

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

На правах рукопису

МАЛЄЄВА ГАЛИНА ВАСИЛІВНА

УДК 612.8.02

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

Спеціальність 03.00.13 – Фізіологія людини і тварин

Дисертація на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Наукові керівники:

доктор медичних наук, професор

Скибо Галина Григорівна,

доктор біологічних наук, професор

Брежестовський Петро Дмитрович

Київ – 2016

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	5
ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ.....	14
1.1. Загальна характеристика гліцинових рецепторів.....	14
1.1.1. Структура гліцинового рецептора.....	14
1.1.2 Субодиниці гліцинового рецептора.....	17
1.2. Участь гліцинових рецепторів у формуванні патологічних станів ЦНС.....	19
1.2.1. Гіперплексія.....	20
1.2.2. Больовий синдром.....	22
1.2.3. Роль гліцинових рецепторів у функціонуванні гіпокампа в нормі та за умов патології.....	24
1.2.3.1. Значення гліцинових рецепторів для розвитку епілепсії.....	27
1.2.3.2. Взаємодія гліцинергічної та глутаматергічної систем мозку у пост-ішемічний період.....	28
1.3. Фармакологічна модуляція гліцинових рецепторів.....	32
1.3.1. Субодинично-специфічна модуляція гліцинових рецепторів.....	34
1.4. Використання нейронів генерованих з ІПСК людини у дослідженнях патологій нервової системи.....	38
1.4.1. Методи отримання ІПСК з фібробластів людини та генерації нейронів.....	38
1.4.2. Іонні канали, експресовані нейронами, що генеровані з ІПСК людини.....	41
1.4.3. Характеристика нейронів, отриманих із ІПСК пацієнтів із патологіями ЦНС.....	43
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	48
2.1. Методика виділення та культивування органотипових зрізів гіпокампа.....	48
2.2 Методика проведення киснево-глюкозної депривації.....	50

2.3 Методика імуногістохімічного виявлення гліцинових рецепторів на нейронах та астроцитах культивованих слайсів гіпокампа.....	50
2.4 Методика встановлення зміни мембранного потенціалу мітохондрій після КГД.....	52
2.5 Культивування <i>СНО-K1</i> клітин та підготування клітин до трансфекції.....	53
2.6 Трансфекція клітин кДНК рецепторів.....	54
2.7. Електрофізіологічне дослідження дії гінкголевої кислоти на гліцинові та ГАМК _A рецептори.....	56
2.8. Електрофізіологічне дослідження дії ніфлумової кислоти на гліцинові рецептори різної субодиничної композиції.....	59
2.9. Електрофізіологічне дослідження нейронів генерованих з ІПСК людини.....	61
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	63
3.1. Динаміка зміни кількості гліцинових рецепторів, експресованих на поверхні пірамідних нейронів та астроцитів гіпокампа, під впливом КГД.....	63
3.1.1. Локалізація гліцинових рецепторів на пірамідних нейронах та астроцитах СА1 зони гіпокампа в контролі.....	64
3.1.2. Зміна кількості гліцинових рецепторів, локалізованих на нейронах СА1 зони гіпокампа, за умов КГД.....	65
3.1.3. Зміна кількості гліцинових рецепторів, локалізованих на астроцитах СА1 зони гіпокампа за умов КГД.....	67
3.1.4. Зміни мітохондріальної активності пірамідних нейронів гіпокампа під впливом КГД.....	69
3.2. Гінкголева кислота - новий позитивний модулятор гліцинових рецепторів.....	70
3.2.1. Вплив гінкголевої кислоти на $\alpha 1$ -гліцинові рецептори.....	71
3.2.2 Вплив гінкголевої кислоти на $\alpha 1\beta$ -гліцинові рецептори.....	76
3.2.3 Вплив гінкголевої кислоти на $\alpha 2$ -гліцинові рецептори.....	78

3.2.4. Вплив гінкголевої кислоти на $\alpha 3$ -субодиниці гліцинового рецептора.....	79
3.2.5 Вплив гінкголевої кислоти на ГАМК _A рецептори.....	80
3.2.6. Визначення амінокислотних залишків, що є ключовими для потенціюючої дії гінкголевої кислоти на $\alpha 1$ -гліцинові рецептори.....	82
3.3. Ніфлумова кислота – блокатор гліцинових рецепторів.....	88
3.3.1 Взаємодія ніфлумової кислоти із $\alpha 1$ -гліциновими рецепторами.....	88
3.3.2. Дія ніфлумової кислоти на $\alpha 2$ -гліцинові рецептори.....	92
3.3.3. Дія ніфлумової кислоти на $\alpha 3$ -гліцинові рецептори.....	94
3.3.4. Дія ніфлумової кислоти на мутантні G254A рецептори.....	96
3.3.5. Дія ніфлумової кислоти на гетеромерні $\alpha 1\beta$ - та $\alpha 2\beta$ -гліцинові рецептори.....	99
3.4. Характеристика потенціалактивованих та лігандкерованих іонних каналів, що експресуються нейронами отриманими з ІПСК людини.....	103
3.4.1 Дослідження натрієвих та калієвих потенціалкерованих каналів індукованих нейронів людини.....	103
3.4.2 Встановлення наявності лігандкерованих іонних каналів на нейронах, що походять з індукованих плюрипотентних клітин людини.....	106
РОЗДІЛ 4 ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	111
4.1.Модуляція експресії гліцинових рецепторів під дією КГД.....	111
4.2.Фармакологічна модуляція гліцинових рецепторів.....	114
4.2.1.Гінкголева кислота – новий позитивний модулятор гліцинових рецепторів.....	114
4.2.2.Ніфлумова кислота – інгібітор гліцинових рецепторів.....	118
4.3.Нейрони генеровані із фібробластів людини – перспективна система для дослідження гліцинових рецепторів.....	121
ВИСНОВКИ.....	123
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	124

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- ЦНС** – центральна нервова система
- CHO** – chinese hamster ovary cells
- NeuN** – neuronal nuclear antigene
- GFAP** – glial fibrillary acidic protein
- GlyR** – glycine receptor
- НМДА** – N-метил-D-аспартат
- ГАМК** – гама-аміномасляна кислота
- 5-НТ₃** – 5-гідрокситраптамін
- ТМ1-ТМ4** – трансмембранні домени
- COX2** – cyclooxygenase 2
- PGE2** – prostaglandine E2
- цАМФ** – циклічний аденозинмонофосфат
- АТФ** - аденозинтрифосфат
- CaMKII** – Ca²⁺/calmoduline-dependent protein kinase II
- КГД** – киснево-глюкозна депривація
- IC₅₀** – півмаксимальна концентрація інгібітора
- ЦТБ** - ціанотрифенілборат
- ІПСК** – індуковані плюрипотентні стовбурові клітини
- ЕСК** – ембріональні стовбурові клітини
- ПД** – потенціал дії
- ТТХ** - тетродотоксин
- 4-АР** – 4-аміно-піридин
- АМПА** – α-імно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонова кислота
- ПЛР** – полімеразно-ланцюгова реакція
- GluA1, GluA2** - субодиниці АМПА-рецептора
- GluN1, GluN2** - субодиниці НМДА-рецептора
- Cav1.2, Cav2.2, Cav2.3** – потенціалкеровані кальцієві канали
- Nav1.1** - потенціалкерований натрієвий канал
- MEM** – minimum essential medium

HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HBSS – Hank's balanced salt solution

ACSF – artificial cerebrospinal fluid

PBS – phosphate buffer solution

ДМСО - диметилсульфоксид

BSA – bovine serum albumin

FBS – fetal bovine serum

EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid

кДНК – комплементарна дизоксирибонуклеїнова кислота

мРНК – матрична рибонуклеїнова кислота

GFP – green fluorescent protein

ЕД₅₀ - півефективна доза

nH – коефіцієнт Хілла

ГР – гліциновий рецептор

ГК – гінкголева кислота

G - гліцин

S - серин

A - аланін

T - треонін

МП – мембранний потенціал

НФК – ніфлумова кислота

ТЕА - тетраетиламоній

РКС - proteine kinase C

ВСТУП

Актуальність теми. 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 нікотинівий 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, гіпокампі (Chattipakorn and McMahon, 2002). Даний тип рецепторів залучений до контролю значної кількості фізіологічних процесів, зокрема моторно-рухової діяльності, відчуття болю, дихання, 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 його Cl^- -селективного 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, запального болю та епілепсії (Langlhofer 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 розподілення 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, гінголевої кислоти, на гліцинові рецептори не була вивчена. Вплив ніфлумової кислоти, добре відомого інгібітора Cl^- -селективних потенціалкерованих 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 розподілення 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 *CHO - 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 генерації нейронів із фібробластів людини. Використання даного методу дозволить поглибити наше розуміння особливостей функціонування ЦНС людини на молекулярному рівні.

Мета роботи полягала у з'ясуванні особливостей функціонування гліцинергічної системи гіпокампа за умов киснево-глюкозної депривації; пошуку нових модуляторів гліцинового рецептора; а також у 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, компонента 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 субодиничної 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. У нашому дослідженні вперше було продемонстровано КГД-індуковане зменшення кількості гліцинових рецепторів, експресованих на поверхні пірамідних нейронів гіпокампа. Вперше було показано, що гінкголева кислота є позитивним модулятором гліцинових рецепторів та вперше виявлено амінокислотні залишки, що є відповідальними за субодинично-вибіркову дію гінкголевої 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 за методом, що не потребує використання клітин-годувальниць.

Практичне значення отриманих результатів. Нами було показано, що під впливом киснево-глюкозної депривації 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. Отже – потенційним кандидатом для розробки нових фармакологічних препаратів, спрямованих на корекцію патологічних станів пов'язаних 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, що не потребує використання клітин-годувальниць, мають усі характеристики функціональних нервових клітин. Даний метод є високоефективним та низькозатратним 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 Systèmes, Marseille, France*). Вивчення впливу ніфлумової кислоти на функціонування гліцинових рецепторів проведене здобувачем самостійно. Самостійно виконано статистичний аналіз отриманих результатів. Дослідження гліцинових рецепторів пірамідних нейронів та астроцитів гіпокампа, а також визначення активності мітохондрій проводили у співпраці з провідним 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 у співпраці з *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 meetig of Internationa Society for Neurochemistry (Australia, Cairns, 2015); CYS-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.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літературних даних, опису матеріалів та методів дослідження, результатів,

обговорення, висновків та списку використаних джерел (158 найменувань).
Дисертація складається зі 140 сторінок та ілюстрована 69 рисунками.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ

1.1. Загальна характеристика гліцинових рецепторів

У нервовій системі хребетних швидка гальмівна синаптична передача забезпечується двома основними системами: ГАМК-ергічною та гліцин-ергічною. В першій, нейропередавачем виступає γ -аміномасляна кислота (ГАМК), в другій – найпростіша амінокислота – гліцин. Іонотропні ГАМК_A-рецептори локалізуються переважно в синапсах головного мозку, в той час як, гліцинові – в спинному мозку і стовбурі мозку (Lynch, 2004).

Фізіологічні функції гліцинергічної системи дуже різноманітні: від контролю моторної діяльності і генерації ритму до обробки сенсорної інформації. Функціонування гліцинових рецепторів залежить від місця їх локалізації у нервовій системі, субодиничного складу, регуляції вторинними посередниками (протеїнкінази, фосфатази, іони кальцію), а також від концентрації іонів у внутрішньоклітинному та позаклітинному середовищах (Webb and Lynch, 2007).

1.1.1. Структура гліцинового рецептора

Гліциновий рецептор разом із нікотинним ацетилхоліновим, серотоніновим (5-HT₃) та ГАМК_A рецепторами входить до складу родини цис-петельних лігандкерованих рецепторів (Kehoe et al., 2009; Miller and Smart, 2010). Білок гліцинового рецептора вперше було біохімічно очищено зі спинного мозку щура, з використанням афінної хроматографії та високо специфічного антагоніста гліцинового рецептора – стрихніну (Pfeiffer et al., 1982). При цьому було виявлено три білки з молекулярною масою 49, 58 та 93 кД, з яких перші два було ідентифіковано як $\alpha 1$ та β -субодиниці, гомологічні відповідним субодиницям інших представників родини цис-петельних рецепторів (Grenningloh et al., 1987; 1990a). В подальших експериментах продемонстровано, що білок, молекулярна маса якого становить 93 кД, специфічно зв'язується з β -

субодиницею і тубуліном, відіграючи, таким чином, головну роль у кластеризації гліцинових рецепторів (Prior et al., 1992). Він отримав назву геферин.

Іонотропний канал гліцинового рецептора представляє собою гомо- і гетеромерні ансамблі з 5 білкових субодиниць, що формують його центральну пору (Langosch et al., 1988; Laube et al., 2002), аналогічно до інших представників родини цис-петельних рецепторів (Unwin, 2005; Brejc et al., 2001). У структурі субодиниць гліцинового рецептора можна виділити наступні елементи: довгий зовнішньоклітинний N-термінальний домен, що складається більше як з 200 амінокислот, чотири трансмембранні домени (TM1-TM4), з'єднані петлями різної довжини (цитоплазматична петля, що з'єднує TM3 і TM4 домени нараховує майже 100 амінокислотних залишків), і короткий позаклітинний C-кінець (рис.1.1.1). N-термінальний домен кожної субодиниці має консервативну ділянку з 13 амінокислот, обмежених цистеїнами, котрі з'єднуючись ковалентно формують цис-петлю (Du et al., 2015).

Кінець N-термінального домена кожної субодиниці являє собою α -спіраль, за якою слідує серія з 10 β -складчатих структур (β -листів), задіяних у зв'язуванні агоніста. У формуванні ліганд зв'язуючого сайту приймають участь центральні ділянки N-термінальних доменів двох сусідніх субодиниць, а саме A-C «головної» (або «+») субодиниці і D-F петлі комплементарної (або «-») субодиниці (Pless et al., 2008). Дані петлі являються лінкерними ділянками, що поєднують β складчасті структури між собою. Консервативна цис-петля, яка входить до складу даного домену і петля, що зв'язує β -листки 2 і 3 видаються в сторону трансмембранних доменів і, ймовірно, відповідають за передачу інформації від ліганд-зв'язуючого сайту до канал-активуючих воріт, що містяться в порі (Dellisanti et al., 2007; Corringer et al., 2000).

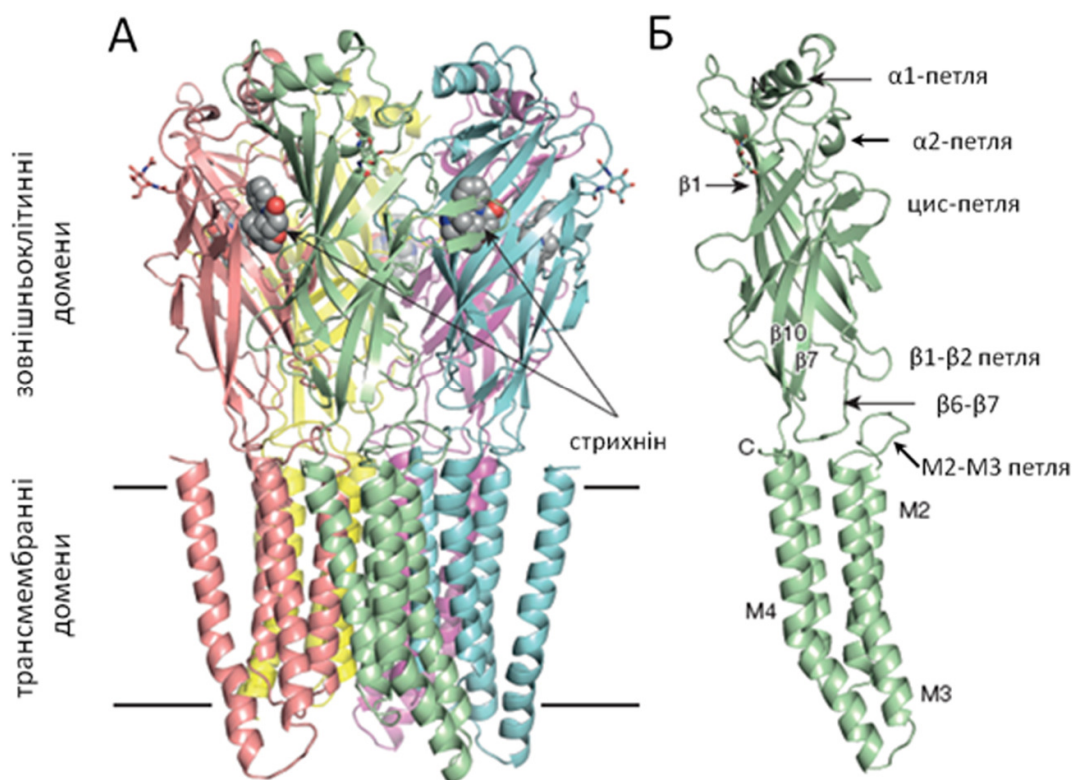


Рис. 1.1.1. А. Архітектура пентамера гліцинового рецептора у стрихнінзв'язаному стані, кожна субодиниця позначена окремим кольором. Б. Структура субодиниці гліцинового рецептора: на рис. позначено α -спіралі, β -петлі, а також цис-петля, утворена взаємодією двох цистеїнів, у зовнішньоклітинному домені та α -спіралі, що формують трансмембранні домени, (модифіковано з Huang et al., 2015).

Чотири трансмембранні домени субодиниць гліцинового рецептора представлені α -спіралями, що пронизують біліпідну мембрану. П'ять субодиниць, з яких складається рецептор, зорієнтовані таким чином, що їх TM2 домени утворюють іон-селективний канал, а TM1, TM3 і TM4 домени його оточують і взаємодіють з ліпідами цитоплазматичної мембрани (Hilf et al., 2009). Згідно із кристалічною структурою гліцинового рецептора (Du et al., 2015) пора каналу звужується у двох місцях: на рівні Pro266 та Leu277 (рис. 1.1.2). При зв'язуванні агоніста з рецептором TM2 домени відхиляються від центра каналу

та повертаються за часовою стрілкою призводячи до розширення пори (у закритому стані на рівні Leu277 радіус пори складає 1,4 А, тоді як у відкритому стані радіус збільшується до 4-5 А) (Du et al., 2015).

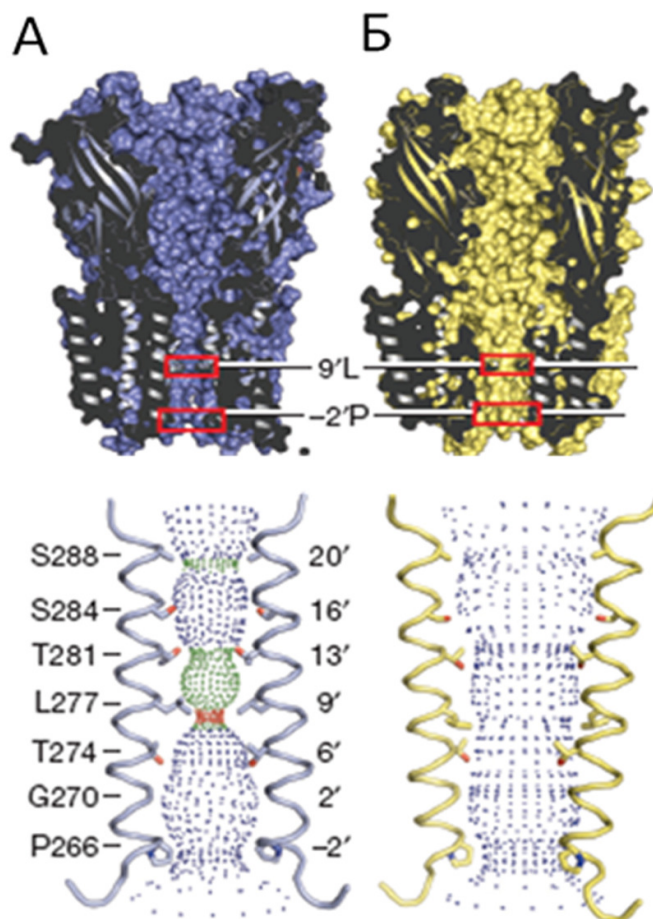


Рис. 1.1.2. Іонна пора каналу гліцинового рецептора у стрихнінзв'язаному (А) та гліцинзв'язаному (Б) станах; 9'L та -2'P місця звуження каналу (модиф. з Du et al., 2015). Внизу показані трансмембранні домени, що формують пору каналу.

1.1.2 Субодиниці гліцинового рецептора

Із ЦНС хребетних виділено і клоновано чотири підтипи α -субодиниці гліцинового рецептора ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$; рис. 1.1.3), котрі на 90% гомологічні між собою (Grenningloh et al., 1990b) і β -субодиницю, що має 47% гомології із $\alpha 1$ (Grenningloh et al., 1990a). $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ субодиниці можуть формувати

функціональні гомомерні та гетеромерні (в комбінації з β -субодиницею) рецептори, в той час як β -субодиниця не володіє здатністю формувати функціональні гомомерні рецептори (Kneussel and Betz, 2000). Важливою властивістю β субодиниці є наявність у цитоплазматичному домені ділянки зв'язування з геферином – арматурним білком, головним завданням якого є забезпечення постсинаптичної кластеризації гліцинових рецепторів (Kirsch and Betz, 1995). Властивості гомомерних і гетеромерних рецепторів дещо відрізняються між собою. Було встановлено, що провідність гомомерних рецепторів приблизно в 2 рази більше (80-100 пС), ніж гетеромерних (40-50 пС) (Bormann et al., 1993). Окрім того, гомомерні та гетеромерні рецептори мають різні фармакологічні властивості (Pribilla et al., 1992; Kondratskaya et al., 2005).

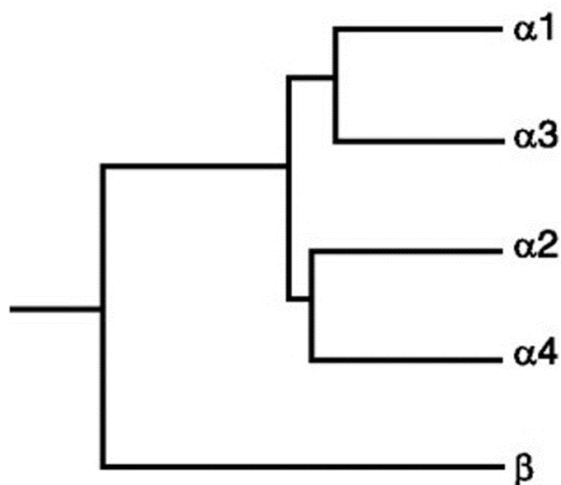


Рис.1.1.3 Дендрограма гліцинового рецептора ссавців (модифіковано з Zeilhofer et al., 2012).

З допомогою методу *in situ* гібридизації було показано, що для кожної субодиниці характерне специфічне місце локалізації у спинному мозку, стовбурі мозку і певних зонах головного мозку (Malosio et al., 1991). У ЦНС дорослих ссавців переважає $\alpha 1$ -субодиниця. Рівень її експресії достатньо високий у ядрах стовбура мозку, спинному мозку, таламусі і гіпоталамусі. Переважна синаптична локалізація $\alpha 1$ свідчить про формування гетеромерних α/β -рецепторів (Kim et al., 2006).

В період ембріонального розвитку $\alpha 2$ -субодиниця, що переважно формує гомомерні рецептори, є найбільш поширеною субодиницею гліцинового рецептора в ЦНС (Watanabe and Akagi, 1995). Однак, через три тижні після народження рівень експресії $\alpha 2$ -субодиниці різко знижується. В дорослому організмі $\alpha 2$ -субодиниця була виявлена лише в сітківці, ядрі нюхового аналізатора і деяких зонах головного мозку (Lynch, 2009).

Локалізація $\alpha 3$ -субодиниці була підтверджена в кількох регіонах ЦНС, однак, найбільш детально досліджено її поширення у сітківці (Haverkamp et al., 2003) і ноцецептивних нейронах I і II шарів задніх рогів спинного мозку (Harvey et al., 2004), де вона бере участь у формуванні больових відчуттів.

Субодиницю $\alpha 4$ гліцинового рецептора виявлено в спинному мозку, дорзальних і симпатичних гангліях курчат (Harvey, 2000), а також у сітківці мишей (Heinze et al., 2007). У людини ген, що кодує дану субодиницю належить до псевдогенів.

Таким чином, на даний момент, встановлено існування 5 субодиниць гліцинового рецептору: 4α і 1β , що можуть формувати як гомомерні, так і гетеромерні рецептори. Різні підтипи рецептора відрізняються за функціональними характеристиками, мають відмінності в локалізації, а рівні їх експресії змінюються у процесі розвитку. Актуальність дослідження гліцинових рецепторів обумовлена тим, що вони відіграють провідну роль у значній кількості фізіологічних процесів.

1.2. Участь гліцинових рецепторів у формуванні патологічних станів ЦНС

Порушення нормального функціонування гліцинергічної нейротрансмісії є причиною розвитку значної кількості патологій ЦНС. Залежно від своєї локалізації та субодиничного складу гліцинові рецептори можуть брати участь у досить різноманітних фізіологічних процесах (контроль моторної діяльності, сприйняття звукових та зорових сигналів, відчуття болю). Таким чином, зміни у роботі гліцинових рецепторів можуть стати причиною розвитку гіперплексії,

болювого синдрому, епілепсії та постішемичного ураження нервової тканини (Shiang et al., 2013; Harvey et al., 2004; Meier et al., 2005 ; Yao et al., 2012).

1.2.1. Гіперплексія

Гіперплексія – спадкове нейрологічне захворювання, яке фенотипово проявляється у вигляді сильно перебільшеної реакції на неочікувані акустичні і тактильні стимули, (Andermann et al., 1980) та спричинене мутацією гліцинового рецептора (Shiang et al., 1993).

Існує декілька механізмів розвитку гіперплексії, залежно від мутацій, що її спричиняють. Розглянемо більш детально деякі із них. Насамперед, це спонтанна активність гліцинових рецепторів, що є наслідком аутомно домінантних ‘missense’ мутацій $\alpha 1$ субодиниці (Y128C, Q226E, V280M, R414H) (Chung et al., 2010; Bode et al., 2013a). Більшість мутацій описаних у тексті позначені на рис. 1.2.1. Заміна амінокислоти Q на E у локусі 226, розміщеному на верхівці TM1-домену, найімовірніше, призводить до підсилення електростатичної взаємодії із R271, на верхівці TM2-домену сусідньої субодиниці і, як наслідок, збільшення просвіту закритого стану каналу (Bode et al., 2013b). Мутація V280M (TM2-TM3-петля) призводить до підвищення чутливості до гліцину та спонтанної активації каналу, імовірно, внаслідок конформаційних змін TM-доменів, які уможливають віддалення TM2 від центру каналу і збільшення його просвіту у неактивованому стані (Bode et al., 2013b). Заміни Y128C, що входить до складу одного з β -листків зовнішнього домену, і R414H (TM4 домен), найімовірніше, спричиняють неспецифічні структурні зміни, які є відповідальними за спонтанну активність гліцинового рецептора (Chung et al., 2010). Спонтанна активність гліцинових рецепторів призводить до того, що іони хлору, постійно надходячи до клітини, зміщують рівноважний потенціал у бік більш позитивних значень, і як наслідок, до зниження амплітуди струму та ефективності гальмівної гліцинергічної передачі. Наступним кроком розвитку патології є розвиток хронічної деполяризації та підвищення частоти генерації потенціалів дії.

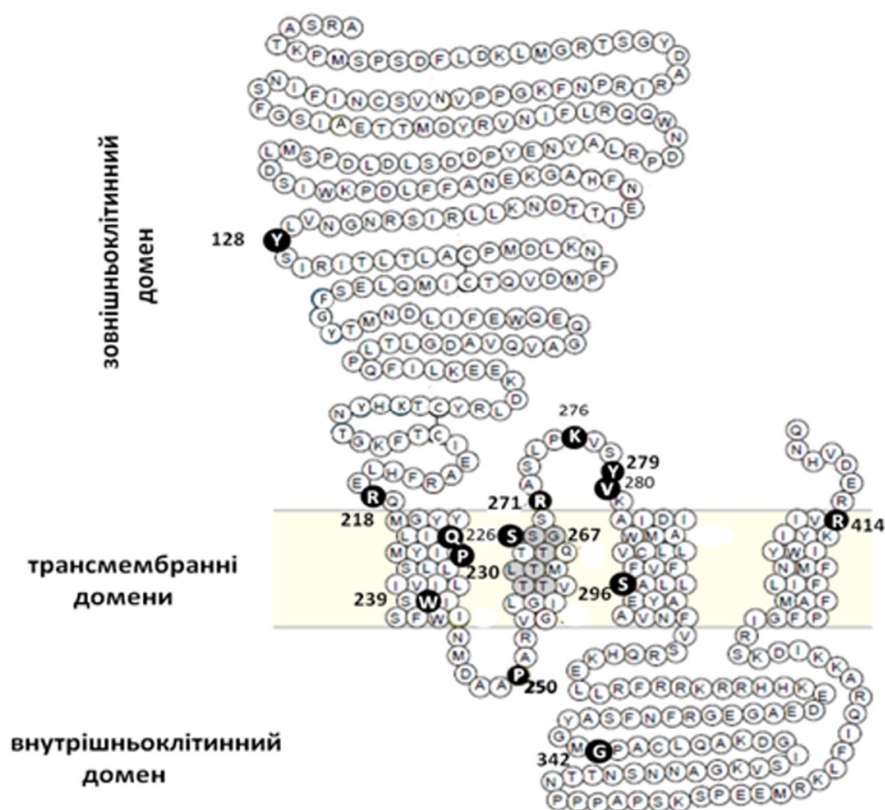


Рис. 1.2.1 Мутації $\alpha 1$ -гліцинового рецептора, що спричиняють розвиток гіперплексії.

