види раку (Dziegielewska et al., 2014; Gackière et al., 2013).

Дитяча абсансна епілепсія людини – це поширене захворювання, на яке страждають близько 0,05% дітей по всьому світу(Callenbach et al., 1998). Вона характеризується наявністю абсансів – коротких (4-20 секунд) періодів несвідомості, які можуть повторюватися в пацієнта від 5 до 100 разів на день. Значна кількість пацієнтів видужує після віку 15-17 років без терапії або внаслідок лікування анти-епілептичними препаратами (Berg et al., 2014). Проте в інших пацієнтів абсанси змінюються конвульсивними формами епілепсії після настання пубертатного періоду(Boima et al., 1996). Етіологія абсансної епілепсії залишається невідомою, хоча виявлені генетичні кореляції захворювання з декількома нуклеотидними поліморфізмами в генах Т-каналів. Також на зв'язок НПКК з абсансною епілепсією вказують дослідження на тваринних моделях цього захворювання(Tsakiridou et al., 1995), участь НПКК-залежної таламічної активності у нападах (Coenen et al., 2003), і те, що деякі антиепілептичні препарати є блокаторами Т-струму (Broicher et al., 2007). Але яким саме чином Т-канали залучені в етіологію абсанс-епілепсії, залишається невідомим.

Відсутність надійних селективних фармакологічних активаторів та блокаторів окремих підтипів Т-каналів та всієї підродини утруднює пошук лікарських засобів для корекції патологічних станів, пов'язаних з дисфункцією кальцієвих каналів Т-типу. Саме тому актуальним є пошук

внутрішніх клітинних механізмів, які впливають на посилення чи послаблення активності НПКК. До таких механізмів належить регуляція експресії генів каналів Т-типу за допомогою транскрипційних факторів (Trimarchi et al., 2009). Зараз вже очевидно, що подібний вплив можуть здійснювати й ендogenousні малі інтерференційні РНК. Проте досі нема літературних даних щодо взаємодії малих РНК з мРНК Т-каналів, тому пошук таких ендogenousних регуляторів є важливим як з фундаментальної точки зору, так і для перспективи селективного фармакологічного чи генетичного впливу на кальцієві канали Т-типу.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Робота виконувалася в рамках фундаментальної теми № 0110U006269 «Іонні канали та кальцієвий гомеостаз як мішені модуляторного впливу ендogenousних та екзогенних біологічно активних речовин».

Метою дослідження було виявити зміни експресії генів низькопорогових кальцієвих каналів у таламусі та сомато-сенсорній корі щура під час нормального онтогенезу та в спадковій моделі абсансної епілепсії – лінії щурів WAG/Rij, з'ясувати потенційні механізми регуляції їх експресії та провести кореляцію між профілями експресії каналів, функціональними характеристиками нейронів і вираженістю епілептичного фенотипу.

Задачі дослідження:

1. Дослідити нейрон-специфічну експресію генів, що кодують $\alpha 1$ -субодиниці $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$, $Ca_v3.3$ низькопорогових кальцієвих каналів, у гальмівних ГАМК-ергічних та збуджувальних глутаматергічних нейронах таламуса та порівняти її з електрофізіологічними характеристиками цих нейронів
2. Дослідити зміни експресії генів, що кодують $\alpha 1$ -субодиниці $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$, $Ca_v3.3$ низькопорогових кальцієвих каналів, у тканині таламусу щурів різного віку
3. Визначити рівень експресії мРНК кальцієвих каналів Т-типу в таламусі та сомато-сенсорній корі щурів лінії WAG/Rij та дослідити Т-струми в нейронах цих ділянок мозку.
4. Оцінити можливий вплив мікроРНК на експресію Т-типу кальцієвих каналів

Об'єкт дослідження – низькопорогові кальцієві канали в нейронах головного мозку щурів

Предмет дослідження – кальцієві струми, рівень експресії мРНК і білка низькопорогових кальцієвих каналів в нервовій тканині та окремих нейронах таламуса і соматосенсорної кори щурів лінії Wistar WAG/Rij різного віку.

Методи дослідження. **Біофізичні:** електрофізіологічне вимірювання струмів через мембрану клітини, метод «петч-клемп», електрофорез ДНК і білків; **біохімічні та імунохімічні:** виділення окремих клітин з ядер таламусу та кори головного мозку щура, виділення РНК з нервової тканини головного мозку, виділення білків з нервової тканини, імунохімічне визначення білків

методом «вестерн-блот»); **молекулярно-біологічні**: зворотна транскрипція із полімеразною ланцюговою реакцією, полімеразна ланцюгова реакція для кДНК з однієї клітини, кількісна полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР у реальному часі); **біоінформаційні**: пошук сайтів зв'язування мікроРНК з мРНК у відкритих базах даних.

Наукова новизна одержаних результатів. У дисертаційній роботі:

- вперше проведено дослідження експресії мРНК низькопорогових кальцієвих каналів у таламусі на різних етапах онтогенезу і встановлено, що різні субодиниці кальцієвих каналів Т-типу змінюють свою експресію в таламусі та соматосенсорній корі головного мозку в процесі розвитку організму щура,
- встановлено зміни експресії мРНК і білка низькопорогових кальцієвих каналів у соматосенсорній корі щурів зі спонтанними абсансами, зокрема збільшення кількості мРНК і білка каналу $Ca_v3.1$ у соматосенсорній корі щурів лінії WAG/Rij і пов'язано це збільшення з абсансним фенотипом.
- вперше виявлено посттранскрипційну регуляцію мРНК низькопорогового кальцієвого каналу $Ca_v3.2$ за допомогою мікроРНК *gno-miR-1* в корі головного мозку та таламусі щура.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані в дисертації результати можуть бути використані для подальших досліджень біофізичних і молекулярних механізмів, що лежать в основі залежних від віку особливостей регуляції концентрації іонів кальцію в нейронах таламусу, а

також патогенезу абсансної епілепсії. Знання щодо зміни експресії низькопорогових кальцієвих каналів розширюють уявлення про їхню роль у формуванні нервової системи і можуть бути використані при пошуку нових регуляторів транскрипції і трансляції T-каналів. Результати дисертації також можуть бути використанні при розробці терапевтичних засобів лікування патологій, пов'язаних з гіперактивністю низькопорогових кальцієвих каналів.

Особистий внесок здобувача. Головна ідея та задачі досліджень були сформульовані науковим керівником д.б.н., проф. Шубою Я.М. Аналіз літературних даних, проведення біофізичних експериментів на поодиноких нейронах таламусу, вивчення експресії мРНК у тканині та окремих клітинах, імунохімічний аналіз вмісту білка, а також статистична обробка та аналіз одержаних результатів проводилися дисертантом самостійно. Автор висловлює щире подяку к.б.н О.К. Щегловітову і д.м.н. В.Є. Досенку за допомогу в оволодінні методиками, а також Б.Р. Шаропову, К.Л. Гулак, Н.Л. Штефан, М.Ю. Батюку, Д.О. Дринь, к.б.н. О.В. Дергаю, к.б.н. М.В. Дергаю, к.б.н. О.П. Любановій за допомогу в експериментах, аналізі та інтерпретації отриманих результатів, формулюванні основних положень та підготовці матеріалів до друку.

Апробація результатів дисертації. Результати роботи було представлено на семінарах Сектору нейрофізіології Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця (2005, 2011, 2012, 2015) та наступних наукових конференціях: Physiological society International Workshop on Molecular

Physiology of Membrane Transport and Cellular Signalling (Яремче, 2007), 7th FENS forum of European neuroscience, (Амстердам, Нідерланди, 2010), The Bridges in Life Sciences 6th Annual Scientific Meeting, (Братислава, Словаччина, 2011), 36th FEBS Congress "Biochemistry for tomorrow's medicine" (Турин, Італія, 2011), V З'їзд Українського біофізичного товариства, (Луцьк, 2011), V Congress of Ukrainian Society for Neuroscience (Київ, 2011), III Конгресс фізіологів СНГ, (Ялта, 2011), VI конгрес патофізіологів України, (Місхор, 2012), I і III Всеукраїнські конференції молодих вчених "Фізіологія: від молекул до організму"(Київ, 2011, 2013), XI міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь та поступ біології» (Львів, 2015).

Публікації

За матеріалами дисертації опубліковано 19 робіт, у тому числі 5 статей у наукових журналах.

Структура і обсяг роботи. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, експериментальних результатів, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків та списку використаних джерел. Дисертацію викладено на 108 сторінках стандартного тексту. Вона містить 25 рисунків та 1 таблицю. Список використаної літератури охоплює 123 найменування.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Різноманіття низькопорогових кальцієвих каналів

1.1.1. Потенціалзалежні кальцієві канали серед біорізноманіття іонних каналів

Опис і аналіз з фізичної точки зору біологічних процесів, що забезпечуються фундаментальними молекулярними структурами, які лежать в основі всього живого, являє собою найперший інтерес біофізики. Одним з таких процесів є іонний гомеостаз клітини, особливо пов'язаний з іонами кальцію. Найважливіші іони, трансмембранний градієнт концентрації яких впливає на різні клітинні процеси (роботу білків-транспортів малих молекул, осмотичні процеси, міжклітинні взаємодії тощо) – це Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , H^+ . Незважаючи на таку невелику кількість типів іонів, існує понад 300 різних генів, що кодують трансмембранні каналні білки, які дозволяють клітині впускати в цитоплазму та випускати назовні ці іони (це лише білки, що відповідають за пасивний транспорт іонів) (Шуба et al., 2010). Якщо врахувати механізми альтернативного сплайсінгу, редагування РНК, посттрансляційного процесінгу білка та утворення гетеромерних каналів, то кількість можливих білків-каналів, що можуть відрізнятися за функцією, досягає багатьох тисяч (Holmgren et al., 2013; Lipscombe et al., 2013). При цьому не можна забувати, що в основі функціонування цих білків лежить простий фізичний принцип: відкриття каналу призводить до руху іонів за

електрохімічним градієнтом. Характер цього руху розшифровується молекулами шляхів внутрішньоклітинного сигналіngu і викликає надзвичайне різноманіття клітинних відповідей на зовнішні стимули.

Найбільш чутливо клітина реагує на зміни концентрації іонів кальцію, що зазвичай занижена в цитоплазмі за допомогою машинерії активного відкачування. Вхід кальцію з позаклітинного простору також відбувається за допомогою різних каналів, що кодуються декількома десятками генів. Тут є селективні та неселективні до кальцію канали, що відкриваються у відповідь на зміни потенціалу, взаємодію з лігандом, перепади температури чи тиску, зсуви рН тощо. При цьому на зміни мембранного потенціалу, що, здавалося б, є досить одноманітними, у клітинах ссавців відповідають канали, які кодуються одразу 10ма генами – родини потенціал-керованих кальцієвих каналів (Lipscombe et al., 2013). Ці канали за структурою генів явно є гомологами – найбільш різні з них мають однакову доменну будову та зберігають до 30% гомології послідовності. Вони експресуються у багатьох типах клітин, причому часто по декілька різних підтипів ПККК у одній клітині. Особливо це характерне для нейронів головного мозку. Всередині родини ПККК за гомологією виділяються дві групи генів, що також мають явну функціональну відмінність – вони відкриваються у відповідь на різні значення деполяризації. Це підродини високопорогових кальцієвих каналів, що пропускають кальцій при підвищенні мембранного потенціалу до -50 – -40 мВ, і низькопорогових, які активуються при нижчих потенціалах – -70 – -

60 мВ. Підродина низькопорогових кальцієвих каналів (НПКК , Т-типу) містить 3 гени, які експресується у багатьох типах клітин по всьому організму ссавців, але всі одночасно вони експресуються лише у нейронах головного мозку(Talley et al., 1999). Кальцієві струми Т-типу вперше описані в сенсорних нейронах спінальних гангліїв українськими вченими в 1983-85 роках (Fedulova et al., 1985; Веселовский et al., 1983)

1.1.2. Молекулярна структура Т-каналів

Функціонально активний білок потенціал-керованого кальцієвого каналу є гетерополімером, тобто складається з кількох білкових субодиниць, які кодуються окремими генами. Головна пороутворююча білкова молекула – $\alpha 1$ -субодиниця, яка є трансмембранним білком. Вона у всіх ПККК складається з чотирьох повторюваних мотивів: вважають, що вони утворилися шляхом двох послідовних дуплікацій у гені предкового калієвого потенціалзалежного каналу (Senatore et al., 2014). Кожен мотив містить 6 трансмембранних сегментів, сформованих α -спіралями, причому 4-й сегмент є сенсором потенціалу й збагачений позитивно-зарядженими залишками амінокислот лізину та аргініну. Між 5-м і 6-м сегментом знаходиться так звана "Р-петля", яка утворює частину внутрішньої поверхні пори та селективного фільтру каналу. Чотири повторювані білкові мотиви поєднані між собою великими внутрішньоклітинними петлями, які містять сайти для взаємодії з цитоплазматичними білками, допоміжними субодиницями та

іншими факторами. Довгі N- та С-кінцеві фрагменти білка також знаходяться на цитоплазматичному боці клітинної мембрани.

Допоміжні субодиниці β , γ , $\alpha_2\delta$ відповідають за транспорт і регуляцію роботи головної субодиниці (Рис. 1.1). Ці субодиниці є необхідними для функції білків, які походять з 7 генів так званих високопорогових кальцієвих каналів (тобто каналів, ворота яких відкриваються при значній зміні мембранного потенціалу, мають високий поріг активації до $-40 - -30$ мВ). Проте низькопорогові кальцієві канали є функціонально активними при експресії лише одного гену α_1 -субодиниці без допоміжних білків. Сайти зв'язування для допоміжних β -субодиниць на внутрішньоклітинних петлях T-каналів втратили свою консервативність порівняно з генами високопорогових кальцієвих каналів.

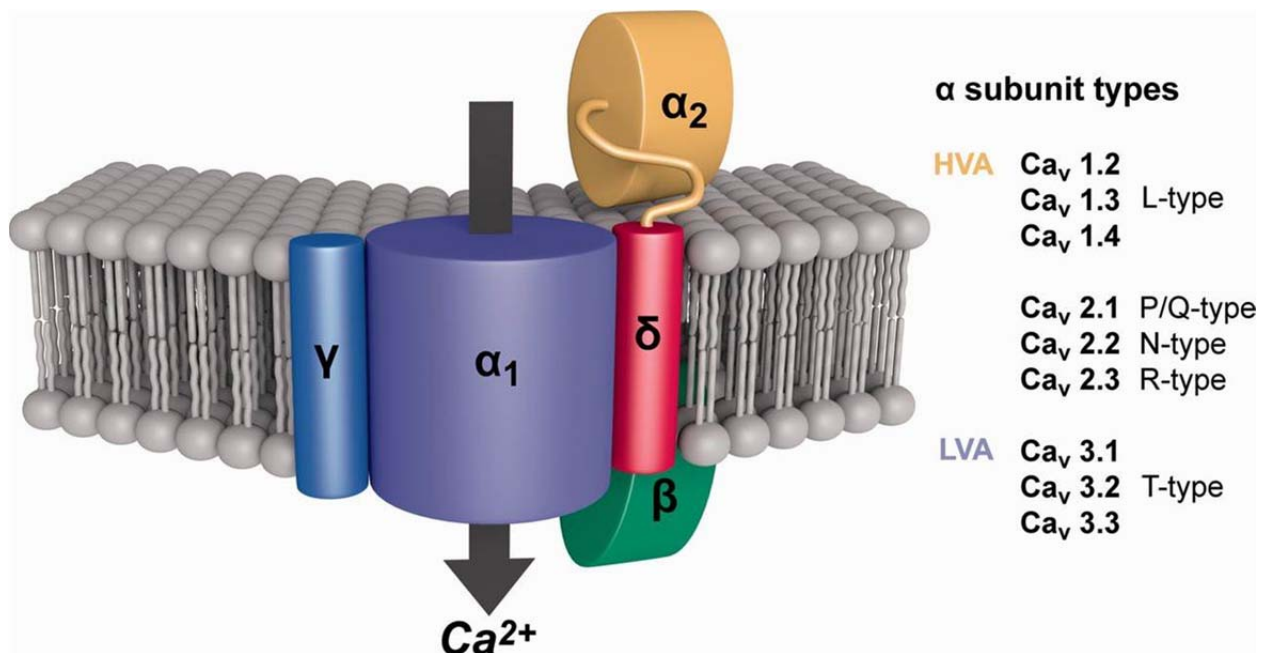


Рис. 1.1. Субодинична будова потенціал-керованого кальцієвого каналу. З (Moran et al., 2014), ліцензія Creative Commons CC-NC-SA 3.0

Гомологи генів, що кодують $\alpha 1$ -субодиниці Т-каналів широко розповсюджені в різних гілках тварин. Ортологічні гени знаходять у таких далеких групах як хоанофлагелляти (Choanoflagellata), трихоплакс (Placozoa), комахи (Insecta), молюски (Mollusca). Деякі групи, як наприклад губки (Spongia), не мають генів кальцієвих каналів Т-типу, ймовірно внаслідок вторинної втрати. Цікаво, що найчастіше в геномі тварини наявний один ортолог підродиною Ca_v3 , але серед представників кишковопорожнинних (Cnidaria) гідра *Hydra magnipapillata* має один ортологічний ген, а анемона *Nematostella vectensis* – два гени (Moran et al., 2014). У геномі ссавців, як і у всіх Tetrapoda і кісткових риб, наявні 3 гени, що кодують НПКК: *Cacna1g* ($Ca_v3.1$), *Cacna1h* ($Ca_v3.2$) і *Cacna1i* ($Ca_v3.3$). Це, ймовірно, є наслідком подвійної диплоїдизації генома предків риб. У людини ці гени розташовані відповідно на 17-й, 16-й і 22-й хромосомах. (Perez-Reyes et al., 2006)

Порівняльний аналіз послідовностей генів Ca_v3 каналів у людини, щура, миші, собаки та корови визначив ступінь гомології членів підродиною в ссавців (Рис. 1.2). $Ca_v3.1$ канали є висококонсервативними, із гомологією 90-95% між згаданими п'ятьма видами, $Ca_v3.2$ менш консервативні – 70-80%, а $Ca_v3.3$ мають проміжні значення – 80-90%.

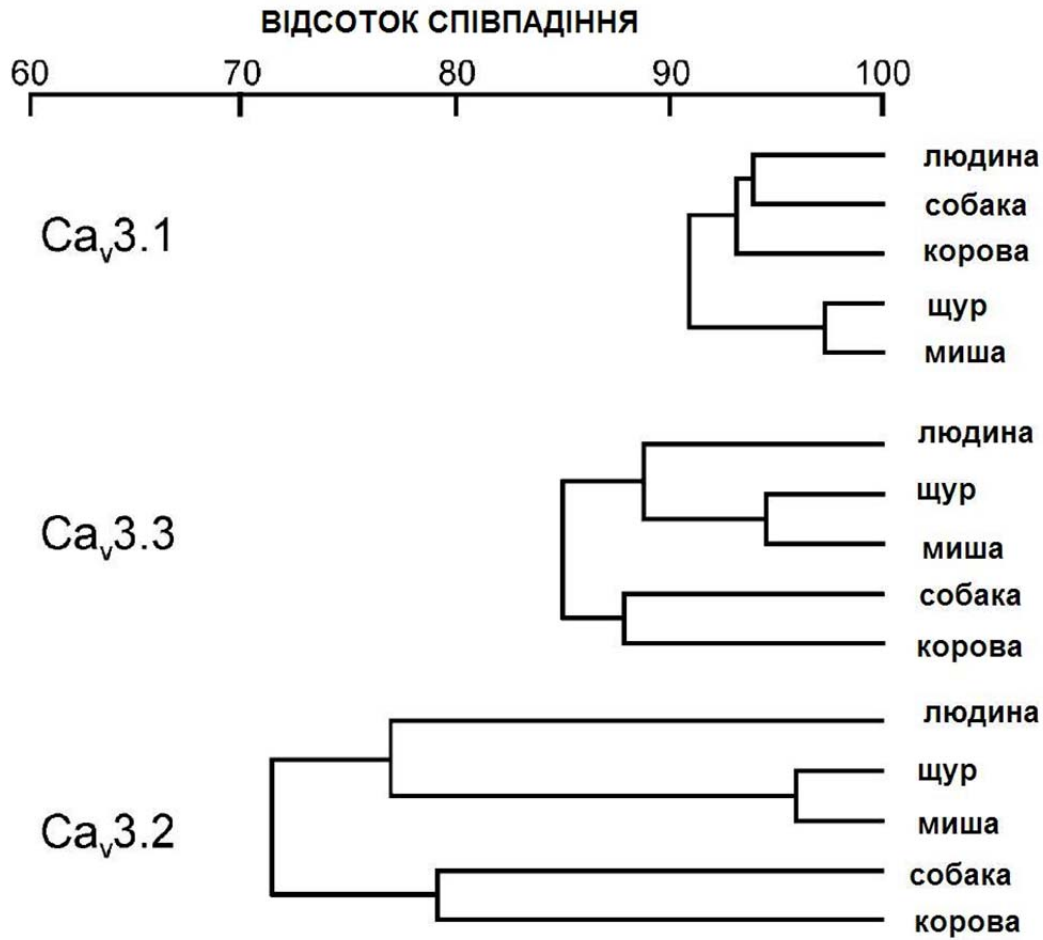


Рис. 1.2. Дендрограма консервативності послідовностей генів Ca_v3 каналів людини, собаки, корови, щура та миші. (модифіковано з E. Perez-Reyes, 2006)

Така консервативність показує, що в ході еволюції зміни в амінокислотній послідовності Ca_v3.1 є максимально обмеженими, що може бути пов'язаним з його важливою роллю в таламо-кортикальній передачі сигналу. Вища варіабельність послідовностей Ca_v3.2 та Ca_v3.3 може бути пов'язаною з їхньою функцією модуляції фізіологічних процесів у різних типах клітин. Гомологія нуклеотидних послідовностей генів підродини Ca_v3 складає близько 40%, найвища консервативність спостерігається у трансмембранних ділянках (Perez-Reyes et al., 2006).

Транскрипти всіх трьох генів підродини Ca_v3 підлягають альтернативному сплайсінгу, що відображається на функції каналів. Кожен ген складається з 35-38 екзонів. Так для $Ca_v3.1$ відомо декілька десятків сплайс-ізоформ, деякі з яких мають більшу щільність на мембрані та змінені характеристики активації, інактивації та проникності (Shcheglovitov et al., 2008). У гені $Ca_v3.2$ виявлено 14 сайтів сплайсінгу, які впливають на проявлення мутантних фенотипів та на активацію струму через канал (David et al., 2010). Декілька сплайс-варіантів, що впливають на електрофізіологію каналу відомо і для $Ca_v3.3$ (Murbartian et al., 2004).

Незважаючи на те, що відсутні відомості про пряму бохімічну взаємодію між $\alpha 1$ -субодиницею та допоміжними білковими субодиницями потенціалкерованих кальцієвих каналів, коекспресія γ - та $\alpha 2\delta$ -білків призводила до змін у воротних струмах та щільності каналів на мембрані, проте цей вплив неспівставний з таким для високопорогових кальцієвих каналів (Lin et al., 2008).

1.1.3 Біофізичні властивості та фармакологія T-каналів

НПКК при значеннях мембранного потенціалу, близьких до потенціалу спокою нейрона -70 мВ, є частково інактивованими. При невеликій гіперполяризації, яка може бути викликана входом іонів хлору в клітину (наприклад, через гальмівні ГАМК- чи гліцинові рецептори) або відкриттям калієвих каналів, відбувається деінактивація T-каналів. Поріг активації для НПКК у різних типах клітин складає -80 – -55 мВ. Цікаво

також, що криві інактивації та активації Т-струму перетинаються, що дозволяє існувати "віконному струму": у невеликому діапазоні мембранного потенціалу частина каналів (менше 1 відсотка) залишаються відкритими і не інактивуються після активації. Такий "віконний струм" підтримує базальний рівень кальцію в цитоплазмі, є механізмом ампліфікації сигналу в деяких типах нейронів (Perez-Reyes et al., 2003).

Т-канали мають найменшу провідність серед ПККК, яка для одиничного каналу складає від 2 до 9 пСм, в залежності від типу клітин та іона-переносника. За кінетикою інактивації Т-струми розділяють на швидкі ($\tau_i=12-30$ мс) і повільні ($\tau_i=45-60$ мс). Відповідно до даних, отриманих на каналах, експресованих в гетерологічних системах експресії, швидка інактивація характерна для ізоформ $Ca_v3.1$ і $Ca_v3.2$, тоді як повільна – для $Ca_v3.3$. Втім різноманіття сплайс-варіантів, мембранного мікрооточення і внутрішньоклітинна регуляція значно ускладнюють цю картину, роблячи співставлення характеристик струму з конкретними субодиницями в різних клітинах утрудненим.

Вхід кальцію через НПКК у нейронах різних відділів головного мозку ссавців призводить до генерації низькопорогових кальцієвих потенціалів (НКП). Це відносно тривала кальцієва хвиля, що призводить до низькоамплітудної деполяризації, на верхівці якої з'являється пачка потенціалів дії. НКП лежить в основі ритмогенезу в таламокортикальних та сітчастих нейронах таламуса, роботи нейронів глибоких ядер мозочка,

інтернейронів кори та смугастого ядра, заднього шовного ядра (Connelly et al., 2015).

Тривалий пошук селективних блокаторів і активаторів НПКК призвів до вельми обмежених результатів. Кілька похідних дигідропіридинів, мібефрадил, антиепілептичні препарати (зокрема етосукцимід), бензодіазепіни, іони нікелю та цинку використовуються лише в лабораторних дослідженнях, проте й вони не досягають бажаної селективності.

