

Національна Академія Наук України
Інститут фізіології імені О.О. Богомольця

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Надтока Сергій Олександрович

УДК 612.822:612.827:576.315:577.352.4

ДИСЕРТАЦІЯ

Модуляція високопровідних катіонних каналів ядерної мембрани нейронів
Пуркінє мозочка щурів лігандами адренергічних і холінергічних рецепторів

091 Біологія

09 Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

Науковий керівник кандидат біологічних наук Котлярова Анна-Малгожата
Борисівна

Київ – 2026

АНОТАЦІЯ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SUMMARY

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

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

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

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

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

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

epinephrine hydrochloride, propranolol hydrochloride and isoprenaline hydrochloride.

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

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

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

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

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Публікації, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

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

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

Публікації, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

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

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

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

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	17
ВСТУП.....	19
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	25
1.1. Будова та функції ядерної мембрани.....	25
1.2. Ядерно-поровий комплекс.....	28
1.3. Іонні канали внутрішньоклітинних органел.....	32
1.4. Тканиноспецифічність іонних каналів.....	38
1.5. Властивості LCC-каналів ядерної мембрани та гіпотеза про їх роль у вивільненні Ca ²⁺	44
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	48
2.1. Об'єкт досліджень.....	48
2.2. Використані розчини та реактиви.....	48
2.3. Ізолювання ядер нейронів Пуркін'є мозочка щурів.....	49
2.4. Реєстрація іонного струму крізь канали ядерної мембрани.....	51
2.5. Статистично-математичне опрацювання результатів.....	55
2.6. Візуалізація результатів проведених досліджень.....	58
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ.....	60
3.1. Вплив модуляторів нікотинових холінорецепторів на властивості LCC-каналів.....	60
3.1.1. Вплив ацетилхолін хлориду на електрофізіологічні параметри LCC-каналів.....	60
3.1.2. Функціональні параметри LCC-каналів за дії карбахолін хлориду.....	66
3.1.3. Властивості LCC-каналів під впливом мекаміламін гідрохлориду.....	71
3.1.4. Вплив панкуроній броміду на електрофізіологічні характеристики LCC-каналів.....	78

3.1.5. Електрофізіологічні властивості LCC-каналів за дії векуроній броміду.....	83
3.1.6. Підсумки досліджень впливу модуляторів нікотинових холінорецепторів на LCC-канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє.....	87
3.2. Вплив модуляторів мускаринових холінорецепторів на властивості LCC-каналів.....	89
3.2.1. Дія атропін сульфату на електрофізіологічні характеристики LCC-каналів.....	90
3.2.2. Властивості та функціонування LCC-каналів під впливом пілокарпін гідрохлориду.....	98
3.2.3. Вплив платифілін гідротартату на функціональні параметри LCC-каналів.....	101
3.2.4. Підсумки досліджень впливу модуляторів мускаринових холінорецепторів на LCC-канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє.....	105
3.3. Вплив модуляторів адренорецепторів на властивості LCC-каналів.....	107
3.3.1. Зумовлені норепінефрин гідрохлоридом ефекти на LCC-канали.....	107
3.3.2. Вплив епінефрин гідрохлориду на властивості та функціонування LCC-каналів.....	110
3.3.3. Дія пропранолол гідрохлориду на LCC-канали та їх властивості.....	114
3.3.4. Електрофізіологічні параметри LCC-каналів під впливом ізопреналін гідрохлориду.....	117
3.3.5. Підсумки досліджень впливу модуляторів адренорецепторів на LCC-канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє.....	123

РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ.....	125
4.1. Аналіз впливу модуляторів нікотинових холінорецепторів на властивості LCC-каналів.....	125
4.2. Аналіз впливу модуляторів мускаринових холінорецепторів на властивості LCC-каналів.....	131
4.3. Аналіз впливу модуляторів адренорецепторів на LCC-канали..	136
4.4. Узагальнення досліджень впливу речовин на LCC-канали.....	138
ВИСНОВКИ.....	147
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	149

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- CLIC – хлоридний внутрішньоклітинний канал (англ. «chloride intracellular channel»)
- DHP-рецептори – дигідропіридинові рецептори (англ. «dihydropyridine receptor»)
- INM – внутрішня ядерна мембрана (англ. «inner nuclear membrane»)
- IP₃ – інозитол-трифосфат (англ. «inositol 1,4,5-trisphosphate»)
- IP₃R – інозитол-трифосфатний рецептор (англ. «inositol trisphosphate receptor»)
- K_{2p} – тандем-порові калієві канали (англ. «tandem pore domain potassium channels»)
- K_{ir} – калієві канали внутрішнього випрямлення (англ. «inward-rectifier potassium channels»)
- K_v – потенціалзалежний калієвий канал (англ. «voltage-gated potassium ion channel»)
- LAP – ламін-асоційований поліпептид (англ. «lamina-associated polypeptide»)
- LBR – ламін В рецептор (англ. «lamin B receptor»)
- LCC-канали – високопровідні катіонні канали (англ. «large-conductance cation channels»)
- MCUC – мітохондріальний кальцієвий уніпортерний комплекс (англ. «mitochondrial calcium uniporter complex»)
- NES – сигнальна послідовність ядерного експорту (англ. «nuclear export signal»)
- NIS – сигнальна послідовність ядерного імпорту (англ. «nuclear import signal»)
- NLS – сигнальна послідовність ядерної локалізації (англ. «nuclear localization signal»)
- NTR – рецептор ядерного транспорту (англ. «nuclear transport receptor»)
- Nup – нуклеопорин (англ. «nucleoporin»)
- ONM – зовнішня ядерна мембрана (англ. «outer nuclear membrane»)

P_o – ймовірність перебування каналів у відкритому стані (англ. «open-state probability»)

RyR – ріанодиновий рецептор (англ. «ryanodine receptor»)

TM – трансмембранний домен (англ. «transmembrane domain»)

TRIC-канали – тримерні внутрішньоклітинні катіонні канали (англ. «trimeric intracellular cation channels»)

VDAC – потенціал-залежний аніонний канал (англ. «voltage dependent anion channel»)

Атр – атропін сульфат

Ах – ацетилхолін хлорид

Век – векуроній бромід

Епі – епінефрин гідрохлорид

Ізо – ізопреналін гідрохлорид

Кон – контроль

Кх – карбахолін хлорид

Мек – мекаміламін гідрохлорид

Нор – норепінефрин гідрохлорид

Пан – панкуроній бромід

Піл – пілокарпін гідрохлорид

Плт – платифілін гідротартат

Прп – пропранолол гідрохлорид

ЯПК – ядерно-поровий комплекс

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

Процес вивільнення Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо, необхідний для функціонування збудливих клітин, таких як нейрони та міоцити (Shkryl, 2024; Zhuk et al., 2025), супроводжується зміною електрохімічного градієнту та наближенням потенціалу ендоплазматичної чи саркоплазматичної мембрани до рівноважного потенціалу цих іонів. Результатом таких змін могла б бути невисока тривалість процесу вивільнення Ca^{2+} та подальше його припинення при досягненні електрохімічної рівноваги менше ніж за 1 мс. Однак зазвичай період виходу цих іонів із саркоплазматичного ретикулуму триває довше, що забезпечується наявністю току позитивних катіонів у протилежному відносно Ca^{2+} струму напрямку (Guo et al., 2013; Gaburjakova et al., 2024), що компенсує електричну компоненту градієнту та зумовлює більш повне вивільнення іонів кальцію з депо. Водночас на даний момент залишається дискусійним те, які саме канали можуть опосередковувати такий протитік. Як можливих кандидатів на цю роль Марченком С.М. було запропоновано високопровідні катіонні канали (LCC-канали), на підставі їх здатності проводити іони K^+ та кореляції щільності цих каналів зі щільністю інозитол-трифосфатних рецепторів, залучених до вивільнення Ca^{2+} (Marchenko et al., 2005; Fedorenko et al., 2010; Fedorenko & Marchenko, 2014). Перевірка гіпотези про участь LCC-каналів у створенні протитоку позитивних іонів може передбачати нокаут генів цих каналів або їх хімічне блокування з подальшим дослідженням того, яким чином це відображається на характеристиках Ca^{2+} струму, однак на даний момент кодуючі гени LCC-каналів не є описаними, також неефективними для їх блокування виявилися такі традиційні інгібітори калієвих каналів, як тетраетиламоній та 4-амінопіридин (Marchenko et al., 2005). Водночас здатність знижувати їх провідність виявили модулятори нікотинових холінорецепторів, зокрема тубокурарин (Lunko et al., 2016; Kotyk et al., 2017), нікотин (Котлярова та ін., 2019) та нейротоксин II (Котик та ін.,

2019). З урахуванням цього, становить науковий інтерес перевірка, чи притаманна подібна дія іншим сполукам цього класу, модуляторам мускаринових холінорецепторів, а також адренорецепторів, ефект яких на LCC-канали не був досліджений раніше. Отримані у ході досліджень результати можуть як посприяти поглибленню розуміння функціональної активності та модуляції цих каналів, так і закласти підґрунтя для подальшого аналізу особливостей хімічної будови, які опосередковують регулювання окремих параметрів електрофізіологічної активності LCC-каналів.

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

Дослідження було виконано у межах відомчих тематик «Молекулярні механізми неврологічних розладів та можливі шляхи їх корекції» (№ державної реєстрації 0124U001713, 2024-2028 рр.), «Молекулярно-генетичні та фармакологічні засоби впливу на клітинні механізми неврологічних розладів» (№ державної реєстрації 0118U007343, 2019-2023 рр.), «Клітинні та молекулярні механізми функціонування нейронів головного та спинного мозку в нормі та патології» (№ державної реєстрації 0116U004473, 2017-2021 рр.), а також в межах завдань гранту Національної Академії Наук України «Фармакологічна чутливість та експресія катіонних каналів великої провідності у ядрах клітин різного типу» (№ державної реєстрації 0121U112012, 2021-2022 рр.) та із використанням речовин, придбаних на його кошти.

Мета і завдання дослідження

Метою роботи є охарактеризувати вплив адреномодуляторів, а також модуляторів нікотинних та мускаринових холінорецепторів на LCC-канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка щурів.

Згідно з цією метою було сформульовано наступні завдання:

1. Дослідити електрофізіологічні властивості LCC-каналів за дії модуляторів нікотинних холінорецепторів.

2. Визначити вплив на LCC-канали модуляторів мускаринових холінорецепторів.

3. З'ясувати властивості LCC-каналів під впливом модуляторів адренорецепторів.

4. Порівняти вплив досліджених сполук і визначити, які речовини є найбільш ефективними модуляторами LCC-каналів.

Об'єкт дослідження: LCC-канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка щурів лінії *Wistar*.

Предмет дослідження: електрофізіологічні характеристики LCC-каналів під впливом модуляторів холіно- та адренорецепторів.

Методи дослідження

Задля реалізації завдань дослідження було проведено ізоляцію ядер нейронів Пуркінє із корональних зрізів мозочка щурів лінії *Wistar*, та в подальшому використано метод patch-clamp у конфігурації nucleus-attached та в режимі voltage-clamp для вивчення електрофізіологічних характеристик LCC-каналів ядерної мембрани. Визначено амплітуду іонного струму крізь канали та ймовірність їх перебування у відкритому стані, із подальшим статистичним аналізом значущості відмінностей цих параметрів між групами в контрольних умовах та при дії досліджуваних речовин.

Наукова новизна отриманих результатів

У дисертаційній роботі вперше досліджено особливості модуляції LCC-каналів ядерної мембрани нейронів Пуркінє залежно від класу фізіологічно активних сполук, вплив яких вивчали, для багатьох речовин також встановлено особливості впливу залежно від того, з якого боку мембрани їх було застосовано. Можлива дія більшості досліджених речовин, наприклад, ізопреналіну, пропранололу, епінефрину, норепінефрину, атропіну, платифіліну, пілокарпіну, мекаміламіну, панкуронію та векуронію на ядерні LCC-канали не була досліджена раніше у жодній з конфігурацій, тоді як вплив

на ці канали деяких із вивчених сполук, зокрема, ацетилхоліну та карбахоліну, був вивченим раніше, але із використанням інших об'єктів, а саме кардіоміоцитів, і був відмінним від виявленого при використанні нейронів Пуркіньє.

Практичне значення отриманих результатів

Результати проведених досліджень і висновки на їх підставі перш за все поглиблюють розуміння фундаментальних проблем модуляції LCC-каналів ядерної мембрани, однак також можуть бути використані для здійснення цільового регулювання їх функціональної активності як у подальших дослідженнях цих каналів, так і для корекції процесів кальцієвої сигналізації у збудливих клітинах за умови підтвердження залученості LCC-каналів у створення протитоку позитивно заряджених іонів при вивільненні Ca^{2+} із клітинних депо.

Особистий внесок здобувача

Дисертантом разом із науковим керівником Котляровою А. Б. розроблено мету і визначено завдання дисертаційної роботи, а також самостійно проведено аналіз літератури відповідно до теми дослідження. Експериментальна частина виконана спільно з к.б.н. Котляровою А. Б. та к.б.н. Котик О. А. Дисертантом було здійснено статистично-математичне опрацювання результатів, їх опис та графічне представлення, а також в рамках обговорення результатів проведено порівняння з описаною у попередніх працях дією інших речовин на LCC-канали. Окремі реєстрації струму крізь LCC-канали були отримані та/або опрацьовані практикантами Тарнопольською О. В., Проценко К. М., Виноградовою Т. С. і Тагаві А. С., участь яких відображена у спільних публікаціях.

Апробація матеріалів дисертації

Результати досліджень, які увійшли до цієї дисертаційної роботи, було апробовано на наукових семінарах Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця, а також на наступних конференціях:

1. IX з'їзд Українського біофізичного товариства (м. Київ, 30 жовтня – 2 листопада 2023 р).
2. XIX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (м. Львів, 26 – 28 квітня 2023 р).
3. XXI Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених, присвячена 100-річчю від дня народження доктора біологічних наук, професора Василя Юхимовича Шавкуна (м. Львів, 18 – 19 травня 2023 р).
4. Міжнародна науково-практична конференція «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (м. Львів, 3 – 4 жовтня 2024 р).
5. Міжнародна конференція з нейронаук та Наукові читання, присвячені вісцеральній фізіології та патофізіології (м. Київ, 19 – 21 листопада 2024 р).
6. XXI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (м. Львів, 28 квітня – 1 травня 2025 р).
7. XXIII Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених (м. Львів, 15 – 16 травня 2025 р.)
8. IX Міжнародна наукова конференція «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології» (м. Київ, 21 – 24 жовтня 2025 р).
9. Школа-воркшоп «Сучасні методи в нейронауках» (м. Київ, 28 – 29 жовтня 2025 р).
10. VI Міжнародна науково-практична конференція «Природничі науки: проекти, дослідження, перспективи» (м. Лубни – м. Миргород, 5 – 6 листопада 2025 р).

Публікації

Результати науково-дослідної роботи було опубліковано у 5 статтях в періодичних наукових виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science та/або Scopus, із них 3 статті (Nadtoka et al., 2025a; Nadtoka et al., 2025b; Kotyk et al. 2026a) – у «Фізіологічному журналі» (українське фахове наукове видання, проіндексоване у Scopus, Q4 за SJR 2024), 1 стаття (Nadtoka et al., 2026) – у журналі «Neurophysiology» (українське фахове наукове видання, проіндексоване у Web of Science та Scopus, Q4 за SJR 2024), 1 стаття (Kotyk et al., 2026b) – у журналі «Acta Neurobiologiae Experimentalis» (закордонне фахове наукове видання, проіндексоване у Web of Science та Scopus, Q3 за SJR 2024) а також у 10 тезах доповідей на конференціях.

Структура та обсяг дисертації

Дисертаційна робота складається із анотації, змісту, переліку умовних позначень, вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, результатів, обговорення, висновків та списку використаної літератури, що включає 165 джерел. Загальний обсяг дисертації становить 171 сторінку, з яких 130 сторінок становить основна частина, до якої входить вступ, 4 розділи дисертації та висновки. Результати систематизовані у 5-ти таблицях, кількість рисунків у роботі становить 46, з яких 36 відображають безпосередні результати проведених досліджень.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Будова та функції ядерної мембрани

Ядерна оболонка, будова якої наведена на Рисунку 1.1, складається із двох фосfolіпідних шарів: внутрішньої та зовнішньої ядерних мембран (INM та ONM відповідно). Обидва шари ядерної оболонки відокремлені одна від одної перинуклеарним простором, і відстань між цими мембранами становить 30-50 нм (Agrawal & Lele, 2020). Крім зв'язку з ендоплазматичним ретикуломом, люмен якого переходить у перинуклеарний простір, ядерна мембрана утворює інвагінації всередину ядра, які формують нуклеоплазматичний ретикулум. Роль останнього є маловивченою, але припускається, що він бере участь у кальцієвому сигналінгу та експорті мРНК.

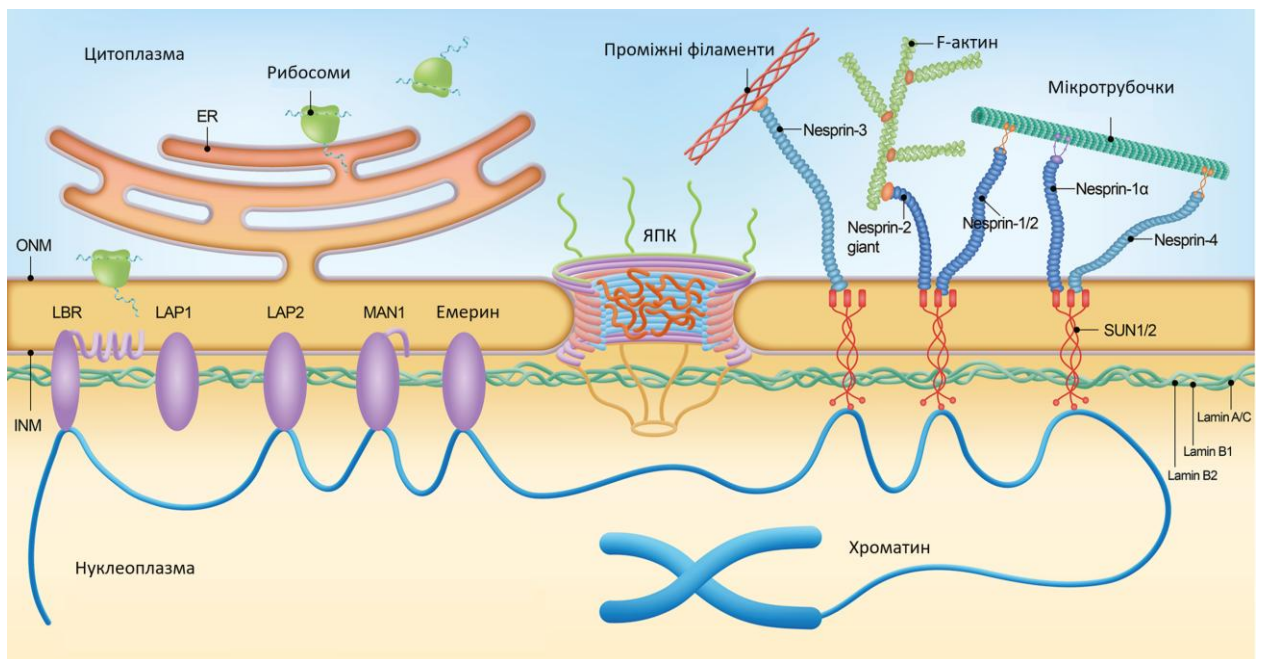


Рис. 1.1. Схематичне зображення будови ядерної мембрани. Зовнішня ядерна мембрана пов'язана з цитоскелетом за допомогою білків Nesprin, а внутрішня – з ядерною ламіною за допомогою SUN-білків, які разом утворюють LINC-комплекс. За (Wu et al., 2025) зі змінами.

За фізичними властивостями оболонка ядра є більш плинною та еластичною, порівняно з плазматичною мембраною. Загалом до функцій ядерної мембрани належить відокремлення вмісту ядра від цитоплазми, регуляція експресії генів, реплікації ДНК та організації хроматину (Hamroelz & Vaumbach, 2023). У багатьох еукаріотів (наприклад, у *Drosophila*) під час мітотичного поділу ядерна мембрана дисоціює, а потім збирається заново після закінчення цього процесу. Водночас дріжджовим клітинам (*Schizosaccharomyces*) притаманний так званий закритий мітоз, при якому мембрана ядра не руйнується, але зазнає локальних перебудов (Dey et al., 2020; Roubinet et al., 2021). Однак, навіть під час відкритого мітозу ядерна оболонка зазвичай не зникає повністю, і її залишки продовжують взаємодіяти з мітотичним веретенном (Dey & Baum, 2021).

Під ядерною мембраною знаходиться ядерна ламіна, яка складається з ламінів А- та В-типів. До ламінів А-типу належать ламіни А та С, а до ламінів В-типу ламіни В1 та В2 (Burla et al., 2020). Загалом ламіни С-типу є продуктом альтернативного сплайсингу того ж гена, який кодує ламіни А, а саме LMNA. На підставі гомології послідовностей всі ядерні ламіни відносять до проміжних філаментів V типу. У їх структурі виділяють утворену 4-ма α -спіральними субдоменами центральну спіраль. Ця центральна спіраль фланкована N- та C-термінальними доменами, у складі яких містяться ламін-специфічні послідовності. Функціонально ламіни забезпечують заякорювання ядерних порових комплексів, описаних у наступному підрозділі, підтримання форми і розмірів ядра, а також беруть участь в організації хроматину (Vahabikashi et al., 2022).

INM взаємодіє з хроматином та ядерною ламіною та містить такі білки, як Емерин, MAN1, Ламін В рецептор (LBR) та Ламін-асоційовані поліпептиди 1 та 2 (LAP1 та LAP2). Емерин, окрім зв'язку з хроматином, також взаємодіє із ламінами А/С, що є критично важливим для підтримки ядерної архітектури і стабільності (Wu et al., 2025). Також емерин відіграє роль у правильному формуванні ядра після мітозу (Dubińska-Magiera et al., 2019).

Ламін-асоційованим поліпептидам 2 (LAP2), типовим у складі внутрішньої ядерної мембрани, притаманна наявність так званих LEM-доменів (назва походить від LAP2, Emerin, MAN1), якими вони зв'язуються із BAF-білками (Barrier to Autointegration Factor), а ті, в свою чергу, із гістонами. До цих білків належать, наприклад, LAP2 β та LAP2 α . LAP2 β зв'язує та секвеструє гістон деацетилазу 3 (HDAC3), та забезпечує підтримку гетерохроматину деацетилюванням лізинів на хвостах гістонів. LAP2 α трансмембранних доменів не містить, але впливає на локалізацію ламінів A та може послаблювати їх взаємодії з еухроматином та гетерохроматином (Alagna et al., 2023; Filipczak et al., 2024). Ламін-асоційовані поліпептиди 1 (LAP1) складаються із N-термінального домену, який зв'язується із емерином та ламінами A- і B-типів, трансмембранного сегменту та перинуклеарного C-кінцевого домену. Функціональна роль LAP1 наразі не є повністю зрозумілою, однак була запропонована його участь у перебудовах ядра під час сперміогенезу та позиціонуванні ламінів і хроматину (Pereira et al., 2019). Участь в організації хроматину бере також і LBR (Lamin B receptor), N-кінцеві терміналі якого взаємодіють із гістонами HP1 через хромодомени та безпосередньо з хроматином через Тюдор домени (Dubińska-Magiera et al., 2019).

Зовнішня ядерна мембрана є продовженням мембрани ендоплазматичного ретикулуму і містить рибосоми з цитоплазматичного боку. У складі ONM виявляють білки Nesprin, яким притаманна наявність KASH-доменів (від «Klarsicht/ANC-1/Syne-1 homology»). Описано, що білки Nesprin-1 та Nesprin-2 мають у своєму складі N-термінальні актин-зв'язувальні домени, які залучені до регуляції форми ядра. Nesprin є компонентами LINC-комплексу (від «Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton»), який забезпечує безпосередній зв'язок між структурами цитоскелету, такими, як мікротрубочки і проміжні філаменти, та ядерною ламіною. Крім них, до складу цього комплексу входять SUN-домени білки внутрішньої ядерної

мембрани, назва яких походить від «Sad1, UNC-84» і до них належать, наприклад, SUN1 та SUN2 (Manda et al., 2023; Wu et al., 2025).

1.2 Ядерно-поровий комплекс

Крім структурних білків, ядерну мембрану пронизують величезні і складні білкові комплекси, що називаються комплексами ядерної пори (ЯПК), показані на Рисунку 1.2. Кожен такий комплекс має октагональну симетрію та висоту 800 Å. У людей зовнішній діаметр комплексу становить 1200 Å, внутрішній близько 425 Å, а молекулярна маса ЯПК становить близько 110 МДа. Для порівняння, у *S. cerevisiae* ЯПК мають подібні розміри, але меншу молекулярну масу, 52 МДа (Lin & Hoelz, 2019).

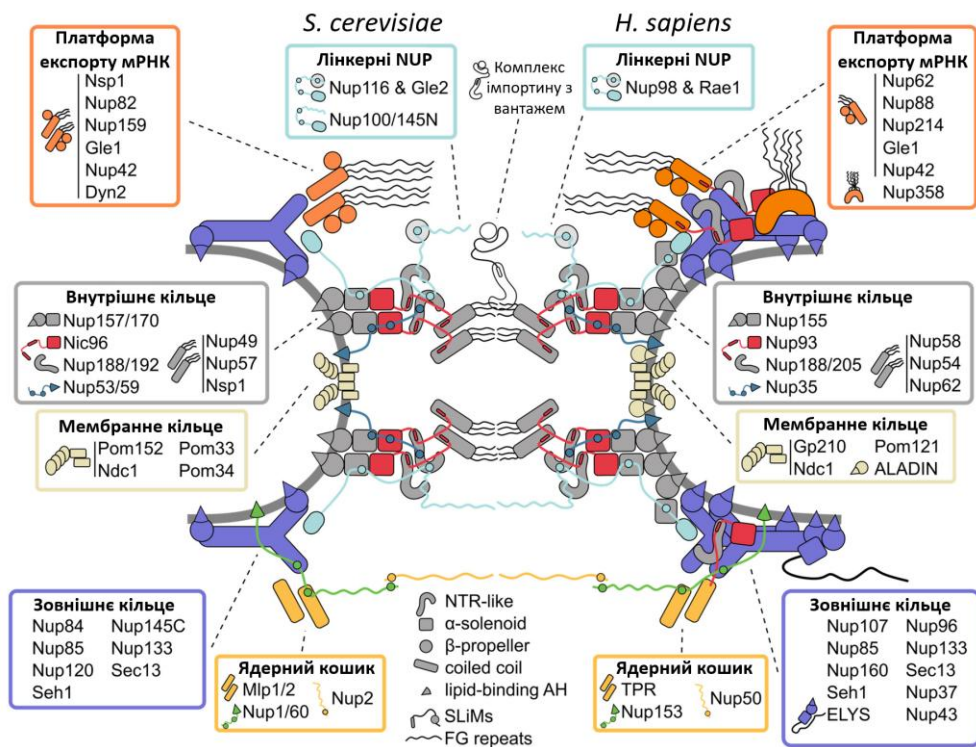


Рис. 1.2. Будова ядерно-порового комплексу клітин дріжджів (*S. cerevisiae*) та людини (*H. sapiens*). За (Dultz et al., 2022).

Ці комплекси складаються із близько 30 типів специфічних білків, що називаються нуклеопоринами (Nup). Загалом один комплекс ядерної пори

утворений із ~500 нуклеопоринів (внаслідок багатокопійності певних типів нуклеопоринів), а кількість самих комплексів ядерної пори на клітину становить близько 3000 (клітини HeLa) (Kabachinski & Schwartz, 2015). Згідно із сучасними даними, отриманими за допомогою кріо-електротомографічних досліджень, у структурі ЯПК виокремлюють симетричну корову частину, яка поділяється на внутрішнє кільце, занурене у мембрану, та два зовнішні по обидві її сторони. Корова частина оточує центральний канал і слугує скафолдом, до якого кріпляться несиметричні нуклеопорини, формуючи таким чином із цитоплазматичного боку цитоплазматичні філаменти та із нуклеоплазматичного боку ядерний кошик (Lin & Hoelz, 2019).

Центральний канал, що проходить крізь кільця кору, вистелений великою кількістю гідрофобних поліпептидів. Такі властивості цих пептидів зумовлені наявністю у їх складі FG (фенілаланін-гліцинових) повторів. Цей канал формує так званий бар'єр проникності, крізь який малі молекули до 40-50 кДа можуть проникати вільно, а більші 50 кДа можуть проникнути до ядра тільки за наявності спеціальної амінокислотної сигнальної послідовності NIS (nuclear import signal), які також називають NLS (nuclear localization signal). Експорт із ядра потребує, відповідно, сигнальної послідовності NES (nuclear export signal) (Mimura & Imamoto, 2016; Rush et al., 2023). Класичні NLS бувають монопартитами із консенсусною послідовністю K-(K/R)-X-(K/R), а також біпартитами, тобто складатися із двох мотивів, розділених варіабельним спейсером, як це є у NLS нуклеоплазміну із консенсусною послідовністю (K/R)_{X₁₀₋₁₂}(K/R)_{3/5}. Що ж до NES, для них консенсусом є (L/I/V/F/M)-X₂₋₃-(L/I/V/F/M)-X-(L/I/V/F/M). Класичними вважаються лейцин-насичені NES, що розпізнаються експортином-1 (Paci et al., 2021).

Комплекси імпорту та експорту формуються за рахунок зв'язування NIS та NES із NTR – рецептором ядерного транспорту. Серед NTR найбільшою родиною є родина β-каріоферинів (Кар) які характеризуються наявністю N-термінального Ran-зв'язувального мотиву та наявністю багатьох (19-24) HEAT-мотивів, що формують суперспіральну архітектуру. Серед 20

виявлених у людських клітинах каріоферинів, 10 належать до імпортинів та беруть участь у імпорті молекул до ядра, 5 – до експортинів, які, відповідно, залучені до експорту із ядра, 3 – до біпортинів, що можуть забезпечувати транспорт в обох напрямках, тоді як функціональна роль ще 2 каріоферинів поки що невідома. Згаданий вище Ran-зв'язувальний мотив важливий для приєднання до імпортинів у ядрі ГТФ-зв'язаної форми ГТФ-ази Ran. За принципом конкурентної взаємодії приєднання даного білка призводить до від'єднання від імпортину вантажу, що переноситься, та є етапом підготовки до нового транспортного циклу (Paci et al., 2021; Wing et al., 2022).

Одним із найвивченіших імпортинів є імпортин- β 1, який переносить до ядра NF- κ B субодиницю p65, транскрипційний фактор автофагії TFEB і ліганд програмованої клітинної смерті PD-L1 та ряд інших молекул, які відіграють роль у регуляції експресії, а також репарації і синтезі ДНК. При здійсненні транспортної функції імпортин- β 1 може рекрутувати адапторний білок імпортин- α , який і утворює безпосередні зв'язки з вантажем та розширює діапазон білків, які можуть транспортуватись, будучи при цьому приєднаним до імпортину- β 1 N-кінцевим доменом. Але деякі молекули можуть розпізнаватися і транспортуватися імпортином- β 1 і без адапторів, до таких, наприклад, належить транскрипційний фактор метаболізму холестеролу SREBP-2 (Yang et al., 2023).

Загалом при канонічному шляху транспортування вантажів із сигналом ядерної локалізації або сигналом ядерного експорту першим кроком є формування комплексу імпортин- β -імпортин- α -NLS-вантаж у цитоплазмі, або ж при експорті з ядра комплексу CRM1-ГТФ-Ran-NES-вантаж, де CRM1 - це білок «chromosomal region maintenance 1», також відомий як експортин-1. Далі вказані комплекси проникають крізь ЯПК та дисоціюють. Комплекс із експортином розпадається в цитоплазмі при гідролізі Ran-ГТФ до Ran-ГДФ, що здійснюється із залученням Ran-зв'язуючих білків (RanBP) та Ran-ГТФазо-активуючого білка (RanGAP); імпортин- β у нуклеоплазмі зв'язується із Ran-ГТФ, що спричиняє дисоціацію імпортувального комплексу, тоді як

імпортин- α зв'язується із другою молекулою Ran-ГТФ та експортином-2, що призводить до дисоціації від комплексу вантажу (Paci et al., 2021; Vogel et al., 2023). Потрібно зазначити, що при визначенні напрямку ядерного транспорту відіграє роль асиметрична концентрація ГТФ і ГДФ у цитоплазмі та нуклеоплазмі. Так, комплекс Ran у цитозолі перебуває переважно у зв'язаному із ГДФ стані, завдяки активності згаданих RanBP та RanGAP, тоді як у нуклеоплазмі Ran є зв'язаним з ГТФ завдяки тому, що RCC1 (фактор обміну гуанінових нуклеотидів, що каталізує вивільнення ГДФ із наступним приєднанням ГТФ) також знаходиться у нуклеоплазмі і зв'язаний із хроматином. Каріоферини зв'язують вантаж при імпорті та Ran-ГТФ взаємовиключним чином, але при цьому приєднують вантаж експорту і Ran-ГТФ разом. Таким чином, зміна конфігурації комплексу при гідролізі Ran-ГТФ до Ran-ГДФ (у цитоплазмі) чи приєднанні Ran-ГТФ (у нуклеоплазмі) є важливою для вивільнення вантажу (Wing et al., 2022).

Також існує і неklasичний шлях транспортування білків крізь ядерну мембрану, який не вимагає наявності монопартитного чи біпартитного NLS. Ним транспортується, наприклад, білок hnRNPA1. Амінокислотна послідовність, що відповідає за перенесення, PY-NLS (Proline-Tyrosine NLS), як було показано, розпізнається імпортином- $\beta 2$, а не імпортином- α . Імпортин- $\beta 2$ належить до великої надродини імпортинів- β , яких налічується близько 20-ти типів і які переносять у ядро та із ядра велику кількість білків, серед яких є рибосомальні, вірусні та гістонові протеїни. Цим же шляхом можуть переноситися до ядра і мітоген-активовані протеїн-кінази (МАРК). За транспортування ERK відповідає імпортин- $\beta 7$, тоді як JNK і p38 для перенесення формують тримерний комплекс із імпортином- $\beta 7$ або імпортином- $\beta 9$ та імпортином- $\beta 3$ задля ядерної транслокації. Утворений комплекс таким чином виглядає як імпортин- $\beta 3$ -імпортин- $\beta 9$ -МАРК або імпортин- $\beta 3$ -імпортин- $\beta 7$ -МАРК (Lu et al., 2021).

1.3. Іонні канали внутрішньоклітинних органел

Добре дослідженими на сьогодні є іонні канали плазматичної мембрани, однак деякі канали було виявлено і у внутрішньоклітинних органелах, зокрема у мітохондріях, ендоплазматичному ретикулумі та ядрі. Серед останніх виокремлюють АТФ-чутливі K^+ -канали (K_{ATP}), калієві канали внутрішнього випрямлення (K_{ir}), хлорні канали (ClC та NCC), та Ca^{2+} -активовані K^+ -канали (Jang et al., 2015). Цікаво, що С-терміналь потенціал-залежних Ca^{2+} -каналів L-типу також може транслокуватися до ядра, де виконує функцію регулятора транскрипції (Gomez-Ospina et al., 2006). Раніше у ядерній мембрані було виявлено Ca^{2+} -провідний іонний канал, який може бути регульованим АТФ-зв'язувальним рецептором $P2X_7$ типу, який, активуючись АТФ цитоплазми, потенційно слугує зв'язуючою ланкою між клітинною активністю та змінами експресії генів, з урахуванням залученості Ca^{2+} до регуляції транскрипційної активності (Atkinson et al., 2002). Крім цього, у ядрах ракових клітин MCF7, A549, та SNU-484, а також у тканинах людського мозку методом вестерн блот аналізу було виявлено потенціал-залежні K^+ -канали 1.3 ($K_v1.3$). Також ці канали були описані у плазматичній та мітохондріальній мембранах, і у ядерній фракції Т-клітин Jurkat. Роль ядерних K_v -каналів може полягати у регуляції клітинної проліферації та апоптозу ракових клітин, крім цього іонні канали ядерної мембрани можуть забезпечувати підтримання різниці потенціалів між нуклеоплазмою та цитоплазмою (Jang et al., 2015; Maliszewska-Olejniczak & Bednarczyk, 2024). Згідно з класичними дослідженнями, ця різниця становить -10 мВ в ізольованих пронуклеусах мишей (Mazzanti et al., 1990), тоді як одні з найбільших значень потенціалу ядерної мембрани (-44 мВ) були виявлені при дослідженні клітин HeLa (Giulian & Diacumakos, 1977). Водночас, ядерна мембрана овоцитів амфібій практично не мала заряду (Kanno & Loewenstein, 1963).

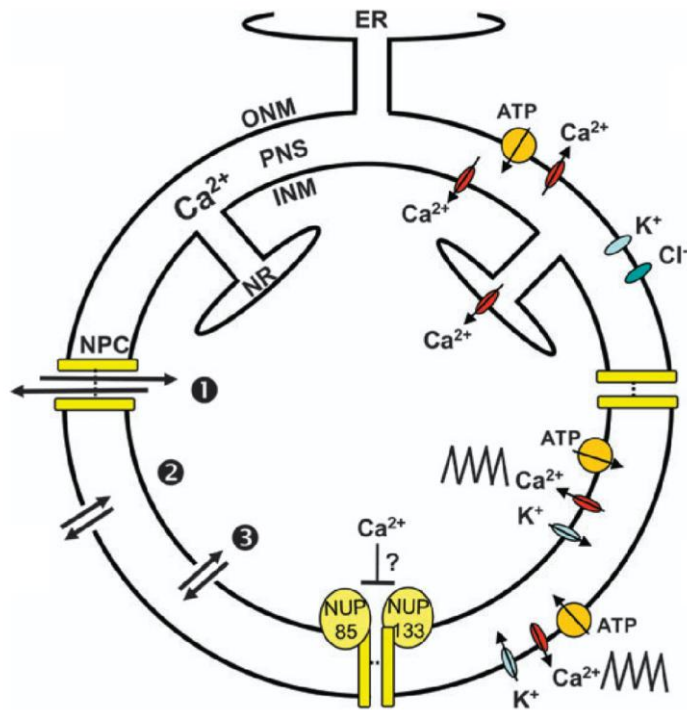


Рис. 1.3. Іонні канали ядерної мембрани (Matzke et al., 2010). ONM – зовнішня ядерна мембрана, INM – внутрішня ядерна мембрана, PNS – перинуклеарний простір, NPC – ядерний поровий комплекс, ER – ендоплазматичний ретикулум, NR – нуклеоплазматичний ретикулум. Числами позначено три шляхи іонного транспорту: 1 – крізь NPC, 2 – через ONM, 3 – через INM.

Схематична репрезентація розподілу іонних каналів на ядерній мембрані представлена на Рисунку 1.3. Ґрунтовну роботу з вивчення іонних каналів ядерної мембрани було проведено Fedorenko та співавторами (Fedorenko & Marchenko, 2014). Згідно з їхніми дослідженнями, проведеними на нейронах зубчасної звивини та CA1 і CA3 зонах гіпокампу, у внутрішній та зовнішній ядерних мембранах пірамідних нейронів CA1 локалізуються катіонні канали з провідністю 248 ± 6 пСм, селективні до моновалентних катіонів. Розподіл цих каналів між мембранами є нерівномірним: так, 37% петчів INM містили K^+ канали із зазначеними параметрами, тоді як на ONM їх було виявлено менш ніж у 2% петчів. Також цими авторами було описано Cl^- канали з провідністю 156 ± 4 пСм, які розташовувалися виключно на зовнішній ядерній мембрані.

Крім цього, у CA1 зоні гіпокампа, переважно на внутрішній мембрані, було виявлено Ca^{2+} канали з провідністю 366 ± 5 пСм, які ідентифіковано як інозитол-трифосфатні рецептори (IP_3Rs), детальніше описані далі. Водночас агоністи ріанодинових рецепторів (RyRs) цАДФ рибоза та ріанодин не призводили до активації іонних каналів на зовнішній чи внутрішній ядерних мембранах, попри попередні дослідження про експресію RyRs у пірамідних нейронах CA1 (Hertle & Yeckel, 2007).

У ядерній мембрані пірамідних нейронів CA3 зони було описано K^+ канали з провідністю 210 ± 6 пСм, а у гранулярних нейронах зубчастої звивини – Ca^{2+} канали з провідністю 378 ± 11 пСм у внутрішній ядерній мембрані, та один канал з провідністю 719 пСм на зовнішній ядерній мембрані, що відповідає IP_3Rs та RyRs . Крім цього, на внутрішній ядерній мембрані Fedorenko і Marchenko було виявлено спонтанно активний Cl^- канал з двома станами провідності, 80 ± 8 пСм та 163 ± 9 пСм, який нагадував двопорові Cl^- канали. Також наявні дані про реєстрацію на зовнішній ядерній мембрані гранулярних нейронів Cl^- каналів з провідністю 305 ± 16 пСм, та катіонних каналів на внутрішній ядерній мембрані з провідністю 179 ± 15 пСм, які за патерном активності, повільною кінетикою та потенціал-залежністю нагадували високопровідні катіонні канали пірамідних нейронів CA1 зони (Fedorenko & Marchenko, 2014).

Згадані вище IP_3Rs та RyRs є основними каналами, крізь які відбувається вивільнення Ca^{2+} у цитозоль з перинуклеарного простору, а також – одними з найбільших іонних каналів із наразі досліджених. Так, молекулярна маса RyRs становить близько 2,2 МДа, а IP_3Rs – 1,2 МДа. Ці рецептори мають схожу архітектуру та є тетрамерами, тобто складаються із 4 субодиниць. RyRs та IP_3Rs можуть бути гомотетрамерами і формуватися з однакових субодиниць, IP_3R також бувають гетеротетрамерами, складаючись із різних субодиниць. Кодування субодиниць у кожній із родин здійснюється 3-ма генами: RYR1 , RYR2 , RYR3 для ріанодинових рецепторів та ITPR1 , ITPR2 і ITPR3 для інозитол-трифосфатних рецепторів. RyRs є у невеликій кількості у всіх

тканинах, але переважно присутні у міоцитах і нейронах, тоді як IP_3Rs експресуються у клітинах усіх типів. З-поміж ріанодинових рецепторів, які поділяють на $RyR1$, $RyR2$ та $RyR3$, $RyR1$ експресуються у скелетних м'язах і активуються взаємодією з потенціал-залежними Ca^{2+} каналами L-типу, тоді як $RyR2$, що експресуються в серці, та $RyR3$ активуються безпосередньо іонами кальцію. IP_3Rs , в свою чергу, активуються інозитол-трифосфатом, який утворюється під час гідролізу фосфоінозитол-дифосфату фосфоліпазою C, і далі можуть модулюватися фосфорилуванням/ дефосфорилуванням, регуляторними білками та іонами кальцію (Mekahli et al., 2011; Woll & Van Petegem, 2022). Після вивільнення Ca^{2+} , повернення його назад до перинуклеарного простору може здійснюватися через Ca^{2+} -АТФази, тоді як проникність ядерного порового комплексу до Ca^{2+} регулюють, гіпотетично, NUP85 та NUP133 (Matzke et al., 2010).

Cl^- канали, описані в дослідженнях Fedorenko на внутрішній ядерній мембрані гранулярних нейронів зубчастої звивини (Fedorenko & Marchenko, 2014), були відкриті у 1990 роках та виконують функцію потенціал-залежних Cl^- каналів або Cl^-/H^+ обмінників. Вони локалізуються як у плазматичній мембрані, та і у внутрішньоклітинних мембранах (Poroca et al., 2017). Загалом виокремлюють два типи їх активності: повільний ворітний механізм дії та швидкий ворітний (у літературі - “slow gating” та “fast gating mechanisms” відповідно), останній з яких наразі є більш вивченим. Згідно з гіпотезою, описаною Bisset та співавторами (Bisset et al., 2005), власне воротами слугує бічний ланцюг залишку Glu-148. Коли цей залишок зміщений до зовнішньоклітинного вестибюля пори, він запобігає проникненню іонів Cl^- за принципом електростатичного відштовхування, тоді як у центральному положенні бічний ланцюг не заважає такому проникненню, і є притисненим до бічної сторони пори іонами Cl^- . Тими ж авторами було припущено, що ці іони підтримують канал у відкритому стані, заштовхуючи цей бічний ланцюг всередину, і можуть спричинити відкриття каналу із закритого стану. Підтримання ж закритого стану може забезпечуватися виштовхуванням

бічного ланцюга Glu-148 іонами Cl^- зсередини клітини. Протонування ланцюга, яке може спостерігатися за умов підвищення кислотності середовища і, відповідно, збільшення кількості протонів H^+ , прибирає електростатичний бар'єр і також спричиняє відкриття даних каналів (Bisset et al., 2005). Структурно ClC формують димери, при цьому кожен з мономерів у даному комплексі здатен до незалежного проведення іонів. Із 9-ти типів ClC білків, що зустрічаються у клітинах ссавців (ClC-1 – ClC-7, ClC-Ka, ClC-Kb), 4 містять β -субодиницю, але лише у трьох із них, а саме у ClC-7, ClC-Ka, та ClC-Kb, вона є необхідною для нормального функціонування каналу, тоді як у ClC-2 вона лише змінює його ворітні властивості. (Jentsch & Pusch, 2018; Poroca et al., 2017).

Розглядаючи іонні канали внутрішньоклітинних органел, згадки заслуговують також іонні канали мітохондрій, до яких належать потенціал-залежні аніонні канали зовнішньої мітохондріальної мембрани (VDAC – voltage dependent anion channels), а також кальцій-проникні (MCUC – mitochondrial calcium uniporter complex), калієві та аніон-селективні канали внутрішньої мембрани (IMAC – membrane anion channel; CLIC – chloride intracellular channel). Калієві канали мітохондрій в свою чергу підрозділяються на АТФ-регульовані (mitoK_{АТФ}), кальцій-активовані (mitoBK_{Ca}) та потенціал-залежні (mitoK_v1.3, mitoK_v1.5, mitoK_v7.4). Крім цих каналів, у мітохондрії виділяють так званий мітохондріальний мегаканал (MMC – mitochondrial megachannel), він же – РТР (permeability transition pore) (Szabo & Szewczyk, 2023). Деякі з вищевказаних каналів будуть описані далі.

Одними з перших досліджуваних іонних каналів у мітохондріях були потенціал-залежні аніонні канали (VDAC), іноді також описувані як порини. Їх провідність у середовищі із симетричним розчином 1 моль/л KCl з обох сторін біліпідного шару становить 4-5 нС, а аніонна селективність цих каналів є низькою. Цікаво, що VDAC потенційно мають сайт зв'язування для Ca^{2+} , і також здатні проводити цей іон. Ці канали беруть участь у активації інфламасомного комплексу NLRP3, а також у запуску апоптозу шляхом

зв'язування із білками родини Vcl2 (BAX та BAK), при цьому розмір пори VDAC збільшується, що призводить до вивільнення цитохрому c. Крім цього було показано, що одна з трьох ізоформ цього білка, VDAC1, надекспресується у ракових клітинах, а сайленсинг такої експресії інгібує прогресію раку (Ponnalagu & Singh, 2020).

