

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

МАЛЄЄВА ГАЛИНА ВАСИЛІВНА

УДК 612.8.02

**МОДУЛЯЦІЯ ФУНКЦІЇ ТА ЕКСПРЕСІЇ ГЛІЦИНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ У
РІЗНИХ КЛІТИННИХ СИСТЕМАХ**

03.00.13 – фізіологія людини і тварин

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2016

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі цитології Інституту фізіології ім.О.О. Богомольця НАН України та Інституті Системних Нейронаук, Марсель, Франція (*Institut de Neurosciences des Systèmes, Marseille, France*).

Наукові керівники: доктор медичних наук, професор, заслужений діяч науки і техніки України,
Скибо Галина Григорівна,
Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця
НАН України, завідувач відділу цитології;

доктор біологічних наук, професор
Брежестовський Петро Дмитрович,
Institut de Neurosciences des Systèmes (France),
заслужений науковий директор.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор **Макарчук Микола Юхимович,** ННЦ «Інститут біології» КНУ імені Тараса Шевченка, завідувач кафедри фізіології людини і тварин;

доктор біологічних наук, професор **Недзвецький Віктор Станіславович,** Дніпропетровський Національний Університет імені Олеся Гончара, кафедра біофізики і біохімії.

Захист відбудеться «31» січня 2017 р. о 16 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01601, м.Київ-24, вул. Богомольця, 4

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (01601, м.Київ-24, вул. Богомольця, 4).

Автореферат розісланий «20» грудня 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої
вченої ради,



к.б.н. Любанова О.П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. В основі функціонування центральної нервової системи (ЦНС) лежить взаємодія структур, що забезпечують гальмівну та збуджуючу синаптичні передачі. Провідну роль у цьому процесі відіграє стан лігандкерованих цис-петельних рецепторів, що формують як аніон-, так і катіон-селективні канали. До катіон-селективних належать серотоніновий та нікотинний ацетилхоліновий рецептори, до аніон-селективних – рецептори γ -аміномасляної кислоти (ГАМК) та гліцину.

Гліцинові рецептори є важливим компонентом гальмівної нейропередачі у ЦНС. Вони переважно експресуються нейронами спинного мозку та стовбура мозку (Betz and Laube, 2006), однак дослідження останніх десятиліть продемонстрували їх локалізацію також у вищих відділах ЦНС, зокрема, гіпокампа (Chattipakorn and McMahon, 2002). Даний тип рецепторів залучений до контролю значної кількості фізіологічних процесів, зокрема моторно-рухової діяльності, дихання, відчуття болю, сприйняття звукових та візуальних сигналів (Lynch, 2004).

Гліциновий рецептор утворюють 5 білкових субодиниць, що формують його іонну пору (Langosch et al., 1988). Із ЦНС хребетних було виділено і клоновано чотири α -субодиниці, що на 90% гомологічні між собою (Grenningloh et al., 1990a) та одну β -субодиницю (Grenningloh et al., 1990b). Кожна із них складається з довгого зовнішньоклітинного N-термінального домену, чотирьох трансмембранних доменів (TM1-TM4) і короткого позаклітинного C-кінця (Du et al., 2015). Гліцинові рецептори поділяють на гомомерні – сформовані лише одним підтипом α -субодиниць та гетеромерні – утворені поєднанням α - та β -субодиниць (Grudzinska et al., 2005). Сайт зв'язування агоніста гліцину із рецептором знаходиться у зовнішньоклітинному домені. Активація гліцинового рецептора призводить до відкриття селективного Cl^- -каналу та надходження іонів Cl^- до клітини, що супроводжується гіперполяризацією постсинаптичної мембрани і, як наслідок, пригнічення генерації потенціалів дії (Dutertre et al., 2012).

Актуальність вивчення гліцинових рецепторів обумовлена тим фактом, що посилення їх роботи може мати нейропротекторний ефект (Lu et al., 2012). Дисфункція гліцинових рецепторів може бути причиною розвитку гіперплексії, болю запального типу та епілепсії (Langhofer and Villmann, 2016). Показано, що рівень активності гліцинергічної системи впливає на стан нервової тканини після ішемічного пошкодження мозку (Yao et al., 2012; Tanabe et al., 2010). Даний аспект функціонування гліцинових рецепторів залишається малодослідженим. На нашу думку, особливої уваги заслуговує вивчення зміни кількості гліцинових рецепторів, експресованих на поверхні клітин гіпокампа, під впливом ішемії, оскільки даний параметр може значним чином впливати на активність гліцинергічної системи.

Актуальним є також пошук нових модуляторів гліцинових рецепторів, здатних безпосередньо впливати на їх роботу. До того ж, встановлення

механізмів взаємодії гліцинових рецепторів із фармакологічно активними речовинами дозволить краще зрозуміти принципи функціонування та особливості структури цих рецепторів. Раніше було показано, що гінкголіди – терпени, що входять до складу екстракту *Ginkgo biloba*, пригнічують роботу гліцинових рецепторів (Kondratskaya et al., 2002), однак дія іншого компоненту екстракту, гінкголевої кислоти, на гліцинові рецептори не була вивчена. Вплив ніфлумової кислоти, добре відомого інгібітора СГ-селективних потенціалкероаних каналів, на гліцинові рецептори також залишався без уваги дослідників. У даному дослідженні нами було проаналізовано дію цих речовин на гліцинові рецептори.

У ході роботи нами було використано кілька експериментальних клітинних систем. Зокрема, вивчення змін кількості гліцинових рецепторів за умов киснево-глюкозної депривації (КГД) здійснювали із застосуванням органотипової культури зрізів гіпокампа. Перевагою даного методу є те, що він забезпечує збереження структури, що притаманна гіпокампу в нормі, та синаптичних контактів між нейронами. Вивчення дії модуляторів проводили на рецепторах, експресованих у гетерологічній системі (лінії клітин *CNO - hamster ovary cells*), оскільки дана техніка дає змогу досліджувати рецептори визначеної субодиничної композиції. Актуальною, на нашу думку, також є розробка нових клітинних систем для вивчення гліцинових рецепторів, особливо з огляду на швидкий розвиток технології формування нейронів із фібробластів людини. Використання даного методу дозволить поглибити наше розуміння особливостей функціонування ЦНС людини на молекулярному рівні.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась в рамках науково-дослідних робіт відділу цитології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України: «Ендогенна та фармакологічна регуляція внутрішньоклітинної та міжклітинної сигналізації в клітинах нервової системи в нормі та патології» (2011-2013 рр., номер державної реєстрації 0110U004750) та «Клітинні сигнальні системи в нормі та патології» (2014-2018 рр., номер державної реєстрації 0113U007273); та Інституту Системних Нейронаук, Марсель, Франція (*Institut de Neurosciences des Systèmes, Marseille, France*): «Функції та модуляція рецептор-кероаних каналів».

Мета роботи полягала у з'ясуванні особливостей функціонування гліцинергічної системи гіпокампа за умов КГД; пошуку нових речовин, здатних модулювати роботу гліцинових рецепторів; а також вивченні можливості використання нейронів, генерованих із фібробластів людини, для дослідження гліцинових рецепторів.

Для досягнення мети було поставлено наступні **завдання**:

1. Дослідити кількість гліцинових рецепторів на поверхні пірамідних нейронів та астроцитів CA1 зони гіпокампа в контролі та за умов киснево-глюкозної депривації.
2. Встановити вплив гінкголевої кислоти, компоненту екстракту *Ginkgo biloba*, на функціонування гліцинових рецепторів різної субодиничної

композиції. Визначити амінокислотні залишки, що є ключовими для взаємодії кислоти із гліциновим рецептором.

3. Вивчити дію ніфлумової кислоти, блокатора потенціалкерованих Cl^- -каналів, на гліцинові рецептори різної субодиночної композиції. Визначити локус взаємодії рецептора із ніфлумовою кислотою.
4. Охарактеризувати іонні канали, експресовані на поверхні нейронів, генерованих із фібробластів людини.

Об'єкт дослідження: функціонування та експресія цис-петельних гліцинових рецепторів.

Предмет дослідження: модулювання активності гліцинових рецепторів в умовах киснево-глюкозної депривації та під дією органічних кислот; особливості поверхневої експресії гліцинових рецепторів у різних клітинних системах.

Методи дослідження: для виконання поставлених завдань у роботі було застосовано низку методик культивування тваринних клітин, гістохімічні та електрофізіологічні методи. Зокрема, нами було здійснено культивування органотипових зрізів гіпокампа, лінії клітин *CHO*; генерацію нейронів із фібробластів людини та їх культивування. Для дослідження гліцинових рецепторів пірамідних нейронів та астроцитів гіпокампа було застосовано імуногістохімічне забарвлення зрізів гіпокампа із використанням специфічних антитіл *NeuN*, *GFAP* та *GlyR*. Визначення активності мітохондрій здійснювали шляхом їх забарвлення *MitoTracker Orange*. Аналіз отриманих забарвлених зрізів проводили із застосуванням конфокальної мікроскопії. Метод *patch-clamp* із фіксацією потенціалу у конфігурації «ціла клітина» використовували для дослідження струмів, опосередкованих лігандкерованими та потенціалкерованими іонними каналами, а також їх модуляції під дією органічних кислот.