1.1.4. Регуляція експресії генів Т-каналів

Кальцієві канали Т-типу поширені в багатьох типах клітин, експресуються на різних рівнях та їх кількість варіює в онтогенезі та при фізіологічних і патологічних змінах. На експресію генів Т-каналів впливає низка внутрішньоклітинних месенджерів, проте чіткі механізми показані лише для небагатьох, а транскрипційних факторів виявлено всього декілька. Відомо, що ген *Cacnalg* знаходиться під позитивним контролем комплексу транскрипційних факторів LEF1/ β -catenin, які забезпечують його високу експресію в таламусі (Wisniewska et al., 2010). Також у кардіоміоцитах експресію цього гену стимулює рецептор глюкокортикоїдів GR1 (BenMohamed et al., 2009). Нещодавно виявлено 4 сайти для транскрипційного фактору Sp1 у промоторі гену *cacnalg* та показано його стимулювальний вплив на транскрипцію (González-Ramírez et al., 2014). Експресія гену *cacnalh* у серці активується транскрипційним фактором

Csx/Nkx2.5 (Wang et al., 2007), але може пригнічуватися 17-естрадіолом через фосфорилування цього фактору (Marni et al., 2009). Рівень експресії обох генів підвищувався завдяки впливу тестостерону (Michels et al., 2006). Крім того, у хромафінних клітинах наднирників щура продемонстровано збільшення експресії гену *Casnalh* під впливом цАМФ, але в результаті PKA-незалежного шляху (Giancippoli et al., 2006; Novara et al., 2004). В науковій літературі не описано жодного транскрипційного фактору для гену *casnali*, що, ймовірно, пов'язано з його меншою клінічною значимістю.

Важливою ланкою впливу на посттранскрипційну долю мРНК є система РНК-інтерференції. Малі некодуючі інтерференційні РНК, насамперед мікроРНК, впливають на цілі ансамблі транскриптів. Для низки іонних каналів показана посттранскрипційна регуляція мікроРНК, проте кальцієві канали Т-типу як мішені цього класу регуляторних молекул у літературі не вказані. Нам відома лише одна побіжна згадка, що передбачає (але не досліджує) регуляцію НПКК у серці за допомогою мікроРНК *mir-1* (Houser et al., 2009).

1.1.5. Фізіологічна роль Т-каналів

НПКК експресуються у багатьох тканинах і органах ссавців, як у збудливих (нейронах, м'язах, секреторних клітинах), так і в інших клітинах (лімфоцити, сперматозоони, остеобласти тощо) (Iftinca et al., 2011). Високий рівень експресії генів всіх трьох членів родини Ca_v3 у нервовій системі

пов'язаний з їх роллю в переключенні режиму активності нейронів між поодинокими потенціалами дії і пачками потенціалів та участю в синаптичній передачі (див. наступний розділ 1.2).

У той же час, Т-канали є генераторами ритму в провідній системі серця ссавців. Відносно високий потенціал спокою атипівих кардіоміоцитів синоатріального вузла (близько -60мВ) дає можливість НПКК перебувати в зоні поблизу "віконного струму", а також легко виходити з інактивації завдяки невеликому рівню гіперполяризації, забезпеченої виходом калію з клітини (Mangoni et al., 2006).

Регуляція функції та експресії генів НПКК у судинах ангіотензин-альдостероновою системою активно впливає на підвищення артеріального тиску. Внесок цього механізму виявився настільки важливим, що в останні роки Т-канали почали розглядати як потенційну мішень для антигіпертензивної терапії (Perez-reyes et al., 2009). Разом із тим, в артеріях головного мозку кальцієвий канал $\text{Ca}_v3.2$ навпаки бере участь у розслабленні м'язової стінки судин завдяки залученню механізму негативного зворотного зв'язку шляхом стимулювання виходу кальцію з депо та активації кальцій-залежних калієвих каналів (Harras et al., 2015).

НПКК активно експресуються під час ембріогенезу, проліферації та диференціації в багатьох типах клітин. Наприклад, у проліферуючих міоцитах легеневої артерії кальцієвий канал $\text{Ca}_v3.1$ необхідний для переключення між різними етапами клітинного циклу (Pluteanu et al., 2011).

У декількох роботах показано вплив T-каналів на активацію експресії генів. Зокрема в мезенхімальних клітинах хрящової тканини трахеї кальцієвий канал $Ca_v3.2$ стимулює диференціацію у хондроцити, активуючи промотор гену *Sox9* через NFAT-сигнальний шлях (Lin et al., 2014)

1.2. Експресія та функція низькопорогових кальцієвих каналів у нейронах різних відділів нервової системи

1.2.1. Загальний огляд

Результати досліджень з гібридизації *in situ* виявили унікальну картину розповсюдження НПКК у різних ділянках головного мозку щура (Talley et al., 1999). Високі рівні експресії генів T-каналів спостерігалися у релейних ядрах таламуса, гіпофізі, нижніх оливах, сенсорних гангліїв, зубчастої фасції. Також значні кількості мРНК було детектовано у мозочку, смугастому ядрі, субталамічних ядрах. Домінуюча експресія гену $Ca_v3.1$ виявлена у мигдалині, корі великих півкуль, ростральному гіпоталамусі, стовбурі мозку, спинному мозку. При цьому мРНК $Ca_v3.2$ і $Ca_v3.3$ мають вищий рівень у базальних ядрах, а всі три ізоформи представлені в рівній мірі у гіпокампі, нюховій цибуліні, каудальному гіпоталамусі. Втім, наявність високої експресії певного гену у вигляді мРНК необов'язково корелює з наявністю функціонального білка.

Властивість деінактивуватися і активуватися поблизу мембранного потенціалу спокою та здатність генерувати НКП дозволяє T-каналам

переводити нейрон у режим пачкової активності, що характерно для нейронів таламусу, шару Пуркін'є мозочка, гіпокампа. Цікаво, що в дофамінергічних нейронах чорної субстанції Ca_v3 -канали взаємодіють з кальцій-залежними калієвими каналами низької провідності (SK) й навпаки викликають перехід з пачкового до тонічного режиму нервової імпульсації (Senatore et al., 2012).

Інша важлива регуляторна функція T-каналів – тонке налаштування синаптичної передачі. Зокрема $Ca_v3.2$ взаємодіє з калієвим каналом K_v7 , пригнічуючи його задля регуляції передачі потенціалу дії по аксону (Martinello et al., 2015).

У сенсорних гангліях задніх корінців спинного мозку наявний високий рівень експресії гена $Ca_v3.2$ та домінантний T-струм через цей канал. Експерименти з заглушенням транскрипції цього гену виявили роль T-струму в передачі больового сигналу з периферії до ЦНС (Bourinet et al., 2005). Збільшення щільності T-каналів на мембрані сенсорних нейронів спостерігається при нейропатичному болю внаслідок розвитку цукрового діабету (Duzhuu et al., 2015). Тим не менш, механізми участі НПКК у передачі хронічного болю залишаються неясними (Bourinet et al., 2014)

Для експресії генів кальцієвих каналів T-типу в нервовій системі характерна суттєва онтогенетична залежність. В багатьох типах нейронів вони експресуються у певному віці, після чого зникають з мембрани (Fedulova et al., 1994; O'Dell et al., 1991)

1.2.2. НПКК у таламусі

У таламусі експресуються всі 3 гени підродини Ca_v3 . Дослідження розподілу мРНК Т-каналів за допомогою методу гібридизації *in situ* показало переважання транскриптів $Ca_v3.1$ у таламокортикальних релейних нейронах, $Ca_v3.2$ і $Ca_v3.3$ у сітчастому ядрі, а також змішану картину для локальних інтернейронів. Домінантну роль кальцієвого каналу $Ca_v3.3$ у генерації повільних хвиль під час сну доведено дослідями з нокаутними $Ca_v3.3^{-/-}$ мишами (Astori et al., 2011). Проте в низці електрофізіологічних та імунохімічних досліджень показано більш складний розподіл ізоформ НПКК у таламусі, зокрема в латеродорзальному ядрі (Tarasenko et al., 1997) .

Біофізичні властивості каналів Т-типу роблять їх ідеальними регуляторами ритмогенезу в нейронах таламусу (Snutch et al., 2010). Гіперполяризаційні гальмівні впливи виводять Т-канали з інактивациї, а струм, що активується гіперполяризацією, опосередкований HCN-каналами, викликає слабку депольаризацію, достатню для активації НПКК. Кальцієвий струм призводить до появи НКП, який переводить нейрон з режиму поодиноких потенціалів дії у ритм генерації пачок ПД. Коли на постсинаптичну мембрану приходять збуджувальні впливи з нижчих відділів нервової системи, мембрана депольаризується і ті Т-канали, що були активні, інактивуються, а інактивована більшість каналів залишається в тому ж стані. В такому стані нейрон генерує окремі ПД з різною частотою, передаючи сигнали від периферичної частини нервової системи до кори. У тому ж разі,

коли переважають гальмівні впливи і сумація постсинаптичних потенціалів призводить до гіперполяризації, НПКК деінактивуються і завдяки невеликій деполяризації, спричиненої відчиненням HCN-каналів, масово впускають кальцій, переводячи клітину до режиму пачкової активності. Такі події призводять до переривання передачі сигналів від сенсорних систем до кори, а на рівні організму – до сну. Збільшення активності T-каналів у неналежний час вважається однією з можливих причин дитячої епілепсії та інших видів епілепсії з абсансами (Cheong et al., 2013, 2014; Shin et al., 2006).

1.2.3. НПКК у корі великих півкуль

Методом гібридизації *in situ* встановлено наявність значних кількостей мРНК НПКК у різних частинах кори великих півкуль головного мозку щура (Talley et al., 1999). Утім за наступні роки було вивчено лише декілька аспектів поширення T-каналів у корі. Зокрема $Ca_v3.3$ було виявлено за допомогою антитіл та електронної мікроскопії в ГАМК-ергічних нейронах II, III, IV, V і IV шарів сомато-сенсорної кори, причому найбільша щільність каналів спостерігалася на дендритах і в перисинаптичних ділянках клітинної мембрани (Liu et al., 2011). Разом із тим детальне електрофізіологічне дослідження пірамідних нейронів V шару соматосенсорної кори 12-16-денних щурів виявило наявність усіх типів високопорогових ПККК, але відсутність струмів T-типу (Almog et al., 2009). Електричну активність та пресинаптичну локалізацію $Ca_v3.2$ було виявлено в глутаматергічних закінченнях на клітинах III шару енторинальної кори щурів, де T-канали

взаємодіють з HCN-каналами задля регуляції синаптичної передачі та пластичності (Huang et al., 2011). Щільність T-струму в зоровій корі щурів змінюється в ранній постнатальний період, досягаючи максимуму в період відкриття очей, а потім повертаючись на попередній низький рівень. Фармакологічними методами визначено ізоформу як $Ca_v3.2$ та показано її важливу участь у формуванні довготривалої синаптичної потенціації (Hogibe et al., 2014). Отже, незважаючи на малу дослідженість T-каналів у корі головного мозку, наявні роботи свідчать про залучення їх у якості регуляторів роботи синапсів. Найбільш динамічно експресія кальцієвих каналів T-типу в корі ссавців змінюється у ранньому постнатальному етапі розвитку та пов'язана з формуванням нових нервових зв'язків, після чого відносно стабілізується.

1.3 Абсансна епілепсія

1.3.1 Дитяча абсансна епілепсія людини

Дитяча абсансна епілепсія людини – це поширене захворювання, на яке страждають близько 0,05% дітей по всьому світу (5 людей на 10000) (Callenbach et al., 1998). Це ідіопатична генетично обумовлена епілепсія з абсансами: короткими (4-20 секунд) періодами несвідомості, які можуть повторюватися в пацієнта від 5 до 100 разів на день. На електроенцефалограмі хворих спостерігаються характерні періоди – комплекси "пік-хвиля" (*англ.* spike-wave discharges).

У клініці вважається, що близько 90% пацієнтів з дитячою епілепсією видужують без терапії або внаслідок лікування антиепілептичними препаратами етосукцимідом та валпроатом (Berg et al., 2014), і абсанси припиняються після віку 15-17 років. В окремих випадках у пацієнтів з'являються клонічні або навіть генералізовані приступи після настання пубертатного періоду. Проте за даними мета-аналізу (Vouma et al., 1996) ймовірність появи конвульсивних форм епілепсії може бути набагато вищою через невірні оцінки, викликані помилковими діагнозами, використаними в попередніх аналізах.

На відміну від інших видів епілепсії, дитяча абсансна епілепсія є майже виключно спадковою. Дослідження кореляції між генотипом і фенотипом виявили декілька десятків однонуклеотидних поліморфізмів – точкових замін

у ДНК – які частіше зустрічаються у хворих на абсансну епілепсію. Такі поліморфізми знайдено у генах глутаматних та ГАМК-рецепторів, ГАМК-транспорттерів, натрієвих та нуклеотид-керованих каналів, переносників глюкози, факторів трансляції та епігенетичного маркування (Maheshwari et al., 2014).

Також відомо декілька одонуклеотидних поліморфізмів у генах НПКК, які асоціюють з абсансною епілепсією. Секвенування генів *CACNA1G* та *CACNA1H* у ханьській популяції північно-східного Китаю виявило 12 міссенс-мутацій, частота яких вище в хворих на дитячу абсансну епілепсію (Chen et al., 2003). 7 з цих поліморфізмів впливають на амінокислотні заміни у внутрішньоклітинній петлі, що з'єднує I та II мембранні домени, 2 сайти розміщені в позаклітинних петлях, а 3 – у трансмембранних сегментах. Аналіз цих мутацій у гетерологічній системі експресії показав зміну часової та/або вольт-амперної характеристики струму. Всі поліморфізми збільшували кількість відкритих каналів у стаціонарному стані, а надекспресовані в культурі нейронів гіпокампу зсувають баланс нейронної активності у бік НКП і пачок потенціалів дії (Eckle et al., 2014). Утім подальші популяційні дослідження не виявили більшість подібних поліморфізмів у інших популяціях Європи, Азії та Америки. Лише мутація R788C виявилася більш розповсюдженою: її мають близько 20% китайців, 14% японців та 5% європейців (Vitko et al., 2005).

1.3.2 Тваринні моделі

Докази генетичної схильності до абсансної епілепсії виходять із близнюкового аналізу. Було помічено, що коінциденція хвороби набагато вища у монозиготних близнюків, ніж у гетерозиготних. Враховуючи генетичну схильність, спадкові тваринні моделі набагато краще відтворюють абсансну епілепсію людини, ніж моделі, у яких епілепсія індукується фармакологічними чинниками. Тому генетичним моделям деякий час надавали перевагу. Досить широко використовувалися такі експериментальні моделі, як пеніцилінова котяча, пентилентетразолова та γ -гідроксибутирова.

У сімдесятих роках ХХ століття було описано різноманітні мишачі генетичні моделі, у яких крім комплексів "пік-хвиля" (spike-wave discharges) спостерігалися й інші неврологічні аномалії. Пізніше пік-хвильові розряди було виявлено і у щурів.

В роботі (Ernst et al., 2009) було створено мишачу лінію, що гіперекспресувала ізоформу $Ca_v3.1$. В неї було виявлено характерні для абсансів веретеновидні розрядки на ЕЕГ. Цікаво, що гіперекспресія Т-каналу спостерігалася не тільки у таламусі, але й корі.

Найперші вимоги до достовірної моделі епілепсії – це наявність спонтанних комплексів "пік-хвиля" на електроенцефалограмах (ЕЕГ) та супутніх клінічних ознак епілепсії. У минулому дослідники спостерігали, що деякий відсоток щурів у схрещуваній має пік-хвильові розряди, які супроводжуються зупинкою тварини та посмикуванням вібрисів (Coenen et

al., 2003). Група Marescaux та Vergnes (Danober et al., 1994, 1998; Pinault et al., 1998) проводила інтенсивні дослідження на Страсбурзькій породі лінії щурів Wistar. У 31% щурів віком 6-12 місяців були зареєстровані комплекси "пик-хвиля". Потім вони відібрали та схрестили цих щурів між собою, яких потім назвали «Страсбурзькі щурі з генетичною абсансною епілепсією» (Genetic Absence Epileptic Rats of Strasbourg, GAERS). Цим вдалося підвищити і частоту появи, і тривалість пик-хвильових розрядів. Генералізовані, неконвульсивні приступи з'являються у GAERS у віці 40-120 днів і тривають впродовж їхнього життя, посилюючись із віком. Інші дослідники також помічали, що різноманітні породи та селективні лінії щурів проявляють пик-хвильові розряди. У всіх породах та лініях спостерігається вік-залежне підвищення кількості уражених тварин, кількості та часу тривалості пик-хвильових розрядів. Було показано, що у щурів Wistar віком у 22 місяці проявляється відхилення у більше ніж 90% особин []. Таке монотонне збільшення пик-хвильових розрядів із віком не зовсім співпадає із ситуацією при людському захворюванні. Абсансна епілепсія людини – це дитяче захворювання, яке або проходить при статевому дозріванні, або трансформується у більш серйозний тип епілепсії; тоді як у щурів пик-хвильові розряди появляються при статевому дозріванні і не зникають до кінця життя.

1.3.3. Характеристика експериментальної моделі абсансної епілепсії у щурів лінії WAG/Rij

У 1986 році було помічено, що усі дорослі WAG/Rij щурі проявляють пік-хвильові розряди із слабкими клінічними проявами. У 6-ти місячному віці самки та самці проявляють близько 16-20 розрядів на годину із середньою тривалістю біля 5 с. Це близько кількох сотень розрядів на день. Пік-хвильові розряди проявляються у віці від 2 до 3 місяців, у молодших особин вони не були помічені. WAG/Rij лінія є сублінією WAG породи, яка була виведена із лінії Wistar у лабораторії Glaxo Лондоні в 1924 році. Існують й інші підлінії, такі як WAG/Cpb, WAG/Kyo, WAG/Mb1, Wag/Orl, Wag/Ztu. WAG/Rij – це інбредна лінія, виведена схрещуваннями між сіблінгами більше 130 поколінь. Поведінка WAG/Rij подібна до щурів Wistar.

Пік-хвильова активність на кортикальній ЕЕГ дорослих WAG/Rij складається із пакетів імпульсів тривалістю 1-30 с і частотою 7-10 Гц []. У людини частота нижча – 3 Гц. Як і в інших лініях, кількість пік-хвильових розрядів зростає із віком. У 6-тимісячних щурів трапляється 16-18 нападів на годину, 300-400 – на день. Відмінності між статями мінімальні. Комплекси «пік-хвиля» білатерально-симетричні, поширюються на усю кору. У фронтальних ділянках розряди краще проявляються, ніж у паріетальних. Як і людей, під час нападів разом із електрофізіологічними ознаками проявляються і слабкі зовнішні. Приступи у WAG/Rij щурів супроводжуються лицевими міоклонними посіпуваннями, посмикуваннями

вібрисів, прискореним диханням, відкиданням голови та посіпуванням очей. За іншими параметрами тварини цілком нерухомі. Такі стани, як активність, повільний сон та REM-сон сильно впливають на ймовірність виникнення розрядів. У більш ніж 80% випадків комплекси «пік-хвиля» виникають під час пасивної активності або поверхневого повільного сну []. Деколи приступи проявляються впродовж глибокого повільного сну та рухливої активності. Під час REM-сну комплекси «пік-хвиля» трапляються рідко. У людей також напади трапляються частіше під час дрімоти чи поверхневого повільного сну. Це вказує на те, що комплекси «пік-хвиля» легко проявляються у перехідних станах між сном та активністю. Звідси, вони переважно проявляються у нестабільні періоди, які також часто характеризуються сонними веретенами. Час появи та частота веретен співпадає із такими пік-хвильових розрядів. Ця подібність вказує на близьку спорідненість цих двох явищ.

Комплекси «пік-хвиля» регулюються циркадними ритмами, найбільше їх трапляється між 4 та 5 годинами темного періоду, коли щурі перебувають в стадій поверхневого повільного сну чи дрімоти []. Найменше число пік-хвильових розрядів співпадає із появою дня, коли у щурів спостерігається стадія найбільш глибокого повільного сну. Дослідження на людях також підтверджують циркадну ритмічність нападів, що асоціюються із періодом ранкових пробуджень та періодами відпочинку. Найбільш широко розповсюджена методика провокування нападів у людини – це повна

депривація сну. У WAG/Rij щурів повна депривація сну також викликає підвищення кількості комплексів «пік-хвиля» впродовж перших 4 годин.

Судячи з усього, включаючи асоціацію нападів із станом активності чи сну, та зв'язком пік-хвильових розрядів із сонними веретенами для обох видів, WAG/Rij модель має «достовірне обличчя». Також, для обох видів присутній циркадний розподіл, проте із-за активності щурів уночі, періоди найбільшої схильності до нападів не співпадають із людськими. Досліди із депривацією сну підтверджують «передбачувану достовірність» моделі.

Чотири теорії намагалися пояснити джерело пік-хвильових розрядів, асоційованих із відсутньою епілепсією. Penfield та Jasper запропонували «центренцефалічну» теорію, що розглядає глибокий субкортикальний пейсмейкер, який, можливо, розміщується у верхній частині стовбура мозку, або у медіальному таламусі і має широкі проекції до обох півкуль, як джерело комплексів «пік-хвиля» (Hudson et al., 2009; Magiorkinis et al., 2014). Buzsaki і ін. (1988) запропонували теорію «таламічного годинника», у якій сітчасті таламічні ядра містять пейсмейкер, що генерує комплекси "пік-хвиля". Натомість, «кортикальна» теорія Банкауда (1972) та Нідермеєра (1972) розглядає певний фокус у корі як джерело SWD. У цій теорії субкортикальні структури не обов'язкові для генерації SWD, а грають пасивну роль. Gloor (1968, 1969) постулював «кортикоретикулярну» теорію, що об'єднує таламічну та кортикальну теорії. За нею гіперзбудлива кора

ненормально відповідає на нормальні таламокортикальні імпульси, генеруючи тим самим ненормальні таламокортикальні осциляції.

У всіх теоріях, як вихідну умову, приймають велику синхронізацію таламокортикальних чи кортикоталамічних зв'язків. Широко поширені, синхронні, білатеральні SWD є доказом цього. Нідерландські вчені (Meeren et al., 2002) досліджували ініціацію та розповсюдження SWD, вимірюючи потенціали на корі та таламусі у вільнорухомих WAG/Rij щурів. Було знайдено «кортикальний фокус» у периоральній ділянці соматосенсорної кори, відповідальній за відчуття верхньої губи та вібриси (мал. 1.3). Пік-хвильові розряди, записані із інших ділянок кори, достатньо сильно відставали від фокальної ділянки, а часові затримки зростали із відстанню електрода від фокуса. Внутрішньоталамічні взаємозв'язки були більш складними і не могли давати відчутного впливу на кортикальне поширення комплексів «пик-хвиля». Кортикальні та таламічні сайти взаємодіяли двонаправлено, напрямок зв'язку варіював впродовж одного приступу. Проте, впродовж перших 500 мс кортикальний фокус відчутно випереджав таламус.

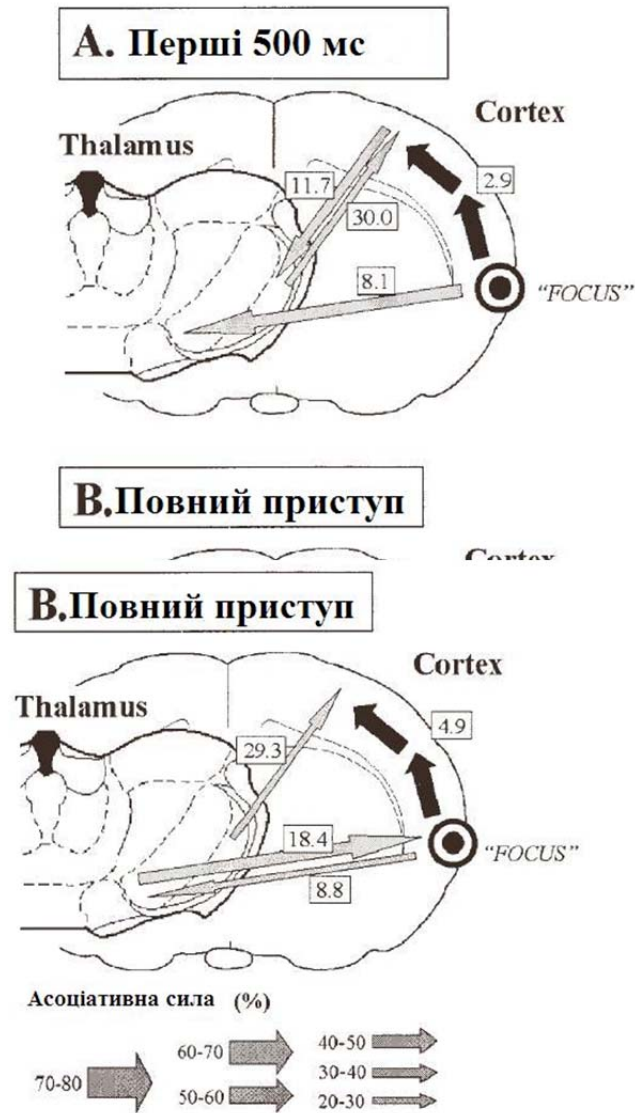


Рис. 1.3 Кортикальні (чорні стрілки) та кортикоталамічні взаємозв'язки впродовж спонтанних SWD у WAG/Rij щурів. Товщина стрілки відображає силу асоціації між ділянками. А, Взаємозв'язки в перші 500 мс приступу. Кортикальний фокус у соматосенсорній корі верхньої губи та носа відчутно випереджав інші кортикальні ділянки. Соматосенсорна ділянка задньої лапи відставала на 2.9 мс від фокуса. Кортикальний фокус випереджав вентропостеріальне медіальне ядро таламусу на 8.1 мс. В, взаємозв'язки впродовж усього приступу. (Адаптовано з (Meeren et al., 2002))

Ці дані заперечують наявність лише одного субкортикального пейсмейкера комплексів «пік-хвиля» у щурів. Натомість, результати вказують на домінуючу роль кортикального фокуса у ініціації комплексів, а висока синхронізація досягається надзвичайно швидким розповсюдженням приступу по корі (Meegen et al., 2005). Впродовж першого циклу, кора рекрутує таламус, який починає брати участь у осциляціях. Через деякий час кора та таламус починають діяти як уніфікована осциляторна мережа. По факту, кора залучає інтактний таламус у підтримання осциляцій. Із цього слідує, що комплекси «пік-хвиля» не є формою збурених сонних веретен, що генеруються таламусом, а являють собою окреме явище. Тому був запропонований синтез «кортикальної» та «кортикоретикулярної» теорій у теорію «запуску корою та підтримки таламусом».