Серед білків мітохондріальної мембрани виокремлюють також хлоридні внутрішньоклітинні канали (CLIC), до родини яких належить шість висококонсервативних білків. CLIC4 локалізується у різних компартментах клітини і з урахуванням цього має широкий спектр функцій, у контексті ж мітохондрій припускається, що він відіграє роль антиоксиданта на підставі нещодавнього виявлення *in vitro* його здатності до глутаредоксин-подібної активності. Було встановлено, що видалення CLIC4 із клітин бDT1 мишей (ракові клітини грудей) призводить до накопичення реактивних форм кисню (ROS) і підвищення чутливості цих клітин до ROS-індукуючого агента H₂O₂ (Al Khamisi et al., 2022). На відміну від CLIC4, локалізованого переважно на зовнішній мітохондріальній мембрані, CLIC5 локалізований на внутрішній, і загалом був першим вивченим на молекулярному рівні хлорним каналом внутрішньої мембрани мітохондрій. Він бере участь у регуляції ROS і, подібно до CLIC4, був виявлений у кардіоміоцитах (Gururaja Rao et al., 2020; Ponnalagu et al., 2016).

Наступним мембранним білком є мітохондріальний кальцієвий уніпортерний комплекс (mitochondrial calcium uniporter complex – MCUC), який важливий для швидкого захоплення Ca²⁺ у матрикс. Першим ідентифікованим представником цієї родини був MICU1, EF-hand білок, пороформуючою частиною якого є coiled-coiled домен CCDC109A. De Stefani та співавторами встановлено, що даний комплекс за відсутності іонів кальцію здатен пропускати натрій, його провідність до Ca²⁺ становить 6-7 пСм (за негативних значень потенціалу мембрани), і він характеризується швидкою кінетикою, низькою ймовірністю перебування у відкритому стані (P_o) за низького значення напруги а також зростанням цієї ймовірності із

підвищенням мембранного потенціалу. Також цією ж групою вчених було ідентифіковано ключові амінокислотні залишки глутамату в поровій ділянці (Szabo & Szewczyk, 2023; De Stefani et al., 2011).

Заслуговують на увагу також білки mPTP (Mitochondrial Permeability Transition Pore), який також відомі як ММС (див. вище), що характеризуються кондуктивністю 1,3 нСм у 150 ммоль/л KCl, неселективністю, чутливістю до циклоспорину-А та здатністю до активації іонами Ca^{2+} (Szabo & Szewczyk, 2023). Ці канали є великими та неспецифічними, і крізь них можуть проходити речовини розміром аж до 1,5 кДа, що дозволяє припустити діаметр пори близько 3 нм. mPTP формується в умовах оксидативного стресу чи мітохондріального Ca^{2+} перенавантаження, та призводить до вивільнення із мітохондрій великої кількості Ca^{2+} та проапоптичних білків, що в результаті призводить до клітинної загибелі (O-Uchi et al., 2014).

Калієві канали мітохондрій пов'язані із енергетичним метаболізмом, автофагією та нейрональним апоптозом. Одними із представників потенціал-залежних калієвих каналів є $\text{K}_v7.4$, які, як було показано, регулюють проникність до K^+ у мітохондріях серцевого м'язу та мають кардіопротективний ефект. Крім цього, у ізольованих нейрональних мітохондріях $\text{K}_v7.4$ регулюють мембранний потенціал та зворотне захоплення Ca^{2+} , як було встановлено фармакологічними дослідженнями, а також значення цього потенціалу і продукцію ROS у інтактних кортикальних нейронах (Paventi et al., 2022).

1.4. Тканиноспецифічність іонних каналів

Загалом калієві канали поділяються на 3 основні класи за структурою та функціями, а саме потенціал-залежні (K_v), що містять 6 трансмембранних спіралей (далі – ТМ), тандем-порові доменні канали (K_{2p} , 4 ТМ) та канали внутрішнього випрямлення (K_{ir} , 2 ТМ). Крім них також виділяють ліганд-

залежні калієві канали (K_{ligand}), які взаємодіють з різноманітними клітинними месенджерами та містять або 2, або 6 ТМ (Kuang et al., 2015).

Потенціал-залежні K^+ канали (K_v) є найбільшим класом серед зазначених, та відповідають за повернення деполяризованої клітини до вихідного стану після потенціалу дії. Частина представників K_v каналів регулює нейрональну збудливість, тоді як інші впливають на тривалість потенціалу дії у серцевому м'язі або залучені до процесів клітинної проліферації та розвитку раку. Крім цього, аномальне функціонування потенціал-залежних K^+ каналів може бути частиною патогенетичних механізмів хвороби Альцгеймера, Паркінсона, епілепсії та шизофренії (Urrutia et al., 2024). З-поміж 40-ка типів K_v каналів, принаймні 26 експресується у нейронах. За деякими винятками (K_v3), ці канали локалізуються або в дендритах або в аксонах, але не в обох одночасно. Так, K_v1 виявляють майже виключно на аксонах нейронів, зокрема на початковому сегменті аксона, як і K_v7 , а також на периферії перехватів Ранв'є та у нервових терміналях, тоді як експресія K_v4 обмежена дендритами, при цьому кількість цих каналів збільшується із наближенням до дистального кінця дендритів (Jensen et al., 2011).

K^+ канали внутрішнього випрямлення (K_{ir}) характеризуються великою різноманітністю функцій залежно від їх локалізації та типу, і поділяються на 7 підродин ($K_{\text{ir}}1 - K_{\text{ir}}7$), які об'єднують у групи класичних K_{ir} каналів, що активуються фосфатидилінозитол-дифосфатом ($K_{\text{ir}}2$), G білок-зв'язаних K_{ir} каналів ($K_{\text{ir}}3$), АТФ-чутливих ($K_{\text{ir}}6$) та калій-транспортних K_{ir} каналів ($K_{\text{ir}}1$, $K_{\text{ir}}4$, $K_{\text{ir}}5$, $K_{\text{ir}}7$). Особливістю K_{ir} каналів є те, що їх провідність до іонів K^+ підвищується при гіперполяризації і знижується при деполяризації, оскільки в останньому випадку вони блокуються внутрішньоклітинними іонами Mg^{2+} та поліамінами. Ці канали локалізуються в нейронах стовбура мозку, зокрема, у блакитній плямі та парабрахіальному ядрі, фолікулярних клітинах щитовидної залози і епітеліальних клітинах проксимальних каналців нирок, а також у панкреатичних β -клітинах, де вони контролюють секрецію інсуліну (Kuang et al., 2015; Zhang & Guo, 2023).

Тандем-порові K^+ канали (K_{2p}) поширені як у збудливих, так і в незбудливих тканинах. Їх особливістю є те, що вони перебувають у конститутивно відкритому стані і відповідають за утворення мембранного потенціалу спокою. У будові цих каналів виокремлюють 2 поро-формуєчі домени та 4 ТМ. Їх цікавим представником є $K_{2p4.1}$, також відомий як TRAAK (TWIK-related arachidonic acid activated K^+ channel), що експресується винятково у головному мозку, спинному мозку та сітківці миші. TRAAK каналам приписують нейропротективні властивості у зв'язку з тим, що вони стимулюються ненасиченими жирними кислотами, які мають антиконвульсивні та антиішемічні ефекти. Зокрема було виявлено, що експресію TRAAK стимулює нейропротективний препарат рілузол (Kuang et al., 2015; Fink, 1998).

Ліганд-керовані K^+ канали ВКСа, що мають ядерну локалізацію у ендотеліальних клітинах, функціонально пов'язані з перинуклеарними рецепторами простагландину EP3 і регулюють потенціал ядерної мембрани та експресію ендотеліальної NO-синтази. Крім цього, ВКСа також було виявлено у мітохондріях мозку та серця, де вони задіяні у зниженні продукції реактивних форм кисню, а також на зовнішній ядерній мембрані панкреатичних ацинарних клітин щурів. Припускається, що подібно до таких каналів на плазматичній мембрані, внутрішньоклітинні ВКСа працюють як сенсори Ca^{2+} для внутрішньоклітинних органел. Окрім чотирьох сайтів зв'язування цих іонів, ВКСа також мають чотири сенсори напруги і можуть бути активовані при деполяризації мембрани (Guntur et al., 2021).

Хлорні канали, механізми функціонування яких було описано попередньо, впливають на збудливість скелетних, серцевих та гладеньких м'язів, нейронів, а також залучені до трансепітеліального транспорту солей, регуляції клітинного об'єму, клітинного циклу, апоптозу і ацидифікації внутрішніх і зовнішніх компартментів клітини. І хоча наразі немає офіційних рекомендацій щодо класифікації цих каналів, загалом їх можна поділити на потенціал-чутливі ClC, кальцій-активовані, високо-кондуктивні (максі-

канали), об'єм-регульовані та регулятори трансмембранної провідності при цистичному фіброзі (CFTR – від англ «cystic fibrosis transmembrane conductance regulator»). У ссавців виокремлюють 9 типів ClC каналів (від ClC-1 до ClC-7, а також hClC-Ka (rClC-K1) і hClC-Kb (rClC-K2)) (Alexander et al., 2011). Із них ClC-1, ClC-2 і два ClC-K канали локалізуються на плазматичній мембрані, а всі інші - переважно у мембранах внутрішньоклітинних органел (Jentsch & Pusch, 2018). ClC-1 присутні виключно у скелетних м'язах (Conte et al., 2020), ClC-2 виявляють на базолатеральній поверхні епітеліальних клітин дванадцятипалої і товстої кишки мишей, цитозолі клітин людської товстої кишки (Jin & Blikslager, 2015), у MDCK клітинах (від англ «Madin-Darby canine kidney cells»), а також у ретинальному пігментному епітелії, де вони є критично необхідними для виживання зовнішньої частини сітківки (Hanke-Gogokhia et al., 2021). За тканинною локалізацією, ClC-3 виявляють у мозку, надниркових залозах, підшлунковій залозі, сітківці, печінці, скелетних м'язах і серці. Цей канал переважно локалізується у ендосомах, разом із ClC-4 та ClC-5, та був виявлений у синаптичних везикулах (Poroca et al., 2017). Високі рівні експресії ClC-3 каналу спостерігаються у гіпокампі та клітинах Пуркінє мозочка (Suzuki et al., 2006). Подібні патерни експресії спостерігаються і у ClC-4, їх виявляють у внутрішньоклітинних органелах скелетних м'язів, серця та мозку, а дисфункція цих каналів пов'язана із епілепсією та розумовою відсталістю (Guzman et al., 2017). ClC-5 виявляють у нирках, де він локалізується у клітинах проксимальних каналців та може брати участь в ендоцитозі (Sakhi et al., 2021). ClC-6 експресується переважно у нервовій системі, зокрема, у пізніх ендосомальних компартментах (Zhang et al., 2023), а ClC-7 відіграє ключову роль у підтриманні лізосомального гомеостазу остеокластів (Schrecker et al., 2020).

Кальцій-активовані хлорні канали (CaCC) беруть участь у таких фізіологічних процесах, як сенсорна трансдукція, епітеліальна секреція електролітів та води, регуляція тону судин та збудливості нервових та серцевих тканин (Yuan et al., 2023). Відкриття цих великих аніонних каналів

призводить до ефлюксу хлору та деполяризації мембрани, таким чином вони опосередковують підвищення збудливості та навіть генерацію потенціалу дії у відповідь на підвищення концентрації Ca^{2+} . Їх виявляють і у гладком'язовій тканині, як і об'єм-чутливі та CFTR хлоридні канали. У міометрії локалізуються виключно класичні Ca^{2+} -активовані та потенціал-чутливі хлорні канали, тоді як у фазичних і тонічних кровоносних судинах виявляють класичні та некласичні (сGMP-регульовані) CaCC, нечутливі до мембранного потенціалу (Wray et al., 2021).

Окремої згадки заслуговують Maxi-Cl канали, вони ж – висококондуктивні максі-аніонні канали. Їх назва зумовлена значеннями провідності у 300-400 пСм, крім цього, вони характеризуються лінійною вольт-амперною залежністю та значною аніон-катіонною селективністю. Пара цих каналів є широкою та асиметричною, її зовнішньоклітинний радіус становить 1,42 нм, а внутрішньоклітинний 1,16 нм. Крім іонів Cl^- , ці канали є проникними також і для деяких органічних аніонів, таких як АТФ та глутамат. Найвища ймовірність перебування Maxi-Cl каналів у відкритому стані спостерігається при мембранному потенціалі 0 мВ, а їх закриття реєструють при ± 20 мВ. Вони залучені до рідинної секреції, регуляції клітинного об'єму та процесів апоптозу, крім цього, завдяки певній проникності до нуклеотидів Maxi-Cl канали можуть брати участь у пуринергічній міжклітинній сигналізації. Вивільнення АТФ внаслідок активації цього типу каналів було підтверджено у клітинах фібросаркоми у відповідь на осмотичний шок, у нирках в клітинах щільної плями (лат. «*macula densa*») у відповідь на сольовий стрес, та у кардіоміоцитах у відповідь на ішемію і гіпоксію. Загалом Maxi-Cl канали є поширеними у багатьох тканинах і клітинах, включаючи також ендотелій, нейрони, гліальні клітини, лімфоцити та плаценту (Okada et al., 2021; Sabirov et al., 2021).

Потенціал-залежні Ca^{2+} канали (Ca_v) поділяються на 3 підродини залежно від пороформуючої субодиниці α_1 , а саме $\text{Ca}_v1.1$ - $\text{Ca}_v1.4$, $\text{Ca}_v2.1$ - $\text{Ca}_v2.3$, $\text{Ca}_v3.1$ - $\text{Ca}_v3.3$. Оскільки іонні канали перших двох підродин (Ca_v1 та Ca_v2)

активуються при вищих значеннях мембранного потенціалу, їх об'єднують терміном HVA (англ. «high-voltage activated») канали, тоді як Ca_v3 активуються при деполяризації, що лише незначною мірою перевищує потенціал спокою, та іноді потребують попередньої гіперполяризації мембрани (Yao et al., 2024). Ca_v1 також називають каналами L-типу, вони кодуються генами *CACNA1S*, -C, -D та -F; Ca_v2 поділяють на P/Q-, N- та R-типи, що відповідають $Ca_v2.1$, $Ca_v2.2$ і $Ca_v2.3$ та кодуються генами *CACNA1A*, -B та -E; Ca_v3 , які також позначають як канали T-типу, є кодовані *CACNA1G*, -H та -I (Dolphin, 2016). Канали L-типу, зокрема $Ca_v1.1$ та $Ca_v1.2$ поширені переважно у м'язовій тканині, а саме у т-каналцях скелетних м'язів ($Ca_v1.1$), кардіоміоцитах передсердь та гладком'язових клітинах ($Ca_v1.2$). $Ca_v1.3$ та $Ca_v1.4$ мають більш специфічний розподіл, так, $Ca_v1.3$ зустрічаються у синоатріальному вузлі, атріовентрикулярному вузлі та в альдостерон-секретуючих клітинах надниркових залоз, а $Ca_v1.4$ – у клітинах сітківки (Dolphin, 2016; Zaveri et al., 2023). На відміну від IP_3R та RyR , які характеризуються високою провідністю і низькою афінністю до Ca^{2+} , канали L-типу мають відносно низьку провідність і високу афінність до цих іонів (Gillespie & Fill, 2008). P/Q-, N- та R-канали нейронів є ключовими каналами у синаптичній передачі, тоді як T-канали регулюють коливання мембранного потенціалу та пейсмейкерну активність збудливих клітин (Mueller et al., 2023). Альтернативна назва $Ca_v2.1$ (P/Q) каналів також відображає особливості їх розподілу, і походить від нейронів Пуркінє мозочка та гранулярних клітин, де вони були вперше описані, тоді як назва каналів N-типу ($Ca_v2.2$) є скороченням від «нейрональні», R ($Ca_v2.3$) – від «фармакорезистентні», а T (Ca_v3) – від «транзйентні» (Liu et al., 2025). Канали T-типу експресуються T-лімфоцитами, ооцитами, сперматозоїдами, ендокринними клітинами, остеобластами, міоцитами, адипоцитами та нейронами (Tomida et al., 2024).

1.5. Властивості LCC-каналів ядерної мембрани та гіпотеза про їх роль у вивільненні Ca^{2+}

Вивільнення іонів Ca^{2+} з ендоплазматичного та саркоплазматичного ретикулуму, опосередковане описаними у попередніх розділах інозитол-трифосфатними каналами та ріанодиновими рецепторами, може призводити до зміщення локального мембранного потенціалу ретикулуму до рівноважного потенціалу цих іонів. Однак, попри очікуване досягнення значень рівноважного потенціалу менш ніж за 1 мс, тривалість вивільнення Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо може становити більше 10 мс. Як механізм компенсації зміни заряду мембрани внаслідок руху іонів Ca^{2+} розглядається струм позитивно заряджених іонів у протилежному напрямку (Gillespie & Fill, 2008; Zsolnay et al., 2018).

Уявлення про необхідність існування такого току іонів для компенсації струму, спричиненого іонами Ca^{2+} , зумовило пошук каналів і механізмів, які його могли б забезпечувати. На роль таких каналів розглядалися саркоплазматичні K^+ канали (Picard et al., 2002), та самі ріанодинові рецептори (Gillespie & Fill, 2008). Саркоплазматичні K^+ канали пізніше було ідентифіковано не як один, а як два окремі TRIC (від англ. «trimeric intracellular cation») канали: TRIC-A та TRIC-B (Pitt et al., 2010). Однією з їх раніше відомих властивостей є дуже низька (< 3 пСм) провідність до іонів Цезію (Coronado et al., 1980), що було використано при дослідженні їх можливої ролі у забезпеченні компенсаторного струму K^+ . Ці дослідження показали, що заміна іонів K^+ у цитозолі на іони Na^+ та Cs^+ не призводить до зміни амплітуди чи швидкості вивільнення Ca^{2+} , що наводить на думку, що для забезпечення компенсаторного струму дані канали не є необхідними (Guo et al., 2013). Водночас результати, отримані іншою групою дослідників, свідчать про аномальність у локальних спонтанних активаціях ріанодинових рецепторів у гладком'язових клітинах артерій в нокаутних за TRIC-A мишей, та про порушення IP_3 -рецептор опосередкованого вивільнення Ca^{2+} і перевантаження

внутрішньоклітинних кальцієвих депо в епітеліальних клітинах дихальних шляхів у нокаутних за TRIC-B мишей (Zhou et al., 2014). З урахуванням відсутності впливу на вивільнення Ca^{2+} у випадку зниження провідності даних каналів заміною K^+ на Cs^+ , можна припустити, що хоч їх наявність і є необхідною для нормального функціонування системи вивільнення Ca^{2+} , ця роль здійснюється шляхом інших механізмів, наприклад, шляхом безпосередньої взаємодії TRIC із р'янодиновими рецепторами (Zhou et al., 2014) і/або за рахунок участі в зниженні концентрації K^+ в саркоплазматичному ретикулумі після його надходження туди внаслідок компенсаторного струму (Guo et al., 2013).

Таким чином, забезпечення компенсаторного струму може здійснюватися іншими каналами, на роль яких були запропоновані LCC-канали (від англ. «large-conductance cationic channels»), які також характеризуються здатністю проводити K^+ струм (Marchenko et al., 2005). Ці канали є одними з найпоширеніших спонтанно-активних каналів внутрішньої ядерної мембрани, зі щільністю розташування приблизно 7 каналів на mkm^2 , і серед їх властивостей можна зазначити повільну кінетику, високу ймовірність перебування у відкритому стані (особливо за позитивних значень мембранного потенціалу) та високу провідність, яка для іонів K^+ становить 198 ± 27 пСм у нейронах Пуркін'є мозочка (Fedorenko et al., 2010). Крім цього, LCC-канали здатні проводити іони Cs^+ , на відміну від TRIC-каналів, а також інші моновалентні катіони, такі як Na^+ , Rb^+ та Li^+ . Однак, вони є непроникними для двовалентних катіонів, таких як Ca^{2+} та Ba^{2+} (Fedorenko et al., 2010; Marchenko et al., 2005). З урахуванням цього, розглянута вище заміна K^+ на Cs^+ , хоч і є дієвим шляхом нівелювати чи суттєво знизити участь у компенсаторних струмах TRIC-каналів, не мала такого ж ефекту на LCC-канали, що може пояснювати описану (Guo et al., 2013) індіферентність локальних подій вивільнення Ca^{2+} , також відомих як кальцієві спалахи, до такої заміни.

Коли цими ж авторами було замінено іони K^+ на $Tris^+$, то швидкість кофеїн-індукованого вивільнення Ca^{2+} не зазнала значних змін, але спостерігалось збільшення пікових значень цього вивільнення, що вказувало на накопичення цих іонів у саркоплазматичному ретикулумі, а також зниження амплітуди та частоти Ca^{2+} спалахів. Було зроблено припущення, що замість K^+ у цьому випадку компенсаторну функцію на себе частково перебрали іони Mg^{2+} , які проходили крізь $RyR2$ (Guo et al., 2013). При цьому, відштовхуючись від гіпотези про забезпечення протитоку позитивно заряджених іонів LCC-каналами, іони Mg^{2+} навряд могли мати внесок у його формування, оскільки ці канали є селективними до моновалентних і не пропускають двовалентні катіони (Fedorenko & Marchenko, 2014), що пояснювало б зниження частоти локальних подій вивільнення Ca^{2+} та його накопичення у клітинних депо. Провідність LCC-каналів до $Tris^+$ також становить певний науковий інтерес у контексті інтерпретації вищеописаних досліджень. Ще одним свідченням на користь можливої участі цих каналів у Ca^{2+} сигналізації є дані про кореляцію їх щільності із щільністю ядерних IP_3 -каналів, що наштовхує на думку про коекспресію та пов'язаність їх функцій (Fedorenko & Marchenko, 2014), тому питання подальшого дослідження LCC-каналів є важливим для утвердження достовірного уявлення про механізми, що забезпечують вивільнення Ca^{2+} в клітинах. Окрім цього, з урахуванням описаного цими ж авторами існування LCC-подібних каналів із різною провідністю у зубчастій звивині (DG) та CA1 зоні гіпокампа (Fedorenko & Marchenko, 2014), заслуговує на увагу розгляд властивостей цих каналів залежно від їх локалізації та розподілу у тканинах різного типу. Наявність потенційних відмінностей у таких властивостях є закономірною внаслідок відмінностей у механізмах Ca^{2+} сигналізації, до якої можуть бути залучені LCC-канали, між збудливими та незбудливими тканинами.

Крім нейронів, на даний момент наявні відомості про наявність цих каналів у кардіоміоцитах (209 ± 13 пСм) (Котик та ін., 2016). Крім цього, ще раніше Rousseau та співавторами (Rousseau et al., 1996) на зовнішній (але не на

внутрішній) мембрані кардіоміоцитів було описано високопровідні (180 – 200 пСм) іонні канали, селективні до K^+ . З урахуванням їх потенціал-залежності та нечутливості до Cs^+ та TEA^+ , можна припустити, що описані ними канали належали до LCC-каналів. Також у літературі при описі LCC-каналів кардіоміоцитів згадується про їх здатність бути активованими вивільненими із депо іонами кальцію, спонтанно чи внаслідок індукції цього процесу кофеїном або галотаном (Zhang et al., 2007) і, з урахуванням їх невідомої молекулярної природи, зустрічаються припущення про те, що ці канали утворені із поліцистину-2 (Volk et al., 2003) чи паннексину-1 (Kienitz et al., 2011). Але беручи до уваги такі описані авторами характеристики, як здатність пропускати двовалентні катіони, зокрема Ca^{2+} та Ba^{2+} , а також значення провідності у 300 пСм, слід зазначити, що попри однакову назву, ці канали найімовірніше є відмінними від тих, які розглядаються у цій роботі.

Щодо наявних даних про фармакологічну чутливість LCC-каналів до блокаторів, то наразі виявлено, що пригнічувати провідність крізь здатні такі н-холіномодулятори, як атракуріум, дитилін (Kotyk et al., 2017), нейротоксин II (Котик та ін., 2019), нікотин, піпекуроній бромід та рокуроній бромід (Котлярова та ін., 2019), з яких найсильнішими інгібіторами є нікотин та нейротоксин II. Однак, на ці канали не впливають такі традиційні інгібітори K^+ каналів, як тетраетиламоній, 4-амінопіридин, блокатор катіонних каналів La^{3+} , а також рутеній червоний, ріанодин, гепарин, інозитол-3-фосфат та АТФ (Marchenko et al., 2005). Крім цього, варто зазначити, нещодавні дослідження таких поширених у хірургічній практиці анестетиків та природних отрут, як мідокалму, дипрофолу та α -кобратороксину показали, що вони зменшують ймовірність LCC-каналів перебувати у відкритому стані (P_o). Так, при дії α -кобратороксину (1 – 2 ммоль/л) та дипрофолу (0,2 – 2 ммоль/л) було встановлено зменшення P_o вдвічі, а під дією мідокалму (2 ммоль/л) в 2 – 4 рази. Також у випадку α -кобратороксину та мідокалму спостерігалось підвищення "миготіння" каналів, що може бути зумовлено частковим механічним блокуванням їх іонної пори (Котик та ін., 2019).

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкт досліджень

Експериментальну роботу було проведено з використанням ядер нейронів Пуркінє, одержаних з мозочка тритижневих щурів лінії *Wistar*. Утримання і видача тварин для досліджень були забезпечені науково-дослідною експериментальною базою з клінікою (Віварій), що входить до складу Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця як структурний виробничий підрозділ. При проведенні експериментів керувалися біоетичними нормами, описаними у Європейській конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), дотримуючись Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006, № 3447-IV), а також правил і принципів Комітету з біоетики Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, що підтверджено протоколом № 2/26 від 03.03.2026.

2.2. Використані розчини та реактиви

При виконанні експериментальної частини було використано такі розчини та реагенти:

1. Розчин на основі NaCl, що застосовували для охолодження мозочка щурів під час операції (ммоль/л): NaCl – 150; HEPES – 10; EDTA – 1; pH 7,4. Температура цього розчину становила 4°C.
2. Розчин для гомогенізації зразків (ммоль/л): глюконат калію – 150; HEPES – 10; HEPES-K – 10; pH 7,2.
3. Робочий (контрольний) розчин на основі KCl (ммоль/л): KCl – 150; HEPES – 8; HEPES-K – 12; EGTA – 1; pH 7,2.

4. Розчини досліджуваних модуляторів холіно- та адренорецепторів, які готували на основі робочого розчину описаного вище складу із додаванням у нього поокремо наступних діючих сполук (ммоль/л):

- 1) мекаміламін гідрохлорид – 1;
- 2) ацетилхолін хлорид – 1;
- 3) карбахолін хлорид – 1;
- 4) панкуроній бромід – 0,05/0,1/0,2/0,5/1;
- 5) векуроній бромід – 0,05/0,1/0,2/0,5/1;
- 6) атропін сульфат – 0,2/0,5/1/2;
- 7) платифілін гідротартат – 1;
- 8) пілокарпін гідрохлорид – 1;
- 9) норепінефрин гідрохлорид – 1;
- 10) епінефрин гідрохлорид – 0,1/0,2/0,5/1/2/5;
- 11) пропранолол гідрохлорид – 1;
- 12) ізопротерінол гідрохлорид – 0,1/0,2/0,5/1/2/10.

Для речовин, які проявляли незвичний ефект і визначення залежності впливу яких від концентрації сполуки дозволяло краще зрозуміти закономірності їх дії, було додатково проведено дослідження із використанням розчинів із різними концентраціями діючої речовини у їх складі, які наведені у переліку вище. Основні компоненти розчинів були виготовлені Sigma-Aldrich (США). Крім вказаних сполук, під час досліджень було використано інгібітори протеаз «сOmplete Protease Inhibitor Cocktail», виготовлені F. Hoffmann-La Roche AG (Швейцарія), які додавали відповідно до інструкцій виробника до розчину для гомогенізації, із результуючою концентрацією інгібіторів 1,6 мг/мл.

2.3. Ізолювання ядер нейронів Пуркінє мозочка щурів

При проведенні експериментів керувалися методикою підготовки зразків ядер до patch-clamp досліджень, описаною Marchenko та Fedorenko (Fedorenko

& Marchenko, 2014; Marchenko et al., 2005) із пізнішими модифікаціями (Котлярова та ін., 2019) відповідно до особливостей досліджень. З метою виділення ядер нейронів Пуркінє, після анестезії та декапітації тварин стерильними інструментами розкривали черепну коробку та виокремлювали мозочок, обробляючи місце операції холодним розчином на основі NaCl задля уповільнення процесів деградації тканин. Далі мозочок переносили на охолоджену підставку, вкриту фільтрувальним папером, який абсорбував невеликі кількості крові та тканинної рідини, що виділялася під час операції. Фільтрувальний папір також був змоченим розчином NaCl з метою покращення теплообміну між підставкою та мозочком, додатково сприяючи його охолодженню. Після цього скальпелем мозочок нарізали на корональні зрізи товщиною 0,3 – 0,5 мм, які поміщали у мікропробірки типу Eppendorf ємністю 1,5 мл, що містили 1 мл розчину для гомогенізації із інгібіторами протеаз. Отримані таким способом зразки мозочка щурів переносили до морозильної камери, де вони зберігалися у замороженому стані до наступного етапу експерименту.

Перед безпосереднім проведенням електрофізіологічних досліджень зразки розморожували і гомогенізували шляхом шестиразового пропускання шматочка тканини у вищезгаданому розчині крізь затуплену голку шприца діаметром 0,84 мм (21 за шкалою Гейджа). Мікропробірки з гомогенатом центрифугували при 5,5 тис. об./хв. протягом 5 хв у центрифугі MiniSpin (Eppendorf, Німеччина) для відокремлення важкої фракції ядер від решти клітинних органел. Після цього супернатант зливали, а преципітат, що містив ядра клітин Пуркінє, ресуспендували у контрольному розчині на основі KCl. Отриману суспензію переносили у ванночку на предметному столику інвертованого мікроскопа (Leica DMIRB, Німеччина) для візуального контролю подальших маніпуляцій, кінцевий об'єм суспензії у ванночці становив 200 мкл. Через 5 хв, відведених для осідання ядер на предметне скельце, яке утворювало дно ванночки, та утворення з ним стабільного контакту, зразок промивали 10-ма мл контрольного розчину для усунення

неосілих решток клітин з поля зору, які могли б заважати підведенню мікропіпетки до ядра.

2.4. Реєстрація іонного струму крізь канали ядерної мембрани

Для реєстрації струму крізь іонні канали використовували метод patch-clamp у конфігурації nucleus-attached та режимі voltage clamp. Перед проведенням дослідження виготовляли мікропіпетки із мікрокапілярів з боросилікатного скла (Sutter Instruments, США) за допомогою пуллера PC-10 Vertical Puller (Narishige, Японія). Для цього мікрокапіляр розташовували у пуллері так, щоб нагрівальна спіраль знаходилася навколо його центральної частини, потім виставляли температурний режим «High», що відповідав нагріванню спіралі до 85°C, встановлювали обмежувач розтягнення та вмикали пристрій. Результатом цього першого кроку був видовжений і стоншений посередині мікрокапіляр. Його знову позиціонували у пуллері так, щоб нагрівальна спіраль знаходилася навколо стоншеної ділянки, виставляли температурний режим «Low», що відповідав нагріванню спіралі до 65°C, прибирали обмежувач розтягнення та знову вмикали пуллер. На цьому другому етапі в результаті розтягу мікрокапіляр розділявся на дві однакові за розміром мікропіпетки із діаметром кінчика від 1 до 10 мкм. Опір мікропіпеток становив 7-15 МΩ.

Після знаходження у зразку ядра досліджуваної клітини за допомогою інвертованого мікроскопа, ці мікропіпетки заповнювали контрольним розчином на основі KCl. Оскільки ним же була заповнена і дослідна камера, в якій знаходилися ядра клітин, що забезпечувало ідентичність іонного складу розчину з обох сторін мембрани. Для здійснення реєстрації струму крізь канали у мікропіпетку поміщали записуючий електрод, підключений до ампліфікатора сигналу Visual-Patch 500 (Bio-Logic, Франція). Інший електрод, референтний, був сполучений із ванночкою зі зразком через агаровий місток

(концентрація агар-агару становила 0,3%). Схема електричних відведень зображена на Рисунку 2.1.

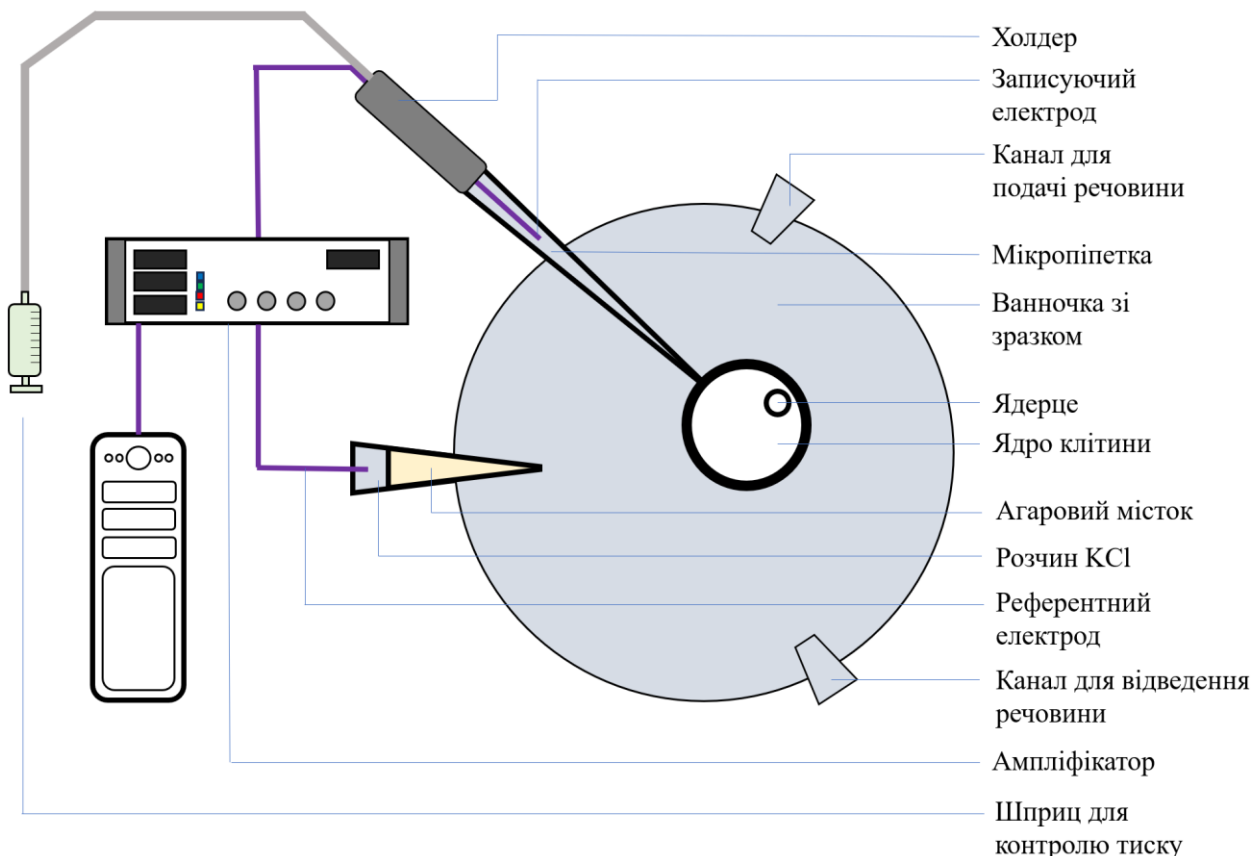


Рис. 2.1. Схема розташування електродів під час patch-clamp дослідження

Далі мікропіпетку з електродом підводили до ядра за допомогою макрота мікро-маніпуляторів, спостерігаючи за положенням піпетки на екрані мікроскопа. Перед зануренням у зразок в мікропіпетці за допомогою шприца, герметично приєднаного до неї, створювали позитивний тиск для запобігання засміченню її кінчика при проходженні крізь рештки клітин. При наближенні до ядра на відстань близько 5-10 мкм фіксували різницю потенціалів між електродами, після чого мікропіпетку остаточно підводили до мембрани ядра досліджуваної клітини до моменту їх дотику. Далі позитивний тиск у петч-піпетці змінювали на негативний задля прикріплення до мембрани, вмикали подачу напруги на електрод у піпетці та здійснювали реєстрацію струму крізь

іонні канали в межах петч-сайту із часовою дискретизацією 200 мкс при фіксації потенціалу на наступних значеннях: -40 мВ, +40 мВ, -60 мВ та +60 мВ. Фіксація відбувалася поетапно у вказаному порядку, кожен з етапів, що відповідав реєстрації струму при відповідному потенціалі, тривав 2-3 хвилини. Після реєстрації контрольних значень, робочий розчин у ванночці замінювали на розчин досліджуваної сполуки шляхом перфузії 2 мл цієї речовини крізь зразок із одночасним відведенням наявного у ванночці контрольного розчину на основі KCl за допомогою насоса. Наступним кроком реєстрували значення струму крізь іонні канали при дії досліджуваної речовини за тих самих мембранних потенціалів і у тому ж порядку, що і під час контрольних реєстрацій. Після отримання таких записів розчин у ванночці знову піддавали заміні, пропускаючи 10 мл робочого розчину KCl крізь зразок, відмиваючи зі зразка таким чином сполуку, що вивчалася. Цей крок здійснювали для уможливлення подальшого аналізу оборотності змін електрофізіологічних параметрів, викликаних речовиною.

Слід зауважити, що після додавання діючої речовини у ванночку зі зразком після приєднання петч-піпетки до ядерної мембрани, молекули цієї сполуки мали доступ і діяли виключно на внутрішньоядерну частину мембрани та заякорених у неї каналів, тоді як перинуклеарна сторона була експонована до розчину, що заповнював петч-піпетку. У ході досліджень виникла ідея додатково оцінити, чи супроводжується зміна конфігурації застосування речовини зміною її впливу на LCC-канали, тож для деяких речовин було проведено ще одну серію досліджень, із додаванням діючої речовини у розчин в піпетці. Таким чином, після приєднання петч-піпетки до мембрани, сполука, яку вивчали, взаємодіяла тільки з перинуклеарною стороною її стороною, а внутрішньоядерна частина мембрани знаходилася у середовищі контрольного розчину на основі KCl. Після запису електричної активності LCC-каналів за цих умов, у ванночку, як і у попередній серії, також додавали діючу речовину, і на цій стадії вона знаходилася з обох сторін ядерної мембрани. Здійснивши реєстрації струму з речовиною у ванночці,

зразок промивали робочим розчином на основі KCl. Порівняно з основною частиною досліджень при додаванні розчинів досліджуваних сполук до ванночки, інші зазначені раніше методологічні аспекти, такі як значення фіксованих потенціалів, часова дискретизація самої реєстрації струму, підготовка зразків та метод приєднання до ядерної мембрани не зазнали змін. З врахуванням цього, у випадку виявлення відмінностей у реєстрованих електрофізіологічних параметрах LCC-каналів, вони можуть бути пов'язані саме з модифікацією конфігурації застосування речовини та стороною мембрани, з якою вона взаємодіяла.

Узагальнюючи, для кожної досліджуваної сполуки було отримано такі серії реєстрацій при заповненні петч-піпетки контрольним розчином на основі KCl та почерговій фіксації мембранного потенціалу при -40 мВ, $+40$ мВ, -60 мВ та $+60$ мВ:

1. Контрольні реєстрації струму крізь іонні канали, ізольовані петч-піпеткою. З обох боків мембрани знаходився розчин на основі KCl. На рисунках цей етап позначено «Кон/Кон».

2. Реєстрації струму крізь канали в межах петчу після заміни розчину на основі KCl у ванночці на розчин досліджуваної сполуки, при цьому речовина мала доступ лише до внутрішньоядерного боку мембрани. Цей етап позначено на рисунках як «Речовина/Кон».

3. Реєстрації струму після відмивки діючої речовини із ванночки зі зразком контрольним розчином.

Крім цього, для деяких речовин було проведено додаткові дослідження для оцінки того, чи впливає зміна конфігурації застосування на виявлені ефекти, тож у цьому випадку петч-піпетка містила розчин досліджуваної сполуки. При аналогічних значеннях підтримуваних потенціалів було отримано наступні серії:

1. Реєстрації електричної активності іонних каналів при заповненні ванночки зі зразком контрольним розчином на основі KCl, а піпетки – досліджуваною речовиною. При цьому діюча речовина взаємодіяла

лише з перинуклеарною частиною ядерної мембрани. Цей етап позначено як «Кон/Речовина».

2. Реєстрації струму після додавання діючої речовини шляхом перфузії у ванночку зі зразком, таким чином досліджувана сполука взаємодіяла з мембраною як з внутрішньоядерного боку, так і з перинуклеарного. На рисунках цьому етапу відповідало позначення «Речовина/Речовина».

3. Реєстрації електричної активності після відмивки діючої речовини з ванночки розчином на основі KCl, петч-піпетка при цьому залишалася заповненою розчином досліджуваної сполуки.

Із метою універсалізації опису груп у легенді графіків та рисунків, в першій частині позначень за типом «Розчин А / Розчин Б» завжди наведено, яка речовина знаходилася у ванночці зі зразком, а у другій – якою речовиною було заповнено піпетку. Крім цього, варто зазначити, що з урахуванням чутливості петч-контакту до впливу зовнішніх факторів, які можуть призводити до порушення цілісності мембрани або від'єднання петч-піпетки від неї, частина реєстрацій завершувалася до або під час відмивки діючої речовини. З урахуванням цього, кількість отриманих реєстрацій після відмивки деяких сполук була недостатньою для статистичного аналізу при всіх підтримуваних потенціалах, тож ці результати не були наведені на графіках, але отримані значення вказувалися у тексті, якщо на їх підставі можна було зробити припущення щодо оборотності виявлених ефектів.

2.5. Статистично-математичне опрацювання результатів

Обробку отриманих реєстрацій проводили у програмі Clampfit 10.7 (Axon Instruments, США). На першому кроці реєстрацію із одного петч-сайту, що включала період електричної активності іонних каналів за контрольних умов, за дії досліджуваної речовини та після її відмивки, ділили на фрагменти, відповідні цим трьом станам та кожному із чотирьох підтримуваних

потенціалів. Далі для кожного з фрагментів було виставлено значення базової лінії як таке, при якому всі канали перебували у закритому стані.

Наступним кроком визначали амплітуду струму крізь іонні канали за допомогою вбудованих інструментів у програмі Clampfit 10.7 як різницю між середніми значеннями цього параметра між періодами перебування каналів у закритому та у відкритому станах. Після визначення таким чином амплітуди струму крізь канали у різних частинах оброблюваного фрагмента реєстрації, середнє між цими значеннями вважали амплітудою за відповідного мембранного потенціалу та концентрації речовини. Додатній чи від'ємний знак біля отриманих значень при цьому відповідав додатнім чи від'ємним значенням мембранного потенціалу, та відображав напрямок струму: при позитивному підтримуваному потенціалі іони K^+ крізь LCC-канали переміщувалися з піпетки (розташованої з боку перинуклеарного простору) до нуклеоплазми, тоді як при негативному – навпаки, з нуклеоплазми до піпетки.

При визначенні ймовірності перебування каналів у відкритому стані (P_o), що було наступним кроком, мало бути враховано кілька особливостей їх функціонування. По-перше, після приєднання петч-піпетки до ядерної мембрани і фіксації мембранного потенціалу, частина іонних каналів в межах петч-сайту закривалася в межах 1-2 хвилин внаслідок швидкої зміни умов. Таким чином, задля запобігання хибній інтерпретації зменшення кількості відкритих каналів як наслідку дії речовини, розрахунок P_o для контролю та наступних етапів проводили тільки після стабілізації їх кількості в межах реєстрації.

Наступною особливістю досліджуваних LCC-каналів є швидкі переходи між відкритим і закритим станами, які виглядають на реєстрації як серія щільно розташованих спайків з амплітудою в межах типової амплітуди струму для однієї події відривання. Це явище, яке називається «миготінням каналів», вносить похибку у визначення P_o , оскільки висока кількість короткотривалих переходів між станами ускладнює виявлення програмним забезпеченням початку довготривалих закривань та відкривань. З метою часткового

нівелювання цього ефекту, було використано редукцію даних із фактором редукції 10 методом заміни на середнє, що означає, що кожні 10 точок значень струму були замінені на 1 точку, розраховану як середнє між ними. Цей підхід дозволяє знизити кількість зумовлених миготінням спайків в межах реєстрації, зберігаючи при цьому довготривалі переходи між станами каналів. Крім цього, при визначенні P_o були ігноровані зміни між закритим та відкритим станами, тривалість яких становила менше 10 мс та/або амплітуда яких була нижчою ніж 50% попередньо встановленої для LCC-каналів амплітуди за відповідного мембранного потенціалу.

Перевірка значущості різниці між групами та побудова графіків були здійснені у програмах Origin 2018 (OriginLab Corporation, США) та Prism 8 (GraphPad Software, США). Дані було представлено у форматі $M \pm SEM$. Значення n при описі результатів відповідає кількості реєстрацій, на підставі яких наведені значення були обчислені. Порівняння між двома групами, наприклад, при визначенні значущості різниці між значеннями амплітуди струму крізь LCC-канали та їх ймовірності перебування у відкритому стані в контрольних умовах та при застосуванні досліджуваної речовини проводилися з використанням двобічного t-тесту. У випадку, якщо визначені параметри було отримано як повторювані виміри на одному об'єкті в різних умовах, використано парний t-тест (перший тип), якщо ж дані у групах було отримано з різних сетів ядер, використано непарний t-тест (третій тип). У ситуаціях, які передбачали порівняння кількох груп, наприклад, при дослідженнях впливу сполуки на параметри амплітуди струму та P_o залежно від її концентрації, для визначення значущості відмінностей було використано однофакторну ANOVA та тест Šídák для пост-хок аналізу. Різниця між групами вважалася статистично значущою при $P < 0,05$.

2.6. Візуалізація результатів проведених досліджень

Крім наведення графіків усередненої амплітуди струму та ймовірності перебування каналів у відкритому стані за різних потенціалів ядерної мембрани у контрольних умовах та при додаванні досліджуваних речовин, для візуалізації результатів також було обрано і представлено оригінальні фрагменти реєстрацій, на яких попередньо встановлені статистичні закономірності були помітними та вираженими. Крім цього, для репрезентативних реєстрацій було побудовано гістограми, що відображали превалювання на них певних значень амплітуди струму, для кожного з мембранних потенціалів окремо. На цих гістограмах шкала «кількість» (вісь ординат) відповідала кількості точок з певним значенням амплітуди, діапазон значень якої наведено на осі абсцис. З урахуванням того, що значення амплітуди струму при позитивних та негативних потенціалах суттєво відрізнялися, використання однакової шкали для них було невиправданим, тому шкали амплітуди струму на репрезентативних фрагментах і амплітудних гістограмах також відрізнялися залежно від знаку мембранного потенціалу (напр. між -40 мВ та $+40$ мВ), але були однаковими між потенціалами одного знаку (напр. між -40 мВ та -60 мВ). Як для представлення типових фрагментів реєстрацій, так і для побудови амплітудних гістограм використано програму Origin 2018 (OriginLab Corporation, США).