Наукова новизна отриманих результатів. В дисертаційній роботі вперше було продемонстровано КГД-індуковане зменшення кількості гліцинових рецепторів, експресованих на поверхні пірамідних нейронів гіпокампа. Вперше було показано, що гінголева кислота є позитивним модулятором гліцинових рецепторів та вперше виявлено амінокислотні залишки, що є відповідальними за субодиночно-вибіркову дію гінголевої кислоти на гліцинові рецептори. Нами вперше встановлено, що ніфлумова кислота є блокатором каналу гліцинового рецептора та ідентифіковано амінокислотний залишок, що бере участь у цьому процесі. Вперше виявлено гліцинові рецептори на нейронах, генерованих із фібробластів людини (Badja et al., 2014).

Практичне значення отриманих результатів. Нами було показано, що під впливом КГД кількість гліцинових рецепторів, експресованих на поверхні пірамідних нейронів гіпокампа, зменшується. Отже, за цих умов, гліцин сприятиме, перш за все, активації НМДА рецепторів та розвитку ефектів ексайтотоксичності. Ми припускаємо, що фармакологічна потенціація роботи гліцинових рецепторів може протидіяти розвитку ексайтотоксичності та мати позитивний вплив на стан нервової тканини після киснево-глюкозної депривації. У ході нашого дослідження було виявлено два нових модулятора гліцинових

рецепторів: гінкголеву та ніфлумову кислоти. Нами встановлено, що гінкголева кислота є потенціатором $\alpha 1$ -гліцинових рецепторів, а отже – потенційним кандидатом для розробки нових фармакологічних препаратів, спрямованих на корекцію патологічних станів, що пов'язані зі зниженням функціональної активності гліцинових рецепторів. Нами показано, що ніфлумова кислота, що широко застосовується як знеболюючий препарат у медицині та інгібітор потенціалкерованих Cl^- -каналів у експериментальній біології, діє також на лігандкеровані Cl^- -селективні гліцинові рецептори. По-перше, це обмежує її використання як специфічного інгібітора потенціалкерованих Cl^- -каналів, по-друге, свідчить про можливий побічний ефект ніфлумової кислоти, оскільки інгібування $\alpha 3$ -гліцинових рецепторів призводить до виникнення відчуття болю. Нами було показано, що нейрони, генеровані із фібробластів людини за новітнім методом, мають усі характеристики функціональних нервових клітин. Даний метод є високоефективним та низьковитратним способом генерації нейронів із фібробластів, оскільки не вимагає додавання до культурального середовища трансформаційних факторів. Окрім того, нами продемонстровано, що дані нейрони експресують на своїй поверхні гліцинові рецептори. Це відкриває можливості для їх використання при дослідженні патології гліцинових рецепторів людини – гіперплексії, спричиненої мутаціями гену, що кодує субодиниці гліцинового рецептора.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем самостійно проведено аналіз літературних даних; разом із науковими керівниками визначено мету дослідження, поставлено завдання та розроблено методологію їх виконання. Електрофізіологічне дослідження дії гінкголевої кислоти на гліцинові рецептори було здійснене у співпраці із к.б.н. Булдаковою С. І. (*Institut de Neurosciences des Systemes, Marseille, France*). Вивчення впливу ніфлумової кислоти на функціонування гліцинових рецепторів проведено здобувачем самостійно. Самостійно виконано статистичний аналіз отриманих результатів. Дослідження гліцинових рецепторів пірамідних нейронів та астроцитів гіпокампа, а також визначення активності мітохондрій проводили у співпраці зі старшим науковим співробітником відділу цитології, к.б.н. Лушніковою І. В. Генерація нейронів із фібробластів людини проводилася співробітниками відділу *Medical Genetics and Functional Genomics (INSERM, Aix-Marseille University, Marseille, France)*, зокрема *PhD Badja C.* Здобувачем самостійно виконано електрофізіологічний аналіз нейронів, генерованих із фібробластів людини. Мутації гліцинового рецептора виконані *GeneCust (Luxembourg)* та *PhD Peiretti F. (Nutrition Obésité Risques Thrombotiques, Marseille, France)*

Апробація результатів. Основні положення дисертації слухали та обговорювали на X Anniversary Ukrainian - Polish - Belorussian Conference “Physiology and Pathology of Respiration: Advances in Basic Research and Clinical Applications” (Kyiv, Ukraine, 2013); VI Конгрес Українського Товариства Нейронаук (Київ, Україна, 2014); 9th FENS Forum of Neuroscience (Milano, Italy, 2014); European Society for Neurochemistry’s Conference “Molecular Mechanisms of Regulation in the Nervous System”, Young Members Symposia (Tartu, Estonia,

2015); Biennial meeting of International Society for Neurochemistry (Cairns, Australia, 2015); Conference of Young Scientists-2015 (Kyiv, Ukraine, 2015); 3-тя Міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (Дніпропетровськ, Україна, 2015); 10th FENS Forum of Neuroscience (Copenhagen, Denmark, 2016).

Публікації. Матеріали дисертації викладені у 15 публікаціях: 7 статей у міжнародних та вітчизняних фахових наукових журналах, затверджених ВАК України, та 8 тез доповідей на наукових конференціях.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Розділ **Огляд літературних даних** складається з 4 підрозділів, в яких наведено інформацію про структуру та фізіологічну роль гліцинових рецепторів, їх участь у розвитку патологічних станів ЦНС, засоби їх фармакологічної модуляції та основні характеристики нейронів, генерованих із фібробластів людини. Гліциновий рецептор відомий як хлор-селективний лігандкерований канал, що належить до системи швидкої гальмівної нейропередачі у ЦНС. Фізіологічні функції гліцинових рецепторів дуже різноманітні: від контролю моторної діяльності і генерації ритму до обробки сенсорної інформації (Lynch, 2004). Порушення нормального функціонування гліцинергічної нейропередачі є причиною виникнення гіперплексії та больового синдрому; гліцинові рецептори беруть також участь у розвитку епілепсії та постішемичного ураження нервової тканини (Shiang et al., 2013; Harvey et al., 2004; Meier et al., 2005 ; Yao et al., 2012). Агоніст гліцинового рецептора, гліцин, відіграє подвійну роль у функціонуванні ЦНС, оскільки є активатором гальмівних рецепторів та ко-активатором збудливих – НМДА-рецепторів (Johnson and Ascher, 1987). Особливого значення даний феномен набуває за умов патології, зокрема при КГД, коли надмірна активація НМДА-рецепторів спричинює ушкодження нервової тканини, а стимуляція гліцинових може протидіяти її негативним наслідкам (Tanabe et al., 2010; Yao et al., 2012). Проте, особливості функціонування та експресії гліцинових рецепторів за умов КГД залишаються малодослідженими. З огляду на різноманітність функцій, що гліцинові рецептори виконують у ЦНС, вони є потенційними мішенями м'язових релаксантів, знеболюючих, антиепілептичних та нейропротекторних препаратів (Webb and Lynch, 2007). Однак, на сьогоднішній день, кількість речовин, здатних специфічно впливати на роботу даного типу рецепторів, є досить обмеженою. Генерація нейронів із клітин сполучної тканини, шляхом індукції плюрипотентних стовбурових клітин, стала визначним проривом у галузі нейронаук (Takahashi and Yamanaka, 2006; Wernig et al., 2008). Використання даного методу відкриває нові можливості для дослідження патологій ЦНС людини та їх лікування, зокрема, захворювань, пов'язаних із дисфункцією гліцинових рецепторів.

В розділі **Матеріали та методи дослідження** описані методичні підходи, використані при виконанні роботи. Всі експерименти були проведені із

дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях. Локальні Біоетичні комітети Інституту фізіології імені О.О. Богомольця та Університету Екс-Марсель (Франція) розглянули та схвалили протоколи всіх експериментальних процедур із використанням лабораторних тварин.

Експериментальні моделі. У якості експериментальної моделі для дослідження зміни кількості гліцинових рецепторів за умов КГД було обрано культуру органотипових зрізів гіпокампа щурів лінії *Wistar* віком 7 днів. Культивування органотипових зрізів гіпокампа здійснювалося у стерильних умовах за методикою розробленою Stoppini (Stoppini et al., 1991).

Для вивчення дії гінголевої та ніфлумової кислот на гліцинові рецептори було використано гетерологічну систему їх експресії – клітини лінії СНО (*Chinese hamster ovary cells*), що культивувалися за стандартних для клітин ссавців умов.

Трансформація фібробластів та всі заходи із культивування отриманих нейронів були виконані співробітниками відділу *Medical Genetics and Functional Genomics (INSERM, Aix-Marseille Université, Marseille, France)*.