Таким чином, аналіз літературних відомостей дозволяє на зробити наступні висновки:

1. Низькопорогові кальцієві канали наявні в багатьох типах клітин ссавців, де виконують функції ритмогенезу, активації механізмів руху, внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації, регуляції експресії генів тощо.
2. Кожен з трьох генів НПКК має власний профіль експресії, який змінюється в нормальному онтогенезі та при патологічних станах, призводячи до змін фізіології клітини та організму.

3. Функції НПКК добре описані в таламусі, проте залишається неясною динаміка змін експресії генів T-каналів в ньому під час раннього і зрілого періоду онтогенезу, а також мало відомо про регуляцію, що викликає ці зміни, зокрема про регуляцію за допомогою РНК-інтерференції
4. Експресія генів та функція T-каналів у корі великих півкуль головного мозку вивчені недостатньо, зокрема майже відсутні відомості щодо ролі $Ca_v3.1$
5. Клітинні механізми розвитку дитячої абсансної епілепсії людини і моделі абсансів – щурів лінії WAG/Rij – досліджені недостатньо, хоча припускається певна роль НПКК у патологічній активності головного мозку.

РОЗДІЛ 2 Методика досліджень

2.1 Об'єкт дослідження

Всі дослідження проводилися на щурах ліній Wistar WAG/Rij, що утримувалися у віварії Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця в окремих кімнатах, щоб не допустити міжлінійного схрещування. Для дослідження використовувалися самці щурів віком 1, 5, 10, 15, 25, 30 постнатальних днів, а також 3- і 6-місячні. Всі маніпуляції з тваринами відбувалися у відповідності до вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних наукових цілей (Страсбург, 18 березня 1986 рік), та згідно з «Науково-практичними рекомендаціями з утримання лабораторних тварин та роботи з ними» Міністерства охорони здоров'я України (Київ, 2002).

Тканину головного мозку виділяли для дослідження окремих нейронів, виділення тотальної РНК або білку. Попередньо готували наступні розчини (концентрації в мілімолях на літр). Розчин 1: 150 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 1,25 NaH₂PO₄. Розчин 2: 150 NaCl, 74,5 KCl, 0,9 CaCl₂, 1,1 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 1,25 NaH₂PO₄. Безпосередньо перед використанням у розчини додавали 10 мМ глюкози.

Щура лінії Wistar віком 14-15 днів наркотизували та декапітували, ножицями зрізали шкіру голови та підрізали череп спереду. Мозок діставали, відрізали мозочок, приклеювали до підставки вібратору потиличною частиною та занурювали в охолоджений до +4°C розчин 2. За допомогою

вібратому робили корональні зрізи товщиною у 300-500мкм, які вміщували під бінокулярний мікроскоп. На кожному зрізі згідно з атласом мозку щура (Paxinos et al., 1998) знаходили сітчасте та латеродорзальне ядра таламусу і зону соматосенсорної кори верхньої губи та вібрис, які потім вирізали за допомогою тонкого скальпеля.

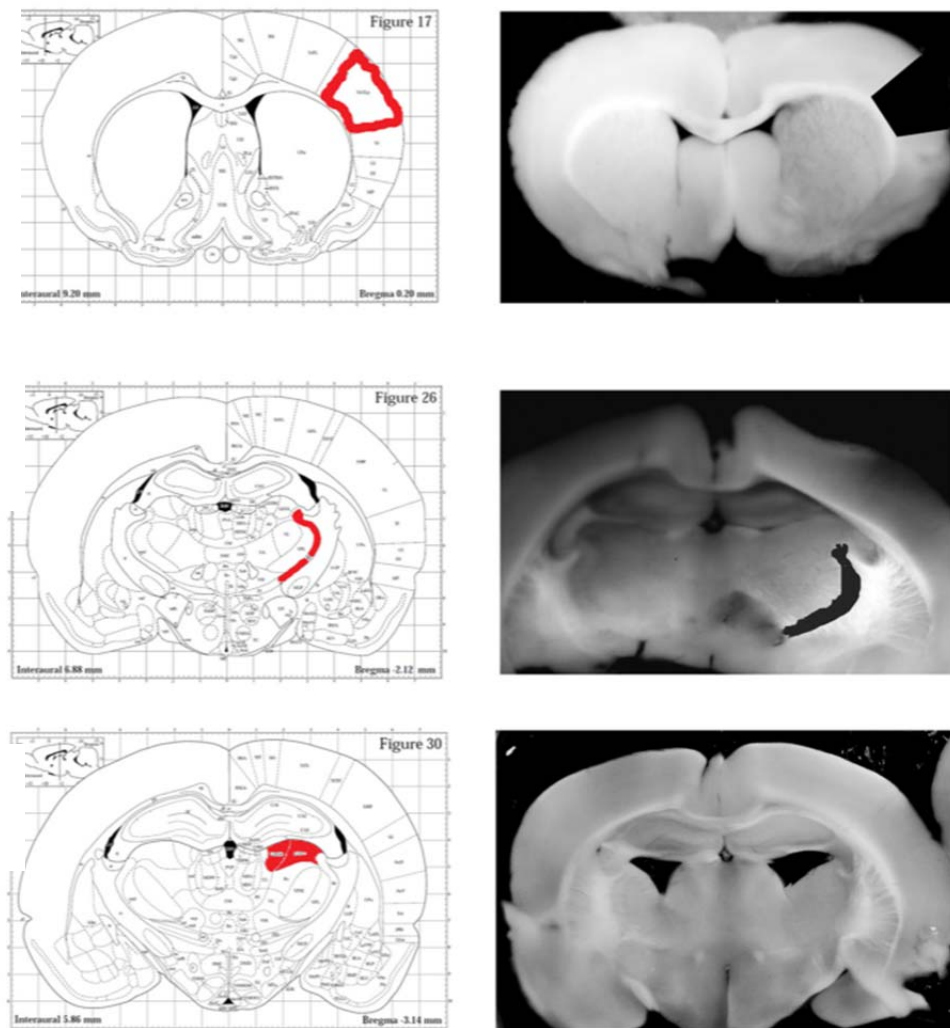


Рис. 2.1. Відділи мозку, які бралися у дослідження. А – соматосенсорна кора верхньої губи та вібрис (СК), Б – сітчасте ядро таламуса (СЯ), В – латеродорзальне ядро таламуса (ЛД). Ліва панель з [Paxinos, Watson, 1998]

Усі реактиви, якщо не зазначено інакше, виробництва компанії Sigma-Aldrich (США).

2.2 Молекулярно-біологічні методи дослідження

2.2.1 Полімеразна ланцюгова реакція поодиноких клітин (методика "single-cell RT-PCR")

Для аналізу експресії генів Ca_v3 в поодиноких нейронах таламусу поодинокі клітини засмоктувалися в мікропіпетку, яка містила 2 мкл внутрішньоклітинного розчину (мМ): CsOH – 50 , CsCl – 80, HEPES – 10, EGTA – 10 (рН доводили розчином HCl до 7,3) і переносилися в спеціальний буфер для проведення зворотної транскрипції. Буфер містив у кінцевій концентрації наступні компоненти: 50 ммоль Tris-HCl (рН 8.3), 50 ммоль KCl, 4 ммоль $MgCl_2$, 40 ммоль дітіотреїтолу, 40 одиниць інгібітору РНКаз RiboLock (Fermentas, Литва), 300 мкМ інгібітору протеасоми (цистолактоцистин-бета-лактону), 0.2 мкг олігомерного $(dT)_{18}$ праймера, 1 ммоль суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів (Fermentas, Литва). До початку реакції ЗТ проби зберігались при 4°C. Потім до всіх зразків додавали 40 одиниць зворотної транскриптази М-MuLV (Fermentas, Литва), та інкубували проби протягом 2 годин при 42°C. Отриману таким чином одноланцюгову кДНК з поодиноких клітин гіпокампу використовували для проведення двох раундів ПЛР із застосуванням відповідних праймерів. Ампліфікаційна суміш для мультиплексної ПЛР містила 5 мкл 5-кратного PCR-буферу із сульфатом амонію, 2.5 мМ сульфату магнію, 200 мкМ суміші

чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 5 пМ кожного з праймерів та 0.5 одиниць рекомбінантної Taq-полімерази (Fermentas, Литва). Об'єм зразків доводили до 25 мкл деіонізованою водою. Програма першого раунду ампліфікації складалася з 25 циклів: денатурація – 94°C, 1 хв, приєднання праймерів – 64°C, 1 хв і елонгація – 74°C, 1 хв (GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems, США). При проведенні другого раунду ПЛР в окремі пробірки додавали по 5 мкл продукту першого раунду мультиплексної ПЛР для ампліфікації специфічних фрагментів генів і використовували ті ж самі компоненти суміші, проте збільшували концентрацію праймерів до 30 пМ. Другий раунд ампліфікації складався з 45-48 циклів. Ампліфікати розділяли в 1.5% агарозному гелі, що містив бромістий етидій. Візуалізація та оцінка яскравості ампліфікатів після горизонтального електрофорезу (170 В протягом 30 хв.) проводилися за допомогою транслюмінатора та програмного забезпечення ViTran (Біоком, Росія)

2.2.2 Виділення РНК з тканин мозку

Із вирізаних ділянок та культури клітин проводилося виділення тотальної РНК із застосуванням набору Trizol RNA-prep. kit (“Isogene”, Росія). Метод заснований на фенол-хлороформній екстракції РНК з цілісної тканини. Послідовність дій:

1. Одразу ж після виділення тканини мозку поміщали у 300мкл Trizol-реагенту. При виділенні із культури клітини змивали із чашок охолодженим реагентом Trizol. Перемішували. Поміщали на +4°С на 5 хвилин.

2. Додавали 150 мкл суміші хлороформ:ізоаміловий спирт (49:1), перемішували та центрифугували на максимальній швидкості (16 krcf) 20 хв при +4°С.

3. Верхню, водну фазу відбирали, до неї додавали рівний об'єм холодного (+4° С) ізопропанолу. Залишали на -20°С на ніч.

4. Центрифугували з прискоренням 16000×g при температурі +4°С протягом 20 хвилин.

5. Рідину зливали, до преципітату додавали 500 мкл 75% етанолу, перемішували.

6. Центрифугували 5 хв з прискоренням 16000×g при +4°С. Надосад зливали.

7. Висушували преципітат і розчиняли його у 30 мкл деіонізованої води, чистої від нуклеаз.

8. Визначали концентрацію та чистоту за допомогою спектрофотометра NanoDrop ND1000. У досліді брали лише проби зі співвідношенням поглинання на довжинах хвиль $A_{260}/A_{280} > 1,6$

При роботі із РНК усі робочі поверхні та рукавички оброблялися сумішшю блокаторів рибонуклеаз RNA zap ("Ambion", США).

2.2.3 Зворотна транскрипція

Для проведення реакції використовувався RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (“Fermentas”, Литва). Реакцію проводили у два етапи. Спочатку готували суміш із оліго-дТ₁₈ (50 пікомоль на реакцію) та випадкового гексамерного праймерів (50 пікомоль на реакцію), сумарної РНК (0,3-3 мкл, що відповідало 0,3-0,5 мкг), та води із загальним об’ємом 11,5 мкл суміші. Проводили нагрівання суміші до 70 °С протягом 5 хвилин для досягнення денатурації вторинних структур РНК. Далі суміш охолоджували до 0°С для досягнення ефекту гасіння. На другому етапі готували суміш із буфера, суміші дезоксирибонуклеотидтрифосфатів (дНТФ) (1 мкл 10 мМ), інгібітора рибонуклеаз RiboLock (20 од) та полімерази M-MuLV Reverse Transcriptase (200 од) загальним об’ємом 7 мкл. Цю суміш додавали до першої і проводили ревертазну реакцію за програмою: 25°С 10 хв., 42°С 60 хв., 70°С 10 хв. В результаті отримували кДНК.

Для зворотної транскрипції мікроРНК та контрольної U6 РНК застосовували TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (“Applied Biosystems”, USA). Процедура була така: готували суміш із 0,15 мкл 100 мМ дНТП , 1 мкл MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/ мкл, 1,5 мкл 10× Reverse Transcription Buffer, 0,19 мкл RNase Inhibitor, 20 U/мкл, 4,16 мкл води, 5 мкл РНК (1-10 нг), 3 мкл специфічних 5х праймерів. Далі інкубували на ампліфікаторі 30 хв 16 °С, 30 хв 42 °С, 5 хв 85 °С, ∞ 4°С.

2.2.4 Полімеразна ланцюгова реакція

Для проведення реакції використовувалася Taq polymerase (“Fermentas”, Литва). Реакційна суміш містила 1x Taq буфер, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM дНТФ (кожного з дНТФ), Taq pol.2.5u, кДНК 3 мкл, прямі та зворотні праймери по 30 пмоль і складала 25 мкл. Реакцію проводили за такою програмою: 94°C 30 с, variable °C 50 с, 72°C 50 с, повтор 2 та 3 етапу n-разів, 72°C 5 хв.

Температура гібридизації та кількість циклів варіювали в залежності від праймерів та матриці. Послідовності праймерів для ПЛР та ПЛР для однієї клітини вказані в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

| Ген | Праймери | Т°C гібридизації | Розмір амплікону |
|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------|
| <i>Casnalg</i> (Cav3.1) | прямий – 5`-agccccggtggtttcttcta-3` зворотний – 5`-tgagcggtcgcagcacac-3` | 59°C | 398 п.о. |
| <i>Casnali</i> (Cav3.3) | прямий – 5`-gctgcggcgcctggaaga-3` зворотний – 5`- gsscatgcacggacagcagcacaat-3` | 62°C | 322 п.о. |
| <i>Casnalh</i> (Cav3.2) | прямий – 5`-aggaggctcggcgccgg-3` зворотний – 5`-ggataggaggacgatggcсаа- 3` | 59°C | 355 п.о. |
| <i>Actb</i> | прямий – 5`-tcatactatcggcaatgagc-3` | 60°C | 300 п.о. |

| | | | |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|------|----------|
| (β-актин) | зворотний – 5`-ggccaggatagagccacca-3` | | |
| <i>Gad1</i> (GAD65) | прямий – 5`-tcttttctcctggtggtgcc-3` зворотний – 5`-ccccaaagcagcatccacat-3` | 58°C | 391 п.о. |
| <i>GAT1</i> | прямий – 5`-acatggaaggacgcttcgactt-3` зворотний – 5`- tcagccagaaggacagcacagct-3` | 56°C | 274 п.о. |
| <i>VGluT1</i> | прямий – 5`-accatcggaggccagatcg-3` зворотний – 5`-gccactcctcccgcgtcttgtgc- 3` | 58°C | 341 п.о. |

2.2.5 Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі

Отриману кДНК (розділ 2.2.3) використовували для проведення кількісної полімеразної ланцюгової реакції «в реальному часі». Цей метод дозволяє зчитувати кількість продуктів ПЛР, що утворилися після кожного циклу реакції за допомогою спектрофлуориметру, який вимірює флуоресценцію пришитих до додаткового ДНК-праймеру зондів-барвників.

Реакційна суміш складалася із 10 мкл ПЛР-суміші FastTaqMan PCR MasterMix (“Applied Biosystems”, США), 0,5 мкл суміші праймерів та зонду, 7,5 мкл води та 2 мкл кДНК, з загальним об’ємом суміші 20 мкл. Реакцію проводили у ампліфікаторі 7500 Fast Real-Time PCR System (“Applied Biosystems”, США) за програмою 94°C 5 с, 60°C 30 с протягом 45-50 циклів при аналізі експресії *casnalh* та 95°C 20 с, 95°C 3 с, 61°C 30 с із повторенням 2 і 3 етапу протягом 50-60 циклів для аналізу експресії *rho-miR-1*. Кожна

проба при проведенні реакції дублювалася. У реакції використовувалися такі праймери: *casnalh* – набір Rn01460339_gH, барвник FAM. Як позитивний внутрішній контроль використовували транскрипт гену «домашнього господарства» гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (GAPDH). Для перевірки його кількості використовували TaqMan Rodent GAPDH Control Reagents (VIC™ Probe) (“Applied biosystems”, США). Для виміру експресії *rho-miR-1* використовувався набір 002064 (“Applied Biosystems”, США), а для гена «домашнього господарства» U6 – набір 001973 (“Applied Biosystems”, США). Кількісну оцінку експресії та обробку даних проводили з використанням програмного забезпечення 7500 Fast System SDS Software 1.3.1 (“Applied Biosystems”, США).

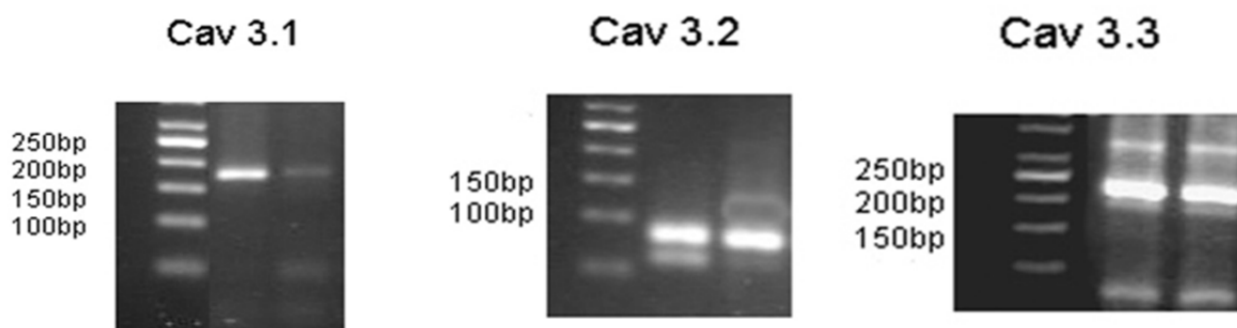


Рис. 2.2. Амплікони кДНК 3 ізоформ Т-каналів після кількісної ПЛР, розділені в агарозному гелі.

2.2.6 "Вестерн-блот"

Для виявлення білку $Ca_v3.1$ у тканині соматосенсорної кори використовували імунохімічний метод «вестерн-блот». Суть його полягає в

екстракції тотального білка з тканини, електрофоретичної розгонки білків у денатуруючому гелі за їхньою молекулярною масою, переносі їх на мембрану, де вони зв'язуються із специфічними первинними і вторинними антитілами. Вторинні антитіла, кон'юговані із ферментом системи детекції, яка дозволяє фотографічним способом зафіксувати люмінесценцію субстрату і таким чином визначити кількість зв'язаних із цільовим білком антитіл.

Тканину вміщували у буферний розчин А, де гомогенізували за допомогою гомогенізатора Поттера. Далі екстракт наносили у лунки 5% поліакриламідного гелю та розганяли протягом 2 годин при 120 В. Якість електрофорезу оцінювали зафарбовуванням 10% розчином барвника Coomassie R. Після електрофорезу гель вміщували у електроблотер та проводили перенос на нітроцелюлозну мембрану за дією електричного струму протягом 1 години. Мембрану залишали у 5% розчині знежиреного сухого молока із PBS та Tween-20 на ніч на ротаторі для забивки вільних сайтів. На наступний день мембрану відмивали у PBS-Tween 3 рази, після чого інкубували із первинними антитілами до Ca_v3.1 (поліклональні антитіла кроля, дарунок проф. Т. Снатча) та до актину (моноклональні антитіла миші, Abscam) протягом 2 годин. Знову відмивали у PBS-Tween 3 рази та інкубували 40 хвилин із вторинними анти-кролячими та анти-мишачими анти-IgG антитілами, кон'югованими із пероксидазою хрину. Знову відмивали у PBS-Tween 3 рази. Після цього додавали люмінол та кумарову

кислоту для отримання люмінесценції. Сигнал детектували за допомогою рентгенівської фотоплівки у темній кімнаті.

2.3. Електрофізіологічний експеримент

В наших експериментах чашку Петрі з клітинами встановлювали в препаративній камері, розташованій на предметному столику інвертованого мікроскопу з оптикою "Zeiss" (Німеччина). Скляні мікроелектроди виготовлювались з боросилікатного скла (зовнішній діаметр 1,5 мм). Піпетки мали діаметр кінчика $1 \div 2$ мкм та опір $3 \div 5$ М Ω при заповненні стандартним внутрішньоклітинним розчином. Мікроелектрод закріплювали у полікарбонатному тримачі, прикріпленому до передпосилувачу Dagan pre-one, (Dagan Corp., США). Передпосилувач розташований на мікроманіпуляторі. Заповнений розчином мікроелектрод занурювали до позаклітинного розчину і компенсували потенціал кінчика, який в середньому складає $4 \div 5$ мВ. Гігаомні контакти між клітинною мембраною і електродом утворювали, притискаючи піпетку з прикладеним до неї невеликим позитивним тиском до поверхні клітини та потім скидаючи цей тиск до атмосферного. Утворення гігаомного контакту контролювали в режимі фіксації потенціалу, подаючи на мембрану прямокутні гіперполяризуючі імпульси амплітудою -10 мВ. Після утворення щільного контакту піпетки з поверхнею мембрани проводилась компенсація ємності піпетки відносно зовнішнього розчину. Конфігурацію "ціла клітина"

отримували при прориві мембрани під піпеткою імпульсами від'ємного тиску, після чого записували ємнісний струм у відповідь на гіперполяризуючий імпульс амплітудою в 10 мВ.

Вихідний сигнал посилювача фільтрували при частоті зрізу 10 кГц за допомогою 3-х полюсного фільтру Бесселя і 2-5 кГц цифровим фільтром. Комп'ютерна система забезпечувала також генерацію командних імпульсів.

Позаклітинний базовий розчин для дослідження мембранних струмів в ізольованих нейронах містив (в мМ): NaCl_2 – 150, NaOH – 10, KCl – 3 CaCl_2 – 5, MgCl_2 – 1, HEPES – 10, глюкози – 10, рН доводили розчином HCl до 7,4. Щоб виключити натрієву і калієву провідності, кальцієві струми вимірювались у позаклітинному розчині такого складу (ммоль/л): TEACl – 150, MgCl_2 – 1, CaCl_2 – 2,5, HEPES – 10 (рН доводили розчином TeaOH до 7,3) Реєструючи піпетку заповнювали внутрішньоклітинним розчином такого складу (ммоль/л): CsOH – 50, CsCl – 80, HEPES – 10, EGTA – 10 (рН доводили розчином HCl до 7,3). Заміни зовнішніх розчинів проводили за допомогою багатоствольної мікропіпетки зі спільним витоком, який розташовувався біля досліджуваної клітини.

2.4. Математичні методи аналізу даних і програмне забезпечення

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програмного пакету Origin 7.0. Для порівняння двох груп даних з нечисленними вибірками використовували критерій Манна-Уїтні. Для

порівняння трьох і більше груп використовували аналіз ANOVA. Статистично значимими вважали відмінності, які мали ймовірність помилки $p < 0,05$.

Для аналізу записів електрофізіологічних експериментів використовували програмне забезпечення Clampfit (Axon Instruments, США).

Аналіз праймерів для ПЛР на ефективність здійснювали за допомогою програмного забезпечення BLAST та FastPCR.

Для біоінформаційного пошуку потенційної взаємодії мікроРНК з 3'-нетрансльованою ділянкою матричної РНК використовували он-лайн програмний пакет TargetScan (<http://www.targetscan.org/>). Додаткову перевірку сайтів взаємодії здійснювали за допомогою програмного забезпечення RNAhybrid (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>).