Також варто зазначити, що оскільки на амплітудних гістограмах були відображені абсолютні значення кількості точок даних, а не відносні щодо тривалості реєстрації, з метою коректності порівнянь різних реєстрацій сама тривалість використаних для побудови гістограм записів була стандартизована і становила 30 секунд. При цьому використання фрагментів такої тривалості для відображення оригінальних реєстрацій ускладнило б розрізнення окремих каналів на рисунку і тому було невиправданим, тож у цьому випадку було використано 15-секундні фрагменти. Зважаючи на це, вживане при описі результатів формулювання відповідності амплітудних

гістограм представленим типовим фрагментам реєстрацій слід розуміти так, що показані репрезентативні фрагменти оригінальних реєстрацій є частиною довших записів, на основі яких будували гістограми амплітуди струму.

Додатково проведено первинну оцінку закономірностей хімічної будови речовин, що зумовлювали зниження амплітуди струму крізь LCC-канали та їх ймовірності перебування у відкритому стані у різних конфігураціях аплікації цих сполук (у ванночку зі зразком чи через петч-піпетку). При аналізі формул використаних у цьому дослідженні речовин їх коректність була верифікована у базі даних PubChem (NCBI).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ

3.1. Вплив модуляторів нікотинових холінорецепторів на властивості LCC-каналів

З урахуванням описаних в огляді літератури перспективних результатів, отриманих при вивченні впливу на LCC-канали таких модуляторів нікотинових ацетилхолінових рецепторів, як нейротоксин II (Котик та ін., 2019), d-тубокурарин (Lunko et al., 2016; Kotyk et al., 2017) та нікотин (Котлярова та ін., 2019), було вирішено дослідити дію також інших речовин цього класу, зокрема ацетилхоліну, карбахоліну, мекаміламіну, панкуронію та векуронію з метою встановлення, чи для них також є характерними виражені антагоністичні властивості щодо досліджуваних іонних каналів.

3.1.1. Вплив ацетилхолін хлориду на електрофізіологічні параметри LCC-каналів

Ацетилхолін, як і карбахолін, є відомим агоністом нікотинових та мускаринових ацетилхолінових рецепторів (Clague et al., 1985; Jones et al., 2012; Li et al., 2010; Rakala et al., 2025; Verbitsky et al., 2000). Головними функціями, з якими традиційно асоціюється ацетилхолін, хоч і не обмежується ними, є нейротрансмісія у центральній нервовій системі, нервово-м'язовому з'єднанні та у вісцеральних гангліях. В медицині його застосовують при хірургічному виправленні катаракти, іридектомії і кератоплазії, завдяки його здатності викликати швидкий міоз райдужної оболонки (Drudi et al., 2017). Відомими побічними ефектами при цьому є едема рогівки (Menchini et al., 1989). Ацетилхолін продукується у нервових терміналях холін-ацетилестеразою з холіну та ацетил-КоА, а пізніше, після вивільнення у синаптичну щілину, гідролізується ацетилхолінестеразою до холіну та ацетату

(Bittner & Martyn, 2019). Ацетилхолін також відомий здатністю до зниження кров'яного тиску шляхом активації NO-залежної вазодилатації (Stiegler et al., 2021). Крім цього, обговорюється його роль в імунній відповіді, з урахуванням даних про секрецію цієї речовини Т-лімфоцитами (Malin et al., 2020).

У процесі досліджень впливу ацетилхоліну на електрофізіологічні параметри ядерних каналів виявлено, що ця речовина при додаванні у ванночку в концентрації 1 ммоль/л і взаємодії з внутрішньоядерною стороною мембрани зменшує амплітуду струму крізь LCC-канали при потенціалах -60 мВ та -40 мВ ($P < 0,001$; $n = 15$ для обох потенціалів), але не впливає на струм крізь ці канали при позитивних значеннях підтримуваного потенціалу $+60$ мВ та $+40$ мВ. Приклади фрагментів реєстрацій представлені на Рисунку 3.1А, а амплітудні діаграми на основі репрезентативних фрагментів зображені на Рисунку 3.1Б.

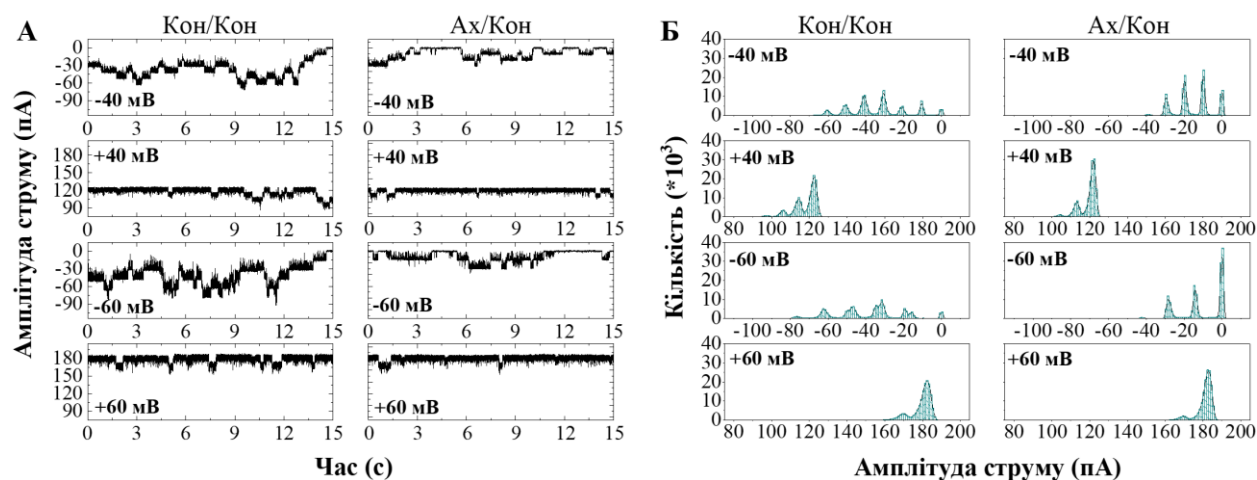


Рис. 3.1. Приклади реєстрацій струму крізь LCC-канали (А) та гістограми значень амплітуди, відповідні вказаним реєстраціям (Б) за контрольних умов (Кон/Кон) та при додаванні ацетилхолін хлориду в концентрації 1 ммоль/л у ванночку зі зразком (Ах/Кон).

Зменшення амплітуди струму за дії ацетилхоліну при -60 мВ становило 6,8% (від $-14,35 \pm 0,26$ пА до $-13,37 \pm 0,23$ пА) та 6,0% при -40 мВ (від $-9,64 \pm 0,19$ пА до $-9,06 \pm 0,23$ пА), як показано на Рисунку 3.2А. Ймовірність

перебування LCC-каналів у відкритому стані також зменшилася при додаванні цієї речовини у вищевказаній концентрації до ванночки зі зразком. При потенціалі -60 мВ значення P_o знизилися на $41,2\%$ ($P < 0,05$), а саме з $0,17 \pm 0,03$ до $0,10 \pm 0,02$ ($n = 13$ для обох груп), як показано на Рисунку 3.2Б, а тривалий ефект візуально спостерігали навіть після відмивки ацетилхоліну за допомогою 10 мл розчину на основі KCl раніше описаного складу. При потенціалі -40 мВ спостерігали аналогічну тенденцію. Після додавання у ванночку ацетилхолін знизив P_o LCC-каналів з $0,33 \pm 0,01$ до $0,20 \pm 0,03$ ($n = 13$ для обох груп), що відповідає зміні на $39,4\%$ ($P < 0,001$). Описаний ефект також зберігався після відмивки досліджуваної речовини розчином на основі KCl.

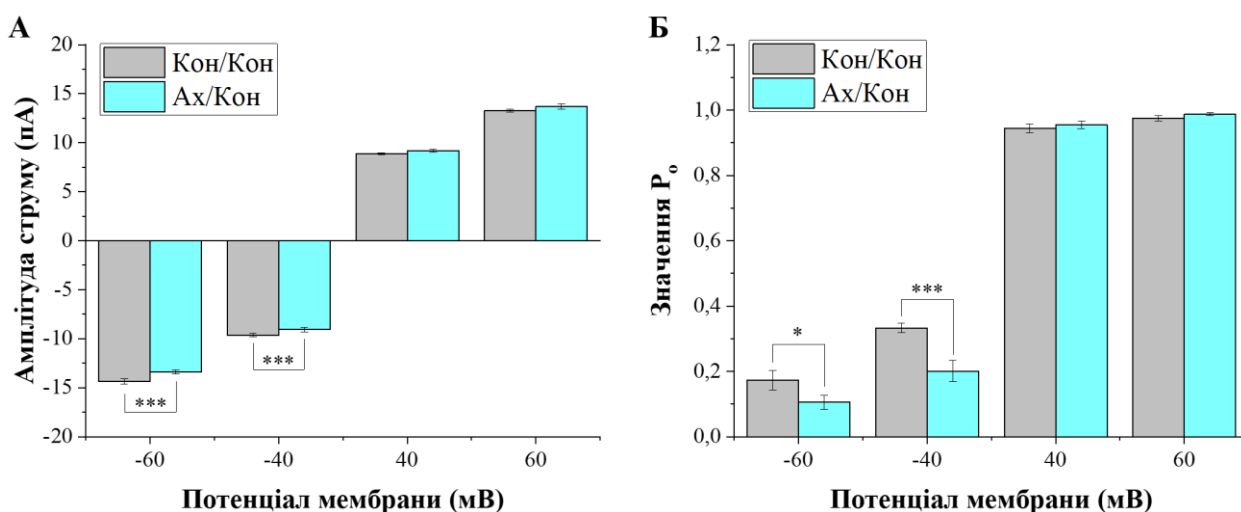


Рис. 3.2. Усреднена амплітуда струму крізь LCC-канали при різних мембранних потенціалах (А) та ймовірність цих каналів перебувати у відкритому стані (Б) за умов контролю (Кон/Кон) та при додаванні ацетилхолін хлориду в концентрації 1 ммоль/л у ванночку зі зразком (Ах/Кон). * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.

Вплив ацетилхоліну на значення P_o LCC-каналів може свідчити про те, що він має сильний інгібуючий вплив на їх активність при негативних

мембранних потенціалах. Подібно до результатів, отриманих при оцінці амплітуди, змін P_o при позитивних мембранних потенціалах не зареєстровано.

Оскільки більшість попередньо вивчених речовин, для яких показана здатність модулювати властивості LCC-каналів, додавали безпосередньо у ванночку зі зразком (Kotyk et al., 2017; Котик та ін. 2019), під час проведення досліджень було вирішено також перевірити, чи відрізняється вплив модуляторів нікотинових холінорецепторів на LCC-канали при їх додаванні через петч-піпетку, оскільки це зумовлювало б їх вплив виключно на перинуклеарну частину ядерної мембрани. Таким чином, на наступному кроці, при застосуванні розчину ацетилхоліну в концентрації 1 ммоль/л через петч-піпетку, зареєстровано статистично значуще зниження амплітуди струму через LCC-канали при всіх підтримуваних потенціалах. Фрагменти реєстрацій, отриманих на цьому етапі, представлені на Рисунку 3.3А, а відповідні їм амплітудні діаграми наведені на Рисунку 3.3Б.

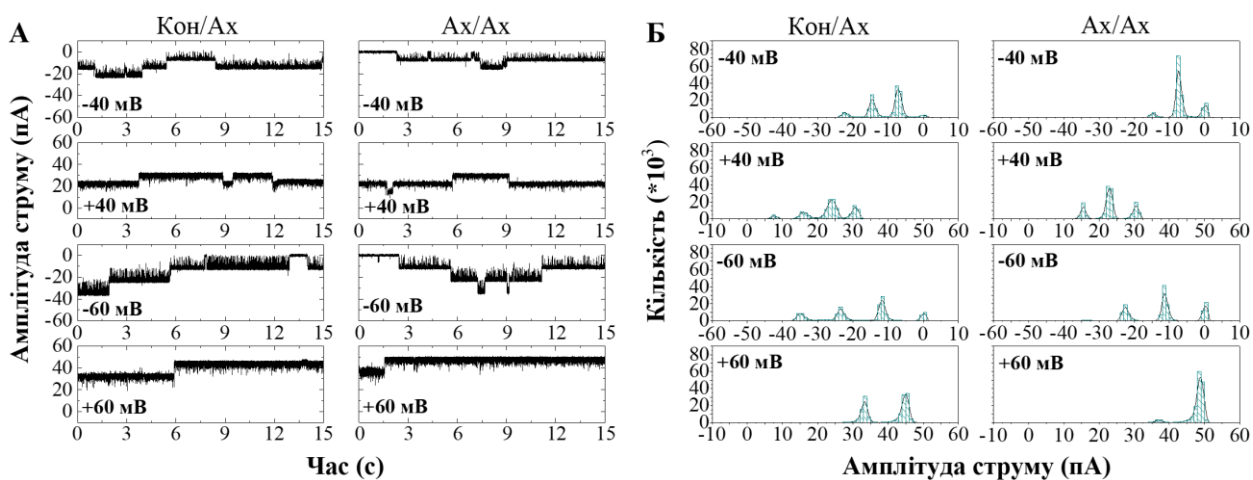


Рис. 3.3. Репрезентативні фрагменти реєстрацій струму крізь LCC-канали (А) та амплітудні діаграми на їх основі (Б) при додаванні ацетилхоліну хлориду в концентрації 1 ммоль/л у петч-піпетку (Кон/Ах) та у піпетку і ванночку зі зразком (Ах/Ах).

При потенціалі -60 мВ амплітуда струму зменшилася з $-14,35 \pm 0,26$ пА ($n = 15$) в контролі до $-11,49 \pm 0,38$ пА ($n = 6$) при аплікації ацетилхоліну з

перинуклеарного боку (зміна 19,9%; $P < 0,001$). При -40 мВ зниження становило 25,4% ($P < 0,001$), з $-9,64 \pm 0,18$ пА ($n = 15$) до $-7,19 \pm 0,10$ пА ($n = 10$). Порівнюючи ці дані з результатами, отриманими при додаванні ацетилхоліну до ванночки, можна зробити висновок, що ефект речовини був більш виражений при аплікації через піпетку та взаємодії з перинуклеарною стороною LCC-каналів. Також варто зазначити, що хоча ацетилхолін не впливав на амплітуду струму при позитивних мембранних потенціалах при додаванні у ванночку, при додаванні в піпетку такий ефект все ж було виявлено, як показано на Рисунку 3.4А. Зокрема, при мембранному потенціалі $+40$ мВ значення амплітуди знизилися з $8,87 \pm 0,11$ пА ($n = 15$) в контролі до $7,25 \pm 0,23$ пА ($n = 6$) з речовиною в піпетці (зміна на 18,3%; $P < 0,001$), а при $+60$ мВ з $13,27 \pm 0,16$ пА ($n = 15$) до $11,17 \pm 0,54$ пА ($n = 5$), що відповідає зміні на 15,8% ($P < 0,05$).

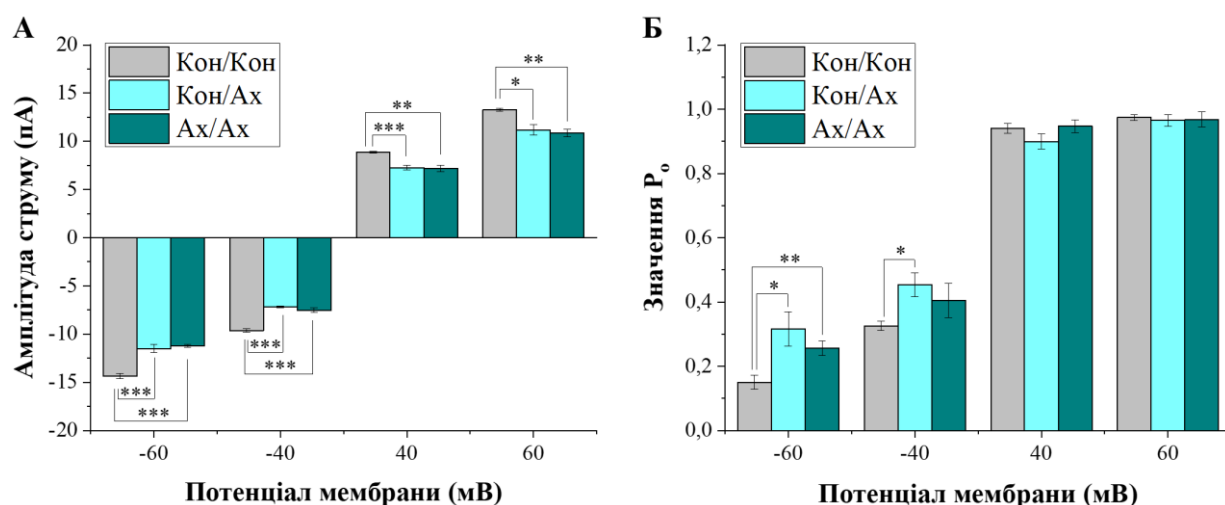


Рис. 3.4. Значення амплітуди струму крізь LCC-канали при позитивних і негативних мембранних потенціалах (А) та усереднена ймовірність перебування цих каналів у відкритому стані (Б) за умов контролю (Кон/Кон) та при дії ацетилхоліну, доданого в концентрації 1 ммоль/л до петч-піпетки (Кон/Ах), та до петч-піпетки і ванночки (Ах/Ах). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

На наступному етапі, коли досліджувана речовина була додана також і у ванночку і таким чином взаємодіяла як з внутрішньою, так і з перинуклеарною сторонами ядерної мембрани (вказано на Рисунках 3.3 та 3.4. як конфігурація A_x/A_x), жодних змін порівняно зі станом, коли ацетилхолін був присутній лише в піпетці, не спостерігали. Результати оцінки ймовірності відкритого стану LCC-каналів з ацетилхоліном в піпетці також становлять інтерес. На відміну від зниження P_o , яке спостерігали при додаванні речовини до ванночки, її аплікація через піпетку призвела до збільшення значень цього параметру при всіх підтримуваних негативних потенціалах. Зміна P_o внаслідок додавання ацетилхоліну в піпетку показана на Рисунку 3.4Б. При потенціалі -60 мВ значення P_o зросло з $0,15 \pm 0,02$ ($n = 13$) у контролі до $0,31 \pm 0,05$ ($n = 5$) з ацетилхоліном у піпетці (зміна на 106,7%; $P < 0,05$), а при потенціалі -40 мВ зареєстровано збільшення P_o з $0,32 \pm 0,01$ ($n = 12$) до $0,45 \pm 0,03$ ($n = 5$), що свідчить про зміну на 40,6% ($P < 0,05$). При цьому, коли на наступному кроці розчин ацетилхоліну було додано також і у ванночку, таким чином він був аплікований і у ванночку і у піпетку одночасно, спостерігали тенденцію до повернення P_o до контрольних значень, що загалом є очікуваним, враховуючи результати, отримані попередньо при додаванні ацетилхоліну лише до ванночки. При потенціалі -60 мВ середнє значення P_o зменшилося до $0,25 \pm 0,02$ ($n = 4$), а при потенціалі -40 мВ до $0,40 \pm 0,05$ ($n = 5$). Тим не менш, ця тенденція, хоч і була помітною при порівнянні середніх значень P_o між групами, не виявилася статистично значущою.

На підставі проведених досліджень дії ацетилхоліну на LCC-канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє (Надтока та ін., 2025а; Надтока та ін., 2025с; Nadтока et al., 2025b) можна зробити такі узагальнення:

1. Ацетилхолін у концентрації 1 ммоль/л при додаванні у ванночку зі зразком зменшує як P_o (на 41,2% при -60 мВ), так і амплітуду (на 6,8% при -60 мВ) струму крізь LCC-канали при негативних мембранних потенціалах.

2. При позитивних значеннях мембранного потенціалу і за додавання у ванночку ацетилхолін не впливає на амплітуду струму крізь LCC-канали та їх значення P_o .
3. При аплікації через петч-піпетку, ацетилхолін зменшує амплітуду струму крізь LCC-канали як при негативних (на 25,4% при -40 мВ), так і при позитивних (на 18,3% при +40 мВ) мембранних потенціалах, і збільшує ймовірність того, що канали будуть у відкритому стані при негативних потенціалах (на 106,7% при -60 мВ).

3.1.2. Функціональні параметри LCC-каналів за дії карбахолін хлориду

Дослідження впливу агоністів нікотинових холінорецепторів на LCC-канали були продовжені вивченням їх характеристик за дії карбахоліну. Подібно до ацетилхоліну, карбахолін також використовується в медичній практиці для індукції міозу райдужної оболонки і зниження внутрішньоочного тиску. Ефекти цієї речовини дуже подібні до таких ацетилхоліну, оскільки він також діє як агоніст мускаринових та нікотинових ацетилхолінових рецепторів. Однією з ключових відмінностей карбахоліну є його вища стійкість до гідролізу ацетилхолінестеразою, що веде до його більш тривалої дії, порівняно з ацетилхоліном (Wood, 1988). Також повідомляється, що карбахолін здатен індукувати вироблення мукусу в кишківнику та має протективну дію при його ураженнях шляхом посилення апікальних щільних з'єднань між клітинами (Hof et al., 2024).

Результати, отримані при дослідженні впливу цієї речовини на LCC-канали, свідчать про те, що у концентрації 1 ммоль/л карбахолін не є їх ефективним блокатором при додаванні у ванночку та взаємодії з їх внутрішньоядерною частиною.

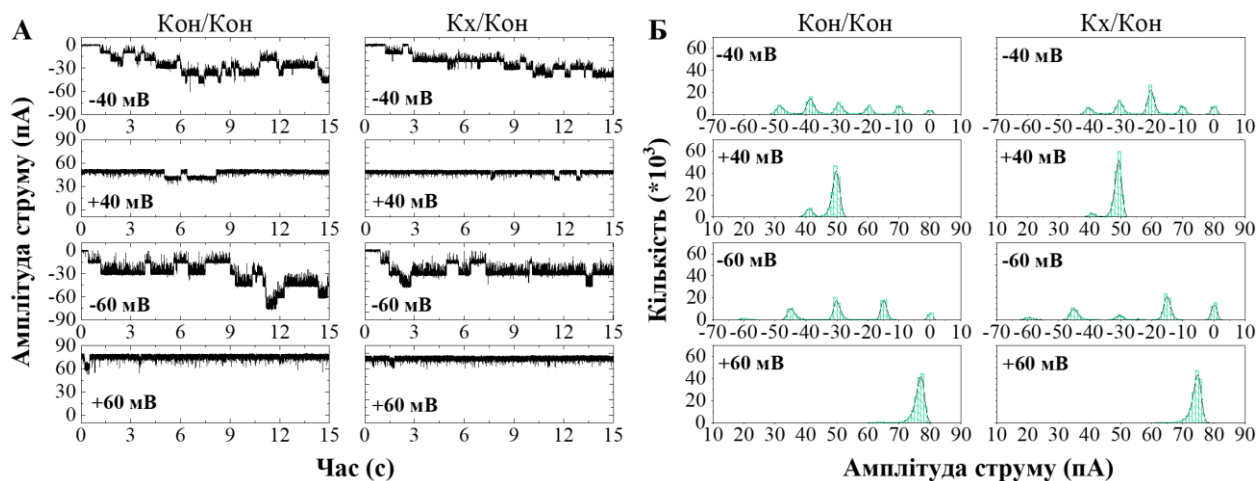


Рис. 3.5. Приклади реєстрацій струму крізь LCC-канали (А), а також відповідні їм амплітудні гістограми (Б) за різних значень мембранних потенціалів у контрольних умовах (Кон/Кон) та при додаванні карбахолін хлориду (Кх/Кон) у концентрації 1 ммоль/л до ванночки.

Зареєстровані значення амплітуди струму знаходилися в діапазоні, типовому для струму крізь LCC-канали, зокрема, $-14,79 \pm 0,25$ пА при мембранному потенціалі -60 мВ; $-9,78 \pm 0,16$ пА при -40 мВ; $8,60 \pm 0,15$ пА при $+40$ мВ; та $12,48 \pm 0,45$ пА при потенціалі $+60$ мВ ($n = 12$ для кожної із зазначених груп), та не відрізнялися між контрольними реєстраціями та із додаванням карбахоліну у вказаній концентрації. Фрагменти реєстрацій для конфігурації додавання речовини до ванночки зі зразком, а також відповідні їм амплітудні діаграми представлені на Рисунках 3.5А та 3.5Б відповідно.

Незважаючи на відсутність змін амплітуди струму при додаванні карбахоліну до розчину у ванночці, за цієї конфігурації зареєстровано зниження значень P_o при потенціалі -60 мВ, при цьому ймовірність перебування LCC-каналів у відкритому стані зменшилася з $0,23 \pm 0,01$ ($n = 11$) у контролі до $0,16 \pm 0,02$ ($n = 9$) з карбахоліном (1 ммоль/л) у розчині (зміна на 30,4%; $P < 0,05$). Цей ефект зберігався після вимивання речовини зі зразка.

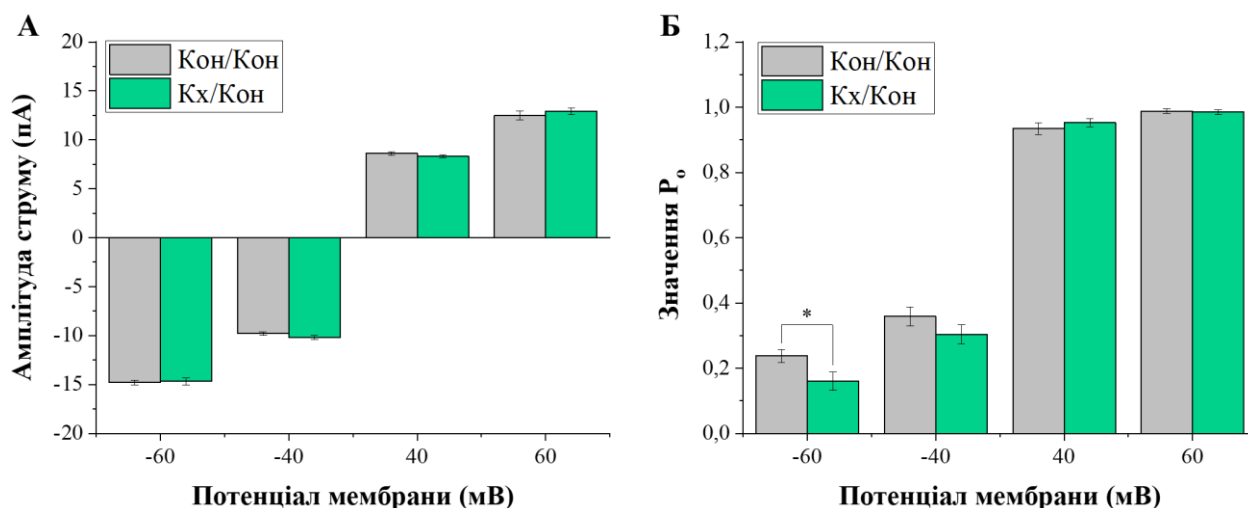


Рис. 3.6. Значення амплітуди струму крізь LCC-канали залежно від мембранного потенціалу (А), а також ймовірність перебування цих каналів у відкритому стані (Б) в контрольних умовах (Кон/Кон) та при додаванні карбахолін хлориду (Кх/Кон) в концентрації 1 ммоль/л до ванночки. * $P < 0,05$.

Ці дані, отримані на нейронах Пуркінє, відповідають результатам попередніх досліджень (Kotyk et al., 2017), згідно з якими карбахолін також не впливав і на амплітуду струму через LCC-канали кардіоміоцитів. Привертає увагу той факт, що, незважаючи на нездатність впливати на значення амплітуди, карбахолін все ж зменшував P_o цих каналів. Ймовірно, що модуляція амплітуди струму крізь них та ймовірності перебувати у відкритому стані опосередковується різними ділянками взаємодіючих молекул. Усереднена амплітуда струму крізь LCC-канали при різних мембранних потенціалах показана на Рисунку 3.6А. Вплив карбахоліну на P_o LCC-каналів представлено на Рисунку 3.6Б.

Водночас, коли карбахолін додавали у піпетку та він впливав безпосередньо на перинуклеарну частину LCC-каналів, спостерігали статистично значуще зменшення амплітуди струму при всіх застосованих потенціалах.

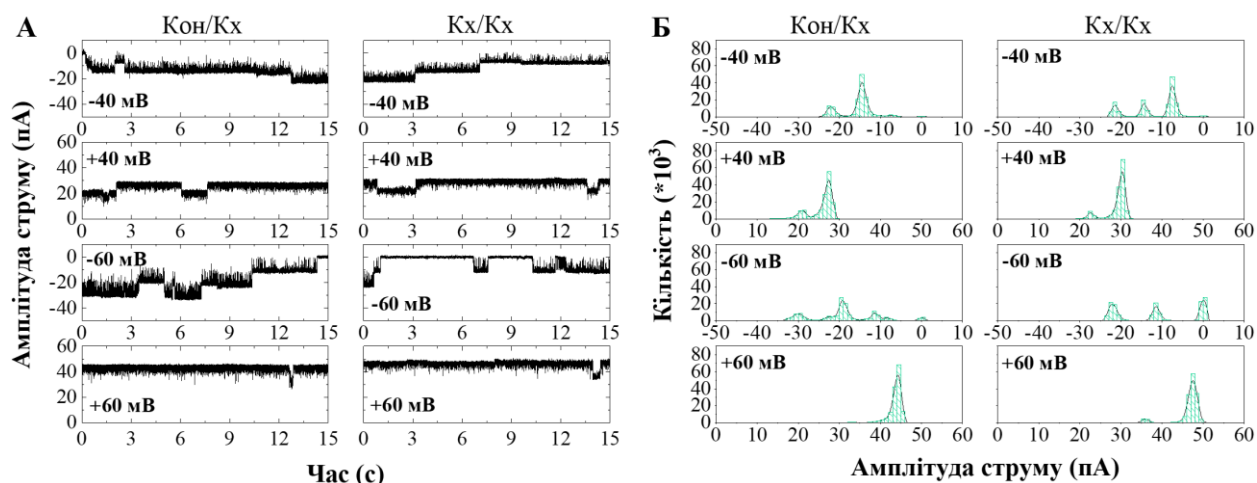


Рис. 3.7. Приклади реєстрацій струму крізь LCC-канали (А) і відповідні їм амплітудні гістограми (Б) при додаванні карбахолін хлориду в концентрації 1 ммоль/л до піпетки (Кон/Кх), а також до піпетки і до ванночки (Кх/Кх).

Як і раніше, репрезентативні фрагменти отриманих реєстрацій представлені на Рисунку 3.7А, а амплітудні діаграми на основі цих фрагментів показані на Рисунку 3.7Б. При потенціалі -60 мВ амплітуда зменшилася на 20,3% ($P < 0,001$), з $-14,57 \pm 0,18$ пА ($n = 8$) до $-11,61 \pm 0,47$ пА ($n = 7$); при потенціалі -40 мВ на 17,3% ($P < 0,05$), з $-9,67 \pm 0,10$ пА ($n = 8$) до $-8,00 \pm 0,51$ пА ($n = 8$); при потенціалі +40 мВ на 21,9% ($P < 0,001$), від $8,76 \pm 0,14$ пА ($n = 8$) до $6,84 \pm 0,34$ пА ($n = 7$); при потенціалі +60 мВ на 10,8% ($P < 0,05$), від $12,45 \pm 0,48$ пА ($n = 8$) до $11,11 \pm 0,23$ пА ($n = 6$). Зменшення амплітуди, яке спостерігали при додаванні карбахоліну в піпетку, залишалося незмінним при подальшому додаванні діючої речовини протоком у розчин у ванночці, що підтверджує результати, отримані на попередньому кроці. Така різниця в ефекті карбахоліну залежно від того, з якого боку мембрани його аплікували, може свідчити про те, що структура LCC-каналів також є гетерогенною залежно від сторони мембрани, і молекула карбахоліну має мотиви, які взаємодіють з перинуклеарною частиною цих каналів, але не з внутрішньоядерною.

На відміну від конфігурації, коли карбахолін додавали у ванночку, він не впливав на P_o LCC-каналів при аплікації за допомогою петч-піпетки. Однак,

як тільки карбахолін після цього додали у ванночку, значення P_o знижувалися з $0,20 \pm 0,03$ ($n = 7$) у конфігурації з карбахоліном в піпетці до $0,07 \pm 0,01$ ($n = 4$) у конфігурації з карбахоліном у піпетці та ванночці (зміна 65,0%; $P < 0,01$; мембранний потенціал -60 мВ). Ці результати додатково підтверджують гіпотезу про те, що здатність певних речовин модулювати амплітуду струму через LCC-канали та P_o цих каналів може бути незалежною одна від одної та опосередковуватися різними молекулярними механізмами. Графіки усередненої амплітуди струму крізь LCC-канали та їх P_o за конфігурації додавання речовини у піпетку показані на Рисунку 3.8.

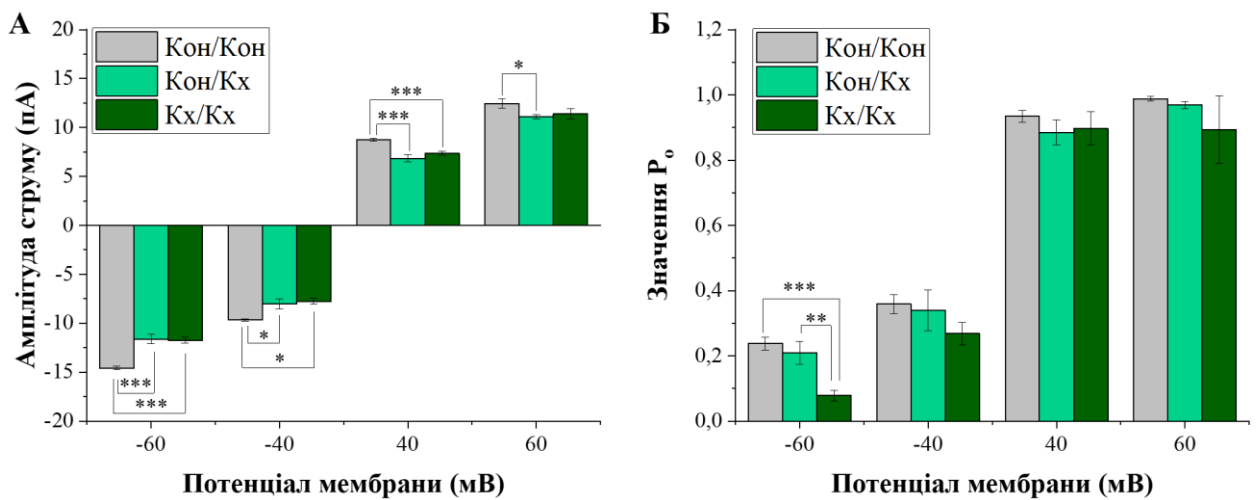


Рис. 3.8. Значення амплітуди струму крізь LCC-канали залежно від підтримуваного потенціалу (А) та ймовірність цих каналів бути у відкритому стані (Б) за умов контролю (Кон/Кон), при додаванні карбахолін хлориду в концентрації 1 ммоль/л до піпетки (Кон/Кх), та до ванночки зі зразком і піпетки (Кх/Кх). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Проміжні підсумки, які можна зробити на підставі досліджень дії карбахоліну на LCC-канали ядерної мембрани (Надтока та ін., 2025b; Надтока та ін., 2025c; Nadтока et al., 2025b), наступні:

1. Карбахолін у концентрації 1 ммоль/л не зменшує амплітуду струму крізь LCC-канали при додаванні у ванночку, але зменшує їх значення P_o на 30,4% при мембранному потенціалі -60 мВ.

2. При застосуванні через петч-піпетку карбахолін демонструє здатність зменшувати амплітуду іонного струму, опосередкованого LCC-каналами, при всіх підтримуваних потенціалах (на 17,3% при -40 мВ та на 21,9% при +40 мВ), але не впливає на P_o .

3.1.3. Властивості LCC-каналів під впливом мекаміламін гідрохлориду

Окрім дослідження дії агоністів нікотинових холінорецепторів, було вивчено також і вплив їх антагоністів, зокрема, мекаміламіну, на електрофізіологічні властивості LCC-каналів. Мекаміламін є біциклічною монотерпеноїдною молекулою, що містить систему з двох об'єднаних між собою кілець, та за своєю фізіологічною дією належить до антагоністів н-холінових рецепторів (Crooks et al., 2014). Відомо, що ця речовина широко використовувалася в медицині для лікування гіпертензії (McMahon, 2019). Мекаміламін пригнічує передачу сигналів у симпатичних гангліях, призводячи до розширення кровоносних судин і, таким чином, знижуючи тиск крові. Однак, терапевтична доза у 30 – 90 мг/день спричиняє також і ряд побічних ефектів, таких, як закреп, сухість у роті та затримка сечі. Внаслідок цього аспекту його дії, зараз мекаміламін рідко призначають пацієнтам і дана речовина використовується переважно з науковою метою. Тим не менше, нещодавні дослідження показали ефективність мекаміламіну при лікуванні тютюнової залежності, оскільки він, блокуючи фізіологічні ефекти нікотину, підвищує частоту випадків утримання від куріння (Crooks et al., 2014). Зниження дозування до 5 мг/день, тим часом, запобігає прояву побічних гангліонарних ефектів (Shytle et al., 2002).

В ході досліджень впливу мекаміламіну на LCC-канали встановлено, що заміна розчину у ванночці, в якій містилися ядра нейронів Пуркінє, на розчин цієї речовини з концентрацією 1 ммоль/л, призводила до статистично значущого зниження амплітуди струму крізь LCC-канали при негативних

потенціалах, а саме при -60 мВ та при -40 мВ. Репрезентативні фрагменти реєстрацій показано на Рисунку 3.9А, амплітудні діаграми на основі цих фрагментів представлено на Рисунку 3.9Б.

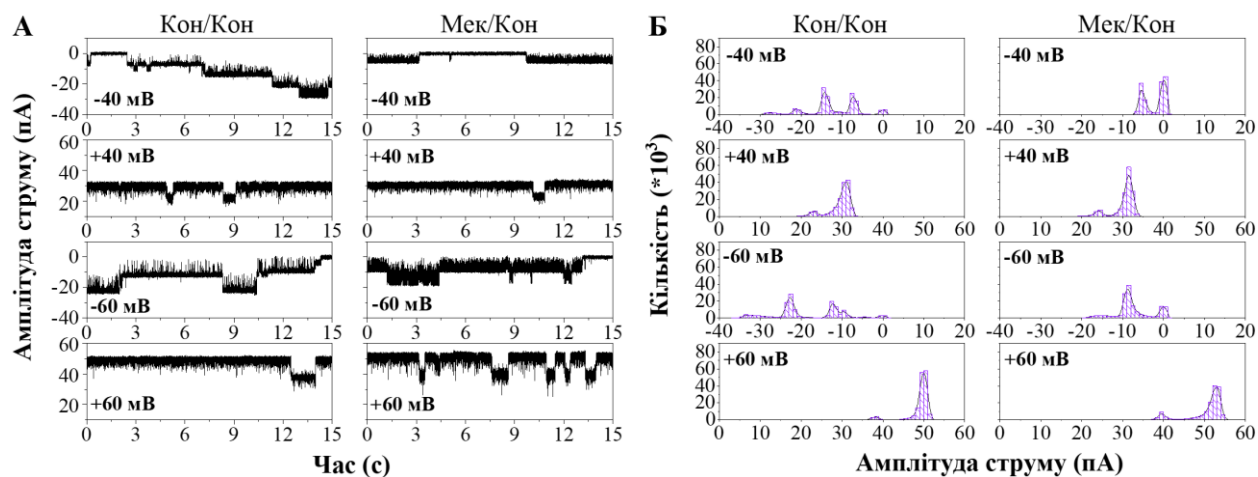


Рис. 3.9. Фрагменти отриманих реєстрацій струму крізь LCC-канали (А) та гістограми амплітуди струму на основі цих реєстрацій (Б) у контрольних умовах (Кон/Кон) та при застосуванні мекаміламін гідрохлориду в концентрації 1 ммоль/л у ванночку зі зразком (Мек/Кон).

За потенціалу -60 мВ, амплітуда струму крізь LCC-канали знижувалася з $-11,72 \pm 0,46$ пА ($n = 4$) у контролі до $-9,75 \pm 0,51$ пА ($n = 5$) у розчині мекаміламіну (зміна на 16,8%; $P < 0,05$). Крім цього, значення, отримані після відмивки досліджуваної речовини розчином на основі KCl ($-9,90 \pm 0,18$ пА), не відрізнялися суттєвим чином від тих, які спостерігалися безпосередньо після додавання цієї сполуки, що може свідчити про наявність тривалого ефекту мекаміламіну та про силу його зв'язування з LCC-каналами, однак кількість точок даних, отриманих після відмивки ($n = 2$), не дозволяє стверджувати це однозначно. Подібні результати спостерігалися і при застосуванні потенціалу -40 мВ. Так, амплітуда струму крізь LCC-канали у цьому випадку знижувалася від $-7,88 \pm 0,29$ пА ($n = 5$) у контролі до $-6,64 \pm 0,45$ пА ($n = 5$) в присутності мекаміламіну (зміна на 15,7%; $P < 0,05$). В той же час при потенціалах $+40$ мВ та $+60$ мВ амплітуда збільшувалася з

7,18 ± 0,34 пА (n = 5) до 7,62 ± 0,34 пА (n = 5) та з 11,35 ± 0,53 пА (n = 4) до 11,72 ± 0,41 пА (n = 4), що свідчить про зміну на 6,1% (P < 0,05) та 3,3% (P < 0,05) відповідно. Цей ефект не було описано для галаміну (Lunko & Lunko, 2020) чи нікотину (Котлярова та ін., 2019) – інших модуляторів ацетилхолінових рецепторів, дія яких на LCC-канали була досліджена раніше. Загальна тенденція, яку можна спостерігати на підставі отриманих результатів, полягає в тому, що мекаміламін у концентрації 1 ммоль/л знижує амплітуду струму крізь LCC-канали при негативних мембранних потенціалах на 16-17%, однак при позитивних потенціалах навпаки, призводить до слабо вираженого, однак статистично значущого збільшення амплітуди струму на 3-6%. Для пояснення цього ефекту потрібні подальші дослідження LCC-каналів, зокрема, молекулярні. Крім цього, як показано на Рисунку 3.9А, за дії мекаміламіну зареєстровано підвищення миготіння каналів, особливо виражене при -60 мВ. Цей процес супроводжується швидкими змінами між провідним і непровідним станами каналу і часто відображає механічне блокування його пори. Можна припустити, що мекаміламін не здатен до утворення достатньо стабільних зв'язків з поро-формуєчими або важливими для модуляції доменами LCC-каналів для того, щоб повністю елімінувати K⁺ струм.

Також встановлено, що при аплікації мекаміламіну у ванночку зі зразком відбувається зниження ймовірності перебування LCC-каналів у відкритому стані при підтримуваному потенціалі -40 мВ. При цьому значенні мембранного потенціалу виявлено статистично значуще зниження P_o від 0,49 ± 0,04 (n = 7) у контролі до 0,27 ± 0,07 (n = 5) у присутності мекаміламіну (зміна на 44,9%; P < 0,05). Варто зазначити, що при потенціалі -60 мВ також спостерігалася тенденція до зниження P_o LCC-каналів за дії мекаміламіну, однак подальший аналіз показав, що вона не є статистично значущою, оскільки одне з чотирьох отриманих значень суперечило цій закономірності. Зміни середніх значень ймовірності відкритого стану та амплітуди струму між описаними групами представлені на Рисунку 3.10.

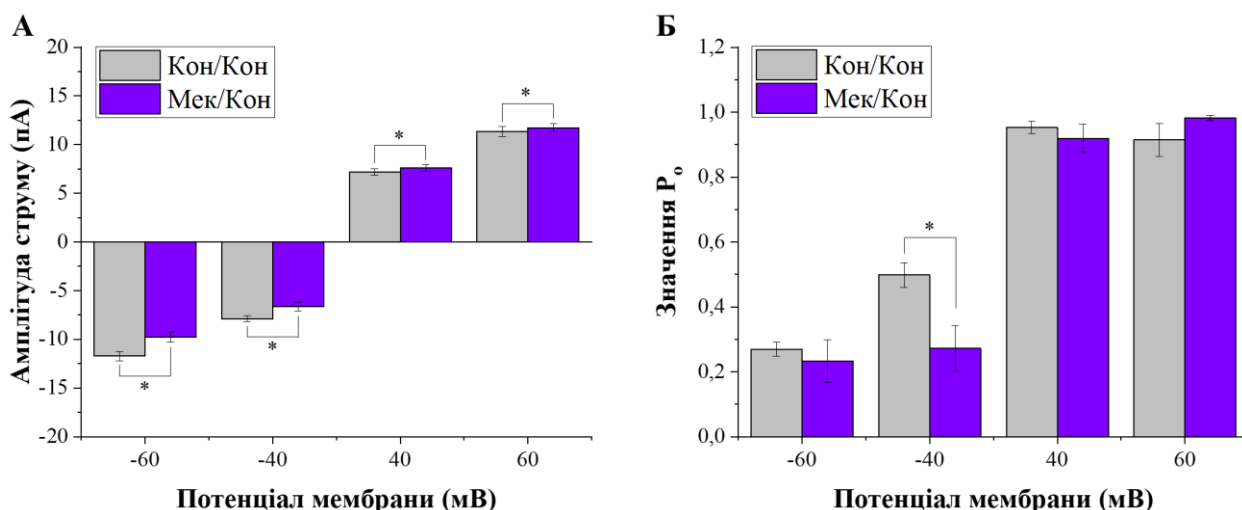


Рис. 3.10. Усереднені значення амплітуди струму крізь LCC-канали залежно від мембранного потенціалу (А) та ймовірність перебування цих каналів у відкритому стані (Б) у контролі (Кон/Кон) та при додаванні у ванночку зі зразком розчину мекаміламін гідрохлориду в концентрації 1 ммоль/л (Мек/Кон). * $P < 0,05$.

Узагальнюючи результати, отримані на цій стадії досліджень, можна стверджувати, що мекаміламін є відносно ефективним інгібітором LCC-каналів, здатним знижувати як амплітуду струму крізь ці канали, так і їх ймовірність перебувати у відкритому стані, однак останній з наведених ефектів спостерігали лише при потенціалі -40 мВ.

Для оцінки того, чи є відмінність у дії мекаміламіну залежно від того, з якого боку мембрани його застосовано, на наступному етапі речовину було апліковано через петч-піпетку, завдяки чому мекаміламін взаємодіяв із перинуклеарною стороною LCC-каналів, замість інтрануклеарної, як це було у випадку, коли речовину додавали безпосередньо у ванночку зі зразком. Репрезентативні фрагменти реєстрацій, отримані на цій стадії досліджень, показані на Рисунку 3.11.