Киснево-глюкозна депривація. Ефекти киснево-глюкозної депривації (КГД) вивчали на 12-14 день культивування. Для проведення КГД поживне середовище замінювалось на розчин *ACSF*, що мав наступний склад: NaCl 124 ммоль/л; KCl 1,6 ммоль/л; NaHCO_3 24 ммоль/л; KH_2PO_4 1,2 ммоль/л; аскорбінова кислота 2 ммоль/л; сахароза 10 ммоль/л. Зрізи, розташовані на проникній пористій мембрані, переносили у спеціальну камеру, повітря в якій було замінено на газову суміш (95% NO_2 /5% CO_2). У безкиснево/безглюкозному середовищі зрізи витримували протягом 30 хв, після чого повертали до нормальних умов культивування на 1 або 4 год (нормоксична реоксигенація).

Імуногістохімічне дослідження. Візуалізація гліцинових рецепторів, експресованих на поверхні пірамідних нейронів та астроцитів гіпокампа, в контролі та через 1 і 4 год після КГД здійснювалася із використанням методу імуногістохімічного забарвлення. У якості первинних антитіл для виявлення гліцинових рецепторів було використано моноклональні антитіла *mouse GlyR*; для ядер пірамідних нейронів гіпокампа – *chicken NeuN*; для астроцитів – *chicken GFAP*. Вторинні антитіла були кон'юговані із флуоресцентними мітками. Стан мітохондрій нейронів гіпокампа після КГД визначали із застосуванням флуоресцентного барвника *MitoTracker Orange (Life Technologies, США)*. Аналіз отриманих забарвлених зрізів здійснювався із використанням конфокального мікроскопу *FluoView FV1000 (Olympus Inc., США)*. Кількісну оцінку поверхневої експресії гліцинових рецепторів та активності мітохондрій проводили у програмі *ImageJ (США)*.

Електрофізіологічні методи. Дослідження впливу гінголевої та ніфлумової кислот на гліцинові рецептори здійснювали із застосуванням методу *patch-clamp*. Трансфекцію кДНК різних субодиниць рецептора ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, β) та *GFP (green fluorescent protein)* здійснювали із використанням *Lipofectamine 2000 (Life Technologies, США)* за протоколом, що був рекомендований виробником.

Через 24-72 год зелені флуоресцентні клітини відбиралися для проведення *patch-clamp* експериментів у конфігурації «ціла клітина». Струми, опосередковані гліциновими рецепторами, були індуковані аплікацією різних концентрацій гліцину. Для *patch-clamp* аналізу нейронів, генерованих із фібробластів людини, було використано клітини, що культивувалися протягом 7-35 днів з моменту індукції диференціації. Реєстрацію струмів, опосередкованих ліганкерованими іонними каналами, здійснювали при аплікації різних концентрацій специфічних агоністів даних рецепторів (гліцину, ГАМК, ацетилхоліну). Для індукції струмів, опосередкованих потенціалкерованими іонними каналами, було використано протокол, що дозволяв покрокову зміну мембранного потенціалу від -80 до $+30$ мВ.

Всі електрофізіологічні результати було проаналізовано із використанням програми *PatchMaster* (HEKA Elektronik, Германия).

Розчини. Зовнішньоклітинний розчин для *patch-clamp* реєстрацій містив (ммоль/л): NaCl 140, CaCl₂ 2, KCl 2.8, MgCl₂ 4, HEPES 20, глюкоза 10; pH 7.4; 320-330 мосм/л. У ході дослідження було використано кілька внутрішньоклітинних розчинів: (i) CsCl 140, CaCl₂ 6, MgCl₂ 2, MgATP 2, NaGTP 0.4, HEPES/CsOH 10, BAPTA/КОН 20; pH 7.3; 290 мосм/л; (ii) глюконат калію 120, KCl 20, CaCl₂ 6, MgCl₂ 2, HEPES 10, BAPTA/КОН 2; pH 7.3; 290 мосм/л. Для зміни розчинів було застосовано систему швидкої аплікації (*SF 77A Perfusion Fast-Step*, Warner, США).

Статистичний аналіз. Статистична обробка результатів була здійснена із застосуванням парного та непарного тестів Ст'юдента у програмі *Origin 7.5* (*OriginLabs*, США).

Результати дослідження та їх обговорення

Визначення кількості гліцинових рецепторів CA1 зони гіпокампа в нормі та після киснево-глюкозної депривації

Кількість гліцинових рецепторів на поверхні пірамідних нейронів та астроцитів CA1 зони гіпокампа визначали через 1 та 4 год після КГД. Показано, що через 1 год після початку реоксигенації відносна площа позитивного забарвлення гліцинових рецепторів (*GlyR*) на пірамідних нейронах CA1 зони гіпокампа знизилася до $0,28 \pm 0,025$ у.о. ($n=10$, $p<0,05$) порівняно з контролем $0,4 \pm 0,04$ у.о. ($n=10$). Через 4 год було зафіксовано поглиблення цього процесу, зокрема спостерігалось подальше зниження відносної площі флуоресценції до $0,24 \pm 0,01$ у.о. ($n=10$, $p<0,05$, рис. 1).

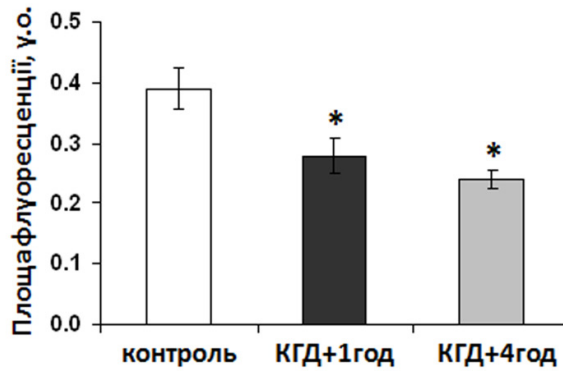


Рис.1. Відносна площа GlyR-позитивного забарвлення пірамідних нейронів CA1 зони гіпокампа в контролі (білий стовпчик) та після КГД: чорний стовпчик – через 1 годину, сірий стовпчик – через 4 години після початку реоксигенації ($p < 0,05$)*

Астроцити були значно менш чутливими до впливу КГД. Через 1 год після ішемії спостерігалось незначне підвищення кількості гліцинових рецепторів, розташованих на тілах астроцитів та їх відростках – з $0,2 \pm 0,02$ у.о. ($n=12$) до $0,25 \pm 0,02$ у.о. ($n=12$, $p > 0,05$), при цьому через 4 год їх кількість практично повернулася до контрольного значення (рис.2).

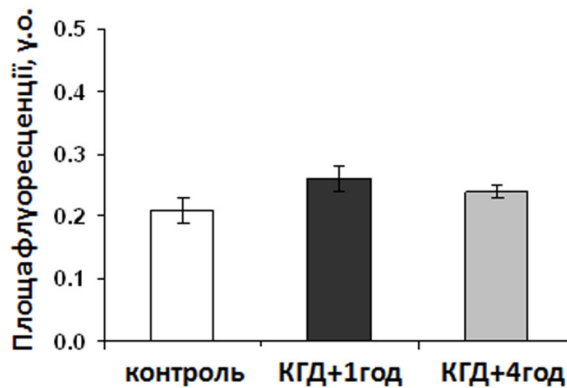


Рис.2. Відносна площа флуоресценції гліцинових рецепторів, локалізованих на астроцитах гіпокампа в контролі (білий стовпчик), через 1 годину (чорний стовпчик) та 4 години (сірий стовпчик) після КГД.

Отримані нами дані демонструють, що під дією КГД відбувається інтерналізація гліцинових рецепторів пірамідних нейронів CA1 зони гіпокампа, імовірно, внаслідок запуску каскаду внутрішньоклітинних реакцій фосфорилування (Huang et al., 2007). Аналіз літератури показав, що активація гліцинових рецепторів може мати нейропротективний ефект за умов КГД (Weber and Taylor 1994; Yao et al., 2012). Однак, зменшення кількості гліцинових рецепторів, експресованих на поверхні нервових клітин, спричинене КГД, може призводити до зниження ефективності роботи гліцинергічної системи. Отже, доцільною, з нашої точки зору, є розробка нових засобів позитивної модуляції даного типу рецепторів, особливо за умов патологічних станів.

Імовірно, процес інтерналізації гліцинових рецепторів пов'язаний із порушеннями іонного та енергетичного метаболізму, спричиненими КГД. Зокрема, нами було показано, що через 1 та 4 год після КГД спостерігаються зміни в активності мітохондрій. У контролі відносний рівень активності мітохондрій пірамідних нейронів CA1 зони становив $1,7 \pm 0,2$ у.о. Через одну

годину після КГД (30 хв) ми спостерігали його підвищення до $2,8 \pm 0,2$ у.о ($p < 0,05$), а через 4 години активність мітохондрій знижувалася до $2,2 \pm 0,3$ у.о. ($p < 0,05$). Це свідчить про те, що 30 хв КГД може значним чином вплинути на функціонування мітохондрій нейронів. Порушення нормальної роботи мітохондрій та їх здатності підтримувати іонний гомеостаз призводять не лише до енергетичного дефіциту, але й до запуску внутрішньоклітинних процесів, що можуть ініціювати інтерналізацію лігандкерованих рецепторів (Coultrap et al., 2011; Montori et al., 2012).