Одним із механізмів формування гіперплексичного фенотипу є порушення відкривання каналу гліцинового рецептора. R271Q та R271L, розташовані на зовнішньоклітинному кінці TM2-домену, є найбільш поширеними та найбільш вивченими гіперплексичними мутаціями. Ці мутації не змінюють кількість гліцинових рецепторів на поверхні клітин, однак сильно впливають на їх чутливість до гліцину та провідність каналів (Maksay et al., 2002). Найімовірніше, зниження провідності каналів пов'язане зі зникненням позитивно зарядженого залишку, при заміні R271 на Q, чи L, а отже, порушенням здатності пори накопичувати негативно заряджені іони хлору. Окрім того, важливе значення має локалізація R271 – поряд із TM2-TM3-петлею, яка забезпечує передавання сигналу від сайту зв'язування гліцину до сайту відповідального за безпосереднє відкривання каналу. Імовірно, інші мутації, локалізовані в цій петлі (K276E/Q та Y279C/S), діють за таким самим

механізмом (Keramidas et al., 2004; Lape et al., 2012). Мутація P250T (у TM1–TM2-петлі) призводить до нестабільності відкритого стану каналу і, як наслідок, швидкої десенситизації рецептора (Saul et al., 1999).

Мутації β -субодиниці, що є визначальною для формування синаптичних рецепторів, також можуть спричинювати гіперплексію. На сьогоднішній день, зареєстровано одну аутосомну домінантну мутацію Y470C [63] та значну кількість аутосомних рецесивних мутацій (Chung et al., 2013). Більшість рецесивних мутацій (наприклад E24X, R50X, M177R, G229D) розміщені у зовнішньоклітинному домені *GLRB*, однак трансмембранні домени (S321F) та TM2-TM3 петля (W310C, R450X) також можуть містити гіперплексичні мутації. Головним наслідком вище перерахованих амінокислотних замін у β субодиниці є порушення мембранної експресії гетеромерних гліцинових рецепторів або зниження чутливості рецептора до агоніста (Chung et al., 2013; Rees et al., 2002).

Отже, гіперплексія – це неврологічне захворювання, спричинене мутаціями генів, що кодують білки гліцинергічної системи (найчастіше $\alpha 1$ -субодиниці рецептора). Нині найбільш ефективним засобом терапії гіперплексії є клонозепам, що забезпечує потенціацію ГАМК_A рецепторів (Schaefer et al., 2012). Активізація гальмівної ГАМК-ергічної системи компенсує порушення роботи гліцинергічної, однак не може повністю її замінити. Дослідження гіперплексії спрямовані на розробку більш специфічних та ефективних засобів лікування цього захворювання.

1.2.2. Больовий синдром

Гліцинові рецептори відіграють одну із ключових ролей у виникненні больового синдрому, спричиненого запальним процесом. При запаленні, $\alpha 3$ -гліцинові рецептори, локалізовані у дорсальних рогах спинного мозку (місці закінчення чутливих волокон) зазнають фосфорилування, що призводить до зниження їх активності (Harvey et al., 2004). Блокування гліцинергічної нейротрансмісії сприяє передачі нервового імпульсу від високочутливих

аферентних волокон до нейронів, чії відростки йдуть до вищих центрів обробки сенсорної інформації, а отже призводить до посилення больової чутливості.

Запальний процес активує синтез COX2 (циклооксигеназа 2) у периферичних тканинах, а також у ЦНС, зокрема у дорсальних рогах спинного мозку. COX2 у свою чергу зв'язується з PGE2 (простагландин 2). Простагландин, взаємодіючи із рецептором простагландину EP2 субтипу, сприяє підвищенню внутрішньоклітинного рівня цАМФ та, відповідно, активації протеїнкінази А, фосфорилуванню та пригніченню роботи $\alpha 3$ -гліцинових рецепторів (Zeilhofer, 2005; рис.1.2.2).

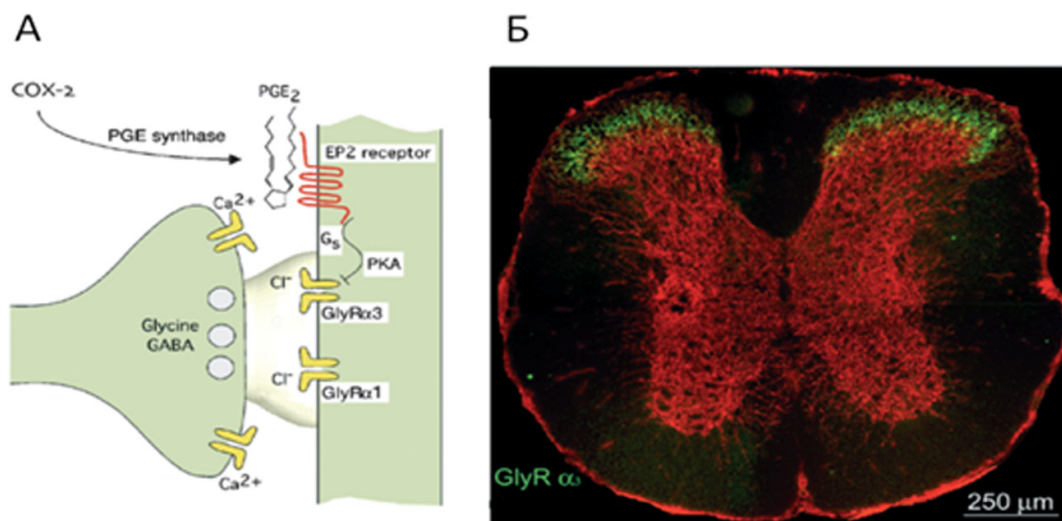


Рис. 1.2.2. Роль гліцинового рецептора у сприйнятті болю. А. Схема сигнального шляху, що ініціюється синтезом простагландинів (PGE2) та призводить до пригнічення активності $\alpha 3$ -гліцинових рецепторів у дорсальних рогах спинного мозку. Б. Імуногістохімічне забарвлення $\alpha 3$ -рецепторів у дорсальних рогах спинного мозку (модиф. з Zeilhofer, 2005).

Важливе значення $\alpha 3$ -гліцинових рецепторів у формуванні синдрому хронічного запального болю було підтверджене із використанням тваринної моделі. Миші *Gla3^{-/-}* нокаутні за геном $\alpha 3$ -гліцинових рецепторів лишалися чутливими до всіх видів болю, окрім запального, що говорить про високу

специфічність дії простагландинів саме на $\alpha 3$ -гліцинові рецептори (Hosl et al., 2009).

1.2.3. Роль гліцинових рецепторів у функціонуванні гіпокампа в нормі та за умов патології

Гліцинові рецептори, локалізовані у головному мозку, зокрема в гіпокампі також приймають участь у розвитку патологічних станів ЦНС. Довгий час вважалося, що гліцинові рецептори локалізовані лише у спинному мозку та стовбурі мозку (Bowerly and Smart, 2006). Електрофізіологічне дослідження, що переконливо продемонструвало наявність гліцинових рецепторів у пірамідних клітинах та інтернейронах гіпокампа було здійснене Chattipakorn та McMahon (Chattipakorn and McMahon, 2002). В експериментах проведених на зрізах гіпокампа щурів (вік 3-4 тижні) аплікація гліцину індукувала стрихнінчутливі СГ струми як у пірамідних клітинах, так і в інтернейронах (рис. 1.2.3). Окрім того, було встановлено, що дані клітини експресують дві субпопуляції рецепторів: гомомерні та гетеромерні. Гомомерні рецептори було заблоковано аплікацією пікротоксину, в той час як гетеромерні рецептори були нечутливими навіть до його високих концентрацій (1ммоль/л).



Рис. 1.2.3 Іонні струми зареєстровані від пірамідних клітин та інтернейронів гіпокампа, індуковані аплікацією 300 мкмоль/л гліцину в контролі, при аплікації 10 мкмоль/л бікукуліну та 1 мкмоль/л стрихніну (модиф. з Chattipakorn and McMahon, 2002).

Згодом локалізацію гліцинових рецепторів у гіпокампі було підтверджено імуногістохімічно. Гліцинові рецептори були присутні як на поверхні пірамідних нейронів, так і на поверхні інтернейронів (Brackmann et al., 2004; рис. 1.2.4).

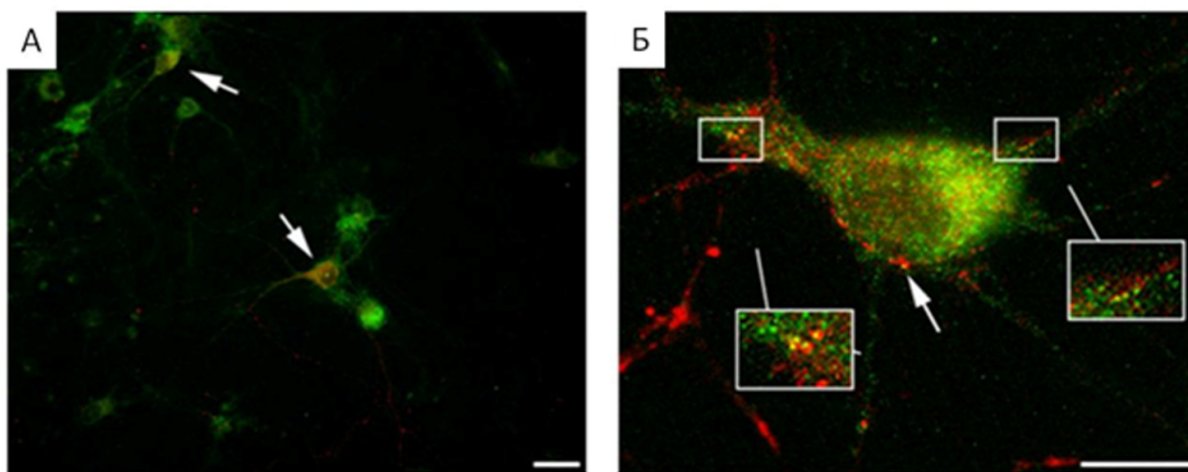


Рис. 1.2.4. Подвійне забарвлення гліцинових рецепторів (зелений колір, Alexa Fluor 488) та маркеру ГАМКергічних нейронів GAD (червоний, Cy3); стрілками відмічено ГР- та GAD-позитивні нейрони (модиф. з Brackmann et al., 2004).

Субклітинна локалізація гліцинових рецепторів у гіпокампі залишається спірною. Danglot та співробітники у 2004 показали, із використанням електронної та конфокальної мікроскопії, що гліцинові рецептори у гіпокампі можуть бути локалізовані як синаптично, так і екстрасинаптично. У тому ж році дві інші групи отримали свідчення постсинаптичної локалізації гліцинових рецепторів та їх здатності формувати кластери (Brackmann et al., 2004; Levi et al., 2004). Однак, варто зазначити, що електрофізіологічно синаптична локалізація гліцинових рецепторів не була підтверджена. У досліджах Mori та співробітників було показано, що габазин (антагоніст ГАМК_A рецепторів) повністю пригнічує інгібіторні постсинаптичні струми у гіпокампі (Mori et al., 2002). Ймовірно, гліцинові рецептори, розташовуючись екстрасинаптично, знаходяться у стані тонічної активації за рахунок розчинених у міжклітинному просторі амінокислот: гліцину, β -аланіну та таурину (Mori et al., 2002; Zhang et al., 2008).

Незвичайність гліцину як нейротрансмітера полягає у тому, що він є як активатором гальмівних (гліцинових), так і коактиватором збудливих (НМДА) рецепторів. Проте, чутливість цих двох типів рецепторів до гліцину є різною – для НМДА ефективна концентрація знаходиться в межах субмікромолярних,

тоді як для гліцинових становить десятки мікромолей. Гліцин представляє собою унікальний засіб регуляції функціонування нейрональних мереж гіпокампа (Ху, 2010) та виконує роль модулятора пластичності синаптичних контактів між нейронами (Zhang et al., 2008). Таким чином, гліцин, взаємодіючи із рецепторами активація яких має протилежно направлений вплив на ЦНС, має важливе значення для модуляції рівня збудливості клітин гіпокампа у фізіологічних та патофізіологічних умовах.

1.2.3.1. Значення гліцинових рецепторів для розвитку епілепсії

Особливості функціонування гліцинових рецепторів локалізованих у вищих відділах ЦНС, особливо в умовах патологічних станів, мало досліджені. Однак у 80-х роках ХХ-го століття *in vivo* було показано, що введення гліцину може підвищувати антиепілептичний ефект агоністів ГАМК-рецепторів (Seiler et al., 1984). Гліцин та таурин, що також є агоністом гліцинових рецепторів, здатні пригнічувати епілептиформну активність у гіпокампі, що була індукована видаленням іонів Mg^{2+} із середовища (Kirchner et al., 2003). Окрім того, встановлено, що аплікація гліцину гіперполяризує нейрони гіпокампа та пригнічує генерацію потенціалів дії (Chattipakorn and McMahon, 2003).

Вперше, існування $\alpha 3^{P185L}$ рецепторів, що мають високу чутливість до гліцину було продемонстровано Meier та співробітниками у 2005 році. ED_{50} гліцину для даного типу рецепторів складає 5 мкмоль/л, що уможливорює їх активацію під дією гліцину, розчиненого у міжклітинному просторі (Meier et al., 2005). Згодом $\alpha 3^{P185L}$ та $\alpha 2^{192L}$, $\alpha 2B^{192L}$ рецептори, що також володіють високою спорідненістю до гліцину, були виявлені у гіпокампах пацієнтів, що мали епілепсію скроневої частки. Перманентна активація гліцинових рецепторів розчиненим у міжклітинному просторі гліцином призводить до надмірного надходження хлору до нейронів та зміщення рівноважного потенціалу для хлору в бік більш позитивних значень. Це, в свою чергу, підвищує збудливість клітин та може сприяти розвитку епілепсії скроневої частки (Eichler et al., 2008). Окрім того, високий рівень експресії $\alpha 3^{P185L}$, $\alpha 2^{192L}$ та $\alpha 2B^{192L}$ рецепторів корелює зі

схильністю нейронів до апоптозу. Нещодавно зафіксовано кілька випадків, коли у хворих на епілепсію було виявлено антитіла до гліцинових рецепторів (Zuliani et al., 2014; Baysal-Kirac, 2016; Gaspard, 2016). Це черговий раз свідчить про важливу роль порушень гліцинергічної нейротрансмісії у розвитку епілепсії.

Отже, аналіз літературних даних продемонстрував, що гліцинові рецептори беруть участь у генерації епілептиформної активності гіпокампа і є перспективною «мішенню» для розробки нових антиепілептичних препаратів.

1.2.3.2. Взаємодія гліцинергічної та глутаматергічної систем мозку у пост-ішемічний період

Участь гліцинових рецепторів та гліцину у розвитку пост-ішемічних ефектів, на сьогоднішній день, є малодослідженим питанням, що, на нашу думку, заслуговує на увагу.

Як уже зазначалося вище, гліцин має подвійну дію: є агоністом гальмівних гліцинових та є ко-агоністом збудливих НМДА-рецепторів. Активація гліцинових рецепторів сприяє гіперполяризації нейронів та може позитивно впливати на їх стан після ішемічного епізоду, протидіючи ефектам, спричиненим надмірним виділенням глутамату до синаптичних щілин. Однак, одночасно із цим, виступаючи ко-агоністом НМДА рецепторів, гліцин може призводити до погіршення функціонального стану нейронів гіпокампа та поглибленню наслідків ексайтотоксичності.

Підвищення концентрації глутамату у синаптичних щілинах є одним із ключових наслідків ішемії мозку. Довготривала активація глутаматних рецепторів призводить до збільшення внутрішньоклітинної концентрації кальцію, що в свою чергу, спричинює активацію каскаду кальцій-залежних катаболічних процесів, деполяризацію нейронів та апоптоз (Bano and Nicotera 2007; Choi, 1996). Надмірне надходження до клітини іонів кальцію, спричинене глутаматною ексайтотоксичністю, та надпродукція вільних радикалів призводять до порушення функціонування мітохондрій: зниження синтезу АТФ та дизрегуляції іонного метаболізму (Halestrap, 2006). Окрім того, спостерігаються

зміни активності кіназ, зокрема CaMKII, що може впливати на широкий спектр внутрішньоклітинних подій (Coultrap et al., 2011).

Отже, роль гліцину у пост-ішемічних процесах є досить складною та неоднозначною. Як агоніст гліцинових рецепторів він сприяє підтриманню гіперполяризації нейронів та пригнічує їх надмірну активацію; з іншого боку, являючись коагоністом НМДА рецепторів, бере участь у розвитку ефектів ексайтотоксичності.

У 90-х роках XX-го століття дослідження, спрямовані на встановлення впливу гліцину на стан мозкової тканин після ішемії, зосереджувались саме на ексайтотоксичній дії гліцину та її негативних наслідках. Newell та співробітники у 1995 році показали, що пошкоджуючий вплив киснево-глюкозної депривації (КГД) може бути суттєво знижений при адміністрації антагоністів гліцинового сайту НМДА рецепторів (Acta 1021 та 7-хлорокінуренова кислота), при цьому аплікація гліцину протидіє їх нейропротекторному ефекту (Newell et al., 1995). Подібні результати були отримані при дослідженні механізму нейропротекторного впливу ксенону за умов КГД. Ксенон діє як інгібітор НМДА рецепторів, блокуючи сайт зв'язування гліцину із рецептором. Додавання надлишкової концентрації гліцину (100 мкмоль/л) до культурального середовища нівелювало позитивний ефект ксенону (Banks et al., 2010).

Інша властивість гліцину – здатність активувати гальмівні рецептори залишалася без уваги дослідників. Однак, згодом було показано, що гліцин має саме подвійну дію, яка, за існуючими даними, значно залежить від його концентрації. Дослідження Tanabe та співробітників у 2010 році продемонструвало, що у CA1 зоні гіпокампа екзогенна аплікація агоністів гліцинового рецептора гліцину та таурину сприяє відновленню амплітуди збуджуючих постсинаптичних потенціалів (Tanabe et al., 2010), що, як було показано раніше, позитивно корелює з морфологічним та функціональним станом нейронів (Weber and Taylor, 1994).

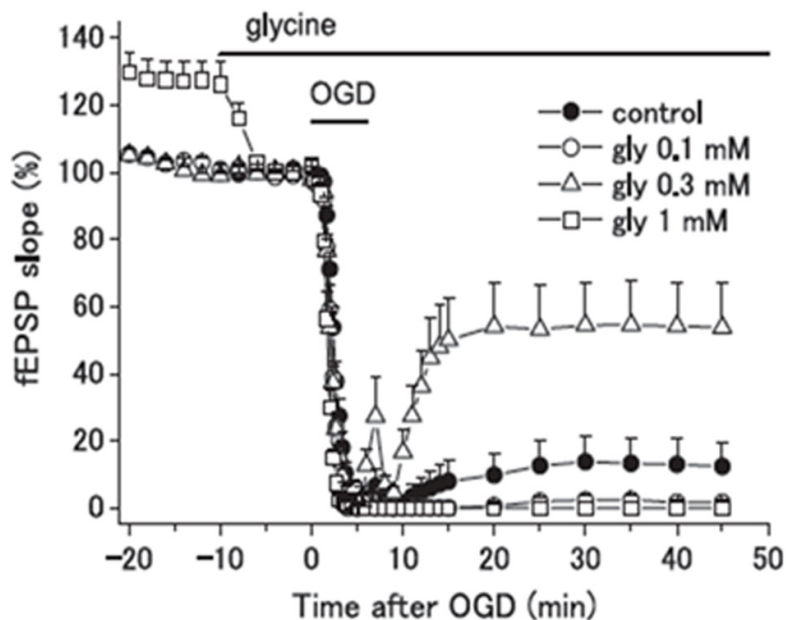


Рис. 1.2.5. Вплив киснево-глюкозної депривації (OGD) на збудливі постсинаптичні потенціали в контролі та в присутності різних концентрацій гліцину (0,1 ммоль/л, 0,3 ммоль/л, 1 ммоль/л) (модиф. з Tanabe et al., 2010).

Варто відмітити, що лише певні оптимальні концентрації гліцину та таурину мали цитопротективний ефект (для гліцину така концентрація складала 0,3 ммоль/л) (рис.1.2.5). Аплікація агоністів у концентраціях, що перевищували цей рівень, або були нижчими за нього, навпаки погіршувала стан нейронів гіпокампа.

Описані вище результати отримали часткове підтвердження у роботі, в якій, використовуючи моделі *in vivo* та *in vitro*, дослідникам вдалося показати, що гліцин у низьких концентраціях негативно впливає на стан нервової тканини після ішемії, тоді як високі концентрації гліцину мають нейропротективний ефект (Yao et al., 2012). Імовірно, це пов'язано із тим, що спорідненість гліцину до НМДА рецепторів вища за його спорідненість до гліцинових рецепторів. Таким чином, низькі концентрації гліцину, перш за все, спричиняють активацію НМДА рецепторів.

Іншим можливим механізмом позитивного впливу гліцину на пост-ішемічну нервову тканину є його здатність протидіяти апоптозу. Як показано на рис.1.2.6, кількість клітин, що зазнали апоптозу значно знижується у випадку адміністрації гліцину (Lu et al., 2012). Його цитопротективний ефект обумовлений прямою взаємодією із гліциновими рецепторами та асоційований із деактивацією фосфорильованої форми *c-Jun N-terminal kinase*, зниженням активності каспази-3 та інших білків апоптозу. Варто зазначити, що у разі *knockdown* $\alpha 1$ -гліцинових рецепторів пригнічення апоптозу під дією гліцину не спостерігалось (Lu et al., 2012).

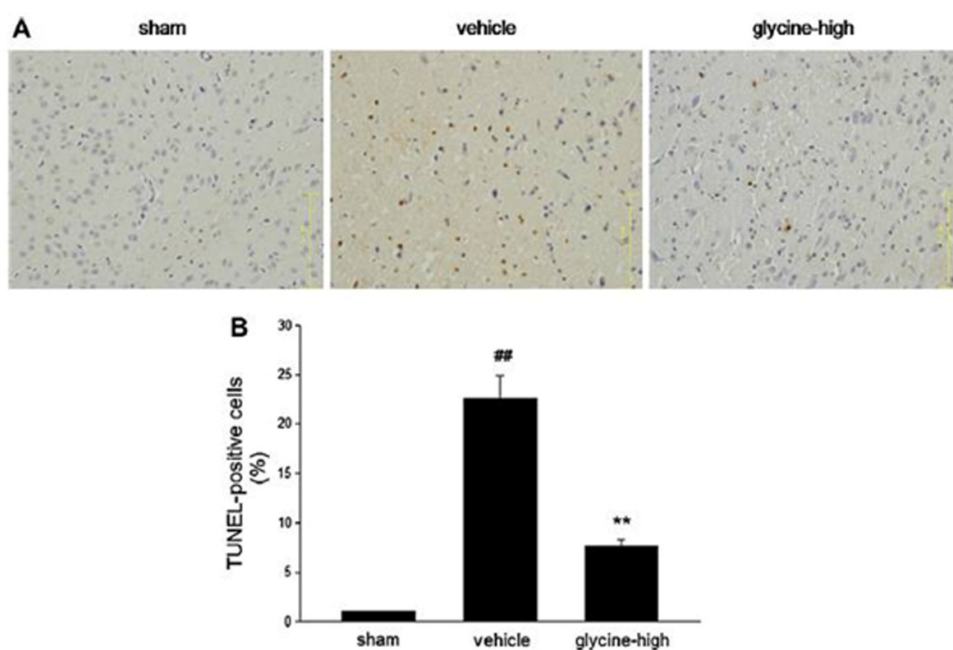


Рис. 1.2.6. TUNEL-забарвлення клітин, локалізованих у зоні ішемічного ураження та кількісна оцінка апоптичних TUNEL-позитивних клітин в умовах контролю, адміністрації плацебо та гліцину (модиф. з Lu et al., 2012).

Нашу увагу привернув той факт, що жодне дослідження не підіймало питання зміни кількості гліцинових рецепторів, експресованих на поверхні нейронів гіпокампа, під впливом ішемії та киснево-глюкозної депривації. Зокрема, було показано, що рівень мРНК ГАМК_A рецептора суттєво знижувався після ішемії (Montori et al., 2012), тоді як кількість НМДА рецепторів збільшувалася під впливом гіпобаричної гіпоксії (Hota et al., 2008). Отже, зміна

рівня експресії гліцинових рецепторів на поверхні нейронів гіпокампа може бути одним із чинників, що впливає на переважання цитопротективного, чи пошкоджуючого впливу гліцину в пост-ішемічних умовах. Окрім того, взаємодія між активацією гліцинових та НМДА рецепторів, як у контролі, так і після ішемії, є комплексним питанням, що, на сьогоднішній день, не досліджене в повній мірі.

Таким чином, гліцинові рецептори відіграють важливу роль у розвитку значної кількості захворювань ЦНС. Дослідження особливостей функціонування гліцинових рецепторів за патологічних умов може відкрити нові шляхи для корекції порушень роботи ЦНС.

1.3. Фармакологічна модуляція гліцинових рецепторів

Гліцинові рецептори є потенційними мішенями м'язових релаксантів, знеболюючих, антиепілептичних та нейропротекторних препаратів. Кількість речовин, здатних впливати на роботу гліцинових рецепторів є досить обмеженою. Зокрема, інгібіторами гліцинових рецепторів є стрихнін, пікротоксин, цианотрифенілборат та гінкголіди. До речовин, що потенціюють гліцинові рецептори, належать: етанол, анастетики, івермектин, канабіноїди та ендоканабіноїди (Webb and Lynch, 2007; Yevenes and Zeilhofer, 2011).

Агоністами гліцинового рецептора є речовини амінокислотної природи. Ефективність активації рецепторів агоністами знижується у наступному порядку: гліцин > β -аланін > таурин (Lynch 2004).

Стрихнін є високоспецифічним конкурентним антагоністом гліцинових рецепторів із IC_{50} близько 5-10 нмоль/л. (рис. 1.3.1; Young and Snyder, 1973).

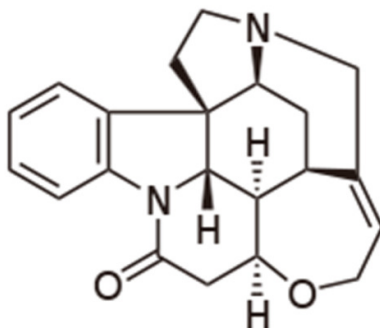


Рис. 1.3.1. Стрихнін. Структурна формула.

У зв'язку із цим стрихнін часто застосовується у якості інструменту для дослідження гліцинових рецепторів. Зокрема, вперше гліциновий рецептор було виділено із застосуванням афінної хроматографії на аміно-стрихнін-агарозній колонці (Pfeiffer et al., 1982). Радіоактивний [^3H] стрихнін широко використовується для вивчення спорідненості різних агоністів до рецептора (Maksay and Biro, 2002).

Сайти зв'язування стрихніну та гліцину з рецептором не є ідентичними, але частково перекриваються та динамічно взаємодіють між собою. Шляхом мутагенезу було встановлено, що заміна консервативних залишків G160E, Y161A, що розташовані у зовнішньо-клітинному домені рецептора, перешкоджає зв'язуванню стрихніну з рецептором (Vandenberg et al., 1992a). Згодом було визначено інші амінокислотні залишки, що беруть участь у взаємодії гліцинових рецепторів зі стрихніном: Y197, K200, Y202 (Rajendra et al., 1995; Vandenberg et al., 1992b).