РОЗДІЛ 3 Результати власних досліджень

3.1 Розробка методу полімеразної ланцюгової реакції для оцінки експресії генів у окремих нейронах

Основним методом, який дозволяє оцінити експресію гена є полімеразна ланцюгова реакція із зворотною транскрипцією. Високоспецифічні праймери дозволяють вивчати мРНК конкретного гена, а модифікація методу із застосуванням флуоресцентних барвників (кількісна ПЛР, «ПЛР у реальному часі») дає можливість визначити кількість цієї РНК. Проте для виявлення експресії генів у тканині, що складена клітинами, які відрізняються між собою, потрібен ще більш тонкий метод, який би дозволяв працювати із невеликою кількістю мРНК, яка міститься у одній клітині. Саме це задача для іншої модифікації ПЛР – ПЛР для одної клітини. Коли є необхідність у такому підході? Припустимо, в нас є тканина або клітинна популяція, яка містить клітини, що функціонально відрізняються між собою. Наприклад, це можуть бути епітеліальні клітини, частина з яких знаходиться у інтерфазі, інші мітотично діляться, а деякі гинуть апоптозом, автофагією чи некрозом. Звичайно, всі ці клітини одного типу будуть мати різні профілі експресії генів. Інша необхідність застосувати ПЛР для одної клітини з'являється тоді, коли у тканині містяться клітини різних типів, які не можна розділити при виділенні РНК. Такими є дрібні м'язеві структури на кшталт кровоносних судин або протоків секреторних органів, наприклад сечоводів та

сім'япроводів. Дійсно, хоча при виділенні тканини сім'япроводів вдається розділити шар слизового епітелію та м'язи, все одно м'язовий шар містить залишки як епітелію, так і нервових закінчень, тому не можна виключати змішування мРНК із різних джерел. Тут знову-таки потрібна ПЛР для одної клітини. Апогеем складності, звичайно, є нервова тканина, де навіть дві сусідні клітини можуть відрізнятися між собою за функцією, активністю, напрямком передачі інформації. Тому для нейрофізіології та нейрогенетики ПЛР для однієї клітини є потужним інструментом, що дозволяє «паспортизувати» конкретні нейрони та класифікувати їх за різними критеріями, як-то секреція медіаторів, наявність іонних каналів та рецепторів, участь у нервових процесах тощо.

Не дивно, що саме нейрофізіологи розробили і вперше застосували цей метод невдовзі після відкриття самого принципу ПЛР (Lambolez et al., 1992). Теоретична роздільна здатність ПЛР становить 1 молекулу ДНК, тому принципівих заперечень для ампліфікації кДНК, отриманої з мРНК однієї клітини (від десятків до тисяч молекул одного типу) не існує. Головною методичною складністю є відбір та збереження РНК та кДНК до початку ПЛР. Для роботи із гостро ізольованими нейронами ми модифікували варіант методу, що застосовувався (Takazawa et al., 2004). Спочатку клітину після вимірювання струмів засмоктували у додаткову скляну мікропіпетку діаметром 8-16 мкм, що містила дистильовану воду із інгібітором РНКаз. Вміст мікропіпетки об'ємом 1-5 мкл додавали до заздалегідь приготованої

суміші, що містила буферний розчин для зворотної транскрипції, дНТФ, оліго-дТ та випадковий гексамерний праймери. Реакція зворотної транскрипції ставилася негайно після додавання ревертази, без стадії виділення РНК. Після неї ставили першу ПЛР із сумішшю праймерів до досліджуваних кДНК, а далі другу вже для кожної пари праймерів окремо. Проте об'єм реакції було дуже складно контролювати, а від'єднання вимірювального електроду та додатковий час для засмоктування більшою мікропіпеткою могло призводити до втрати частини мРНК та до забруднення проби зовнішньою РНК. Для подолання цієї проблеми було порівняно клітини, взяті у дистильованій воді та у внутрішньоелектродному розчині, що містив 125 мМ цезію та 10 мМ ТЕА. Таке порівняння виявило не виявило різниці у експресії бета-актину у обох варіантах процедури відбору. Таким чином, подальші забори клітин здійснювали прямо у вимірювальний скляний електрод.

З метою запобігти ампліфікації геномної ДНК було використано праймери, що гібридизуються із матрицею на стику екзонів кДНК. Такі праймери добре паруються із кДНК, яка отримана шляхом зворотної транскрипції зрілої процесованої мРНК. При цьому вони мають неспарену ділянку на 3'-кінці відповідної геномної ДНК, яка містить послідовності інтронів, тому приєднання ДНК-полімераз і подальша ампліфікація ДНК, що використовує геномну ДНК як матрицю, стає неможливою (Рис. 3.1). Разом з тим, дослідники, які розробили ПЛР для кДНК з однієї клітини,

вважають, що ризику ампліфікації геномної ДНК не існує (Johansen et al., 1995). Оскільки стадія виділення нуклеїнових кислот відсутня при виконанні цієї методики, ДНК, ймовірно, залишається у комплексі з ядерними білками та нездатна брати участь у ПЛР.

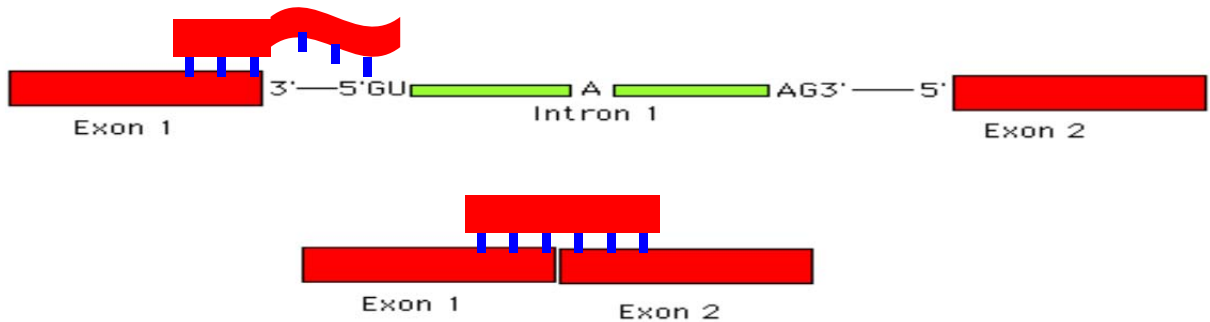


Рис. 3.1. Принцип роботи праймера, що не гібридизується з геномною ДНК, але комплементарний до стику екзонів на кДНК.

Крім інгібітору РНКаз до розчину для збирання клітин додавали блокатор протеасоми класто-лактоцистин-бета-лактон у концентрації 10 мкМ з огляду на відомості про РНКазну активність протеасоми (Досенко et al., 2005). Також до суміші було додано додатково 300 мкМ дитіотриетолу, стабілізатору ферментів, що також сприяв успішному проходженню зворотної транскрипції.

Даний метод був також застосований у модифікації кількісної ПЛР. На відміну від звичайної реакції, ПЛР «у реальному часі» проводили в один етап, довжиною у 50-55 циклів.

Для перевірки методу на псевдопозитивні результати було поставлено реакцію з праймерами для β -актину із проведенням негативних контролів. В одну з пробірок не додавали ревертазу для перевірки можливості ампліфікації геномної ДНК. До іншої замість клітини додавали 2 мкл поживного середовища, щоб упевнитися, що в ньому нема достатньої кількості цілісної мРНК для забруднення матеріалу з окремої клітини молекулами з загиблих клітин. Також ставили реакцію, в якій клітину було замінено на 2 мкл деіонізованої води, щоб перевірити можливість контамінації реагентів. Жоден з негативних контролів не давав характерного амплікону. Такі контролі ставили постійно для кожної нової реакції.

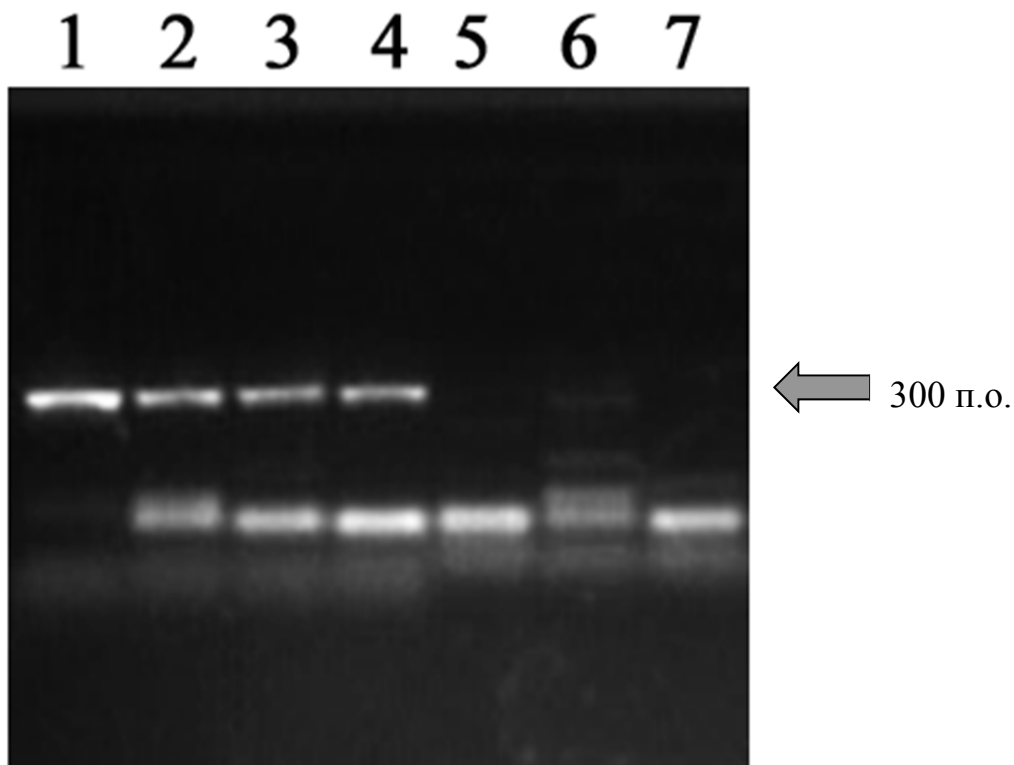


Рис.3.2. Амплікони β -актину після двох стадій ПЛР для однієї клітини. На

доріжки 1-4 нанесено продукт ампліфікації кДНК з однієї клітини. Доріжки 5-7 – негативні контролю: 5 – не проведено зворотну транскрипцію, 6 – не додано клітину, 7 – замість клітини набрано поживне середовище.

Метод було відпрацьовано у двох дослідженнях. У першому було встановлено диференціальну експресію нейрональної форми синаптичного білка інтерсектина у таламусі мишей. Було проведено ПЛР для однієї клітини на таламічних нейронах мишей та встановлено, що у нейронах (n=5) експресуються сплайс-ізоформи 1 і 2 мРНК інтерсектину, тоді як у гліальній РНК, виділеній з нейроглиоми, присутня лише сплайс-ізоформа 1, що узгоджувалося із нейрональною функцією ізоформи 2. (Рис. 3.3)

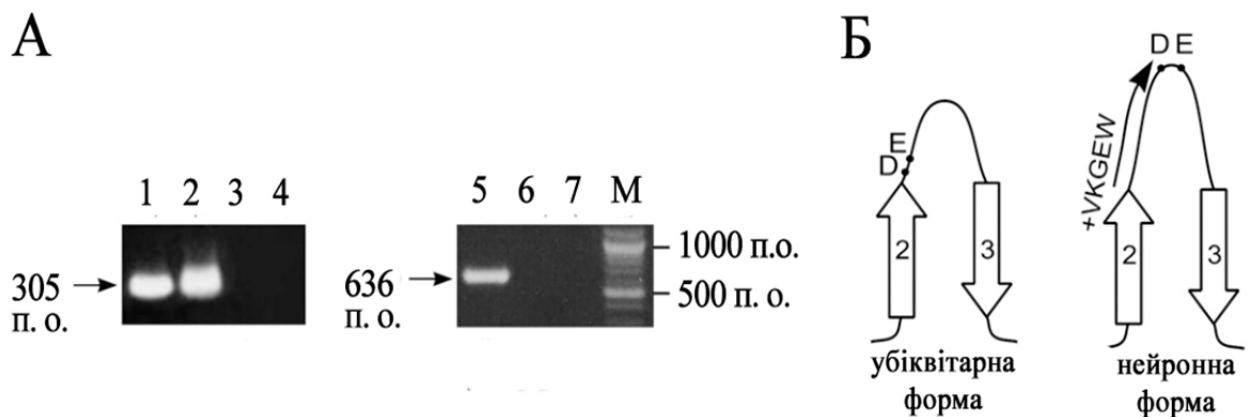


Рис. 3.3. Дві сплайс-ізоформи мРНК білка ендозитозу інтерсектина

зустрічаються в нейронах, і лише одна в клітинах гліального походження

А – продукти електрофорезу кДНК інтерсектину в окремих нейронах миші (ліва панель) та клітинній лінії гліобластоми людини (права панель). 1, 2 – окремі нейрони таламусу миші; 5, 6 – клітини гліобластоми (у зразку на

доріжці 6 відсутня експресія нейронної сплайс-ізоформи мРНК); 3, 4, 7 – негативні контролі без ДНК; М – маркер молекулярної маси. Б – схематичне зображення ділянки альтернативного сплайсингу мРНК інтерсектина.

У другому досліді ми виявляли експресію мРНК ванілоїдних рецепторів надродини іонних каналів ТРП. За допомогою кількісної ПЛР було оцінено експресію мРНК TRPV1 та TRPV2 у ГАМК-ергічних та глутаматергічних нейронах культури гіпокампу щурів. Виявилося, що, хоча обидва канали експресуються в обох типах нейронів, але у ГАМК-ергічних частіше знаходиться мРНК TRPV1 каналу (Рис.3.4).

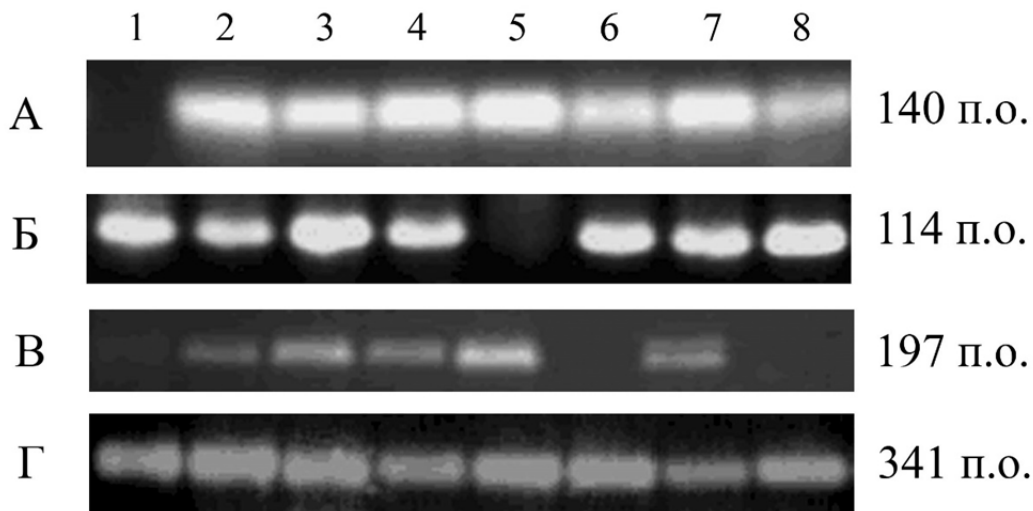


Рис. 3.4. Окремі нейрони гіпокампа в культурі експресують різні комбінації генів ТРП-каналів. А. TRPV1, Б. TRPV2, В. TRPV3 Г. β -актин. 1-8 – окремі нейрони.

Таким чином модифікація методу ЗТ-ПЛР для кДНК з однієї клітини була розроблена і підготовлена для дослідження експресії генів низькопорогових кальцієвих каналів у таламусі щурів.

3.2 Експресія генів низькопорогових кальцієвих каналів у таламусі щурів

3.2.1 Нейрон-специфічна експресія генів $\alpha 1$ -субодиниць низькопорогових кальцієвих каналів в таламусі

Класичним є уявлення про поділ ядер таламусу на 3 групи: релейні, асоціативні та нейрони сітчастого ядра (Steriade et al., 2001, 2014). Якщо релейні ядра виконують функції передачі інформації від периферійних сенсорних систем до кори, то асоціативні здійснюють первинну обробку та консолідацію інформації. Окремо стоїть сітчасте ядро, яке регулює роботу всіх інших ядер шляхом їхнього гальмування. З такої класифікації бере свій початок розділення таламічних нейронів на таламокортикальні, сітчасті та інтернейрони. Звідси ж з'являється схема кортикоталамічної петлі. Суть її в тому, що сигнали від периферійних аферентних центрів досягають таламокортикальних збуджуючих глутамат-ергічних нейронів, які генерують потенціали дії у тонічній модальності. Через синаптичний зв'язок із кортикальними нейронами ці сигнали досягають кори. Кортикальні нейрони в свою чергу посилають відростки назад, до таламусу, збуджуючи всі 3 типи його нервових клітин. Важливим регулятором цієї петлі є гальмівні ГАМК-ергічні сітчасті нейрони, які є переривачами передачі інформації до кори. Більш дрібні ГАМК-ергічні інтернейрони гальмують активність всіх інших нейронів (Steriade et al., 2001).

За морфологією ці нейрони різноманітні навіть у межах одного типу. Більші (20-35 мкм) сітчасті та таламокортикальні є мультиполярними. Серед останніх зустрічаються багатокутні та видовжені клітини із трьома, п'ятьма і більше відростками. Сітчасті нейрони часто видовжені, звичайно мають менше п'яти відростків. Інтернейрони дрібніші (10-15 мкм), округлі та мультиполярні (більше 10-12 відростків).

Щодо експресії T-каналів у різних типах нейронів таламусу, то інформація в літературі суперечлива. Дані гібридизації *in situ* на зрізах головного мозку (Talley et al., 1999) демонструють наявність високої експресії Ca_v3.1 у релейних ядрах, причому деякі з ядер (бокове колінчасте, медіодорзальне, вентральне та інші) експресують виключно цю ізоформу. В той же час, інші релейні ядра експресують Ca_v3.1 разом із Ca_v3.3 – до них належать латеродорзальне, антеріодорзальне та деякі інші. мРНК Ca_v3.2 практично відсутня у релейних ядрах. Сітчасте ядро, що складається майже виключно з сітчастих нейронів, містить найбільшу кількість мРНК Ca_v3.3, менше Ca_v3.2 та майже позбавлене Ca_v3.1. Проте роботи, у яких досліджували наявність білка НПКК у таламусі імуногістохімічними методами, продемонстрували відмінний патерн експресії. Так, ізоформа Ca_v3.3 була знайдена на дистальних дендритах нейронів релейних ядер, де ніби-то відсутня відповідна мРНК (Connelly et al., 2015). Електрофізіологічні вимірювання трансмембранних кальцієвих струмів також дають суперечливі результати, оскільки не дають можливості прямо оцінити склад наявних в

нейроні ізоформ, адже відсутні селективні блокатори підтипів T-каналів (Shcheglovitov et al., 2005). Тому для пошуку внеску кожної з ізоформ необхідно комбінувати електрофізіологічний експеримент з наступним визначенням типів мРНК, які наявні в конкретній клітині.

Ми виділяли окремі нейрони з таламусу щурів та вимірювали низькопорогові кальцієві струми. Для оцінки властивостей струмів ми використовували імпульсний протокол та вимірювали вольт-амперну характеристику.

Після запису струмів цитоплазма клітини аналізувалась на наявність мРНК субодиниць каналів T-типу, а також маркерів для визначення типів нейронів. Глутамат-ергічними вважали ті нейрони, в яких було визначено

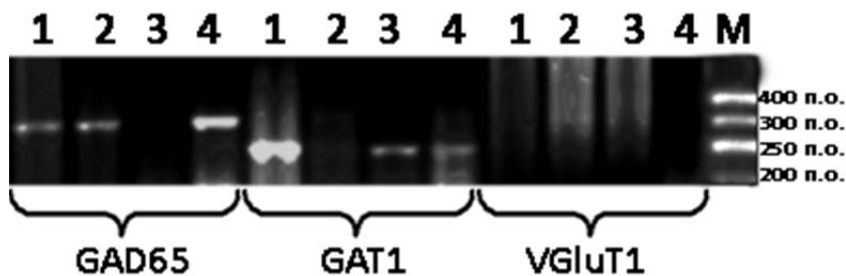
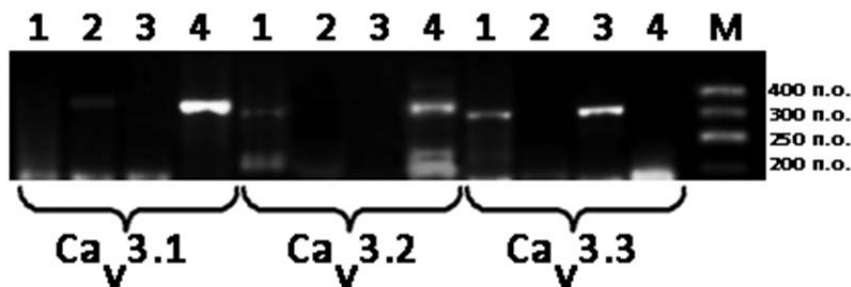


Рис.3.5. Зразок агарозного гелю після електрофорезу результатів ПЛР для однієї клітини. 1-4 окремі клітини.

присутність мРНК везикулярного глутаматного транспортеру (VGluT), ГАМК-ергічними ті, які одночасно експресували гени глутамат-декарбоксилази (GAD65) та везикулярного транспортеру ГАМК (GAT1).

Більшість успішно проаналізованих клітин (n=21) демонстрували експресію мРНК двох або трьох субодиниць одночасно (Рис. 3.2.4).

Тим не менш, окремі клітини (n=4) містили мРНК лише однієї субодиниці: Ca_v3.1 або Ca_v3.3.

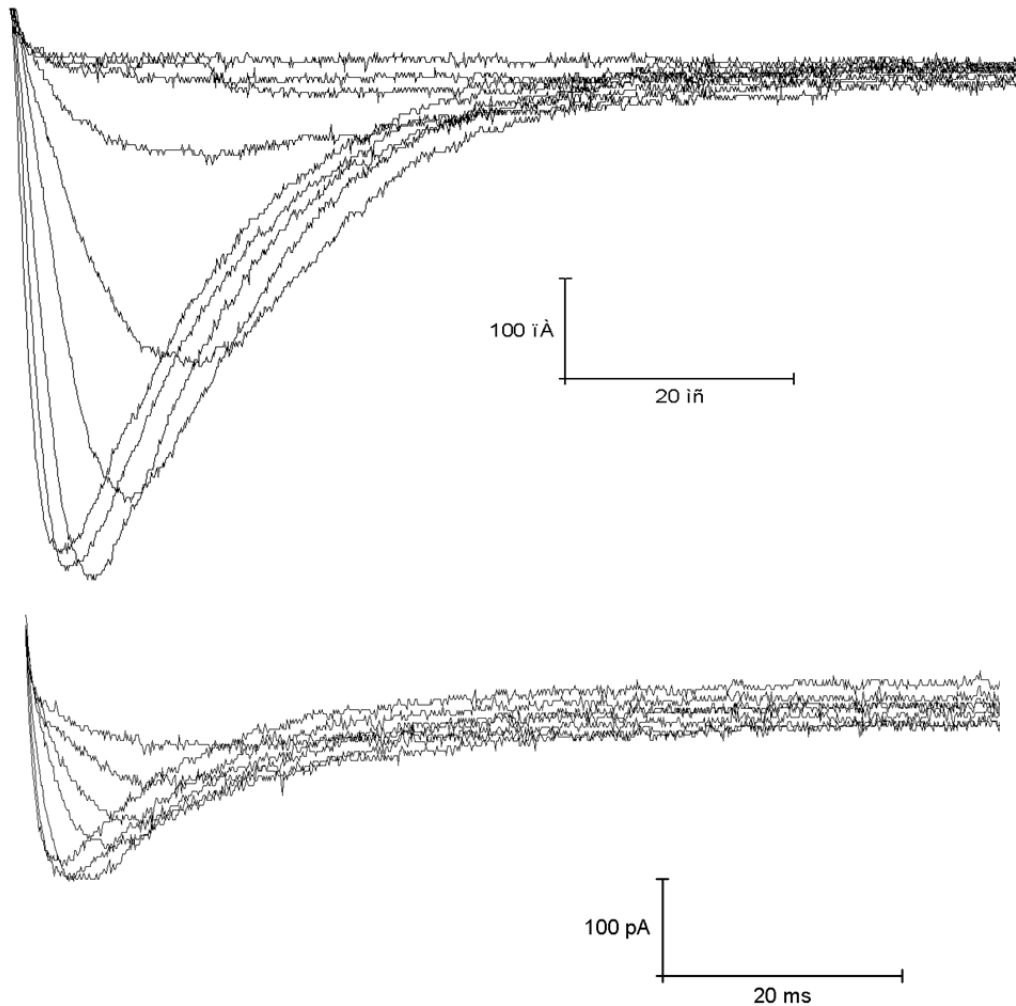


Рис.3.6. Оригінальні записи Т-струмів у клітинах, які експресують ізоформи $Ca_v3.1$ (згори) або $Ca_v3.3$ (знизу)

Відмінності між струмами у клітинах, що експресували різні субодиниці не спостерігалися ані у вольт-амперній характеристиці, ані в параметрах активації та інактивації. Амплітуди струмів відрізнялися суттєво в бік високого рівня для $Ca_v3.1$, проте невелика кількість досліджених клітин не дозволяє нам зробити статистично обґрунтовані висновки щодо не випадковості цієї різниці (Рис.3.6).

Також ми порівняли Т-струми у глутамат-ергічних та ГАМК-ергічних нейронах, та знову не знайшли відмінностей у біофізичних характеристиках струмів (Рис. 3.7. А). Можливою причиною таких результатів ми припускаємо процес виділення нейронів для електрофізіологічного вимірювання струмів. Ферментативна обробка призводить до втрати нейронами аксону та дендритного дерева, для збирання цитоплазми доступна лише сома нейрона та окремі проксимальні частини дендритів. Разом з тим відомо, що мРНК синаптичних білків транспортується саме в термінальні частини дендритів, де може зберігатися деякий час та в потрібний момент транслювати білок на локальних рибосомах (Vicario et al., 2015). Для Т-каналів відома диференційна наявність каналів на мембрані соми та дендритів (Connelly et al., 2015; Talley et al., 1999), тому можна припустити, що кількість мРНК дистально експресованих каналів є незначною в сомі.