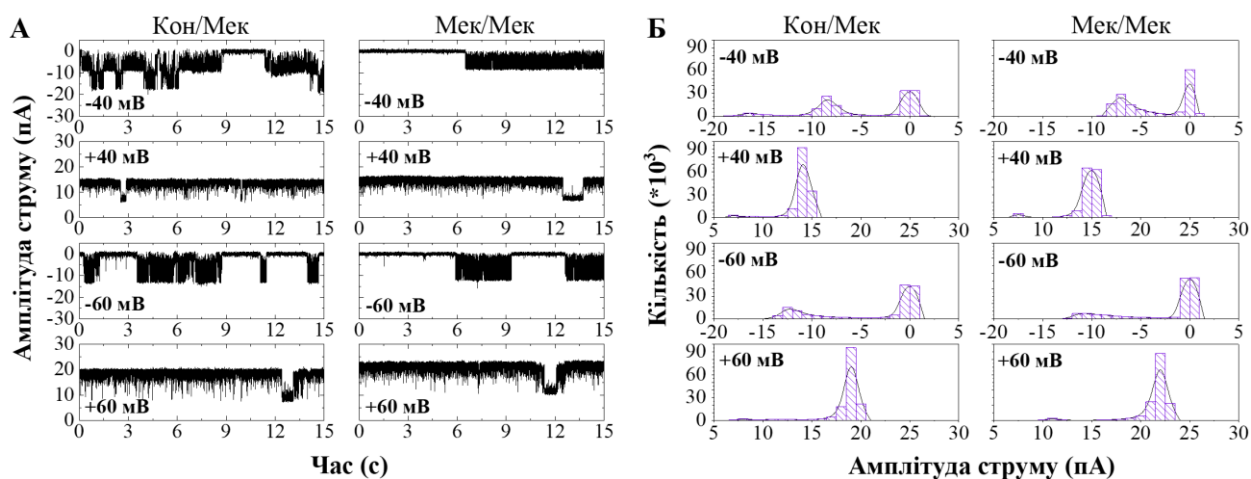


Рис. 3.11. Приклади отриманих реєстрацій іонного струму крізь LCC-канали (А) та відповідні їм амплітудні діаграми (Б) за різних значень мембранного потенціалу при додаванні мекаміламін гідрохлориду до піпетки (Кон/Мек) або до піпетки та ванночки (Мек/Мек) у концентрації 1 ммоль/л.

Коли мекаміламін у концентрації 1 ммоль/л було застосовано шляхом його додавання у розчин в петч-піпетці, виявлено статистично значуще зниження амплітуди струму крізь LCC-канали як при позитивних, так і при негативних мембранних потенціалах. При потенціалі -60 мВ, амплітуда знизилася на 13,7% ($P < 0,05$), з $-11,56 \pm 0,46$ пА ($n = 7$) до $-9,98 \pm 0,08$ пА ($n = 8$), та далі до $-7,99 \pm 0,13$ пА ($n = 2$) коли мекаміламін було додано з обох сторін ядерної мембрани, що відповідає зміні на 30,9%. При потенціалі -40 мВ спостерігали схожий ефект: зниження амплітуди з $-7,97 \pm 0,18$ пА ($n = 9$) до $-7,22 \pm 0,10$ пА ($n = 10$) коли мекаміламін було застосовано з одного боку (крізь петч-піпетку), що свідчить про зниження на 9,4% ($P < 0,01$), та до $-6,13 \pm 0,06$ пА ($n = 2$) коли досліджувана речовина була додана також і у ванночку та знаходилася з обох боків мембрани (тенденція до зменшення на 23,1%). Значущим було зниження амплітуди струму при застосуванні мекаміламіну з перинуклеарного боку і при позитивних потенціалах. Так, при потенціалі $+40$ мВ, зареєстровано зниження амплітуди від $7,51 \pm 0,37$ пА ($n = 6$) до $6,36 \pm 0,20$ пА ($n = 8$), що означає зміну на 15,3% ($P < 0,05$), і при потенціалі $+60$ мВ від $11,39 \pm 0,41$ пА ($n = 5$) до $9,67 \pm 0,23$ пА ($n = 8$), що

свідчить про зменшення на 15,1% ($P < 0,01$). Залежність середніх значень амплітуди струму від концентрації мекаміламіну та мембранного потенціалу представлена на Рисунку 3.12А.

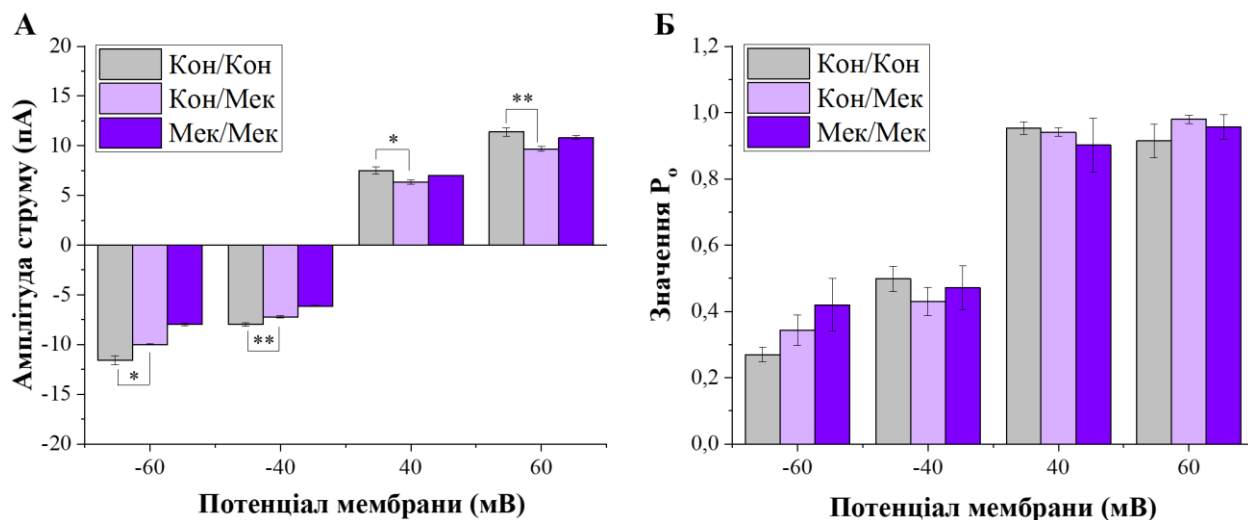


Рис. 3.12. Усереднені значення амплітуди струму через LCC-канали при різних значеннях потенціалу ядерної мембрани (А) та ймовірність цих каналів перебувати у відкритому стані (Б) у контрольних умовах (Кон/Кон), при додаванні мекаміламін гідрохлориду в концентрації 1 ммоль/л до піпетки (Кон/Мек), а також до піпетки і ванночки (Мек/Мек). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Варто зазначити, що ефект поступового зниження амплітуди струму, який спостерігали при аплікації мекаміламіну з обох боків мембрани, був присутнім лише при негативних мембранних потенціалах і не був виявлений на позитивних. Навпаки, коли досліджувана речовина була додана також і у ванночку зі зразком, то порівняно з даними, отриманими при додаванні мекаміламіну лише через піпетку, при позитивних значеннях потенціалу спостерігали зростання амплітуди до $7,02 \pm 0,02$ пА ($n = 2$) при +40 мВ (тенденція до зміни на 10,4%) та до $10,82 \pm 0,16$ пА ($n = 2$) при +60 мВ (тенденція до зміни на 11,9%), із реверсією майже до контрольних значень. І хоча потрібно зазначити, що лише для невеликої кількості ядер вдалося

отримати дані із застосуванням речовини з обох боків мембрани одночасно, загалом ці результати узгоджуються з тими, які було отримано на попередньому етапі експерименту, коли додавання мекаміламіну до ванночки зі зразком збільшувало амплітуду струму крізь LCC-канали при позитивних потенціалах і знижувало при негативних. Як і у випадку, коли мекаміламін було додано у ванночку, миготіння каналів спостерігали також і при аплікації речовини крізь піпетку. Цей ефект показано на Рисунку 3.11А, і його наявність може свідчити про те, що механічне блокування пори LCC-каналів є неспецифічним до сторони каналу.

На відміну від результатів, отриманих при додаванні мекаміламіну у ванночку, коли ця речовина була застосована з перинуклеарного боку мембрани, не було зареєстровано статистично значущого ефекту на ймовірність перебування LCC-каналів у відкритому стані, як зображено на Рисунку 3.12Б.

На підставі досліджень мекаміламіну (Надтока та ін., 2024а; Надтока та ін., 2025с; Nadтока et al., 2025а) можна зробити такі проміжні узагальнення:

1. Мекаміламін є інгібітором LCC-каналів середньої ефективності, який зменшує амплітуду K^+ струму через ці канали при негативних мембранних потенціалах і при додаванні у ванночку (на 15,7% при -40 мВ), а при позитивних значеннях потенціалу амплітуда струму через LCC-канали внаслідок дії даної речовини зростає (на 6,1% при +40 мВ).
2. Ефект мекаміламіну варіює залежно від сторони мембрани, на яку від діє, і при застосуванні речовини через петч-піпетку та впливі на перинуклеарну частину LCC-каналів він зменшує амплітуду струму як при позитивних (на 15,3% при +40 мВ), так і при негативних (на 9,4% при -40 мВ) мембранних потенціалах.
3. Мекаміламін знижує ймовірність перебування LCC-каналів у відкритому стані (на 44,9%), але лише при взаємодії з внутрішньоядерною стороною каналів та при мембранному потенціалі -40 мВ.

4. Вплив мекаміламіну супроводжується підвищенням миготінням LCC-каналів, що спостерігається як при додаванні цієї речовини до ванночки зі зразком, так і в піпетку.

3.1.4. Вплив панкуроній бромід на електрофізіологічні характеристики LCC-каналів

Вивчення впливу модуляторів холінорецепторів на LCC-канали ядерної мембрани було продовжене із використанням таких антагоністів н-холінорецепторів, як панкуроній бромід. Ця речовина є недеполяризуючим нейром'язовим блокатором, що зв'язується з нікотиновими холінорецепторами постсинаптичної мембрани, проявляючи таким чином конкурентний антагонізм щодо ацетилхоліну. Внаслідок цього відбувається запобігання деполаризації рухової кінцевої пластинки, що використовується при індукції м'язового розслаблення (Schilliger et al., 2023).

Як міорелаксант панкуроній використовується у хірургічній анестезії, де він прийшов на заміну раніше вживаному тубокурарину (Sakata & Ono, 2023), а також при іммобілізації тварин для їх подальшого транспортування (Schilliger et al., 2023). Крім цього, оскільки використання панкуронію індукує розслаблення дихальних м'язів, використання цієї сполуки часто зумовлює необхідність штучної вентиляції легень (Kernbach-Wighton et al., 2016), однак перші спроби використання нейром'язових блокаторів, таких як тубокурарин та панкуроній, були асоційовані з підвищенням смертності серед пацієнтів, тож пізніше було впроваджено введення неостигміну на завершальних етапах хірургічного втручання з метою реверсії дії цих міорелаксантів. Тим не менше, оскільки панкуроній виводиться з організму з сечею, особи зі нирковою дисфункцією навіть попри спроби реверсії за допомогою неостигміну часто продовжували страждати від його впливу на дихальну систему (Hunter & Vlobner, 2024).

Згідно з проведеними дослідженнями встановлено, що розчин панкуроній броміду з концентрацією діючої речовини 1 ммоль/л при додаванні у ванночку зі зразком значуще знижував амплітуду струму крізь LCC-канали як при негативних (-60 мВ, -40 мВ), так і при позитивних (+40 мВ) значеннях мембранного потенціалу. Приклади фрагментів отриманих реєстрацій та відповідні гістограми амплітуди струму наведено на Рисунку 3.13.

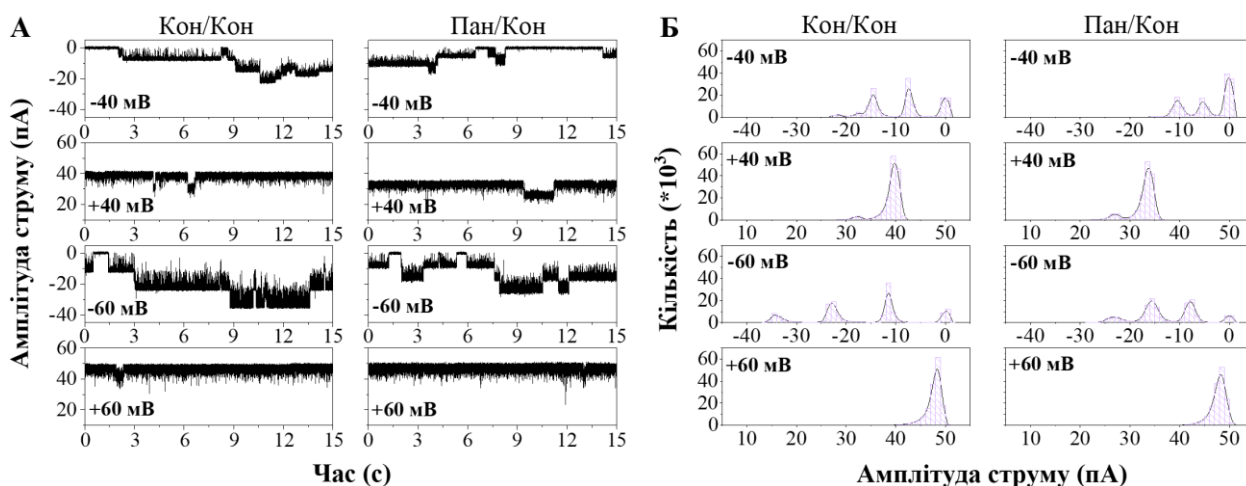


Рис. 3.13. Приклади реєстрацій струму крізь LCC-канали (А) та відповідні реєстраціям амплітудні діаграми (Б) в умовах контролю (Кон/Кон) та при додаванні 1 ммоль/л панкуроній броміду у ванночку (Пан/Кон).

При потенціалі -60 мВ встановлено зниження усередненої амплітуди струму з $-11,08 \pm 0,32$ пА ($n = 6$) у контролі до $-8,23 \pm 0,92$ пА ($n = 5$) за дії речовини (зменшення на 25,7%; $P < 0,05$), при потенціалі -40 мВ ця речовина знижувала амплітуду струму з $-7,17 \pm 0,15$ пА ($n = 11$) до $-5,14 \pm 0,26$ пА ($n = 7$), що свідчить про зменшення на 28,3% ($P < 0,001$), а при значенні підтримуваного потенціалу +40 мВ спостерігали зниження амплітуди з $7,65 \pm 0,17$ пА ($n = 9$) в контролі до $6,22 \pm 0,46$ пА ($n = 6$), яке відповідає зміні на 18,7% ($P < 0,05$).

Варто також зазначити, що зменшення значень цього параметру мало оборотний характер, і після заміни розчину панкуроній броміду на контрольний розчин шляхом перфузії ним зразка з ядрами, ці значення мали

тенденцію повертатися до вихідних. Так, при -40 мВ після відмивки розчину діючої речовини усереднена амплітуда струму становила $-7,16 \pm 0,27$ пА ($n = 7$), що є більшим на $39,3\%$ порівняно зі значеннями при додаванні панкуроній броміду у ванночку, а при $+40$ мВ амплітуда струму була $7,77 \pm 0,08$ пА ($n = 5$), що є більшим на $24,9\%$ порівняно зі значеннями із додаванням досліджуваної речовини. Подібний ефект спостерігали також і при -60 мВ, де після відмивки речовини усереднена амплітуда становила $-10,51 \pm 0,76$ пА ($n = 4$), на $27,7\%$ вищі значення при порівнянні з дослідною групою.

Попри виражений вплив на амплітуду струму крізь LCC-канали як за позитивних, так і за негативних значень мембранного потенціалу, зниження ймовірності цих каналів перебувати у відкритому стані за дії панкуроній броміду не встановлено. Потрібно зазначити, що попередня оцінка зміни P_o при -40 мВ із порівнянням контрольної і дослідної групи парним т-тестом все ж вказувала на наявність значущої зміни вказаного параметру із $P < 0,05$, однак, при подальшому дослідженні впливу різних концентрацій цієї речовини за допомогою ANOVA, внаслідок поправки на множинні порівняння різниці за концентрації 1 ммоль/л виявлено не було. Виходячи з того, що за наявності різних концентраційних груп їх порівняння з використанням ANOVA є коректнішим, було вирішено опиратися на отримані саме цим тестом результати при описі дії речовини.

Значення P_o , що відображають ймовірність перебування каналів у відкритому стані, а також усереднена амплітуда струму крізь LCC-канали залежно від речовини у ванночці зі зразком та підтримуваного потенціалу ядерної мембрани представлені на Рисунку 3.14.

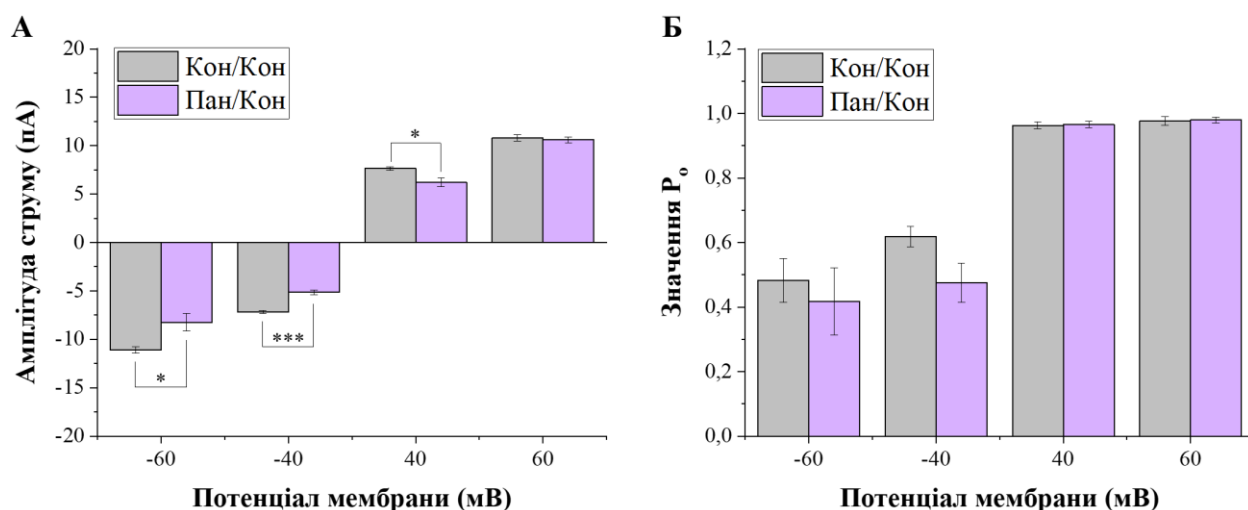


Рис. 3.14. Значення амплітуди струму крізь LCC-канали залежно від підтримуваного потенціалу (А) та ймовірність перебування цих каналів у відкритому стані (Б) у контрольних умовах (Кон/Кон) та при застосуванні панкуроній броміду в концентрації 1 ммоль/л у ванночку зі зразком (Пан/Кон). * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.

Також проведено дослідження концентраційної залежності ефекту панкуроній броміду на вищеописані електрофізіологічні параметри LCC-каналів при потенціалі -40 мВ. Згідно з результатами цих досліджень, встановлено, що мінімальна концентрація речовини, що за цих умов спричиняла статистично значуще зниження амплітуди струму крізь ці канали, становила 0,5 ммоль/л, при цьому усереднені значення амплітуди знизилися з $-7,17 \pm 0,15$ пА ($n = 11$) до $-6,39 \pm 0,22$ пА ($n = 3$) за дії панкуроній броміду (відмінність на 10,9%; $P < 0,01$). Нормалізовані значення амплітуди струму за різних концентрацій досліджуваної речовини представлені на Рисунку 3.15А. У цей же час ймовірність каналів перебувати у відкритому стані не зазнавала змін залежно від застосованої концентрації панкуроній броміду, як показано на Рисунку 3.15Б. Можна зробити спостереження, що панкуроній бромід специфічно впливає саме на амплітуду струму крізь LCC-канали і, ймовірно, не має молекулярних патернів, які забезпечували б регуляцію їх відкритого стану.

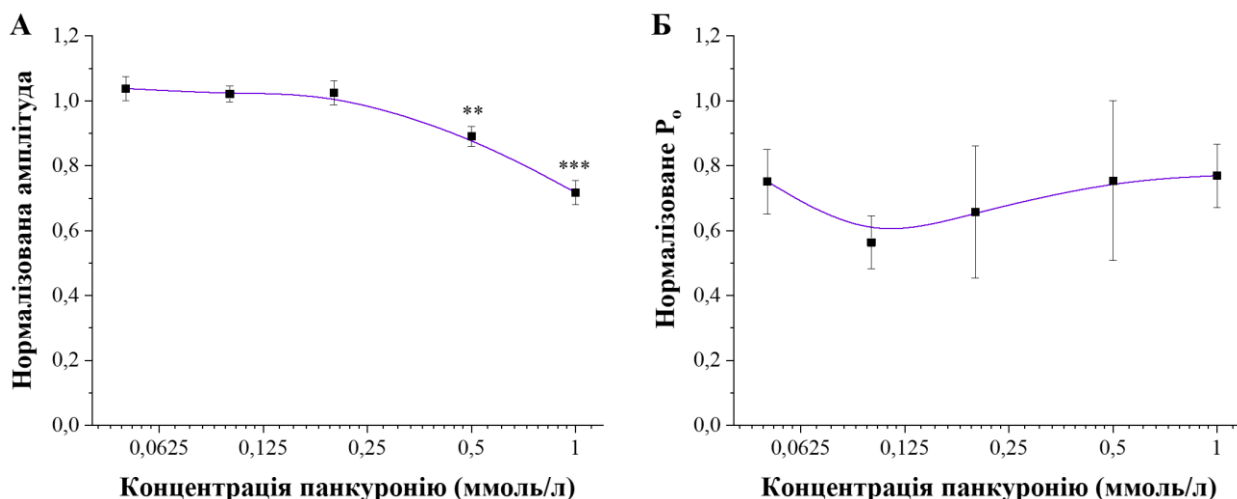


Рис. 3.15. Нормалізовані параметри амплітуди струму крізь LCC-канали (А) та їх ймовірність знаходитися у відкритому стані (Б) при додаванні різних концентрацій панкуроній броміду у ванночку зі зразком та фіксації мембранного потенціалу при значенні -40 мВ. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

З врахуванням отриманих даних (Котик та ін., 2025а; Надтока та ін., 2025с), можна зробити наступні попередні висновки щодо впливу панкуроній броміду на властивості LCC-каналів:

1. Панкуроній бромід (1 ммоль/л) зумовлює зниження амплітуди струму крізь LCC-канали як за позитивних, так і за негативних мембранних потенціалів, при цьому максимальна інгібувальна дія (зниження амплітуди на 28,3%) проявляється при потенціалі -40 мВ. Мінімальна концентрація цієї речовини серед досліджених, що зумовлює зменшення амплітуди струму крізь вказані канали становить 0,5 ммоль/л.
2. Панкуроній бромід не знижує ймовірність відкритого стану LCC-каналів незалежно від мембранного потенціалу (в межах діапазону -60 мВ – $+60$ мВ при концентрації 1 ммоль/л) та концентрації речовини (в межах 0,05 ммоль/л – 1 ммоль/л при -40 мВ).

3.1.5 Електрофізіологічні властивості LCC-каналів за дії векуроній броміду

Подібно до панкуронію, векуроній бромід також належить до недепоряризуючих нейром'язових блокаторів, і має схожу з ним структуру, а саме гідрофобний стероїдний кор та дві четвертинні амонійні групи, приєднані до нього. Попри цю подібність, дія векуронію є сильнішою порівняно з панкуронієм (Sakata & Ono, 2023). Впровадження векуроній броміду у медичну практику суттєво знизило частоту випадків залишкового нейром'язового блокування, оскільки елімінація цієї речовини з організму є менш залежною від нирок (Hunter & Blobner, 2024). Крім цього, було показано, що векуроній бромід запобігає м'язовим спазмам та постопераційній міалгії (Bayable et al., 2023), а у комбінації з атракуріумом проявляє синергійний ефект, суттєво підвищуючи тривалість нейром'язової блокади (Palem Reshmika et al., 2023). Окрім використання цієї сполуки під час загальної анестезії при ендотрахіальній інтубації, векуроній застосовується у комбінації з мідазоламом та KCl для здійснення летальної ін'єкції у деяких штатах Америки (Isaacs et al., 2023).

Дослідження дії векуроній броміду на LCC-канали показало, що ця речовина у концентрації 1 ммоль/л призводить до значного зниження амплітуди струму крізь ці канали за всіх досліджених мембранних потенціалів. Реєстрації струму крізь ці канали за контрольних умов та після додавання вказаної речовини наведені на Рисунку 3.16.

Під час аналізу результатів, отриманих із застосуванням векуроній броміду, привертає увагу, що за ефективністю зменшення значень цього параметру дія вказаної речовини є більш вираженою, ніж у будь-якого з досліджених у цій роботі н-холіномодуляторів. Так, при негативних потенціалах векуроній бромід спричинив зниження амплітуди струму крізь LCC-канали з $-11,09 \pm 0,38$ пА ($n = 5$) до $-5,45 \pm 0,58$ пА ($n = 4$), що вказує на зменшення на 50,9% ($P < 0,001$), та з $-7,49 \pm 0,25$ пА ($n = 8$) до $-4,36 \pm 0,30$ пА

(n = 8), відображаючи зміну на 41,8% ($P < 0,001$) за значень потенціалу ядерної мембрани -60 мВ та -40 мВ відповідно.

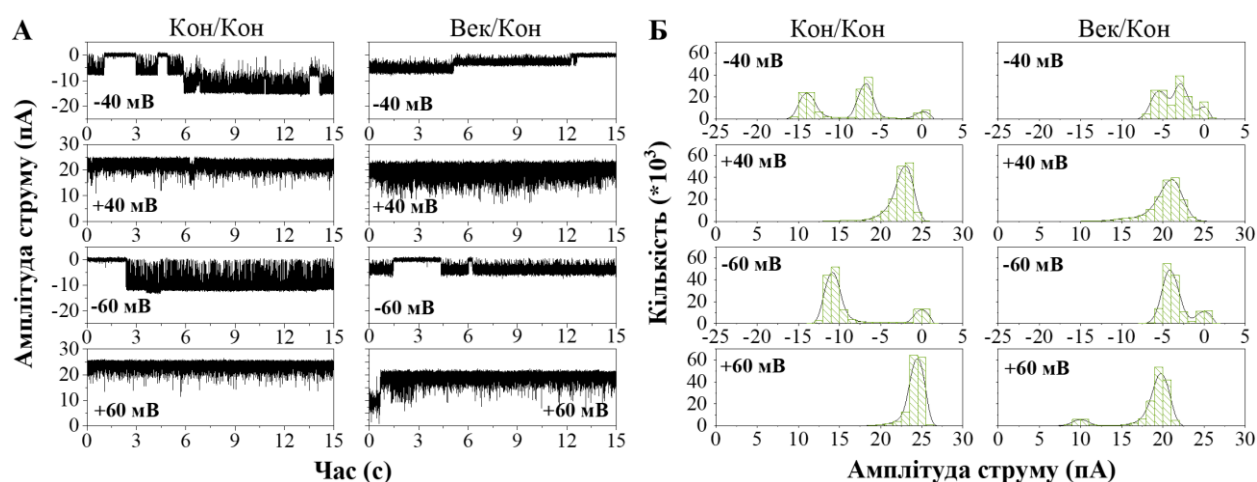


Рис. 3.16. Фрагменти типових реєстрацій струму крізь LCC-канали (А) та гістограми значень амплітуди іонного струму (Б) за умов контролю (Кон/Кон) та при додаванні у ванночку зі зразком векуроній броміду в концентрації 1 ммоль/л (Век/Кон).

При цьому дія вказаної речовини була оборотною, і після її відмивки контрольним розчином КСІ значення амплітуди струму поверталися до близьких до початкових, а саме до $-11,01 \pm 0,33$ пА ($n = 4$) при -60 мВ та $-7,38 \pm 0,39$ пА ($n = 6$) при -40 мВ. Подібний ефект спостерігали і при позитивних потенціалах, хоч і виражений він був меншою мірою. При потенціалі ядерної мембрани +40 мВ амплітуда струму крізь LCC-канали знизилася з $7,49 \pm 0,10$ пА ($n = 8$) у контролі до $6,10 \pm 0,04$ пА ($n = 5$) за дії векуроній броміду (зміна на 18,6%; $P < 0,001$), і після відмивки повернулася до $7,76 \pm 0,09$ пА ($n = 5$). В той же час при потенціалі +60 мВ при додаванні цієї речовини значення амплітуди знизилися з $11,06 \pm 0,21$ пА ($n = 5$) до $9,61 \pm 0,22$ пА ($n = 4$), відповідаючи зміні на 13,1% ($P < 0,01$), із подальшим збільшенням до $10,57 \pm 0,93$ пА ($n = 3$) та наближенням до вихідних значень після заміни розчину векуроній броміду у ванночці на контрольний розчин. Усереднені значення амплітуди струму за кожного зі згаданих потенціалів та

статистична різниця між групами за цим параметром наведена на Рисунку 3.17А. Цікавим є те, що попри виражений вплив на амплітуду струму крізь LCC-канали, векуроній, як і описаний попередньо панкуроній, не призводив до значущої зміни ймовірності їх перебування у відкритому стані при жодному з підтримуваних потенціалів, як зображено на Рисунку 3.17Б.

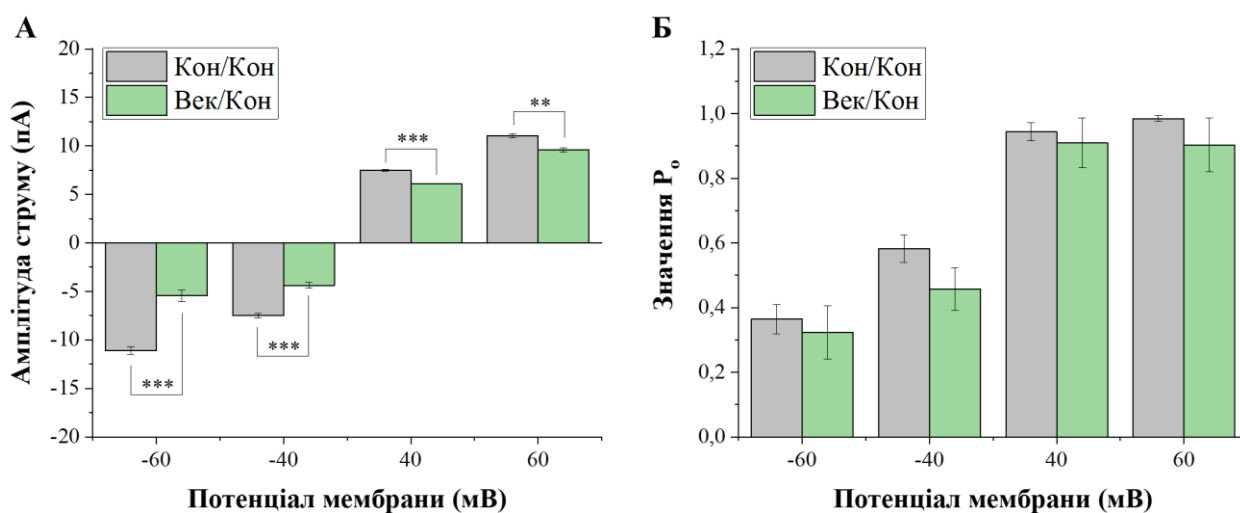


Рис. 3.17. Амплітуда іонного струму крізь LCC-канали за різних значень мембранних потенціалів (А) та ймовірність цих каналів бути у відкритому стані (Б) в контрольних умовах (Кон/Кон) та при застосуванні векуроній броміду у концентрації 1 ммоль/л у ванночку зі зразком (Век/Кон). ** P < 0,01; *** P < 0,001.

При потенціалі -60 мВ P_o цих каналів за дії вказаної речовини у концентрації 1 ммоль/л становило 0,32 ± 0,08 (n = 4), при потенціалі -40 мВ отримано значення 0,45 ± 0,06 (n = 8), при потенціалі +40 мВ значення P_o становили 0,90 ± 0,07 (n = 5), а при +60 мВ встановлено, що P_o LCC-каналів відповідає 0,90 ± 0,08 (n = 3). Варто зазначити, що при негативних значеннях потенціалу все ж спостерігалася певна тенденція до зменшення ймовірності відкритого стану, зокрема при -40 мВ, але вона не була підтверджена статистичними методами (P = 0,0764).

Додатково при дослідженні ефектів векуронію було звернено увагу на залежність ефектів цієї речовини від її застосованої концентрації при значенні мембранного потенціалу -40 мВ. Встановлено, що мінімальною її концентрацією, що спричиняє статистично значуще зменшення амплітуди струму крізь LCC-канали за вказаних умов, є $0,2$ ммоль/л. При цьому амплітуда знижувалася на $4,8\%$ ($P < 0,01$), з $-7,49 \pm 0,25$ пА ($n = 8$) до $-7,13 \pm 0,32$ пА ($n = 4$). Зі збільшенням концентрації векуронію амплітуда струму продовжувала поступово знижуватися, як показано на Рисунку 3.18А. Водночас значення ймовірності відкритого стану LCC-каналів не зазнавали статистично значущих змін (Рисунок 3.18Б), підтверджуючи дані, отримані на попередньому етапі досліджень.

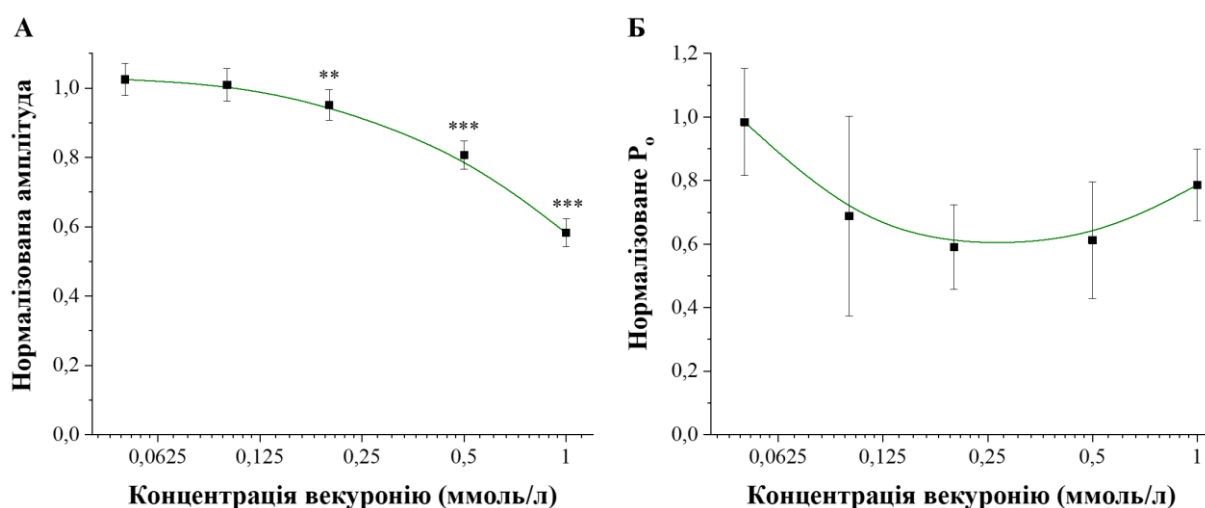


Рис. 3.18. Нормалізована амплітуда струму крізь LCC-канали (А) та ймовірність їх перебування у відкритому стані (Б) при застосуванні різних концентрацій векуроній броміду та фіксації мембранного потенціалу при -40 мВ. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Описані результати викладені у публікаціях (Котик та ін., 2025b; Надтока та ін., 2025c) та можуть узагальнені наступним чином:

1. Векуроній бромід у концентрації 1 ммоль/л суттєво знижує амплітуду струму крізь LCC-канали як при позитивних (на $13,1\%$ при $+60$ мВ), так і при негативних потенціалах (на $50,9\%$ при -60 мВ).

2. Векуроній бромід не впливає на ймовірність LCC-каналів перебувати у відкритому стані незалежно від мембранного потенціалу (в діапазоні значень підтримуваного потенціалу -60 мВ – +60 мВ при концентрації 1 ммоль/л) та концентрації досліджуваної речовини (при -40 мВ в межах концентрацій 0,05 ммоль/л – 1 ммоль/л).
3. Мінімальною концентрацією векуроній броміду, що спричиняє зниження амплітуди струму крізь LCC-канали при мембранному потенціалі -40 мВ за досліджуваних умов, є 0,2 ммоль/л.

3.1.6. Підсумки досліджень впливу модуляторів нікотинових холінорецепторів на LCC-канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє

Отримані результати досліджень впливу ацетилхолін хлориду, карбахолін хлориду, мекаміламін гідрохлориду, панкуроній броміду та векуроній броміду узагальнені в підсумовуючих таблицях 3.1 та 3.2.

Таблиця 3.1. Зміни електрофізіологічних параметрів функціонування LCC-каналів за додавання модуляторів нікотинових холінорецепторів в концентрації 1 ммоль/л у ванночку. А – амплітуда струму; P_o – ймовірність відкритого стану каналів.

Речовина	Підтримуваний потенціал мембрани			
	-60 мВ	-40 мВ	+40 мВ	+60 мВ
Мекаміламін	A ↓16,8%	A ↓15,7% P _o ↓44,9%	A ↑6,1%	A ↑3,3%
Ацетилхолін	A ↓6,8% P _o ↓41,2%	A ↓6,0% P _o ↓39,4%	Без змін	Без змін
Карбахолін	P _o ↓30,4%	Без змін	Без змін	Без змін
Панкуроній	A ↓25,7%	A ↓28,3%	A ↓18,7%	Без змін
Векуроній	A ↓50,9%	A ↓41,8%	A ↓18,6%	A ↓13,1%

Таблиця 3.2. Зміни характеристик LCC-каналів при застосуванні модуляторів нікотинових холінорецепторів в концентрації 1 ммоль/л у піпетку. А – амплітуда струму; P_o – ймовірність відкритого стану каналів.

Речовина	Підтримуваний потенціал мембрани			
	-60 мВ	-40 мВ	+40 мВ	+60 мВ
Мекаміламін	A ↓13,7%	A ↓9,4%	A ↓15,3%	A ↓15,1%
Ацетилхолін	A ↓19,9% P _o ↑106,7%	A ↓25,4% P _o ↑40,6%	A ↓18,3%	A ↓15,8%
Карбахолін	A ↓20,3%	A ↓17,3%	A ↓21,9%	A ↓10,8%

Статті, в яких опубліковані основні наведені у підрозділі результати:

1. Nadtoka S, Kotyk O, Protsenko K, Kotliarova A. Effects of mecamylamine on the electrophysiological properties of LCC-channels in rat cerebellar Purkinje neurons. *Fiziol Zh.* 2025; 71(5): 22-30. <https://doi.org/10.15407/fz71.05.022>.

2. Nadtoka S, Kotyk O, Tarnopolska O, Kotliarova A. Effects of acetylcholine and carbachol on nuclear large conductance cation channels in rat cerebellar Purkinje neurons. *Fiziol Zh.* 2025; 71(6): 67-77. <https://doi.org/10.15407/fz71.06.067>.

Тези доповідей:

1. Надтока С., Котик О., Проценко К., Котлярова А. Вплив мекамеламіну на LCC-канали нейронів Пуркін'є мозочка щурів. Тези доповідей Міжнародної конференції з нейронаук та Наукових читань, присвячених вісцеральній фізіології та патофізіології; 2024 лис 19 – 21; Київ, Україна. *Фізіол. журн.* 2024;70(5):68.

2. Надтока С., Проценко К., Котик О., Котлярова А. Вплив ацетилхоліну на LCC-канали нейронів Пуркін'є мозочка щурів. Молодь і поступ біології: збірник тез XXI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів; 2025 кві 28 – тра 1; Львів, Україна. Львів; 2025, с. 47 – 48.

3. Надтока С., Котик О., Проценко К., Котлярова, А. Вплив карбахоліну на LCC-канали нейронів Пуркін'є мозочка щурів. Тези доповідей XXIII

Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених; 2025 тра 15 – 16; Львів, Україна. Біологія тварин. 2025;27(2):63.

4. Котик О.А., Надтока С.О., Проценко К.М., Котлярова А.Б., Марченко С.М. Вплив векуронію броміду на високопровідні катіонні канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка. Тези доповідей ІХ Міжнародної наукової конференції «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології»; 2025 жов 21 – 25; Київ, Україна. Київ; 2025, с. 50.

5. Надтока С., Котик О., Котлярова А. Ефект модуляторів холіно- та адренорецепторів на властивості LCC-каналів нейронів Пуркінє мозочка. Школа-воркшоп «Сучасні методи в нейронауках»; 2025 жов 28 – 29; Київ, Україна. Фізіол. журн. 2025;71(5S):1-18.

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

3.2. Вплив модуляторів мускаринових холінорецепторів на властивості LCC-каналів

Враховуючи результати дослідження дії модуляторів нікотинових ацетилхолінових рецепторів, згідно з якими багато сполук цього класу виявило здатність ефективно інгібувати електрофізіологічну активність LCC-каналів, наступним закономірним кроком було перевірити, чи притаманні подібні властивості модуляторам мускаринових ацетилхолінових рецепторів. Як представників цієї групи речовин для досліджень використано атропін, платифілін та пілокарпін.

3.2.1. Дія атропін сульфату на електрофізіологічні характеристики LCC-каналів

Атропін належить до неспецифічних блокаторів мускаринових холінорецепторів (Lochner & Thompson, 2016; Upadhyay & Weuerman, 2020), що синтезується рослинами родини *Solanaceae*, зокрема, беладоною звичайною (*Atropa belladonna*). Ця речовина використовується у медичній практиці при брадикардії (Aldossary, 2022), та для полегшення болю при іридоцикліті - запаленні райдужної оболонки ока (Kaiti, 2022). Згідно з нещодавніми дослідженнями, атропін також був визнаний ефективним для контролю прогресії міопії у дітей (Hou et al., 2023; Moriche-Carretero et al., 2024), однак через 10-20 років після застосування цієї речовини в дитячому віці різниця у вираженості міопії між групами з використанням плацебо та атропіну зникає, тож у довгостроковій перспективі ефективність атропіну є дискусійною (Li et al., 2024). До найпоширеніших побічних ефектів атропіну належить прискорене серцебиття, конвульсії, марення, пригнічене слиновиділення та бронхіальна секреція (Aldossary, 2022), а при застосуванні атропіну у складі крапель для очей – світлочутливість і розмите поле зору (Hou et al., 2023). Цікавою особливістю цієї речовини є те, що вона проявляє конкурентний антагонізм також і до 5-HT₃ рецепторів завдяки своїй структурній подібності до їх лігандів (Lochner & Thompson, 2016).

При дослідженні впливу цієї речовини на іонні канали ядерної мембрани встановлено, що при аплікації у ванночку зі зразком та, відповідно, взаємодії цієї речовини з внутрішньоядерною стороною каналів, вона призводить до зменшення амплітуди струму крізь LCC-канали за негативних потенціалів ядерної мембрани. Приклади фрагментів реєстрацій та амплітудні діаграми на їх основі показані на Рисунку 3.19А та 3.19Б відповідно.

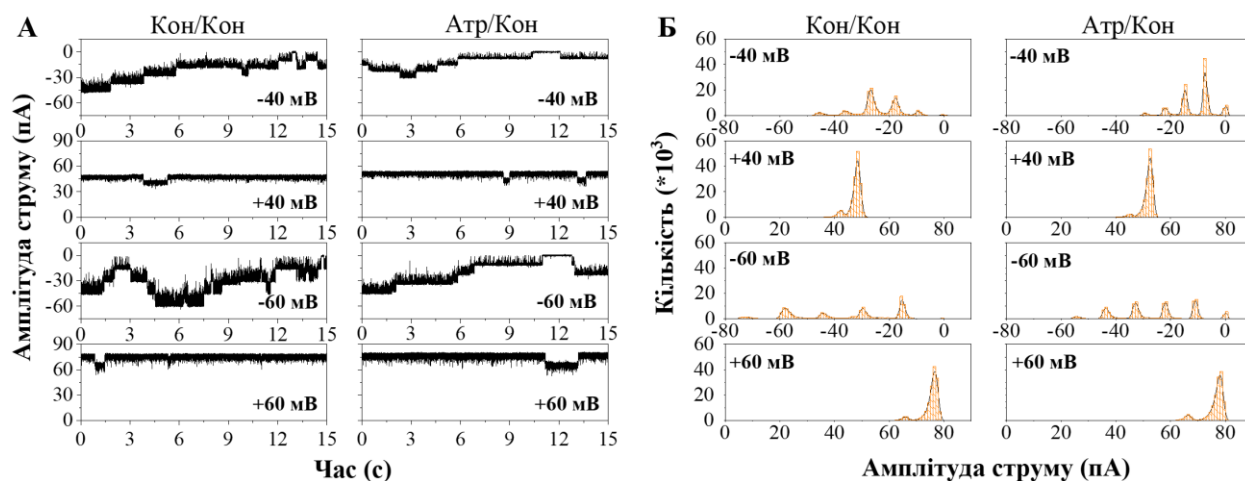


Рис. 3.19. Репрезентативні реєстрації іонного струму крізь LCC-канали (А) та амплітудні гістограми для відповідних реєстрацій (Б) в умовах контролю (Кон/Кон) та при додаванні атропін сульфату в концентрації 1 ммоль/л до ванночки (Атр/Кон).

При потенціалі -60 мВ амплітуда струму знизилася з $-12,94 \pm 0,28$ пА ($n = 14$) в контролі до $-10,35 \pm 0,24$ пА ($n = 9$) в розчині атропіну з концентрацією 1 ммоль/л (зміна на 20,0%; $P < 0,001$). Подібні результати спостерігалися і при потенціалі -40 мВ. У цьому випадку амплітуда струму зменшилася з $-8,25 \pm 0,18$ пА ($n = 19$) до $-6,62 \pm 0,16$ пА ($n = 13$), що відповідає зміні на 19,8% ($P < 0,001$). При обох потенціалах інгібування не було необоротним, враховуючи, що після відмивки атропіну контрольним розчином КСІ амплітуда становила $-12,43 \pm 0,24$ пА ($n = 7$) при -60 мВ та $-7,59 \pm 0,24$ пА ($n = 11$) при -40 мВ, таким чином наблизившись до своїх початкових показників (значення більші на 20,1% та 14,7% для -60 мВ та -40 мВ відповідно порівняно з результатами, отриманими за додавання атропіну в концентрації 1 ммоль/л до ванночки). Однак, за дії атропіну жодних змін не було виявлено при позитивних значеннях потенціалу мембрани. Амплітуда струму при $+40$ мВ залишалася в межах 7-8 пА, а при потенціалі $+60$ мВ становила 11-12 пА як у контролі, так і під впливом атропіну, що є типовими значеннями амплітуди струму крізь LCC-канали згідно з результатами описаних у попередніх розділах досліджень.

Окремо варто зазначити, що дія атропіну супроводжувалася незначним миготінням LCC-каналів, однак цей ефект спостерігали не на всіх записах і був зафіксований лише при візуальних спостереженнях реєстрації струму при здійсненні експериментів, без подальшого кількісного аналізу.