1.3.1. Субодинично-специфічна модуляція гліцинових рецепторів

Більшість речовин, що є модуляторами гліцинових рецепторів мають більшу спорідненість до однієї із субодиниць рецептора. Даною властивістю володіють як потенціатори (етанол, канабіноїди, ендоканабіноїди), так і блокатори гліцинових рецепторів (ціанотрифенілборат, гінкголіди і пікротоксин).

Розглянемо більш детально дію деяких із них на гліцинові рецептори.

Канабіноїди. Фітоканабіноїд Δ^9 -тетрагідроканабінол, що є головним психоактивним компонентом марихуани, безпосередньо взаємодіє із гліциновими рецепторами, сприяючи значному підвищенню амплітуди струму, опосередкованого $\alpha 1$ - та $\alpha 3$ -субодиницями. Потенціація $\alpha 2$ -рецепторів виражена менш яскраво. Дослідження Xiong та співробітників (2011) показало, що важливу роль у субодиничній вибірковості потенціюючої дії Δ^9 -тетрагідроканабінолу відіграє TM3, а зокрема, S296 ($\alpha 1$) та S307 ($\alpha 3$), що на відміну від A303 ($\alpha 2$) здатні формувати гідроксильний зв'язок із OH групою тетрагідроканабінолу. Імовірно, така взаємодія є головною причиною позитивної модуляції $\alpha 1$ - та $\alpha 3$ -рецепторів під дією Δ^9 -тетрагідроканабінолу (Xiong et al., 2011).

Ендоканабіноїди – речовини ендогенного походження, що активують G-білок залежні канабіноїдні рецептори (Piomelli, 2003). Вперше пряму дію ендоканабіноїдів на гліцинові рецептори було показано на нейронах гіпокампа – N-арахідоноіл-етанол-амід та 2-арахідоноіл-гліцерол знижували амплітуду, впливали на кінетику деактивації та дисенситизації гліцинергічних струмів (Lozovaya et al., 2005).

N-арахідоноіл-гліцин (рис.1.3.2) відноситься до групи кислих ендоканабіноїдів та потенціює струми опосередковані $\alpha 1$ -гліциновими рецепторами, пригнічуючи струми опосередкованих $\alpha 2$ - та $\alpha 3$ -рецепторами. Амінокислотні залишки A52 (зовнішньоклітинний домен), G254 (TM2) та K385 (внутрішньоклітинна петля, що з'єднує TM3 та TM4 домени) є визначальними для субодинично вибіркової позитивної модуляції $\alpha 1$ -рецепторів під дією N-арахідоноіл-гліцину.

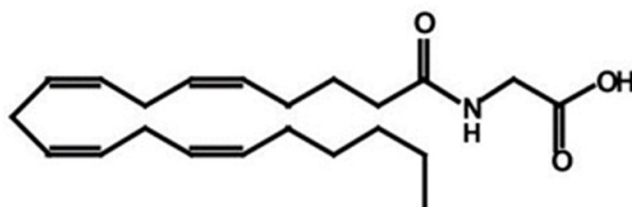


Рис. 1.3.2. N-арахідоноіл-гліцин. Структурна формула.

Етанол також володіє субодиночноспецифічною активністю по відношенню до гліцинових рецепторів. Ступінь потенціації $\alpha 1$ -гліцинових рецепторів під впливом етанолу переважає ступінь потенціації $\alpha 2$ -рецепторів. При здійсненні амінокислотної заміни в $\alpha 1$ -субодиноці, A52 було заміщено на характерний для $\alpha 2$ -субодиноці S, спостерігається зниження ефективності дії етанолу на $\alpha 1$ -рецептори (Mascia et al., 1996). Це дозволяє припустити, що A52 задіяна у формуванні одного із сайтів зв'язування етанолу. Пізніше було продемонстровано, що залишки розміщені в TM2 та TM3 доменах, S267 та A288 відповідно, також впливають на зв'язування етанолу з гліциновим рецептором, імовірно, формуючи інший сайт зв'язування (Mihic et al., 1997).

Ціанотрифенілборат (ЦТБ), що належить до класу органічних синтетичних речовин (рис.1.3.3), інгібує роботу $\alpha 1$ -гліцинових рецепторів у досить низьких концентраціях ($IC_{50}=2,6$ мкмоль/л) (Rundstrom et al., 1994). За механізмом дії він є потенціалзалежним блокатором іонного каналу. Водночас, $\alpha 2$ -гліцинові рецептори є значно менш чутливими до дії ЦТБ (значення IC_{50} перевищує 20 мкмоль/л). Чутливість гетеромерних $\alpha 1\beta$ -рецепторів не відрізняється від чутливості гомомерних $\alpha 1$ -рецепторів, однак вбудовування β -субодиноці в $\alpha 2$ -рецептори знижує IC_{50} до 7,5 мкмоль/л.

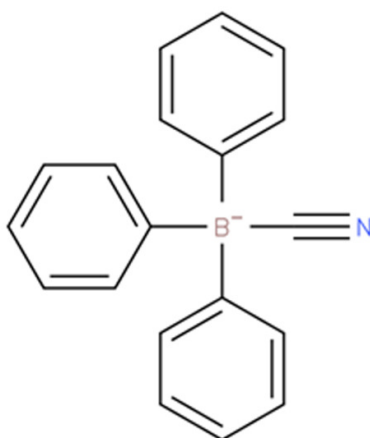


Рис. 1.3.3. Структура молекули ціанотрифенілборату.

Оскільки ЦТБ володіє характеристиками порового блокатора, припускалося, що саме ТМ2 (домен, що формує іонну пору гліцинового рецептора) відіграє ключову роль у різниці реакцій $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -субодиниць на аплікацію ЦТБ. ТМ2 домени цих субодиниць відрізняються лише за амінокислотним залишком, розташованим у позиції 2' (254 за нумерацією $\alpha 1$ -субодиниці, 261 за нумерацією $\alpha 2$ -субодиниці) – для $\alpha 1$ -субодиниці це G, а для $\alpha 2$ -субодиниці A. З метою з'ясування ролі 2' G у чутливості $\alpha 1$ -рецепторів до ЦТБ було здійснено заміну даного амінокислотного залишку на A. Мутантний рецептор, що було отримано в результаті даної заміни втратив чутливість до блокуючої дії ЦТБ (Rundstrom et al., 1994).

Однак цікавим є той факт, що химерний рецептор $\alpha 2\beta$, у якому ТМ2-домени β -субодиниці були замінені на ТМ2-домени $\alpha 2$ -субодиниці блокувався ЦТБ із IC_{50} 3 мкмоль/л. Тобто, амінокислотна послідовність ТМ2, імовірно, є важливою для взаємодії гліцинового рецептора з ЦТБ, однак інші ділянки рецептора також приймають участь у формуванні сприятливої геометрії сайту зв'язування (Rundstrom et al., 1994).

Гінкголіди. Вперше, інгібуюча дія гінкголіду В (рис.1.3.4) на гліциніндуковані струми була показана Kondratskaya та співробітниками на дисоційованій культурі пірамідних нейронів гіпокампа (Kondratskaya et al., 2002). Гінкголіди А, В, С, J є компонентами екстракту *Ginkgo biloba*, що за хімічною структурою відносяться до терпенів. За механізмом своєї дії на гліцинові рецептори гінкголіди належать до потенціалзалежних блокаторів відкритого каналу (Hawthorne et al., 2006), при цьому гомомерні $\alpha 1$ -рецептори більш чутливі до гінкголіду В, ніж гомомерні $\alpha 2$ -рецептори (Kondratskaya et al., 2005).

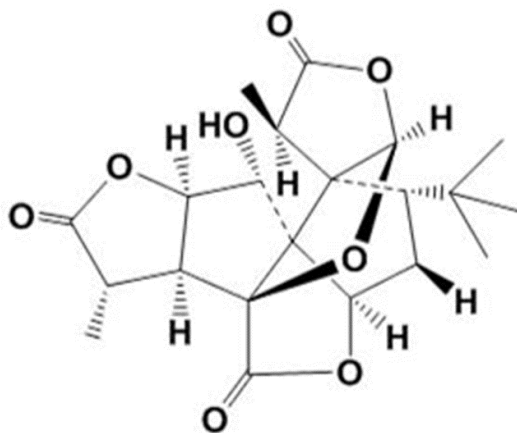


Рис. 1.3.4. Гінкголід В. Структурна формула.

Характерною особливістю гінкголідів є їх висока спорідненість до гетеромерних рецепторів. Чутливість до гінкголіду В $\alpha 2$ -гліцинового рецептора підвищується в 25 разів після інкорпорації β субодиниці (Kondratskaya et al., 2005). Із застосуванням методів мутагенезу, *patch-clamp* та молекулярного моделювання було продемонстровано, що найбільш вірогідним сайтом зв'язування гінкголідів із гліциновим рецептором є регіон 2'-6' ТМ2-домену (Kondratskaya et al., 2005; Hawthorne et al., 2006).

Пікротоксин. До групи алкалоїдів, що є блокаторами гліцинових рецепторів також належить пікротоксин. На противагу гінкголідам пікротоксин має вищу спорідненість до гомомерних гліцинових рецепторів, тоді як гетеромерні значно менш чутливі до його блокуючої дії (Pribilla et al., 1992). Однак, ключову роль у взаємодії пікротоксину із гліциновим рецептором так само відіграють амінокислотні залишки, що знаходяться у позиціях 2' та 6' пори (Zhorov and Bregestovski, 2000).

Як уже було зазначено вище, різні субодиниці гліцинового рецептора відрізняються за своєю локалізацією та функціями. Це створює умови для цільової терапії патологій, обумовлених дисфункцією певних субодиниць рецептора. Проте, фармакологія гліцинових рецепторів є досить обмеженою. Саме тому пошук нових, особливо субодиничноспецифічних, модуляторів гліцинових рецепторів є актуальним завданням.

1.4. Використання нейронів генерованих з ІПСК людини у дослідженнях патологій нервової системи

Індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (ІПСК) людини є результатом репрограмування соматичних клітин, вони характеризуються здатністю диференціюватися у клітини будь-якого з трьох зародкових шарів – ендодерми, ектодерми чи мезодерми (Takahashi and Yamanaka, 2006). Технологія генерації індукованих плюрипотентних стовбурових клітин відкриває нові можливості для вивчення різноманітних патологій людини на клітинному рівні. Особливий інтерес ці клітини представляють для дослідження нервової системи, оскільки матеріал, що дозволив би встановити індивідуальні характеристики патології того, чи іншого пацієнта, найчастіше, може бути отриманий лише *post mortem*. Таким чином, удосконалення методів генерації ІПСК та їх диференціювання у нейрони є багатообіцяючим напрямком дослідження патологій нервової системи людини, що швидко розвивається.

1.4.1. Методи отримання ІПСК з фібробластів людини та генерації нейронів

Ембріональні стовбурові (ЕС) клітини, отримані із бластоцист здатні необмежено ділитися, знаходячись при цьому у плюрипотентному стані, та диференціюватися у клітини будь-якого із трьох зародкових шарів (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). ЕС клітини людини можуть бути застосовані для лікування багатьох захворювань: хвороби Паркінсона, травм спинного мозку та діабету (Thomson et al., 1998), однак, питання етичності використання ембріонів людини обмежує застосування ЕС клітин у якості терапевтичного засобу. У 2006 році Takahashi та Yamanaka вперше продемонстрували можливість отримання плюрипотентних стовбурових клітин із соматичних (фібробластів) (Takahashi and Yamanaka 2006), за що останній отримав Нобелівську премію у 2012 році (Yamanaka, 2013).

Було відомо, що соматичні клітини можуть бути репрограмовані шляхом переміщення їх ядерного вмісту до ооцитів (Wilmut et al., 1998), або шляхом злиття з ембріональними стовбуровими клітинами (Cowan et al., 2005; Tada et

al., 2001). Отже, яйцеклітини та ЕС клітини у своїй цитоплазмі містять фактори, що здатні повернути соматичні клітини до стану плюрипотентності. Ці дослідження стали відправною точкою пошуку транскрипційних факторів, що відповідають за підтримку плюрипотентності стовбурових клітин і у випадку надекспресії можуть запустити перепрограмування соматичних клітин. Перш за все, Takahashi та Yamanaka звернули увагу на кілька генів, що, як раніше було показано, відповідають за збереження плюрипотентності ЕС клітин на ранніх стадіях розвитку ембріону, зокрема: Oct3/4, Sox2 та Nanog; та на гени рівень експресії яких зазвичай підвищений у ракових клітинах: Stat3, E-RAS, c-myc, Klf4 та β -катенін; окрім того ними було ідентифіковано кілька додаткових генів, що експресуються виключно у ЕСК (Takahashi та Yamanaka, 2006).

Транскрипційні фактори, що є ключовими для репрограмування соматичних клітин були ідентифіковані у серії елегантних експериментів проведених Takahashi and Yamanaka. У якості маркеру переходу диференційованих соматичних клітин до плюрипотентності було використано ген Fbx15, оскільки високий рівень його експресії є характерним для стовбурових клітин. Для цього у Fbx15 було вбудовано ген стійкості до неоміцину, експресія якого дозволяла клітинам виживати у середовищі, що містив антибіотик G418 (рис.1.4.1). Таким чином, за даних умов культивування нормальні фібробласти мали гинути, в той час як експресія гену Fbx15 (що означала перехід до плюрипотентності) забезпечувала виживання клітин і стимулювала їх проліферацію.

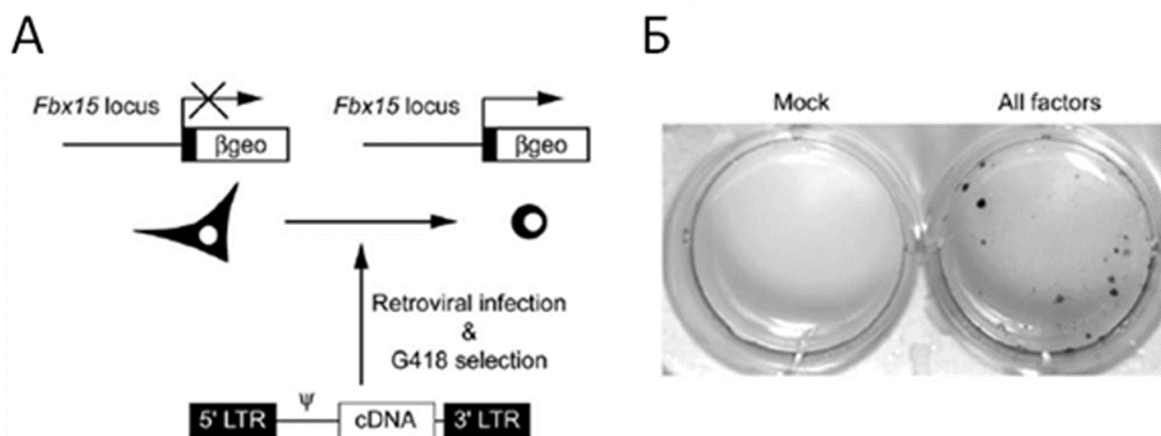


Рис. 1.4.1. А. Стратегія розроблена Takahashi and Yamanaka для тестування генів-кандидатів. **Б.** Колонії стовбурових клітин на 16 день після трансфекції 24-ма генами-кандидатами (модиф. з Takahashi and Yamanaka, 2006).

Трансфекція фібробластів миші усіма 24-ма генами кандидатами призвела до формування колоній, що містили проліферуючі клітини із плюрипотентними властивостями (рис.1.10). Після цього шляхом виключення було ідентифіковано найважливіші фактори, що є необхідними для перетворення фібробластів у ЕС-подібні клітини. Серед них: Oct3/4, Sox2, c-Мус та Klf4. ІПСК, що були отримані в результаті експресії чотирьох вище зазначених транскрипційних факторів, демонстрували підвищений рівень експресії ембріональних генів та здатність до формування тератом. Згодом, цією ж групою було доведено можливість використання фібробластів людини для генерації індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (Takahashi et al., 2007).

Вперше диференціація нейронів з ІПСК була здійснена Wernig et al. у 2008 році. Використаний ними багатоступеневий протокол було раніше успішно застосовано для отримання нейронів з ЕСК (Okabe et al., 1996). Даний протокол передбачає: (і) використання підложки клітин-годувальниць з ембріональних фібробластів – для розмноження ІПСК; (іі) подальше культивування у

середовищі, що містило фактор росту фібробластів (*FGF2*) - для формування нейрональних попередників; (iii) додавання факторів *sonic hedgehog* and *FGF8* – для остаточної диференціації β -III-тубулін-позитивних клітин із нейрональною морфологією.

Трансплантація соматичних клітин отриманих з ІПСК в майбутньому може бути використана для терапії багатьох захворювань: хвороби Паркінсона (Kriks et al., 2011), ушкоджень спинного мозку (Nori et al., 2011; Tsuji et al., 2010), макулярної дегенерації (Okamoto and Takahashi, 2011). Окрім того, клітини отримані від пацієнтів можуть бути використані для моделювання захворювань, вивчення молекулярних механізмів їх розвитку, скринінгу ліків та розробки індивідуальних стратегій лікування. Необхідно відмітити, що ІПСК дають змогу відтворювати фенотипи не лише моногенних захворювань (спричинених мутацією одного гена), але і багатофакторних: хвороби Паркінсона (Devine et al., 2011), хвороби Альцгеймера (Israel et al., 2012; Yagi et al., 2011) та шизофренії (Brennand et al., 2011).

1.4.2. Іонні канали, експресовані нейронами, що генеровані з ІПСК людини

Враховуючи досить незначний строк, протягом якого розвиваються технології, пов'язані із генерацією ІПСК, клітини, отримані в результаті їх диференціації, вимагають усебічного вивчення не лише у випадку мутацій, але і в контролі. Зокрема, при дослідженні нейронів, отриманих із ІПСК, особливе значення має встановлення властивостей іонних каналів, експресованих цими клітинами, оскільки вони є визначальними факторами нормального функціонування нейронів та нейрональних мереж. Окрім того, значна кількість патологій нервової системи спричинені дисфункцією іонних каналів.

Одним із найважливіших параметрів, що підтверджує приналежність індукованих нейронів до клітин нейронального типу, є їх здатність генерувати потенціали дії. В одній із перших робіт, що мали на меті охарактеризувати електрофізіологічні параметри даного типу нейронів було показано, що потенціали дії (ПД), генеровані індукованими нейронами у відповідь на імпульс

деполяризуючого струму, не відрізняються від ПД зареєстрованих від нейронів, диференційованих із ембріональних стовбурових клітин (Zeng et al., 2010) (рис.1.4.2). У обох типів клітин було відмічено наявність ТТХ-чутливих вхідних натрієвих струмів та ТЕА-, 4-АР- чутливих вихідних калієвих струмів.

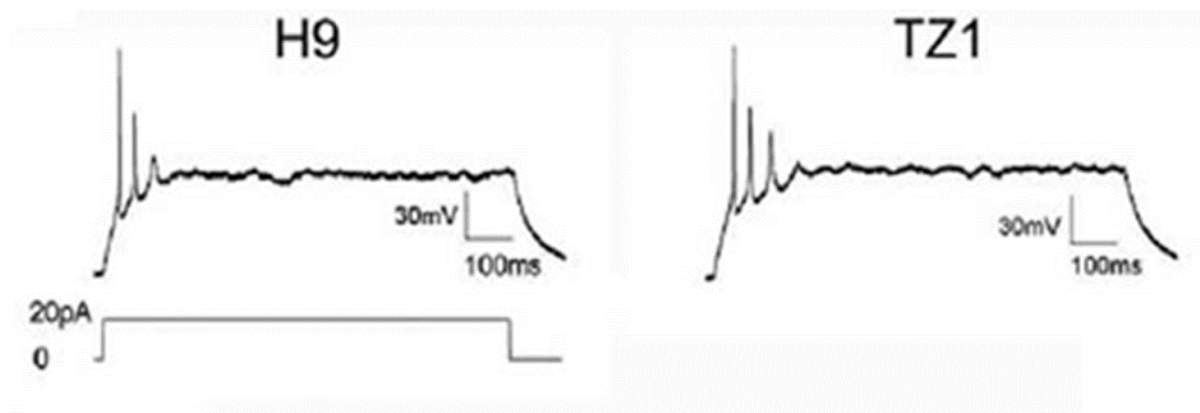


Рис. 1.4.2. Потенціали дії генеровані нейронами, отриманими з ембріональних стовбурових клітин (H9) та нейронами, отриманими з індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (TZ1) (модиф. з Zeng et al., 2010).

Дослідження проведене Haythornthwaite et al., 2012 продемонструвало, що індуковані нейрони мають натрієві, калієві та кальцієві потенціалкеровані канали. Активація Na^+ -ТТХ-чутливих каналів відбувалася при -40 мВ, максимальний струм спростерігався при -10 – -20 мВ, активація K^+ струмів чутливих до ТЕА та 4-АР відбувалася при -30 мВ. Окрім того, було зареєстровано струми, індуковані аплікацією ГАМК. В середньому амплітуда струмів викликаних аплікацією 30 мкмоль/л ГАМК становила 163 ± 26 пА ($n=63$) (Haythornthwaite et al., 2012).

Нещодавно було здійснено детальну характеристику АМПА- та НМДА-рецепторів, що експресуються ІПСК нейронами. З використанням методу реєстрації кальцієвих градієнтів автори показали наявність АМПА– індукованих струмів ($\text{ED}_{50}=0,9$ мкмоль/л), що блокувалися антагоністом АМПА-рецепторів GYKI-53784. ПЛР (полімеразноланцюгова реакція) аналіз продемонстрував

високий рівень експресії GluA1- та GluA2-субодиниць АМПА-рецептора та GluN1- та GluN2-субодиниць НМДА-рецептора. При аналізі потенціалкерованих кальцієвих каналів з використанням специфічних блокаторів та ПЛР аналізу було встановлено, що дані нейрони експресують Cav1.2, Cav2.2, Cav2.3 канали (Dage et al., 2014).

Таким чином, нейрони отримані із ПСК експресують на своїй поверхні потенціалкеровані та лігандкеровані іонотропні канали, що здатні генерувати іонні струми при їх активації. Нейрони, отримані з ПСК, мають основні характеристики клітин нейронального типу та представляють собою перспективну модель для вивчення особливостей функціонування ЦНС. Однак, іонні канали, притаманні даному типу клітин, охарактеризовані не в повній мірі та потребують подальшого дослідження.

1.4.3. Характеристика нейронів, отриманих із ПСК пацієнтів із патологіями ЦНС

Генерація нейронів з індукованих плюрипотентних стовбурових клітин стала проривом у вивченні захворювань ЦНС, оскільки, із використанням даної методики, ми можемо визначати функціональні параметри нервових клітин конкретних пацієнтів. Зокрема, було здійснено кілька досліджень нейрональних дисфункцій, спричинених порушеннями роботи іонних каналів.

Відомо, що основною причиною фебрильних судом та тяжкої міоклонічної епілепсії раннього дитячого віку (синдром Драве) є мутація гену *SCN1A*, що кодує $\alpha 1$ -субодиницю Nav1.1 потенціалзалежного натрієвого каналу (Claes et al., 2001). Для проведення електрофізіологічного дослідження було використано індуковані нейрони пацієнта із синдромом Драве та пацієнта із фебрильними судомами. Секвенування гену *SCN1A* показало, що пацієнт із синдромом Драве мав мутацію F1415I (у лінкерній ділянці, яка поєднує S3 та S4 домени рецептора), тоді як пацієнт із фебрильними судомами мав мутацію Q1923R даного гену (у ділянці C кінця рецептора). Побудова кривих I/V залежності натрієвих струмів контрольних нейронів та нейронів з мутаціями

натрієвих каналів F1415I та Q1923R продемонстрували підвищену збудливість нейронів, що експресували мутантні Na^+ потенціалкеровані канали. Зокрема, було відмічено підвищення амплітуди натрієвих струмів, затримку інактивації каналів та зсув потенціалу реверсії в сторону деполяризації (рис.1.4.3, Jiao et al., 2013).

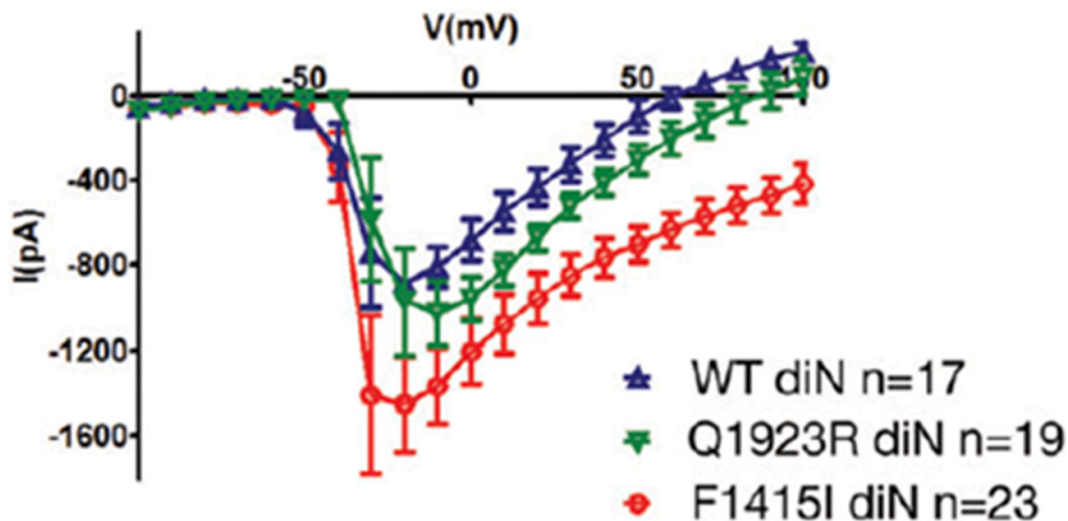


Рис. 1.4.3. Криві залежності амплітуди натрієвого струму від мембранного потенціалу для рецепторів Nav1.1 дикого типу та мутантних рецепторів Q1923R та F1415I (модиф. з Jiao et al., 2013).

Таким чином, нейрони отримані з ІПСК пацієнтів із синдромом Драве та фебрилярними судомками повністю відтворили фенотипи захворювань та відповідали на специфічне лікування. Завдяки даному дослідженню вдалося продемонструвати фізіологічні наслідки, спричинені мутаціями Q1923R та F1415I каналу Nav1.1 (Jiao et al., 2013).

Дослідження синдрому Тімоті стало іншою вдалою спробою використання ІПСК для встановлення молекулярних механізмів генетичної патології, що спричинює дисфункцію ЦНС. Синдром Тімоті – захворювання, що асоційоване із вадами розвитку нервової системи та аутизмом, спричинене мутацією кальцієвого потенціалкерованого каналу L-типу Cav1.2. З метою встановити наслідки даної мутації на клітинному рівні дослідниками було генеровано нейрони з ІПСК отриманих від пацієнта із синдромом Тімоті. Значення порогу,

амплітуди потенціалу дії та потенціалу спокою були однаковими для контрольних нейронів та нейронів отриманих від пацієнта. Основна відмінність між двома групами нейронів полягала у характерному для індукованих нейронів із синдромом Тімоті довготривалому підвищенні внутрішньоклітинної концентрації кальцію, що слідувало за деполяризацією клітин. Дане підвищення пригнічувалося аплікацією німодіпіну, що є блокатором кальцієвих каналів (рис.1.4.5).

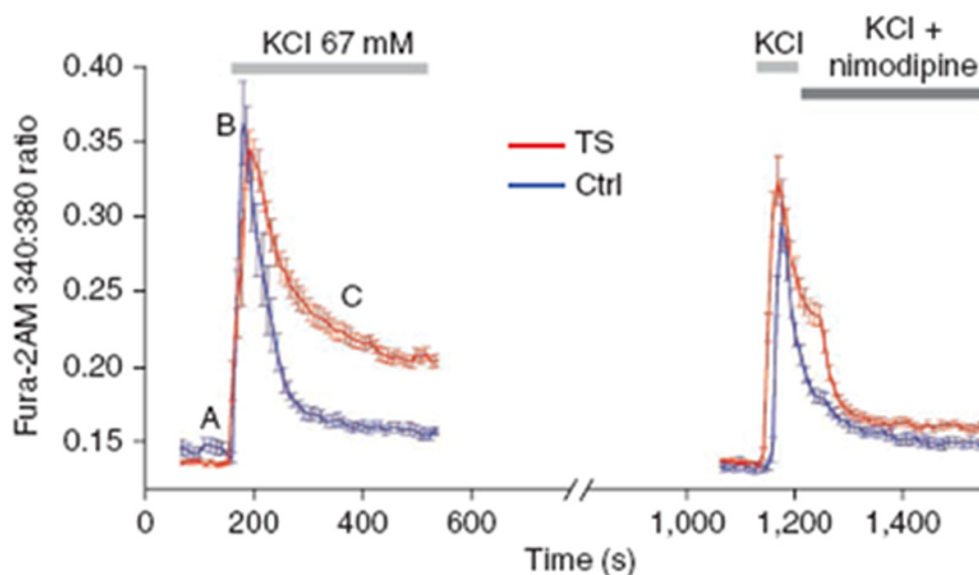


Рис. 1.4.5. Кальцієві транзєнти зарєєстровані від контрольних нейронів (Ctrl) та від нейронів пацієнта із синдромом Тімоті (TS); справа кальцієві транзєнти зарєєстровані від тих самих нейронів при аплікації блокатора кальцієвих каналів німодіпіну (модиф. з Pasca et al., 2011).