Результати коекспресії мРНК $\alpha 1$ -субодиниць Т-каналів з маркерами нейромедіаторів показали відсутність кореляції між ними. Серед успішно досліджених нервових клітин було 33% глутамат-ергічних і 57% ГАМК-ергічних (Рис. 3.2.6.Б).

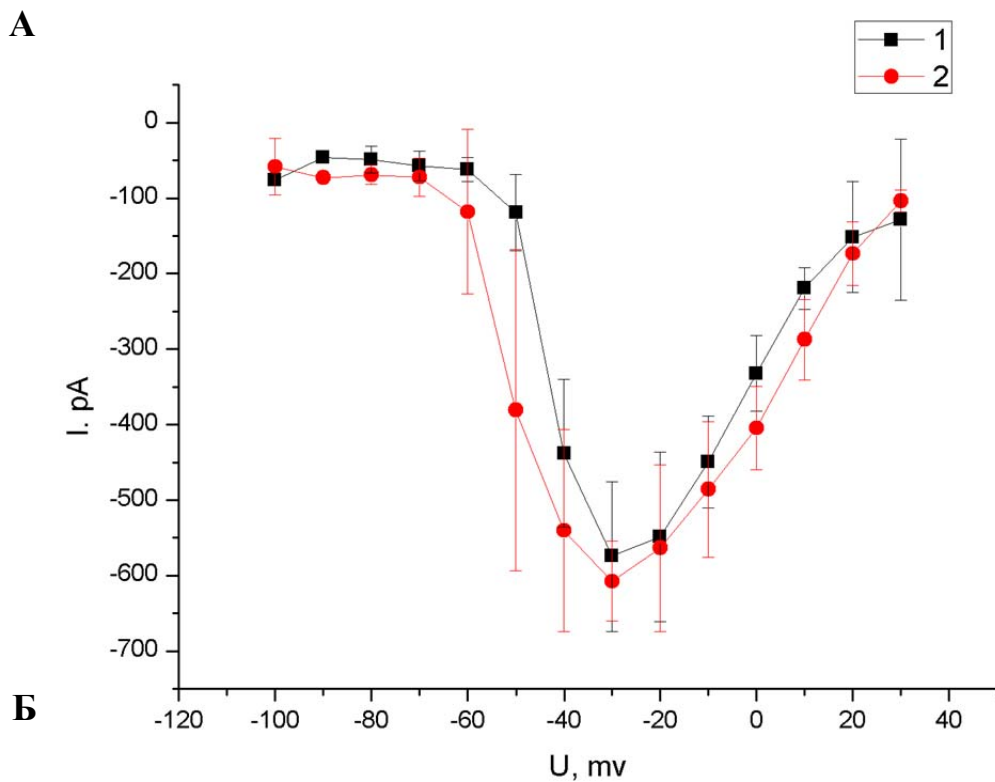


Рис. 3.7. А. Вольт-амперна характеристика кальцієвих струмів Т-типу в

нейронах, що експресували гени маркерів глутаматергічних (1) і ГАМК-ергічних нейронів (2). Б. Співвідношення глутаматергічних і ГАМК-ергічних нейронів серед успішно досліджених клітин.

При цьому 2 нейрони експресували одразу маркери обох нейромедіаторів. Це може бути ознакою артефакту дослідження, проте проведені нами контролі на псевдопозитивний результат, викликаний можливим забрудненням генетичним матеріалом з клітинного ядра, з поживного середовища та неспецифічною ампліфікацією ДНК, не давали продуктів реакції. Тому ймовірною причиною такого результату є неспецифічна експресія маркерів одного з нейромедіаторів у цих конкретних нейронах. Менше ймовірними варіантами ми вважаємо захоплення цими клітинами мРНК сусідніх клітин або секрецію різними синапсами однієї клітини двох різних типів нейромедіатора, хоча подібні випадки описані в науковій літературі (Angelica et al., 2008).

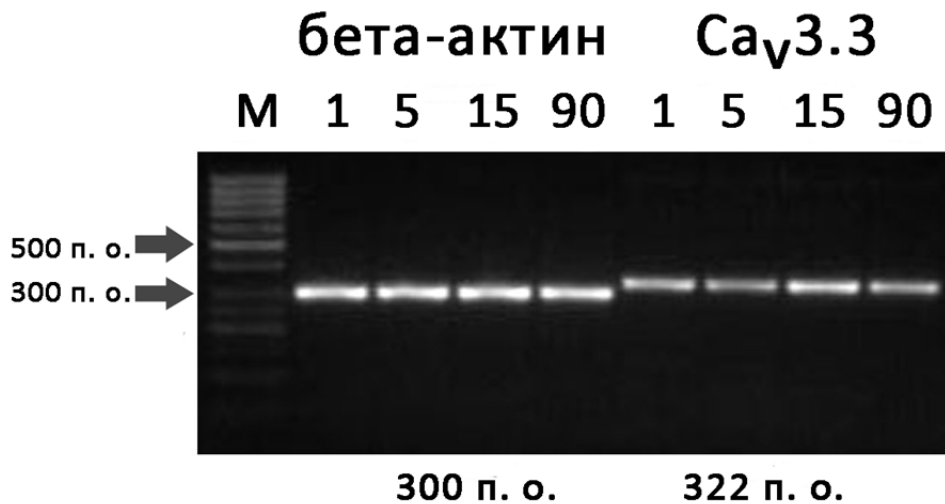
Наші дані ПЛР для однієї клітини не дозволяють нам зробити однозначних висновків щодо нейрон-специфічної експресії генів кальцієвих каналів Т-типу в різних групах нейронів таламусу, тому подальші дослідження ми здійснювали на цілих ядрах, зокрема латеродорзальному (ЛД) та сітчастому (СЯ).

3.2.2. Онтогенетичний аспект експресії мРНК альфа1-субодиниць низькопорогових кальцієвих каналів в таламусі

Проблема динамічної експресії НПКК у таламусі привертала увагу дослідників вже давно. Таламус є однією із небагатьох ділянок мозку, де визначено високу експресію змішаних за своєї природою Т-струмів. Роботи Тарасенка й колег (Tarasenko et al., 1997) продемонстрували, що швидкий та повільний компонент струму змінюються у онтогенезі, причому повільний компонент з'являється пізніше, досягаючи максимуму через 15-17 діб після народження. Клонування альфа1-субодиниць Т-каналів призвело до знайдення фізичного субстрату повільного та швидкого струмів – ізоформ $Ca_v3.3$ та $Ca_v3.1$ відповідно. Тим не менш, які саме ізоформи є функціонально активними у таламусі на різних етапах онтогенезу, залишалось невідомим, оскільки експерименти з гібридизації *in situ* показали наявність експресії там не тільки $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ та $Ca_v3.3$, але й $Ca_v2.3$, що відноситься до кальцієвих каналів R-типу та має схожі на Т-канали біофізичні властивості струму.

Тому ми провели серію ПЛР, взявши щурів різного постнатального віку: 1, 5, 15 та 90 діб. Результати реакцій показали, що в найбільшому ступені в латеродорзальному ядрі таламусу щурів всіх вікових груп експресується мРНК, що кодує субодиниці $Ca_v3.1$ та $Ca_v3.3$, а рівень $Ca_v3.2$ та $Ca_v2.3$ знаходиться на значно нижчому рівні (Рис. 3.8). Продукти ПЛР для генів *Casnalg* ($Ca_v3.1$) і *Casnali* ($Ca_v3.3$) візуалізувались після 35 циклів ампліфікації, як і амплікон гена "домашнього господарства" β -актина. Для

візуалізації ампліконів *Cacna1h* (Ca_v3.2) і *Cacna1e* (Ca_v2.3) Напівкількісний аналіз за відотною яскравістю ампліконів у агарозному гелі показав, що рівень експресії генів Ca_v3.2 та Ca_v2.3 у латеродорзальному ядрі у 16-32 разів більше, ніж такий для генів Ca_v3.1 і Ca_v3.3. Отримані дані співпадали із результатами гібридизації *in situ*, що продемонстрували більшу наявність мРНК Ca_v3.1 і Ca_v3.3 у мозку дорослого щура. Дані стандартної ПЛР не дозволяють казати про онтогенетичні особливості експресії мРНК каналів Т-типу. У одноденних щурят кількість мРНК Ca_v3.1, Ca_v3.2, Ca_v3.3 і Ca_v2.3 суттєво не відрізнялась від такої у 5-, 15- та 90-денних щурів. Таким чином, можна було припустити, що причиною змін у амплітуді різних підтипів Т-струму є не регуляція транскрипції мРНК, а подальша доля білку після трансляції та його взаємодія з іншими факторами.



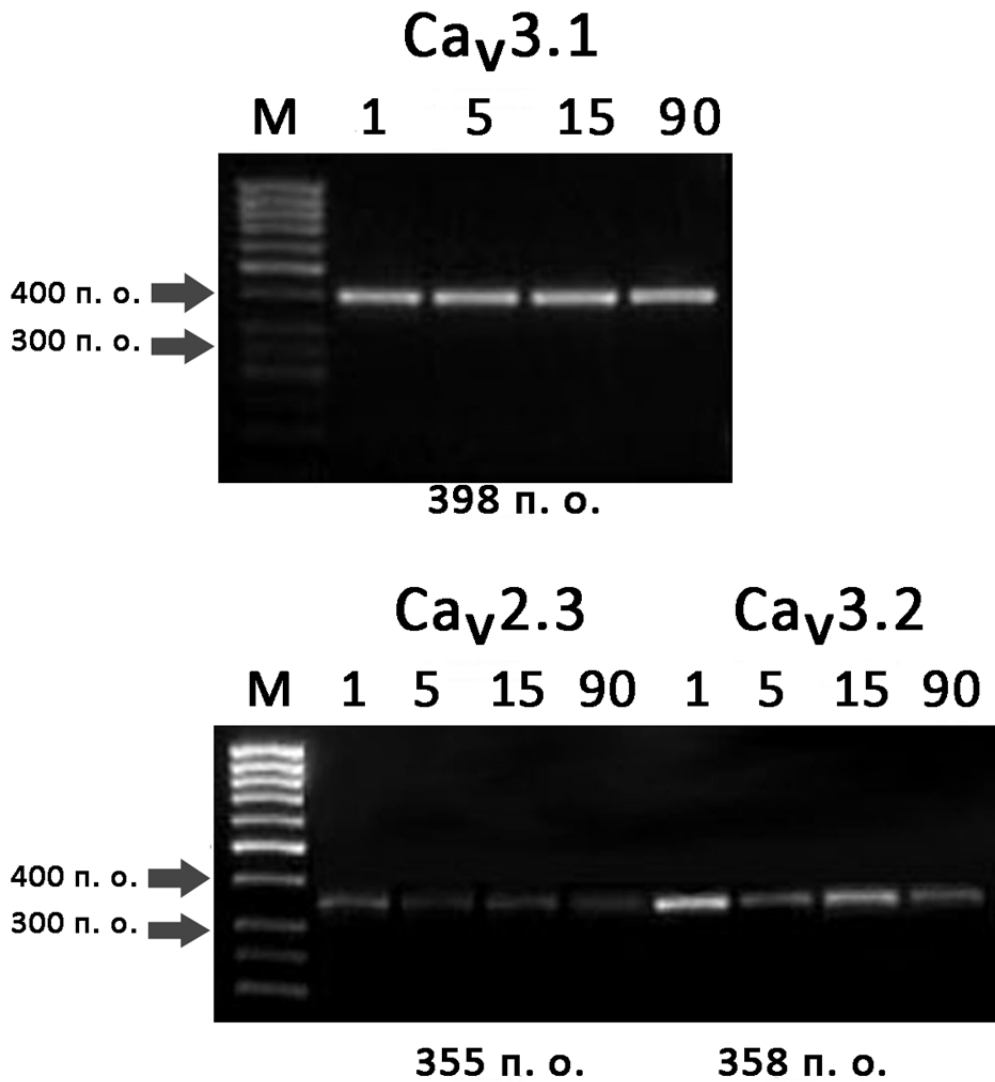


Рис.3.8. А. Результати електрофорезу ампліконів β -актину і Ca_v3.3 після 35 циклів ПЛР. М маркер молекулярної ваги. 1, 5, 15, and 90 – вік щурів у постнатальних днях, у яких виділялася тканина латеродорзального ядра. Б. Те ж саме для Ca_v3.1. В. Те ж саме для Ca_v3.2 і Ca_v2.3 після 38 циклів ПЛР.

Тим не менш, остаточний висновок щодо рівня транскрипції можна зробити лише після аналізу кількісним методом. Для цього ми застосували ПЛР «у реальному часі» та звузили період онтогенезу досліджуваних тварин. Оскільки літературні дані точно вказують найпізніший час відсутності

повільного компоненту Т-струму як 10-12 постнатальних діб, а його максимальна амплітуда з'являється після 17 дня, то ми обрали 10- та 25-денних щурів як надійні точки, в яких струми гарантовано розрізняються. В ході дослідження виявилось, що на 10-й постнатальний день у ЛД ядрі таламусу найбільше експресується мРНК каналу $Ca_v3.3$ (Рис. 3.9). Рівень мРНК $Ca_v3.1$ був менше у 1,7 разів, тоді як кількість $Ca_v3.2$ відрізнялася у 6 разів у бік зменшення. Із досягненням 25денного віку рівні мРНК $Ca_v3.1$ та $Ca_v3.2$ знижувалися відповідно у 3,5 та 12 разів, тоді як кількість мРНК $Ca_v3.3$ зменшувалася недостовірно (на 20%). Таким чином у віці 25 днів у щурів спостерігається така послідовність експресії мРНК каналів Т-типу: $Ca_v3.2 \ll Ca_v3.1 < Ca_v3.3 \approx 1:14:76$.

Як видно з цих даних, експресія мРНК $Ca_v3.1$ та $Ca_v3.3$ до десятого дня знаходиться на співставному рівні, тоді як кількість мРНК $Ca_v3.2$ значно нижче. До 25 дня значно зменшується рівень мРНК $Ca_v3.1$, а $Ca_v3.3$ майже не змінюється.

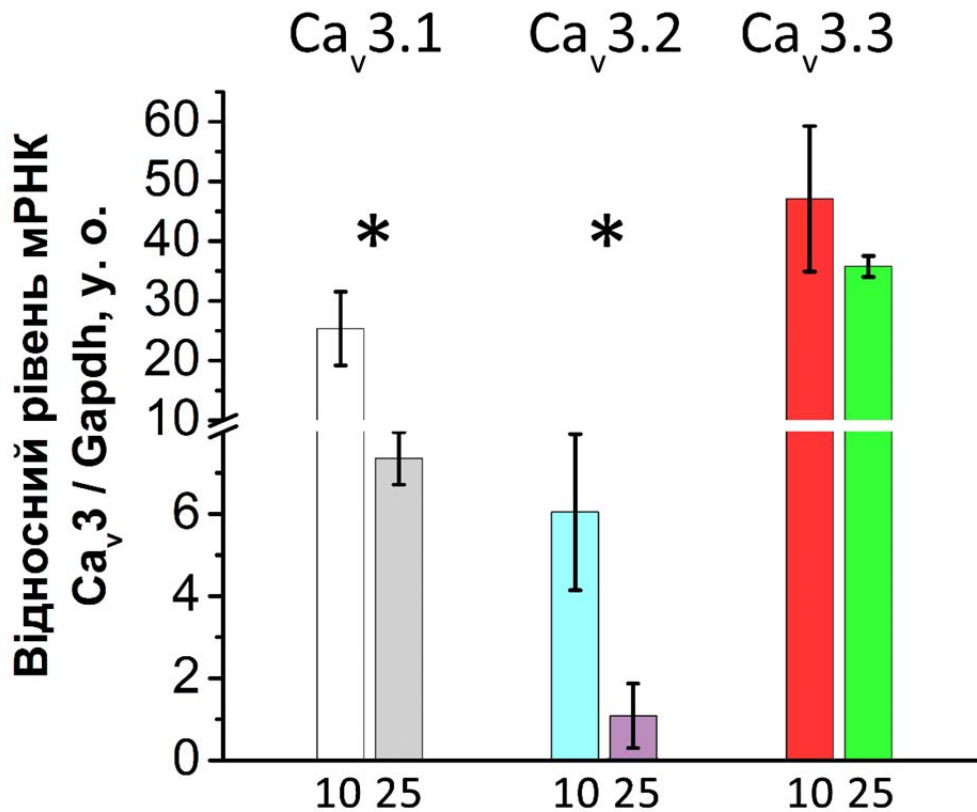


Рис.3.9 Зміни відносної кількості мРНК трьох субодиниць Т-каналів у латеродорзальному ядрі таламусу з 10го по 25й день постнатального розвитку.

Згідно з результатами, отриманими у експериментах із штучно експресованими у гетерологічних системах субодиницях Т-каналів, саме Ca_v3.1 відповідає за струм із швидкою кінетикою активації інактивації, а Ca_v3.3 – за «повільний» струм. Якщо б кількість мРНК прямо корелювала із кількістю каналу на мембрані клітини, то картина мала б бути іншою: у Т-струмі на 10й день онтогенезу «повільний» і «швидкий» компонент приблизно рівні, а на 25-й «швидкий» сильно зменшується при збереженні «повільного» компоненту. Але струми, що спостерігаються, кардинально

інші (Tarasenko et al., 1997). Значить, ми можемо припустити, що існує певний механізм вибіркової трансляції та/або посттрансляційний процес, що особливим чином впливає на долю мРНК $Ca_v3.3$, яка спочатку не дає функціонального каналу на мембрані, а потім все-таки транлюється.

Так чи інакше, але це припущення виходить із інформації, що отримана у гетерологічних системах експресії (ооцитах *Xenopus*, лінії HEK293 та інших). Експресовані там T-канали можуть мати відмінну фармакологію, кінетику струму, поріг активації тощо.

Таким чином, НПКК у ЛД ядрі таламуса демонструють складний онтогенетичний патерн експресії генів у фізіологічних умовах та поступово знижують рівень транскрипції від 10-го до 25-го постнатального дня, а склад ізоформ не співпадає з передбаченими за електрофізіологічними показниками.

3.3 Низькопорогові кальцієві канали у мозку щурів лінії WAG/Rij

3.3.1 Кількісна оцінка експресії мРНК альфа1-субодиниць низькопорогових кальцієвих каналів у сітчастому ядрі таламусу та соматосенсорному кортексі

Зв'язок між Т-каналами та абсансною епілепсією видається дуже тісним. На це вказують і тваринні моделі, і роль таламічної активності у нападах, і те, що антиепілептичні препарати є блокаторами Т-струму. Але яким саме чином Т-канали залучені в етіологію абсансної епілепсії, залишається невідомим. Ключовим є питання, в якій ділянці мозку відбуваються первинні зміни, які призводять до абсансів – таламусі чи корі. Для того, щоб виявити можливість залучення каналів Т-типу до патологічних процесів у цих двох зонах, ми дослідили експресію їх мРНК у сітчастому ядрі таламусу та соматосенсорній корі верхньої губи та вібрис, так званому «кортикальному фокусі».

Сітчасте ядро є негативним регулятором активності таламусу та містить ГАМК-ергічні сітчасті нейрони, які гальмують нейропередачу через релейні таламокортикальні нейрони та запускає їхній перехід до пачкової активності. Аналіз експресії каналів Т-типу у сітчастому ядрі дорослих щурів лінії WAG/Rij та контрольних щурів Wistar показав відсутність статистично значущих відмінностей між двома лініями (Рис. 3.9).

Відносна кількість мРНК $Ca_v3/GAPDH$, у.о.

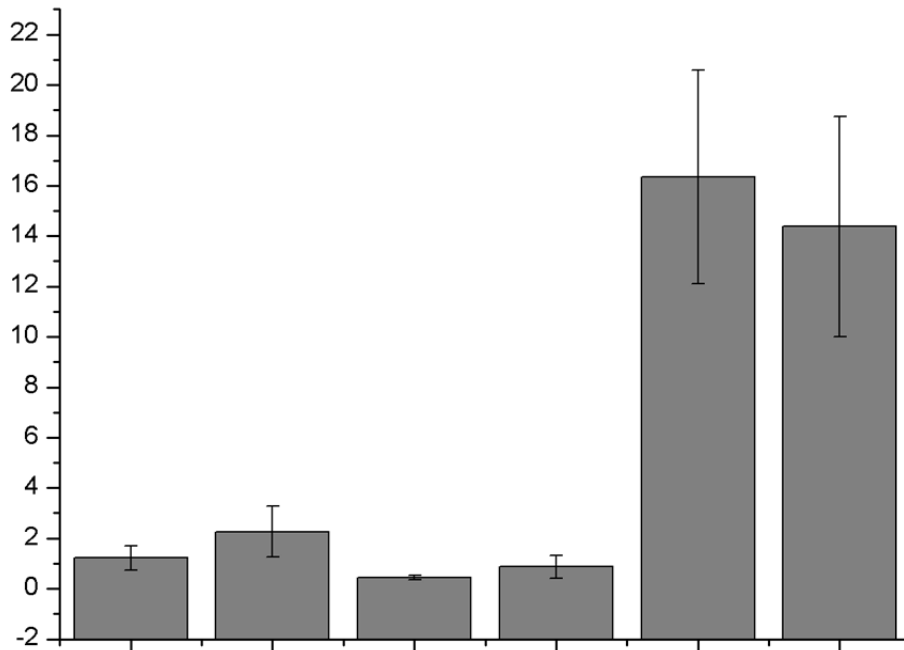
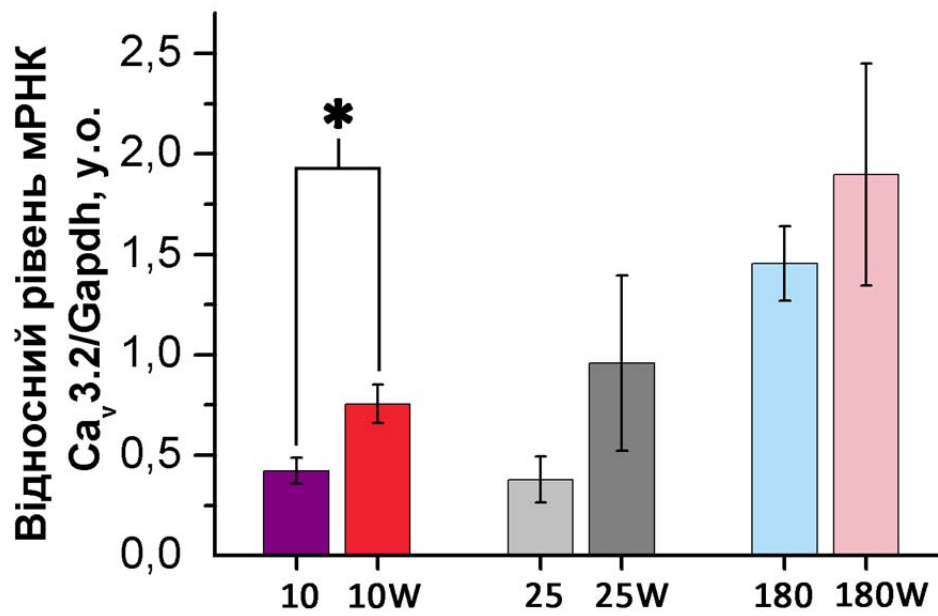
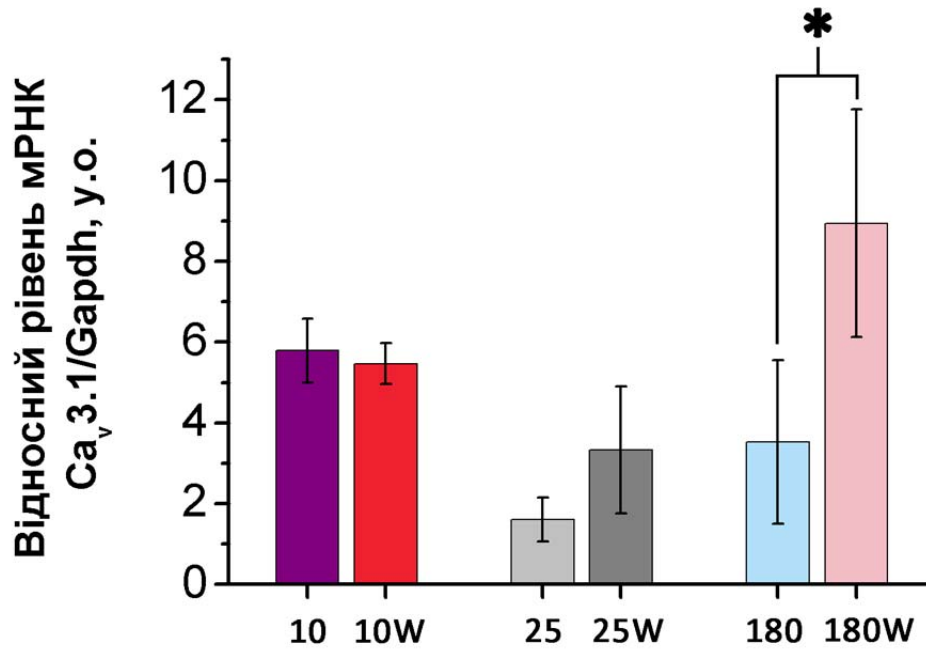


Рис. 3.9. Рівні мРНК НПКК у сітчастому ядрі таламусу щурів ліній Wistar і WAG/Rij. 1. Ca_v3.1, Wistar; 2. Ca_v3.1, WAG/Rij; 3. Ca_v3.2, Wistar; 4. Ca_v3.2, WAG/Rij; 5. Ca_v3.3, Wistar; 6. Ca_v3.3, WAG/Rij (відмінності статистично не значимі, $p > 0,05$)

Та ж закономірність спостерігалась при вивченні рівня мРНК у «кортикальному фокусі» обох ліній щурів, де за вимірами ЕЕГ розпочинаються абсансна активність. Але, на відміну від СЯ, встановлено статистично значиме збільшення експресії мРНК Ca_v3.1 у 2,5 рази (Рис. 3.10).