Аналіз дії гінголевої кислоти на гліцинові рецептори

Раніше було показано, що гінголіди, що входять до складу екстракту *Ginkgo biloba*, здатні інгібувати іонні струми, опосередковані гліциновими рецепторами (Kondratskaya et al., 2002; 2004; 2005). У ході пошуку нових модуляторів гліцинових рецепторів нами встановлено, що гінголева кислота, інший компонент екстракту *Ginkgo biloba*, субординично-специфічно потенціює струми, опосередковані $\alpha 1$ -гліциновими рецепторами.

Гінголева кислота у концентрації 100 нмоль/л сприяла підвищенню амплітуди струмів $\alpha 1$ -рецепторів з 291 ± 65 пА до 467 ± 124 пА ($n=8$, $p < 0,05$ рис.3, А). Для різних клітин ступінь потенціації коливався від 30 до 100% і в середньому складав $51 \pm 10\%$ ($n=8$, рис. 3, Б).

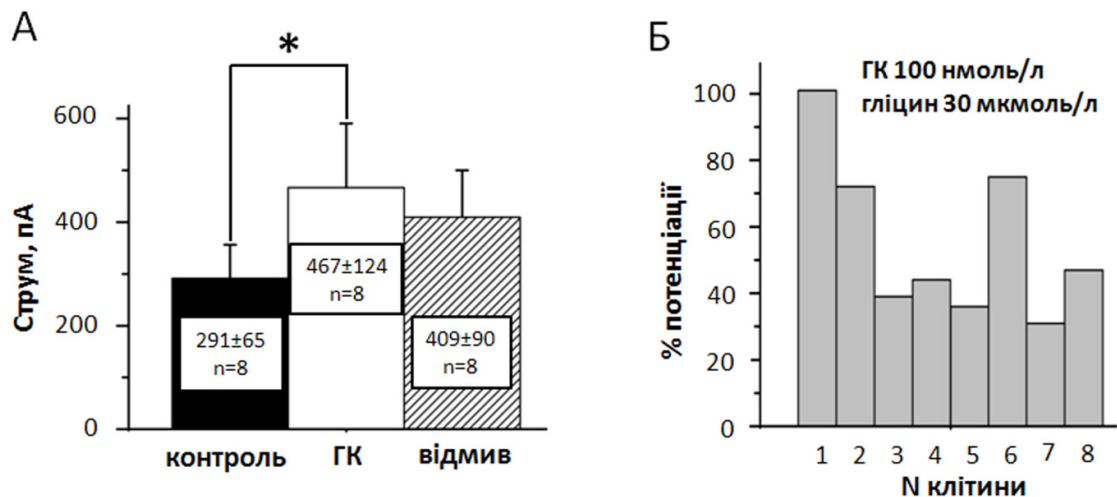


Рис.3. Потенціація струмів, опосередкованих $\alpha 1$ -рецепторами, під дією гінголевої кислоти. А. Амплітуда струмів, індукованих 30 мкмоль/л гліцину в контролі (чорний стовпчик), після аплікації 100 нмоль/л гінголевої кислоти (білий) та після її відмивання (заштрихований стовпчик); $*p < 0,05$. Б. Відсоток потенціації амплітуди струму під дією 100 нмоль/л гінголевої кислоти для кожної окремої клітини.

Ефект гінголевої кислоти розвивався повільно. Струм, зареєстрований через 40 с після початку її аплікації (100 нмоль/л), зріс на 54%, у порівнянні з контролем. Наступні реєстрації, у присутності гінголевої кислоти, продемонстрували подальше наростання амплітуди струму до майже повної

стабілізації через 2 хв. Під час відмиву модулятора спостерігалось часткове повернення амплітуди струму до вихідного значення. При повторній аплікації його ефект посилювався – амплітуда струму зросла на 105% у порівнянні із контролем (рис.4).

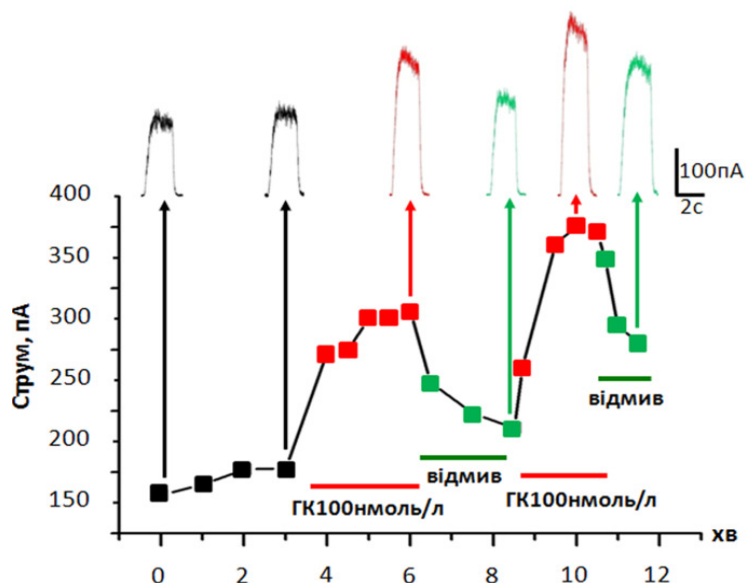


Рис.4. Кінетика розвитку ефекту потенціації $\alpha 1$ -рецепторів під впливом 100 нмоль/л гінкголевої кислоти; чорними квадратами позначено контрольні реєстрації; червоними – реєстрації, здійснені під час аплікації гінкголевої кислоти, зеленими – під час її відмиву; тривалість аплікації гінкголевої кислоти та відмиву позначено внизу графіка.

У присутності гінкголевої кислоти ми спостерігали зсув кривих концентраційних залежностей вліво та зниження ED_{50} для гліцину. Так, після преаплікації гінкголевої кислоти (3 мкмоль/л) протягом 1-3 хв ED_{50} для гліцину знижувалася від 36 ± 6 мкмоль/л до 17 ± 2 мкмоль/л ($n=9$, $p<0,01$).

Подібною була дія гінкголевої кислоти на гетеромерні $\alpha 1\beta$ -рецептори. Однак рецептори, сформовані $\alpha 2$ -, $\alpha 2\beta$ та $\alpha 3$ -субодиницями, були нечутливими до дії гінкголевої кислоти, так само як і ГАМК_A-рецептори ($\alpha 1\beta 2\gamma 2$).

Отже, нами було показано, що гінкголева кислота є специфічним модулятором роботи $\alpha 1$ -гліцинових рецепторів. З метою з'ясувати механізм її субодиничної вибірковості ми провели аналіз амінокислотних послідовностей $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -субодиниць, що дозволив виділити амінокислотні залишки, котрі із найбільшою вірогідністю приймають участь у цьому процесі. Для того, щоб експериментально підтвердити визначальну роль даних залишків у потенціації гліцинового рецептора гінкголевою кислотою, у $\alpha 2$ -субодиниці вони були замінені на відповідні з $\alpha 1$ -субодиниці: треонін (T) 59 на аланін (A), аланін (A) 261 на гліцин (G), аланін (A) 303 на серин (S).

Наші експерименти показали, що мутантні $\alpha 2$ T59A/A261G/A303S гліцинові рецептори, на відміну від $\alpha 2$ -субодиниць дикого типу, були чутливими до потенціюючої дії гінкголевої кислоти (рис. 5).

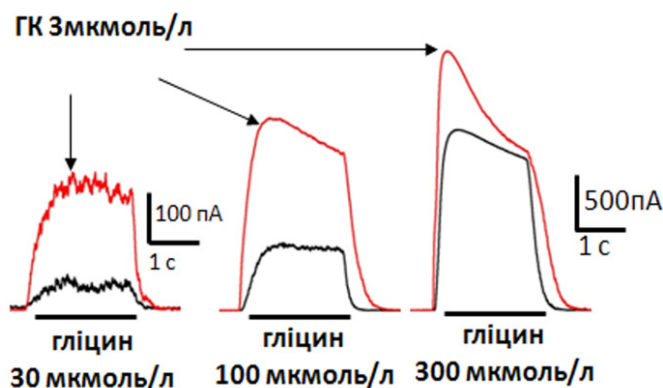


Рис.5. Вплив гінкголевої кислоти (3 мкмоль/л) на індуковані гліцином (30, 100, 300 мкмоль/л) струми, опосередковані мутантними $\alpha 2$ -рецепторами; реєстрації в контролі – чорний колір, після аплікації гінкголевої кислоти – червоний.