У якості одного із головних наслідків довготривалого підвищення внутрішньоклітинної концентрації кальцію дослідники виділили порушення нормальної експресії генів. При порівнянні із контрольними нейронами було виявлено, що у нейронах із синдромом Тімоті порушено експресію 211-ти генів (експресія 126 підвищена, експресія 85 знижена). 11 генів, регуляція яких була порушена, асоційовані з аутизмом та вадами інтелектуального розвитку. Гени іншої групи були пов'язані з кальційзалежною регуляцією транскрипційного

фактору CREB (*RSK/MSK*, *CAMKII*), або є прямими мішенями CREB: *EGR1*, *FOS*, *FOSB*, *GAD67*, *TH*. Варто також зазначити, що *TH* (тирозин гідроксилаза) є ключовим ферментом синтезу допаміну та норепінефрину. Отже, мутація асоційована із синдромом Тімоті призводить до дизрегуляції кальційзалежної експресії генів та порушень катехоламінергічної нейротрансмісії (Pasca et al., 2011).

Розробка методу генерації індукованих плюрипотентних стовбурових клітин людини із соматичних клітин стала революційним проривом у галузі фундаментальних біологічних досліджень та медицині. Генерація різних типів клітин з ИПСК дає змогу вивчати молекулярні механізми виникнення тих, чи інших захворювань, проводити скринінг фармакологічних препаратів та відкриває нові перспективи у царині трансплантології. Особливо актуальними ці дослідження є для вивчення нервової системи, що ускладнене неможливістю отримання прижиттєвого матеріалу та низьким рівнем регенерації.

Дана галузь розвивається лише протягом останніх 10 років, тому вимагає подальшої детальної розробки. Значна увага дослідників приділена пошуку нових можливостей для вдосконалення протоколу диференціації різних типів клітин з ИПСК, зокрема підвищення ефективності (% трансформованих клітин), зниження вартості процесу та його тривалості. Детального вивчення потребують іонні канали, що експресуються індукованими нейронами – встановлення їх фізіологічних та фармакологічних характеристик. Окрім того, на передній план виходить вивчення індукованих нейронів, отриманих від пацієнтів із захворюваннями ЦНС. Це дасть змогу детально охарактеризувати молекулярні механізми їх виникнення, а також розробити індивідуальні стратегії лікування.

Гліцинові рецептори є важливою складовою частиною системи швидкої нейротрансмісії, що забезпечують нормальне функціонування ЦНС. Порушення роботи гліцинергічної нейротрансмісії відіграє важливу роль у розвитку різних патологій ЦНС (гіперплексія, біль, ішемічне ураження мозку), проте на сьогоднішній день особливості їх функціонування за умов патологічних станів залишаються малодослідженими та потребують подальшого вивчення. Гліцинові

рецептори являють собою важливі мішені для розробки нових фармакологічних препаратів, що дозволять із високою ефективністю модулювати їх активність та впливати на перебіг патологічних процесів, до розвитку яких залучені гліцинові рецептори. Перспективним також є пошук нових систем дослідження гліцинових рецепторів. Зокрема, з огляду на розвиток методу генерації нейронів із індукованих плюрипотентних стовбурових клітин людини – революційної технології, що дозволить вивчати молекулярні особливості захворювань конкретних пацієнтів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Методика виділення та культивування органотипових зрізів гіпокампа

Метою нашого дослідження було встановлення зміни кількості гліцинових рецепторів, експресованих на поверхні нейронів гіпокампа, до та після киснево-глюкозної депривації. У якості експериментальної системи для проведення дослідження було обрано органотипові зрізи гіпокампа, що культивувалися за методикою розроблено Stoppini (Stoppini et al., 1991).

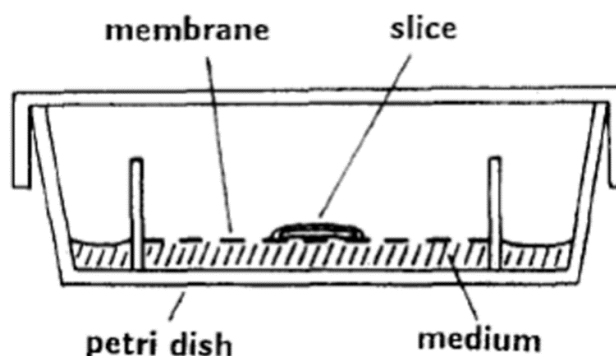


Рис. 2.1.1. Схема розміщення культивованого експланту на поверхні пористої мембрани у чашці Петрі (модиф. зі Stoppini et al., 1991).

Головна особливість цієї методики культивування полягає у тому, що експлант розміщується на проникній мембрані на межі між повітрям та рідким поживним середовищем (рис.2.1.1). Даний тип культивування дає змогу зберегти органотипову структуру гіпокампа та ультраструктурні характеристики його клітин (Stoppini et al., 1991).

Всі маніпуляції, пов'язані з отриманням тканинного матеріалу для культивування, а також процедури зміни середовища, проходили у стерильних умовах. Середовища виділення та культивування стерилізували, використовуючи фільтри *Millipore Steritop* (діаметр пор 0,22 мкм).

Гіпокампи виділяли з мозку щурів лінії *Wistar* віком 7 днів. Перед проведенням декапітації тварин анастезували ін'єкцією каліпсоу з ксилазином. Отримані гіпокампи нарізали на чопері (*McIlwain tissue chopper*, Англія), товщина кожного слайсу складала 325 мкм.

Для виділення гіпокампів використовували середовище наступного складу:

- 50% мінімального поживного середовища *MEM* (*Gibco*, США);
- 5 ммоль/л *Tris* (*Sigma*, США);
- 2 ммоль/л NaHCO_3 (*Gibco*, США);
- 12,5 ммоль/л *HEPES* (*Gibco*, США);
- 15 ммоль/л D-глюкози (*Sigma*, США);
- 100 од.д./мл пеніциліну (*Gibco*, США), 100 мг/мл стрептоміцину (*Gibco*, США);
- 25 % 10-кратного сольового розчину *HBSS* (*Gibco*, США) розбавленого у співвідношенні 1 до 10 у деіонізованій воді;
- 25% деіонізованої води.

pH середовища – 7,3

Ретельний морфологічний контроль отриманих зрізів проводився із використанням світлового мікроскопу (*Zeiss Telaval 31*). Для подальшого культивування відбиралися лише ті, що не мали ознак механічного ушкодження. Культивування проводили у 6-ти лункових планшетах, на поверхні пористих мембран, що забезпечували одночасно постачання зрізів гіпокампа поживними речовинами, розчиненими у середовищі для культивування, та вільний доступ повітря. Умови культивування: концентрація CO_2 – 5%, температура – 37°C.

Середовище для культивування мало наступний склад:

- 50% мінімального поживного середовища (*MEM*);
- 2,5 ммоль/л *Tris*;
- 2 ммоль/л NaHCO_3 ;
- 12,5 ммоль/л *HEPES*;
- 15 ммоль/л D-глюкози;

- 100 од.д/мл пеніциліну; 100 мг/мг стрептоміцину;
- 25% кінської сироватки;
- 25% сольового розчину *HBSS*.

pH середовища 7,2

Поживне середовище змінювали через 24 год після виділення зрізів та надалі двічі на тиждень. Експерименти з киснево-глюкозної депривації проводили на 12-14 день після початку культивування.

2.2. Методика проведення киснево-глюкозної депривації

Киснево-глюкозна депривація (КГД) передбачає перенесення культивованих зрізів гіпокампа у середовище збіднене на кисень та глюкозу, з метою викликати в нейронах специфічні зміни клітинного метаболізму.

Для проведення киснево-глюкозної депривації середовище для культивування замінювалось на розчин *ACSF*, що мав наступний склад: NaCl 124 ммоль/л; KCl 1,6 ммоль/л; NaHCO₃ 24 ммоль/л; KH₂PO₄ 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 замінене газовою сумішшю (95%NO₂/5%CO₂). У безкиснево/безглюкозному середовищі їх витримували протягом 30 хв, після чого повертали до нормальних умов культивування на 1 або 4 год (нормоксична реоксигенація).

2.3. Методика імуногістохімічного виявлення гліцинових рецепторів на нейронах та астроцитах культивованих зрізів гіпокампа

Встановлення кількості гліцинових рецепторів, експресованих на поверхні пірамідних нейронів та астроцитів гіпокампа, в контролі та через 1 та 4 год після КГД здійснювалося із використанням методу імуногістохімічного забарвлення нервової тканини. Для виявлення гліцинових рецепторів було використано моноклональні антитіла *mouse anti-GlyR*; для візуалізації ядер пірамідних нейронів гіпокампа – *chicken anti-NeuN*; для забарвлення астроцитів – *chicken anti-GFAP*.

Протокол імуногістохімічного забарвлення передбачав наступні етапи:

1. Зрізи гіпокампа фіксувалися розчином формальдегіду (4%) протягом 12-16 год.
2. Після цього їх двічі відмивали від фіксатора розчином *PBS* (0,01 моль/л).
3. Для покращення проникнення антитіл у досліджувану тканину зразки проходили процедуру заморожування/відтаювання (-20°C /кімнатна температура) у розчині кріопротектору (20% ДМСО + 2% гліцерину).
4. Після відтаювання їх відмивали розчином *PBS* (0,01 моль/л).
5. З метою запобігти неспецифічному зв'язуванню антитіл перед проведенням імуногістохімічного забарвлення зрізи протягом 1 год обробляли блокуючим розчином наступного складу: *PBS* із додаванням козиної сироватки (1:100), *BSA* (1%) та *Triton* (0,1%).
6. Нанесення первинних антитіл, розведених у блокуючому розчині.

Первинні антитіла використані у даному дослідженні:

Anti-GlyR (1:500);

Anti-NeuN clone A60 (1:500);

Anti-GFAP (1:500).

7. Після інкубації з первинними антитілами протягом 24 год зрізи відмивалися розчином *PBS* (0,1 моль/л).
8. Нанесення вторинних антитіл, розведених у розчині *BSA* (1%).

Вторинні антитіла, використані у даному дослідженні:

Alexa 555 Donkey anti-mouse антитіла (1:800);

Alexa 488 Donkey anti-chicken антитіла (1:800).

Вторинні антитіла, використані у даному дослідженні були кон'юговані з флуоресцентними мітками, візуалізація яких можлива лише при опроміненні світлом певної довжини хвилі (555 та 488 нм відповідно).

9. Після інкубації із вторинними антитілами протягом 1,5 год зрізи відмивалися розчином *PBS*.

10. Дослідження отриманих зрізів гіпокампа проводилось із застосуванням конфокального мікроскопу *FluoView FV1000 (Olympus Inc., США)* через кілька днів після імуногістохімічного забарвлення.

Кількість гліцинових рецепторів (в умовних одиницях) визначалася як відношення площі червоної флуоресценції (гліцинові рецептори) до площі поля зору; $n=10$. Статистичну обробку результатів проводили із застосуванням t -критерію Ст'юдента, відмінність між групами вважали статистично достовірною при $p<0,05$.

2.4. Методика встановлення зміни активності мітохондрій після КГД

Оцінка стану мітохондрій нейронів гіпокампа після КГД була здійснена із використанням *MitoTracker Orange (Life technologies, США)*. Даний барвник дифундує через плазматичну мембрану активних мітохондрій та акумулюється в них за рахунок формування тіольних кон'югатів з мітохондріальними білками. Після того як барвник проникає в мітохондрії клітини можуть фіксуватися альдегідними фіксаторами, що полегшує подальшу роботу з тканиною та її аналіз.

Для забарвлення зрізів гіпокампа *Mitotracker Orange* використовували наступний протокол:

1. відмивали зрізи середовищем без сироватки;
2. інкубували їх із барвником *Mitotracker Orange* (кінцева концентрація 50 нмоль/л, 30 хв. при температурі 37°C);
3. відмивали в *PBS* – 2 рази по 5 хв;
4. фіксували зрізи у розчині параформальдегіду (4%) протягом 30 хв;
5. відмивали в *PBS* – 2 рази по 15 хв;

Отримані зрізи досліджували із використанням конфокального мікроскопу *FluoView FV1000 (Olympus Inc., США)*.

Активність мітохондрій (в умовних одиницях) визначалася як відношення площі червоної флуоресценції (*MitoTrackerOrange*) до площі поля зору; $n=12$.

Статистичну обробку результатів проводили із застосуванням t -критерію

Ст'юдента, відмінність між групами вважали статистично достовірною при $p < 0,05$.

2.5. Культивування *CHO-K1* клітин та підготування клітин до трансфекції

Дослідження дії гінкголевої та ніфлумової кислот на гліцинові та ГАМК_A рецептори проводилося із застосуванням гетерологічної системи експресії – клітин лінії *CHO-K1* (*Chinese hamster ovary cells*), що культивувалися в стандартних, для клітин ссавців, умовах – 37°C, 5% CO₂.

Середовище для культивування *CHO-K1* клітин мало наступний склад:

- *Hamm's F12* (комерційне середовище для культивування, *Life Technologies*, США)
- *FBS* (10%) (*Life Technologies*, США)
- пеніцилін/стрептоміцин (0,1%) (*Life Technologies*, США)
- L-глутамін (0,1%) (*Life Technologies*, США)

Клітини лінії *CHO-K1* належать до адгезивного типу, їх вирощували у плоских флаконах для культивування (*Corning*, США) або, безпосередньо перед проведенням електрофізіологічного дослідження, на покривних скельцях (діаметр 12 мм), розміщених у чашках Петрі (35мм). Клітини пересаджували при досягненні 70% конфлюентності.

Розчини необхідні для проведення пересадки клітин:

- середовище для культивування *CHO-K1* клітин;
- *PBS*;
- трипсин (0,25%) з *EDTA* (для забезпечення хелатування двохвалентних катіонів).

Для пересадки клітин на покривні скельця застосовували наступний протокол:

1. шар культивованих клітин промивали *PBS* для звільнення їх поверхні від катіонів Ca²⁺ та Mg²⁺, що можуть блокувати дію трипсину;

2. наносили на клітини розчин трипсину (0,25%) з *EDTA* та залишали в інкубаторі на 1 хвилину;
3. після цього легким постукуванням стимулювали від'єднання клітин від поверхні флакону та додавали розчин для культивування, що блокував трипсин;
4. ресуспендували клітини шляхом титрування з допомогою піпетки;
5. переносили необхідну кількість клітин на покривні скельця із додаванням середовища для культивування.

2.6. Трансфекція клітин кДНК рецепторів

Клітини лінії *CHO-K1* не містять ендогенних лігандкерованих іонних каналів. Завдяки цьому, застосовуючи метод трансфекції кДНК, ми можемо отримати клітини, що експресують рецептори визначеної субодиничної композиції.

Трансфекція проводилася із використанням *Lipofectamine 2000* (*Life Technologies*, США) за протоколом, що був рекомендований виробником.

Розчини необхідні для проведення трансфекції:

- *Lipofectamine 2000*;
- середовище *Opti-MEM* (*Gibco*, США);
- кДНК досліджуваного рецептора;
- поживне середовище із додаванням 1мкмоль/л стрихніну.

Протокол трансфекції передбачає проведення наступних маніпуляцій (рис.2.6.1):

1. розчинити 7 мкл *Lipofectamine 2000* у 125 мкл середовища *Opti-MEM*;
2. розчинити 0,5-2 мкг/мкл кДНК у 125 мкл середовища *Opti-MEM*;
3. змішати два розчини (1:1);
4. інкубувати протягом 5 хвилин за кімнатної температури;
5. нанести отриману суміш на клітини, що були висіяні на покривні скельця;

6. через три години розчин замінити на поживне середовище, що містить, у випадку гліцинового рецептора, 1мкмоль/л стрихніну (для попередження спонтанної активації рецептора).

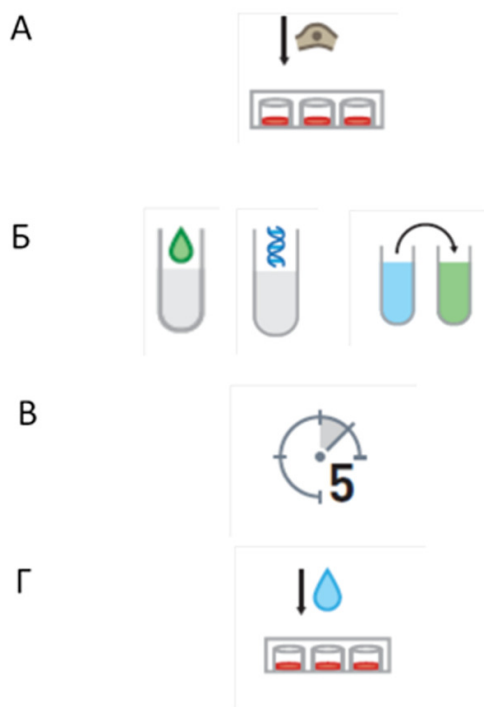


Рис. 2.6.1. Схема трансфекції *CHO-K1* клітин кДНК рецептора. А. Перенесення *CHO-K1* клітин на покривні скельця. Б. Приготування розчинів кДНК та *Lipofectamine 2000*. В. Інкубування. Г. Нанесення трансфекційної суміші на клітини.

В даному дослідженні *CHO-K1* клітини трансфекували кДНК кількох субодиниць гліцинового рецептора: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, β , а також мутантних $\alpha 1$ G254A та $\alpha 2$ T59A/A261G/A303S. Для експресії функціональних ГАМК_A рецепторів клітини трансфекували комбінацією субодиниць: $\alpha 1$ -GFP, $\beta 2$ та $\gamma 2$.

Для візуалізації клітин, що експресують рецептори до трансфекційної суміші додавали кДНК зеленого флуоресціюючого білка (*GFP*), що значно спрощувало процес відбору трансфєкованих клітин для електрофізіологічного дослідження (рис.2.6.2). У випадку ГАМК_A рецептора *GFP* є частиною конструкту $\alpha 1$ -субодиниці.

GFP складається з 238 амінокислот, поглинає синє світло (max 395nm) та випромінює зелене світло (max 509 nm). Флуоресценція *GFP* є стабільною, даний білок успішно синтезується з кДНК різними типами клітин (*Escherichia coli*, *Caenorhabditis elegans*, широким спектром клітин ссавців).

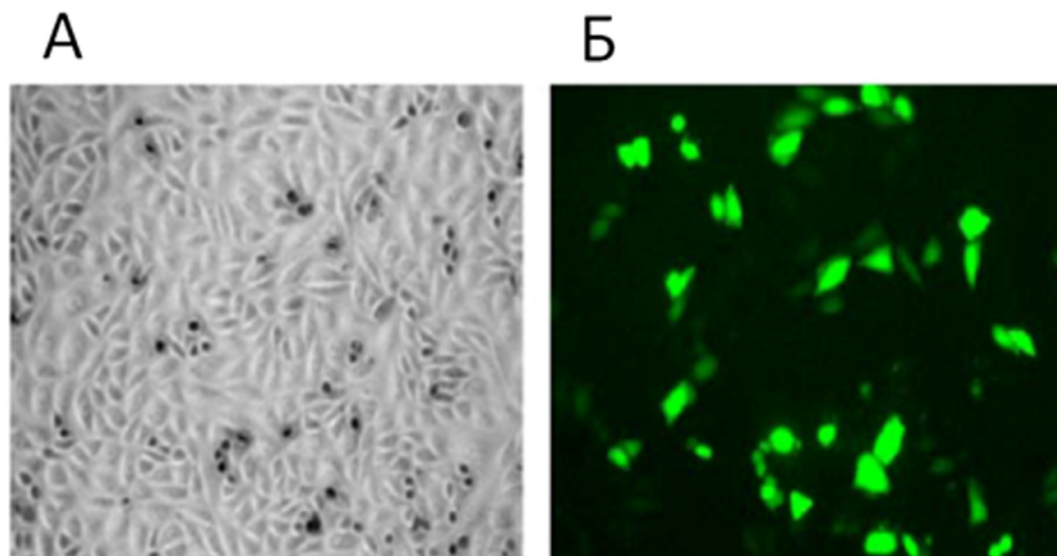


Рис. 2.6.2. Трансфеговані клітини у звичайному світлі (А) та при освітленні ртутієвою лампою (Nikon) (Б). Зеленим світяться клітини трансфеговані кДНК рецептора та зеленого флуоресціюючого білка (*GFP*).

Електрофізіологічні експерименти проводились через 24-72 години після початку трансфекції. Цей час є оптимальним для досягнення достатнього рівня експресії функціональних гліцинових та ГАМК_A рецепторів.

2.7. Електрофізіологічне дослідження дії гінкголевої кислоти на гліцинові та ГАМК_A рецептори

Для дослідження дії гінкголевої кислоти на гліцинові рецептори *CHO-K1* клітини трансфеговалися кДНК $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 2$ T59A/A261G/A303S та β субодиниць рецептора. Для дослідження впливу гінкголевої кислоти на ГАМК_A рецептори клітини трансфеговали комбінацією субодиниць: $\alpha 1$ -*GFP*/ $\beta 2/\gamma 2$. Флуоресцентні клітини відбиралися для проведення *patch-clamp* експериментів у конфігурації «ціла клітина» із фіксацією потенціалу (рис.2.7.1).

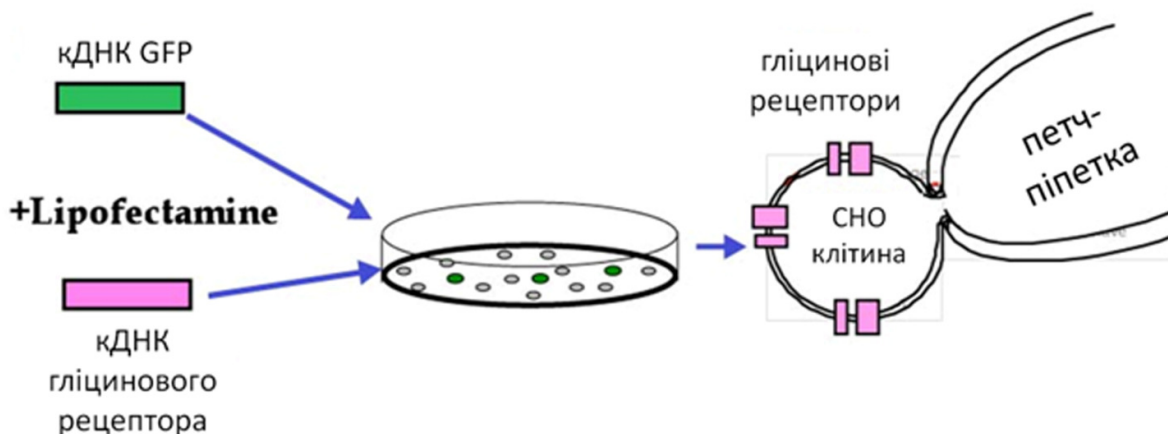


Рис. 2.7.1. Схема проведення *patch-clamp* експерименту. Зелені флуоресцентні *CHO*-клітини, ко-трансфековані кДНК *GFP* та гліцинового рецептора, відбиралися для проведення *patch-clamp* реєстрацій у конфігурації «ціла клітина».

Електрофізіологічні реєстрації здійснювалися за кімнатної температури (20-25°C) із використанням підсилювача EPC9 (*HEKA Electronic*, Германія). Під час експерименту клітини знаходились у зовнішньоклітинному розчині, що містив (ммоль/л): NaCl 140, CaCl₂ 2, KCl 2.8, MgCl₂ 4, HEPES 20, глюкоза 10; pH 7.4; 320-330 мосм/л.

У якості внутрішньоклітинного було використано два розчини різної композиції. 'CsCl розчин' містив (ммоль/л): CsCl 140, CaCl₂ 6, MgCl₂ 2, MgATP 2, NaGTP 0.4, HEPES/CsOH 10, ВАРТА/КОН 20; pH 7.3; 290 мосм/л. При використанні даного внутрішньоклітинного розчину фіксований потенціал становив -30 мВ. 'Калій глюконатний розчин' містив (ммоль/л): глюконат калію 120, KCl 20, CaCl₂ 6, MgCl₂ 2, HEPES 10, ВАРТА/КОН 2; pH 7.3; 290 мосм/л. Фіксований мембранний потенціал становив 0 мВ.

Піпетки для реєстрацій були виготовлені із боросилікатних скляних капілярів (*Harvard Apparatus Ltd*, США), їх опір складав 5-10 МОм.

Для зміни розчинів було використано систему швидкої аплікації (*SF 77A Perfusion Fast-Step*, Warner, США), що розміщувалася на відстані 40-50 мкм від

досліджуваної клітини. Дана система дозволяє зміну 10-90% розчину протягом 3-5 мс.

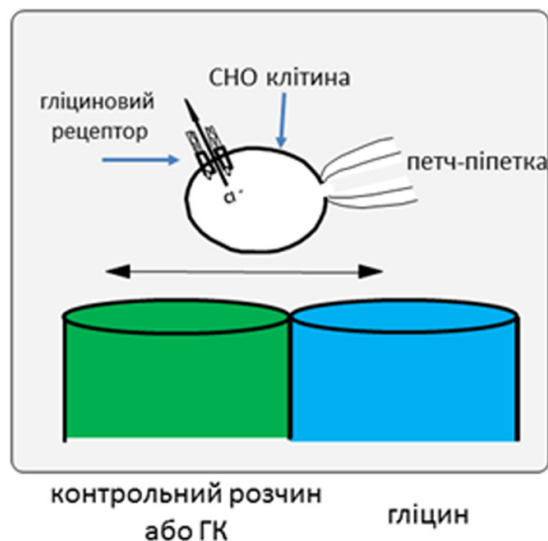


Рис. 2.7.2. Схема проведення електрофізіологічних реєстрацій гліциніндукованих струмів використана при дослідженні взаємодії гліцинового рецептора із гінкголевою кислотою.

На рис.2.7.2 зображено схему експерименту по дослідженню впливу гінкголевої кислоти на гліцинові рецептори. Перша реєстрація гліцин-індукованого струму проводилась в присутності контрольного розчину (тривалість аплікацій гліцину становила 2 с) після кількох реєстрацій (з метою досягнення постійної амплітуди реєстрованого струму) контрольний розчин замінювався на розчин, що містив гінкголеву кислоту. Тривалість аплікації гінкголевої кислоти варіювала від 20 с до 6 хв, при цьому через кожні 0,5-1 хв здійснювали реєстрацію гліциніндукованих струмів.

Всі електрофізіологічні результати було проаналізовано із використанням програми *PatchMaster* (НЕКА Elektronik, Германія). Для побудови кривих залежності амплітуди струму від концентрації агоніста було застосовано алгоритм рівняння Хіла (із використанням програми *Origin 7.5* (OriginLabs, США):

$$I = I_{max} / (1 + (ED_{50}/[A])^{nH}),$$

де I – струм індукований концентрацією агоніста A , I_{max} - максимальна амплітуда струму, nH – коефіцієнт Хілла, а ED_{50} – концентрація при якій спостерігається півмаксимальна амплітуда струму.

Гінкголева кислота (*Sigma-Aldrich*) була розведена у ДМСО до концентрації 100 мкмоль/л (базовий розчин); для проведення експериментів базовий розчин розводили у зовнішньоклітинному до бажаної концентрації.

Парний та непарний *t-test* були використані для статистичного аналізу.

2.8. Електрофізіологічне дослідження дії ніфлумової кислоти на гліцинові рецептори різної субодиничної композиції

Експерименти проводились на лінії клітин *CHO-K1* трансфєкованих різними субодиницями гліцинового рецептора ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 1G254A$) за методикою трансфєкції *Lipofectamine 2000*, що описана вище.

Під час *patch-clamp* реєстрацій клітини знаходились у зовнішньоклітинному розчині, що містив (ммоль/л): NaCl 140, CaCl₂ 2, KCl 2.8, MgCl₂ 4, HEPES 20, глюкоза 10; pH 7.4; 320-330 мосм/л. Внутрішньоклітинний розчин містив (ммоль/л): CsCl 140, CaCl₂ 6, MgCl₂ 2, MgATP 2, NaGTP 0.4, HEPES/CsOH 10, ВАРТА (калієва сіль) 2; pH 7.3; 290 мосм/л.