Крім зміни амплітуди струму, встановлено статистично значуще зниження значень P_o при потенціалі -40 мВ, із $0,38 \pm 0,03$ ($n = 16$) у контрольному розчині KCl до $0,28 \pm 0,05$ ($n = 11$) з атропіном у ванночці (зміна на 26,3%; $P < 0,01$). При потенціалі -60 мВ також спостерігали тенденцію до зниження P_o , однак внаслідок того, що одне із зареєстрованих значень ймовірності відкритого стану цій тенденції суперечило, зміна не була визнана значущою ($P = 0,0574$). Результати оцінки ймовірності перебування LCC-каналів у відкритому стані та амплітуди струму крізь них показані на Рисунку 3.20.

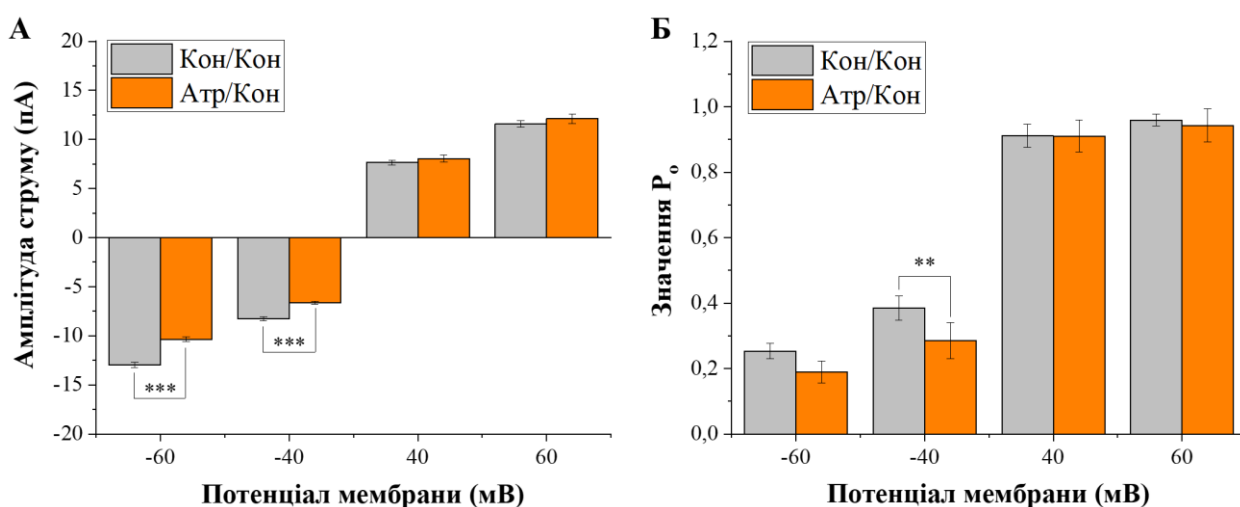


Рис. 3.20. Усереднені значення амплітуди струму крізь LCC-канали (А) та ймовірність їх перебування у відкритому стані (Б) в контролі (Кон/Кон) та при додаванні атропін сульфату в концентрації 1 ммоль/л у ванночку зі зразком (Атр/Кон). ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

При мембранних потенціалах +40 мВ та +60 мВ змін P_o не виявлено, і LCC-канали були переважно відкриті ($P_o > 0,8$). Такі значення є характерними для цих каналів, були описані раніше (Fedorenko & Marchenko, 2014) та в подальшому підтверджені для нейронів та кардіоміоцитів (Nadtoka et al., 2023). Досі жодна речовина не продемонструвала здатності пригнічувати P_o LCC-каналів при позитивних мембранних потенціалах.

На наступному етапі вивчено вплив атропіну (1 ммоль/л) при додаванні до петч-піпетки задля оцінки його інгібувальних властивостей при взаємодії з перинуклеарною стороною LCC-каналів. У цій конфігурації зареєстровано статистично значуще зниження амплітуди струму як при негативних, так і при позитивних потенціалах. При мембранному потенціалі +40 мВ амплітуда струму крізь LCC-канали знизилася з $7,66 \pm 0,43$ пА ($n = 16$) в контролі до $5,86 \pm 0,26$ пА ($n = 4$) при додаванні атропіну до піпетки (зміна на 23,5%; $P < 0,001$). При потенціалі +60 мВ амплітуда зменшилася з $11,58 \pm 0,54$ пА ($n = 14$) в контролі до $9,08 \pm 0,37$ пА ($n = 4$) з атропіном у піпетці (зміна на 21,6%; $P < 0,001$). Коли на наступному кроці розчин атропіну (1 ммоль/л) було додано також у ванночку зі зразком (і таким чином він взаємодіяв як з внутрішньоядерними так і з перинуклеарними доменами каналів), подальшого зниження при потенціалах +40 мВ та +60 мВ не спостерігали, що підтверджує результати, отримані на попередньому етапі, із розчином KCl у піпетці. Аплікація атропіну (1 ммоль/л) через петч-піпетку призвела до зменшення амплітуди струму і при мембранному потенціалі -60 мВ. За контрольних умов амплітуда струму становила $-12,94 \pm 0,47$ пА ($n = 14$) та знизилася до $-11,36 \pm 0,51$ пА ($n = 4$) з атропіном у піпетці (зміна на 12,2%; $P < 0,05$). Також спостерігалася тенденція до зниження амплітуди при потенціалі -40 мВ, але ці спостереження не мали статистичного підтвердження. Приклади отриманих на цій стадії реєстрацій струму наведено на Рисунку 3.21.

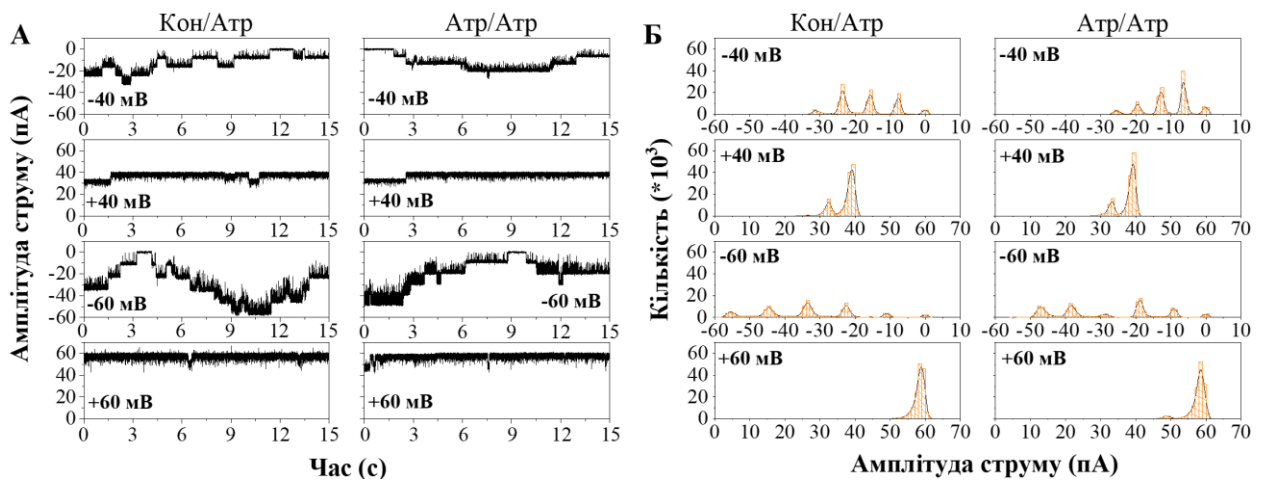


Рис. 3.21. Фрагменти отриманих реєстрацій струму крізь LCC-канали при різних мембранних потенціалах (А) та відповідні реєстраціям амплітудні діаграми (Б) при додаванні атропін сульфату в концентрації 1 ммоль/л до петч-піпетки (Кон/Атр), та до петч-піпетки і ванночки зі зразком (Атр/Атр).

Подальше додавання атропіну (1 ммоль/л) у ванночку призвело до значного зменшення амплітуди струму як при -40 мВ, так і при -60 мВ. При мембранному потенціалі -40 мВ значення амплітуди в конфігурації додавання атропіну (1 ммоль/л) як у ванночку так і в піпетку, становили $-6,48 \pm 0,27$ пА ($n = 3$), що свідчить про зниження значень на 22,2% порівняно з контролем ($P < 0,01$). При -60 мВ амплітуда струму за цих умов знизилася до $-9,30 \pm 0,28$ пА ($n = 3$), що свідчить про зміну на 28,1% порівняно з контролем ($P < 0,001$).

Визначення ймовірності перебування LCC-каналів у відкритому стані показало, що атропін у концентрації 1 ммоль/л не впливає на P_o цих каналів при додаванні через піпетку, на відміну від результатів отриманих при додаванні цієї речовини безпосередньо у ванночку зі зразком. Однак, коли атропін (1 ммоль/л) додатково аплікували у ванночку, було помічено зниження значень P_o при -40 мВ. При цьому потенціалі ймовірність перебування LCC-каналів у відкритому стані знизилася з $0,38 \pm 0,03$ ($n = 16$) у контролі до $0,28 \pm 0,02$ ($n = 2$) при додаванні атропіну як у ванночку, так і в піпетку (зміна на 26,3%), однак внаслідок незначного розміру вибірки проведення оцінки статистичної значущості такої зміни було б некоректним.

На противагу цьому, коли атропін додавали лише через петч-піпетку, значення P_o LCC-каналів становили $0,40 \pm 0,03$ ($n = 3$). Усереднені значення P_o та амплітуди струму крізь канали для цієї конфігурації показані на Рисунку 3.22.

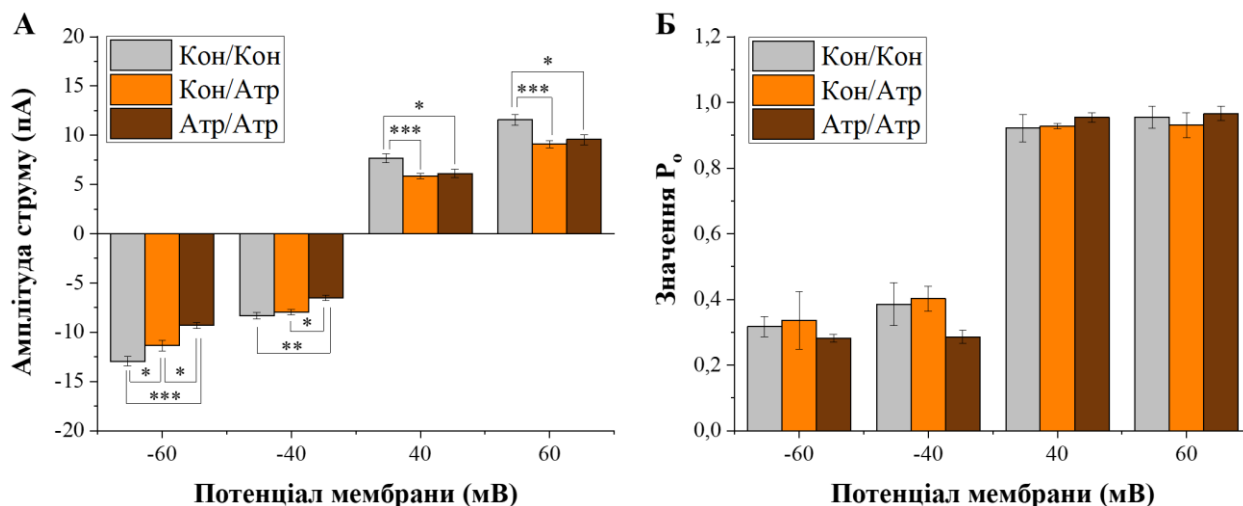


Рис. 3.22. Амплітуда іонного струму крізь LCC-канали залежно від підтримуваного потенціалу (А) та ймовірність відкритого стану цих каналів (Б) за умов контролю (Кон/Кон), при додаванні атропін сульфату в концентрації 1 ммоль/л до петч-піпетки (Кон/Атр), та до петч-піпетки і ванночки (Атр/Атр). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Ці дані узгоджуються з результатами, описаними для попереднього етапу дослідження, і можуть свідчити про те, що атропін здатний змінювати P_o LCC-каналів лише при взаємодії з їхніми внутрішньоядерними доменами, оскільки вони є єдиними в межах петчу, що зазнають впливу досліджуваного розчину при його аплікації у ванночку. Як можлива причина цього ефекту може бути розглянуте припущення, що структурні патерни молекули атропіну, відповідальні за модуляцію P_o , сумісні лише з унікальними для внутрішньоядерних доменів патернами LCC-каналів.

Додатково було вивчено залежність між концентрацією атропіну та амплітудою струму через LCC-канали і встановлено, що при потенціалі ядерної мембрани -40 мВ розчин атропіну, доданий до ванночки зі зразком у

концентрації 0,2 ммоль/л, не викликає статистично значущих змін амплітуди, водночас при концентрації 0,5 ммоль/л амплітуда струму зменшилася до $-7,67 \pm 0,11$ пА ($n = 4$), що відповідає зміні на 7,0% порівняно з контролем ($P < 0,05$). Збільшення концентрації речовини до 2 ммоль/л (результати для 1 ммоль/л описані в попередній серії експериментів) призвело до зменшення амплітуди до $-6,42 \pm 0,28$ пА ($n = 10$), що свідчить про зниження на 22,2% порівняно з контролем ($P < 0,001$). Однак, цей результат значуще не відрізнявся від значень, отриманих при концентрації 1 ммоль/л.

Водночас встановлено, що атропін не впливає на ймовірність відкритого стану LCC-каналів за концентрацій 0,2 ммоль/л та 0,5 ммоль/л, і спостережувана під час досліджень тенденція до зниження P_o не була підтверджена статистичним аналізом. Графіки залежності нормалізованих значень амплітуди струму та ймовірності відкритого стану LCC-каналів від застосованої концентрації атропіну представлені на Рисунках 3.23А та 3.23Б відповідно.

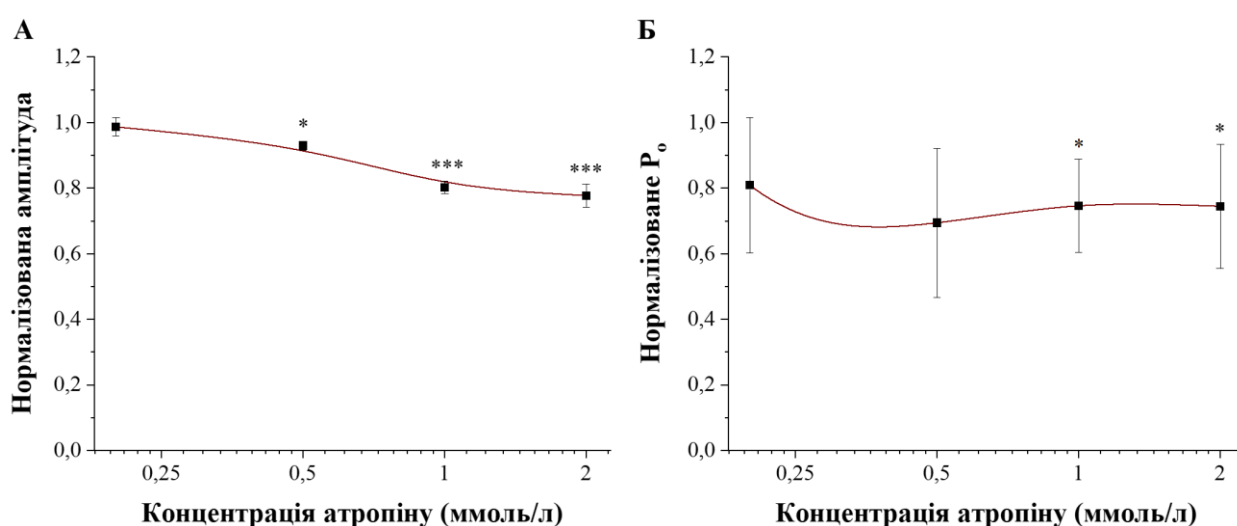


Рис. 3.23. Нормалізована амплітуда іонного струму крізь LCC-канали (А) та ймовірність їх відкритого стану (Б) залежно від концентрації атропін сульфату у ванночці зі зразком при фіксації мембранного потенціалу при -40 мВ. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.

Тим не менше, за концентрацій 1 ммоль/л та 2 ммоль/л зміна P_o була значущою порівняно з контролем, без достовірних відмінностей між результатами для цих двох груп. При концентрації атропіну 2 ммоль/л значення P_o LCC-каналів становили $0,28 \pm 0,07$ ($n = 7$), що на 26,3% нижче порівняно з $0,38 \pm 0,03$ ($n = 16$) у контролі ($P < 0,05$).

Результати, отримані у описаних експериментах та відображені у публікаціях (Котик та ін., 2023b; Надтока та ін., 2025c; Nadтока et al., 2026), вказують на майже повну відсутність збільшення антагоністичних властивостей атропіну при концентраціях вище 1 ммоль/л. Як ймовірність відкритого стану LCC-каналів, так і амплітуда струму, що проходить крізь них, не змінювалися при збільшенні концентрації досліджуваної речовини вдвічі. Водночас для того, аби зробити однозначні висновки щодо сатурації сайтів зв'язування з атропіном, може мати цінність дослідження дії цієї речовини і за вищих концентрацій. Попередньо, вплив атропіну на LCC-канали ядерної мембрани можна узагальнити наступним чином:

1. Атропін у концентрації 1 ммоль/л при додаванні у ванночку зменшує амплітуду струму через LCC-канали при негативних мембранних потенціалах (на 19,8% при -40 мВ) та не впливає на значення амплітуди при позитивних потенціалах. Тим часом, при додаванні через петч-піпетку, атропін зменшує амплітуду струму як при позитивних (на 23,5% при +40 мВ), так і при негативних (на 12,2% при -60 мВ) мембранних потенціалах.
2. Атропін (1 ммоль/л) здатний зменшувати ймовірність відкритого стану LCC-каналів при потенціалі -40 мВ при додаванні до ванночки зі зразком (на 26,3%), але не впливає на P_o каналів при аплікації через петч-піпетку.
3. Збільшення концентрації атропіну з 1 ммоль/л до 2 ммоль/л не призводить до збільшення його інгібуючого ефекту на LCC-канали при потенціалі -40 мВ.

3.2.2. Властивості та функціонування LCC-каналів під впливом пілокарпін гідрохлориду

Пілокарпін у природних умовах синтезується лише одним видом рослин, а саме *Pilocarpus microphyllus*, що поширений у Бразилії (Caldeira et al., 2017; Sobreiro et al., 2025). Ця сполука є агоністом усіх п'яти (M1-M5) мускаринових ацетилхолінових рецепторів (Karourani et al., 2022), але у випадку M3R вона може діяти також і як антагоніст, залежно від типу клітини (Pronin et al., 2017). У медичній практиці, пілокарпін використовується для лікування глаукоми та, іноді, гіпофункції слинних залоз (Aronson, 2016b). У низьких концентраціях ця речовина також полегшує симптоми пресбіопії у осіб, що на неї страждають, покращуючи гостроту зору на близьких відстанях (Holland et al., 2024). Окрім агоністичного ефекту на мускаринові холінорецептори, пілокарпін також здатен підвищувати швидкість обміну серотоніну (Haubrich & Reid, 1972), а також виявляти певні бета-адренергічні властивості (Karourani et al., 2022).

При дослідженні ефектів пілокарпіну на електрофізіологічну активність LCC-каналів встановлено, що ця сполука не знижує ймовірність перебування вказаних каналів у відкритому стані при аплікації до ванночки у концентрації 1 ммоль/л. Попри спостереження зниження значень P_o при потенціалах -60 мВ та -40 мВ, при статистичному порівнянні груп значення P знаходилися на межі значущості та не підтверджували наявності ефекту. Репрезентативні фрагменти реєстрацій та амплітудні гістограми наведені на Рисунках 3.24А та 3.24Б відповідно.

Ця речовина за додавання до ванночки також не зумовлювала змін амплітуди струму крізь LCC-канали. При потенціалі -60 мВ амплітуда струму становила $-12,26 \pm 0,67$ пА ($n = 10$), а при потенціалах +40 мВ та +60 мВ зареєстровано значення амплітуди $8,11 \pm 0,25$ пА ($n = 16$) та $12,38 \pm 0,49$ пА ($n = 10$) відповідно. Ці результати не відрізнялися між контрольною групою та при додаванні пілокарпіну.

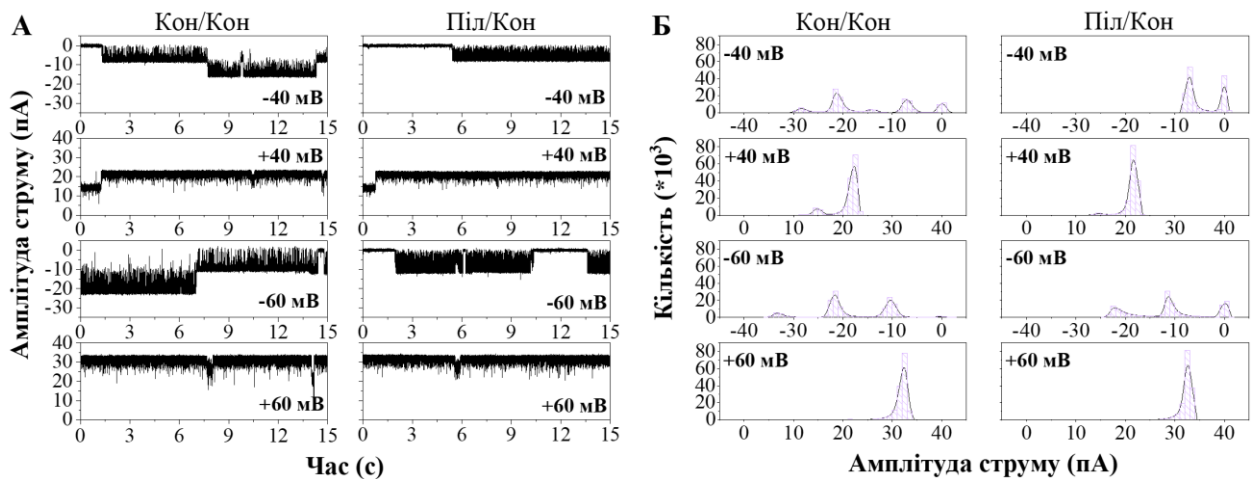


Рис. 3.24. Приклади отриманих реєстрацій (А) та діаграми амплітуди струму на їх основі (Б) за умов контролю (Кон/Кон) та при додаванні пілокарпін гідрохлориду в концентрації 1 ммоль/л до ванночки (Піл/Кон).

Водночас має бути зазначено, що первинне порівняння контрольної групи ($-7,82 \pm 0,34$ пА; $n = 17$) та групи з додаванням пілокарпину в концентрації 1 ммоль/л ($-7,25 \pm 0,40$ пА; $n = 12$) при потенціалі -40 мВ з використанням t -тесту свідчило про те, що нульова гіпотеза має бути відкинена ($P = 0,0482$), однак подальша оцінка ефектів цієї речовини залежно від застосованої концентрації з використанням ANOVA не підтвердила наявності статистично значущих відмінностей. Беручи до уваги, що застосування різних концентрацій речовини зумовлює використання саме ANOVA як основного методу аналізу, можна зробити висновок, що пілокарпін при значеннях мембранного потенціалу -40 мВ все ж не впливає на амплітуду струму, і результати на Рисунку 3.25 зображені відповідним чином. Також виявлено, що пілокарпін не змінює P_o навіть при концентрації речовини 10 ммоль/л. Виходячи з вищенаведеного, можна припустити, що за вказаної конфігурації пілокарпін не є здатним до модуляції жодного із досліджених електрофізіологічних параметрів LCC-каналів.

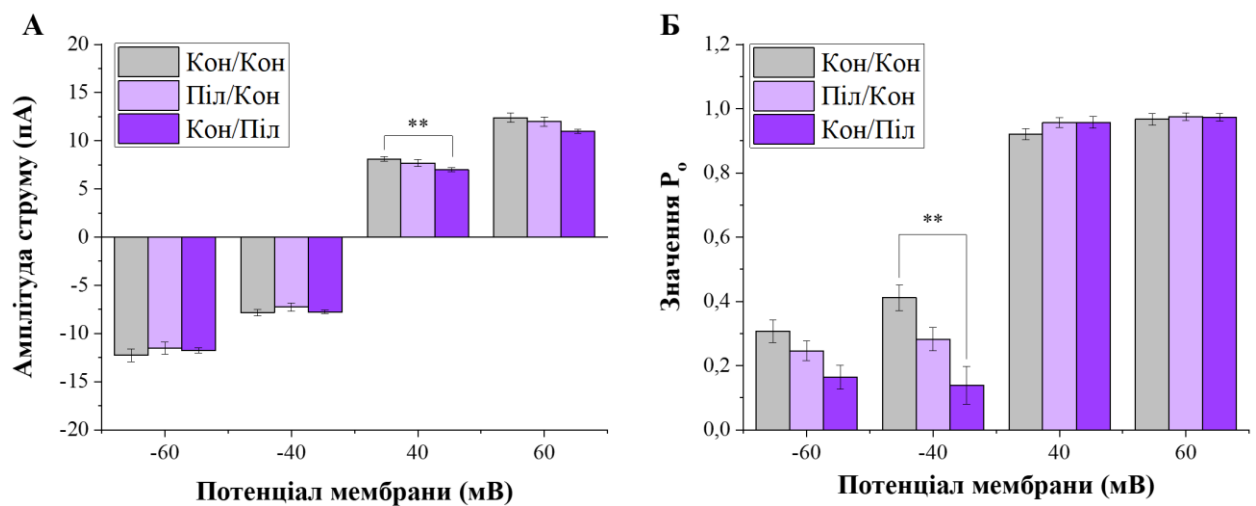


Рис. 3.25. Вплив пілокарпін гідрохлориду на усереднені значення амплітуди струму крізь LCC-канали (А) та ймовірність їх відкритого стану (Б) при додаванні цієї речовини у концентрації 1 ммоль/л до ванночки зі зразком (Піл/Кон) або до петч-піпетки (Кон/Піл) порівняно з контролем (Кон/Кон). ** $P < 0,01$.

Коли ж ця речовина у аналогічній концентрації 1 ммоль/л була додана до петч-піпетки, вона виявила певну здатність до зниження значень амплітуди струму, при цьому вказаний ефект був виражений при позитивних підтримуваних потенціалах. При +40 мВ, середні значення амплітуди струму знизилися з $8,11 \pm 0,25$ пА ($n = 16$) у контролі до $6,98 \pm 0,21$ пА ($n = 3$), що означає зміну на 13,9% ($P < 0,01$), тоді як при +60 мВ спостерігали подібну тенденцію, зі зниженням значень амплітуди з $12,38 \pm 0,49$ пА ($n = 10$) до $11,01 \pm 0,20$ пА ($n = 2$) із пілокарпіном у петч-піпетці (зменшення на 11,1%), але внаслідок незначної вибірки статистична значущість не могла бути оцінена. На відміну від описаних результатів із додаванням пілокарпіну до ванночки, також було виявлено значуще зменшення ймовірності відкритого стану LCC-каналів при потенціалі -40 мВ, за якого значення P_o знижувалися на 68,3% ($P < 0,01$), з $0,41 \pm 0,04$ ($n = 16$) до $0,13 \pm 0,05$ ($n = 4$). Схожа тенденція спостерігалася і при -60 мВ, але не була в подальшому підтверджена статистичним аналізом.

Таким чином, дія пілокарпіну на LCC-канали ядерної мембрани характеризується наступними особливостями (Котик та ін., 2023а; Котик та ін., 2023b; Надтока та ін., 2025с; Kotyk et al., 2026а):

1. Пілокарпін у концентрації 1 ммоль/л знижує як ймовірність перебування LCC-каналів у відкритому стані (на 68,3% при -40 мВ), так і амплітуду струму крізь ці канали (на 13,9% при +40 мВ) при застосуванні речовини через петч-піпетку.
2. При аплікації пілокарпіну (1 ммоль/л) у ванночку зі зразком ця сполука не здатна змінювати амплітуду струму крізь LCC-канали чи їх значення P_o незалежно від мембранного потенціалу та застосованої концентрації.

3.2.3. Вплив платифілін гідротартату на функціональні параметри LCC-каналів

На наступному кроці досліджень було вивчено вплив платифіліну у концентрації 1 ммоль/л на ядерні LCC-канали. Платифілін, на відміну від пілокарпіну, є антагоністом М-холінорецепторів. Ця речовина була вперше отримана із *Senecio platyphyllus* (Sadgrove, 2022), та є єдиним піролізидиновим алкалоїдом, що не має гепатотоксичного ефекту і не індукує антиканцерогенний p53-опосередкований репаративний сигналінг (Ebmeyer et al., 2020). Для платифіліну була показана здатність блокувати ацетилхолін-опосередковані відповіді у клубовій кишці морської свинки і, попри непоширеність у сучасній медицині, ця сполука певний час використовувалася для лікування гіпермоторності шлунково-кишкового тракту, а також як мідріатик для розширення зіниць при обстеженні (Pomeroy & Raper, 1971).

В ході досліджень виявлено, що при додаванні цієї речовини до ванночки, зниження нею амплітуди струму крізь LCC-канали виявлялося переважно при негативних мембранних потенціалах, зокрема, при -60 мВ. При цьому потенціалі, значення амплітуди знизилися з $-11,86 \pm 0,60$ пА ($n = 8$) за умов контролю до $-9,85 \pm 0,55$ пА ($n = 8$) при додаванні платифіліну (зміна на

16,9%; $P < 0,01$). Після заміни розчину платифіліну знову на контрольний розчин, амплітуда струму повернулася майже до вихідних значень ($-11,28 \pm 0,67$ пА; $n = 7$). Попередні спостереження зниження амплітуди при -40 мВ не отримали статистичного підтвердження. Однак, при цьому потенціалі зареєстровано зниження ймовірності перебування LCC-каналів у відкритому стані, зі зміною значень цього параметра від $0,57 \pm 0,05$ ($n = 9$) у контролі до $0,27 \pm 0,06$ ($n = 9$) за дії платифіліну (зниження на 52,6%; $P < 0,01$). Заміна платифіліну на контрольний розчин KCl призвела до часткового відновлення ймовірності відкритого стану, і значення P_o LCC-каналів на цій стадії становили $0,42 \pm 0,09$ ($n = 8$). Узагальнюючи ці дані, можна припустити, що інгібувальна дія платифіліну при додаванні до ванночки є оборотною та виражена переважно при негативних мембранних потенціалах. Репрезентативні фрагменти реєстрацій наведено на Рисунку 3.26А, а відповідні амплітудні гістограми – на Рисунку 3.26Б.

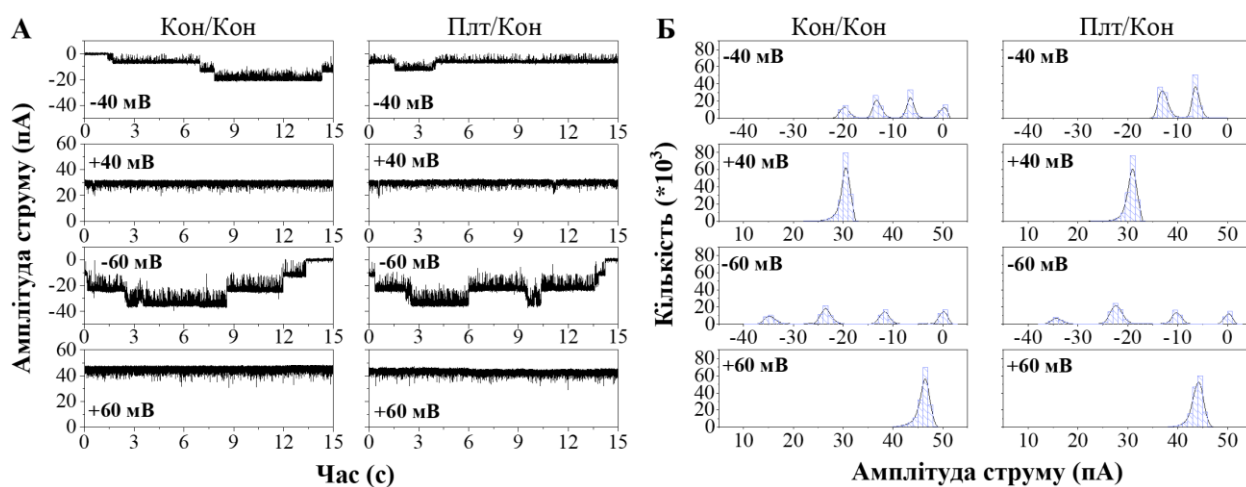


Рис. 3.26. Типові реєстрації іонного струму крізь LCC-канали (А) та амплітудні діаграми на їх основі (Б) за умов контролю (Кон/Кон) та при додаванні платифілін гідротартату в концентрації 1 ммоль/л до ванночки (Плт/Кон).

Цікаві результати отримано при додаванні платифіліну (1 ммоль/л) до петч-піпетки. На відміну від зниження амплітуди іонного струму, як це було

описано для попередньої конфігурації, при додаванні до піпетки ця речовина підвищувала середні значення вказаного параметру при негативних значеннях мембранного потенціалу. У ході аналізу встановлено, що при потенціалі -40 мВ усереднена амплітуда струму крізь канали збільшується з $-7,66 \pm 0,37$ пА ($n = 9$) до $-9,26 \pm 0,20$ пА ($n = 8$), що відповідає зростанню на $20,9\%$ ($P < 0,01$), тоді як при -60 мВ спостерігали збільшення від $-11,92 \pm 0,53$ пА ($n = 9$) у контролі до $-13,56 \pm 0,35$ пА ($n = 4$) за додавання досліджуваної речовини (зміна на $13,8\%$; $P < 0,05$). При позитивних значеннях мембранного потенціалу, тим часом, амплітуда струму крізь LCC-канали знизилася на $22,2\%$ та $22,1\%$ при потенціалах $+40$ мВ та $+60$ мВ відповідно. Так, при $+40$ мВ значення амплітуди в умовах контролю становили $7,85 \pm 0,11$ пА ($n = 9$), і змінилися до $6,11 \pm 0,34$ пА ($n = 5$) за додавання платифіліну ($P < 0,01$). Подібним чином, при мембранному потенціалі $+60$ мВ амплітуда іонного струму знизилася з $11,69 \pm 0,16$ пА ($n = 8$) до $9,11 \pm 0,11$ пА ($n = 3$) при аплікації речовини ($P < 0,001$). Попри низьку кількість успішних реєстрацій у конфігурації додавання речовини через піпетку, висока статистична значущість різниці у наведених порівняннях може бути забезпечена більшою кількістю контрольних вимірів та невеликим розкидом значень амплітуди струму між реєстраціями.

Ймовірність LCC-каналів перебувати у відкритому стані також суттєво змінилася за дії платифіліну при його додаванні через петч-піпетку. При потенціалі -60 мВ значення P_o знизилася від $0,42 \pm 0,05$ ($n = 7$) до $0,19 \pm 0,04$ ($n = 4$), що відповідає зміні на $54,8\%$ ($P < 0,01$), а при потенціалі -40 мВ від $0,57 \pm 0,05$ ($n = 9$) до $0,39 \pm 0,03$ ($n = 8$), свідчачи про зниження на $31,6\%$ ($P < 0,05$). Однак, змін ймовірності відкритого стану при позитивних мембранних потенціалах ($+40$ мВ та $+60$ мВ) встановлено не було. Графік зміни цього параметру, як і середньої амплітуди струму за різних конфігурацій додавання платифіліну представлено на Рисунку 3.27.

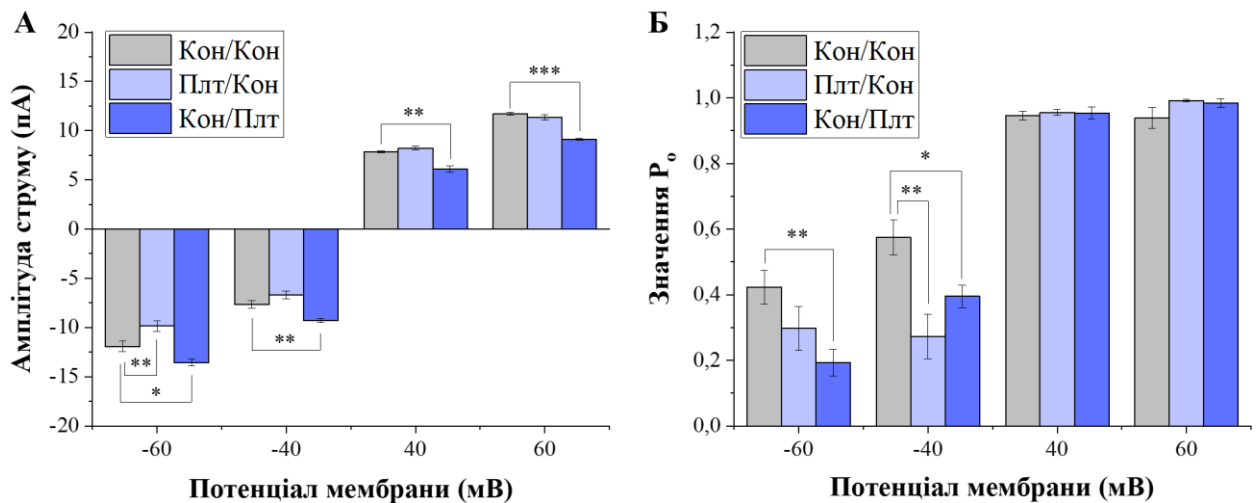


Рис. 3.27. Вплив платифілін гідротартрату на усереднену амплітуду струму крізь LCC-канали (А) та ймовірність цих каналів бути у відкритому стані (Б) при додаванні вказаної речовини у концентрації 1 ммоль/л до ванночки зі зразком (Плт/Кон) чи петч-піпетки (Кон/Плт) порівняно з умовами контролю (Кон/Кон). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

З врахуванням результатів досліджень платифіліну (Котик та ін., 2023b; Надтока та ін., 2025c; Kotyk et al., 2026a), попередні узагальнення щодо його ефекту на LCC-канали можуть бути сформульовані наступним чином:

1. Платифілін при додаванні до ванночки у концентрації 1 ммоль/л знижує як амплітуду струму крізь LCC-канали (на 16,9% при -60 мВ), так і їх ймовірність перебувати у відкритому стані (на 52,6% при -40 мВ).
2. При застосуванні через петч-піпетку платифілін збільшує амплітуду струму при негативних мембранних потенціалах (на 20,9% при -40 мВ) і знижує її за при позитивних (на 22,2% при +40 мВ), залишаючись здатним при цьому знижувати ймовірність LCC-каналів бути відкритими (на 54,8% при -60 мВ).

3.2.4. Підсумки досліджень впливу модуляторів мускаринових холінорецепторів на LCC-канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє

Результати проведених досліджень атропін сульфату, пілокарпін гідрохлориду та платифілін гідротартату при додаванні розчинів діючих сполук до ванночки зі зразком відображені у таблиці 3.3.

Таблиця 3.3. Вплив м-холіномодуляторів на LCC-канали ядерної мембрани за додавання вказаних сполук в концентрації 1 ммоль/л до ванночки зі зразком. А – амплітуда струму; P_o – ймовірність відкритого стану каналів.

Речовина	Підтримуваний потенціал мембрани			
	-60 мВ	-40 мВ	+40 мВ	+60 мВ
Атропін	А ↓20,0%	А ↓19,8% P _o ↓26,3%	Без змін	Без змін
Платифілін	А ↓16,9%	P _o ↓52,6%	Без змін	Без змін
Пілокарпін	Без змін	Без змін	Без змін	Без змін

Додавання розчину пілокарпину до петч-піпетки супроводжувалося виявом її здатності до модуляції LCC-каналів, як це показано у таблиці 3.4.

Таблиця 3.4. Зміни електрофізіологічних характеристик LCC-каналів за додавання розчинів м-холіномодуляторів у концентрації 1 ммоль/л до петч-піпетки. А – амплітуда струму; P_o – ймовірність відкритого стану каналів.

Речовина	Підтримуваний потенціал мембрани			
	-60 мВ	-40 мВ	+40 мВ	+60 мВ
Атропін	А ↓12,2%	Без змін	А ↓23,5%	А ↓21,6%
Платифілін	А ↑13,8% P _o ↓54,8%	А ↑20,9% P _o ↓31,6%	А ↓22,2%	А ↓22,1%
Пілокарпін	Без змін	P _o ↓ 68,3%	А ↓13,9%	Без змін

Статті, в яких опубліковані основні наведені у підрозділі результати:

1. Nadтока S, Kotyk O, Kotliarova A. Effects of atropine on the electrophysiological properties of LCC-channels of the nuclear membrane of Purkinje neurons. *Neurophysiology*. 2026. <https://doi.org/10.1007/s11062-025-09986-6>.

2. Kotyk O, Nadтока S, Kotliarova A. Effects of pilocarpine and platyphylline on nuclear membrane large-conductance cation channels in rat cerebellar Purkinje neurons. *Fiziol Zh*. 2026; 72(1): 83-91. <https://doi.org/10.15407/fz72.01.083>.

Тези доповідей:

1. Котик О.А., Надтока С.О., Котлярова А.Б. Модуляція високопровідних катіонних каналів ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка: ефекти атропіну, платифіліну та пілокарпіну. Матеріали чергового ІХ з'їзду Українського біофізичного товариства; 2023 жов. 30 – лист. 2; Київ, Україна. Київ; 2023, с. 40 – 41.

2. Nadтока S., Kotliarova A., Kotyk O. Identification of LCC channels' conductivity in different types of cells. Молодь і поступ біології: збірник тез доповідей ХІХ Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів; 2023 кві 26 – 28; Львів, Україна. Львів; 2023, с. 189 – 190.

3. Котик О., Надтока С., Котлярова А. Вплив пілокарпіну на LCC-канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка щурів. Тези доповідей ХХІ Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених, присвяченої 100-річчю від дня народження доктора біологічних наук, професора Василя Юхимовича Шавкуна; 2023 тра 18 – 19; Львів, Україна. Біологія тварин. 2023;25(2):58.

4. Надтока С., Котик О., Котлярова А. Ефект модуляторів холіно- та адренорецепторів на властивості LCC-каналів нейронів Пуркінє мозочка. Школа-воркшоп «Сучасні методи в нейронауках»; 2025 жов 28 – 29; Київ, Україна. Фізіол. журн. 2025;71(5S):1-18.

3.3. Вплив модуляторів адренорецепторів на властивості LCC-каналів

Оскільки більшість досі описаних у цій та інших працях сполук, що впливають на електрофізіологічні характеристики LCC-каналів, належать до модуляторів холінорецепторів (Брянцева та ін., 2021; Котлярова та ін., 2019; Kotyk et al., 2017), на наступному етапі логічно є перевірка, чи здатність до інгібування LCC-каналів є специфічною саме для цього класу сполук, що могло б бути підставою для припущення про певну подібність структури досліджуваних каналів із структурою холінорецепторів, чи сполуки з інших класів фізіологічно активних речовин також можуть впливати на їх функціонування. Для з'ясування цього аспекту було вивчено вплив на електрофізіологічні характеристики LCC-каналів представників родини адреномодуляторів, а саме норепінефрину, епінефрину, ізопреналіну та пропранололу.

3.3.1. Зумовлені норепінефрин гідрохлоридом ефекти на LCC-канали

Норепінефрин (норадреналін) є дофаміновим похідним та основним симпатичним нейротрансмітером у нервовій системі. Дія норадреналіну опосередковується α_1 -, α_2 -, та β_1 -адренорецепторами, на які він має агоністичний ефект, але при цьому він не взаємодіє із β_2 -рецепторами. Головним чином притаманні для нього ефекти зумовлені його впливом на адренорецептори α -типу, і супроводжуються вазоконстрикцією всіх периферійних кровоносних судин, окрім коронарних артерій (Skelding & Valverde, 2020). Ця вазоконстрикція може знижувати кількість крові, яку прокачує серце за хвилину, оскільки збільшується тиск, з яким має бути подоланий при кожному серцевому скороченні (Hugcombe, 2018). Описаний ефект частково компенсується збільшенням частоти серцевих скорочень та систолічного об'єму (тобто об'єму крові, що виштовхується за одне скорочення лівого шлуночка до аорти), які зумовлюються дією норепінефрину

на $\beta 1$ -адренорецептори. Загалом дія норадреналіну на $\beta 1$ -адренорецептори є менш вираженою, порівняно з такою для адреналіну (Ebert, 2019). Також відомо, що норадреналін регулює увагу та загальну активність мозку. Головним його джерелом у мозку є блакитна пляма (лат. «*Locus Coeruleus*») (Schwarz & Luo, 2015).

Згідно з результатами дослідження впливу норепінефрину в контексті його впливу на ядерні іонні канали встановлено, що додавання цієї сполуки у концентрації 1 ммоль/л у ванночку зі зразком призводить до статистично значущого зниження амплітуди струму крізь LCC-канали при потенціалах -60 мВ ($P < 0,001$) та -40 мВ ($P < 0,05$). Репрезентативні фрагменти реєстрацій, отриманих у контролі та із додаванням норепінефрину при цих та інших мембранних потенціалах, як і відповідні їм амплітудні діаграми представлені на Рисунку 3.28.

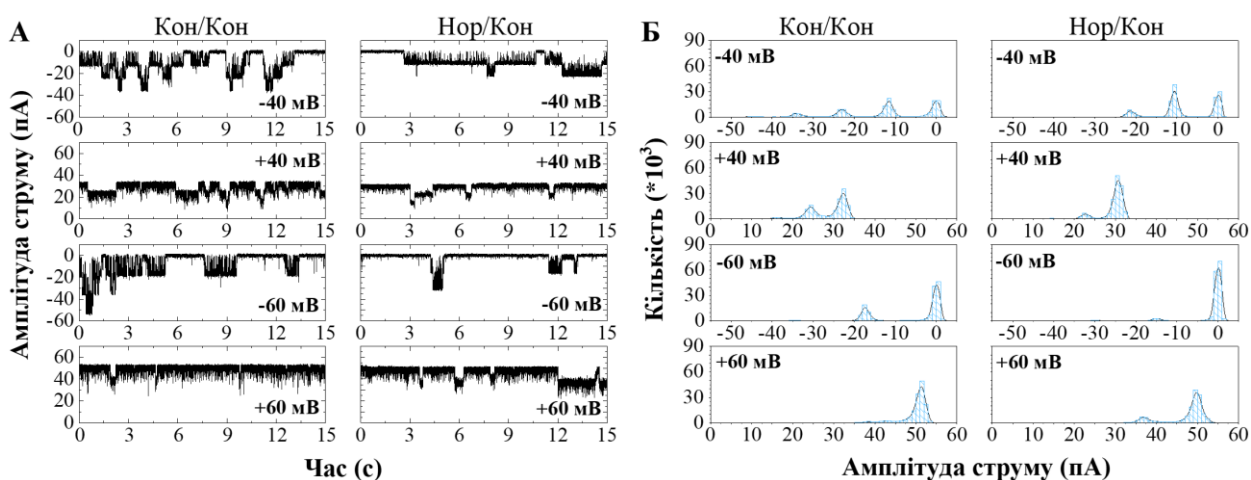


Рис. 3.28. Приклади типових реєстрацій струму крізь LCC-канали (А) та амплітудні діаграми, що їм відповідають (Б), за додавання норепінефрин гідрохлориду в концентрації 1 ммоль/л до ванночки зі зразком (Нор/Кон) порівняно з контролем (Кон/Кон).