В присутності 3 мкмоль/л гінкголевої кислоти спостерігався значний зсув кривих концентраційної залежності вліво: значення ED_{50} були в межах від 31 мкмоль/л до 118 мкмоль/л, тоді як в контролі ED_{50} для мутантних $\alpha 2$ -рецепторів варіювала від 56 мкмоль/л до 238 мкмоль/л ($n=12$, $p<0,01$).

Спираючись на отримані результати, нами було зроблено висновок, що амінокислоти A52, G254 та S296 залучені до процесу взаємодії $\alpha 1$ -рецепторів із гінкголевою кислотою.

Особливості модулюючого впливу ніфлумової кислоти на гліцинові рецептори

Ніфлумова кислота є нестероїдним протизапальним препаратом, що здатний інгібувати потенціалкеровані Cl^- -канали (White and Aylwin, 1990; Liantonio et al., 2007). Нами було висунуто припущення, що ніфлумова кислота також є інгібітором лігандкерованих Cl^- -каналів гліцинових рецепторів.

Спорідненість ніфлумової кислоти до $\alpha 1$ -субодиниць рецептора була порівняно низькою, однак нам вдалося продемонструвати потенціалзалежність їх взаємодії (рис.6, А, Б).

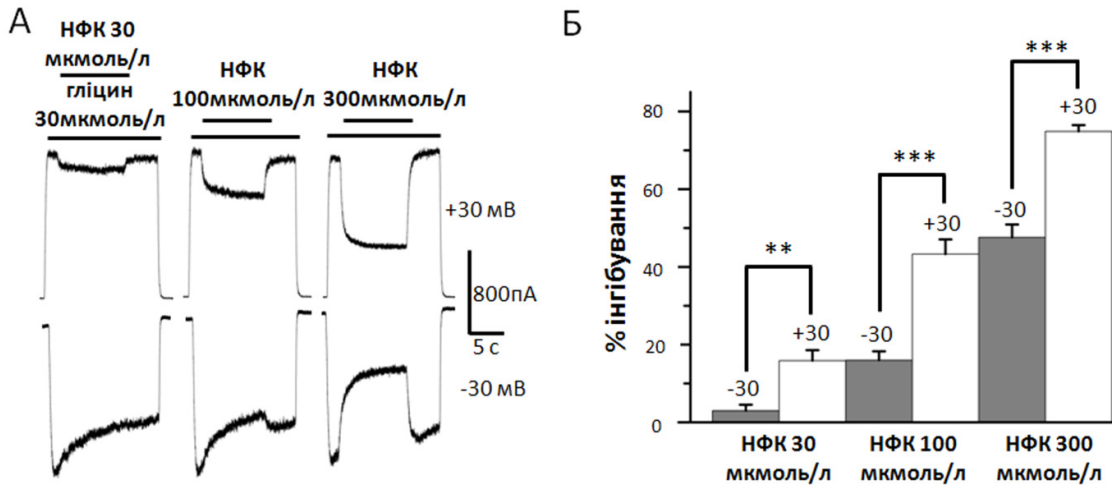


Рис.6. Взаємодія ніфлумової кислоти (НФК) з $\alpha 1$ -субодиницями гліцинового рецептора. А. Реєстрації $\alpha 1$ -опосередкованих струмів (гліцин 30 мкмоль/л) при аплікації різних концентрацій НФК (30, 100 та 300 мкмоль/л), МП становив +30 мВ (верхні реєстрації) та -30 мВ (нижні реєстрації); Б. Усереднені значення інгібування гліцин-індукованих струмів (30 мкмоль/л) під дією різних концентрацій НФК (30, 100, 300 мкмоль/л) при -30 (сірі стовпчики) та +30 мВ (білі стовпчики); ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Для детального дослідження потенціал- та концентраційної залежності дії ніфлумової кислоти на $\alpha 1$ -рецептори нами було застосовано «ремп» протокол, що дозволяє швидко (1 сек) змінювати МП від -80 до +80 мВ (рис. 7, А).

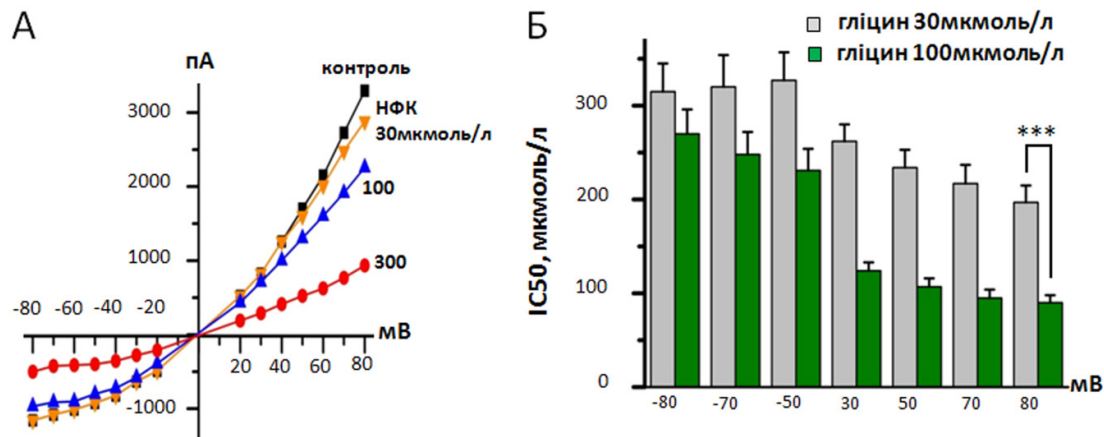


Рис.7. Потенціалзалежність взаємодії ніфлумової кислоти із $\alpha 1$ -субодиницями гліцинового рецептора. А. Репрезентативні криві залежності амплітуди струму від МП в контролі (30 мкмоль/л гліцину, чорні квадрати) та при аплікації суміші гліцину з різними концентраціями НФК (30 мкмоль/л – жовті перевернуті трикутники; 100 – сині трикутники; 300 – червоні кола); Б. IC₅₀ НФК для $\alpha 1$ -рецепторів. Струми, індуковані аплікацією 30 мкмоль/л гліцину (сірі стовпчики) та 100 мкмоль/л гліцину (зелені стовпчики), *** $p < 0,001$.

Для струмів, індукованих 30 мкмоль/л гліцину, IC_{50} ніфлумової кислоти при -80мВ склала 315 ± 30 мкмоль/л, в той час як при +80мВ цей показник знизився до 197 ± 18 мкмоль/л ($n=10$, $p<0,01$). Збільшення концентрації агоніста (100 мкмоль/л) призвело до зростання ефективності взаємодії ніфлумової кислоти із рецептором: при -80мВ IC_{50} склала 270 ± 26 мкмоль/л, в той час як при +80мВ – 90 ± 8 мкмоль/л ($n=10$, $p<0,001$; рис.7,Б).

Залежність ефективності взаємодії ніфлумової кислоти із гліциновим рецептором від МП та концентрації гліцину свідчить про її здатність блокувати пору каналу гліцинового рецептора.

При дослідженні $\alpha 2$ -гліцинових рецепторів було встановлено, що спорідненість ніфлумової кислоти до них була вищою, ніж до $\alpha 1$ (рис. 8, А, Б).

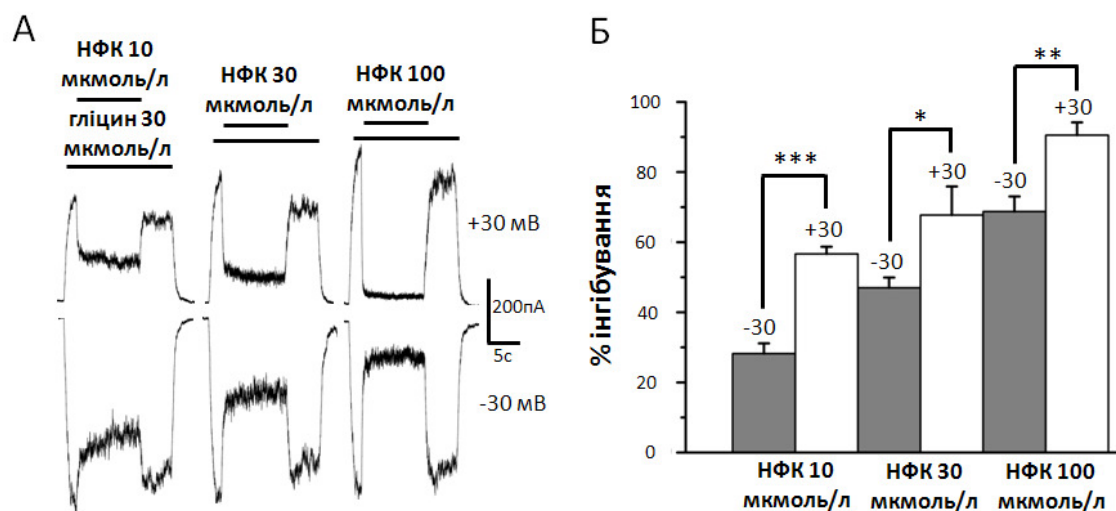


Рис.8. Взаємодія $\alpha 2$ -гліцинових рецепторів із ніфлумовою кислотою. А. Пригнічення гліциніндукованих струмів (30 мкмоль/л) аплікацією різних концентрацій ніфлумової кислоти (10, 30, 100 мкмоль/л), мембранний потенціал становив +30 мВ (верхні реєстрації) та -30 мВ (нижні реєстрації); Б. Усереднені значення інгібування $\alpha 2$ -опосередкованих струмів під дією 10, 30 та 100 мкмоль/л НФК; МП -30мВ – сірі стовпчики, +30 мВ – білі стовпчики (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

Характерною рисою даної взаємодії була яскраво виражена потенціалзалежність (рис. 9, А). При -80мВ IC_{50} ніфлумової кислоти склала 166 ± 28 мкмоль/л, в той час як при +80мВ цей показник знизився до 9 ± 2 мкмоль/л ($n=8$, $p<0,0001$, рис. 9, Б).