Для оцінки онтогенетичних змін експресії Т-каналів у «кортикальному фокусі» ми також взяли 10 і 25-денних щурів обох ліній.



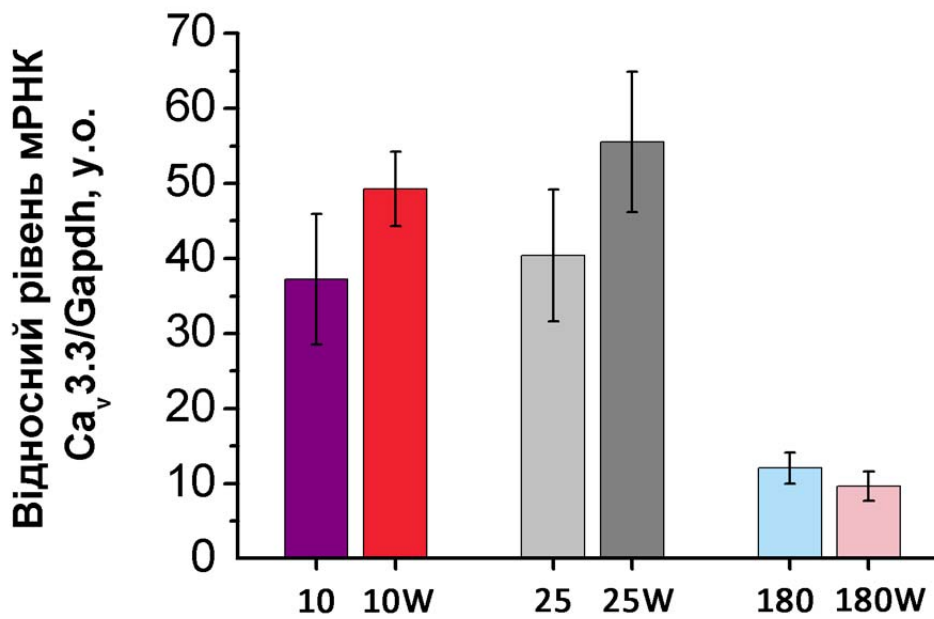


Рис. 3.10. Рівні мРНК НПКК у «кортикальному фокусі» щурів ліній Wistar і WAG/Rij. 10, 25, 180 – щури Wistar, 10W, 25W, 180W – щури WAG/Rij відповідного постнатального віку (числа відповідають дням).* – $p < 0,05$

Цікавою виявилася динаміка експресії Ca_v3.1 у контрольних щурів Wistar. Найбільшу кількість мРНК було встановлено у щурів 10-денного віку, у 25-денному віці вона знижувалася майже у 3 рази, а потім у 6-місячному віці складала близько 65% від початкової. При цьому, рівень мРНК Ca_v3.1 у щурів лінії WAG/Rij не відрізнявся від контрольних на 10-й день, а на 25-й уже перевищував відповідний у контрольних щурів. Стабільно низька кількість мРНК субодиниці Ca_v3.2 у молодих щурів Wistar супроводжувалася майже вдвічі збільшеною експресією у відповідних вікових групах модельних щурів. А ось для мРНК Ca_v3.3 рівень був значно вищий (3,5-4

рази) у молодому віці, ніж у дорослому. При цьому в лінії WAG/Rij спостерігалася тенденція до збільшення експресії мРНК $Ca_v3.3$ у 10- та 25-денних щурів, на противагу 6-місячним, де навпаки, була слабка тенденція до нижчої експресії.

Експресія мРНК Ca_v3 каналів у корі великих півкуль показана ще в дослідженні (Talley et al., 1999). Ми вперше демонструємо зміни цієї експресії для моделі абсансної епілепсії, хоча непряме посилення на таку зміну є в роботі (Ernst et al., 2009). При штучній гіперекспресії $Ca_v3.1$ у мозку мишей виникала спонтанна ЕЕГ-активність, подібна до абсансів. Автори роботи сконцентрувалися на змінах провідностей через Т-канали у таламусі, ніяк не коментуючи майже симетричне збільшення експресії мРНК ізоформи $Ca_v3.1$ у соматосенсорній корі. Хоча, на нашу думку, такий очевидний феномен вимагає більш детального, в тому числі й електрофізіологічного, вивчення.

При цьому Т-струми в кортикальних нейронах описані лише в декількох роботах, тоді як в інших постулюється відсутність функціонально активних Т-каналів у цих нейронах. Сама по собі експресія мРНК не є однозначним показником наявності білка, а тим більше робочого мембранного каналу. Існує ціла система молекулярних механізмів, що регулюють появу функціонального білка вже після транскрипції мРНК. Це і допоміжні білки інформосоми, і білкові фактори трансляції, і малі РНК, і посттрансляційні модифікації поліпептиду, і білки трафікінгу, тощо. Кожен із цих факторів

може призвести до переривання класичного шляху ДНК – мРНК – функціональний білок. Так, наприклад, у кардіоміоцитах людини високо експресується мРНК каналу $Ca_v3.2$, більш того, вперше цей канал був клонований саме із серця людини і названий H-субодиницею (від англ. "heart"). Тим не менш, досі не вдавалося зареєструвати T-струми у людських кардіоміоцитах. Тому навіть значні зміни експресії мРНК мають бути перевірені на їхнє віддзеркалення у білку та його функції.

3.3.2 Експресія білка альфа1-субодиниць низькопорогових кальцієвих каналів у соматосенсорній корі

Наявність транскриптів Ca_v3 у корі щурів показано у багатьох роботах. Дані щодо білка не такі однозначні та переконливі. Є роботи, де показані нетривіальні функції для ізоформ $Ca_v3.2$ (Huang et al., 2011) та $Ca_v3.3$ (Liu et al., 2011). Щодо експресії білка $Ca_v3.1$ у корі, то така залишається невідомою. При цьому широке електрофізіологічне дослідження ПЗКК у 5-6му шарі соматосенсорної кори щура продемонструвало наявність всіх типів високопорогових кальцієвих каналів, але не низькопорогових (Almog et al., 2009). Таким чином, визначення наявності білка $Ca_v3.1$ та його функції у соматосенсорній корі представляє інтерес не лише у світлі його потенційної патофізіологічної ролі у моделі абсанс-епілепсії, але й створює нове знання щодо роботи кортикальних нейронів.

Для порівняльного аналізу функції T-каналів у нейронах "кортикального фокусу" щурів ліній Wistar та WAG/Rij віком 10 днів були виділені окремі

нейрони з цієї зони для "петч-клемп" експерименту. Як не дивно, в нейронах жодної лінії не було зареєстровано T-струму (n=40) (Рис. 3.11).

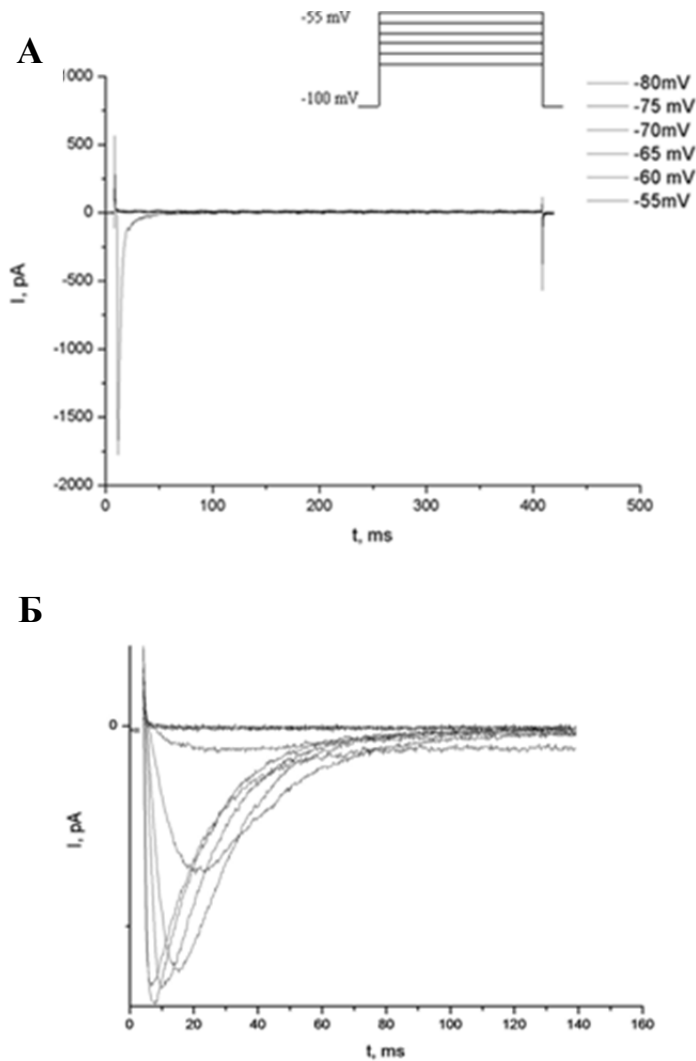
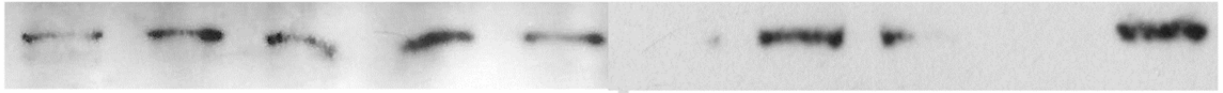


Рис. 3.11. Відповідь кортикального (А) і таламічного (Б) нейрона на імпульсний протокол для низькопорогового кальцієвого струму.

Паралельно із тканини «кортикального фокусу» дорослих 6-місячних щурів було виділено сумарний білок, розділено в полікриламідному гелі та детектовано експресію білка $Ca_v3.1$ та бета-актину за допомогою методу "Вестерн блот". В обох лініях було виявлено білкову смугу із молекулярною масою близько 270-280 кДа, що відповідає розмірам білка $Ca_v3.1$. Крім того,

у білку з мозку щурів WAG/Rij спостерігалася слабка смужка із меншою на 10-30 кДа молекулярною масою за основну (Рис. 3.12).

Wistar



WAG/Rij

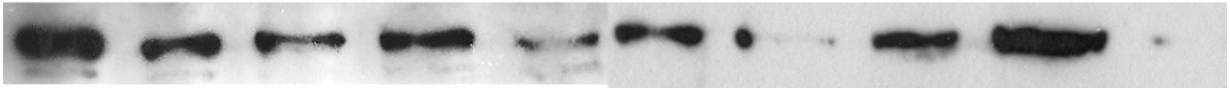


Рис. 3.12. "Вестерн-блот" сумарного білка з "кортикального фокусу" 6-місячних щурів; з антитілами проти $Ca_v3.1$ (близько 270 кДа); кожна доріжка містить сумарний білок з тканини окремої тварини.

Кількість цього білка, встановлена денситометричним методом за щільністю більшої смужки відносно до щільності смужки актину, розрізнялася у 2,1 рази на користь щурів лінії WAG/Rij (Рис. 3.13).

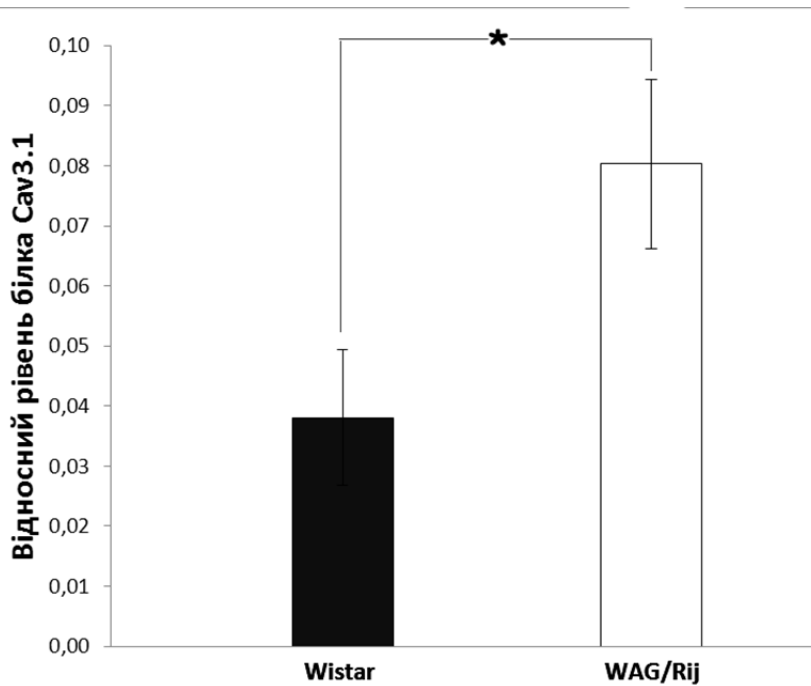


Рис. 3.13. Відносний рівень білка Ca_v3.1 у зоні сомато-сенсорної кори («кортикальному фокусу») щурів ліній Wistar I WAG/Rij, нормований по актину.

Співпадіння напрямку та величини зміни експресії ізоформи кальцієвого каналу Ca_v3.1 вказує на залучення цього каналу до існування абсанс-епілептичного фенотипу щурів лінії WAG/Rij. Проте відсутність Т-струмів у гостроізолюваних кортикальних нейронах не дозволяє зробити чіткий висновок щодо його безпосередньої ролі. Тим більше, що існує мало відомостей щодо ролі кальцієвих каналів Т-типу у корі головного мозку.

Кортикальним нейронам невластива пачкова активність, тому пейсмейкерна функція для НПКК є сумнівною. Вірогідною є вже описана для каналу Ca_v3.2 роль у екзоцитозі синаптичних везикул. Також можлива експресія білка Ca_v3.1 на мембрані дистальних відростків, що унеможлиблює реєстрацію

струму на мембрані соми та проксимальних дендритів, що доступні на гостроізолюваних клітинах.

3.3.3. Порівняння Т-кальцієвого струму в таламусі щурів лінії WAG/Rij і Wistar

Дослідження Т-каналів у релейних таламічних ядрах щурів лінії WAG/Rij обмежені фактично однією роботою (Broicher et al., 2008), де вивчалися експресія мРНК та характеристики Т-струму у бічному колінчастому тілі. Крім того, порівняння в цьому дослідженні здійснювалося не з материнською лінією Wistar, а із завідомо далекою генетично лінією ACI. Тому для розширення нашого розуміння змін експресії Т-каналів у моделі абсанс-епілепсії та для наближення до визначення генетичних основ етіології патологічного фенотипу цієї моделі ми порівняли експресію каналів Т-типу в латеродорзальному ядрі ліній WAG/Rij та Wistar методом кількісної ПЛР.

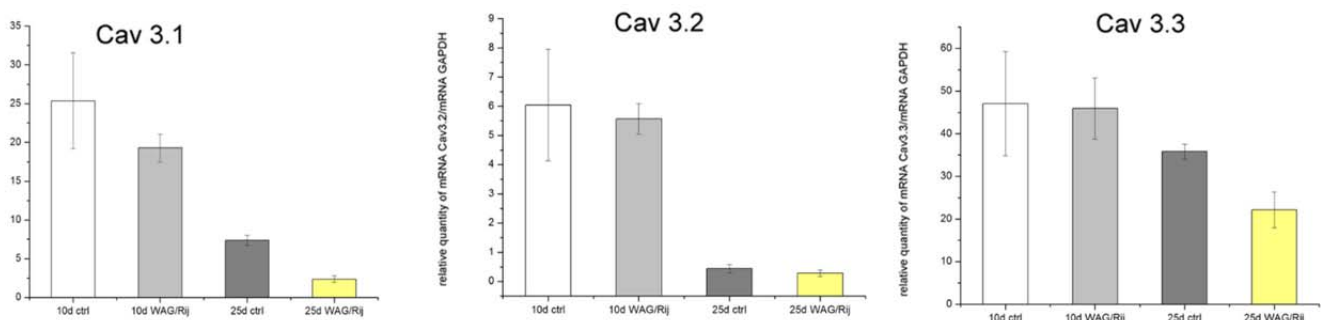


Рис. 3.14. Зміни кількості мРНК Ca_v3 кальцієвих каналів у латеродорзальному ядрі таламуса з 10го (1й і 2й стовпчик) по 25й (3й і 4й стовпчик) постнатальний день. 1й і 3й стовпчик – щури лінії Wistar, 2й і 4й – щури лінії

WAG/Rij

Проведене нами порівняння кількості мРНК зазначених кальцієвих каналів у ЛД щурів ліній WAG/Rij та Wistar показало, що у тварин 10-денного віку рівень експресії $Ca_v3.1$ знижується на $\sim 35\%$, тоді як у $Ca_v3.2$ та $Ca_v3.3$ лишається незмінним за умов абсансної епілепсії, в той час як у 25-денних спостерігається зниження рівня експресії $Ca_v3.1$ та $Ca_v3.3$ (на $\sim 68\%$ та $\sim 48\%$, відповідно) (Рис. 3.14).

З метою підтвердити отриманий результат ми провели вимірювання трансмембранних струмів на гостроізолюваних нейронах ЛДЯ щурів моделі абсанс-епілепсії та контрольної лінії.

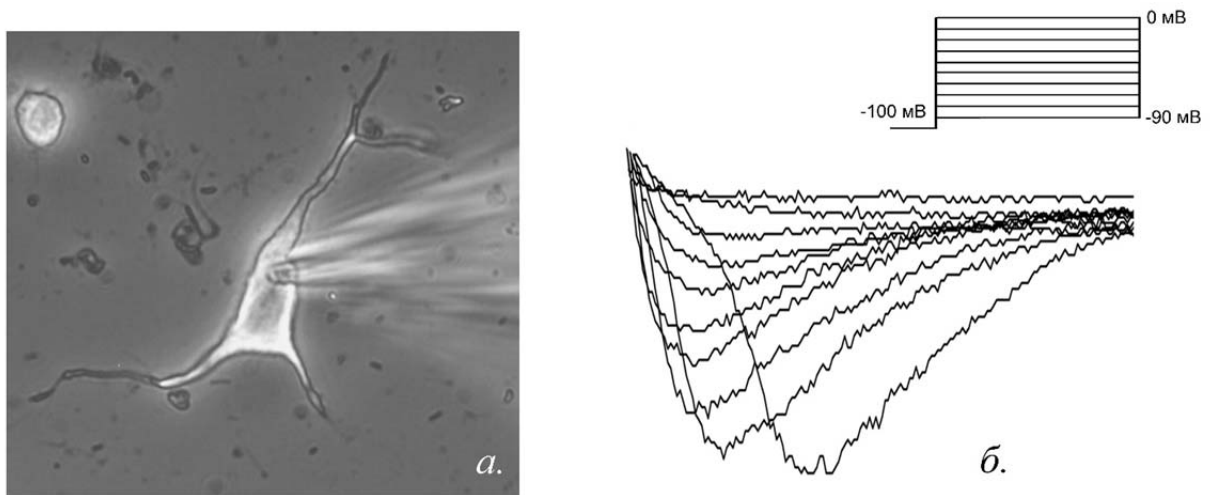


Рис.3.15. Електрофізіологічне дослідження методом петч-клемп у конфігурації «ціла клітина» кальцієвого струму через Т-канали в ізолюваних нейронах латеродорзального ядра. А. Вигляд нейрона під час вимірювання струму. Б. Протокол подачі фіксованого потенціалу на

мембрану клітини (зверху) та характерний зразок запису кальцієвого Т-струму (знизу) у відповідь на протокол.

Дослідження виявило значне зменшення щільності Т-струмів у клітинах ЛДЯ 10-денних щурів ліній WAG/Rij у порівнянні із лінією Wistar (рис. 3.15). Загалом, у контрольних щурів зазначена величина при 40 мВ становила $12,95 \pm 1,83$ пА/пФ ($n=8$), в той час як у епілептичних тварин вона дорівнювала $7,42 \pm 1,8$ пА/пФ ($n=7$) (Рис. 3.16).

Зниження як експресії мРНК $Ca_v3.1$, так і зменшення загального Т-струму у поодиноких нейронах латеродорзального ядра таламусу в щурів лінії WAG/Rij йде врозріз із даними (Broicher et al., 2008), де в бічному колінчастому ядрі було зафіксовано збільшення амплітуди струму на 27%, тоді як в нашому експерименті спостерігалось зменшення його амплітуди на 43%. Чим же можна пояснити таку розбіжність? Як вже відмічалось, наше дослідження проводилося у іншому ядрі таламусу, тому відмінності можуть бути пояснені невідомими механізмами, специфічними для латеродорзального ядра невідомими механізмами. Крім того, у якості контролю дослідники брали лінію ACI, а не Wistar, тому різниця може бути викликана саме відмінністю контрольної лінії щурів. Але ці пояснення стосуються акциденцій, яка же може бути суть цього феномену? Ми не виключаємо, що пізня поява абсансного фенотипу викликана компенсаторними механізмами, що не дають генетичній зумовленості

реалізуватися в ранньому онтогенезі. Компенсація може працювати дуже активно, блокуючи роботу елементів, що надалі призведуть до розвитку абсансу. Звичайно, що тут немає жодної телеології, а цей можливий процес працює за принципом зворотного зв'язку. Після статевого дозрівання компенсаторний механізм може інактивуватися і схильність до появи абсансів розвивається впродовж декількох місяців.

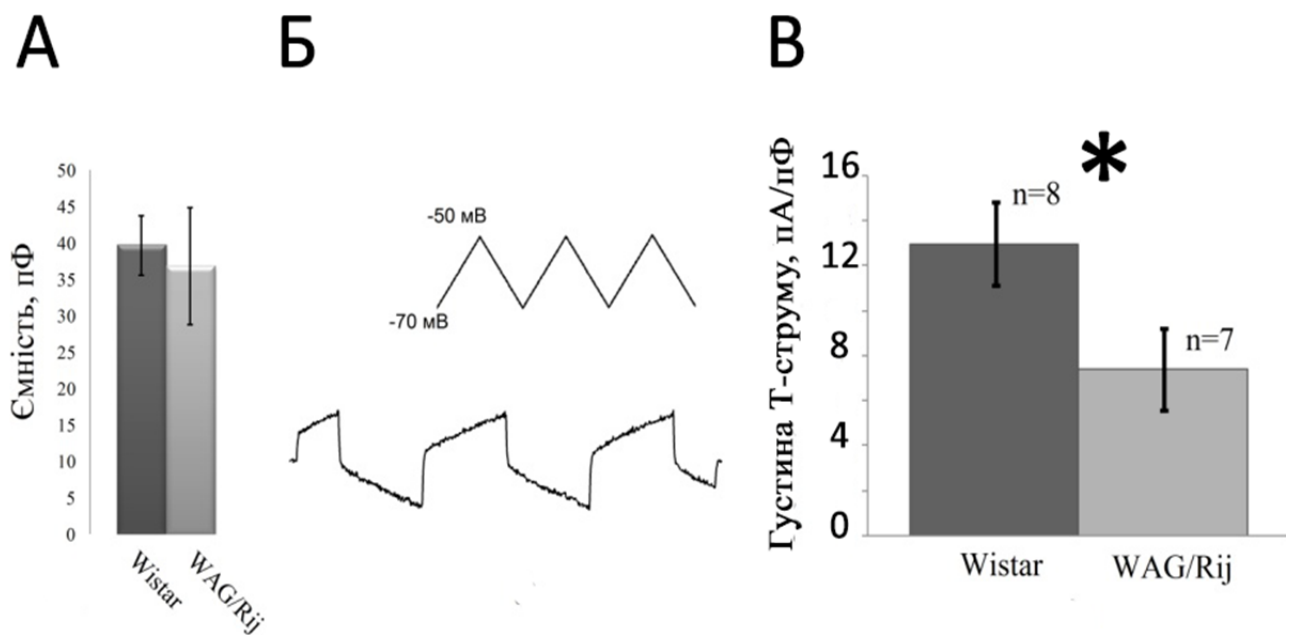


Рис. 3.16. А. Середні значення електричної ємності нейронів, виділених з щурів ліній WAG/Rij і Wistar. Б. Протокол подачі фіксованого потенціалу на мембрану клітини для визначення електричної ємності нейронів (зверху) і характерна відповідь на нього. В. Середні значення густин кальцієвого Т-струму в нейронах, виділених з щурів ліній WAG/Rij і Wistar.

Таким чином зміни в експресії генів низькопорогових кальцієвих каналів відбуваються не лише в ході нормального розвитку мозку щурів, а й

за умов експериментальної абсансної епілепсії. Ці зміни можна спостерігати не лише на рівні мРНК, але й на рівні білку та функціонального каналу. Механізми регуляції змін експресії потребують подальшого дослідження.