При потенціалі -60 мВ, середні значення амплітуди струму знизилися від $-14,93 \pm 0,34$ пА ($n = 7$) до $-13,41 \pm 0,43$ пА ($n = 7$), що свідчить про зміну на 10,2%, а при потенціалі -40 мВ зареєстровано зниження з $-9,72 \pm 0,39$ пА

(n = 7) до $-9,07 \pm 0,41$ пА (n = 7), що відповідає зміні на 6,7%. Після заміни дослідного розчину у ванночці на контрольний розчин на основі КСІ, амплітуда струму мала тенденцію до повернення до початкових значень і становила $-13,87 \pm 0,46$ пА (n = 5) при -60 мВ і $-9,68 \pm 0,38$ пА (n = 5) при -40 мВ. Також встановлено, що норепінефрин здатен суттєво знижувати ймовірність перебування LCC-каналів у відкритому стані при негативних мембранних потенціалах. Згідно з отриманими результатами, ця сполука у концентрації 1 ммоль/л знижувала значення P_o досліджуваних каналів з $0,39 \pm 0,01$ (n = 6) до $0,18 \pm 0,02$ (n = 7), що відображає зменшення на 53,8% ($P < 0,01$) при потенціалі -40 мВ, та з $0,25 \pm 0,03$ (n = 6) до $0,16 \pm 0,02$ (n = 7) при потенціалі -60 мВ (зміна на 36,0%; $P < 0,05$). Жодного значущого впливу на P_o не виявлено при +40 мВ та +60 мВ. Зміна описаних електрофізіологічних характеристик досліджуваних каналів за дії норепінефрину представлена на Рисунку 3.29.

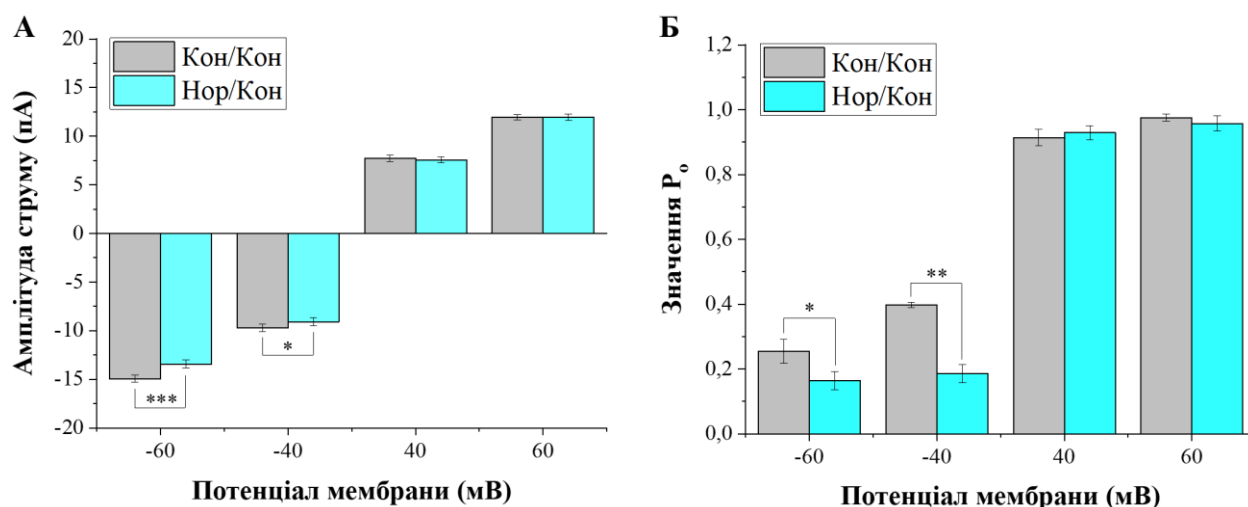


Рис. 3.29. Вплив норепінефрин гідрохлориду у концентрації 1 ммоль/л на усереднені значення амплітуди струму крізь LCC-канали (А) та ймовірність каналів перебувати у відкритому стані (Б) при додаванні цієї речовини у ванночку (Нор/Кон) порівняно з контрольними параметрами (Кон/Кон). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Підсумовуючи ці результати, можна стверджувати, що інгібуючий ефект норепінефрину проявляється переважно при негативному потенціалі мембрани (Надтока та ін., 2025с; Kotyk et al., 2026b). Ця речовина має відносно слабку блокуючу дію в контексті зниження амплітуди струму, але водночас має суттєвий вплив на ймовірність LCC-каналів перебувати у відкритому стані.

Попередні висновки щодо впливу норепінефрину на LCC-канали при додаванні речовини у ванночку зі зразком можуть бути сформульовані наступним чином:

1. Норепінефрин у концентрації 1 ммоль/л здатен знижувати як амплітуду струму крізь LCC-канали, так і ймовірність їх перебування у відкритому стані, однак лише при негативних потенціалах ядерної мембрани.
2. Зниження амплітуди струму за дії норепінефрину є незначним (6,7% при -40 мВ), однак ймовірність відкритого стану LCC-каналів за дії цієї речовини таких самих значеннях мембранного потенціалу знижується більш ніж вдвічі (на 53,8%).

3.3.2. Вплив епінефрин гідрохлориду на властивості та функціонування LCC-каналів

На наступному етапі досліджень було вивчено дію епінефрину на властивості LCC-каналів. Ця речовина, також відома як адреналін, є ефективним агоністом $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, $\beta 1$ -, та $\beta 2$ -адренорецепторів, та продукується хромафінними клітинами надниркових залоз (Al-Shura, 2021; Skelding & Valverde, 2020). Як катехоламін, адреналін є продуктом трансформації тирозину (Salinas, 2016). Адреналін вважається сильним вазопресором, і справді, було показано зниження ним коронарного, ренального та спланхіального кровотоку більшою мірою, ніж це притаманно для норадреналіну (Hircombe, 2018). Тим не менш, потребує згадки дозозалежність його вазоконстрикторної дії. Так, при високих його

концентраціях, превалює його опосередкований α -адренорецепторами ефект, що призводить до периферійної вазоконстрикції. Водночас за низьких доз адреналіну β -рецептор-опосередкований ефект є більш вираженим, зумовлюючи вазодилатацію, бронходилатацію, підвищувану скорочуваність міокарду та частоту серцевих скорочень (Skelding & Valverde, 2020). В медицині адреналін використовується при невідкладній допомозі у випадках анафілактичного шоку та при зупинці серцебиття, хоча в деяких сучасних протоколах порятунку за відсутності серцебиття адреналін замінюють вазопресином (Parich, 2016).

В рамках цієї роботи було вивчено вплив епінефрину і на електрофізіологічні параметри внутрішньоядерних LCC-каналів. Реєстрації струму крізь них в умовах контролю та при аплікації цієї речовини у ванночку у концентрації 1 ммоль/л показані на Рисунку 3.30А. Амплітудні діаграми відповідних реєстрацій представлені на Рисунку 3.30Б.

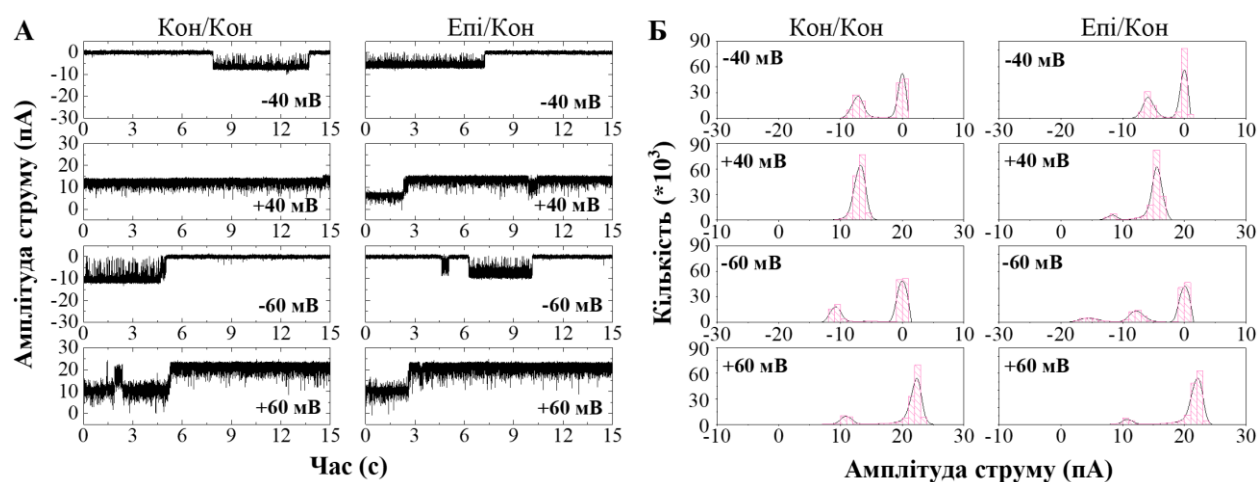


Рис. 3.30. Фрагменти реєстрацій струму крізь LCC-канали (А) та амплітудні гістограми відповідних реєстрацій (Б) за умов контролю (Кон/Кон) та у розчині епінефрин гідрохлориду (Епі/Кон), аплікованого у концентрації 1 ммоль/л у ванночку зі зразком.

Виявлено, що епінефрин здатен знижувати амплітуду струму крізь LCC-канали при потенціалі -40 мВ, а вираженість цього ефекту була дещо вищою

порівняно з тим, який був описаний для норепінефрину. Так, при концентрації епінефрину 1 ммоль/л у ванночці зі зразком, зниження амплітуди при потенціалі -40 мВ становило 13,4%, зі зміною абсолютних значень від $-7,52 \pm 0,15$ пА ($n = 12$) до $-6,51 \pm 0,37$ пА ($n = 8$) ($P < 0,01$). Як і у випадку з норепінефрином, після відмивання речовини зі зразка значення амплітуди частково поверталися до тих, які реєстрували у контролі, і становили $-6,83 \pm 0,16$ пА ($n = 4$). Також було помічено тенденцію до зниження амплітуди струму і при потенціалі -60 мВ, але ця зміна не була статистично значущою.

Крім цього спостерігали, що зі збільшенням підтримуваного потенціалу ядерної мембрани збільшувалася і відмінність між значеннями амплітуди струму за контрольних умов та при додаванні епінефрину. Так, наприклад, при потенціалі -80 мВ значення амплітуди знизилися з -15,09 пА до -8,87 пА (зміна на 41,2%; $n = 1$). Однак, оскільки головним фокусом досліджень були зміни при потенціалах ± 40 мВ та ± 60 мВ для забезпечення можливості порівняння отриманих результатів з даними, отриманими для інших речовин, експерименти зі значеннями мембранного потенціалу ± 80 мВ мали переважно оглядовий характер.

Подальше вивчення ймовірності перебування LCC-каналів у відкритому стані за дії епінефрину показало, що ця сполука не має впливу на P_o вказаних каналів за жодного із підтримуваних потенціалів, на відміну від норепінефрину. Усереднені значення цього параметру, а також амплітуди струму крізь канали залежно від композиції розчину, в якому перебував зразок, та мембранного потенціалу представлені на Рисунку 3.31. Можна припустити, що концентрація епінефрину, що потрібна на прояву вираженого ефекту на ймовірність перебування цих каналів у відкритому стані є вищою, ніж застосована на цій стадії досліджень.

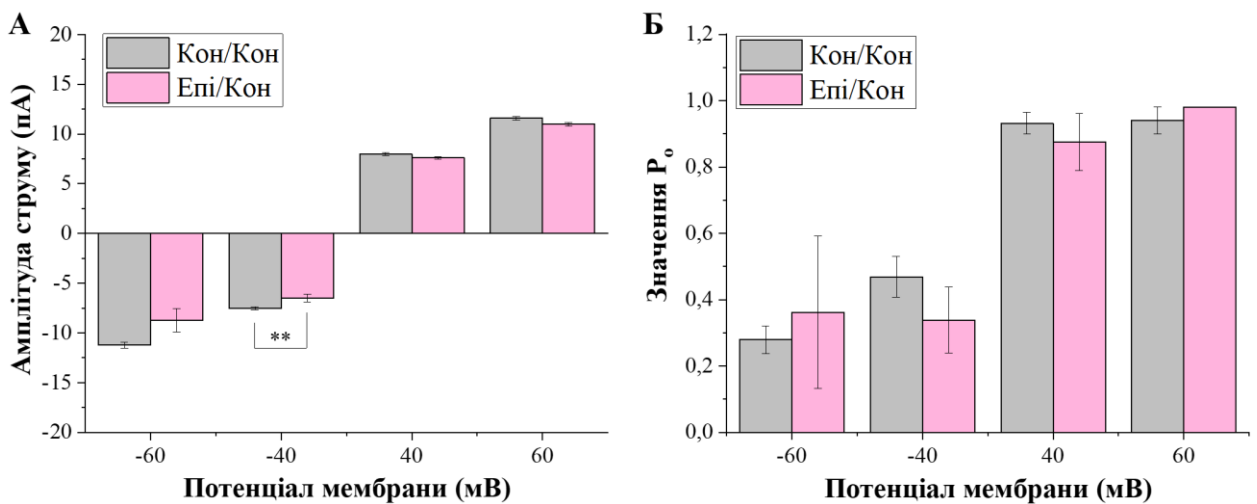


Рис. 3.31. Значення амплітуди струму крізь LCC-канали за різних значень підтримуваних потенціалів (А) та ймовірність цих каналів знаходитися відкритими (Б) за контрольних умов (Кон/Кон) та при додаванні епінефрин гідрохлориду (Епі/Кон) у концентрації 1 ммоль/л до ванночки. ** $P < 0,01$.

Для перевірки наведеного припущення, на наступному етапі було вивчено вплив епінефрину на LCC-канали при його додаванні у ванночку в різних концентраціях. Згідно з отриманими даними, мінімальна концентрація епінефрину, за якої спостерігали статистично значущий ефект на амплітуду струму крізь LCC-канали, становила 1 ммоль/л. Збільшення концентрації до 2 ммоль/л призводило до подальшого зниження амплітуди до $-4,53 \pm 0,68$ пА ($n = 6$), що відображає відмінність на 39,8% порівняно з контролем ($P < 0,05$). Схожі результати отримано і при потенціалі -60 мВ, за якого виявлено статистично значуще зниження амплітуди струму з $-11,22 \pm 0,29$ пА ($n = 5$) до $-3,97 \pm 0,47$ пА ($n = 3$), яке відповідає різниці на 64,6% ($P < 0,01$) при аплікації епінефрину у концентрації 2 ммоль/л у ванночку. Водночас, збільшення концентрації цієї речовини не призвело до значущих змін у її здатності впливати на ймовірність перебування LCC-каналів у відкритому стані. Як можлива причина відсутності статистично підтверджених змін за цим параметром може бути розглянена значна варіабельність між ядрами в межах

однієї концентраційної групи, що є типовим при визначенні P_o LCC-каналів. Можна припустити, що модуляція амплітуди струму крізь ці канали та їх ймовірності перебування у відкритому стані опосередкована різними механізмами, і що хоч епінефрин і має молекулярні мотиви, завдяки яким він проявляє здатність знижувати амплітуду струму прямопропорційно своїй концентрації, у даної сполуки відсутні властивості, які дозволяли б їй впливати на P_o цих каналів.

Виходячи з отриманих результатів (Надтока та ін., 2025с; Kotyk et al., 2026b), можна зробити такі проміжні узагальнення щодо впливу епінефрину на LCC-канали при його додаванні у ванночку:

1. Епінефрин у концентрації 1 ммоль/л призводить до незначного (13,4%) зниження амплітуди струму крізь LCC-канали при потенціалі -40 мВ, однак не має впливу на цей параметр при позитивних мембранних потенціалах.
2. Мінімальною з досліджуваних концентрацією епінефрину, що зумовлює зниження амплітуди струму, є 1 ммоль/л, із прямопропорційним збільшенням інгібувальних властивостей при подальшому підвищенні концентрації речовини.
3. Епінефрин не впливає на ймовірність LCC-каналів перебувати у відкритому стані, незалежно від застосованої концентрації (в межах від 0,1 ммоль/л до 5 ммоль/л) чи мембранного потенціалу (в діапазоні від -60 мВ до $+60$ мВ).

3.3.3. Дія пропранолол гідрохлориду на LCC-канали та їх властивості

Пропранолол, що випускається під торговою маркою обзидан, є антагоністом β -адренорецепторів (Srinivasan, 2019), що був початково винайдений для лікування стенокардії (лат. «*angina pectoris*») і зараз використовується як препарат першої лінії при есенціальному треморі (Frei &

Truong, 2022). Головним механізмом дії при цьому вважається блокування периферійних β_2 -адренорецепторів, розташованих у м'язових волокнах (Hedera, 2017). Тремор спокою, асоційований із хворобою Паркінсона, також іноді лікують пропранололом, однак нещодавній мета-аналіз (Frei & Truong, 2022) показав, що на даний момент неможливо однозначно встановити, чи є таке лікування ефективним або хоча б безпечним. З моменту винайдення у 1960-тих роках Сером Джеймсом Блеком (англ. Sir James Black), цей препарат знайшов багато застосувань у медичній сфері та довів свою ефективність при мігрені, серцевій аритмії, тривожності, гіпертензії, міокардіальному інфаркті, феохромоцитомі і гіпертироїдії (Srinivasan, 2019). Тим не менше, невідповідальне використання препаратів пропранололу може вести до прояву побічних ефектів, таких, як гіпотензія, виснаження, брадикардія та еректильна дисфункція (Pirker et al., 2023). Дія пропранололу на β -адренергічні рецептори є неселективною, тож він взаємодіє як із β_1 , так і з β_2 типами адренорецепторів, таким чином запобігаючи приєднанню епінефрину та норепінефрину до їх специфічних сайтів зв'язування (Al-Majed et al., 2017; Srinivasan, 2019).

При дослідженні дії пропранололу на LCC-канали встановлено, що при додаванні у ванночку зі зразком, пропранолол у концентрації 1 ммоль/л статистично значуще знижував амплітуду струму крізь LCC-канали при негативних мембранних потенціалах. Після додавання пропранололу до ванночки при потенціалі -60 мВ амплітуда знизилася з $-11,46 \pm 0,49$ пА ($n = 3$) у контрольному розчині до $-8,83 \pm 0,44$ пА ($n = 3$) за дії речовини у концентрації 1 ммоль/л (зміна на 22,9%; $P < 0,05$), а при потенціалі -40 мВ значення амплітуди знизилися з $-7,32 \pm 0,13$ пА ($n = 10$) до $-6,62 \pm 0,26$ пА ($n = 8$), що відображає зміну на 9,6% ($P < 0,05$). Отримані у ході досліджень реєстрації та побудовані на основі них амплітудні діаграми представлені на Рисунках 3.32А та 3.32Б відповідно.

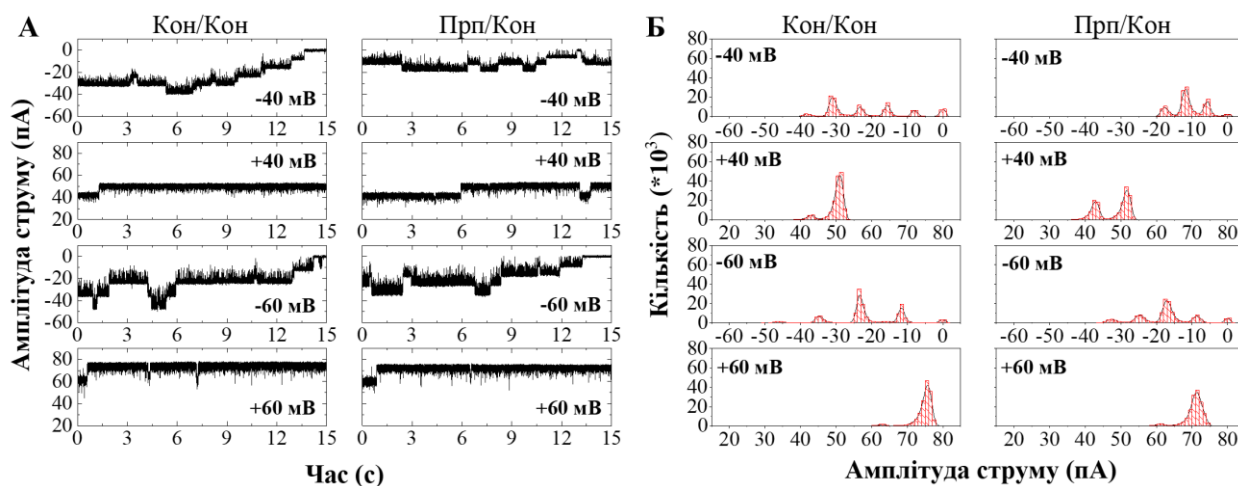


Рис. 3.32. Репрезентативні фрагменти реєстрацій струму крізь LCC-канали (А) та гістограми амплітуди струму, що відображають кількість точок даних із певними її значеннями в межах реєстрації (Б) за контрольних умов (Кон/Кон) та при додаванні 1 ммоль/л пропранолол гідрохлориду до ванночки (Прп/Кон).

Подібно до інших модуляторів адренергічних рецепторів, описаних у цій роботі, пропранолол не був здатним впливати на амплітуду струму при позитивному мембранному потенціалі. Графік усереднених значень амплітуди струму крізь LCC-канали залежно від речовини, в середовищі якої вони перебували, представлений на Рисунку 3.33А. Також варто зазначити, що під час досліджень було помічено тенденцію до зниження ймовірності відкритого стану LCC-каналів при потенціалах -40 мВ та +40 мВ при застосуванні пропранололу у концентрації 1 ммоль/л. Ця тенденція може бути помічена як на графіку усереднених значень P_o за різних мембранних потенціалів (Рис. 3.33Б), так і на амплітудних діаграмах репрезентативних реєстрацій (Рис. 3.32Б). Однак, вона не була підтверджена подальшим статистичним аналізом.

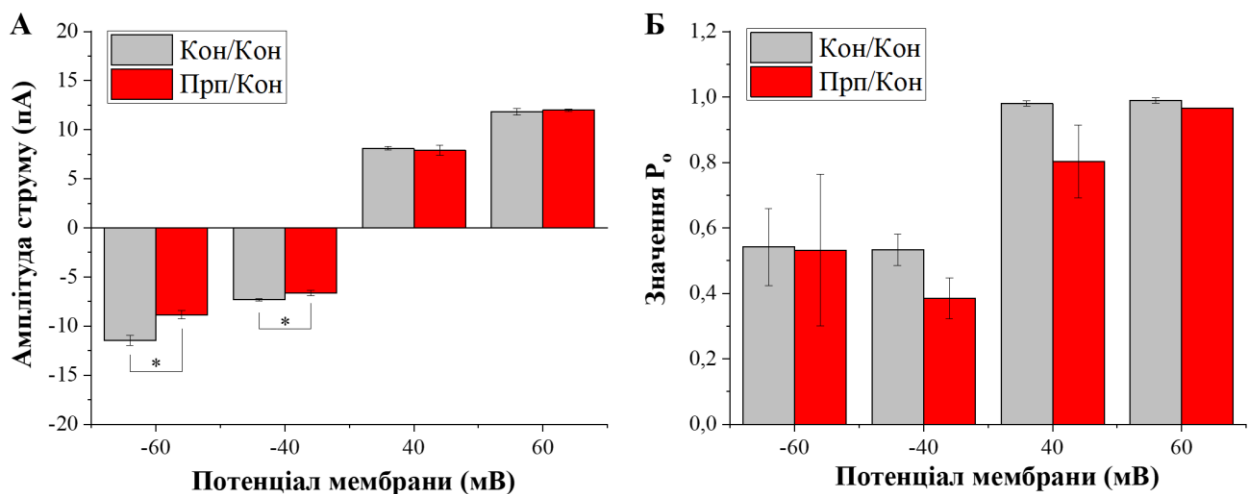


Рис. 3.33. Вплив пропранолол гідрохлориду на амплітуду струму крізь LCC-канали (А) та значення їх ймовірності знаходитися у відкритому стані (Б) при додаванні цієї речовини у концентрації 1 ммоль/л до ванночки (Прп/Кон) порівняно з контролем (Кон/Кон). * $P < 0,05$.

Отримані результати (Надтока та ін., 2025с; Kotyk et al., 2026b) щодо дії пропранололу на електрофізіологічні властивості LCC-каналів при додаванні розчину цієї сполуки до ванночки можуть бути узагальнені наступним чином:

1. Пропранолол у концентрації 1 ммоль/л знижує амплітуду струму крізь LCC-канали при негативних мембранних потенціалах, із максимально вираженим зменшенням значень цього параметра при потенціалі -60 мВ (на 22,9%).
2. Пропранолол (1 ммоль/л) не змінює ймовірність LCC-каналів перебувати у відкритому стані за жодного з підтримуваних мембранних потенціалів (від -60 мВ до +60 мВ).

3.3.4. Електрофізіологічні параметри LCC-каналів під впливом ізопреналін гідрохлориду

На наступній стадії досліджень було вивчено властивості ядерних LCC-каналів за дії ізопреналіну. Ізопреналін, він же – ізопротеринол, є синтетичним симпатоміметичним препаратом, який походить із норадреналіну і завдяки

цьому також відомий як ізопропілнорадреналін (Bradley, 1989). Він проявляє дію як неселективний агоніст β -адренергічних рецепторів, розслабляючи гладенькі м'язи дихальних шляхів та кровоносних судин. Завдяки цьому, ізопреналін певний час використовували у медицині для покращення периферійної циркуляції в умовах шоку та як бронхолітик, однак зараз переважно замінений селективними агоністами β -адренорецепторів. Одним із суттєвих недоліків цього препарату є те, що його метаболіт – 3-альфаметилізопреналін – може виявляти бета-блокувальний ефект, протидіючи таким чином ефекту вихідної сполуки і вимушуючи пацієнтів поступово підвищувати дозу. Побічні ефекти, які при цьому спостерігаються, включають головний біль, тахікардію, тремор та запаморочення (Aronson, 2016a; O'Shaughnessy, 2012). Станом на сьогодні, ізопреналін використовується переважно у лабораторних умовах для штучної індукції гострого міокардіального інфаркту чи серцевого фіброзу, залежно від дози (Bader Eddin et al., 2025).

При вивченні дії цієї речовини на властивості LCC-каналів виявлено, що, подібно до раніше описаного мекамиламіну, ця речовина при додаванні у ванночку в концентрації 1 ммоль/л зумовлює значне миготіння каналів, особливо при негативних потенціалах, як показано на Рисунку 3.34. Настільки інтенсивне миготіння також відобразилося на амплітудних діаграмах репрезентативних реєстрацій. Можна помітити, як швидкий перехід і коливання між закритим і відкритим станами каналів стирає чітку різницю між піками, які зазвичай відповідають значенням амплітуди, що були зареєстровані найчастіше. Це вказує на те, що при негативних потенціалах стан, при якому канал був повністю відкритим і забезпечував струм зі стабільною амплітудою, був рідкісним.

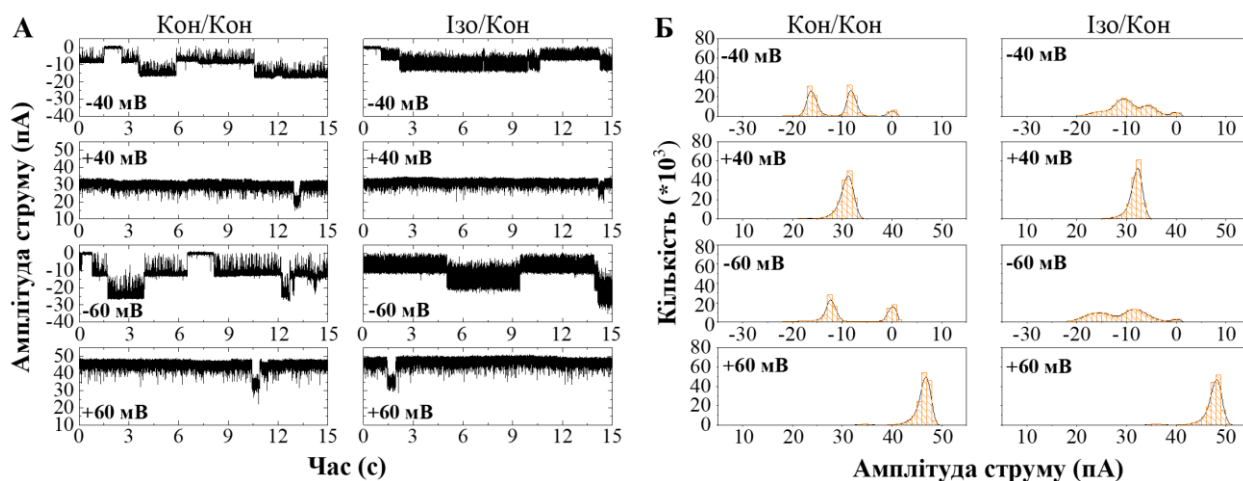


Рис. 3.34. Фрагменти реєстрацій іонного струму крізь LCC-канали (А) та амплітудні діаграми відповідних реєстрацій (Б) за умов контролю (Кон/Кон) та у розчині доданого у ванночку ізопреналін гідрохлориду (Ізо/Кон) з концентрацією діючої речовини 1 ммоль/л.

Крім цього, при додаванні у ванночку у концентрації 1 ммоль/л та за негативних значень мембранного потенціалу ця речовина спричинила суттєве зниження амплітуди струму крізь досліджувані канали. Так, встановлено зниження значень амплітуди при потенціалі -40 мВ з $-7,58 \pm 0,13$ пА ($n = 11$) у контролі до $-5,64 \pm 0,30$ пА ($n = 10$) при додаванні ізопреналіну (зміна на 25,6%; $P < 0,001$). При потенціалі -60 мВ, водночас, ця речовина зумовила зниження середніх значень амплітуди струму з $-11,59 \pm 0,31$ пА ($n = 6$) до $-5,48 \pm 0,48$ пА ($n = 5$), що відповідає зміні на 52,7% ($P < 0,001$). Цей патерн зберігся і коли потенціал ядерної мембрани в межах петч-сайту було зафіксовано при -80 мВ, при цьому амплітуда струму знизилася з $-14,75$ пА ($n = 1$) до $-4,34 \pm 0,11$ пА ($n = 2$), що відповідає зниженню на 70,6%, однак, за цих значень потенціалу наведені зміни не могли бути статистично верифіковані і наведені для зображення загальної закономірності. Також помічено, що зниження амплітуди струму, ймовірно, є оборотним, оскільки після відмивки речовини зі зразка контрольним розчином КСІ цей параметр повертався до близьких до контрольних значень ($-12,36$ пА для -60 мВ та $-7,98 \pm 0,01$ пА для -40 мВ; $n = 1$ та $n = 2$ відповідно). Згідно з цими

результатами, ізопреналін виявив найвищу здатність до інгібування LCC-каналів у контексті впливу на амплітуду струму крізь них порівняно з іншими дослідженими у межах цієї роботи модуляторами адренорецепторів. Зміни цього параметру за дії ізопреналіну при позитивних та негативних підтримуваних потенціалах зображені на Рисунку 3.35А.

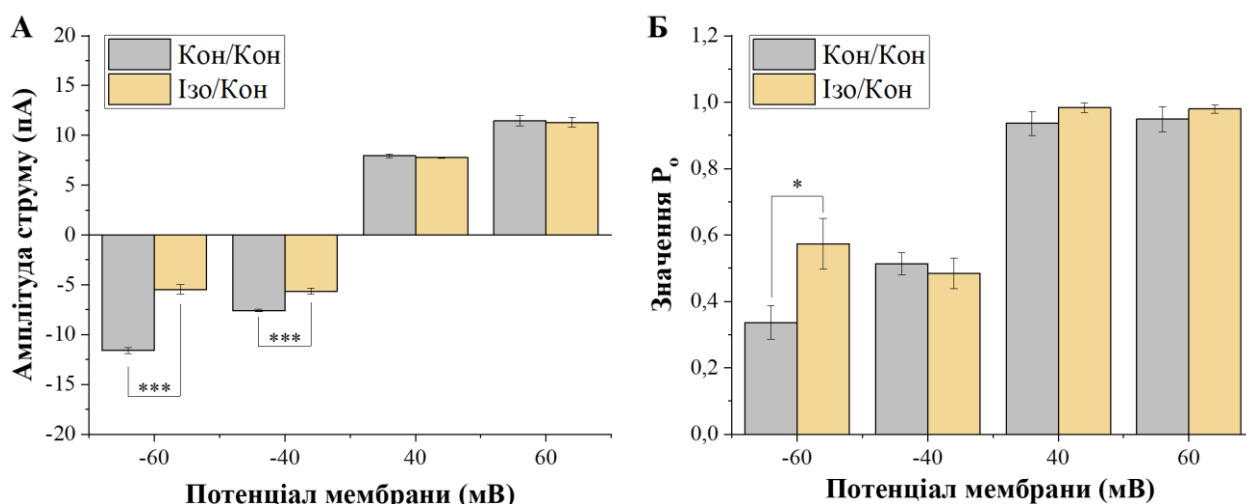


Рис. 3.35. Усереднені значення амплітуди струму крізь LCC-канали (А) та ймовірність цих каналів перебувати у відкритому стані (Б) при додаванні ізопреналін гідрохлориду у ванночку зі зразком із кінцевою концентрацією діючої речовини 1 ммоль/л (Ізо/Кон) порівняно з контролем (Кон/Кон). * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.

Однак, попри чітко виражене і статистично значуще зменшення амплітуди струму за дії ізопреналіну, результати визначення ймовірності перебування LCC-каналів у відкритому стані за дії цієї речовини, показані на Рисунку 3.35Б, внесли певну неоднозначність у розуміння її впливу. Так, встановлено, що при потенціалі -60 мВ ізопреналін (1 ммоль/л) викликав статистично значуще збільшення значень P_0 з $0,33 \pm 0,05$ ($n = 6$) у контролі до $0,57 \pm 0,07$ ($n = 5$) при застосуванні досліджуваної речовини (збільшення на 72,7%; $P < 0,05$). Такий результат вказує на те, що канал був у відкритому стані довше, порівняно з контрольними умовами. Можна припустити, що цей ефект може бути частково пов'язаним з інтенсивним миготінням каналів, описаним

вище. Ймовірно, що при зумовленні молекулою ізопреналіну механічного блокування пори, яке вважається причиною явища миготіння (Котик та ін., 2019), LCC-канал не може ні повноцінно закритися ні відкритися, призводячи до реєстрованого збільшення ймовірності відкритого стану. Однак цей ефект не зареєстровано за жодних інших значень мембранного потенціалу, що не підтверджує згадану ідею.

Продовжуючи вивчення впливу ізопреналіну на LCC-канали, на наступному кроці досліджень було перевірено, чи є ці ефекти залежними від концентрації. Нормалізовані значення амплітуди струму та P_o , отримані при додаванні цієї речовини у ванночку в різних концентраціях, представлені на Рисунку 3.36.

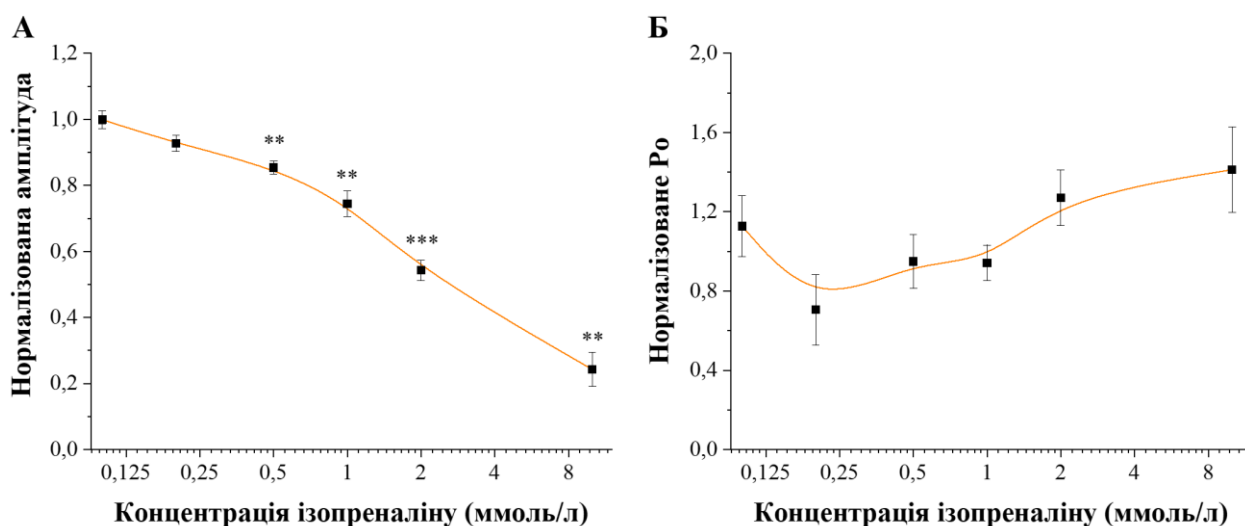


Рис. 3.36. Залежність нормалізованої амплітуди струму крізь LCC-канали (А) та ймовірності їх відкритого стану (Б) від концентрації ізопреналін гідрохлориду при його додаванні у ванночку та фіксації мембранного потенціалу при -40 мВ. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Виявлено, що мінімальна концентрація ізопреналіну, яка здатна спричинити статистично значуще зниження амплітуди, становить $0,5$ ммоль/л. За цієї концентрації аплікованої сполуки значення амплітуди знизилися з $-7,58 \pm 0,13$ пА ($n = 11$) у контролі до $-6,47 \pm 0,15$ пА ($n = 6$) з ізопреналіном

(зміна на 14,6%; $P < 0,01$). Амплітуда струму продовжила поступове зниження зі збільшенням концентрації ізопреналіну, із максимальним ефектом при концентрації 10 ммоль/л. У цьому випадку зареєстровані значення амплітуди становили $-1,83 \pm 0,39$ пА ($n = 4$), що є зниженням на 75,9% порівняно з контролем ($P < 0,01$).

Привертає увагу те, що при мембранному потенціалі -40 мВ збільшення концентрації ізопреналіну не мало впливу на ймовірність LCC-каналів перебувати у відкритому стані, і навіть при концентрації 10 ммоль/л не встановлено значущої різниці за цим параметром у контролі 0.51 ± 0.03 ($n = 11$) та при застосуванні ізопреналіну 0.72 ± 0.11 ($n = 4$), попри видимість певної тенденції до зростання. Ці дані можуть вказувати на те, що отримані попередньо при потенціалі -60 мВ результати щодо статистично значущого підвищення P_o можуть бути випадковими, або ж свідчити про залежність взаємодії між речовиною і каналом від вузького діапазону значень мембранного потенціалу. Таким чином, дані щодо впливу ізопреналіну на ймовірність перебування LCC-каналів у відкритому стані наразі залишаються дискусійними.

З врахуванням результатів досліджень цієї речовини (Надтока та ін., 2024b; Надтока та ін., 2025c; Kotyk et al., 2026b), можуть бути запропоновані такі проміжні узагальнення щодо дії ізопреналіну на LCC-канали при додаванні розчину сполуки у ванночку:

1. Ізопреналін (1 ммоль/л) статистично значуще знижує амплітуду струму крізь LCC-канали при негативних потенціалах ядерної мембрани, з максимальним зниженням на 52,7% при -60 мВ.
2. Попри виражене зниження амплітуди струму при -60 мВ, ізопреналін за ідентичних значень мембранного потенціалу і концентрації підвищує ймовірність відкритого стану LCC-каналів на 72,7%.
3. Дія ізопреналіну на LCC-канали супроводжується вираженим миготінням, особливо при негативних підтримуваних потенціалах.

3.3.5. Підсумки досліджень впливу модуляторів адренорецепторів на LCC-канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє

Результати проведених досліджень впливу норепінефрин гідрохлориду, епінефрин гідрохлориду, пропранолол гідрохлориду та ізопреналін гідрохлориду на функціональні характеристики LCC-каналів при додаванні речовин у ванночку зі зразком представлені у таблиці 3.5.

Таблиця 3.5. Зміни електрофізіологічних властивостей LCC-каналів при застосуванні розчинів вказаних адреномодуляторів у концентрації 1 ммоль/л у ванночку. А – амплітуда струму; P_o – ймовірність відкритого стану каналів.

Речовина	Підтримуваний потенціал мембрани			
	-60 мВ	-40 мВ	+40 мВ	+60 мВ
Норепінефрин	А ↓10,2% P _o ↓36,0%	А ↓6,7% P _o ↓53,8%	Без змін	Без змін
Епінефрин	Без змін	А ↓13,4%	Без змін	Без змін
Пропранолол	А ↓22,9%	А ↓9,6%	Без змін	Без змін
Ізопреналін	А ↓52,7% P _o ↑72,7%	А ↓25,6%	Без змін	Без змін

Статті, в яких опубліковані основні наведені у підрозділі результати:

1. Kotyk O, Nadтока S, Vynohradova T, Taghavi A, Marchenko S, Kotliarova A. Effects of adrenergic receptor modulators on nuclear LCC-channels in Purkinje neurons. *Acta Neurobiol Exp.* 2026; 86: 11-21. <https://doi.org/10.55782/j42ygh03>

Тези доповідей:

1. Надтока С., Котик О., Котлярова А. Вплив ізопротеренолу на LCC-канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка щурів. Тези доповідей Міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні проблеми сучасної

біології, тваринництва та ветеринарної медицини»; 2024 жов 3 – 4; Львів, Україна. Біологія тварин. 2024;26(3):95.

2. Надтока С., Котик О., Котлярова А. Ефект модуляторів холіно- та адренорецепторів на властивості LCC-каналів нейронів Пуркінє мозочка. Школа-воркшоп «Сучасні методи в нейронауках»; 2025 жов 28 – 29; Київ, Україна. Фізіол. журн. 2025;71(5S):1-18.

РОЗДІЛ 4 ОБГОВОРЕННЯ

Узагальнюючи результати вивчення впливу холіно- та адреномодуляторів на LCC-канали ядерної мембрани, необхідним є виокремлення ключових речовин, які притаманні як кожній із досліджуваних сполук в межах її класу, так і проведення порівнянь речовин за вираженістю їх інгібувальних властивостей щодо цих каналів незалежно від їх категорії за фізіологічною дією. Встановлення того, які речовини є ефективними для регуляції окремих електрофізіологічних параметрів LCC-каналів, є важливим у контексті можливості їх подальшого використання для зумовлення відповідного впливу, зокрема, при дослідженні наслідків інгібування цих каналів на процес вивільнення іонів Ca^{2+} .

4.1. Аналіз впливу модуляторів нікотинових холінорецепторів на властивості LCC-каналів

Результати щодо впливу ацетилхоліну на електрофізіологічні властивості LCC-каналів вказують на те, що при додаванні у ванночку та взаємодії з їх внутрішньоядерною стороною, інгібуючий вплив ацетилхоліну на амплітуду струму через ці канали значно менш виражений, порівняно з іншим агоністом н-холінових рецепторів, ніотином, описаним раніше (Котлярова та ін., 2019), який спричиняв зменшення амплітуди LCC-опосередкованого струму вдвічі вже при концентрації 0,2 ммоль/л. Ще один модулятор н-холінових рецепторів, мекаміламін, досліджений у цій роботі, також мав сильніший вплив на амплітуду струму, що проходить через LCC-канали, та зменшував значення цього параметру у 2-3 рази ефективніше порівняно з ацетилхоліном. Тим не менш, певний ступінь інгібування дозволяє припустити існування принаймні часткової взаємодії між LCC-каналами та молекулами ацетилхоліну, враховуючи, що антагоністичні ефекти як ацетилхоліну, так і

карбахоліну були все ще сильнішими, порівняно з ефектами деяких інших модуляторів n-холінових рецепторів на LCC-канали, а саме метиллікаконітину та альфа-конотоксину PeIA (Брянцева та ін., 2021; Котлярова та ін., 2019). Незважаючи на доволі слабкий вплив на амплітуду струму, ацетилхолін при додаванні у ванночку продемонстрував виражену здатність знижувати P_o LCC-каналів при негативних мембранних потенціалах, зі зниженням ймовірності відкритого стану майже вдвічі за концентрації речовини 1 ммоль/л, що є порівнянним з дією толперизону, описаного у попередніх дослідженнях (Котик та ін., 2019). Водночас, коли ацетилхолін було додано через петч-піпетку та він взаємодіяв з перинуклеарною стороною LCC-каналів, ця речовина збільшувала P_o LCC-каналів, на противагу ефекту, зареєстрованому при його аплікації у ванночку. Таке підвищення P_o LCC-каналів не було описано раніше в літературних джерелах, і не спостерігали більше при вивченні жодного з досліджуваних в межах цієї роботи представника нікотинових чи мускаринових холіномодуляторів. Ще більш інтригуючим цей результат робить те, що збільшення параметру P_o спостерігали одночасно зі значним зменшенням амплітуди струму крізь LCC-канали, зареєстрованим при всіх потенціалах. Це зниження амплітуди перевищувало таке, описане для мекаміламіну, а також і для самого ацетилхоліну у конфігурації додавання речовини до ванночки зі зразком, однак зменшення амплітуди, зумовлене піпекуроній та рокуроній бромідами було все ж більш ефективним за аналогічної концентрації речовини (Котлярова та ін., 2019). Загалом відмінність у силі ефекту ацетилхоліну на амплітуду струму крізь канали, а також протилежність цього ефекту у контексті впливу на ймовірність відкритого стану LCC-каналів залежно від того, з якого боку ядерної мембрани ця речовина була застосована, може свідчити про потенційні відмінності між внутрішньоядерними та перинуклеарними доменами LCC-каналів.

Наведене припущення щодо гетерогенності будови LCC-каналів знайшло подальше підґрунтя при аналізі ефектів, зумовлених карбахоліном. Коли ця речовина у концентрації 1 ммоль/л була додана у ванночку зі зразком і

взаємодіяла з внутрішньоядерною частиною LCC-каналів, не спостерігали значущих змін амплітуди струму LCC-каналів, але зареєстровано зменшення P_o при мембранному потенціалі -60 мВ. Ці результати узгоджуються з попередніми дослідженнями, проведеними на кардіоміоцитах, де не було виявлено суттєвих змін амплітуди струму через LCC-канали під впливом карбахоліну (Kotyk et al., 2017). Крім цього, схожий ефект, а саме зниження ймовірності відкритого стану каналів без зниження амплітуди струму крізь них, спостерігали і при застосуванні гексаметонію, дія якого описана у літературних джерелах (Брянцева та ін., 2021). Однак, коли розчин карбахоліну було додано у петч-піпетку і він взаємодіяв з перинуклеарною частиною цих каналів, спостерігали значне зменшення амплітуди струму крізь LCC-канали при всіх застосованих потенціалах, але при цьому значення P_o не зазнавали змін, що є протилежним до ефектів, встановлених при додаванні карбахоліну до ванночки. Беручи до уваги ці результати для ацетилхоліну та карбахоліну, можна припустити, що модуляція ймовірності перебування LCC-каналів у відкритому стані не залежить від модуляції амплітуди струму, що проходять крізь них. Це також перший випадок, коли показано асиметричну дію агоністів н-холінових рецепторів на LCC-канали. Окремо варто зазначити, що при застосуванні ацетилхоліну та карбахоліну не спостерігався ефект миготіння каналів; тим часом α -кобратоксин, який також, як було показано, здатний зменшувати P_o LCC-каналів, викликав миготіння каналів одночасно з їх інгібуванням (Котик та ін., 2019), як і мекаміламін, описаний у цій роботі.