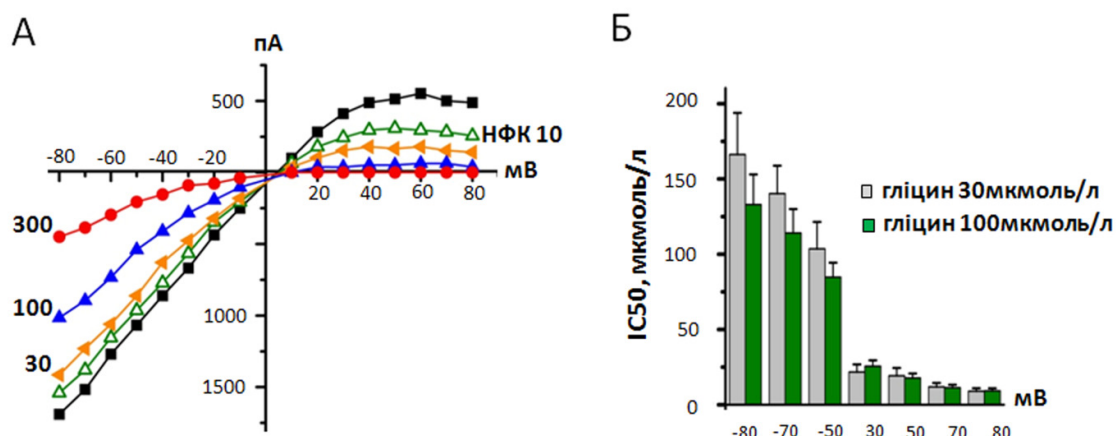


Рис.9. Потенціалзалежність взаємодії ніфлумової кислоти із $\alpha 2$ -гліциновими рецепторами. А. Репрезентативні криві залежності амплітуди $\alpha 2$ -опосередкованого струму від МП в контролі (чорні квадрати) та під час аплікації різних концентрацій ніфлумової кислоти (10 мкмоль/л – пусті зелені трикутники; 30 – жовті перевернуті трикутники; 100 – сині трикутники; 300 – червоні кола); Б. IC_{50} ніфлумової кислоти при різних МП, струми індуковано аплікаціями гліцину в концентрації 30 мкмоль/л (сірі стовпчики) та 100 мкмоль/л (зелені).

На відміну від $\alpha 1$ -рецепторів, при підвищенні концентрації гліцину зниження IC_{50} ніфлумової кислоти для $\alpha 2$ не спостерігалось.

Для $\alpha 3$ -субодиниць, так само, як і для двох інших субодиниць рецептора, ефективність дії ніфлумової кислоти була вищою при позитивних МП – при -80 мВ IC_{50} складала 86 ± 14 мкмоль/л, в той час як при +80 мВ - 16 ± 6 мкмоль/л ($n=7$).

Вивчення взаємодії ніфлумової кислоти із гетеромерними $\alpha 1\beta$ - та $\alpha 2\beta$ -рецепторами показало, що вбудовування β субодиниці не справляє суттєвого впливу на чутливість гліцинових рецепторів до неї. Аналіз кривих залежності амплітуди струму від МП показав, що IC_{50} ніфлумової кислоти для $\alpha 1\beta$ -рецепторів при +80 мВ складає 150 ± 4 мкмоль/л, а при -80 мВ – 256 ± 32 мкмоль/л ($n=5$). Однак, варто зазначити, що ступінь потенціалзалежності взаємодії $\alpha 2$ -рецепторів із ніфлумовою кислотою знизився внаслідок ко-експресії β -субодиниці – IC_{50} при -80 мВ складала 107 ± 37 мкмоль/л, а при +80 мВ – 20 ± 8 мкмоль/л.

Нами було висунуто припущення, що різниця у чутливості $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -субодиниць до ніфлумової кислоти обумовлена відмінністю амінокислотних послідовностей доменів, що формують пору каналу. У 2' позиції пори $\alpha 1$ -рецептори мають гліцин (G), тоді як $\alpha 2$ – аланін (A). Для перевірки даної гіпотези нами було здійснено точкову мутацію $\alpha 1$ -субодиниці, а саме: G254 замінено на A. При +80 мВ IC_{50} ніфлумової кислоти для мутантного рецептора становила 64 ± 10 мкмоль/л ($n=13$), що значно нижче, ніж для $\alpha 1$ -рецепторів дикого типу ($p<0,001$). В той самий час, при негативних потенціалах чутливість мутантних $\alpha 1$ -рецепторів була подібною до чутливості $\alpha 1$ -рецепторів дикого типу і складала 251 ± 30 мкмоль/л ($n=13$, рис.10, А). На противагу $\alpha 1$ -рецепторам

дикого типу, при підвищенні концентрації агоніста ефективність інгібування $\alpha 1$ G254A не збільшувалася ($n=10$, рис. 10, Б).

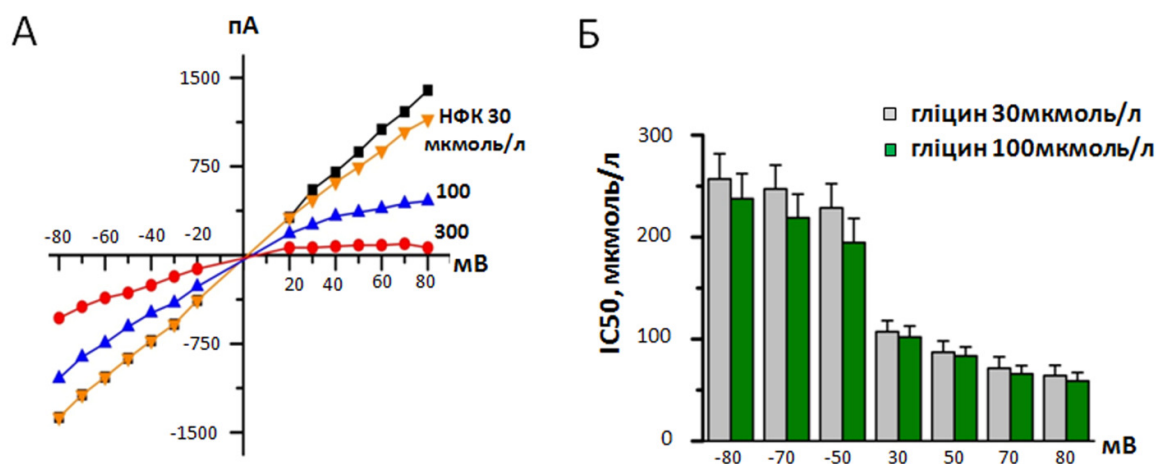


Рис.10. Потенціалзалежність дії НФК на мутантні $\alpha 1$ -гліцинові рецептори. А. Репрезентативні криві I/V залежності для $\alpha 1$ G254A-рецепторів у контролі та при аплікації різних концентрацій ніфлумової кислоти; Б. IC_{50} ніфлумової кислоти при аплікації 30 (сірі стовбчики) та 100 μM (зелені) гліцину.

Отже, мутація G254A у $\alpha 1$ -субодиниці спричинила підвищення ефективності її взаємодії із ніфлумовою кислотою. Проте, чутливість мутантних $\alpha 1$ -рецепторів була все ж нижчою, ніж $\alpha 2$ - та $\alpha 3$ -рецепторів. Це може свідчити про наявність кількох сайтів взаємодії ніфлумової кислоти із гліциновим рецептором.