3.4. Роль мікроРНК в регуляції експресії низькопорогових кальцієвих каналів

3.4.1. Біоінформаційний пошук мікроРНК, що взаємодіють із мРНК кальцієвих каналів Т-типу

З наших та літературних даних видно, що кальцієві канали Т-типу є об'єктами динамічної регуляції експресії. Очевидно, що ті зміни кількості мРНК та білку каналів, що спостерігаються, є наслідком впливу на гени та мРНК каналів багатьох факторів. На даний момент існує мало даних стосовно білкових факторів транскрипції кальцієвих каналів Т-типу. Що ж до універсальних посттранскрипційних регуляторів, мікроРНК, то їхній вплив на іонні канали вивчено дуже обмежено, а для Т-каналів вони взагалі не описані. МікроРНК взаємодіють із мРНК через специфічні сайти, що знаходяться на 3'-нетрансльованій ділянці (3'UTR) мРНК. Для біоінформатичного пошуку сайтів для мікроРНК ми використовували програмний пакет TargetScan (<http://www.targetscan.org/>), оскільки він здійснює пошук сайтів, орієнтуючись не лише на величину вільної енергії дуплекса мікроРНК-мРНК, а слідує усім правилам специфічності сайту. Перше правило – це повна комплементарність у паруванні між мікроРНК та

мРНК на ділянці від 2-го по 8-й нуклеотид мікроРНК (початкова ділянка). ГУ пари та місметчі на цій ділянці сильно понижають ефективність сайтів. Однак, А в першому положенні сайту та А або У у 9 положенні посилюють його ефективність, при чому вони не обов'язково мають паруватися з мікроРНК. Друге правило полягає в тому, що в центральній частині дуплекса мРНК-мікроРНК має існувати неспарена ділянка, що запобігає розриванню мРНК за допомогою білків аргонавтів (AGO) за іншим шляхом РНК-інтерференції. Третє правило вимагає наявності певної доли комплементарності на 3'-частині мікроРНК для стабілізації її взаємодії із мРНК. На цій ділянці часто спостерігаються місметчі та неспарені ділянки, проте високий рівень спарювання (особливо впродовж 13-16 нуклеотидів мікроРНК) може бути критичним у сайтах із субоптимальною зерною ділянкою. Загальне відображення цих правил представлено на Рис. 3.17.

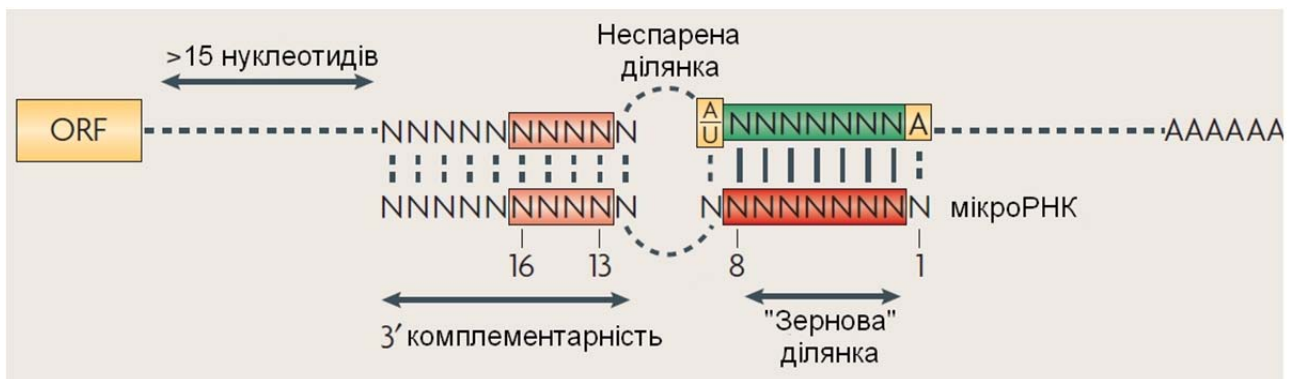


Рис. 3.17. Правила взаємодії мікроРНК із сайтом на 3'-нетрансльованій ділянці мРНК.

Ми просканували 3'UTR мРНК гена *casnalh* ($Ca_v3.2$) і виявили 35 сайтів для різних мікроРНК. Серед них була мікроРНК gno-miR-1, для якої на

даному 3'UTR було два сайти. Надалі ми перевірили ці сайти «на око» використовуючи програму RNAhybrid (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>). Перший сайт є гептамер-A1 сайтом із 1 нуклеотидом – А, а 9-10 – А/У, 12-15 нуклеотиди повністю гібридизовані; ці параметри підвищують силу сайтів. Другий сайт є також гептамер-A1-сайтом із А в якості першого нуклеотиду та частковою гібридизацією на 3'-кінці, проте він дещо слабший за перший (Рис.3.18).

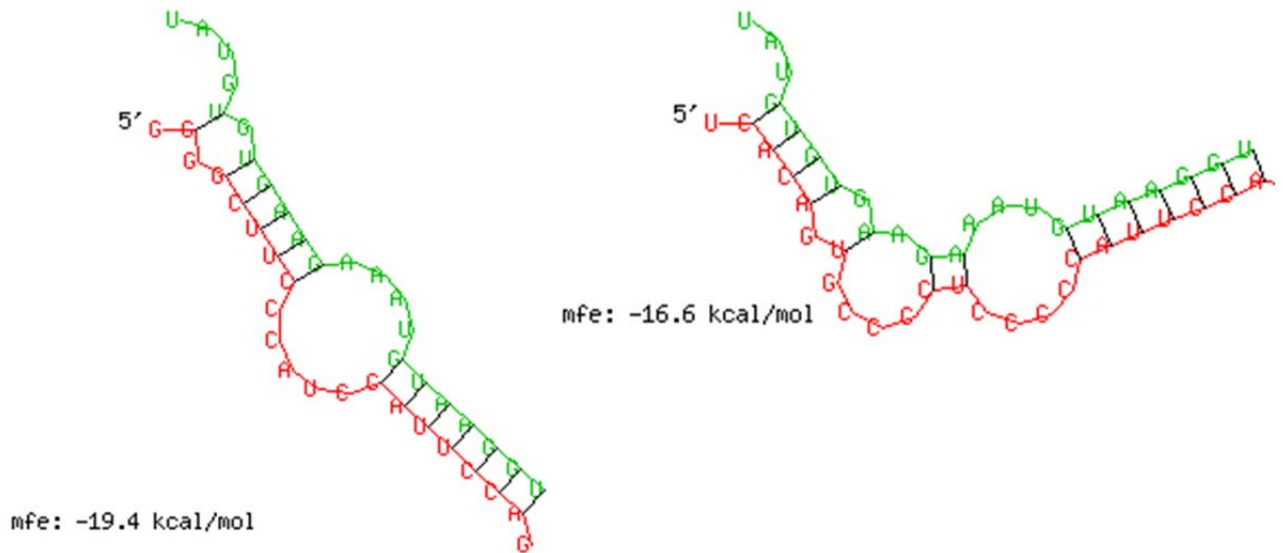


Рис.3.18. Два сайти для gno-miR-1 (зелений колір) на 3'-UTR Ca_v3.2 мРНК (червоний). Mfe – мінімальна вільна енергія зв'язку між молекулами РНК.

В результаті даного аналізу ми виявили gno-miR-1 як потенційний регулятор експресії Ca_v3.2 каналу Т-типу. Ця мікроРНК характерна для міоцитів та кардіоміоцитів, де відповідає за набуття цими клітинами властивого їм профілю експресії генів, дані ж по експресії gno-miR-1 у

нейронах практично відсутні. Тому у нас і постало питання перевірки експресії gno-miR-1 у мозку щурів та порівняння рівнів мРНК $Ca_v3.2$ та даної мікроРНК у нормі та в моделі абсансної епілепсії.

3.4.2 Кількісна оцінка експресії мікроРНК-1 (gno-miR-1) у таламусі та соматосенсорній корі щурів із експериментальною абсанс-епілепсією та на різних етапах онтогенезу

Наявна в літературі інформація щодо експресії gno-miR-1 у кардіоміоцитах дозволила додатково обґрунтувати аналіз її коекспресії із субодиницею $Ca_v3.2$ НПКК. Кількість gno-miR-1 зростає при дозріванні кардіоміоцитів з ембріонального стану у дорослий (Wei et al., 2014). В ході розвитку зміни відбуваються й у складі іонних каналів мембрани серцевих клітин, у тому числі й в кальцієвих каналах Т-типу. Неонатальні та ембріональні кардіоміоцити мишей експресують в основному $Ca_v3.2$, а дорослі знижують його кількість та збільшують експресію $Ca_v3.1$ (Mesirca et al., 2014). Таким чином, порівняння цих даних дає додаткову можливість припускати взаємодію між gno-miR-1 та мРНК $Ca_v3.2$.

Для встановлення рівнів експресії gno-miR-1 застосовувалась кількісна ПЛР. Рівень gno-miR-1 у "кортикальному фокусі" визначався у 10-денних і 6-місячних контрольних щурів лінії Wistar та 6-місячних щурів лінії WAG/Rij. При визначенні експресії gno-miR-1 бралися ті ж самі зразки РНК, в яких було встановлено експресію мРНК субодиниці $Ca_v3.2$. В результаті аналізу

ми виявили оберненопропорційне відношення рівнів gno-miR-1 та мРНК Ca_v3.2, при чому рівень gno-miR-1 у «кортикальному фокусі» соматосенсорної кори був знижений у 3 рази.

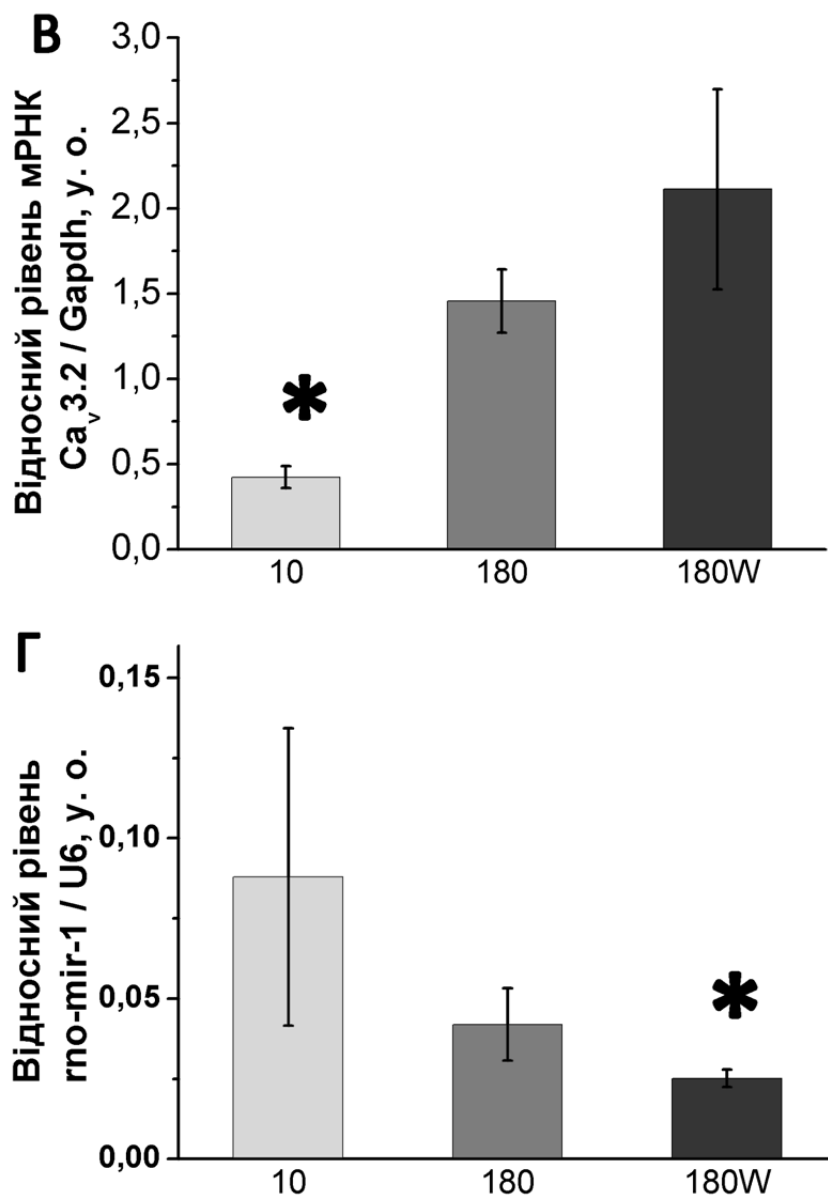


Рис. 3.18. Співставлення експресії мРНК Ca_v3.2 (А) та gno-miR-1 (Б) у «кортикальному» фокусі в нормі та моделі абсанс епілепсії. 10,180 – вік тварин у днях, W – лінія WAG/Rij * – група статистично значимо відрізнялася від інших груп, p<0,05

Один із механізмів дії мікроРНК на мРНК полягає у дестабілізації мРНК шляхом деаденілювання поліА-хвоста, відщеплення кепу та направлення мРНК у Р-тільця, де вона зазнає деградації (Guo et al., 2010). Цей процес залежить від наявності мікроРНК, тому чим вища експресія цієї РНК у клітині, тим більше цільових мРНК зі специфічними сайтами будуть зазнавати впливу та дестабілізуватися. Тому 3-разове пониження експресії досліджуваної *gno-miR-1* у кортикальному фокусі може бути причиною виходу мРНК $Ca_v3.2$ з-під дестабілізуючого впливу даної мікроРНК, що призводить до підвищення експресії $Ca_v3.2$ при епілепсії. Зареєстроване ж нами оберненопропорційне співвідношення між експресією *gno-miR-1* та $Ca_v3.2$ слугує непрямым свідченням регуляції даної мРНК за допомогою *gno-miR-1*.

Щоб перевірити, чи не є знайдена закономірність характерною лише для щурів WAG/Rij, ми звернулися до наших даних щодо зміни експресії $Ca_v3.2$. Так, у латеродорзальному ядрі таламусу кількість мРНК була досить низькою, але її зміни з 10го по 25й день постнатального розвитку були суттєвими. Вимірявши кількість *gno-miR-1*, в результаті ми знову отримали обернене співвідношення між рівнями *gno-miR-1* та мРНК $Ca_v3.2$ (Рис. 3.19.).

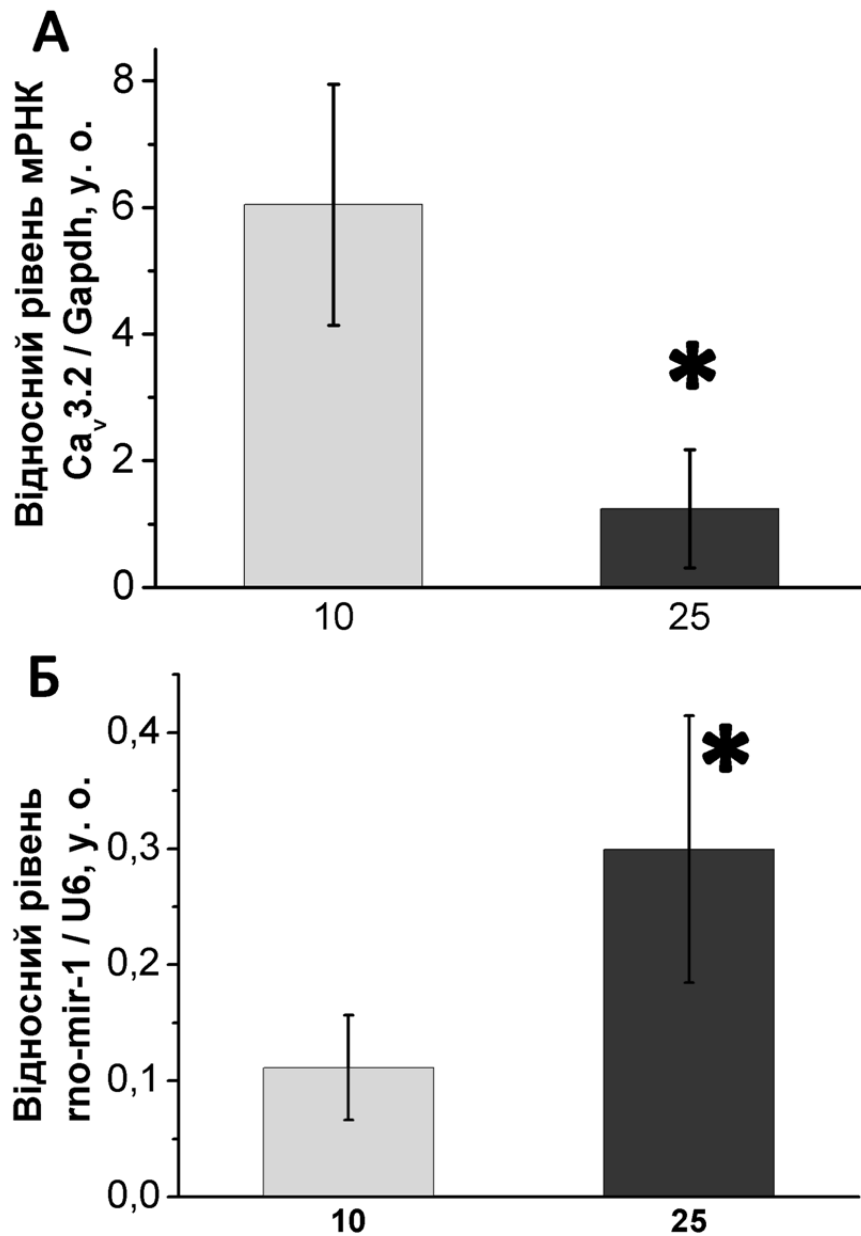


Рис. 3.19. Співставлення експресії мРНК $Ca_v3.2$ (А) та gno-miR-1 (Б) у латеродорзальному ядрі таламусу. 10, 25 – вік тварин у днях. * – група статистично значимо відрізнялася від інших груп, $p < 0,05$

Ці дані знову підтверджують можливість регуляції $Ca_v3.2$ за допомогою gno-miR-1, а також наштовхують на думку про універсальність регуляції експресії даного каналу за допомогою gno-miR-1 як в корі, так і в таламусі.

Однозначне доведення факту взаємодії між мікроРНК *gno-miR-1* і мРНК $Ca_v3.2$ можливо лише в системі *in vitro*. Для цього потрібно клонувати фрагмент геному щура, який містить ДНК *gno-miR-1*, до експресійного вектору, модифікувати наявний клон кДНК щурачої ізоформи $Ca_v3.2$ шляхом додавання до нього 3'-нетрансльованої ділянки цієї мРНК. Обидва вектори необхідно експресувати в гетерологічній системі експресії (наприклад, у клітинній лінії HEK293), де оцінити зменшення щільності каналів на поверхні клітинної мембрани електрофізіологічно чи імунохімічно. Іншим варіантом є різноманітні генетичні конструкції, що несуть гени люциферази. Ці ферменти каталізують реакції відновлення люмінесцентного барвника (люциферину). До кодуєчої частини гену люциферази додається 3'-нетрансльована ділянка досліджуваної мРНК, а потім отриманий вектор коекспресується з мікроРНК. Ступінь заглушення транскрипції вивчають за зміною інтенсивності люмінесценції.

3.5. Аналіз та узагальнення результатів

Низькопорогові кальцієві канали мають вкрай складний патерн експресії у часі та просторі, при зміні фізіологічного стану клітини та при патології. Не будучи єдиною причиною каналопатій, а тому не привертаючи до себе такої уваги, як серцевий калієвий канал HERG чи потенціалкеровані натрієві канали, вони, тим не менше, залучені до величезної кількості клітинних процесів. З того, що вже відомо про функції T-каналів, зрозуміло, що вони задіяні: 1) в тонкій регуляції мембранного потенціалу клітин, що є

необхідною умовою для ритмогенезу в мозку та серці, активації потенціал-залежних натрієвих і калієвих каналів у нейронах і міоцитах судин; 2) у впусканні іонів кальцію в клітину в якості вторинних месенджерів для регуляції відкриття кальцієвого депо ендоплазматичного ретикулуму, стимуляції синаптичної передачі, активації експресії генів тощо.

В нашій роботі ми дослідили різні аспекти змін експресії генів кальцієвих каналів T-типу в таламусі та ділянці соматосенсорної кори щурів. Нам не вдалося класифікувати нейрони релейних ядер за їх функцією та наявністю конкретних ізоформ T-каналів, що свідчить про нелінійну картину і складну субклітинну локалізацію НПКК. Для бічного колінчастого ядра низка дослідників постулює таку класифікацію (Broicher et al., 2007), але для латеродорзального ядра існують дослідження, що суперечать їй (Shcheglovitov et al., 2005; Tarasenko et al., 1997). Наші результати також вказують на те, що для побудови реальної класифікації таламічних нейронів потрібні додаткові інструменти, окрім петч-клемпу, ПЛР для одиничних клітин та імунохімічних методів. Миші з нокаутіваними генами Ca_v3 також є проблемними з точки зору компенсаторних механізмів, що розвиваються у тварин починаючи з ембріогенезу. Ми покладемо надію на селективні блокатори ізоформ T-каналів, а також на вдосконалення засобів адресної доставки малих інтерференційних РНК, які зможуть припинити роботу обраного каналу в певному ядрі таламуса в ході гострого експерименту.

Незважаючи на те, що роль НПКК у таламусі досліджена досить ґрунтовно, зміни їх функції у ранньому постнатальному періоді вивчалися лише електрофізіологічно (Tarasenko et al., 1997), а молекулярно-біологічне підґрунтя залишалось невідомим. Нам вдалося показати, що в ЛД ядрі на високому рівні присутні мРНК $Ca_v3.1$ і $Ca_v3.3$, причому кількість $Ca_v3.1$ суттєво знижується між 10-м і 25-м постнатальними днями. Це може свідчити про участь ізоформи $Ca_v3.1$ у процесі формування синаптичних зв'язків у нейронах таламусу, який завершується в кінці другого тижня після народження.

Зміни в ЛД ядрі щурів зі спадковою моделлю абсансної епілепсії виявились неочікуваними. Зниження кількості мРНК ізоформи $Ca_v3.1$ та щільності Т-струму в нейронах лінії WAG/Rij протирічить прийнятому уявленню про збільшення експресії генів і амплітуди струмів через НПКК як основу генерації комплексів «пік-хвиля». Тим не менш, абсанси в щурів лінії WAG/Rij з'являються після трьохмісячного віку, а досягають максимальної частоти після шостого місяця. Ми припускаємо, що певний компенсаторний механізм може утримувати експресію генів Т-каналів на низькому рівні до пубертатного віку. Подібний ефект спостерігається в іншій моделі абсансної епілепсії – щурах GAERS, де абсанси також з'являються пізно, після 10го місяця життя, а рівень експресії генів НПКК також не відрізняється від контролю в ранньому постнатальному періоді (Talley et al., 2000). Насьогоднішній аналіз Т-струмів у статевозрілих щурів методами електрофізіології

утруднений, втім ця задача має братися до уваги з появою нових методів дослідження (Brewer et al., 1997, 2007). Дві інші зони, задіяні в генерації абсансів у щурів WAG/Rij – СЯ і «кортикальний фокус» з точки зору змін у Т-каналах дали іншу цікаву знахідку. Порівняно з лінією Wistar, у СЯ у модельних щурів ми не знайшли суттєвих відмінностей у рівні експресії генів НПКК. Слід зазначити, що подібне порівняння щурів WAG/Rij з щурами лінії АСІ виявило суттєве зростання рівня мРНК Т-каналів у СЯ перших (Broicher et al., 2008). Проте експресія генів НПКК явно залежить від багатьох білкових факторів, гени яких у далеких лініях щурів можуть сильно варіювати. Ми вважаємо, що найбільш адекватним контролем є найближча до WAG/Rij інbredна лінія, а саме батьківська лінія Wistar. Тому можна казати про меншу залученість Т-каналів СЯ у генерації абсансів, про що додатково свідчить той факт, що нанесення етосукциміду на СЯ не викликало повного зникнення комплексів «пік-хвиля», а лише пригнічувало їх (Sitnikova et al., 2007).

Проте в тому ж дослідженні етосукцимід (неселективний блокатор кальцієвого Т-струму), нанесений на зону сомато-сенсорної кори, яка відповідає за верхню губу та вібриси та є першим у часі джерелом абсансної нервової активності, повністю прибирав циркуляцію комплексів «пік-хвиля». Наші дані щодо збільшення саме там рівня мРНК і білку Ca_v3.1 переконливо свідчать на користь саме кортикоталамічної теорії генезу абсансів у щурів лінії WAG/Rij. Цікаво, що саме підвищення рівня білку Ca_v3.1 призводить до

абсанс-подібної активності в мишей, і при цьому кількість мРНК у мишачій моделі зростає і в корі (Ernst et al., 2009). Утім залишається відкритим питання, яка саме функція $Ca_v3.1$ у кортикальних нейронах, оскільки подібні дослідження нам не відомі.