Аналізуючи результати впливу мекаміламіну на LCC-канали, можна зробити кілька спостережень. По-перше, ця речовина здатна знижувати амплітуду струму крізь LCC-канали за негативного мембранного потенціалу при застосуванні з будь-якої з двох сторін мембрани. По-друге, природа такого інгібування може бути різною, оскільки ефект підвищення амплітуди, який спостерігали при позитивному потенціалі, коли мекаміламін було додано у ванночку зі зразком і він взаємодіяв з внутрішньоядерною стороною мембрани, був відсутній, коли речовину додавали через піпетку і вона

взаємодіяла з перинуклеарною стороною. Відмінність між ефектами мекаміламіну залежно від того, у якій конфігурації його було застосовано, продовжує тенденцію, описану для ацетилхоліну та карбахоліну, та може вказувати на відмінність у доменній будові LCC-каналів з внутрішньоядерної і перинуклеарної сторін мембрани. Підсумовуючи аналіз змін середніх значень амплітуди струму при різних мембранних потенціалах, можна зробити висновок, що мекаміламін, як блокатор LCC-каналів, є менш ефективним порівняно з нейротоксином II, нікотином та піпекуроній бромідом (Котлярова та ін., 2019; Котик та ін., 2019), але його дія на LCC-канали супроводжується зниженням амплітуди струму більшою мірою, порівняно з дією α -кобратоксину. Порівняно з іншими класами біологічно активних молекул, мекаміламін виявився ефективнішим інгібітором LCC-каналів, ніж 4-амінопіридин та тетраетиламоній (Fedorenko et al., 2010), а також толперизон і пропофол (Котик та ін., 2019), попри здатність останніх знижувати ймовірність перебування LCC-каналів у відкритому стані.

Додатково заслуговує на увагу факт того, що інгібуюча здатність речовини може суттєво змінюватися залежно від конфігурації застосування. Як було показано, ацетилхолін, хоча й є слабким інгібітором LCC-каналів, все ж має певний статистично значущий вплив на амплітуду струму, що проходить крізь ці канали, на відміну від карбахоліну, до якого канали залишалися інертними при його додаванні у ванночку зі зразком. Однак, при аплікації через петч-піпетку карбахолін за силою дії не поступався ацетилхоліну за аналогічної конфігурації застосування, і перевищував ефект ацетилхоліну за умови додавання останнього у ванночку. Подібний принцип застосовний також і до мекаміламіну, який виявляє здатність до зменшення амплітуди струму крізь LCC-канали при позитивних мембранних потенціалах виключно при додаванні через петч-піпетку. Беручи до уваги, що багато досліджень модуляторів LCC-каналів проводилися шляхом додавання досліджуваної речовини безпосередньо у ванночку зі зразком (Котлярова та ін., 2019; Kotyk et al., 2017; Котик та ін., 2019), ці результати потенційно

можуть відкрити нові можливості застосування для раніше ігнорованих речовин, оскільки, хоча деякі з них не були здатні модулювати активність LCC-каналів при взаємодії з їх внутрішньоядерною частиною, вони все ще можуть чинити ефект при застосуванні з перинуклеарного боку.

Розглядаючи ефект на властивості LCC-каналів наступного представника н-холіномодуляторів, а саме панкуроній броміду, привертає увагу його виражена дія на амплітуду струму крізь ці канали, що була встановлена при позитивних та негативних мембранних потенціалах. Зниження цього параметру на 20-25% при концентрації речовини 1 ммоль/л зазвичай спостерігали при додаванні розчинів попередньо описаних модуляторів н-холінорецепторів через петч-піпетку, тоді як при взаємодії речовин з внутрішньоядерною частиною мембрани інгібувальний ефект мекаміламіну, ацетилхоліну та карбахоліну був виражений слабше. Водночас дія панкуроній броміду супроводжувалася інгібувальним ефектом такої ж сили (зниження амплітуди струму на чверть) вже при додаванні речовини у ванночку. Однак варто зазначити, що кожен з вищевказаних н-холіномодуляторів був здатен знижувати ймовірність відкритого стану LCC-каналів, на відміну від панкуронію, хоч і при додаванні до ванночки такий ефект мекаміламіну, ацетилхоліну та карбахоліну спостерігали виключно при негативних потенціалах мембрани. Порівнюючи дію панкуроній броміду з літературними даними, можна помітити його схожість за дією з рокуроній бромідом за здатністю знижувати амплітуду струму (Котлярова та ін., 2019), а також із дитиліном (діюча речовина – суксаметоній хлорид) (Kotyuk et al., 2017). Водночас рокуроній бромід, маючи подібну хімічну структуру зі стероїдним ядром у складі молекули, все ж був суттєво ефективнішим при модуляції P_o (Котлярова та ін., 2019).

Наступний із досліджених представників холіномодуляторів, а саме векуроній бромід, також не призводив до статистично значущого зниження значень P_o LCC-каналів за жодної із застосованих концентрацій речовини. Попри це, зумовлене ним зменшення значень амплітуди струму було вдвічі чи

втричі більшим, ніж у будь-якого із вивчених у рамках цієї роботи холіномодуляторів, включно із попередньо згаданим панкуроній бромідом та модуляторами мускаринових холінорецепторів, описаними далі. Особливо вираженим цей ефект був при негативних потенціалах ядерної мембрани, за яких векуроній бромід знижував амплітуду струму у два рази. Статистично значуще зменшення амплітуди за дії цієї речовини спостерігали також і при позитивних потенціалах, за яких з-поміж усіх представників н-холіномодуляторів виявили здатність до зниження цього параметру при додаванні у ванночку тільки панкуроній бромід та векуроній бромід. Порівнюючи векуроній бромід з раніше описаними речовинами, варто зазначити, що зумовлене ним зменшення амплітуди струму є більш вираженим, ніж описане за дії рокуроній броміду, і загалом є подібним до такого при застосуванні піпекуроній броміду, який у концентрації 1 ммоль/л також призводив до зниження цього параметру вдвічі (Котлярова та ін., 2019). Однак, попри виражене зменшення значень амплітуди струму, антагоністичний ефект векуроній броміду все ж поступався d-тубокурарину, наведеному у попередніх роботах серед перспективних блокаторів LCC-каналів (Lunko et al., 2016; Kotyk et al., 2017). В той же час, згадана раніше відсутність впливу на ймовірність перебування LCC-каналів у відкритому стані може бути перевагою при застосуванні векуроній броміду для подальших досліджень, оскільки уможлиблює вивчення наслідків і механізмів зміни одного специфічного параметру (амплітуди струму), а не генералізованого пригнічення кількох параметрів електрофізіологічної активності LCC-каналів одночасно. Подібний ефект специфічного пригнічення амплітуди струму був описаний також і при застосуванні карбахоліну та мекаміламіну, однак він був менш виражений і потребував застосування речовин через петч-піпетку, що є складнішою для реалізації конфігурацією, ніж додавання речовини безпосередньо у ванночку зі зразком.

Узагальнюючи проведені в рамках цієї роботи дослідження модуляторів нікотинових холінорецепторів, за здатністю знижувати ймовірність

перебування LCC-каналів у відкритому стані їх послідовність виглядає наступним чином: мекаміламін \geq ацетилхолін $>$ карбахолін $>$ панкуроній = векуроній. За здатністю знижувати амплітуду струму крізь канали ці речовини розподілені наступним чином: векуроній \gg панкуроній $>$ ацетилхолін $>$ мекаміламін \geq карбахолін. При цьому варто зазначити, що ацетилхолін зумовлює підвищення P_o LCC-каналів при додаванні через піпетку при негативних мембранних потенціалах, а мекаміламін – незначне підвищення амплітуди струму при додаванні у ванночку при позитивних потенціалах, тож у разі їх використання як блокаторів потрібно брати до уваги конфігурацію аплікації речовини та електричні параметри ядерної мембрани.

4.2. Аналіз впливу модуляторів мускаринових холінорецепторів на властивості LCC-каналів

Проаналізувавши результати, отримані при вивченні амплітуди струму крізь LCC-канали при застосуванні атропіну у різних конфігураціях, можна виявити, що ця речовина при додаванні у ванночку зі зразком та взаємодії з внутрішньоядерною частиною LCC-каналів впливала на вказаний параметр лише при негативних мембранних потенціалах, тоді як при аплікації атропіну через петч-піпетку та, як наслідок, взаємодії цієї речовини з перинуклеарною стороною каналів, її інгібуючий ефект проявлявся як при позитивних, так і при негативних потенціалах. Водночас, порівняно із аплікацією у ванночку, зміни амплітуди струму при негативних потенціалах були менш вираженими. Порівняно з ацетилхоліном та карбахоліном, дослідженим у цій роботі, атропін мав сильніший інгібуючий ефект на струм крізь LCC-канали при додаванні у ванночку з ядрами Пуркінє, однак все ж не такий суттєвий, як встановлений для нейротоксину II (Котик та ін., 2019). Раніше описаний піпекуронію бромід, який, подібно до атропіну, може діяти як антагоніст М-холінових рецепторів, також перевершує атропін за своєю здатністю знижувати амплітуду струму через LCC-канали (Котлярова та ін., 2019). Тим

часом, при додаванні до розчину у ванночці, атропін мав сильніший інгібуючий ефект на цей параметр, ніж інший модулятор холінорецепторів, мекаміламін, при аплікації у тій самій концентрації. Також встановлено, що атропін здатний знижувати ймовірність перебування LCC-каналів у відкритому стані при негативних потенціалах, але лише при додаванні у ванночку, подібно до карбахоліну. Виразне зниження значень P_o спостерігали при потенціалі -40 мВ із подібною тенденцією при -60 мВ. Можна помітити подібність з ефектом згаданого раніше ацетилхоліну, який також знижував P_o LCC-каналів при негативних мембранних потенціалах після додавання у ванночку зі зразком, однак при цьому при позитивних потенціалах такий ефект не спостерігався. Варто також зазначити, що атропін був приблизно вдвічі менш ефективним у контексті впливу на ймовірність відкритого стану досліджуваних каналів порівняно з мекаміламіном і рокуроній бромідом (Котлярова та ін., 2019), і за ступенем зниження цього параметру нагадував карбахолін, будучи найслабшим інгібітором ймовірності відкритого стану LCC-каналів серед досліджених у цій роботі модуляторів мускаринових холінорецепторів.

Ще один ефект атропіну, що спостерігали у деяких реєстраціях струму під час проведення досліджень, полягає в його здатності незначно збільшувати миготіння каналів – швидкі переходи каналу між відкритим та закритим станами. Цікавим є те, що сполуки, для яких раніше було описано ефект миготіння каналів, а саме толперизон та α -кобратоксин, також знижували P_o LCC-каналів (Котик та ін., 2019), як і атропін. Також варто зазначити, що атропін при аплікації у ванночку візуально дещо збільшував амплітуду струму через LCC-канали при позитивних мембранних потенціалах. І хоча це не знайшло статистичного підтвердження, така тенденція незалежно спостерігалася як у випадку додавання досліджуваної речовини до ванночки, коли піпетка була заповнена контрольним розчином, так і при додаванні атропіну спочатку у піпетку, а потім до ванночки.

Як було вказано в огляді літератури та при описі результатів, більшість речовин, для яких було доведено вплив на електрофізіологічні властивості LCC-каналів, належать до категорії модуляторів n-холінових рецепторів. Це дозволяє припустити, що деякі молекулярні патерни, які беруть участь у взаємодії з LCC-каналами, можуть нагадувати ті, що беруть участь у модуляції нікотинових ацетилхолінових рецепторів, та/або що існують структурні подібності між певними доменами LCC-каналів та nAChR. Потрібно зазначити, що у цьому аспекті дослідження атропіну, який впливає переважно на мускаринові рецептори, не може однозначно спростувати наведену гіпотезу, оскільки було показано, що ця речовина також здатна впливати і на нікотинові рецептори, хоча цей ефект спостерігався лише в наномолярних концентраціях (González-Rubio et al., 2006). Таким чином, для спростування або підтвердження ідеї про подібність між структурними патернами, що відповідають за модуляцію n-холінових рецепторів, та тими, що беруть участь у взаємодії з LCC-каналами, були необхідними подальші дослідження, проведені у цій роботі з використанням платифіліну та пілокарпіну.

Обговорюючи результати, отримані при вивченні вказаних речовин, потрібно зазначити, що обидві сполуки виявили здатність до інгібування електрофізіологічних властивостей LCC-каналів. У випадку пілокарпіну, такий антагонізм спостерігався при додаванні цієї речовини до петч-піпетки, завдяки чому вона взаємодіяла з перинуклеарною частиною каналів. За відсутністю впливу на амплітуду струму крізь досліджувані іонні канали при додаванні у ванночку, пілокарпін нагадує такі модулятори нікотинових ацетилхолінових рецепторів, як карбахолін, описаний у цій роботі, та раніше досліджений гексаметоній (Брянцева та ін., 2021), які, ймовірно, не мають структурних мотивів, що дозволяли б їм чинити такий вплив, попри їх ефективність при зниженні ймовірності відкритого стану LCC-каналів. Однак, при зміні конфігурації додавання сполуки і її аплікації через петч-піпетку, карбахолін та пілокарпін набували здатності впливати на амплітуду струму крізь канали. З врахуванням цього, можна припустити наявність у складі

молекул вказаних речовин певних патернів, специфічних саме до перинуклеарних доменів LCC-каналів. Також має бути зазначено при цьому, що зумовлене пілокарпіном зниження амплітуди струму було все ж менш вираженим, порівняно з тим, яке опосередковане карбахоліном. При порівнянні пілокарпіну з рокуроній бромідом, іншим модулятором холінорецепторів, можна помітити, що обидві сполуки зумовлюють значне зниження P_o LCC-каналів (Котлярова та ін., 2019), однак механізм, за яким відбувається це регулювання, поки що залишається невідомим.

Платифілін також виявив здатність до зниження ймовірності відкритого стану LCC-каналів, але незалежно від конфігурації його додавання. Крім цього, на відміну від пілокарпіну, він знижував амплітуду струму крізь досліджувані іонні канали при додаванні до ванночки зі зразком, хоча при цьому варто зазначити, що згаданий ефект отримав статистичне підтвердження лише при потенціалі -60 мВ, а зміни порівняно із контрольними значеннями були значно меншими у відсотковому співвідношенні, ніж при зниженні ймовірності відкритого стану каналів, і загалом нагадували ефект пілокарпіну при застосуванні з перинуклеарного боку мембрани. При додаванні платифіліну до петч-піпетки, тим часом, зареєстровано збільшення амплітуди струму крізь LCC-канали при -40 мВ та -60 мВ. Жодна інша із вивчених у цій роботі речовин не була здатна підвищувати амплітуду струму крізь LCC-канали, єдиним винятком при цьому є мекаміламін, однак у випадку мекаміламіну такий ефект був у 2-3 рази меншим, за іншої конфігурації додавання речовини та при позитивних мембранних потенціалах. В той же час, платифілін за позитивних значень потенціалу цей параметр знижував, тож ймовірно, вищеописане підвищення значень амплітуди струму крізь LCC-канали, зумовлене цими двома речовинами, опосередковується різними механізмами.

Додаткової уваги заслуговує те, що та сама речовина, платифілін, спричиняла не просто різний, а протилежний ефект на цей параметр при -60 мВ залежно від конфігурації застосування. Беручи до уваги результати,

описані для інших речовин (наприклад, мекаміламіну, ацетилхоліну, карбахоліну), можна припустити, що модуляція електрофізіологічної активності LCC-каналів є високоспецифічною залежно від сторони мембрани, а самі канали можуть мати структурні відмінності між внутрішньоядерними та перинуклеарними доменами, що має бути враховано у подальших дослідженнях. Здатність пілокарпіну та платифіліну зменшувати ймовірність відкритого стану LCC-каналів є загалом добре вираженою порівняно з модуляторами як мускаринових, так і нікотинових холінорецепторів, зокрема атропіном, карбахоліном, панкуронієм, гексаметонієм (Брянцева та ін., 2021) та рокуроній бромідом (Котлярова та ін., 2019). Платифілін за ступенем зниження P_o у конфігурації додавання речовини у ванночку був однією з найефективніших речовин з описаних у цій роботі, а пілокарпін – найсильнішим інгібітором ймовірності відкритого стану каналів при аплікації речовини через петч-піпетку. Водночас здатність цих речовин знижувати амплітуду іонного струму була загалом низька, і значною мірою залежала від конфігурації їх застосування та підтримуваного потенціалу. Тим не менше, зумовлене ними інгібування електрофізіологічних параметрів LCC-каналів доводить, що модуляція цих каналів може здійснюватися представниками і інших класів речовин, не тільки агоністами та антагоністами нікотинових холінорецепторів, роблячи сумнівним припущення про можливі елементи подібності у будові регуляторних центрів n-холінорецепторів та досліджуваних каналів.

Підсумовуючи і порівнюючи ефекти вивчених у цій роботі модуляторів мускаринових ацетилхолінових рецепторів на LCC-канали, за здатністю знижувати ймовірність відкритого стану цих каналів сполуки вказаного класу розташовуються таким чином: платифілін > пілокарпін >> атропін. За вираженістю зменшення амплітуди струму крізь LCC-канали, послідовність речовин є наступною: атропін > платифілін > пілокарпін. Важливо вказати, що при порівнянні антагоністичної дії платифіліну на LCC-канали з дією інших m-холіномодуляторів взято до уваги його здатність знижувати амплітуду

струму при додаванні речовини до ванночки, тоді як особливості впливу цієї сполуки при застосуванні через петч-піпетку описані вище.

4.3. Аналіз впливу модуляторів адренорецепторів на LCC-канали

На підставі проведених досліджень дії модуляторів адренергічних рецепторів на LCC-канали можна зробити узагальнення, що всі з вивчені сполуки цього класу були здатними ефективно зменшувати амплітуду струму крізь LCC-канали при негативних мембранних потенціалах. Крім цього, інгібувальна дія епінефрину та ізопреналіну залежала від концентрації речовини і підвищувалася разом із нею. Однак, цей принцип не застосовний щодо здатності вказаних сполук модулювати ймовірність перебування LCC-каналів у відкритому стані, оскільки не було виявлено зниження P_o при додаванні ізопреналіну чи епінефрину незалежно від використаної концентрації.

Порівнюючи ефект адреномодуляторів між собою, можна помітити, що зниження амплітуди струму за дії епінефрину є більшим порівняно з тим, яке спостерігали при додаванні норепінефрину (13% проти 7% при потенціалі -40 мВ), однак відсутність значущих змін при потенціалі -60 мВ за додавання епінефрину не дозволяє однозначно зробити такий висновок. Тим часом, жодна із досліджуваних сполук не виявила здатності змінювати амплітуду струму крізь LCC-канали за позитивних мембранних потенціалів. Цей аспект вирізняє дію модуляторів адренергічних рецепторів, описаних у цій частині дослідження, від дії деяких модуляторів нікотинових ацетилхолінових рецепторів, зокрема, векуроній броміду та панкуроній броміду, описаних раніше. Однак інші модулятори холінорецепторів, а саме ацетилхолін та карбахолін, були здатними впливати на амплітуду струму крізь LCC-канали за позитивних потенціалів тільки при аплікації через петч-піпетку і взаємодії з перинуклеарною стороною цих каналів, тож не виключено, що модулятори адренорецепторів також можуть мати подібний ефект при застосуванні у іншій

конфігурації. Загалом, при додаванні до ванночки зі зразком, вплив норепінефрину, епінефрину та пропранололу на амплітуду струму, який проводили LCC-канали, не вирізнявся суттєвим чином від такого, описаного раніше для атропіну, ацетилхоліну, карбахоліну та мекаміламіну при застосуванні аналогічним способом, тобто при додаванні у ванночку зі зразком. Зниження K^+ струму за дії наведених речовин поступалося тому, яке було описане для суксаметонію (Kotyк et al., 2017), та рокуроній броміду (Котлярова та ін., 2019). Водночас це не може бути сказано про дію ізопреналіну, інгібувальна дія якого перевищила ефект кожного із вищеперелічених модуляторів холінорецепторів. Як показано у цій роботі, ізопреналін у концентрації 1 ммоль/л виявляв здатність знижувати амплітуду струму крізь LCC-канали вдвічі, і майже повністю нівелював різницю в амплітуді струму між відкритим та закритим станами каналів при концентрації 10 ммоль/л. Однак деякі модулятори ацетилхолінових рецепторів, описані в інших працях, мали ще більш виражену інгібувальну дію на LCC-канали. Нікотин, наприклад, згаданий раніше при обговоренні результатів, отриманих з використанням модуляторів н-холінорецепторів, знижував амплітуду струму крізь LCC-канали вдвічі вже при концентрації 0,2 ммоль/л, а нейротоксин II зумовлював помітне зменшення амплітуди струму при 0,025 ммоль/л (Котлярова та ін., 2019; Котик та ін., 2019). Проте, на відміну від нікотину та нейротоксину II, ефекти ізопреналіну супроводжувалися вираженим миготінням каналів. Цей феномен раніше був досліджений і описаний для таких речовин, як метиллікаконітин (Брянцева та ін., 2021), тубокурарин (Lunko et al., 2016; Lunko & Lunko, 2020), толперизон, α -кобратоксин та дитилін, і зазвичай пов'язаний із механічним блокуванням пори каналу молекулою досліджуваної сполуки (Котик та ін., 2019). Під час досліджень ізопреналіну було висунуто припущення, що таке блокування може бути причиною ще однієї особливості дії цієї речовини, а саме її здатності підвищувати P_o LCC-каналів при потенціалі -60 мВ. Однак у подальшому подібний ефект не спостерігався при потенціалі -40 мВ незалежно від

застосованої концентрації діючої речовини, тож не може бути виключена ймовірність, що статистично значуща зміна при -60 мВ була випадковою.

Єдиним дослідженням модулятором адренорецепторів, який виявив здатність до зниження ймовірності перебування LCC-каналів у відкритому стані, був норепінефрин. Різниця у здатності до модуляції P_o між норепінефрином та іншими агоністами і антагоністами адренорецепторів може свідчити про те, що молекулі норепінефрину можуть бути притаманні певні структурні особливості, які цю модуляцію опосередковують і які не притаманні іншим дослідженим адреномодуляторам. Подальше вивчення і виявлення цих особливостей може бути важливим при розкритті механізмів регуляції перемикання LCC-каналів між відкритим і закритим станами, тож додаткові дослідження є необхідними для виявлення, які саме молекулярні патерни залучені до цього процесу. Варто також згадати зроблене у попередніх розділах спостереження, що модуляція амплітуди струму крізь LCC-канали та їх ймовірності перебування у відкритому стані може забезпечуватися різними механізмами, оскільки це припущення знаходить підтвердження і при дослідженні модуляторів адренорецепторів, за результатами якого не всі сполуки, які знижували амплітуду струму крізь ці канали, були здатні впливати також і на їх P_o .

Підсумовуючи дослідження дії речовин цього класу, за вираженістю здатності до зниження амплітуди струму крізь LCC-канали адреномодулятори можуть бути розташовані наступним чином: ізопреналін > пропранолол > норепінефрин \approx епінефрин. При цьому єдиною сполукою, яка виявила здатність знижувати P_o LCC-каналів, був норепінефрин, тоді як застосування ізопреналіну призводило до збільшення цього параметру.

4.4. Узагальнення досліджень впливу речовин на LCC-канали

З урахуванням описаних результатів досліджень, за здатністю холіно- та адреномодуляторів впливати на електрофізіологічні параметри LCC-каналів ці

речовини можуть бути поділені на 4 групи залежно від виявленого ефекту та конфігурації застосування:

1. Речовини, що впливають на амплітуду струму при додаванні у ванночку і взаємодії з внутрішньоядерною частиною мембрани: ацетилхолін, панкуроній, векуроній, атропін, платифілін, норепінефрин, епінефрин, пропранолол, ізопреналін, мекаміламін.

2. Речовини, що змінюють амплітуду струму при додаванні через петч-піпетку і взаємодії з перинуклеарною частиною ядерної мембрани: мекаміламін, ацетилхолін, карбахолін, атропін, платифілін, пілокарпін.

3. Речовини, що модулюють ймовірність LCC-каналів перебувати у відкритому стані при додаванні у ванночку і взаємодії з внутрішньоядерною частиною мембрани: мекаміламін, ацетилхолін, карбахолін, атропін, платифілін, норепінефрин, ізопреналін.

4. Речовини, що впливають на ймовірність відкритого стану LCC-каналів при додаванні через петч-піпетку і взаємодії з перинуклеарною частиною мембрани: платифілін, пілокарпін, ацетилхолін.

Більшість із наведених сполук проявляли антагоністичний ефект на LCC-канали, тож їх розподіл на категорії за інгібувальними властивостями виглядав би майже ідентичним чином, однак до інгібіторів амплітуди струму в цьому випадку не слід включати мекаміламін (в конфігурації додавання у ванночку) та платифілін (в конфігурації додавання у піпетку), оскільки за цих умов вказані речовини зумовлювали як підвищення, так і зниження амплітуди, залежно від заряду мембрани. Аналогічно при узагальненні речовин, які зумовлюють зниження ймовірності відкритого стану LCC-каналів, до відповідних груп не слід включати ацетилхолін (при додаванні у піпетку) та ізопреналін (при додаванні у ванночку), оскільки за вказаних конфігурацій ці сполуки зумовлюють підвищення значень P_o . Також можна помітити, що деякі речовини належать одночасно до кількох груп, оскільки зумовлюють кілька різних ефектів, або ж ці ефекти проявляються у різних конфігураціях.

Схематична репрезентація впливу описаних сполук на LCC-канали наведена на Рисунку 4.1.

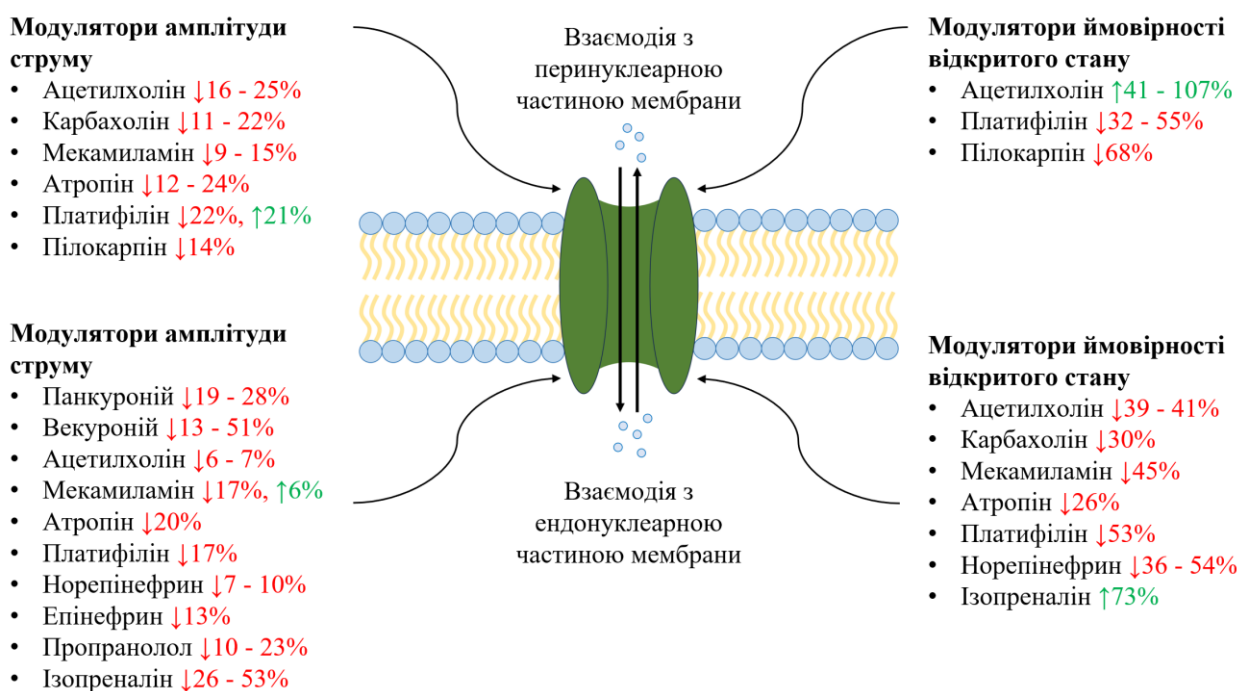


Рис. 4.1. Підсумкова схема впливу досліджених модуляторів холіно- та адренорецепторів у концентрації 1 ммоль/л на LCC-канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка. Додавання речовини через петч-піпетку відповідає її взаємодії з перинуклеарною частиною мембрани, а у ванночку – із ендонуклеарною.

На підставі проведених досліджень у кожній із категорій можна виокремити сполуки, ефект яких на обраний параметр електрофізіологічних властивостей LCC-каналів за умов аналогічної концентрації та способу застосування був найбільш виражений порівняно з іншими речовинами, і які можуть розглядатися як перспективні кандидати для майбутніх досліджень, що вимагають модуляції цих каналів. Так, найбільшою мірою зниження амплітуди струму крізь LCC-канали при додаванні речовини до ванночки зі зразком спостерігали при використанні векуроній броміду та ізопреналіну, однак якщо дія ізопреналіну проявлялася виключно при негативному мембранному потенціалі, то інгібувальний ефект векуроній броміду

спостерігався як при негативних, так і при позитивних мембранних потенціалах. Найефективніше знижував амплітуду струму при додаванні через петч-піпетку ацетилхолін, але оскільки його дія в цій конфігурації супроводжувалася підвищенням P_o LCC-каналів більш ніж вдвічі, подібний за силою, але специфічніший ефект може бути досягнений з використанням карбахоліну. Зниження ймовірності відкритого стану LCC-каналів при додаванні речовини у ванночку було найбільш вираженим при використанні норепінефрину та платифіліну, а при додаванні розчину через піпетку – при використанні пілокарпіну. При цьому підвищення амплітуди струму при додаванні речовини до ванночки спостерігається лише при використанні мекаміламіну, а при додаванні до піпетки – платифіліну. Збільшує ймовірність відкритого стану LCC-каналів при додаванні до ванночки ізопреналін, а при застосуванні через петч-піпетку – лише ацетилхолін.

Відмінності у вираженості блокувального ефекту ϵ , найімовірніше, зумовленими відмінностями у хімічній структурі описаних речовин. Встановлення і подальше вивчення структурних особливостей, які забезпечують інгібування LCC-каналів, може допомогти вибудувати краще розуміння структури самих LCC-каналів, оскільки молекули модулятора зазвичай є комплементарними регуляторному сайту модульованого білка, такого, як іонний канал. З урахуванням цього, хоча аналіз хімічної будови сполук не був метою цієї роботи і встановлення структурних патернів передбачає використання методів тривимірного моделювання молекул з їх гідратними оболонками, на підставі розподілу досліджуваних речовин на вказані групи за виявленим ефектом можуть бути зроблені певні початкові припущення і обговорення особливостей їх будови, які могли б зумовлювати відповідний вплив або навпаки, бути неспецифічними. Так, більшість речовин, що знижують амплітуду струму крізь LCC-канали при аплікації у ванночку, мають щонайменше одну карбонільну групу, а платифілін, панкуроній бромід та векуроній бромід – дві. Попри це, дія платифіліну на амплітуду струму крізь LCC-канали була суттєво слабшою, ніж у панкуроній броміду. Також вказаної

хімічної групи позбавлений ізопреналін, однак за дії цієї речовини описане найбільш виражене зменшення амплітуди струму з-поміж усіх адреномодуляторів. Враховуючи вищезазначене, карбонільна група навряд є залучена до модуляції цього параметру. Крім цього, привертає увагу, що попри загальну гідрофільність молекул, що знижують амплітуду струму крізь LCC-канали при аплікації у ванночку, у складі цих речовин наявна велика кількість гідрофобних циклів. Панкуроній та векуроній з цієї групи характеризуються гідрофобною стероїдною короною частиною, і саме ці речовини зумовлювали найбільш виражене зниження амплітуди струму крізь досліджувані канали. Атропін та катехоламіни, будучи в цілому гідрофільними, також мають у своєму складі циклічні бензольні кільця. Натомість ацетилхолін, найбільш полярна і позбавлена гідрофобних елементів молекула з цієї категорії, водночас мав і найслабший вплив на реєстровані значення амплітуди струму. Хімічні формули речовин, що зумовлюють зниження амплітуди струму крізь LCC-канали при додаванні у ванночку зі зразком наведені на Рисунку 4.2. Тут і далі, коректність наведених формул була перевірена відповідно до представлених у базі даних PubChem (NCBI).

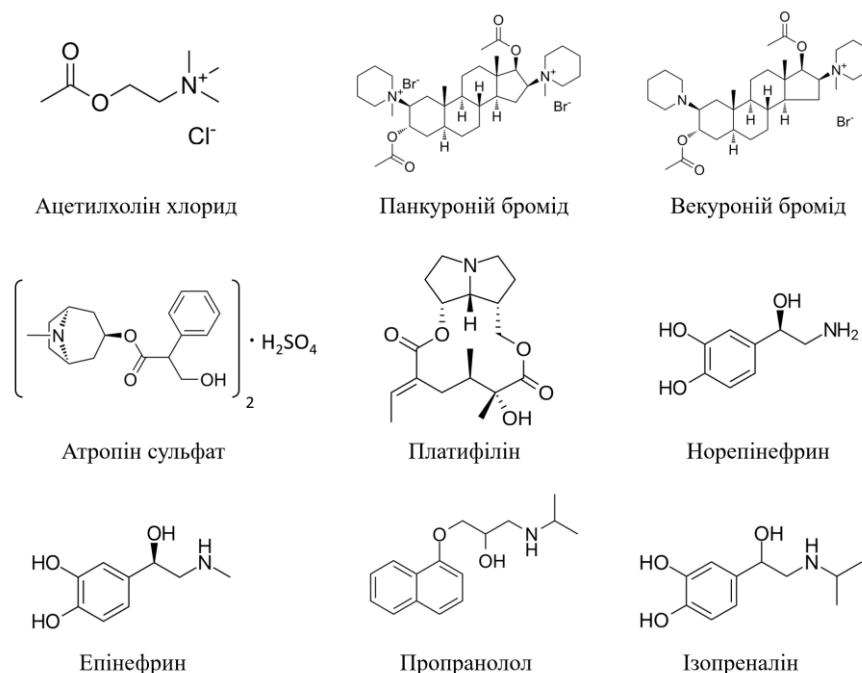


Рис. 4.2. Хімічна будова сполук, які знижують амплітуду струму крізь LCC-канали у конфігурації додавання речовини у ванночку.

Представники другої групи речовин, що знижують амплітуду струму при додаванні через петч-піпетку, є меншими молекулами, позбавленими стероїдних частин, хоча у молекулі атропін сульфату все ж наявний при цьому ароматичний цикл. Мекаміламін в той же час виявляє як слабо гідрофільні, так і гідрофобні властивості, і у формі гідрохлориду ця молекула має позитивний заряд завдяки атому азоту в своєму складі. Наявність позитивно зарядженого атома азоту в молекулі притаманна також ацетилхоліну та карбахоліну при використанні у формі солей хлоридної кислоти, а також атропіну у формі атропін сульфату. Можна припустити, що ця частина бере участь у взаємодії з LCC-каналами і модуляції їх властивостей, однак наведене припущення має бути перевірене подальшими дослідженнями. Речовини, що належать до групи інгібіторів амплітуди струму при додаванні у петч-піпетку представлені на Рисунку 4.3.

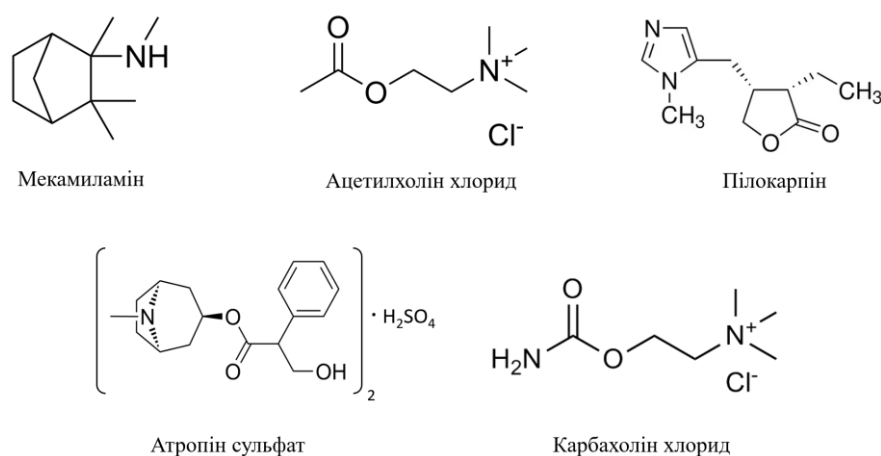


Рис. 4.3. Формули речовин, що знижують амплітуду струму крізь LCC-канали у конфігурації додавання у петч-піпетку.

При розгляді речовин, що зумовлювали зниження ймовірності відкритого стану LCC-каналів, помітно, що більшість з них проявляли антагоністичні властивості при додаванні саме до ванночки, і сполуки цієї групи є чисельнішими та більш гетерогенними за будовою, порівняно з речовинами, які знижували значення цього параметру при додаванні через петч-піпетку.

Однак потрібно зазначити, що не для всіх із вивчених у цій роботі речовин проведено паралельні дослідження при їх додаванні через петч-піпетку, тож деякі з потенційних модуляторів цього параметру у вказаній конфігурації могли залишитися поза увагою. Аналізуючи інгібітори P_o LCC-каналів, що проявляли ефект при додаванні у ванночку, можна помітити, що мекамиламін характеризується наявністю біциклопептанового кільця, що має подібну тривимірну структуру до тропанового кільця атропіну, який за умови взаємодії з внутрішньоядерною частиною каналів також знижує значення P_o . Водночас подібні конформаційні особливості не спостерігаються серед інших молекул, що належать до цієї групи, натомість спостерігається наявність позитивно зарядженого атому азоту, але ця ознака не є високоспецифічною для вказаної категорії речовин, та була притаманна і для модуляторів амплітуди струму крізь канали. Хімічна будова сполук, які знижують P_o LCC-каналів при додаванні у ванночку зі зразком наведена на Рисунку 4.4.

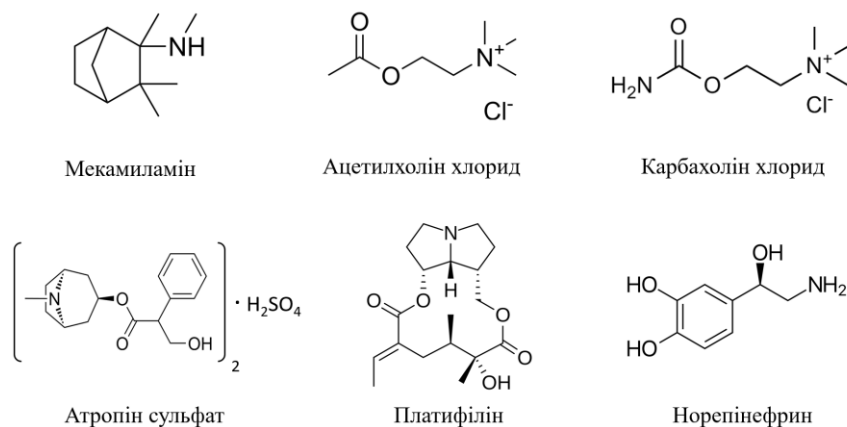


Рис. 4.4. Формули речовин, що зумовлюють зниження ймовірності відкритого стану LCC-каналів при додаванні у ванночку.

Лише дві речовини з досліджених, пілокарпін та платифілін, були здатними знижувати параметр P_o за додавання через петч-піпетку і взаємодії з перинуклеарними доменами досліджуваних каналів. Можна помітити, що платифілін має в своєму складі піролідидинову частину, що складається із двох піролідидинових кілець з усупільненим атомом нітрогену, а пілокарпін включає

метилімідазольне кільце, в якому два атоми нітрогену розділені атомом карбону у складі циклу. Карбонільна група, наявна в цих речовин, була згадана раніше також і в складі тих сполук, які не знижували ймовірність LCC-каналів перебувати у відкритому стані при додаванні через піпетку (наприклад, ацетилхолін та карбахолін), тож можна припустити, що її наявність не є визначальною для модуляції цього параметру. Розглядаючи наявність азотовмісних циклів у молекулах інших сполук, дія яких на цей параметр активності LCC-каналів була досліджена в аналогічній конфігурації, привертає увагу атропін, у складі якого є тропанове кільце. Однією з причин відсутності впливу цієї речовини на ймовірність відкритого стану LCC-каналів може бути складна тривимірна будова цього залишку, яка суттєво відрізняється від більш планарної структури піролізидину та метилімідазолу та може запобігати ефективній взаємодії зі специфічними сайтами у складі досліджуваних каналів. Водночас такі структури були описані серед інгібіторів P_o при додаванні речовини до ванночки і не призводили до відсутності впливу на цей параметр. Потрібно також підкреслити, що на цьому етапі наявність сайтів взаємодії є виключно гіпотетична і викладена тут як припущення в рамках розгляду особливостей речовин, що впливають на LCC-канали. Хімічні формули речовин, що знижують P_o при додаванні до піпетки наведені на Рисунку 4.5.

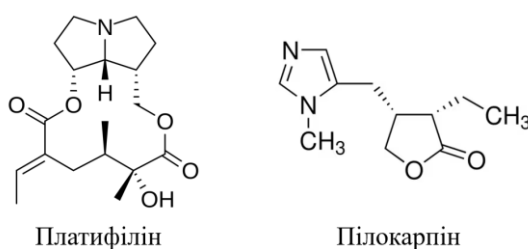


Рис. 4.5. Будова сполук, які інгібують ймовірність LCC-каналів перебувати у відкритому стані при додаванні речовини через петч-піпетку.

Аналізуючи речовини, які згідно з описаними у літературі дослідженнями були здатними чинити найефективніший інгібувальний вплив на ці канали, а саме тубокурарин (Lunko et al., 2016; Kotyk et al., 2017), нікотин та піпекуроній бромід (Котлярова та ін., 2019), можна помітити, що для них є притаманними ті ж риси, що і для описаних вище речовин, вивчених у межах цієї роботи, а саме стероїдне ядро у піпекуронію, нітрогенвмісні цикли у складі піпекуронію і нікотину, та гідрофобні бензолні кільця у тубокурарину. Гексаметоній, описаний як інгібітор P_o LCC-каналів (Брянцева та ін., 2021), за структурою подібний до ацетилхоліну та карбахоліну, як лінійна молекула з позитивно зарядженим атомом азоту. Крім піпекуроній броміду, карбонільні групи та амінозаміщені стероїдні цикли описані і в рокуроній броміду (Котлярова та ін., 2019). Будова згаданих речовин наведена на Рисунку 4.6.

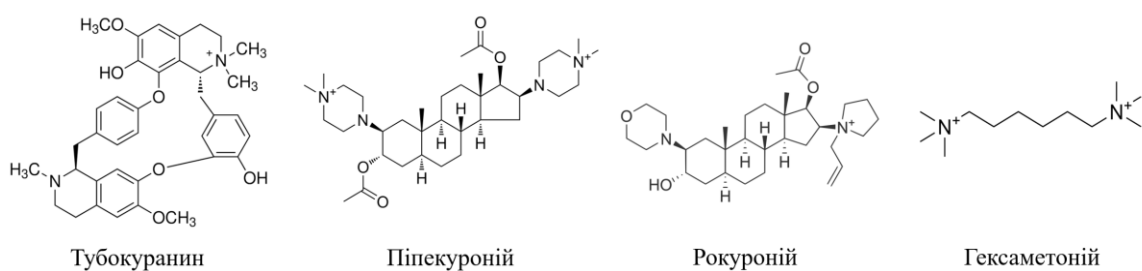


Рис. 4.6. Будова сполук, які проявляли інгібувальні властивості на електрофізіологічні параметри LCC-каналів згідно літературних даних.

Важливо зазначити, що хоча вказані атоми і групи можуть відігравати роль у взаємодії досліджуваних сполук з LCC-каналами, для однозначного розуміння будови та механізмів модуляції цих каналів необхідні подальші дослідження з використанням методів електронної мікроскопії та кристалографії. Проведений же на цьому етапі аналіз властивостей сполук різних класів на LCC-канали має цінність як для уможливлення підбору коректної речовини залежно від необхідного цільового впливу, так і для розуміння принципу гетерогенності впливу речовин на вказані канали залежно від сторони мембрани, з якої ці сполуки було апліковано.

ВИСНОВКИ

За результатами досліджень впливу адреномодуляторів, а також модуляторів нікотинових та мускаринових холінорецепторів на електрофізіологічні властивості LCC-каналів ядерної мембрани можна зробити такі висновки:

1. Вплив досліджених сполук на LCC-канали є специфічним до конфігурації їх застосування, і відрізняється при додаванні речовини до ванночки зі зразком та до петч-піпетки, що відповідає взаємодії речовини з внутрішньоядерними та перинуклеарними доменами цих каналів і може свідчити про відмінності у їх структурі.
2. З-поміж досліджених модуляторів нікотинових холінорецепторів (мекаміламін, ацетилхолін, карбахолін, панкуроній, векуроній) найбільш виражене зменшення амплітуди струму крізь LCC-канали за умови додавання речовини у концентрації 1 ммоль/л у ванночку зумовлював векуроній, що при потенціалі мембрани -60 мВ знижував значення цього параметру на 50,9%. Водночас при додаванні модуляторів нікотинових холінорецепторів через піпетку (мекаміламін, ацетилхолін, карбахолін) найбільшою мірою зменшення амплітуди струму крізь канали за аналогічної концентрації речовини проявлялося під час застосування ацетилхоліну, який зумовлював зниження цього показника на 25,4% при -40 мВ.
3. При додаванні модуляторів нікотинових холінорецепторів у ванночку зі зразком найефективніше зниження ймовірності LCC-каналів перебувати у відкритому стані спостерігали при мембранному потенціалі -40 мВ та концентрації речовини 1 ммоль/л за дії мекаміламіну (на 44,9%), тоді як при застосуванні речовин через петч-піпетку жодна зі сполук цього класу не зменшувала ймовірності відкритого стану досліджуваних каналів, а ацетилхолін підвищував значення цього параметру (на 106,7% при -60 мВ),

на протипагу ефекту, який спостерігали при його додаванні у ванночку зі зразком.