Електрофізіологічні реєстрації проводилися за двома типами протоколів: (і) «довгий протокол» (рис.2.8.1, Б) – під час реєстрації розчин, що аплікувався на досліджувану клітину змінювався кілька разів: гліцин (2с)/суміш гліцину з ніфлумовою кислотою (5с)/гліцин (2с). При цьому фіксований потенціал мембрани залишався незмінним (-30 або +30мВ); (іі) «ремп протокол» (рис. 2.8.1, В) - під час реєстрації струми були індуковані або аплікацією гліцину, або сумішшю гліцину із ніфлумовою кислотою, при цьому фіксований потенціал мембрани змінювали від -80 до +80мВ протягом 1 с.

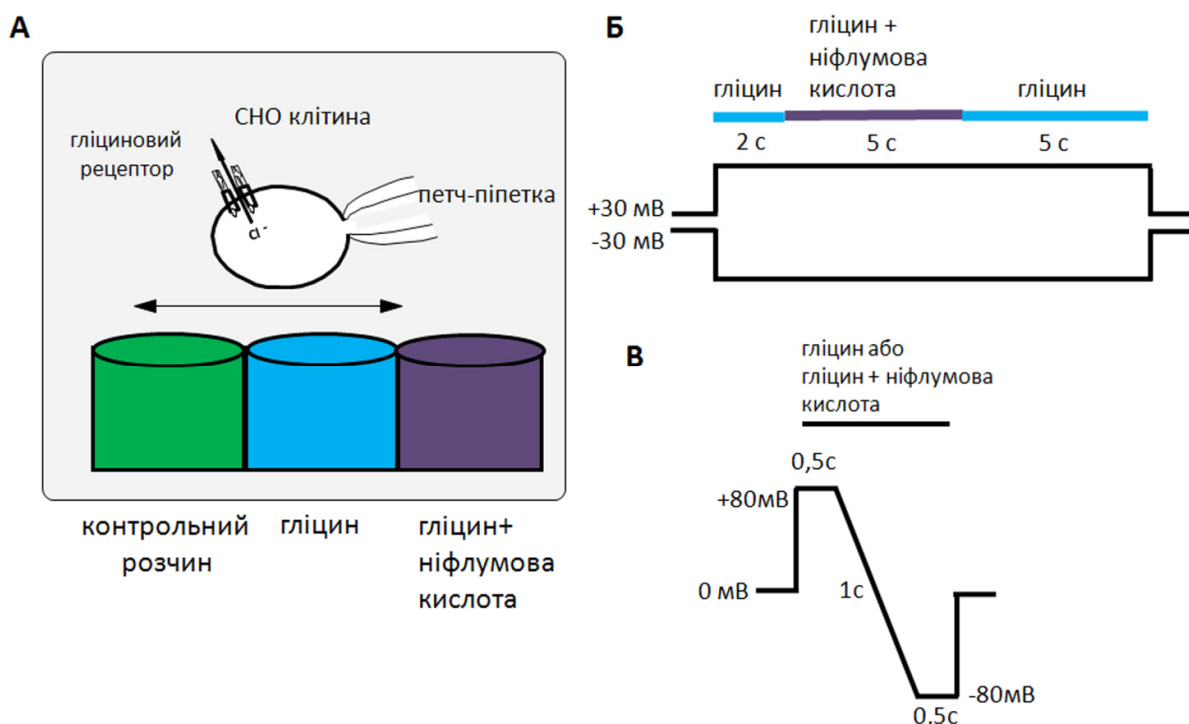


Рис. 2.8.1. А. Схема експерименту при *patch-clamp* дослідження дії ніфлумової кислоти на струми опосередковані гліциновими рецепторами. Б. «Довгий протокол» - схема аплікації розчинів та фіксації потенціалу. В. «Ремп-протокол» - схема аплікації розчинів та фіксації потенціалу.

Для побудови кривих залежності амплітуди струму від концентрації аплікованого інгібітора було застосовано алгоритм рівняння Хіла (із використанням програми *Origin 7.5* (*OriginLabs*, США):

$$I = I_{max} / (1 + (IC_{50}/[A])^{nH}),$$

де I – амплітуда струму при аплікації концентрації інгібітора A , I_{max} – максимальна амплітуда струму, nH – коефіцієнт Хілла, а IC_{50} – концентрація інгібітора при якій спостерігається півмаксимальне пригнічення амплітуди струму.

Ніфлумова кислота (*Tocris*, США) була розведена у ДМСО до концентрації 100 ммоль/л (стоковий розчин), пікротоксин (*Sigma-Aldrich*, США) – у ДМСО до концентрації 50 ммоль/л. Остаточі концентрації були отримані розведенням у зовнішньоклітинному розчині.

Парний та непарний *t-test* були використані для статистичного аналізу.

2.9. Електрофізіологічне дослідження нейронів генерованих з ІПСК людини

З метою характеристики іонних каналів, що експресувалися на поверхні нейронів генерованих із індукованих плюрипотентних стовбурових клітин, нами було проведено електрофізіологічне дослідження даних клітин. Для цього клітини пересаджували на покривні скельця вкриті ламініном (діаметр 14 мм), розміщені всередині чашок для культивування діаметром 35 мм, із додаванням 2 мл поживного середовища. Для *patch-clamp* аналізу було використано клітини, що культивувалися протягом 7-35 днів з моменту індукції диференціації.

Під час експерименту клітини знаходились у зовнішньоклітинному розчині, що містив (ммоль/л): NaCl 140; CaCl₂ 2; KCl 2.8; MgCl₂ 1; HEPES 20; глюкоза 10; pH 7.4; 320-330 мосм/л. Розчин, що ним були заповнені піпетки для *patch-clamp* реєстрацій мав наступну композицію (ммоль/л): глюконат калію 120; KCl 20; MgCl₂ 2; MgATP 2; NaGTP 0.4; HEPES/CsOH 10; BAPTA/КОН 5; pH 7.3; 285-290 мосм/л.

Реєстрація струмів, опосередкованих ліганкерованими іонними каналами, здійснювалася при аплікації різних концентрацій специфічних агоністів даних рецепторів (гліцину, ГАМК, ацетилхоліну). Методика зміни розчинів та побудови кривих концентраційної залежності детально описана у попередньому розділі.

Для індукції струмів, опосередкованих потенціалкерованими іонними каналами було використано протокол фіксації потенціалів, що зображений на рис.2.9.1. Після отримання конфігурації «ціла клітина» мембранний потенціал фіксувався на рівні -70 мВ. Реєстрація вхідного натрієвого та вихідного калієвого струмів здійснювалась під час покрокової (10 мВ) деполяризації мембрани від -80 до +30 мВ. Для активації натрієвих каналів використовували негативний преімпульс амплітудою -120 мВ.

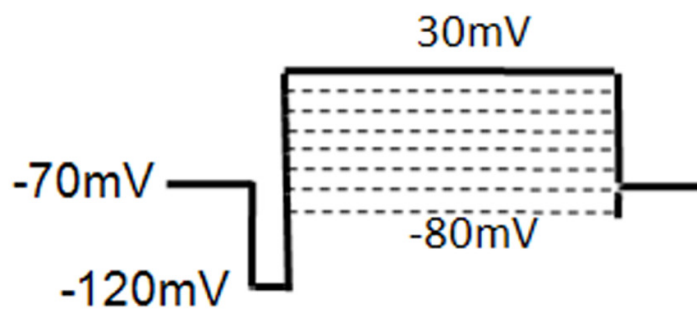


Рис. 2.9.1. Схема протоколу фіксації мембранних потенціалів, застосована для активації потенціалкерованих натрієвих та калієвих каналів.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Динаміка зміни кількості гліцинових рецепторів, експресованих на поверхні пірамідних нейронів та астроцитів гіпокампа, під впливом КГД

Ішемія мозку спричинює комплексні зміни функціонування нейронів. Зокрема, спостерігаються порушення енергетичного метаболізму, зміни в активності та ступені експресії іонних каналів (Montori et al., 2012; Hota et al., 2008) та виділенні нейромедіаторів із пресинаптичного закінчення (Lipton, 1999). Дослідження присвячені ролі гліцину у розвитку наслідків ішемічного ураження показали, що гліцин може мати як позитивний, так і негативний вплив на стан нервової тканини (Newell et al., 1995; Tanabe et al., 2010). Він здатен взаємодіяти із двома типами рецепторів – є коагоністом НМДА та агоністом гліцинових рецепторів, активація яких діє протилежним чином на функціонування нейрональних мереж. Отже, здатність гліцинергічної системи виконувати свої функції може відігравати ключову роль для визначення напрямку дії гліцину. Однак, питанню зміни кількості гліцинових рецепторів, експресованих на поверхні нейрональних клітин, під впливом киснево-глюкозної депривації (КГД), не було приділено достатньо уваги.

Наше дослідження було сфокусоване на гліцинових рецепторах, що локалізовані на пірамідних нейронах та астроцитах CA1 зони гіпокампа. Раніше було показано, що, у гіпокампі, гліцинові рецептори, розміщені екстарсинаптично – на тілах нейронів (Mori et al., 2002). Функція, яку вони при цьому виконують, до кінця не з'ясована. Імовірно, перебуваючи у стані тонічної активації, під дією агоністів, розчинених у міжклітинному середовищі, гліцинові рецептори забезпечують підтримання негативного потенціалу на внутрішній стороні цитоплазматичної мембрани.

3.1.1. Локалізація гліцинових рецепторів на пірамідних нейронах та астроцитах CA1 зони гіпокампа в контролі

Нашим завданням було встановити, чи впливає КГД на кількість гліцинових рецепторів розташованих на поверхні пірамідних нейронів та астроцитів CA1 зони гіпокампа.

Імуногістохімічне виявлення гліцинових рецепторів та їх кількісна оцінка проводилися на культивованих органотипових зрізах гіпокампа з використанням первинних антитіл *NeuN* (специфічний маркер ядер нейронів), *anti-GFAP* (маркер астроцитів) та *anti-GlyR* (маркер гліцинових рецепторів).

У контролі ми спостерігали переважну *GlyR*-позитивність пірамідних нейронів, ядра яких були забарвлені *NeuN* (рис. 3.1.1). Гліцинові рецептори були локалізовані навколо ядер нейронів, що узгоджується із результатами попередніх досліджень (Brackmann et al., 2004; Mori et al., 2002).

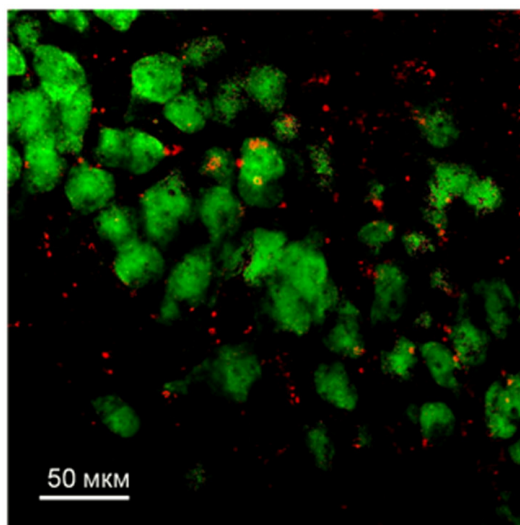


Рис. 3.1.1. Імуногістохімічне забарвлення ядер нейронів CA1 зони гіпокампа (зелений колір) та гліцинових рецепторів (червоний колір) в контролі.

Для встановлення присутності гліцинових рецепторів на поверхні астроцитів гіпокампа нами було проведене подвійне *anti-GFAP/anti-GlyR* імуногістохімічне забарвлення культивованих зрізів гіпокампа. Мікроскопічний аналіз отриманих препаратів показав, що гліцинові рецептори локалізовані як на тілах, так і на відростках астроцитів (рис. 3.1.2).

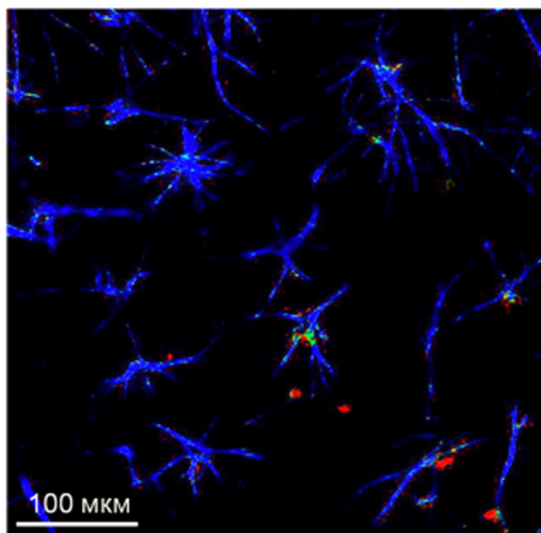


Рис. 3.1.2. Імуногістохімічне забарвлення гліцинових рецепторів (червоний колір) та астроцитів гіпокампа (синій). У випадку колокалізації із астроцитами імунофлуоресценція гліцинових рецепторів має зелений колір. Зображення представлене у псевдокольорах.

3.1.2. Зміна кількості гліцинових рецепторів, локалізованих на нейронах СА1 зони гіпокампа, за умов КГД

Оцінка зміни кількості гліцинових рецепторів, експресованих на поверхні пірамідних нейронів та астроцитів СА1 зони гіпокампа, під впливом КГД проводилася через 1 та 4 години після відновлення надходження кисню та глюкози до тканини. Раніше було показано, що дані часові проміжки є ключовими з огляду на розвиток морфологічних та функціональних змін нервової тканини, спричинених КГД (Lushnikova et al., 2004).

Нами було встановлено, що під дією КГД кількість гліцинових рецепторів, експресованих на поверхні пірамідних нейронів СА1 зони гіпокампа зменшується (рис. 3.1.3). У контролі відносна площа флуоресценції гліцинових рецепторів складала $0,4 \pm 0,04$ у.о. ($n=10$), через одну годину після початку реоксигенації цей показник знизився до $0,28 \pm 0,025$ у.о. ($n=10$, $p<0,05$). Імовірно, це свідчить про інтерналізацію гліцинових рецепторів, спричинену каскадом внутрішньоклітинних реакцій фосфорилування, запущених киснево-глюкозною депривацією.

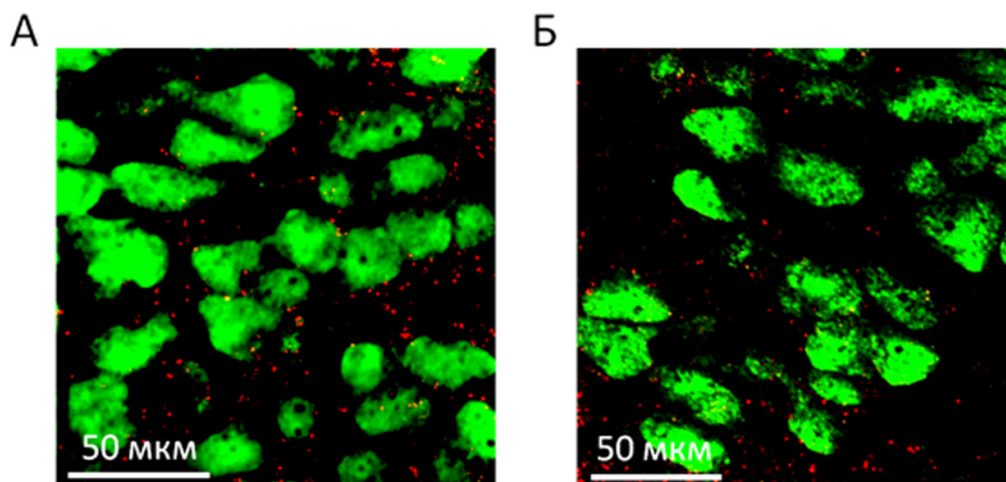


Рис. 3.1.3. *NeuN*-позитивні клітини (зелений колір) та гліцинові рецептори (червоний колір) у СА1 зоні гіпокампа в контролі (А) та через 4 години після КГД (Б).

Через чотири години після реоксигенації було зафіксовано поглиблення цього процесу – ми спостерігали подальше зниження відносної площі *GlyR*-позитивного забарвлення, її значення складо $0,24 \pm 0,01$ у.о. ($n=10$, рис. 3.1.4). Це свідчить про розвиток ефектів спричинених КГД із часом та, ймовірно, про продовження інтерналізації гліцинових рецепторів.

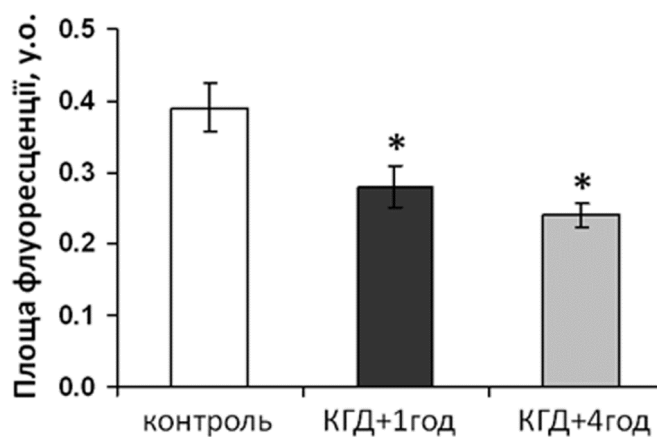


Рис. 3.1.4. Відносна площа ГР-позитивного забарвлення пірамідних нейронів СА1 зони гіпокампа в контролі (білий стовпчик), через 1 (чорний) та 4 (сірий) години після КГД (* $p < 0,05$).

3.1.3. Зміна кількості гліцинових рецепторів, локалізованих на астроцитах CA1 зони гіпокампа за умов КГД

Імуноістохімічне забарвлення показало, що астроцити були значно менш сприйнятливими до впливу КГД – кількість гліцинових рецепторів, присутніх на поверхні астроцитів, практично не змінилася як через 1, так і через 4 години після реоксигенації ($p > 0,05$, рис. 3.1.5).

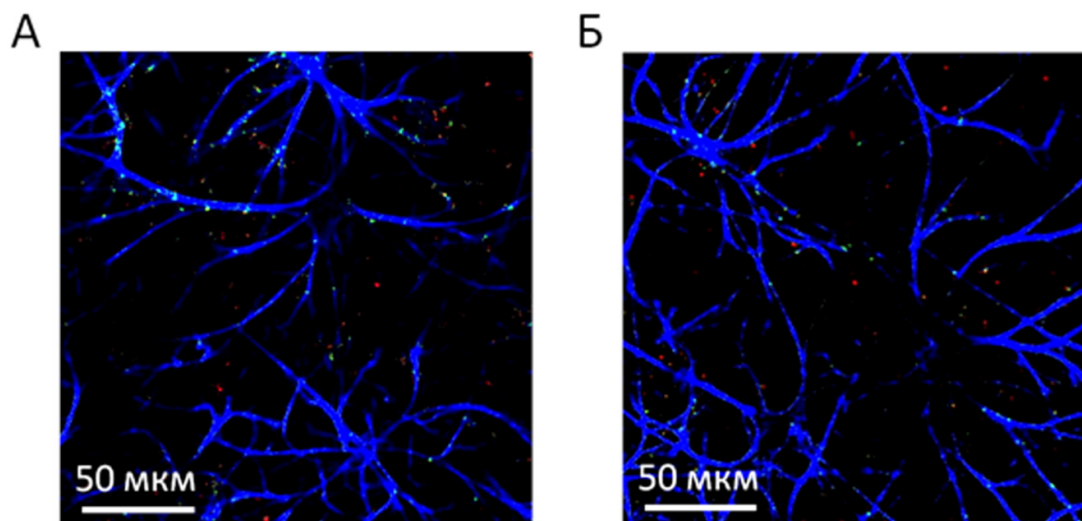


Рис. 3.1.5. Гліцинові рецептори (зелений колір) локалізовані на поверхні астроцитів гіпокампа (синій колір) в контролі (А) та через 4 години після КГД (Б). Зображення у псевдокольорах.

Через одну годину після ішемії спостерігалось незначне підвищення кількості гліцинових рецепторів, розташованих на тілах астроцитів та їх відростках – з $0,2 \pm 0,02$ у.о. до $0,25 \pm 0,02$ у.о. ($n=12$, $p > 0,05$), при цьому через 4 години їх кількість практично повернулася до контрольного значення (рис. 3.1.6.).

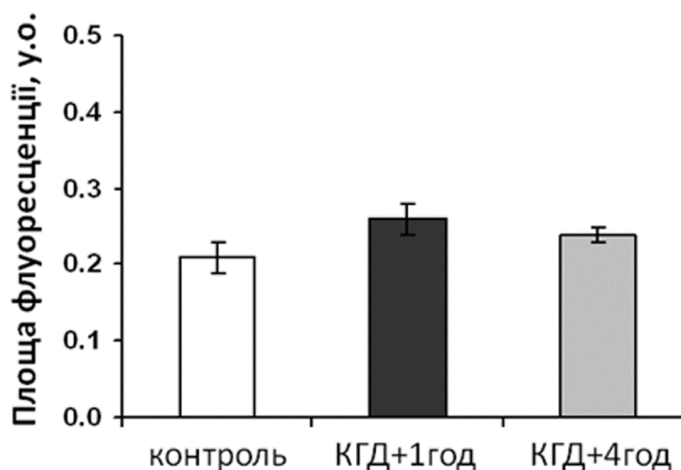


Рис. 3.1.6. Відносна площа флуоресценції гліцинових рецепторів локалізованих на астроцитах гіпокампа в контролі (білий стовпчик), через 1 (чорний) та 4 (сірий) години після КГД.

Враховуючи відсутність вичерпних даних щодо фізіологічної ролі гліцинових рецепторів, експресованих на астроцитах гіпокампа, досить важко висувати припущення щодо причин та функціонального значення стабільності їх експресії після КГД. Це може свідчити як про відмінність механізмів інтерналізації гліцинових рецепторів, характерних для нейронів та астроцитів СА1 зони гіпокампа, так і про принципову різницю у їх реакції на КГД.

Таким чином, нами продемонстровано, що одним із наслідків киснево-глюкозної депривації є зниження кількості гліцинових рецепторів на поверхні пірамідних нейронів. Аналіз літератури показав, що активація гліцинових рецепторів може мати нейропротективний ефект (Weber and Taylor, 1994; Yao et al., 2012). Однак, результати нашого дослідження свідчать, що посилення роботи гліцинових рецепторів не може бути досягнуте лише за рахунок адміністрації агоністів. Отже, доцільним, з нашої точки зору, є вивчення можливостей позитивної модуляції гліцинових рецепторів в умовах КГД.

3.1.4. Зміни мітохондріальної активності пірамідних нейронів гіпокампа під впливом КГД

Одним із ключових порушень клітинного метаболізму, що спостерігаються при КГД, є порушення енергетичного балансу. Нам вдалося продемонструвати, що через 1 та 4 години після початку реоксигенації спостерігаються значні зміни активності мітохондрій нейронів. Розлад роботи мітохондрій та їх здатності підтримувати іонний гомеостаз можуть призвести не лише до енергетичного дефіциту, але й до запуску каскаду внутрішньоклітинних реакцій, що здатні спричинити цілий спектр змін у функціонуванні клітин, зокрема інтерналізацію лігандкерованих рецепторів (Coultrap et al., 2011; Montori et al., 2012).

Із використанням флуоресцентного барвника *MitoTracker Orange* було встановлено, що активність мітохондрій зазнає змін під впливом КГД (рис. 3.1.7. А, Б). У контролі відносний рівень активності мітохондрій пірамідних нейронів СА1 зони становив $1,7 \pm 0,2$ у.о. Через одну годину після КГД (тривалістю 30 хв) ми спостерігали його підвищення до $2,8 \pm 0,2$ у.о (рис.3.1.8., $p < 0,05$). Ймовірно, це свідчить про намагання синтетичного апарату нейронів забезпечити їх нормальне функціонування в умовах дії негативних факторів, асоційованих із КГД, за рахунок увімкнення компенсаторних механізмів.

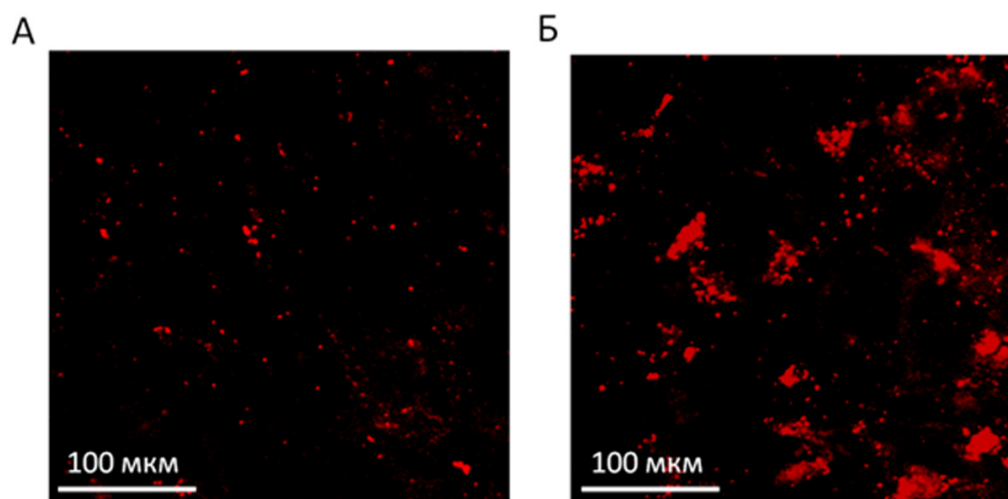


Рис. 3.1.7. *MitoTracker Orange*-зabarвлення СА1 зони гіпокампа в контролі (А) та через 1 год після КГД (Б).

Однак, через 4 години після КГД нами було відмічено зниження активності мітохондрій, що склала $2,2 \pm 0,3$ у.о. ($p < 0,05$). Це свідчить про нездатність системи енергетичного забезпечення нейронів знаходитись довгий час у надактивованому стані та початок розвитку катаболічних процесів.

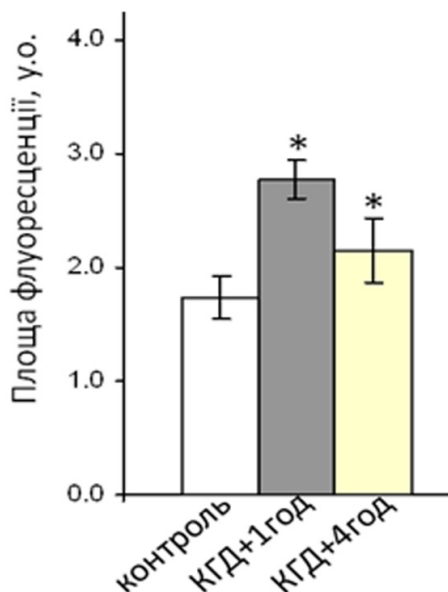


Рис. 3.1.8. Активність мітохондрій пірамідних нейронів СА1 зони в контролі (білий стовпчик), через 1 год (сірий) та 4 год (жовтий) після КГД; * $p < 0,05$.

Зміни активності енергетичного метаболізму є частиною комплексних порушень фізіології пірамідних нейронів, спричинених КГД. Даний процес є динамічним: нами зафіксовано відмінності у стані мітохондрій через 1 та 4 години після початку реоксигенації.

3.2. Гінкголева кислота - новий позитивний модулятор гліцинових рецепторів

Фармакологічна модуляція роботи іонних каналів є одним із основних засобів швидкого впливу на функціонування центральної нервової системи. Одним із найбільш відомих модуляторів лігандкерованих іонних каналів є бензодіазепін, що посилює роботу ГАМК_A рецепторів та застосовується для

симптоматичного лікування епілепсії, гіперплексії та у якості заспокійливого (Jembrek and Vlainic, 2015; Lipinska et al., 2016).

Розробка ефективних та специфічних модуляторів гліцинових рецепторів відкриває нові можливості корекції патологічних станів, обумовлених порушеннями функціонування гліцинергічної системи. При дослідженні модулюючих агентів гліцинових рецепторів важливо брати до уваги той факт, що різні субодиниці рецептора виконують різні функції у ЦНС та часто володіють різною чутливістю до модуляторів. Потенційно, гліцинові рецептори є мішенями для м'язових релаксантів, знеболюючих та антиепілептичних фармакологічних препаратів. Як засвідчив аналіз літератури, посилення роботи гліцинових рецепторів може позитивно впливати на функціональне відновлення та життєздатність нейронів після киснево-глюкозної депривації.

У ході пошуку нових модуляторів гліцинового рецептора нами було встановлено, що гінкголева кислота, компонент екстракту *Ginkgo biloba*, може впливати на функціонування даного типу рецепторів.