Ми встановили обернену залежність між кількістю мРНК $Ca_v3.2$ і мікроРНК *gno-mir-1* у нервовій тканині ЛДЯ і "кортикального фокусу" щурів. Збільшення рівня мікроРНК *gno-mir-1* у ЛДЯ з 10 до 25 дня відповідає зменшенню рівня мРНК $Ca_v3.2$, і навпаки: більша кількість мРНК $Ca_v3.2$ у корі дорослих щурів лінії WAG/Rij відносно 10-денних щурів Wistar супроводжувалася зниженням відносного рівня *gno-mir-1*. МікроРНК *gno-mir-1* найбільше експресується в серці та скелетних м'язах, через що вважається "м'язовою" мікроРНК. Тим не менш, у корі головного мозку мишей рівень *gno-mir-1* перевищує такий у печінці, селезінці чи нирках, та є приблизно в 200 разів нижче за серцевий (Mishima et al., 2007). Наше вивчення експресії *gno-mir-1* у мозку було ініційоване результатами біоінформаційного пошуку, але паралельно в наукових джерелах з'явилися результати щодо впливу гіперекспресії цієї мікроРНК в серці на функції нервової системи та головного мозку. *Mir-1* виявилась задіяною в передачі больового сигналу через сенсорні ганглії до спинного мозку в мишей (Kusuda et al., 2011), активації апоптозу нейронів під дією гіпоксії (Chang et al., 2016). Також було показано пригнічення синтезу транскрипційних факторів BDNF та CREB у гіпокампі мишей, у яких було штучно викликано гіперекспресію мікроРНК

mir-1 в серці (Ma et al., 2015). Дослідники виявили підвищений рівень зрілих та пре-мікроРНК у нейронах гіпокампу, проте залишається неясним, чи таке підвищення відбувається за рахунок власної продукції mir-1, або шляхом транспорту з серця до мозку. Автори дослідження схиляються до другого варіанту, хоча механізми такого транспорту досі не вивчені. МікроРНК mir-1 закодована в 12-му екзоні гена *mib-1* ("mind bomb"), продукт якого є убіквітин-лігазою, що виконує важливу роль у Notch-сигналізації всередині клітини (Liu et al., 2008). Notch-рецептори та пов'язані з ними білки необхідні для пластичності дорослого мозку, тому ген *mib-1* активно транскрибується в різних відділах мозку, що призводить і до додаткової появи mir-1. Незалежне збільшення кількості mir-1 в мозку впливало на когнітивні порушення у піддослідних тварин

Всі викладені результати вказують на те, що попереду в нейрофізіологів ще багато нерозв'язаних питань щодо регуляції експресії генів кальцієвих каналів Т-типу. Відомі транскрипційні фактори пояснюють лише невелику частину змін, які спостерігаються. Високий рівень транскрипції $Ca_v3.1$ у таламусі залежить від комплексу LEF1/ β -катенін, але нічого не відомо щодо причини зміни в його регуляції (Wisniewska et al., 2010). Ми переконані, що РНК-інтерференція може впливати на диференційну регуляцію кожної з ізоформ. Цікаво, що 3'-нетрансльовані ділянки мРНК кожного з генів Ca_v3 не тільки дуже поліморфні за послідовністю, але й за довжиною. Це значить, що кожен з Т-каналів може регулюватися різними мікроРНК. Ми виявили лише

першу потенційну мікроРНК для $Ca_v3.2$, але, без сумніву, таких регуляторних мікроРНК для кальцієвих каналів Т-типу існує значно більше.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено результати власного дослідження змін експресії генів кальцієвих каналів Т-типу в таламусі та соматосенсорній корі щура в онтогенезі та за умов експериментальної моделі абсансної епілепсії у щурів лінії WAG/Rij та розглянуто роль РНК-інтерференції у регуляції цих змін.

1. Розроблено модифікацію методу оцінки експресії генів у окремих нейронах ЦНС за допомогою полімеразної ланцюгової реакції та зворотної транскрипції. Як гальмівні ГАМК-ергічні так і збуджувальні глутаматергічні нейрони таламусу експресують мРНК $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$, $Ca_v3.3$, причому більшість нейронів експресує мРНК 2-х чи 3-х субодиниць одночасно. Т-струми у гальмівних та збуджувальних нейронах відрізняються за електрофізіологічними властивостями несуттєво.
2. Рівень експресії мРНК низькопорогових кальцієвих каналів знижується з 10 до 25 дня постнатального розвитку у латеродорзальному ядрі мозку щура: експресія мРНК $Ca_v3.1$ та $Ca_v3.3$ до десятого дня знаходиться на співставному рівні, тоді як кількість мРНК $Ca_v3.2$ значно нижча. На 25-й день значно зменшується рівень мРНК $Ca_v3.1$ та $Ca_v3.2$, а $Ca_v3.3$ майже не змінюється.
3. У тканині соматосенсорної кори, що відповідає за верхню губу та вібриси щурів лінії WAG/Rij у віці 6 місяців спостерігається збільшена

експресія мРНК ізоформи Т-каналів $Ca_v3.1$ у 2,5 рази та збільшена кількість білка у 2,1 рази, порівняно зі щурами контрольної лінії Wistar. Для 10- і 25-денних щурів WAG/Rij показано зменшення експресії мРНК $Ca_v3.1$ та $Ca_v3.2$ субодиниць Т-каналів та зниження Т-струмів у нейронах латеродорзального ядра таламусу на 43% порівняно з контрольними щурами.

4. Збільшення експресії мікроРНК *gno-mir-1* супроводжується зменшенням експресії мРНК каналу $Ca_v3.2$ у нормальних щурів та щурів зі спадковими абсансами.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Characterization of voltage-gated Ca²⁺ conductances in layer 5 neocortical pyramidal neurons from rats / M. Almog, A. Korngreen [et al.] // PLoS One. – 2009. – № 4
2. MicroRNA and mRNA Cargo of Extracellular Vesicles from Porcine Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells / M.D. Angelica, Y. Fong [et al.] // October. – 2008. – № 4. – P. 520–529.
3. The Ca(V)₃ calcium channel is the major sleep spindle pacemaker in thalamus / S. Astori, R.D. Wimmer, H.M. Prosser [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2011. – № 33. – P. 13823–13828.
4. Regulation of T-type Cav31 channels expression by synthetic glucocorticoid dexamethasone in neonatal cardiac myocytes / F. BenMohamed, L. Ferron, Y. Ruchon [et al.] // Mol. Cell. Biochem. – 2009. – № 1-2. – P. 173–183.
5. Long-term seizure remission in childhood absence epilepsy: Might initial treatment matter? / A.T. Berg, S.R. Levy, F.M. Testa [et al.] // Epilepsia. – 2014. – № 4. – P. 551–557.
6. T current potentiation increases the occurrence and temporal fidelity of synaptically evoked burst firing in sensory thalamic neurons / T. Bessaïh, N. Leresche, R.C. Lambert [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2008. – № 32. – P. 11376–11381.
7. The outcome of absence epilepsy: a meta-analysis / P. a Bouma, R.G. Westendorp, J.G. van Dijk [et al.] // Neurology. – 1996. – № 3. – P. 802–808.
8. Silencing of the Cav32 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception / E. Bourinet, A. Alloui, A. Monteil [et al.] // EMBO J. – 2005. – № 2. – P. 315–324.
9. Calcium-permeable ion channels in pain signaling / E. Bourinet, C. Altier, M.E. Hildebrand [et al.] // Physiol. Rev. – 2014. – № 1. – P. 81–140.

10. Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons / G.J. Brewer [et al.] // *J. Neurosci. Methods.* – 1997. – № 2. – P. 143–155.
11. Isolation and culture of adult neurons and neurospheres / G.J. Brewer, J.R. Torricelli [et al.] // *Nat. Protoc.* – 2007. – № 6. – P. 1490–1498.
12. Specific expression of low-voltage-activated calcium channel isoforms and splice variants in thalamic local circuit interneurons / T. Broicher, T. Kanyshkova, P. Landgraf [et al.] // *Mol. Cell. Neurosci.* – 2007. – № 2. – P. 132–145.
13. Correlation of T-channel coding gene expression, IT, and the low threshold Ca²⁺ spike in the thalamus of a rat model of absence epilepsy / T. Broicher, T. Kanyshkova, P. Meuth [et al.] // *Mol. Cell. Neurosci.* – 2008. – № 3. – P. 384–399.
14. Familial occurrence of epilepsy in children with newly diagnosed multiple seizures: Dutch Study of Epilepsy in Childhood / P.M. Callenbach, a T. Geerts, W.F.M. Arts [et al.] // *Epilepsia.* – 1998. – № 3. – P. 331–336.
15. Roles of microRNA-1 in hypoxia-induced apoptotic insults to neuronal cells / C.Y. Chang // *Arch. Toxicol.* – 2016. – № 1. – P. 191–202.
16. Association between genetic variation of CACNA1H and childhood absence epilepsy / Y. Chen, J. Lu, H. Pan [et al.] // *Ann. Neurol.* – 2003. – № 2. – P. 239–243.
17. T-type Ca²⁺ channels in absence epilepsy / E. Cheong, H.-S. Shin [et al.] // *Pflugers Arch.* – 2014. – № 7. – P. 719–734.
18. T-type Ca²⁺ channels in absence epilepsy / E. Cheong, H.-S. Shin [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – № 7. – P. 1560–1571.
19. Genetic Animal Models for Absence Epilepsy: A Review of the WAG/Rij Strain of Rats / A.M.L. Coenen, E.L.J.M. Van Luijtelaar [et al.] // *Behav. Genet.* – 2003. – № 6. – P. 635–655.
20. The global spike: Conserved dendritic properties enable unique ca²⁺ spike generation in low-threshold spiking neurons / W.M. de Connelly, V. c Crunelli, A.C. Errington [et al.] // *J. Neurosci.* – 2015. – № 47. – P. 15505–

- 15522.
21. Nucleus basalis lesions suppress spike and wave discharges in rats with spontaneous absence-epilepsy / L. Danober, M. Vergnes, A. Depaulis [et al.] // *Neuroscience*. – 1994. – № 3. – P. 531–539.
 22. Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat / L. Danober, C. Deransart, A. Depaulis [et al.] // *Prog. Neurobiol.* – 1998. – № 1. – P. 27–57.
 23. Splice-variant changes of the Ca(V)₂ T-type calcium channel mediate voltage-dependent facilitation and associate with cardiac hypertrophy and development / L.S. David, E. Garcia, S.M. Cain [et al.] // *Channels (Austin)*. – 2010. – № 5. – P. 375–389.
 24. Upregulation of T-type Ca²⁺ channels in long-term diabetes determines increased excitability of a specific type of capsaicin-insensitive DRG neurons / D.E. Duzhy // *Mol. Pain*. – 2015. – P. 29.
 25. T-type Ca²⁺ channel inhibition induces p53-dependent cell growth arrest and apoptosis through activation of p38-MAPK in colon cancer cells / B. Dziegielewska, D.L. Brautigan, J.M. Larner [et al.] // *Mol. Cancer Res.* – 2014. – № 3. – P. 348–358.
 26. Mechanisms by which a CACNA1H mutation in epilepsy patients increases seizure susceptibility / V.-S. Eckle, A. Shcheglovitov, I. Vitko [et al.] // *J. Physiol.* – 2014. – P. 795–809.
 27. Genetic Enhancement of Thalamocortical Network Activity by Elevating 1G-Mediated Low-Voltage-Activated Calcium Current Induces Pure Absence Epilepsy / W.L. Ernst, Y. Zhang, J.W. Yoo [et al.] // *J. Neurosci.* – 2009. – № 6. – P. 1615–1625.
 28. Two types of calcium channels in the somatic membrane of newborn rat dorsal root ganglion neurones / S.A. Fedulova, P.G. Kostyuk, N.S. Veselovsky [et al.] // *J. Physiol.* – 1985. – P. 431–446.
 29. Comparative analysis of ionic currents in the somatic membrane of embryonic and newborn rat sensory neurons / S.A. Fedulova, P.G. Kostyuk,

- N.S. Veselovsky [et al.] // *Neuroscience*. – 1994. – № 2. – P. 341–346.
30. Functional coupling between large-conductance potassium channels and Cav32 voltage-dependent calcium channels participates in prostate cancer cell growth / F. Gackière, M. Warnier, M. Katsogiannou [et al.] // *Biol. Open*. – 2013. – № 9. – P. 941–951.
31. Low-Threshold Exocytosis Induced by cAMP-Recruited CaV32 ($\alpha 1H$) Channels in Rat Chromaffin Cells / A. Giaccipoli, M. Novara, A. de Luca [et al.] // *Biophys. J.* – 2006. – № 5. – P. 1830–1841.
32. Transcription Factor Sp1 Regulates T-Type Ca(2+) Channel CaV 31 Gene Expression / R. González-Ramírez, E. Martínez-Hernández, A. Sandoval [et al.] // *J. Cell. Physiol.* – 2014. – № 5. – P. 551–560.
33. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels / H. Guo // *Nature*. – 2010. – № 7308. – P. 835–840.
34. CaV12/CaV3.x channels mediate divergent vasomotor responses in human cerebral arteries / O.F. Harraz, F. Visser, S.E. Brett [et al.] // *J. Gen. Physiol.* – 2015. – № 5. – P. 405–418.
35. Regulation of Ion Channel and Transporter Function Through RNA Editing / M. Holmgren, J.J.C. Rosenthal [et al.] // *RNA Ed.* – 2013. – P. 1–16.
36. Ni(2+)-sensitive T-type Ca(2+) channel currents are regulated in parallel with synaptic and visual response plasticity in visual cortex / S. Horibe // *Neurosci. Res.* – 2014. – P. 1–7.
37. Ca²⁺ signaling domains responsible for cardiac hypertrophy and arrhythmias / S.R. Houser [et al.] // *Circ. Res.* – 2009. – № 4. – P. 413–415.
38. Presynaptic HCN1 channels regulate Cav32 activity and neurotransmission at select cortical synapses / Z. Huang // *Nat. Neurosci.* – 2011. – № 4. – P. 478–486.
39. Consciousness: physiological dependence on rapid memory access / A.J. Hudson [et al.] // *Front. Biosci.* – 2009. – P. 2779–2800.
40. Neuronal T-type calcium channels: what's new? Iftinca: T-type channel regulation / M.C. Iftinca [et al.] // *J. Med. Life.* – 2011. – № 2. – P. 126–138.

41. Single cell RT-PCR proceeds without the risk of genomic DNA amplification / F.F. Johansen, B. Lambolez, E. Audinat [et al.] // *Neurochem. Int.* – 1995. – № 3. – P. 239–243.
42. Differential expression of microRNAs in mouse pain models / R. Kusuda // *Mol. Pain.* – 2011. – № 1. – P. 17.
43. AMPA receptor subunits expressed by single purkinje cells / B. Lambolez, E. Audinat, P. Bochet [et al.] // *Neuron.* – 1992. – № 2. – P. 247–258.
44. Cav32 T-type calcium channel is required for the NFAT-dependent Sox9 expression in tracheal cartilage / S.S. Lin, B.H. Tzeng, K.R. Lee [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2014. – № 19. – P. E1990–E1998.
45. A critical GxxxA motif in the gamma6 calcium channel subunit mediates its inhibitory effect on Cav31 calcium current / Z. Lin, K. Witschas, T. Garcia [et al.] // *J. Physiol.* – 2008. – № Pt 22. – P. 5349–5366.
46. Lipscombe D. Alternative splicing: functional diversity among voltage-gated calcium channels and behavioral consequences / D. Lipscombe, A. Andrade, S.E. Allen // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – № 7. – P. 1522–1529.
47. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart / N. Liu, S. Bezprozvannaya, A.H. Williams [et al.] // *Genes Dev.* – 2008. – № 23. – P. 3242–3254.
48. Low-threshold calcium channel subunit Cav33 is specifically localized in GABAergic neurons of rodent thalamus and cerebral cortex / X.B. Liu, K.D. Murray, E.G. Jones [et al.] // *J. Comp. Neurol.* – 2011. – № 6. – P. 1181–1195.
49. Cardiac over-expression of microRNA-1 induces impairment of cognition in mice / J.C. Ma, M.J. Duan, L.L. Sun [et al.] // *Neuroscience.* – 2015. – P. 66–78.
50. Highlights in the History of Epilepsy: The Last 200 Years / E. Magiorkinis, A. Diamantis, K. Sidiropoulou [et al.] // *Epilepsy Res Treat.* – 2014. – P. 582039.
51. Maheshwari A. Monogenic models of absence epilepsy windows into the

- complex balance between inhibition and excitation in thalamocortical microcircuits / A. Maheshwari, J.L. Noebels // *Prog. Brain Res.* – 2014. – № C. – 223-252 P.
52. Bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in mice lacking Ca_v3.1 T-type calcium channels / M.E. Mangoni, A. Traboulsie, A.L. Leoni [et al.] // *Circ. Res.* – 2006. – № 11. – P. 1422–1430.
 53. 17 beta-estradiol modulates expression of low-voltage-activated Ca_v3.2 T-type calcium channel via extracellularly regulated kinase pathway in cardiomyocytes / F. Marni, Y. Wang, M. Morishima [et al.] // *Endocrinology.* – 2009. – № 2. – P. 879–888.
 54. Cholinergic afferent stimulation induces axonal function plasticity in adult hippocampal granule cells / K. Martinello // *Neuron.* – 2015. – № 2. – P. 346–363.
 55. Evolving concepts on the pathophysiology of absence seizures: the cortical focus theory / H. Meeren, G. van Luijtelaar, F. Lopes da Silva [et al.] // *Arch. Neurol.* – 2005. – № 3. – P. 371–376.
 56. Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats / H.K.M. Meeren, J.P.M. Pijn, E.L.J.M. Van Luijtelaar [et al.] // *J. Neurosci.* – 2002. – № 4. – P. 1480–1495.
 57. T-type channels in the sino-atrial and atrioventricular pacemaker mechanism / P. Mesirca, A.G. Torrente, M.E. Mangoni [et al.] // *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* – 2014. – № 4. – P. 791–799.
 58. Long-term and immediate effect of testosterone on single T-type calcium channel in neonatal rat cardiomyocytes / G. Michels, F. Er, M. Eicks [et al.] // *Endocrinology.* – 2006. – № 11. – P. 5160–5169.
 59. RT-PCR-based analysis of microRNA (miR-1 and -124) expression in mouse CNS / T. Mishima, Y. Mizuguchi, Y. Kawahigashi [et al.] // *Brain Res.* – 2007. – № 1. – P. 37–43.
 60. The evolution of the four subunits of voltage-gated calcium channels: Ancient roots, increasing complexity, and multiple losses / Y. Moran, H.H.

- Zakon [et al.] // *Genome Biol. Evol.* – 2014. – № 9. – P. 2210–2217.
61. Functional Impact of Alternative Splicing of Human T-Type Cav33 Calcium Channels / J. Murbartian, J.M. Arias, E. Perez-Reyes [et al.] // *J Neurophysiol.* – 2004. – № 6. – P. 3399–3407.
 62. Exposure to cAMP and beta-adrenergic stimulation recruits Ca(V)₃ T-type channels in rat chromaffin cells through Epac cAMP-receptor proteins / M. Novara, P. Baldelli, D. Cavallari [et al.] // *J. Physiol.* – 2004. – № Pt 2. – P. 433–449.
 63. Single calcium channels in rat and guinea-pig hippocampal neurons / T.J. O'Dell, B.E. Alger [et al.] // *J. Physiol.* – 1991. – № 1991. – P. 739–767.
 64. Paxinos G. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates / G. Paxinos, C. Watson 1998. – 237 P.
 65. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels / E. Perez-Reyes [et al.] // *Physiol. Rev.* – 2003. – № 1. – P. 117–161.
 66. Molecular characterization of T-type calcium channels / E. Perez-Reyes [et al.] // *Cell Calcium.* – 2006. – № 2. – P. 89–96.
 67. Molecular Pharmacology of Human Ca_v3.2 T-Type Ca²⁺ Channels: Block by Antihypertensives, Antiarrhythmics, and Their Analogs / E. Perez-reyes, A.L. Van Deusen, I. Vitko [et al.] 2009. – № 2. – P. 621–627.
 68. Intracellular recordings in thalamic neurones during spontaneous spike and wave discharges in rats with absence epilepsy / D. Pinault, N. Leresche, S. Charpier [et al.] // *J. Physiol.* – 1998. – № 2. – P. 449–456.
 69. Regulation and function of Cav31 T-type calcium channels in IGF-I-stimulated pulmonary artery smooth muscle cells / F. Pluteanu, L.L. Cribbs [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2011. – № 3. – P. C517–C525.
 70. Recurrent gain of function mutation in calcium channel CACNA1H causes early-onset hypertension with primary aldosteronism / U.I. Scholl, G. St?lting, C. Nelson-Williams [et al.] // *Elife.* – 2015. – № 4. – P. 1–22.
 71. T-type channels become highly permeable to sodium ions using an alternative extracellular turret region (s5-p) outside the selectivity filter / A.

- Senatore, W. Guan, A.N. Boone [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2014. – № 17. – P. 11952–11969.
72. Gene transcription and splicing of T-type channels are evolutionarily-conserved strategies for regulating channel expression and gating / A. Senatore, J.D. Spafford [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – № 6
73. Alternative splicing within the I-II loop controls surface expression of T-type Cav31 calcium channels / A. Shcheglovitov, I. Vitko, I. Bidaud [et al.] // *FEBS Lett.* – 2008. – № 27. – P. 3765–3770.
74. Contrasting the effects of nifedipine on subtypes of endogenous and recombinant T-type Ca²⁺ channels / A. Shcheglovitov, T. Zhelay, Y. Vitko [et al.] // *Biochem. Pharmacol.* – 2005. – № 5. – P. 841–854.
75. T-type Ca²⁺ channels and absence epilepsy / H.-S. Shin [et al.] // *Cell Calcium.* – 2006. – № 2. – P. 191–196.
76. Electroencephalographic characterization of spike-wave discharges in cortex and thalamus in WAG/Rij rats / E. Sitnikova, G. Van Luijtelaaar [et al.] // *Epilepsia.* – 2007. – № 12. – P. 2296–2311.
77. Contributions of T-type calcium channel isoforms to neuronal firing / T.P. Snutch, S.M. Cain [et al.] // *Channels (Austin).* – 2010. – № 6. – P. 475–482.
78. CACNA1H mutations in autism spectrum disorders / I. Splawski, D.S. Yoo, S.C. Stotz [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2006. – № 31. – P. 22085–22091.
79. Impact of network activities on neuronal properties in corticothalamic systems / M. Steriade [et al.] // *J. Neurophysiol.* – 2001. – № 1. – P. 1–39.
80. Impact of Network Activities on Neuronal Properties in Corticothalamic Systems Impact of Network Activities on Neuronal Properties in Corticothalamic Systems / M. Steriade, S. Lehnert, M.C. Ford [et al.] 2014. – P. 1–39.
81. Membrane and firing properties of glutamatergic and GABAergic neurons in the rat medial vestibular nucleus / T. Takazawa, Y. Saito, K. Tsuzuki [et al.] 2004. – P. 3–39.
82. Differential distribution of three members of a gene family encoding low

- voltage-activated (T-type) calcium channels / E.M. Talley, L.L. Cribbs, J.H. Lee [et al.] // *J. Neurosci.* – 1999. – № 6. – P. 1895–1911.
83. Low-voltage-activated calcium channel subunit expression in a genetic model of absence epilepsy in the rat / E.M. Talley, G. Solórzano, a Depaulis [et al.] // *Brain Res. Mol. Brain Res.* – 2000. – № 1. – P. 159–165.
84. Two types of low-voltage-activated Ca²⁺ channels in neurones of rat laterodorsal thalamic nucleus / A.N. Tarasenko, P.G. Kostyuk, A. V Eremin [et al.] // *J. Physiol.* – 1997. – P. 77–86.
85. CNTF-evoked activation of JAK and ERK mediates the functional expression of T-type Ca²⁺ channels in chicken nodose neurons / T. Trimarchi, J. Pachua, A. Shepherd [et al.] // *J. Neurochem.* – 2009. – № 1. – P. 246–259.
86. Selective increase in T-type calcium conductance of reticular thalamic neurons in a rat model of absence epilepsy / E. Tsakiridou, L. Bertollini, M. de Curtis [et al.] // *J. Neurosci.* – 1995. – № 4. – P. 3110–3117.
87. Dendritic targeting of short and long 3' UTR BDNF mRNA is regulated by BDNF or NT-3 and distinct sets of RNA-binding proteins / A. Vicario, A. Colliva, A. Ratti [et al.] // *Front. Mol. Neurosci.* – 2015. – № October. – P. 62.
88. Functional Characterization and Neuronal Modeling of the Effects of Childhood Absence Epilepsy Variants of CACNA1H, a T-Type Calcium Channel / I. Vitko [et al.] // *J. Neurosci.* – 2005. – № 19. – P. 4844–4855.
89. Transcription factors Csx/Nkx25 and GATA4 distinctly regulate expression of Ca²⁺ channels in neonatal rat heart / Y. Wang, M. Morishima, M. Zheng [et al.] // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2007. – № 6. – P. 1045–1053.
90. Waxman S.G. Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets / S.G. Waxman, G.W. Zamponi // *Nat. Neurosci.* – 2014. – № 2. – P. 153–163.
91. Multifaceted roles of miR-1s in repressing the fetal gene program in the heart / Y. Wei // *Cell Res.* – 2014. – № 3. – P. 278–292.

92. LEF1/beta-catenin complex regulates transcription of the Cav31 calcium channel gene (*Cacna1g*) in thalamic neurons of the adult brain / M.B. Wisniewska, K. Misztal, W. Michowski [et al.] // *J Neurosci.* – 2010. – № 14. – P. 4957–4969.
93. The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential / G. Zamponi, J. Striessnig, A. Koschak [et al.] // *Pharmacol Rev.* – 2015. – № October. – P. 821–870.
94. Два типа кальциевых каналов в соматической мембране нейронов спинальных ганглиев крыс / Н.С. Веселовский, С.А. Федулова [et al.] // *Доклады АН СССР.* – 1983. – № 3. – P. 747.
95. Влияние N-3-метиладенина на пептидазную и рибонуклеазную активность протеасомы / В.Є. Досенко, В.Ю. Загорий, В.С. Нагибин [et al.] // *Укр. биохимический журнал.* – 2005. – № 5. – P. 52–56.
96. Шуба Я.М. Основи молекулярної фізіології іонних каналів / Я.М. Шуба 2010. – 446 P.