Таким чином, нами було виявлено два нових модулятора гліцинових рецепторів – гінголеву та ніфлумову кислоти. Показано, що гінголева кислота володіє здатністю потенціювати $\alpha 1$ -субодиниці у наномолярних концентраціях. Амінокислотні залишки, відповідальні за взаємодію гінголевої кислоти із рецептором, також беруть участь у його взаємодії з ендоканабіноїдами (Yevenes and Zeilhofer, 2011). Ніфлумова кислота є потенціалзалежним блокатором пори каналу гліцинового рецептора, її спорідненість до $\alpha 2$ -субодиниць є значно вищою у порівнянні із $\alpha 1$ -субодиницями. Заміна амінокислотного залишку G254 у TM2-домені на А підвищує чутливість $\alpha 1$ -рецепторів до ніфлумової кислоти. Даний амінокислотний залишок також відіграє роль у визначенні основного стану провідності каналу (Bormann et al., 1993).

Вивчення іонних струмів нейронів, генерованих із фібробластів людини

Одним із завдань нашої роботи був пошук нових систем для вивчення гліцинових рецепторів. В електрофізіологічному дослідженні ми визначали присутність потенціалкерованих та лігандкерованих рецепторів на поверхні нейронів, генерованих із фібробластів людини за новим методом, що не вимагає використання клітин-годувальниць. Більшість досліджених клітин (32 із 37) демонстрували наявність потенціалкерованих вхідного та вихідного струмів при деполяризації мембрани від -80 до +30 мВ. Поріг активації вхідного струму було

зареєстровано на рівні -30 мВ, максимальна амплітуда струму спостерігалася при деполяризації клітини до -20 мВ. Вхідний струм мав швидку кінетику деактивації та пригнічувався аплікацією селективного антагоніста потенціалкерованих натрієвих каналів – тетродотоксину (TTX) (рис.11, А). Подальша деполяризація клітин спричинила активацію потенціалкерованих калієвих каналів, про що свідчила поява вихідного струму, амплітуда якого сягала максимуму при +30 мВ. Зареєстрований нами вихідний струм, пригнічувався аплікацією тетраетиламонію (TEA), що є специфічним блокаторм потенціалкерованих калієвих каналів (рис.11, Б).

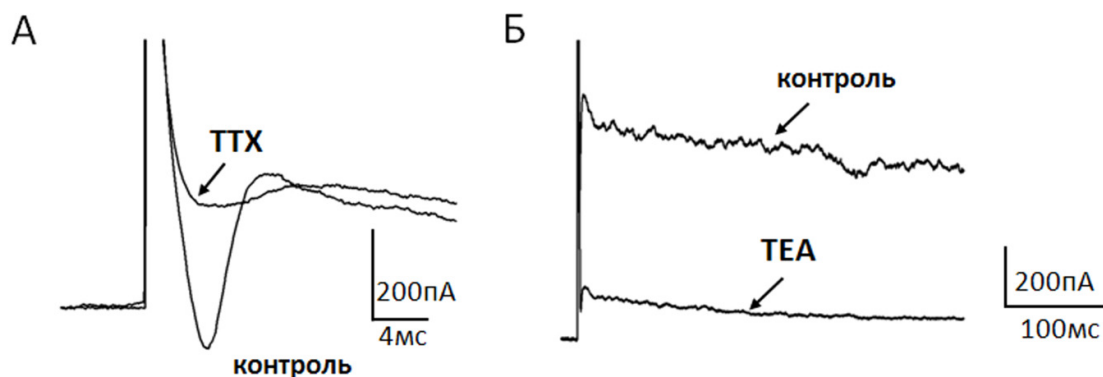


Рис.11. Потенціалактивовані струми, зареєстровані від нейронів, утворених з фібробластів людини. А. Вхідний натрієвий струм у контролі та після аплікації TTX при МП -20мВ. Б. Вихідний калієвий струм у контролі та після аплікації TEA при МП +30мВ.

Окрім того, даний тип нейронів експресував ряд лігандкерованих іонотропних нейрональних рецепторів. Зокрема, шляхом швидкої аплікації їх агоністів нами було виявлено гліциновий, ГАМК та ацетилхоліновий рецептори. Середня амплітуда струму, індукованого 1 ммоль/л гліцину склала 223 ± 64 пА (n=19), а ГАМК-індукованого – 368 ± 65 пА (n=25).

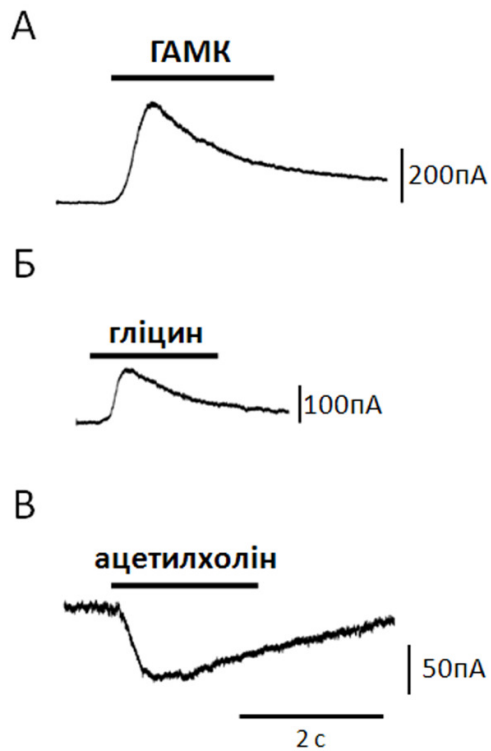


Рис. 12. Іонні струми, індуковані аплікацією агоністів лігандкерованих іонотропних каналів: ГАМК (А), гліцином (Б) та ацетилхоліном (В).

Таким чином, нами було встановлено, що нейрони, отримані із фібробластів людини, за методом, розробленим Badja та співробітниками (Badja et al., 2014), з одного боку, мають основні властивості, необхідні для генерації та проведення нервових імпульсів, а з іншого, експресують на своїй поверхні гліцинові рецептори. Це робить їх перспективною моделлю для вивчення даного типу рецепторів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі за допомогою імуногістохімічних та електрофізіологічних методів досліджено експресію гліцинових рецепторів на поверхні пірамідних нейронів гіпокампа в умовах киснево-глюкозної депривації; виявлено два нових модулятора гліцинових рецепторів (гінкголеву та ніфлумову кислоти); встановлено, що нейрони, отримані із фібробластів людини, експресують гліцинові рецептори, що робить їх перспективною моделлю для вивчення даного типу рецепторів.

За результатами проведеного дослідження зроблено наступні висновки:

1. Киснево-глюкозна депривація супроводжується порушенням енергетичного метаболізму нейронів; при цьому кількість гліцинових рецепторів, експресованих на поверхні пірамідних нейронів СА1 зони гіпокампа, зменшується, в той час як кількість гліцинових рецепторів, локалізованих на поверхні астроцитів, залишається практично незмінною.
2. Гінкголева кислота, що є компонентом екстракту *Ginkgo biloba*, володіє здатністю у наномолярних концентраціях вибірково потенціювати струми, опосередковані $\alpha 1$ -гліциновими рецепторами. Амінокислотні залишки аланін 52, гліцин 254 та серин 296 є ключовими для взаємодії $\alpha 1$ -гліцинових рецепторів із гінкголевою кислотою.
3. Ніфлумова кислота є потенціалзалежним блокатором пори каналу гліцинового рецептора, її спорідненість до $\alpha 2$ - та $\alpha 3$ -субодиниць є вищою, ніж до $\alpha 1$. Заміна гліцину 254 на аланін збільшує чутливість $\alpha 1$ -рецепторів до ніфлумової кислоти.
4. Нейрони, утворені із фібробластів людини, здатні експресувати на своїй поверхні потенціалкеровані канали та лігандкерovanі гліцинові рецептори, що свідчить про можливість їх використання в модельних дослідженнях при вивченні цього типу рецепторів в нормі та при патології.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ РОБІТ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті:

1. Mitochondrial dynamics in oxygen-glucose deprivation on a model of cultivated hippocampal slices / Malieieva G., Lushnikova I., Skibo G. // *Fiziologichnyi zhurnal*. – 2013. – №59(4). – P. 44-47. (Дисертант брала участь у проведенні експериментів, обговоренні результатів дослідів та написанні статті).
2. Молекулярная физиология рецепторов глицина в нервной системе позвоночных / Малеева Г., Брежестовский П. // *Российский физиологический журнал*. – 2014. – №99 (3). – P. 274-300. (Дисертант здійснила аналіз та узагальнення даних літератури та написання статті).
3. Efficient and cost-effective generation of mature neurons from human induced pluripotent stem cells / Badja C, Maleeva G, El-Yazidi C, Barruet E, Lasserre M, Tropel P, Binetruy B, Bregestovski P, Magdinier F. // *Cells Trans Med Stem*. – 2014. – №3. – P. 1–6. (Дисертант виконала значну частину експериментів та аналіз результатів, брала участь у обговоренні результатів дослідів та написанні статті).
4. Гліциновий рецептор: молекулярна організація і патології / Малєєва Г. В., Брежестовський П. Д. // *Фізіологічний журнал*. – 2015. – №61(5). – P. 107-17. (Дисертант здійснила аналіз та узагальнення даних літератури та написання статті).
5. Selective potentiation of alpha 1 glycine receptors by ginkgolic acid / Maleeva G., Buldakova S., Bregestovski P. // *Front Mol Neurosci*. – 2015. – №8:64. doi:10.3389/fnmol. (Дисертант виконала значну частину експериментів та аналіз результатів, брала участь у обговоренні результатів дослідів та написанні статті).
6. Субодинично-специфічна модуляція гліцинових рецепторів під дією гінкголевої кислоти / Малєєва Г. В., Булдакова С. І., Брежестовський П. Д. // *Фізіологічний журнал*. – 2016. – №62(4). – P. 40-45. (Дисертант виконала значну частину експериментів та аналіз результатів, брала участь у обговоренні результатів дослідів та написанні статті).
7. Амінокислотні залишки залучені до позитивної модуляції $\alpha 1$ -гліцинових рецепторів гінкголевою кислотою / Малєєва Г. В., Булдакова С. І., Скибо Г. Г., Брежестовський П. Д. // *Фізіологічний журнал*. Прийнята до друку. (Дисертант виконала значну частину експериментів та аналіз результатів, брала участь у обговоренні результатів дослідів та написанні статті).