3.2.1. Вплив гінкголевої кислоти на $\alpha 1$ -гліцинові рецептори

Гінкголева кислота за своєю хімічною структурою є алкілфенолом (рис.3.2.1). Разом із терпен трілактонами (гінкголіди А, В, С, J, білобалід) та флаваноїдами входить до складу екстракту *Ginkgo biloba* (Ude, 2013). Комерційний екстракт *Ginkgo biloba* (EGb 761) не містить гінкголеву кислоту, оскільки вона має здатність викликати алергічні реакції (Liu and Zeng, 2009). Однак, якщо карбоксильна група гінкголевої кислоти лишається інтактною, вона втрачає свої алергеногенні властивості (Satyan et al., 1998).

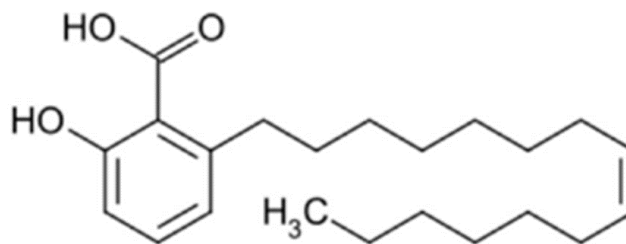


Рис. 3.2.1. Структурна формула гінкголевої кислоти.

Аплікація наномолярних концентрацій гінкголевої кислоти на *CHO-K1* клітини, що експресували $\alpha 1$ -субодиниці гліцинового рецептора, спричинювала потенціацію струмів, індукованих ненасичуючими концентраціями гліцину (30 мкмоль/л).

Гінкголева кислота у концентрації 100 нмоль/л сприяла підвищенню амплітуди струмів, опосередкованих $\alpha 1$ -гліциновими рецепторами, з 291 ± 65 пА до 467 ± 124 пА ($n=8$, $p<0,05$) (рис.3.2.2, А). Для різних клітин ступінь потенціації $\alpha 1$ - рецепторів під впливом гінкголевої кислоти коливався від 30 до 100% (рис.3.2.2, Б), середній відсоток потенціації склав $51 \pm 10\%$ ($n=8$).

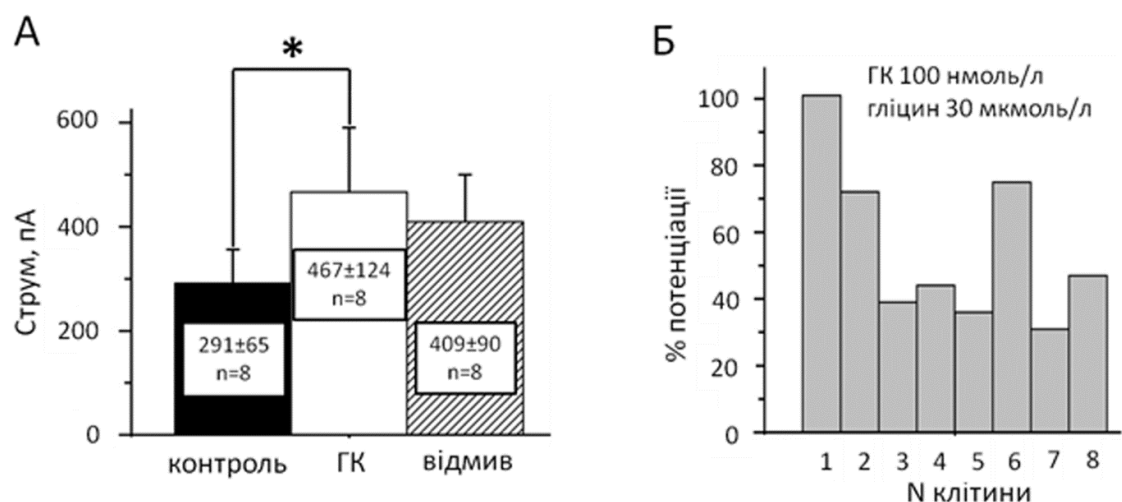


Рис. 3.2.2. Потенціація струмів опосередкованих $\alpha 1$ -гліциновими рецепторами під дією гінкголевої кислоти (ГК). А. Амплітуда струмів індукованих 30 мкмоль/л гліцину в контролі (чорний стовпчик), після аплікації 100 нмоль/л ГК (білий) та після відмивки ГК (заштрихований); * $p<0,05$. Б. Відсоток потенціації амплітуди струму під дією 100 нмоль/л ГК для кожної окремої клітини.

Кінетика розвитку потенціації під дією 100 нмоль/л гінкголевої кислоти відображена на рис.3.10. Після стабілізації гліциніндукованих струмів (перші чотири аплікації) розчин у якому знаходились клітини було замінено на розчин, що містив 100 нмоль/л гінкголевої кислоти. Струм зареєстрований через 40 с

після початку аплікації гінкголевої кислоти зріс на 54%, у порівнянні з контролем. Наступні реєстрації, у її присутності, продемонстрували подальше наростання амплітуди струму до майже повної стабілізації через 2 хвилини. При відмиванні спостерігалось часткове повернення до вихідної амплітуди струму. При повторній аплікації гінкголевої кислоти її ефект посилювався – амплітуда струму зростала на 105% у порівнянні із контролем (рис.3.2.3).

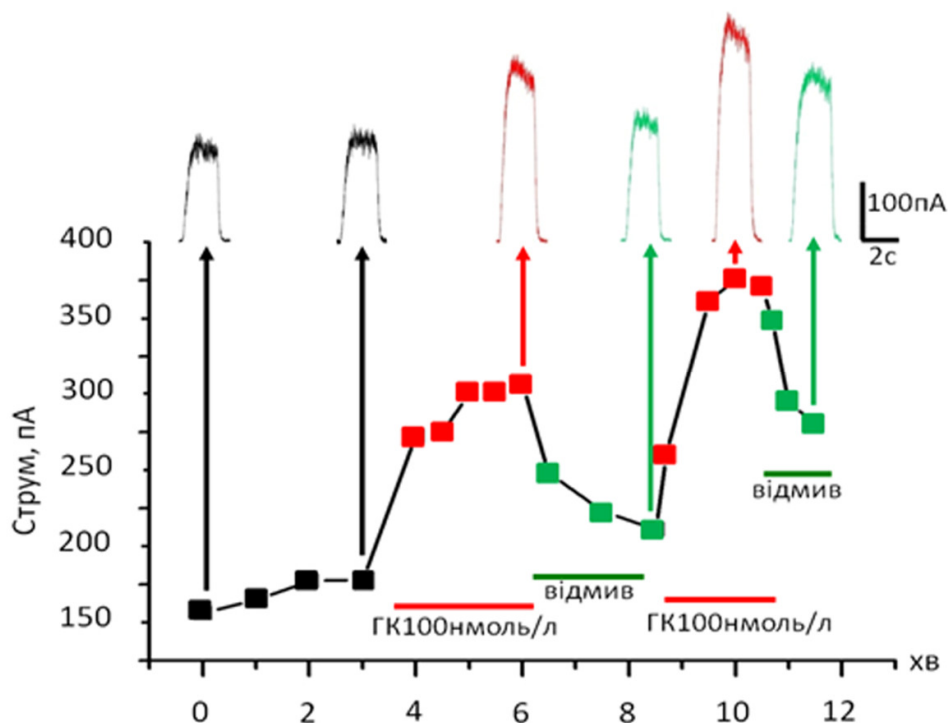


Рис. 3.2.3. Кінетика розвитку ефекту потенціації струмів опосередкованих $\alpha 1$ -гліциновими рецепторами під впливом 100 нмоль/л гінкголевої кислоти; чорними квадратами позначено контрольні реєстрації; червоними – реєстрації здійснені під час аплікації ГК, зеленими – під час відмивання ГК; тривалість аплікації ГК та відмивання позначено внизу графіка.

Розвиток потенціації, викликаной гінкголевою кислотою, залежав від її концентрації у зовнішньоклітинному розчині. Гінкголева кислота у концентрації 30 нмоль/л призводила до зростання амплітуди гліциніндукованого струму через 3 хв після початку її аплікації (рис.3.2.4, А). В той самий час, 3 мкмоль/л

гінкголевої кислоти справляли потенціюючий ефект уже через 30 с (рис. 3.2.4, Б).

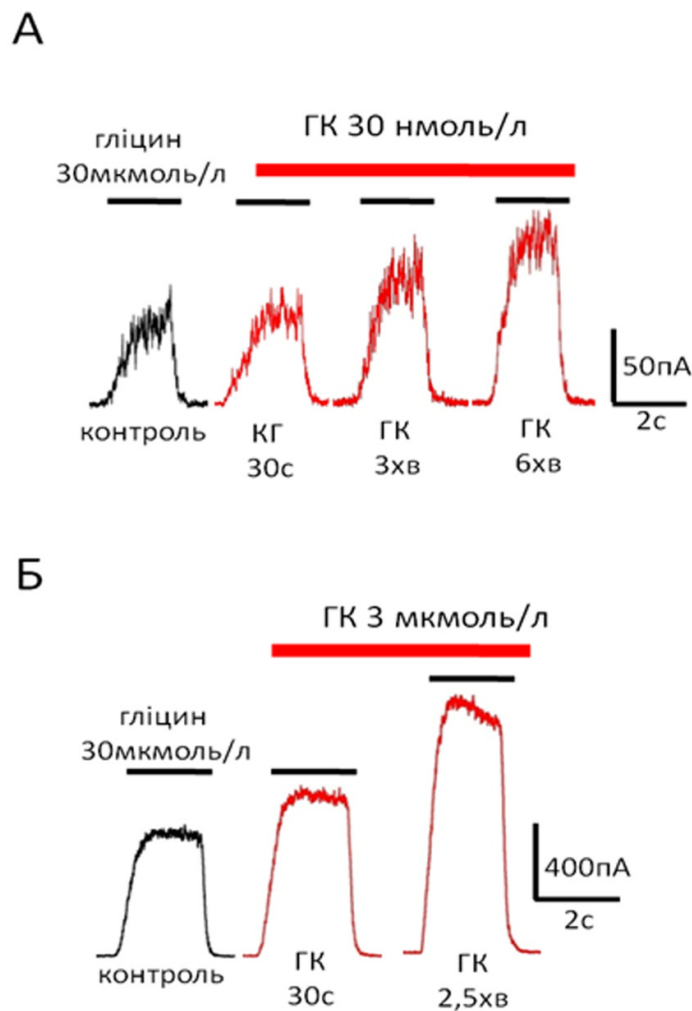


Рис. 3.2.4. Зростання амплітуди гліциніндукованих струмів (30 мкмоль/л) під впливом 30 нмоль/л (А) та 3 мкмоль/л (Б) гінкголевої кислоти; чорним кольором позначено реєстрації здійснені в контролі, червоним – під час аплікації ГК; тривалість аплікації гліцину (чорні смужки) та ГК (червоні) позначено над реєстраціями.

Високі концентрації гінкголевої кислоти спричинювали досить швидкий розвиток потенціації. Під дією 25 мкмоль/л гінкголевої кислоти іонні струми, індуковані 10 мкмоль/л гліцину, демонстрували підвищення амплітуди більш як у два рази уже після 20 с аплікації (рис. 3.2.5, А). У середньому гінкголева

кислота у концентрації 25 мкмоль/л призводила до збільшення струму з 364 ± 49 до 846 ± 135 пА ($n=34$) (рис.3.2.5, Б).

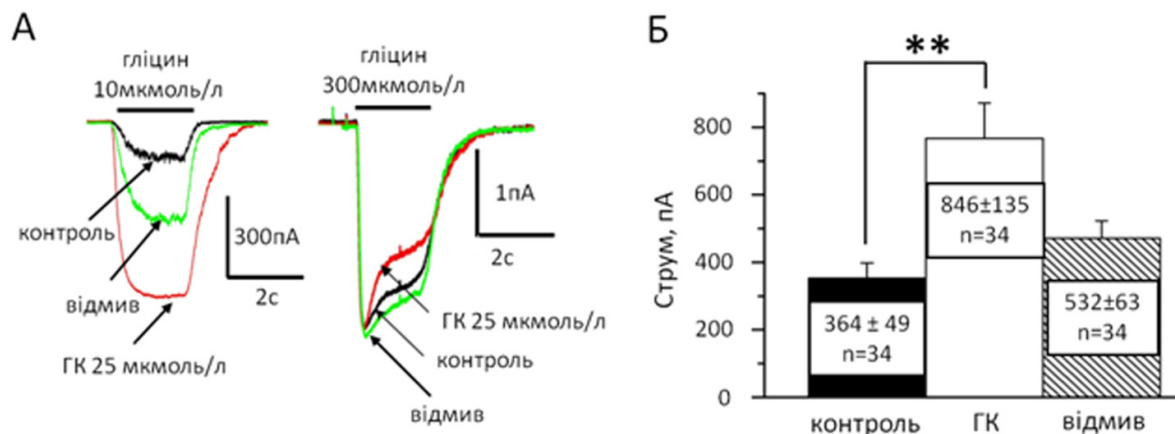


Рис. 3.2.5. Підвищення амплітуди струмів, опосередкованих $\alpha 1$ -рецепторами під дією 25 мкмоль/л ГК. А. Реєстрації струмів індукованих 10 мкмоль/л гліцину (зліва) в контролі (чорний колір), після аплікації ГК (червоний) та після відмивки ГК (зелений); струми індуовані 300 мкмоль/л гліцину - справа. Б. Середні амплітуди струмів (10 мкмоль/л гліцину) в контролі (чорний стовпчик), після дії ГК (білий) та після відмивки (заштрихований); ** $p < 0,01$.

Наступним кроком у дослідженні впливу гінкголевої кислоти на $\alpha 1$ -гліцинові рецептори стала побудова кривих залежності амплітуди струму від концентрації агоніста та визначення півефективної дози (ED_{50}) для гліцину при аплікації гінкголевої кислоти.

Детальний аналіз кривих концентраційної залежності показав, що гінкголева кислота була здатна потенціювати лише струми індуковані ненасичуючими концентраціями гліцину, в той час як амплітуди струмів, індукованих насичуючими концентраціями агоніста, не змінювалися під впливом гінкголевої кислоти. Внаслідок цього, в присутності гінкголевої кислоти, спостерігався зсув кривих концентраційних залежностей вліво та зниження ED_{50} для гліцину (рис. 3.2.6). Преаплікація 3 мкмоль/л гінкголевої

кислоти протягом 1-3 хв спричинила зсув ED_{50} з 36 ± 6 мкмоль/л до 17 ± 2 мкмоль/л ($n=9$, $p<0,01$).

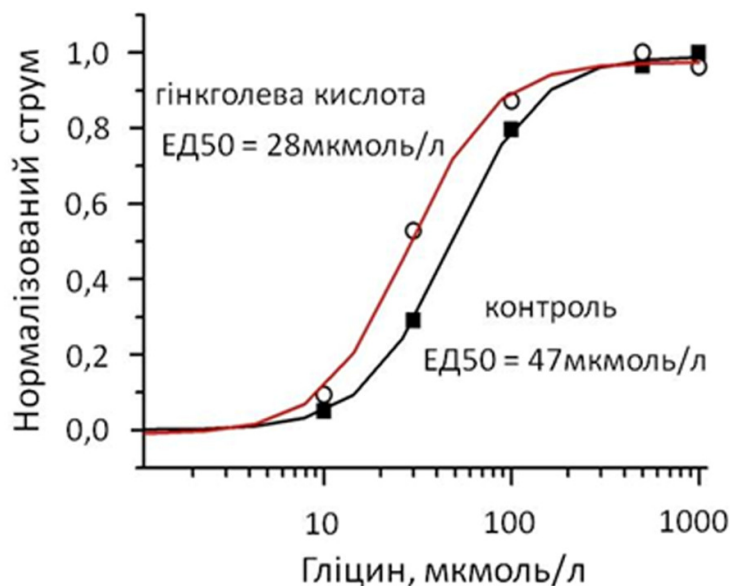


Рис. 3.2.6. Репрезентативні криві залежності амплітуди струму від концентрації гліцину в контролі (чорний колір) та після аплікації гінкголевої кислоти (червоний).

Наші дані свідчать, що гінкголева кислота, навіть у наномолярних концентраціях, здатна потенціювати струми, опосередковані $\alpha 1$ -гліциновими рецепторами.

3.2.2 Вплив гінкголевої кислоти на $\alpha 1\beta$ -гліцинові рецептори

Відомо, що деякі антагоністи гліцинового рецептора по-різному діють на гомомерні та гетеромерні гліцинові рецептори. Наприклад, алкалоїд пікротоксин більш ефективно блокує гомомерні, ніж гетеромерні гліцинові рецептори (Pribilla et al., 1992). В той самий час, гінкголід В є більш ефективним антагоністом гетеромерних рецепторів (Kondratskaya et al., 2005). З метою встановити особливості дії гінкголевої кислоти на гетеромерні $\alpha 1\beta$ -гліцинові рецептори ми трансфекували *CHO-K1* клітини одночасно кДНК $\alpha 1$ - та β -субодиниць у співвідношенні 1:5, що забезпечило формування гетеромерних рецепторів.

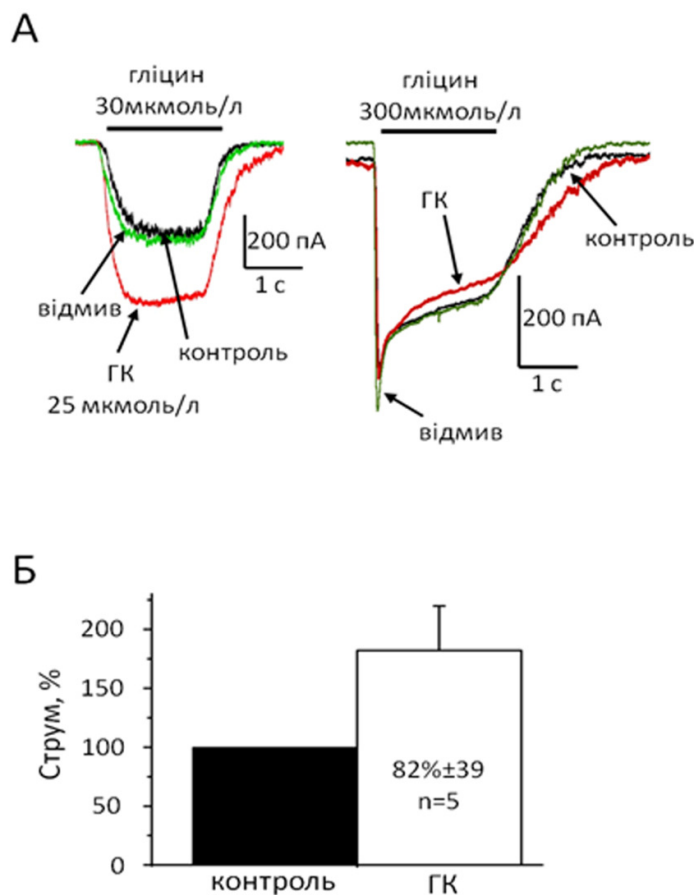


Рис. 3.2.7. Дія ГК на $\alpha 1\beta$ -рецептори. А. Струми індуковані 30 мкмоль/л гліцину (зліва) в контролі (чорний колір), після аплікації 25 мкмоль/л гінголевої кислоти (червоний) та після відмивання (зелений); справа – струми індуковані 300 мкмоль/л гліцину. **Б.** Середній відсоток потенціації струмів (30 мкмоль/л гліцину) опосередкованих $\alpha 1\beta$ -рецепторами під впливом ГК (25 мкмоль/л).

Як і у випадку гомомерних рецепторів амплітуда струмів, опосередкованих гетеромерними $\alpha 1\beta$ -рецепторами, збільшилася на $82 \pm 39\%$ ($n=5$, рис. 3.2.7, Б) в порівнянні із контролем (відсоток потенціації коливався від 19% до 233%). Подібно до гомомерних $\alpha 1$ -рецепторів, гінголева кислота не підвищувала амплітуду струмів, індукованих насичуючими концентраціями гліцину (0,3 – 1 ммоль/л) (рис.3.2.7, А).

3.2.3 Вплив гінкголевої кислоти на $\alpha 2$ -гліцинові рецептори

Гліцинові рецептори, сформовані $\alpha 2$ -субодиницями, характеризуються нижчою чутливістю до гліцину, у порівнянні із $\alpha 1$ -субодиницями – ED_{50} для гліцину склала 42 ± 2 мкмоль/л ($n=10$, рис.3.2.8). Значення ED_{50} для різних клітин варіювало в межах від 24 мкмоль/л до 69 мкмоль/л.

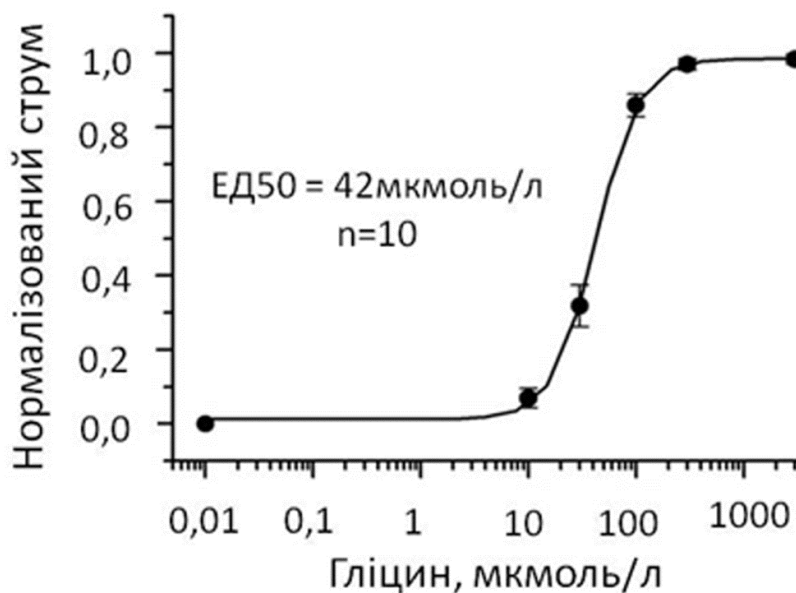


Рис.3.2.8. Кумулятивна крива залежності амплітуди $\alpha 2$ -опосередкованих струмів від концентрації гліцину в контролі.

Дослідження дії гінкголевої кислоти на $\alpha 2$ -гліцинові рецептори проводилося за тим самим протоколом, що і у випадку $\alpha 1$ -рецепторів. Аплікація гінкголевої кислоти протягом 0,5-5 хв супроводжувалася реєстрацією іонних струмів індукованих різними концентраціями гліцину.

На противагу $\alpha 1$ -рецепторам, гінкголева кислота не призводила до потенціації струмів, опосередкованих $\alpha 2$ -субодиницями. Низькі концентрації кислоти (менше 10 мкмоль/л) не впливали істотним чином на амплітуду $\alpha 2$ -струмів. Однак, варто відмітити, що аплікація високих концентрацій гінкголевої кислоти (10 мкмоль/л та 25 мкмоль/л) викликала її зниження на $10 \pm 3\%$ ($n=8$) та $20 \pm 5\%$ ($n=11$) відповідно (рис.3.2.9).

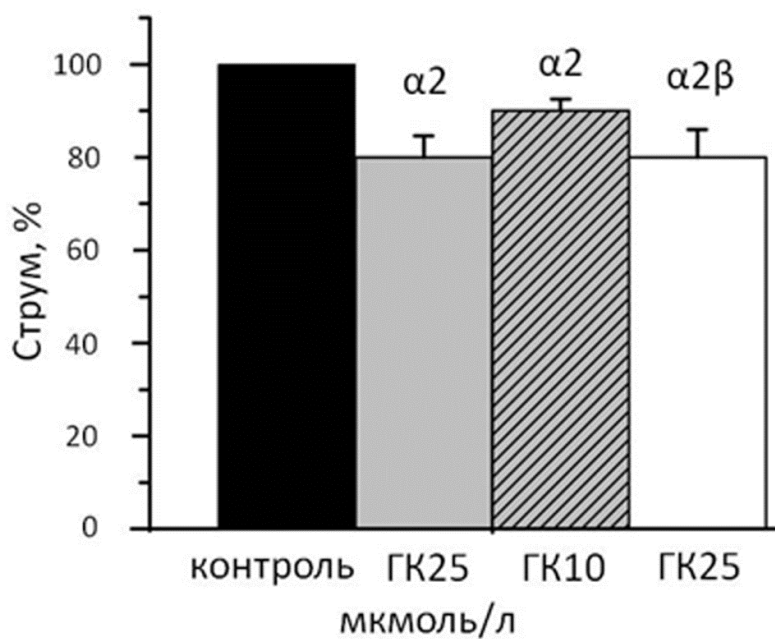


Рис. 3.2.9. Вплив 10 та 25 мкмоль/л гінкголевої кислоти на амплітуду струмів опосередкованих гомомерними $\alpha 2$ - (сірий та заштрихований стовпчики) та гетеромерними $\alpha 2\beta$ -рецепторами (білий).

Подібною була реакція гетеромерних $\alpha 2\beta$ -гліцинових рецепторів – високі концентрації гінкголевої кислоти викликали незначне зниження амплітуди струмів (на $14 \pm 4\%$, $n=9$). Рис.3.2.9 підсумовує вплив гінкголевої кислоти на гомомерні та гетеромерні $\alpha 2$ -гліцинові рецептори.

3.2.4. Вплив гінкголевої кислоти на $\alpha 3$ -субодиниці гліцинового рецептора

Аналіз кривих концентраційних залежностей показав, що ED_{50} для гліцину для даного типу рецепторів становить 142 ± 10 мкмоль/л ($n=11$), що приблизно в три рази вище, ніж для $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -рецепторів (рис. 3.2.10, А).

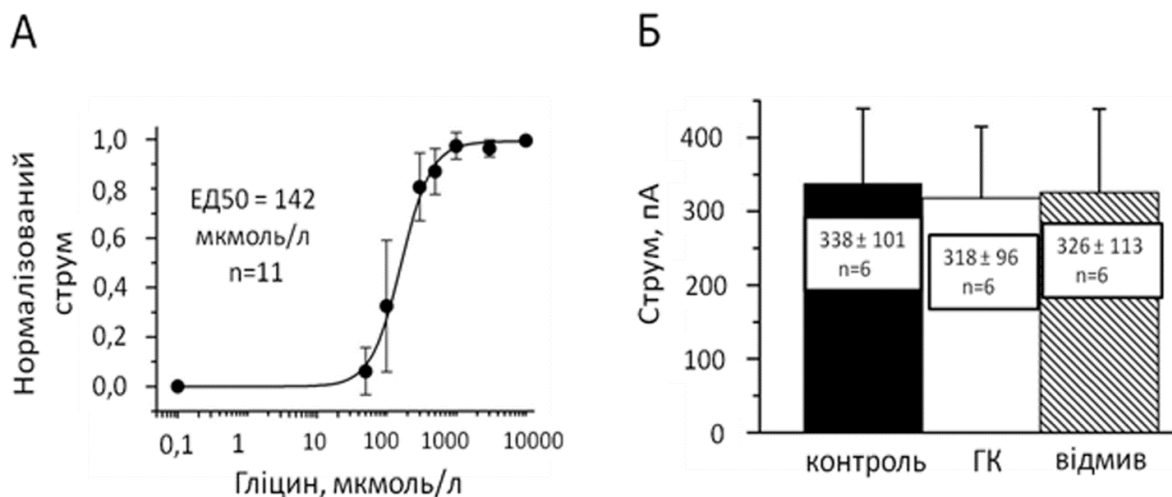


Рис. 3.2.10. А. Крива залежності амплітуди $\alpha 3$ -опосередкованого струму від концентрації гліцину. **Б.** Середня амплітуда гліциніндукованих струмів (100 мкмоль/л), опосередкованих $\alpha 3$ -рецепторами, у контролі (чорний стовпчик), після аплікації 25 мкмоль/л ГК (білий) та після відмиву (заштрихований).

Як продемонстровано на рис.3.2.10, Б, навіть високі концентрації гінкголевої кислоти (25 мкмоль/л) не мали істотного впливу на амплітуду струмів, опосередкованих $\alpha 3$ -рецепторами. В контролі її значення складало 338 ± 101 пА, після аплікації гінкголевої кислоти – 318 ± 96 пА, після повернення клітин до контрольного розчину – 326 ± 113 пА ($n=6$, $p>0,05$).

Подібно до того, як ми це спостерігали на $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -гліцинових рецепторах, гінкголева кислота пришвидшувала кінетику десенситизації струмів індукованих насичуючими концентраціями гліцину (300 мкмоль/л).

Таким чином, отримані нами дані, демонструють, що гінкголева кислота навіть у високих концентраціях не здатна потенціювати струми опосередковані $\alpha 2$ - та $\alpha 3$ -гліциновими рецепторами.