4. Серед вивчених модуляторів мускаринових холінорецепторів (атропін, платифілін, пілокарпін) за умови додавання до ванночки у концентрації 1 ммоль/л найефективніше знижував амплітуду струму крізь LCC-канали атропін (на 19,8% при -40 мВ), ця ж речовина зумовлювала найбільш виражене зниження амплітуди струму при додаванні до петч-піпетки (на 23,5% при +40 мВ). Водночас при аплікації через петч-піпетку платифілін підвищував значення цього параметру (на 20,9% при -40 мВ).
5. При застосуванні модуляторів мускаринових холінорецепторів у концентрації 1 ммоль/л найбільшою мірою ймовірність перебування LCC-каналів у відкритому стані знижувалася при додаванні платифіліну у конфігурації застосування речовини у ванночку зі зразком (на 52,6% при -40 мВ), та пілокарпіну при аплікації розчину сполуки через петч-піпетку (на 68,3% при -40 мВ).
6. Найефективніше зниження амплітуди струму крізь LCC-канали при використанні адреномодуляторів (норепінефрин, епінефрин, пропранолол, ізопреналін) за їх додавання у ванночку зі зразком у концентрації 1 ммоль/л спостерігалось при застосуванні ізопреналіну (на 52,7% при -60 мВ). Зниження ймовірності відкритого стану LCC-каналів при цьому найбільшою мірою зумовлював норепінефрин (на 53,8% при -40 мВ), водночас ізопреналін був єдиною сполукою, яка підвищувала значення цього параметру (на 72,7% при -60 мВ).
7. Вплив мекаміламіну, атропіну та ізопреналіну на LCC-канали супроводжувався ефектом їх миготіння.
8. Отримані результати поглиблюють розуміння особливостей модуляції LCC-каналів залежно від класу фізіологічно активних речовин та того, з якого боку мембрани сполуки були застосовані, а також створюють підґрунтя для подальшого аналізу особливостей хімічної будови речовин, завдяки яким опосередковується така модуляція.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Agrawal, A., & Lele, T. P. (2020). Geometry of the nuclear envelope determines its flexural stiffness. *Molecular Biology of the Cell*, *31*(16), 1815–1821. <https://doi.org/10.1091/mbc.E20-02-0163>
2. Al Khamici, H., Sanchez, V. C., Yan, H., Cataisson, C., Michalowski, A. M., Yang, H. H., Li, L., Lee, M. P., Huang, J., & Yuspa, S. H. (2022). The oxidoreductase CLIC4 is required to maintain mitochondrial function and resistance to exogenous oxidants in breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *298*(9), 102275. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102275>
3. Alagna, N. S., Thomas, T. I., Wilson, K. L., & Reddy, K. L. (2023). Choreography of lamina-associated domains: Structure meets dynamics. *FEBS Letters*, *597*(22), 2806–2822. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14771>
4. Aldossary, S. A. (2022). Review on Pharmacology of Atropine, Clinical Use and Toxicity. *Biomedical and Pharmacology Journal*, *15*(2), 691–697. <https://doi.org/10.13005/bpj/2408>
5. Alexander, S. P., Mathie, A., & Peters, J. A. (2011). Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5th edition. *British journal of pharmacology*, *164*(1), S1–S324. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01649_1.x
6. Al-Majed, A. A., Bakheit, A. H. H., Abdel Aziz, H. A., Alajmi, F. M., & AlRabiah, H. (2017). Propranolol. In *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* (Vol. 42, pp. 287–338). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2017.02.006>
7. Al-Shura, A. N. (2021). 8—Humoral control. In A. N. Al-Shura (Ed.), *Mechanisms of Action in Disease and Recovery in Integrative Cardiovascular Chinese Medicine* (pp. 59–62). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817578-1.00008-2>

8. Aronson, J. K. (2016a). Isoprenaline. In J. K. Aronson (Ed.), *Meyler's Side Effects of Drugs* (16th ed., Vol. 4, p. 351). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53717-1.00926-4>
9. Aronson, J. K. (Ed.). (2016b). Pilocarpine. In *Meyler's Side Effects of Drugs* (16th ed., pp. 763–764). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53717-1.01278-6>
10. Atkinson, L., Milligan, Carol. J., Buckley, N. J., & Deuchars, J. (2002). An ATP-gated ion channel at the cell nucleus. *Nature*, *420*(6911), 42–42. <https://doi.org/10.1038/420042a>
11. Bader Eddin, L., Nagoor Meeran, M. F., Kumar Jha, N., Goyal, S. N., & Ojha, S. (2025). Isoproterenol mechanisms in inducing myocardial fibrosis and its application as an experimental model for the evaluation of therapeutic potential of phytochemicals and pharmaceuticals. *Animal Models and Experimental Medicine*, *8*(1), 67–91. <https://doi.org/10.1002/ame2.12496>
12. Bayable, S. D., Ayenew, N. T., Misganaw, A., Fetene, M. B., & Amberbir, W. D. (2023). The Effects of Prophylactic Intravenous Lignocaine vs Vecuronium on Succinylcholine-Induced Fasciculation and Postoperative Myalgia in Patients Undergoing Elective Surgery at Debre Markos Comprehensive Specialized Hospital, Ethiopia, 2022: Prospective Cohort Study. *International Journal of General Medicine*, *Volume 16*, 2663–2670. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S415854>
13. Bisset, D., Corry, B., & Chung, S.-H. (2005). The Fast Gating Mechanism in ClC-0 Channels. *Biophysical Journal*, *89*(1), 179–186. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.053447>
14. Bittner, E. A., & Martyn, J. A. J. (2019). Neuromuscular Physiology and Pharmacology. In H. C. Hemmings Jr. & T. D. Egan (Ed.), *Pharmacology and Physiology for Anesthesia* (2nd ed., pp. 412–427). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48110-6.00021-1>
15. Bradley, P. B. (1989). Chapter 8—Drugs affecting the sympathetic system. In P. B. Bradley (Ed.), *Introduction to Neuropharmacology* (pp. 83–116).

- Butterworth-Heinemann. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7236-1271-1.50013-4>
16. Burla, R., La Torre, M., Maccaroni, K., Verni, F., Giunta, S., & Saggio, I. (2020). Interplay of the nuclear envelope with chromatin in physiology and pathology. *Nucleus*, *11*(1), 205–218. <https://doi.org/10.1080/19491034.2020.1806661>
17. Caldeira, C. F., Giannini, T. C., Ramos, S. J., Vasconcelos, S., Mitre, S. K., Pires, J. P. D. A., Ferreira, G. C., Ohashi, S., Mota, J. A., Castilho, A., Siqueira, J. O., & Furtini Neto, A. E. (2017). Sustainability of Jaborandi in the eastern Brazilian Amazon. *Perspectives in Ecology and Conservation*, *15*(3), 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.pecon.2017.08.002>
18. Clague, R. U., Eglén, R. M., Strachan, A. C., & Whiting, R. L. (1985). Action of agonists and antagonists at muscarinic receptors present on ileum and atria *in vitro*. *British Journal of Pharmacology*, *86*(1), 163–170. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1985.tb09446.x>
19. Conte, E., Fonzino, A., Cibelli, A., De Benedictis, V., Imbrici, P., Nicchia, G. P., Pierno, S., & Camerino, G. M. (2020). Changes in Expression and Cellular Localization of Rat Skeletal Muscle ClC-1 Chloride Channel in Relation to Age, Myofiber Phenotype and PKC Modulation. *Frontiers in Pharmacology*, *11*, 714. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00714>
20. Coronado, R., Rosenberg, R. L., & Miller, C. (1980). Ionic selectivity, saturation, and block in a K⁺-selective channel from sarcoplasmic reticulum. *The Journal of General Physiology*, *76*(4), 425–446. <https://doi.org/10.1085/jgp.76.4.425>
21. Crooks, P. A., Bardo, M. T., & Dwoskin, L. P. (2014). Nicotinic Receptor Antagonists as Treatments for Nicotine Abuse. In *Advances in Pharmacology* (Vol. 69, pp. 513–551). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420118-7.00013-5>

22. De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabò, I., & Rizzuto, R. (2011). A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, *476*(7360), 336–340. <https://doi.org/10.1038/nature10230>
23. Dey, G., & Baum, B. (2021). Nuclear envelope remodelling during mitosis. *Current Opinion in Cell Biology*, *70*, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.12.004>
24. Dey, G., Culley, S., Curran, S., Schmidt, U., Henriques, R., Kukulski, W., & Baum, B. (2020). Closed mitosis requires local disassembly of the nuclear envelope. *Nature*, *585*(7823), 119–123. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2648-3>
25. Dolphin, A. C. (2016). Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: Physiology and pathophysiology and pharmacology. *The Journal of Physiology*, *594*(19), 5369–5390. <https://doi.org/10.1113/JP272262>
26. Drudi, F. M., Lima, C., Freitas, L., Yogi, M., Nascimento, H., & Belfort Junior, R. (2017). Acetylcholine chloride 1% usage for intraoperative cataract surgery miosis. *Revista Brasileira de Oftalmologia*, *76*(5). <https://doi.org/10.5935/0034-7280.20170051>
27. Dubińska-Magiera, M., Koziół, K., Machowska, M., Piekarowicz, K., Filipczak, D., & Rzepecki, R. (2019). Emerin Is Required for Proper Nucleus Reassembly after Mitosis: Implications for New Pathogenetic Mechanisms for Laminopathies Detected in EDMD1 Patients. *Cells*, *8*(3), 240. <https://doi.org/10.3390/cells8030240>
28. Dultz, E., Wojtynek, M., Medalia, O., & Onischenko, E. (2022). The Nuclear Pore Complex: Birth, Life, and Death of a Cellular Behemoth. *Cells*, *11*(9), 1456. <https://doi.org/10.3390/cells11091456>
29. Ebert, T. J. (2019). Autonomic Nervous System Pharmacology. In H. C. Hemmings, T. D. Egan, & Jr. Egan (Eds.), *Pharmacology and Physiology for Anesthesia* (pp. 282–299). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48110-6.00014-4>

30. Ebmeyer, J., Rasinger, J. D., Hengstler, J. G., Schaudien, D., Creutzenberg, O., Lampen, A., Braeuning, A., & Hessel-Pras, S. (2020). Hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids induce DNA damage response in rat liver in a 28-day feeding study. *Archives of Toxicology*, *94*(5), 1739–1751. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02779-2>
31. Fedorenko, O., & Marchenko, S. (2014). Ion channels of the nuclear membrane of hippocampal neurons. *Hippocampus*, *24*(7), 869–876. <https://doi.org/10.1002/hipo.22276>
32. Fedorenko, O., Yarotskyy, V., Duzhy, D., & Marchenko, S. (2010). The large-conductance ion channels in the nuclear envelope of central neurons. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *460*(6), 1045–1050. <https://doi.org/10.1007/s00424-010-0882-5>
33. Filipczak, D., Souchet, A., Georgiou, K., Foisner, R., & Naetar, N. (2024). Lamin chromatin binding is modulated by interactions of different LAP2 α domains with lamins and chromatin. *iScience*, *27*(10), 110869. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.110869>
34. Fink, M. (1998). A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *The EMBO Journal*, *17*(12), 3297–3308. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.12.3297>
35. Frei, K., & Truong, D. D. (2022). Medications used to treat tremors. *Journal of the Neurological Sciences*, *435*, 120194. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2022.120194>
36. Gaburjakova, J., Domsicova, M., Poturnayova, A., & Gaburjakova, M. (2024). Flecainide Specifically Targets the Monovalent Countercurrent Through the Cardiac Ryanodine Receptor, While a Dominant Opposing Ca²⁺/Ba²⁺ Current Is Present. *International Journal of Molecular Sciences*, *26*(1), 203. <https://doi.org/10.3390/ijms26010203>
37. Gillespie, D., & Fill, M. (2008). Intracellular Calcium Release Channels Mediate Their Own Countercurrent: The Ryanodine Receptor Case Study.

- Biophysical Journal*, 95(8), 3706–3714.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.108.131987>
38. Giulian, D., & Diacumakos, E. G. (1977). The electrophysiological mapping of compartments within a mammalian cell. *The Journal of Cell Biology*, 72(1), 86–103. <https://doi.org/10.1083/jcb.72.1.86>
39. Gomez-Ospina, N., Tsuruta, F., Barreto-Chang, O., Hu, L., & Dolmetsch, R. (2006). The C Terminus of the L-Type Voltage-Gated Calcium Channel CaV1.2 Encodes a Transcription Factor. *Cell*, 127(3), 591–606. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.017>
40. González-Rubio, J. M., García De Diego, A. M., Egea, J., Olivares, R., Rojo, J., Gandía, L., García, A. G., & Hernández-Guijo, J. M. (2006). Blockade of nicotinic receptors of bovine adrenal chromaffin cells by nanomolar concentrations of atropine. *European Journal of Pharmacology*, 535(1–3), 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.01.057>
41. Guntur, D., Olschewski, H., Enyedi, P., Csáki, R., Olschewski, A., & Nagaraj, C. (2021). Revisiting the Large-Conductance Calcium-Activated Potassium (BKCa) Channels in the Pulmonary Circulation. *Biomolecules*, 11(11), 1629. <https://doi.org/10.3390/biom11111629>
42. Guo, T., Nani, A., Shonts, S., Perryman, M., Chen, H., Shannon, T., Gillespie, D., & Fill, M. (2013). Sarcoplasmic Reticulum K⁺ (TRIC) Channel Does Not Carry Essential Countercurrent during Ca²⁺ Release. *Biophysical Journal*, 105(5), 1151–1160. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.07.042>
43. Gururaja Rao, S., Patel, N. J., & Singh, H. (2020). Intracellular Chloride Channels: Novel Biomarkers in Diseases. *Frontiers in Physiology*, 11, 96. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00096>
44. Guzman, R. E., Bungert-Plümke, S., Franzen, A., & Fahlke, C. (2017). Preferential association with ClC-3 permits sorting of ClC-4 into endosomal compartments. *Journal of Biological Chemistry*, 292(46), 19055–19065. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.801951>

45. Hampoelz, B., & Baumbach, J. (2023). Nuclear envelope assembly and dynamics during development. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *133*, 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.02.028>
46. Hanke-Gogokhia, C., Lehmann, G. L., Benedicto, I., de la Fuente-Ortega, E., Arshavsky, V. Y., Schreiner, R., & Rodriguez-Boulan, E. (2021). Apical CLC-2 in retinal pigment epithelium is crucial for survival of the outer retina. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *35*(7), e21689. <https://doi.org/10.1096/fj.202100349R>
47. Haubrich, D. R., & Reid, W. D. (1972). Effects Of Pilocarpine Or Arecoline Administration On Acetylcholine Levels And Serotonin Turnover In Rat Brain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *181*(1), 19–27. [https://doi.org/10.1016/S0022-3565\(25\)29171-6](https://doi.org/10.1016/S0022-3565(25)29171-6)
48. Hedera, P. (2017). Emerging strategies in the management of essential tremor. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, *10*(2), 137–148. <https://doi.org/10.1177/1756285616679123>
49. Hertle, D. N., & Yeckel, M. F. (2007). Distribution of inositol-1,4,5-trisphosphate receptor isoforms and ryanodine receptor isoforms during maturation of the rat hippocampus. *Neuroscience*, *150*(3), 625–638. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.09.058>
50. Hof, S., Lingens, L., Michels, M., Marcus, C., Kuebart, A., Herminghaus, A., Bauer, I., Picker, O., Truse, R., & Vollmer, C. (2024). Local carbachol application induces oral microvascular recruitment and improves gastric tissue oxygenation during hemorrhagic shock in dogs. *Frontiers in Immunology*, *15*, 1369617. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1369617>
51. Holland, E., Karpecki, P., Fingeret, M., Schaeffer, J., Gupta, P., Fram, N., Smits, G., Ignacio, T., & Lindstrom, R. (2024). Efficacy and Safety of CSF-1 (0.4% Pilocarpine Hydrochloride) in Presbyopia: Pooled Results of the NEAR Phase 3 Randomized, Clinical Trials. *Clinical Therapeutics*, *46*(2), 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2023.12.005>

52. Hou, P., Wu, D., Nie, Y., Wei, H., Liu, L., & Yang, G. (2023). Comparison of the efficacy and safety of different doses of atropine for myopic control in children: A meta-analysis. *Frontiers in Pharmacology*, *14*, 1227787. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1227787>
53. Hunter, J. M., & Blobner, M. (2024). Under-dosing and over-dosing of neuromuscular blocking drugs and reversal agents: Beware of the risks. *British Journal of Anaesthesia*, *132*(3), 461–465. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2023.12.001>
54. Hurcombe, S. D. (2018). Critical Care. In S. M. Reed, W. M. Bayly, & D. C. Sellon (Eds.), *Equine Internal Medicine* (4th ed., pp. 158–190). Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44329-6.00004-8>
55. Isaacs, J., Almeter, P., Hunter, A., Lyman, T., Zapata, S., Henderson, B. S., Larkin, S., Long, L., Bossle, M., Bhaktawara, S., Warren, M., M. Lozier, A., Melson, J., Fraley, S., Relucio, E., Felix, M., Reynolds, J., Naseman, R., Platt, T., & Lodder, R. (2023). *Assessment of Vecuronium Quality Using Near-Infrared Spectrometry*. 1026215 Bytes. <https://doi.org/10.6084/M9.FIGSHARE.24846285.V1>
56. Jang, S. H., Byun, J. K., Jeon, W.-I., Choi, S. Y., Park, J., Lee, B. H., Yang, J. E., Park, J. B., O'Grady, S. M., Kim, D.-Y., Ryu, P. D., Joo, S.-W., & Lee, S. Y. (2015). Nuclear Localization and Functional Characteristics of Voltage-gated Potassium Channel Kv1.3. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(20), 12547–12557. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.561324>
57. Jensen, C. S., Rasmussen, H. B., & Misonou, H. (2011). Neuronal trafficking of voltage-gated potassium channels. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *48*(4), 288–297. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2011.05.007>
58. Jentsch, T. J., & Pusch, M. (2018). CLC Chloride Channels and Transporters: Structure, Function, Physiology, and Disease. *Physiological Reviews*, *98*(3), 1493–1590. <https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2017>

59. Jin, Y., & Blikslager, A. T. (2015). ClC-2 regulation of intestinal barrier function: Translation of basic science to therapeutic target. *Tissue Barriers*, 3(4), e1105906. <https://doi.org/10.1080/21688370.2015.1105906>
60. Jones, C. K., Byun, N., & Bubser, M. (2012). Muscarinic and Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists and Allosteric Modulators for the Treatment of Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 37(1), 16–42. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.199>
61. Kabachinski, G., & Schwartz, T. U. (2015). The nuclear pore complex – structure and function at a glance. *Journal of Cell Science*, 128(3), 423–429. <https://doi.org/10.1242/jcs.083246>
62. Kaiti, R. (2022). Role of Atropine in the control of Myopia Progression- A Review. *Beyoglu Eye Journal*. <https://doi.org/10.14744/bej.2022.07742>
63. Kanno, Y., & Loewenstein, W. R. (1963). A study of the nucleus and cell membranes of oocytes with an intra-cellular electrode. *Experimental Cell Research*, 31(1), 149–166. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(63\)90164-2](https://doi.org/10.1016/0014-4827(63)90164-2)
64. Kapourani, A., Kontogiannopoulos, K. N., & Barmpalexis, P. (2022). A Review on the Role of Pilocarpine on the Management of Xerostomia and the Importance of the Topical Administration Systems Development. *Pharmaceuticals*, 15(6), 762. <https://doi.org/10.3390/ph15060762>
65. Kernbach-Wighton, G., Hess, C., & Madea, B. (2016). Interrupted (self -) medication with pancuronium(bromide) and fatal outcome. *Archiv Fur Kriminologie*, 238(1–2), 33–41.
66. Kienitz, M.-C., Bender, K., Dermietzel, R., Pott, L., & Zoidl, G. (2011). Pannexin 1 constitutes the large conductance cation channel of cardiac myocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(1), 290–298. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.163477>
67. Kotyk, O., Kotlyarova, A., Pavlova, N., & Marchenko, S. (2017). Effects of Blockers of Large-Conductance Cation Channels of the Nuclear Membrane. *Neurophysiology*, 49, 151–153. <https://doi.org/10.1007/s11062-017-9644-8>

68. Kotyk, O., Nadtoka, S., & Kotliarova, A. (2026a). Effects of pilocarpine and platyphylline on nuclear membrane large-conductance cation channels in rat cerebellar Purkinje neurons. *Fiziol Zh.*, 72(1), 83–91. <https://doi.org/10.15407/fz72.01.083>
69. Kotyk, O., Nadtoka, S., Vynohradova, T., Taghavi, A., Marchenko, S., & Kotliarova, A. (2026b). Effects of adrenergic receptor modulators on nuclear LCC-channels in Purkinje neurons. *Acta Neurobiol Exp.*, 86: 11–21. <https://doi.org/10.55782/j42ygh03>
70. Kuang, Q., Purhonen, P., & Hebert, H. (2015). Structure of potassium channels. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 72(19), 3677–3693. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1948-5>
71. Li, Y., Liu, X., Rong, F., Hu, S., & Sheng, Z. (2010). Carbachol inhibits TNF- α -induced endothelial barrier dysfunction through alpha 7 nicotinic receptors. *Acta Pharmacologica Sinica*, 31(10), 1389–1394. <https://doi.org/10.1038/aps.2010.165>
72. Li, Y., Yip, M., Ning, Y., Chung, J., Toh, A., Leow, C., Liu, N., Ting, D., Schmetterer, L., Saw, S.-M., Jonas, J. B., Chia, A., & Ang, M. (2024). Topical Atropine for Childhood Myopia Control: The Atropine Treatment Long-Term Assessment Study. *JAMA Ophthalmology*, 142(1), 15. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2023.5467>
73. Lin, D. H., & Hoelz, A. (2019). The Structure of the Nuclear Pore Complex (An Update). *Annual Review of Biochemistry*, 88(1), 725–783. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-011901>
74. Liu, L., Zhou, Y., Liao, P., Soong, T. W., & Hu, Z. (2025). Degradation of voltage-gated calcium channels: Mechanisms and applications in neurological and cardiovascular diseases. *Cell Communication and Signaling*, 23(1), 337. <https://doi.org/10.1186/s12964-025-02347-0>
75. Lochner, M., & Thompson, A. J. (2016). The muscarinic antagonists scopolamine and atropine are competitive antagonists at 5-HT 3 receptors.

76. Lu, J., Wu, T., Zhang, B., Liu, S., Song, W., Qiao, J., & Ruan, H. (2021). Types of nuclear localization signals and mechanisms of protein import into the nucleus. *Cell Communication and Signaling*, 19(1), 60. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00741-y>
77. Lunko, O. V., & Lunko, O. O. (2020). Fast Blocking Effect of Gallamine on LCC Channels: Analysis Using a Truncated Kinetic Scheme. *Neurophysiology*, 52(4), 250–255. <https://doi.org/10.1007/s11062-021-09879-4>
78. Lunko, O. V., Grushkovska, I. V., Lun'ko, O. O., & Marchenko, S. M. (2016). Effect of Tubocurarine on Large-Conductance Cationic Channels in the Inner Nuclear Membrane of Purkinje Neurons of the Rat Cerebellum. *Neurophysiology*, 48(5), 332–335. <https://doi.org/10.1007/s11062-017-9606-1>
79. Malin, S. G., Shavva, V. S., Tarnawski, L., & Olofsson, P. S. (2020). Functions of acetylcholine-producing lymphocytes in immunobiology. *Brain, Gut, and Immune System Interactions*, 62, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.01.017>
80. Maliszewska-Olejniczak, K., & Bednarczyk, P. (2024). Novel insights into the role of ion channels in cellular DNA damage response. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 793, 108488. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2024.108488>
81. Manda, N. K., Golla, U., Sesham, K., Desai, P., Joshi, S., Patel, S., Nalla, S., Kondam, S., Singh, L., Dewansh, D., Manda, H., & Rokana, N. (2023). Tuning between Nuclear Organization and Functionality in Health and Disease. *Cells*, 12(5), 706. <https://doi.org/10.3390/cells12050706>
82. Marchenko, S. M., Yarotsky, V. V., Kovalenko, T. N., Kostyuk, P. G., & Thomas, R. C. (2005). Spontaneously active and InsP₃-activated ion channels in cell nuclei from rat cerebellar Purkinje and granule neurones. *The Journal*

- of *Physiology*, 565(3), 897–910.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.081299>
83. Matzke, A. J. M., Weiger, T. M., & Matzke, M. (2010). Ion channels at the nucleus: Electrophysiology meets the genome. *Molecular Plant*, 3(4), 642–652. <https://doi.org/10.1093/mp/ssq013>
84. Mazzanti, M., DeFelice, L. J., Cohn, J., & Malter, H. (1990). Ion channels in the nuclear envelope. *Nature*, 343(6260), 764–767. <https://doi.org/10.1038/343764a0>
85. McMahon, L. R. (2019). Green tobacco sickness: Mecamylamine, varenicline, and nicotine vaccine as clinical research tools and potential therapeutics. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 12(3), 189–195. <https://doi.org/10.1080/17512433.2019.1570844>
86. Mekahli, D., Bultynck, G., Parys, J. B., De Smedt, H., & Missiaen, L. (2011). Endoplasmic-reticulum calcium depletion and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(6), a004317. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004317>
87. Menchini, U., Scialdone, A., Fantaguzzi, S., Carones, F., Locatelli, A., & Brancato, R. (1989). Clinical evaluation of the effect of acetylcholine on the corneal endothelium. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 15(4), 421–424. [https://doi.org/10.1016/S0886-3350\(89\)80061-6](https://doi.org/10.1016/S0886-3350(89)80061-6)
88. Mimura, Y., & Imamoto, N. (2016). Nuclear Organization (Nuclear Structure and Dynamics). In R. A. Bradshaw & P. D. Stahl (Eds.), *Encyclopedia of Cell Biology* (vol. 2, pp. 311–318). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.20027-8>
89. Moriche-Carretero, M., Revilla-Amores, R., Gutiérrez-Blanco, A., Moreno-Morillo, F. J., Martínez-Perez, C., Sánchez-Tena, M. Á., & Álvarez-Peregrina, C. (2024). Five-year results of atropine 0.01% efficacy in the myopia control in a European population. *British Journal of Ophthalmology*, 108(5), 715–719. <https://doi.org/10.1136/bjo-2022-322808>

90. Mueller, B. D., Merrill, S. A., Watanabe, S., Liu, P., Niu, L., Singh, A., Maldonado-Catala, P., Cherry, A., Rich, M. S., Silva, M., Maricq, A. V., Wang, Z.-W., & Jorgensen, E. M. (2023). CaV1 and CaV2 calcium channels mediate the release of distinct pools of synaptic vesicles. *eLife*, *12*, e81407. <https://doi.org/10.7554/eLife.81407>
91. Nadтока S., Kotliarova A., Kotyk O. (2023). Identification of LCC channels' conductivity in different types of cells. *Молодь і поступ біології: збірник тез доповідей XIX Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів*, 189–190.
92. Nadтока, S., Kotyk, O., Protsenko, K., & Kotliarova, A. (2025a). Effects of mecamlamine on the electrophysiological properties of LCC-channels in rat cerebellar Purkinje neurons. *Fiziol Zh.*, *71*(5), 22–30. <https://doi.org/10.15407/fz71.05.022>
93. Nadтока, S., Kotyk, O., Tarnopolska, O., & Kotliarova, A. (2025b). Effects of acetylcholine and carbachol on nuclear large conductance cation channels in rat cerebellar Purkinje neurons. *Fiziol Zh.*, *71*(6), 67–77. <https://doi.org/10.15407/fz71.06.067>
94. Nadтока, S., Kotyk, O., & Kotliarova, A. (2026). Effects of atropine on the electrophysiological properties of LCC-channels of the nuclear membrane of Purkinje neurons. *Neurophysiology*. <https://doi.org/10.1007/s11062-025-09986-6>
95. O'Shaughnessy, K. M. (2012). Chapter 23—Adrenergic mechanisms and drugs. In P. N. Bennett, M. J. Brown, & P. Sharma (Eds.), *Clinical Pharmacology* (11th ed., pp. 382–392). Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4084-9.00062-8>
96. Okada, Y., Sabirov, R. Z., Merzlyak, P. G., Numata, T., & Sato-Numata, K. (2021). Properties, Structures, and Physiological Roles of Three Types of Anion Channels Molecularly Identified in the 2010's. *Frontiers in Physiology*, *12*, 805148. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.805148>

97. O-Uchi, J., Jhun, B. S., & Sheu, S.-S. (2014). Structural and Molecular Bases of Mitochondrial Ion Channel Function. In D. P. Zipes & J. Jalife (Eds.), *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside* (6th ed., pp. 71–84). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2856-5.00007-8>
98. Paci, G., Caria, J., & Lemke, E. A. (2021). Cargo transport through the nuclear pore complex at a glance. *Journal of Cell Science*, *134*(2), jcs247874. <https://doi.org/10.1242/jcs.247874>
99. Pakala, R. S., Brown, K. N., & Preuss, C. V. (2025). Cholinergic Medications. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538163/>
100. Palem Reshmika, Amitabh Dutta, Savitar Malhotra, Nitin Sethi, & Jayashree Sood. (2023). Efficacy of Atracurium-Vecuronium Combination in Patients Undergoing Laparoscopic Surgery: A Randomized Controlled Study. *Asian Journal of Anesthesiology*, *61*(4). [https://doi.org/10.6859/aja.202312_61\(4\).0001](https://doi.org/10.6859/aja.202312_61(4).0001)
101. Papich, M. G. (2016). Epinephrine. In *Saunders Handbook of Veterinary Drugs* (pp. 291–292). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-24485-5.00242-4>
102. Paventi, G., Soldovieri, M. V., Servettini, I., Barrese, V., Miceli, F., Sisalli, M. J., Ambrosino, P., Mosca, I., Vinciguerra, I., Testai, L., Scorziello, A., Raimo, G., Calderone, V., Passarella, S., & Taglialatela, M. (2022). Kv7.4 channels regulate potassium permeability in neuronal mitochondria. *Biochemical Pharmacology*, *197*, 114931. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.114931>
103. Pereira, C. D., Serrano, J. B., Martins, F., Da Cruz E Silva, O. A. B., & Rebelo, S. (2019). Nuclear envelope dynamics during mammalian spermatogenesis: New insights on male fertility. *Biological Reviews*, *94*(4), 1195–1219. <https://doi.org/10.1111/brv.12498>
104. Picard, L., Côté, K., Teijeira, J., Greentree, D., & Rousseau, É. (2002). Sarcoplasmic Reticulum K⁺ Channels from Human and Sheep Atrial Cells

- Display a Specific Electro-pharmacological Profile. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34(9), 1163–1172.
<https://doi.org/10.1006/jmcc.2002.2041>
105. Pirker, W., Katzenschlager, R., Hallett, M., & Poewe, W. (2023). Pharmacological Treatment of Tremor in Parkinson's Disease Revisited. *Journal of Parkinson's Disease*, 13(2), 127–144.
<https://doi.org/10.3233/JPD-225060>
106. Pitt, S. J., Park, K.-H., Nishi, M., Urashima, T., Aoki, S., Yamazaki, D., Ma, J., Takeshima, H., & Sitsapesan, R. (2010). Charade of the SR K⁺-Channel: Two Ion-Channels, TRIC-A and TRIC-B, Masquerade as a Single K⁺-Channel. *Biophysical Journal*, 99(2), 417–426.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.04.051>
107. Pomeroy, A. R., & Raper, C. (1971). Pyrrolizidine alkaloids: Actions on muscarinic receptors in the guinea-pig ileum. *British Journal of Pharmacology*, 41(4), 683–690. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1971.tb07076.x>
108. Ponnalagu, D., & Singh, H. (2020). Insights Into the Role of Mitochondrial Ion Channels in Inflammatory Response. *Frontiers in Physiology*, 11, 258. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00258>
109. Ponnalagu, D., Gururaja Rao, S., Farber, J., Xin, W., Hussain, A. T., Shah, K., Tanda, S., Berryman, M., Edwards, J. C., & Singh, H. (2016). Molecular identity of cardiac mitochondrial chloride intracellular channel proteins. *Mitochondrion*, 27, 6–14.
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2016.01.001>
110. Poroca, D. R., Pelis, R. M., & Chappe, V. M. (2017). CIC Channels and Transporters: Structure, Physiological Functions, and Implications in Human Chloride Channelopathies. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 151.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00151>
111. Pronin, A. N., Wang, Q., & Slepak, V. Z. (2017). Teaching an Old Drug New Tricks: Agonism, Antagonism, and Biased Signaling of Pilocarpine

- through M3 Muscarinic Acetylcholine Receptor. *Molecular Pharmacology*, 92(5), 601–612. <https://doi.org/10.1124/mol.117.109678>
112. Roubinet, C., White, I. J., & Baum, B. (2021). Asymmetric nuclear division in neural stem cells generates sibling nuclei that differ in size, envelope composition, and chromatin organization. *Current Biology*, 31(18), 3973–3983.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.06.063>
113. Rousseau, E., Michaud, C., Lefebvre, D., Proteau, S., & Decrouy, A. (1996). Reconstitution of ionic channels from inner and outer membranes of mammalian cardiac nuclei. *Biophysical Journal*, 70(2), 703–714. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79610-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79610-8)
114. Rush, C., Jiang, Z., Tingey, M., Feng, F., & Yang, W. (2023). Unveiling the complexity: Assessing models describing the structure and function of the nuclear pore complex. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11, 1245939. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1245939>
115. Sabirov, R., Islam, Md., Okada, T., Merzlyak, P., Kurbannazarova, R., Tsiferova, N., & Okada, Y. (2021). The ATP-Releasing Maxi-Cl Channel: Its Identity, Molecular Partners, and Physiological/Pathophysiological Implications. *Life*, 11(6), 509. <https://doi.org/10.3390/life11060509>
116. Sadgrove, N. J. (2022). Comment on Pyrrolizidine Alkaloids and Terpenes from Senecio (Asteraceae): Chemistry and Research Gaps in Africa. *Molecules*, 27(24), 8868. <https://doi.org/10.3390/molecules27248868>
117. Sakata, S., & Ono, F. (2023). Allosteric inhibition of muscle-type nicotinic acetylcholine receptors by a neuromuscular blocking agent pancuronium. *PLOS ONE*, 18(10), e0292262. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0292262>
118. Sakhi, I., Bignon, Y., Frachon, N., Hureaux, M., Arévalo, B., González, W., Vargas-Poussou, R., & Lourdel, S. (2021). Diversity of functional alterations of the ClC-5 exchanger in the region of the proton glutamate in patients with Dent disease 1. *Human Mutation*, 42(5), 537–550. <https://doi.org/10.1002/humu.24184>

119. Salinas, F. V. (2016). Contemporary Perioperative and Anesthetic Management of Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Advances in Anesthesia*, 34(1), 181–196. <https://doi.org/10.1016/j.aan.2016.08.001>
120. Schilliger, L., Najjar, C., Paillusseau, C., François, C., Gandar, F., Boughdiri, H., & Gansuana, M. (2023). Pancuronium Bromide for Chemical Immobilization of Adult Nile Crocodiles (*Crocodylus niloticus*): A Field Study. *Animals*, 13(10), 1578. <https://doi.org/10.3390/ani13101578>
121. Schrecker, M., Korobenko, J., & Hite, R. K. (2020). Cryo-EM structure of the lysosomal chloride-proton exchanger CLC-7 in complex with OSTM1. *eLife*, 9, e59555. <https://doi.org/10.7554/eLife.59555>
122. Schwarz, L. A., & Luo, L. (2015). Organization of the Locus Coeruleus-Norepinephrine System. *Current Biology*, 25(21), R1051–R1056. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.09.039>
123. Shkryl, V. M. (2024). Endoplasmic Reticulum Calcium Signaling in Hippocampal Neurons. *Biomolecules*, 14(12), 1617. <https://doi.org/10.3390/biom14121617>
124. Shytle, R. D., Penny, E., Silver, A. A., Goldman, J., & Sanberg, P. R. (2002). Mecamylamine (Inversine®): An old antihypertensive with new research directions. *Journal of Human Hypertension*, 16(7), 453–457. <https://doi.org/10.1038/sj.jhh.1001416>
125. Skelding, A. M., & Valverde, A. (2020). Sympathomimetics in veterinary species under anesthesia. *The Veterinary Journal*, 258, 105455. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2020.105455>
126. Sobreiro, M. B., Soares-Souza, G. B., Magalhães, L., De Moraes Cordeiro, D., Molina, M., Vasconcelos, S., Dias, Y. N., Moreira-Oliveira, R. R., Gastauer, M., Ramos, S., Oliveira, G., Caldeira, C. F., & Vidal, A. F. (2025). Decoding pilocarpine biosynthesis and its roles in *Pilocarpus microphyllus* through a comparative transcriptomics approach. *BMC Plant Biology*, 25(1), 1024. <https://doi.org/10.1186/s12870-025-07087-4>

127. Srinivasan, A. (2019). Propranolol: A 50-year historical perspective. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 22(1), 21. https://doi.org/10.4103/aian.AIAN_201_18
128. Stiegler, A., Li, J.-H., Shah, V., Tsaava, T., Tynan, A., Yang, H., Tamari, Y., Brines, M., Tracey, K. J., & Chavan, S. S. (2021). Systemic administration of choline acetyltransferase decreases blood pressure in murine hypertension. *Molecular Medicine*, 27(1), 133. <https://doi.org/10.1186/s10020-021-00380-6>
129. Suzuki, T., Rai, T., Hayama, A., Sohara, E., Suda, S., Itoh, T., Sasaki, S., & Uchida, S. (2006). Intracellular localization of ClC chloride channels and their ability to form hetero-oligomers. *Journal of Cellular Physiology*, 206(3), 792–798. <https://doi.org/10.1002/jcp.20516>
130. Szabo, I., & Szewczyk, A. (2023). Mitochondrial Ion Channels. *Annual Review of Biophysics*, 52, 229–254. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-092622-094853>
131. Tomida, S., Ishima, T., Nagai, R., & Aizawa, K. (2024). T-Type Voltage-Gated Calcium Channels: Potential Regulators of Smooth Muscle Contractility. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(22), 12420. <https://doi.org/10.3390/ijms252212420>
132. Upadhyay, A., & Beuerman, R. W. (2020). Biological Mechanisms of Atropine Control of Myopia. *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice*, 46(3), 129–135. <https://doi.org/10.1097/ICL.0000000000000677>
133. Urrutia, J., Arrizabalaga-Iriondo, A., Sanchez-del-Rey, A., Martinez-Ibargüen, A., Gallego, M., Casis, O., & Revuelta, M. (2024). Therapeutic role of voltage-gated potassium channels in age-related neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 18, 1406709. <https://doi.org/10.3389/fncel.2024.1406709>
134. Vahabikashi, A., Adam, S. A., Medalia, O., & Goldman, R. D. (2022). Nuclear lamins: Structure and function in mechanobiology. *APL Bioengineering*, 6(1), 011503. <https://doi.org/10.1063/5.0082656>

135. Verbitsky, M., Rothlin, C. V., Katz, E., & Belén Elgoyhen, A. (2000). Mixed nicotinic–muscarinic properties of the $\alpha 9$ nicotinic cholinergic receptor. *Neuropharmacology*, 39(13), 2515–2524. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(00\)00124-6](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(00)00124-6)
136. Vogel, O. A., Forwood, J. K., Leung, D. W., Amarasinghe, G. K., & Basler, C. F. (2023). Viral Targeting of Importin Alpha-Mediated Nuclear Import to Block Innate Immunity. *Cells*, 13(1), 71. <https://doi.org/10.3390/cells13010071>
137. Volk, T., Schworer, A., Thiessen, S., Schultz, J., & Ehmke, H. (2003). A polycystin-2-like large conductance cation channel in rat left ventricular myocytes. *Cardiovascular Research*, 58(1), 76–88. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(02\)00858-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(02)00858-1)
138. Wing, C. E., Fung, H. Y. J., & Chook, Y. M. (2022). Karyopherin-mediated nucleocytoplasmic transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(5), 307–328. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00446-7>
139. Woll, K. A., & Van Petegem, F. (2022). Calcium-release channels: Structure and function of IP₃ receptors and ryanodine receptors. *Physiological Reviews*, 102(1), 209–268. <https://doi.org/10.1152/physrev.00033.2020>
140. Wood, T. O. (1988). Effect of carbachol on postoperative intraocular pressure. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 14(6), 654–656. [https://doi.org/10.1016/S0886-3350\(88\)80034-8](https://doi.org/10.1016/S0886-3350(88)80034-8)
141. Wray, S., Prendergast, C., & Arrowsmith, S. (2021). Calcium-Activated Chloride Channels in Myometrial and Vascular Smooth Muscle. *Frontiers in Physiology*, 12, 751008. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.751008>
142. Wu, T., Xu, H., Cheng, L., Wu, R., Guo, F., & Chen, X. (2025). The nuclear envelope and nuclear pore complexes in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 13, 1550859. <https://doi.org/10.3389/fcell.2025.1550859>

143. Yang, Y., Guo, L., Chen, L., Gong, B., Jia, D., & Sun, Q. (2023). Nuclear transport proteins: Structure, function and disease relevance. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 425. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01649-4>
144. Yao, X., Gao, S., & Yan, N. (2024). Structural biology of voltage-gated calcium channels. *Channels*, 18(1), 2290807. <https://doi.org/10.1080/19336950.2023.2290807>
145. Yuan, L., Tang, Y., Yin, L., Lin, X., Luo, Z., Wang, S., Li, J., Liang, P., & Jiang, B. (2023). The role of Transmembrane Protein 16A (TMEM16A) in pulmonary hypertension. *Cardiovascular Pathology*, 65, 107525. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2023.107525>
146. Zaveri, S., Srivastava, U., Qu, Y. S., Chahine, M., & Boutjdir, M. (2023). Pathophysiology of Cav1.3 L-type calcium channels in the heart. *Frontiers in Physiology*, 14, 1144069. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1144069>
147. Zhang, B., Zhang, S., Polovitskaya, M. M., Yi, J., Ye, B., Li, R., Huang, X., Yin, J., Neuens, S., Balfroid, T., Soblet, J., Vens, D., Aeby, A., Li, X., Cai, J., Song, Y., Li, Y., Tartaglia, M., Li, Y., ... Liu, Z. (2023). Molecular basis of ClC-6 function and its impairment in human disease. *Science Advances*, 9(41), eadg4479. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adg4479>
148. Zhang, C., & Guo, J. (2023). Diverse functions of the inward-rectifying potassium channel Kir5.1 and its relationship with human diseases. *Frontiers in Physiology*, 14, 1127893. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1127893>
149. Zhang, Y., Tuft, R. A., Lifshitz, L. M., Fogarty, K. E., Singer, J. J., & Zou, H. (2007). Caffeine-activated large-conductance plasma membrane cation channels in cardiac myocytes: Characteristics and significance. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 293(4), H2448–H2461. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00032.2007>
150. Zhou, X., Lin, P., Yamazaki, D., Park, K. H., Komazaki, S., Chen, S. R. W., Takeshima, H., & Ma, J. (2014). Trimeric Intracellular Cation

- Channels and Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium Homeostasis. *Circulation Research*, 114(4), 706–716. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.301816>
151. Zhuk, P., Karakhim, S., & Kosterin, S. (2025). A Model of Calcium-Induced Calcium Release from the Sarcoplasmic Reticulum in The Smooth Muscle Cell and its Investigation by Mathematical Modeling. *Journal of Pharmacy and Pharmacology Research*, 9(2), 54–83. <https://doi.org/10.26502/fjppr.0109>
152. Zsolnay, V., Fill, M., & Gillespie, D. (2018). Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Release Uses a Cascading Network of Intra-SR and Channel Countercurrents. *Biophysical Journal*, 114(2), 462–473. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.11.3775>
153. Брянцева, Б.-М., Тарнопольська, О., Котик, О., & Котлярова, А. (2021). Вплив неостигміну, гексаметонію і метиллікаконітину на високопровідні катіонні канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка щурів. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія*, 87(4), 6–11. <https://doi.org/10.17721/1728.2748.2021.87.6-11>
154. Котик, О. А., Котлярова, А. Б., Поліщук, А. О., & Марченко, С. М. (2016). Іонні струми поодиноких каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів щура. *Fiziol Zh.*, 62(6), 3–8. <https://doi.org/10.15407/fz62.06.003>
155. Котик, О., Котлярова, А., Ісаєва, О. & Марченко, С. (2019). Вплив деяких анестетиків та природних отрут на функціонування LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів та нейронів Пуркінє мозочка. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія*, 79(3), 43–48.
156. Котик О., Надтока С., Котлярова А. (2023а). Вплив пілокарпіну на LCC-канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка щурів. *Тези доповідей XXI Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих*

- вчених, присвяченої 100-річчю від дня народження доктора біологічних наук, професора Василя Юхимовича Шавкуна, Біологія тварин, 25(2), 58.*
157. Котик О.А., Надтока С.О., Котлярова А.Б. (2023b). Модуляція високопровідних катіонних каналів ядерної мембрани нейронів Пуркіньє мозочка: ефекти атропіну, платифіліну та пілокарпіну. *Матеріали чергового ІХ з'їзду Українського біофізичного товариства, 40–41.*
158. Котик О.А., Надтока С.О., Котлярова А.Б. (2025a). Вплив панкуроній броміду на LCC-канали нейронів Пуркіньє мозочка. *Природничі науки: проєкти, дослідження, перспективи: матеріали VI Міжнародної науково-практичної конференції, 27–28.*
159. Котик О.А., Надтока С.О., Проценко К.М., Котлярова А.Б., Марченко С.М. (2025b). Вплив векуронію броміду на високопровідні катіонні канали ядерної мембрани нейронів Пуркіньє мозочка. *Тези доповідей ІХ Міжнародної наукової конференції «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології», 50.*
160. Котлярова, А. Б., Котик, О. А., Юришинець, І. В., & Марченко, С. М. (2019). Функціонування катіонних каналів великої провідності ядерної мембрани під впливом модуляторів нікотинових холінорецепторів. *Fiziol Zh.*, 65(6), 30–37. <https://doi.org/10.15407/fz65.06.030>
161. Надтока С., Котик О., Проценко К., Котлярова А. (2024a). Вплив мекамеламіну на LCC-канали нейронів Пуркіньє мозочка щурів. *Тези доповідей Міжнародної конференції з нейронаук та Наукових читань, присвячених вісцеральній фізіології та патофізіології, Фізіологічний журнал, 70(5), 68.*
162. Надтока С., Котик О., Котлярова А. (2024b). Вплив ізопротеренолу на LCC-канали ядерної мембрани нейронів Пуркіньє мозочка щурів. *Тези доповідей Міжнародної науково-практичної конференції*

«Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини», Біологія тварин, 26(3), 95.

163. Надтока С., Проценко К., Котик О., Котлярова А. (2025а). Вплив ацетилхоліну на LCC-канали нейронів Пуркінє мозочка щурів. *Молодь і поступ біології: збірник тез XXI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів*, 47–48.
164. Надтока С., Котик О., Проценко К., Котлярова, А. (2025b). Вплив карбахоліну на LCC-канали нейронів Пуркінє мозочка щурів. *Тези доповідей XXIII Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених, Біологія тварин, 27(2), 63.*
165. Надтока С., Котик О., Котлярова А. (2025с). Ефект модуляторів холіно- та адренорецепторів на властивості LCC-каналів нейронів Пуркінє мозочка. *Тези доповідей школи-воркшоп «Сучасні методи в нейронауках», Фізіологічний журнал, 71(5S), 1–18.*