Тези доповідей:

1. Mitochondrial dynamics in oxygen-glucose deprivation on a model of cultivated hippocampal slices / Malieieva G., Lushnikova I., Skibo G. // X Anniversary Ukrainian - Polish - Belorussian Conference “Physiology and Pathology of Respiration: Advances in Basic Research and Clinical Applications”, Kyiv, Ukraine, 2013.
2. Джинколова кислота як селективний модулятор субодиниць гліцинового рецептора / Малєєва Г., Булдакова С., Брежестовський П. // VI Конгрес Українського Товариства Нейронаук, Київ, Україна, 2014.
3. Subunit specific modulation of glycine receptor / Maleeva G., Buldakova S., Bregestovski P. // 9th FENS Forum of Neuroscience, Milano, Italy, 2014.
4. Selective modulation of alpha 1 glycine receptors by ginkgolic acid / Maleeva G., Buldakova S., Bregestovski P. // 25th ISN-APSN Joint Biennial Meeting, Cairns, Australia, 2015.
5. Ginkgolic acid differently modulates Cl-currents mediated by $\alpha 1$ and $\alpha 2$ glycine receptors / Maleeva G., Buldakova S., Bregestovski P. // European Society for Neurochemistry's Conference “Molecular Mechanisms of Regulation in the Nervous System”, Young Members Symposia, Tartu, Estonia, 2015.
6. Amino acid residues involved in positive modulation of $\alpha 1$ glycine receptors by ginkgolic acid / Maleeva G., Buldakova S., Skibo G., Bregestovski P. // 3-тя Міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології», Дніпропетровськ, Україна, 2015.
7. Alpha1 glycine receptor potentiation by ginkgolic acid / Maleeva G., Buldakova S., Bregestovski P. // Conference of Young Scientists, Kyiv, Ukraine 2015.
8. Subunit specific and voltage-dependent inhibition of glycine receptors by niflumic acid / Maleeva G., Bregestovski P. // 10th FENS Forum of Neuroscience, Copenhagen, Denmark, 2016.

АНОТАЦІЯ

Малєєва Г. В. Модуляція експресії та функції гліцинових рецепторів у різних клітинних системах. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13. – фізіологія людини і тварин. – Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ.

Дисертація присвячена дослідженню особливостей експресії та модуляції гальмівних лігандкерованих гліцинових рецепторів. Робота виконана із застосуванням методів електрофізіології та імуногістохімії, а також технік культивування органотипових зрізів гіпокампа, лінії клітин *CNO* та нейронів, генерованих із фібробластів людини. Нами встановлено, що киснево-глюкозна депривація спричинює зменшення кількості гліцинових рецепторів, експресованих на поверхні пірамідних нейронів CA1 зони гіпокампа. З огляду на це, важливим є пошук нових позитивних модуляторів гліцинових рецепторів. У ході роботи, нами виявлено два нові модулятори активності гліцинових рецепторів – гінголеву та ніфлумову кислоти. Показано, що гінголева кислота є субодиночно-специфічним потенціатором $\alpha 1$ -гліцинових рецепторів та встановлено амінокислотні залишки відповідальні за їх взаємодію. Ніфлумова кислота володіє здатністю інгібувати гліцинові рецептори. Її спорідненість до $\alpha 2$ - та $\alpha 3$ -субодиноць є вищою, ніж до $\alpha 1$. Мутація G254A у $\alpha 1$ -субодиноці призводить до підвищення її чутливості до ніфлумової кислоти. Наші дані свідчать про те, що за механізмом дії вона є потенціалзалежним блокатором пори каналу. Окрім того, нами було досліджено лігандкеровані та потенціалкеровані канали нейронів, генерованих із фібробластів людини, та показано, що даний тип клітин експресує на своїй поверхні гліцинові рецептори і може бути використаний у якості моделі для їх вивчення.

Ключові слова: гліциновий рецептор, киснево-глюкозна депривація, *patch-clamp*, іонні струми, гінголева кислота, ніфлумова кислота, нейрони генеровані із фібробластів людини, індуковані плюрипотентні стовбурові клітини.

АННОТАЦИЯ

Малеева Г. В. Модуляция экспрессии и функции глициновых рецепторов в разных клеточных системах. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.13. – физиология человека и животных. – Институт физиологии им А. А. Богомольца НАН Украины, Киев – 2016.

Диссертация посвящена исследованию особенностей экспрессии и модуляции тормозных лигандуправляемых глициновых рецепторов. Работа выполнена с использованием методов электрофизиологии и иммуногистохимии, а также техник культивирования органотипичных срезов гиппокампа, линии клеток *CNO* и нейронов, генерированных из фибробластов человека. Нами установлено, что кислородно-глюкозная депривация вызывает уменьшение количества глициновых рецепторов, экспрессированных на поверхности пирамидных нейронов CA1 зоны гиппокампа. Следовательно, актуальным является поиск новых позитивных модуляторов глициновых рецепторов. В ходе работы, нами обнаружено два новых модулятора активности глициновых рецепторов – гинкголевую и нифлумовую кислоты. Показано, что гинкголевая кислота способна субъединично-специфически потенцировать $\alpha 1$ -глициновые рецепторы, а также идентифицированы аминокислотные остатки ответственные за их взаимодействие. Нифлумовая кислота ингибирует глициновые рецепторы. Ее сродство к $\alpha 2$ - и $\alpha 3$ -субъединицам выше, чем к $\alpha 1$. Мутация G254A приводит к повышению чувствительности $\alpha 1$ -рецепторов к нифлумовой кислоте. Наши данные свидетельствуют о том, что она принадлежит к потенциалзависимым блокаторам поры канала. Кроме того, нами были исследованы лигандуправляемые и потенциал-управляемые ионные каналы нейронов, генерированных из фибробластов человека, и показано, что данный тип клеток экспрессирует на своей поверхности глициновые рецепторы и может быть использован в качестве модели для их изучения.

Ключевые слова: глициновый рецептор, кислородно-глюкозная депривация, *patch-clamp*, ионные токи, гинкголевая кислота, нифлумовая кислота, нейроны генерированные из фибробластов человека, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

ANNOTATION

Maleeva G. V. Modulation of expression and function of glycine receptors in different cell systems. – Manuscript.

Thesis for the PhD degree in biology, speciality 03.00.13. – human and animal physiology. – Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2016.

Thesis is dedicated to the study of expression and modulation of inhibitory ligand-gated glycine receptors. The research was performed using methods of electrophysiology and immunohistochemistry, as well as techniques of cultivation of hippocampal slices, CHO-cells and neurons generated from human fibroblasts. We have found that oxygen-glucose deprivation causes a decrease of the number of glycine receptors expressed on the surface of pyramidal neurons of CA1 zone of hippocampus. Our results stress the importance of a search for new modulators of glycine receptors function. We have identified two new modulators of glycine receptors – ginkgolic and niflumic acids. We have shown that ginkgolic acid is a subunit-specific positive modulator of $\alpha 1$ -glycine receptors and detected the amino acids responsible for their interaction. Niflumic acid is a voltage sensitive inhibitor of glycine receptors with higher affinity to $\alpha 2$ and $\alpha 3$ subunits than to $\alpha 1$. Mutation G254A in $\alpha 1$ receptors increases their sensitivity to niflumic acid. Our data evidences for the pore-blocking mechanism of niflumic acid action. We also have investigated ligand-gated and voltage-gated channels of the neurons generated from human fibroblasts and found that this cell type expresses on its surface glycine receptors and can be used as a model to study their functioning.

Key words: glycine receptor, oxygen-glucose deprivation, patch-clamp, ionic currents, ginkgolic acid, niflumic acid, neurons generated from human fibroblasts, induced pluripotent stem cells.