3.2.5 Вплив гінкголевої кислоти на ГАМК_A рецептори

ГАМК_A-рецептор також належить до родини цис-петельних і разом із гліциновим формує систему гальмівної нейропередачі у ЦНС. Нами було досліджено дію гінкголевої кислоти на $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ підтип ГАМК_A рецепторів. Аналіз

кривих концентраційних залежностей показав, що ED_{50} для ГАМК становить 11 мкмоль/л ($n=20$, рис.3.2.11).

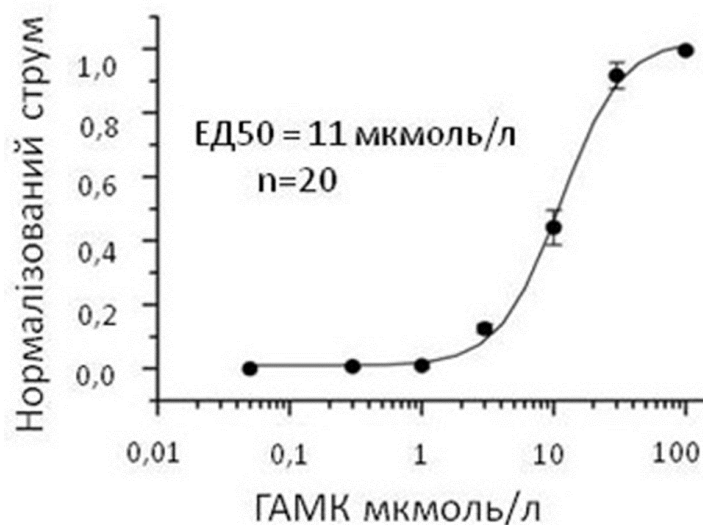


Рис. 3.2.11. Кумулятивна крива залежності амплітуди індукованого струму від концентрації аплікованої ГАМК.

Дію гінкголевої кислоти було протестовано на 20 клітинах. Через 20-40 с після початку аплікації гінкголевої кислоти (25 мкмоль/л) ми не спостерігали суттєвих змін амплітуди ГАМК-індукованих струмів (рис. 3.2.12, А). Середній струм у контролі становив 432 ± 125 пА, після аплікації гінкголевої кислоти – 440 ± 130 пА, після відмиву – 439 ± 130 пА ($n=20$, $p>0,05$, рис. 3.2.12, Б).

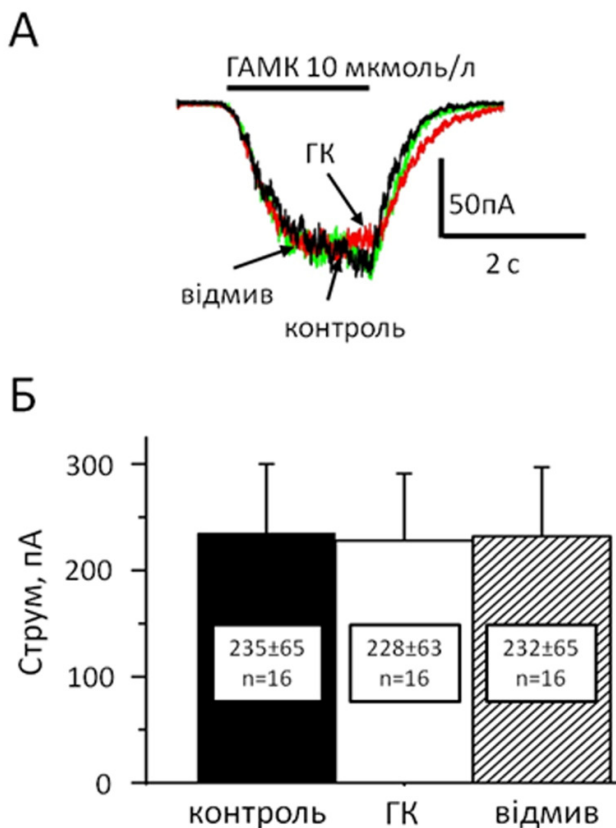


Рис. 3.2.12. А. Реєстрації ГАМК-індукованих струмів (10 мкмоль/л) в контролі (чорний), після аплікації ГК (червоний) та після відмивки (зелений). Б. Середні амплітуди струмів у контролі (чорний стовпчик), після аплікації ГК (білий) та після відмиву (заштрихований).

Таким чином, нами встановлено, що гінголева кислота не взаємодіє із ГАМК_A рецепторами, потенціюючи лише один із компонентів гальмівної системи – гліцинові рецептори.

3.2.6. Визначення амінокислотних залишків, що є ключовими для потенціюючої дії гінголевої кислоти на $\alpha 1$ -гліцинові рецептори

Отже, нам вдалося показати, що гінголева кислота є модулятором роботи $\alpha 1$ -гліцинових рецепторів. Цікавим є те, що вона не здатна потенціювати інші субодиниці гліцинового рецептора ($\alpha 2$ та $\alpha 3$). Ця особливість її дії є важливою, оскільки свідчить про субодиничну специфічність. Отже, амінокислотна

послідовність $\alpha 1$ -субодиниць має принципові відмінності, що забезпечують формування сайту взаємодії із гінкголевою кислотою.

Для з'ясування механізму субодинично-вибіркової потенціюючої дії гінкголевої кислоти на гліцинові рецептори ми вирішили провести аналіз амінокислотних послідовностей $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -субодиниць гліцинового рецептора. Відомо, що провідну роль у алостеричній модуляції лігандкерованих іонотропних рецепторів відіграють зовнішньоклітинний домен та другий і третій трансмембранні домени (TM2, TM3).

Амінокислотні послідовності TM2- та TM3-доменив $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -субодиниць гліцинового рецептора відрізняються лише за двома позиціями: амінокислотним залишком G254, S296 $\alpha 1$ -субодиниці відповідають A261 та A303 $\alpha 2$ -субодиниці (рис.3.2.13). Ці залишки відіграють провідну роль у взаємодії гліцинових рецепторів із ціанотрифенілборатом (Rundstrom et al., 1994), пікротоксином (Zhorov and Bregestovski, 2000) та канабіноїдами (Xiong et al. 2011).

Для зовнішньоклітинного домену характерною є висока міжсубодинична варіабельність, однак раніше було показано, що залишок A52 є ключовим для позитивної модуляції $\alpha 1$ -субодиниці етанолом та ендоканабіноїдами (Mascia et al., 1996; Yevenes and Zeilhofer 2011,b).

Окрім того, у роботі по встановленню сайтів алостеричної модуляції гліцинових рецепторів N-арахідоноіл-гліцином було показано, що $\alpha 2$ -субодиниці, в яких згадані вище залишки були замінені відповідними з $\alpha 1$ -субодиниці, набули здатності потенціюватися під дією N-арахідоноіл-гліцину; в той час як $\alpha 2$ -рецептори дикого типу інгібувалися N-арахідоноіл-гліцином (Yevenes and Zeilhofer 2011,b).

Враховуючи результати вище зазначених досліджень, що демонструють важливу роль A52, G254, S296 у субодиничноспецифічній модуляції гліцинових рецепторів ми вирішили дослідити їх участь у взаємодії рецептора із гінкголевою кислотою. Для реалізації поставленого завдання у $\alpha 2$ -субодиниці гліцинового рецептора було здійснено наступні мутації: T59A у

зовнішньоклітинному домені, A261G у TM2 та A303S у TM3. Тобто, амінокислотні залишки $\alpha 2$ -субодиниці було замінено на відповідні з $\alpha 1$.



Рис. 3.2.13. Амінокислотні послідовності $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -субодиниць гліцинового рецептора; амінокислотні заміни здійснені у даному дослідженні виділено прямокутниками.

Наші експерименти показали, що аплікація гінкголевої кислоти на *CHO* клітини, що експресували мутантні $\alpha 2$ T59A/A261G/A303S гліцинові рецептори, призводила до збільшення амплітуди гліциніндукованих струмів, подібного до того як це спостерігалось на $\alpha 1$ -рецепторах (рис.3.2.14).

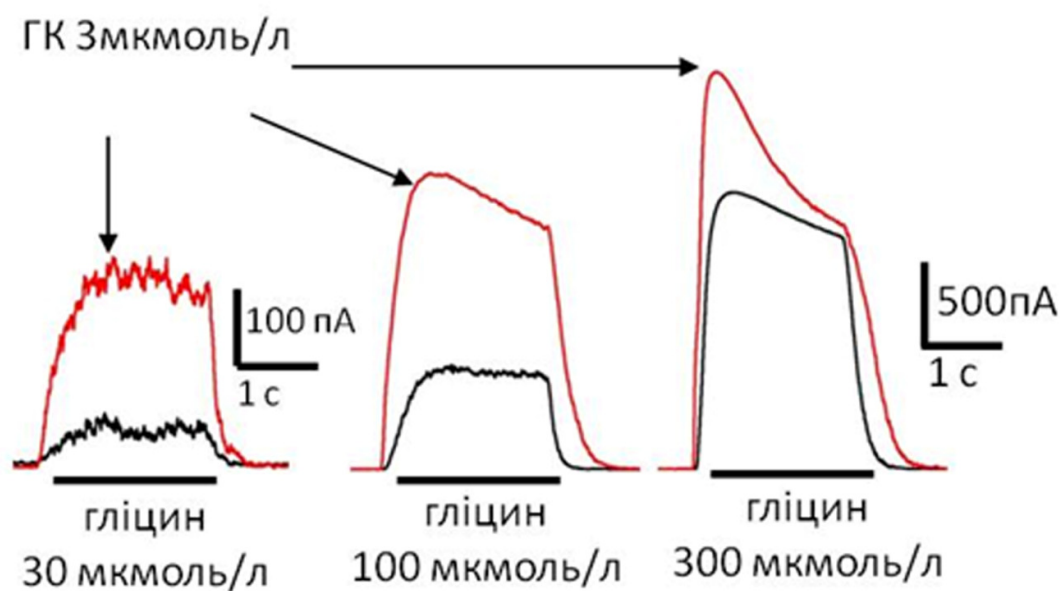


Рис. 3.2.14. Дія гінкголевої кислоти (3 мкмоль/л) на струми опосередковані мутантними $\alpha 2$ -рецепторами та індуковані 30, 100, 300 мкмоль/л гліцину; реєстрації в контролі – чорний колір, після аплікації ГК – червоний.

Після преаплікації гінкголевої кислоти (10 мкмоль/л), протягом 1 хв, струми, індуковані ненасичуючою концентрацією гліцину, зросли в середньому на $89\% \pm 14$ ($n=6$). Для кожної окремої клітини ступінь потенціювання відрізнявся і варіював від 25% до 122% (рис.3.2.15).

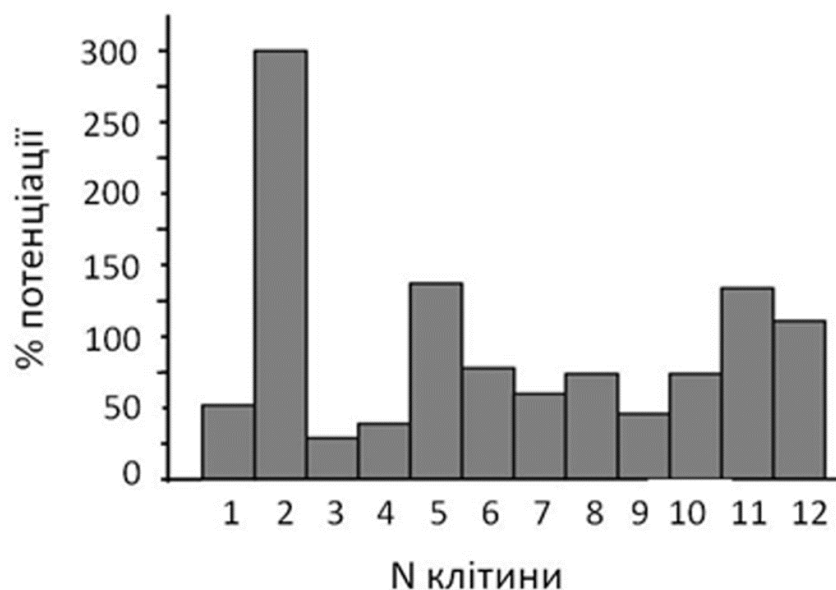


Рис. 3.2.15. Відсоток потенціяції гліциніндукованих струмів під дією 10 мкмоль/л ГК для кожної із 12-ти протестованих клітин.

Кінетика розвитку потенціяції мутантних $\alpha 2$ -рецепторів була подібною до тієї, що ми спостерігали для $\alpha 1$ -рецепторів (рис.3.2.16). Уже після перших 30 с аплікації досліджуваної речовини амплітуда струму підвищилась на 39%. При наступних реєстраціях було зафіксовано її подальше зростання (max підвищення для даної клітини – 136%). При відмиванні гінкголевої кислоти амплітуда струму знижувалася, однак повного відновлення до вихідного значення не відбувалося.

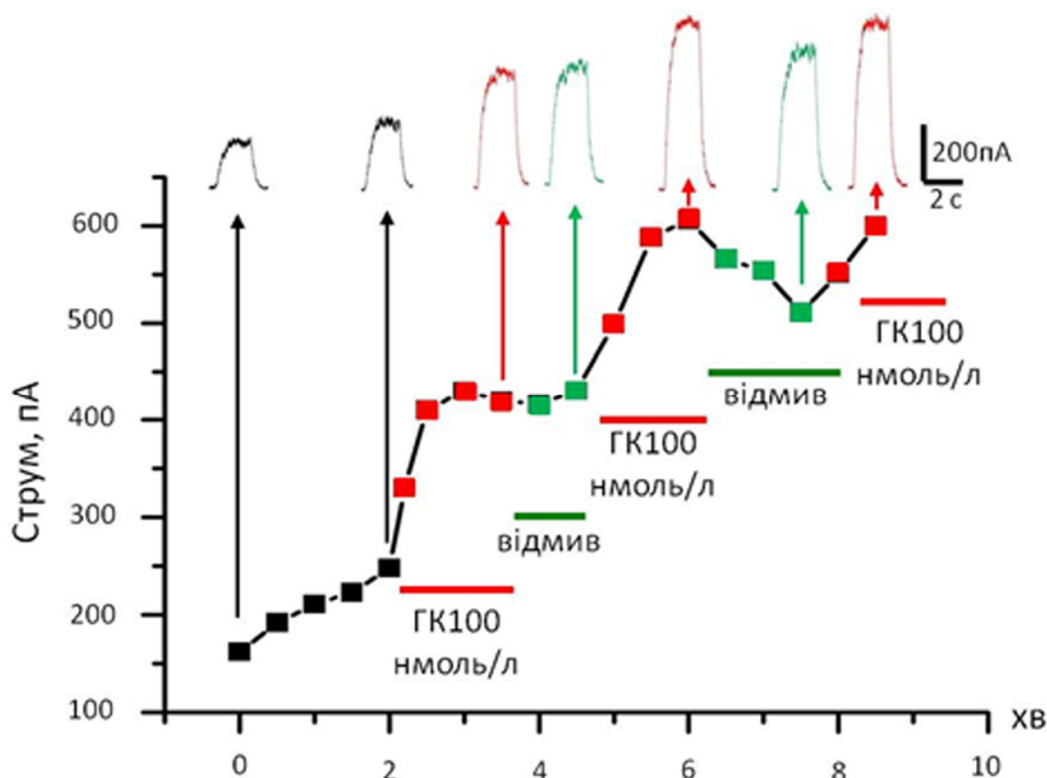


Рис. 3.2.16. Кінетика розвитку потенціалії струмів, опосередкованих мутантними $\alpha 2$ -гліциновими рецепторами, при аплікації 100 нмоль/л гінкголевої кислоти; чорними квадратами позначено контрольні реєстрації; червоними - реєстрації здійснені під час аплікації ГК, зеленими – під час відмивання ГК; тривалість аплікації ГК та відмивання позначено внизу графіка.

Для більш детального дослідження особливостей дії гінкголевої кислоти на мутантні $\alpha 2$ -субодиниці нами було побудовано криві залежності амплітуди струму від концентрації аплікованого гліцину (рис.3.2.17).

Як уже зазначалося вище, ED_{50} для $\alpha 2$ -рецепторів становила 42 мкмоль/л. Аналіз кривих концентраційної залежності показав, що чутливість мутантних $\alpha 2$ -гліцинових рецепторів до гліцину в 3 рази нижча, ніж $\alpha 2$ -рецепторів дикого типу і становить 119 мкмоль/л. В умовах контролю ED_{50} для мутантних $\alpha 2$ -рецепторів варіювала від 56 мкмоль/л до 238 мкмоль/л. 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. Так для клітини, що проілюстрована на рис.3.2.17, в умовах контролю значення ED_{50} становило 155 мкмоль/л, після аплікації 3 мкмоль/л гінкголевої кислоти протягом 1 хв ED_{50} склала 69 мкмоль/л. В середньому, 3 мкмоль/л гінкголевої кислоти спричинили зниження ED_{50} з 119 ± 16 мкмоль/л до 76 ± 9 мкмоль/л ($n=12$, $p<0,01$).

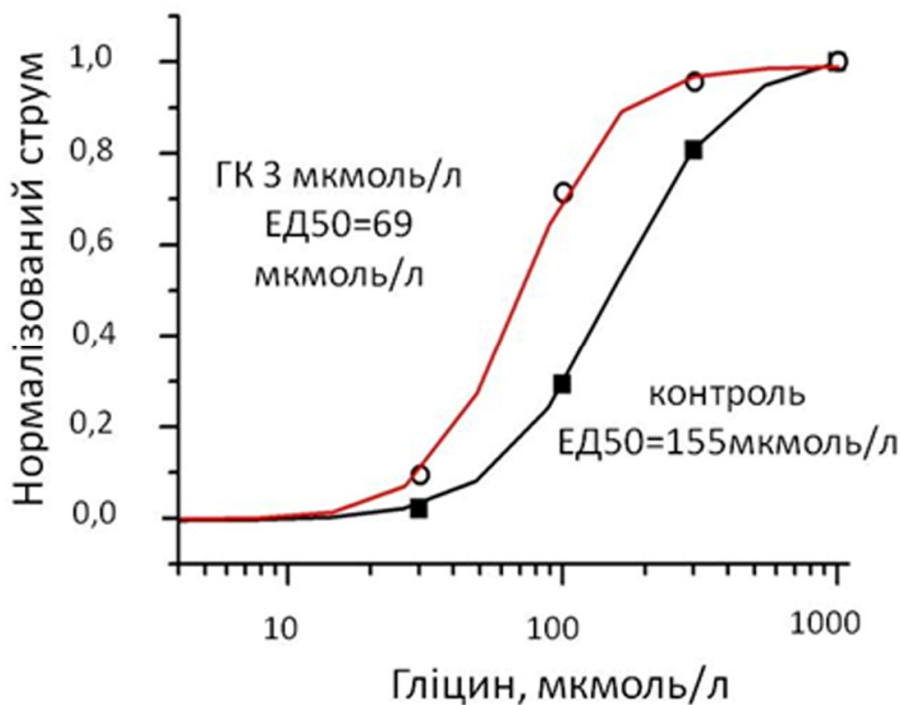


Рис. 3.2.17. Репрезентативні криві залежності амплітуди індукованого струму від концентрації гліцину для $\alpha 2$ -мутантних гліцинових рецепторів у контролі (чорний колір) та в присутності 3 мкмоль/л ГК (червоний колір).

Отримані нами результати демонструють, що мутація трьох амінокислотних залишків у $\alpha 2$ -субодиниці гліцинового рецептора на відповідні з $\alpha 1$ робить її чутливою до потенціюючої дії гінкголевої кислоти. При цьому характер дії гінкголевої кислоти на мутантні $\alpha 2$ -рецептори відповідає характеру її дії на $\alpha 1$ -гліцинові рецептори. Це дозволяє нам припустити, що амінокислоти A52, G254 та S296 залучені у процес взаємодії $\alpha 1$ -рецепторів із гінкголевою кислотою.

3.3. Ніфлумова кислота – блокатор гліцинових рецепторів

Ніфлумова кислота (рис.3.3.1) належить до групи нестероїдних протизапальних препаратів та є високоефективним інгібітором циклооксигенази – ферменту синтезу простагландинів (Cushman and Cheung 1976; Grossman et al., 1995). Окрім того, ніфлумова кислота є відомим блокатором Ca^{2+} -активованих Cl^- -каналів (White and Aylwin, 1990) а також потенціалкерованих Cl^- -каналів (Liantonio et al., 2007). У електрофізіологічних дослідженнях ніфлумова кислота часто використовується як специфічний блокатор цих двох типів хлорних каналів, однак сайт взаємодії ніфлумової кислоти із ними не був визначений. Було показано, що даний фармакологічний агент взаємодіє також із лігандкерованим Cl^- -каналом, а саме із GAMK_A рецепторами (Sinkkonen et al., 2003). Нами було висунуто припущення, що активність ніфлумової кислоти поширюється на інший підтип Cl^- -вибіркових цис-петельних рецепторів – гліциновий. Маючи на меті пошук та дослідження нових модуляторів гліцинови хрецепторів, ми вважали за доцільне встановити особливості дії ніфлумової кислоти на гліцинові рецептори різного субодиничного складу ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 1\beta$, $\alpha 2\beta$).

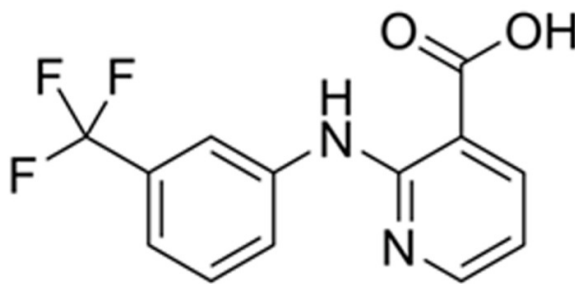


Рис. 3.3.1. Структурна формула ніфлумової кислоти.

3.3.1 Взаємодія ніфлумової кислоти із $\alpha 1$ -гліциновими рецепторами

При аплікації ніфлумової кислоти із застосуванням «довгого протоколу» (див. розділ МЕТОДИ) ми спостерігали зниження амплітуди струмів опосередкованих $\alpha 1$ -гліциновими рецепторами (рис.3.3.2, А). При мембранному потенціалі (МП) -30мВ ніфлумова кислота у концентрації 30, 100 та 300

мкмоль/л інгібувала гліциніндуковані струми (30 мкмоль/л) на $3\pm4\%$, $16\pm6\%$, та $48\pm9\%$ відповідно ($n=7$). Окрім того, нами була відмічена потенціалзалежність дії ніфлумової кислоти на гліцинові рецептори. При позитивному МП (+30 мВ) ми спостерігали зростання ефективності дії ніфлумової кислоти: амплітуда струмів знижувалася на 16 ± 7 , 43 ± 11 та $75\pm4\%$ ($n=7$) відповідно (рис.3.3.2, Б).

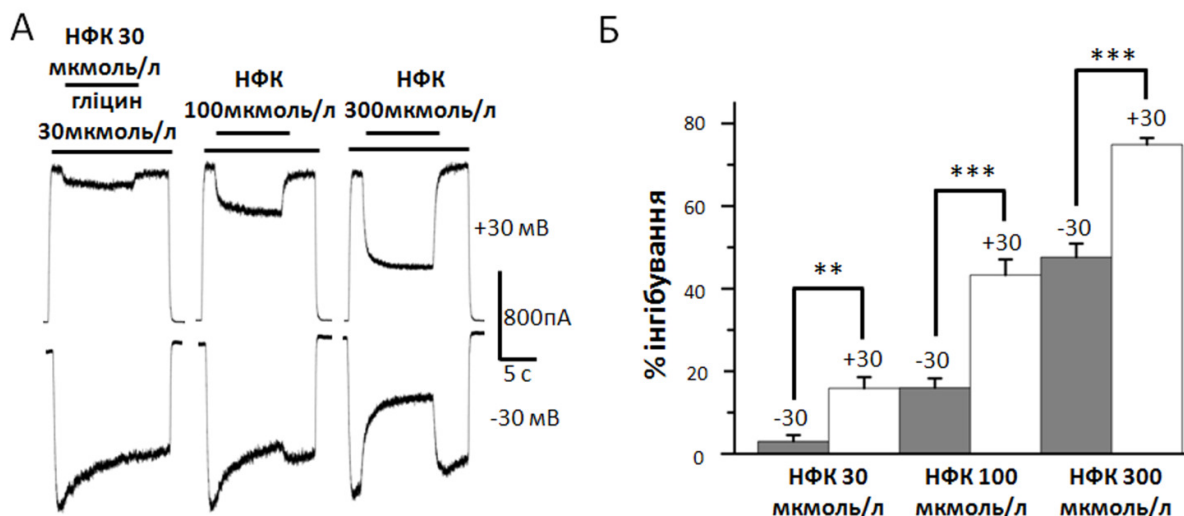


Рис. 3.3.2. Взаємодія ніфлумової кислоти (НФК) з $\alpha 1$ -гліциновими рецепторами. А. Реєстрації $\alpha 1$ -опосередкованих струмів з використанням «довгого» протоколу при аплікації гліцину (30 мкмоль/л) у поєднанні із різними концентраціями НФК (30, 100 та 300 мкмоль/л), МП становив +30 мВ (верхні реєстрації) та -30 мВ (нижні реєстрації); Б. Відсотки інгібування гліциніндукованих 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 більш детального дослідження залежності дії ніфлумової кислоти на гліциніндуковані струми від мембранного потенціалу нами було застосовано «ремп» протокол, що дозволяє безперервну зміну МП від -80 до +80 мВ протягом 1 с (див. розділ методи). На рис. 3.3.3, А показано репрезентативні графіки залежності амплітуди струму (30 мкмоль/л гліцину) від МП в контролі та в присутності різних концентрацій ніфлумової кислоти (30, 100 та 300 мкмоль/л). Нами було відмічено, що для струмів індукованих ненасичуючою концентрацією

гліцину характерне вихідне випрямлення, імовірно, внаслідок вищої імовірності відкритого стану каналу $\alpha 1$ -рецепторів при позитивних потенціалах (Fucile et al., 1999).

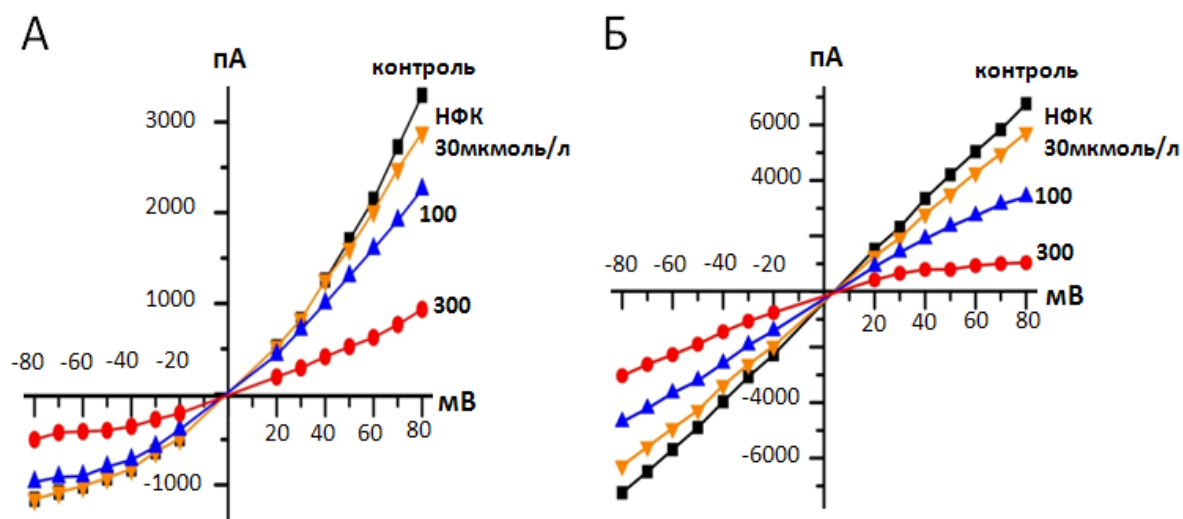


Рис. 3.3.3. Потенціалзалежність дії НФК на $\alpha 1$ -гліцинові рецептори. А. Репрезентативні криві залежності амплітуди струму від МП в контролі (30 мкмоль/л гліцину, чорні квадрати) та при аплікації суміші агоніста з НФК (30 мкмоль/л – жовті перевернуті трикутники; 100 – сині трикутники; 300 – червоні кола); **Б.** Репрезентативні криві залежності амплітуди струму від МП, струми індуковані аплікацією 100 мкмоль/л гліцину; концентрації НФК ті ж самі.

Використовуючі отримані криві залежності гліциніндукованого струму від МП у присутності різних концентрацій ніфлумової кислоти нами було визначено її IC_{50} (концентрацію напівмаксимального інгібування) при різних значеннях МП. Спорідненість ніфлумової кислоти до $\alpha 1$ -гліцинових рецепторів була порівняно низькою, однак нам вдалося підтвердити потенціалзалежність її взаємодії із гліциновими рецепторами (рис. 3.3.4). При -80 мВ IC_{50} ніфлумової кислоти склала 315 ± 30 мкмоль/л, в той час як при $+80$ мВ цей показник знизився до 197 ± 18 мкмоль/л ($n=10$, $p<0,01$). Потенціалзалежність взаємодії свідчить про високу вірогідність того, що її інгібіторний ефект обумовлений блокуванням пори каналу.

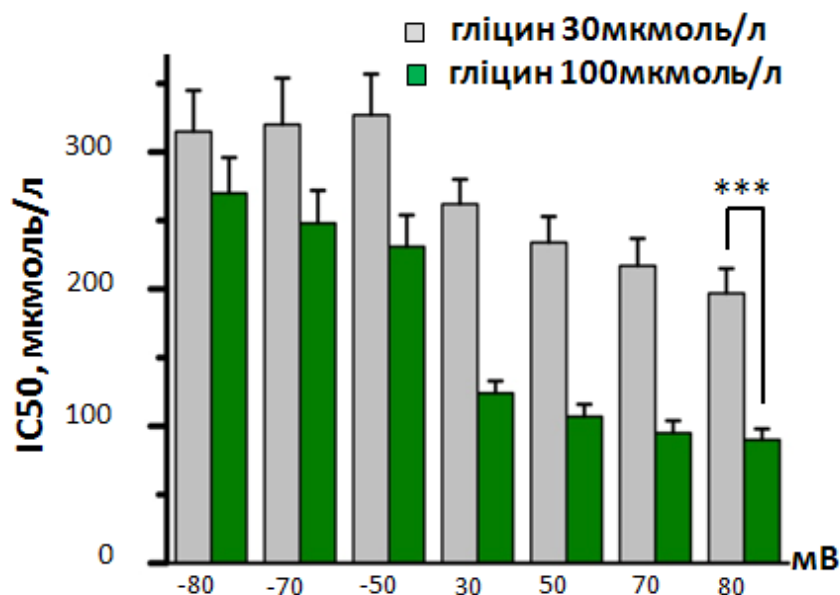


Рис. 3.3.4. IC₅₀ НФК для α1-гліцинових рецепторів. Струми індуковані аплікацією 30 мкмоль/л гліцину (сірі стовпчики) та 100 мкмоль/л гліцину (зелені стовпчики), *** $p < 0,001$.

Для перевірки даного припущення нами було проведено серію «ремп» експериментів із використанням насичуючої концентрації гліцину (100 мкмоль/л). У контролі струми індуковані аплікацією 100 мкмоль/л гліцину демонстрували лінійну залежність від величини мембранного потенціалу, що, ймовірно, було спричинене підвищенням середньої тривалості відкритого стану каналу як при позитивних, так і при негативних потенціалах (рис.3.3.3, Б). Аналіз кривих I/V залежностей, генерованих при аплікації 100 мкмоль/л гліцину та різних концентрацій ніфлумової кислоти, показав, що збільшення концентрації агоніста призводить до зростання ефективності взаємодії модулятора із рецептором: при -80 мВ IC₅₀ складала 270 ± 26 мкмоль/л, в той час як при +80 мВ – 90 ± 8 мкмоль/л ($n=10$, $p < 0,001$). Отримані результати підтверджують наше припущення щодо здатності ніфлумової кислоти виступати блокатором гліцинових рецепторів.

3.3.2. Дія ніфлумової кислоти на $\alpha 2$ -гліцинові рецептори

У ході аналізу взаємодії ніфлумової кислоти із $\alpha 2$ -гліциновими рецепторами було виявлено дві головні особливості. По-перше, даний тип рецепторів був інгібований із вищою ефективністю, ніж $\alpha 1$; по-друге, потенціалзалежність взаємодії була більш виражена.

Із використанням «довгого» протоколу аплікації нами було показано, що ніфлумова кислота у концентрації 10 мкмоль/л пригнічує струми, опосередковані $\alpha 2$ -субодиницями, на 50% при МП +30мВ (рис.3.3.5, А). В середньому 10 мкмоль/л НФК інгібували струми індуковані 30 мкмоль/л гліцину на $28 \pm 3\%$ при -30 мВ та на $57 \pm 2\%$ при +30мВ, 30 мкмоль/л на $47 \pm 3\%$ та $68 \pm 8\%$ відповідно, 100 мкмоль/л на $69 \pm 4\%$ та $91 \pm 4\%$ відповідно ($n=4$, рис. 3.3.5, Б). Отже, для даної субодиниці також була характерною потенціалзалежність взаємодії із ніфлумовою кислотою, особливо при аплікації її низьких концентрацій ($p < 0,001$).

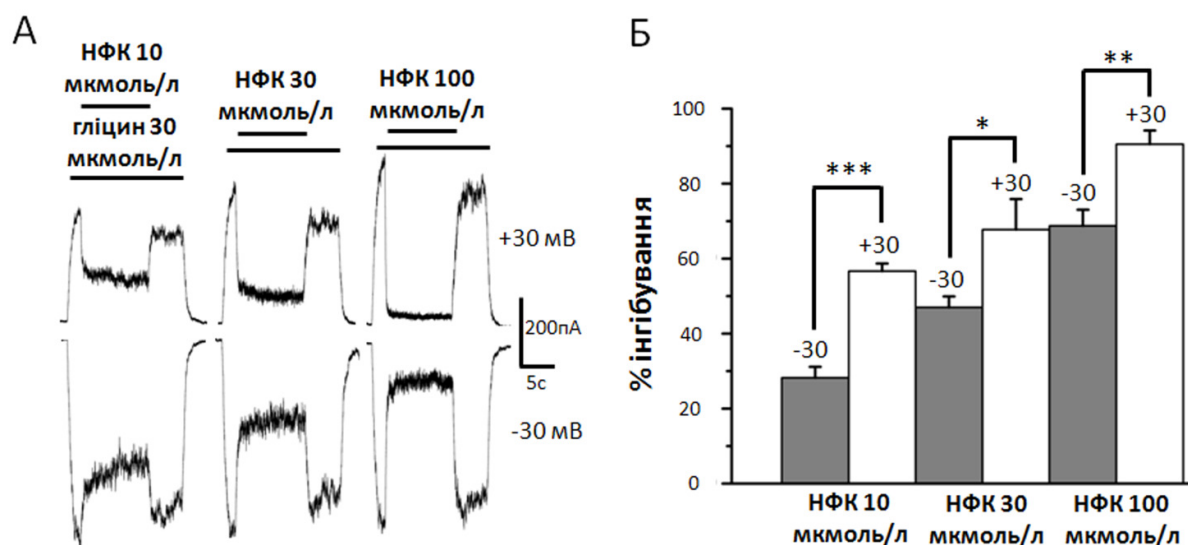


Рис. 3.3.5. Взаємодія $\alpha 2$ -гліцинових рецепторів з НФК. А. Пригнічення гліциніндукованих струмів (30 мкмоль/л) аплікацією різних концентрацій НФК (10, 30, 100 мкмоль/л), мембранний потенціал становив +30 мВ (верхні реєстрації) та -30 мВ (нижні реєстрації); **Б.** Відсоток інгібування $\alpha 2$ -опосередкованих струмів під дією 10, 30 та 100 мкмоль/л НФК; МП -30мВ – сірі стовпчики, +30 мВ – білі стовпчики (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Більш детальне дослідження взаємодії ніфлумової кислоти із $\alpha 2$ -гліциновими рецепторами було проведене із застосуванням «ремп» протоколу. У контролі, на противагу $\alpha 1$ -гліциновим рецепторам, струми активовані ненасичуючою концентрацією гліцину (30 мкмоль/л) демонстрували вхідне випрямлення (рис.3.3.6, А). Ймовірно, це пов'язане із тим, що для $\alpha 2$ -гліцинових рецепторів вірогідність відкритого стану каналу вища при негативних потенціалах. Іншою характерною рисою взаємодії ніфлумової кислоти із $\alpha 2$ -рецепторами була значна залежність її ефекту від мембранного потенціалу. Так при -80мВ IC_{50} для ніфлумової кислоти складала 166 ± 28 мкмоль/л, в той час як при +80мВ цей показник знижувався до 9 ± 2 мкмоль/л ($n=8$, $p<0,0001$, рис.3.3.6, Б).

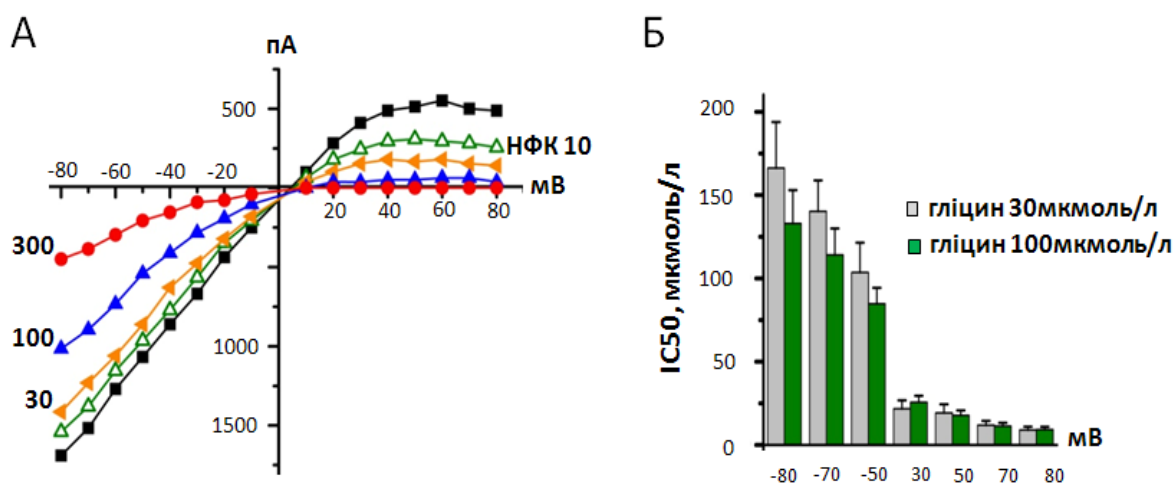


Рис. 3.3.6. Потенціалзалежність взаємодії НФК із $\alpha 2$ -гліциновими рецепторами. А. Репрезентативні криві залежності амплітуди $\alpha 2$ -опосередкованого струму від МП в контролі (чорні квадрати) та під час аплікації різних концентрацій НФК (10 мкмоль/л – пусті зелені трикутники; 30 – жовті перевернуті трикутники; 100 – сині трикутники; 300 – червоні кола); **Б.** IC_{50} НФК при різних МП, струми було індуковано аплікацією 30 мкмоль/л (сірі стовпчики) та 100 мкмоль/л (зелені) гліцину.

На відміну від $\alpha 1$ -гліцинових рецепторів, при підвищенні концентрації агоніста зниження IC_{50} ніфлумової кислоти для $\alpha 2$ -рецепторів не спостерігалось. Струми індуковані 100 мкмоль/л гліцину були пригнічені аплікацією модулятора із IC_{50} 133 ± 20 мкмоль/л при -80мВ та 9 ± 2 мкмоль/л при +80мВ ($n=7$).

В момент закінчення аплікації суміші гліцину та ніфлумової кислоти було зареєстровано «хемп» (залишковий струм), що не був помічений при одночасній аплікації гліцину та кислоти на $\alpha 1$ -гліцинові рецептори (рис.3.3.7). Залишковий струм був присутній як при позитивних, так і при негативних мембранних потенціалах.

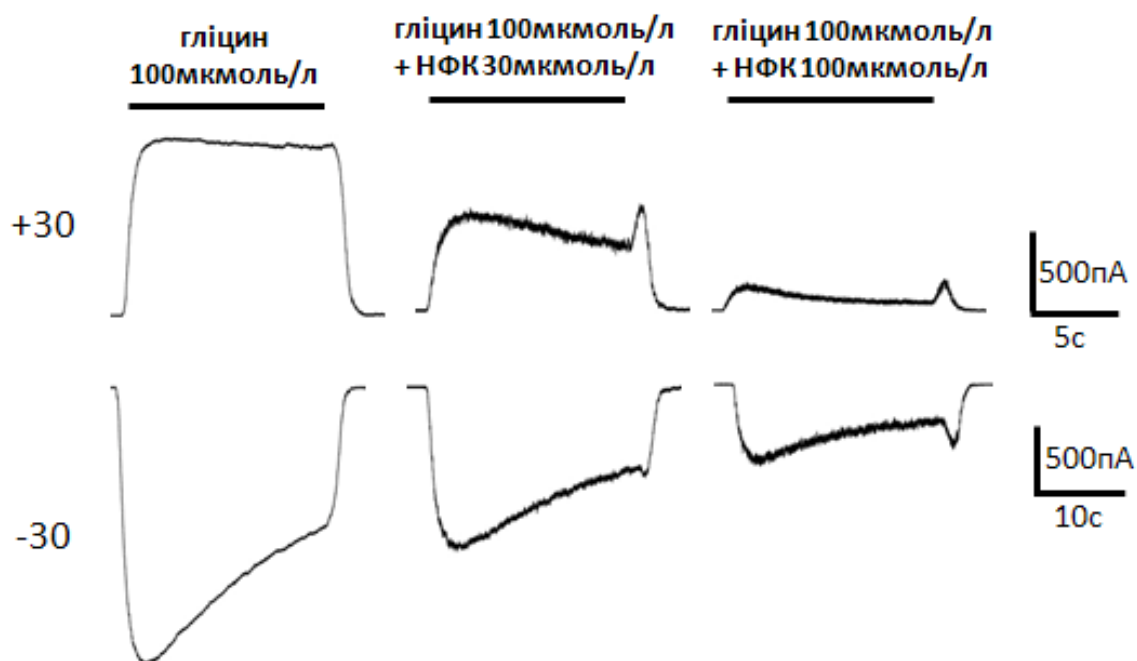


Рис. 3.3.7. Залишковий струм, що виникає під час закінчення одночасної аплікації гліцину (100 мкмоль/л) і НФК (30 та 100 мкмоль/л) при +30 мВ (верхні реєстрації) та -30 мВ (нижні реєстрації).

3.3.3. Дія ніфлумової кислоти на $\alpha 3$ -гліцинові рецептори

Оскільки дві різні субодиниці гліцинового рецептора по-різному взаємоділяли із ніфлумовою кислотою, ми вважали за доцільне дослідити особливості її впливу на функціонування $\alpha 3$ -гліцинових рецепторів.

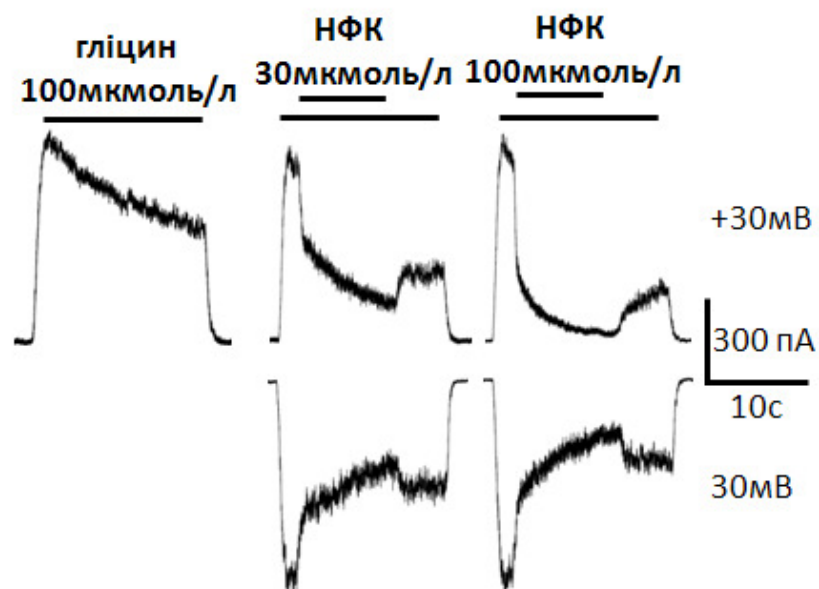


Рис. 3.3.8. Взаємодія $\alpha 3$ -гліцинових рецепторів з НФК. $\alpha 3$ -опосередковані струми індуковані аплікацією 100 мкмоль/л гліцину та сумішню гліцину із різними концентраціями НФК (30 та 100 мкмоль/л); МП становив +30 мВ (верхні реєстрації) та -30 мВ (нижні реєстрації).

Для індукції струмів було використано гліцин у концентрації 100 мкмоль/л, оскільки раніше було показано, що ED_{50} для $\alpha 3$ -рецепторів є вищою, ніж для інших субодиниць гліцинового рецептора (Maleeva et al., 2015). Реєстрації із застосуванням «довгого протоколу» показали, що ніфлумова кислота пригнічує активність $\alpha 3$ -субодиниць із вищою ефективністю, ніж $\alpha 1$ -субодиниць гліцинового рецептора (рис.3.3.8). Ніфлумова кислота у концентрації 30 мкмоль/л знижувала амплітуду струмів опосередкованих $\alpha 3$ -рецепторами на $32 \pm 4\%$ при -30 мВ та на $62 \pm 5\%$ при +30 мВ, в той час як 300 мкмоль/л ніфлумової кислоти інгібували іонні струми на $86 \pm 5\%$ та на $90 \pm 2\%$ відповідно ($n=7$).

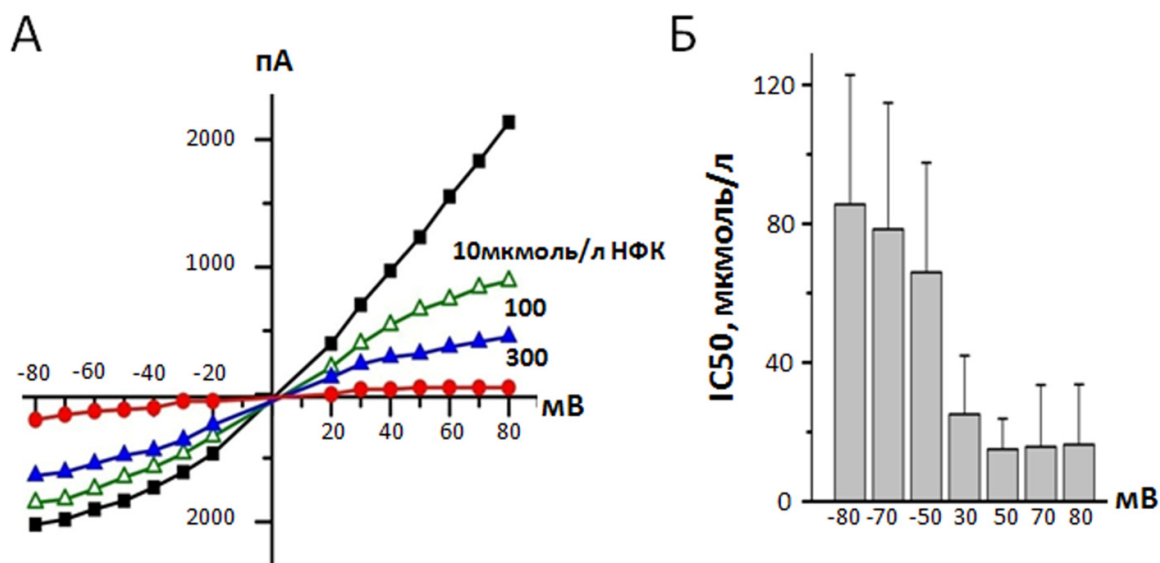


Рис. 3.3.9. Потенціалзалежність дії НФК на $\alpha 3$ -гліцинові рецептори. А. Репрезентативні криві залежності амплітуди гліциніндукованого струму від мембранного потенціалу в контролі та при аплікації різних концентрацій НФК (10, 100, 300 мкмоль/л); **Б.** IC₅₀ НФК для $\alpha 3$ -гліцинових рецепторів при різних мембранних потенціалах.

Так само, як і для двох інших субодиниць гліцинового рецептора, ефективність дії ніфлумової кислоти була вищою при позитивних мембранних потенціалах – при -80 мВ IC₅₀ ніфлумової кислоти склала 86±14 мкмоль/л, в той час як при +80 мВ - 16±6 мкмоль/л (n=7, рис.3.3.9, Б). Таким чином, чутливість $\alpha 3$ -субодиниць гліцинового рецептора до НФК була вищою, ніж $\alpha 1$ -гліцинових рецепторів, та близькою до чутливості $\alpha 2$ -субодиниць. Із використанням «ремп» протоколу також було встановлено, що струми, опосередковані $\alpha 3$ -рецепторами, мають вихідне випрямлення (рис.3.3.9, А).

3.3.4. Дія ніфлумової кислоти на мутантні G254A рецептори

Отримані нами дані показали, що $\alpha 2$ - та $\alpha 3$ -субодиниці рецептора мають високу спорідненість до ніфлумової кислоти, у той час як $\alpha 1$ -рецептори менш чутливі до її інгібуючого впливу. Окрім того, наші результати свідчать про високу ймовірність взаємодії ніфлумової кислоти із порою каналу, а отже ТМ2

доменом, що відповідає за її формування. Спираючись на вище зазначені результати, нами було висунуто припущення, що різниця у чутливості $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -субодиниць до даного модулятора обумовлена відмінністю амінокислотних послідовностей їх ТМ2 доменів. У 2' позиції пори $\alpha 1$ -рецептори мають G, тоді як $\alpha 2$ та $\alpha 3$ – A (рис.3.3.10, А).

Для перевірки цієї гіпотези нами було здійснено точкову мутацію $\alpha 1$ -субодиниці – амінокислотний залишок G254 був замінений на А. Згідно із нашим припущенням мутація даної амінокислоти мала призвести до підвищення ефективності дії ніфлумової кислоти на $\alpha 1$ -гліцинові рецептори.

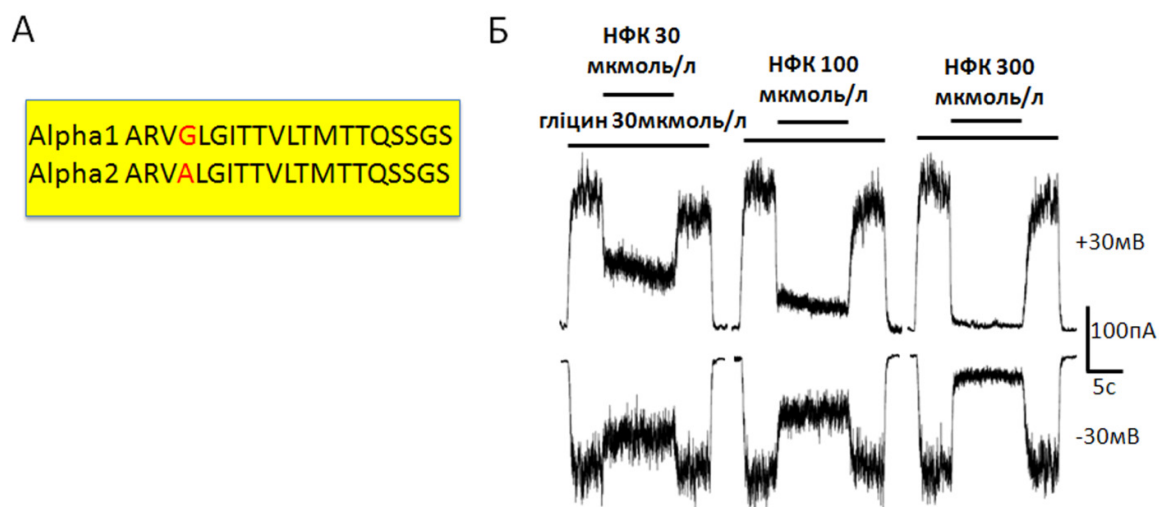


Рис. 3.3.10. Взаємодія НФК із $\alpha 1$ G254A рецепторами. А. Амінокислотна послідовність ТМ2 доменів $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -субодиниць гліцинового рецептора (здійснена нами амінокислотна заміна виділена червоним); Б. Дія різних концентрації НФК (30, 100 та 300 мкмоль/л) на струми індуковані 30 мкмоль/л гліцину.

Перш за все нами було визначено спорідненість мутантного G254A $\alpha 1$ -рецепора до гліцину. Аналіз кривих концентраційної залежності показав, що ED_{50} гліцину для $\alpha 1$ G254A є близькою до ED_{50} для $\alpha 1$ -рецепторів дикого типу і складає 34 ± 6 мкмоль/л ($n=7$).

Струми опосередковані $\alpha 1$ G254A рецепторами, активовані із застосуванням «довгого» протоколу (30 мкмоль/л гліцину), були пригнічені

ніфлумовою кислотою із дещо вищою ефективністю, ніж струми, опосередковані $\alpha 1$ -рецепторами дикого типу (рис.3.3.10, Б). Зокрема, при МП -30 мВ та концентрації ніфлумової кислоти 30, 100 та 300 мкмоль/л амплітуда струмів знижувалася на $22\pm 4\%$, 34 ± 6 та 52 ± 11 ($n=6$) відповідно, в той час як при +30 струми були інгібовані на $23\pm 7\%$, 43 ± 10 та $76\pm 4\%$ ($n=7$) відповідно.

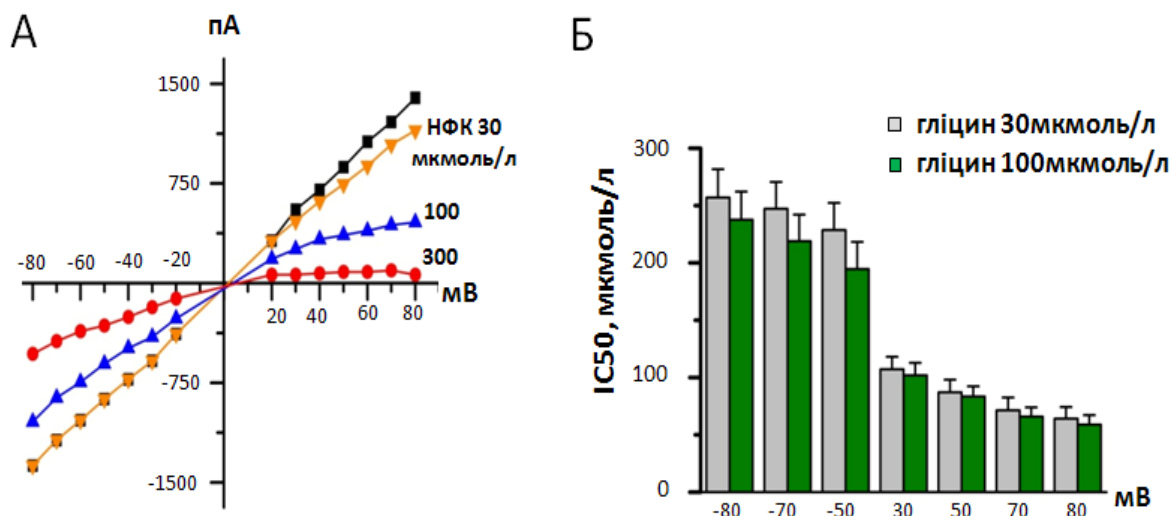


Рис. 3.3.11. Потенціалзалежність дії НФК на мутантні $\alpha 1$ -гліцинові рецептори. А. Репрезентативні криві I/V залежності для $\alpha 1$ G254A рецепторів в контролі та при аплікації різних концентрацій НФК; Б. НФК IC_{50} при аплікації 30 (сірі стовбчики) та 100 мкмоль/л (зелені) гліцину.

Даний ефект був більш яскраво виражений при збільшенні амплітуди зміни мембранного потенціалу, що досягалося із використанням «ремп» протоколу (рис.3.3.11, А). При +80мВ IC_{50} ніфлумової кислоти становила 64 ± 10 мкмоль/л ($n=13$), що значно нижче, ніж для $\alpha 1$ -рецепторів дикого типу (рис.3.3.11, Б). 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.3.3.12). На противагу $\alpha 1$ -рецепторам дикого типу, при підвищенні концентрації агоніста ефективність інгібування $\alpha 1$ G254A не збільшувалася (67 ± 8 мкмоль/л при +80мВ, $n=10$).

Отже, мутація G254A у $\alpha 1$ -субодиниці підвищила ефективність її інгібування ніфлумовою кислотою, однак чутливість $\alpha 1$ -мутантних рецепторів залишилася нижчою, ніж чутливість $\alpha 2$ - та $\alpha 3$ -рецепторів. Це свідчить про наявність кількох сайтів взаємодії ніфлумової кислоти із гліциновим рецептором.

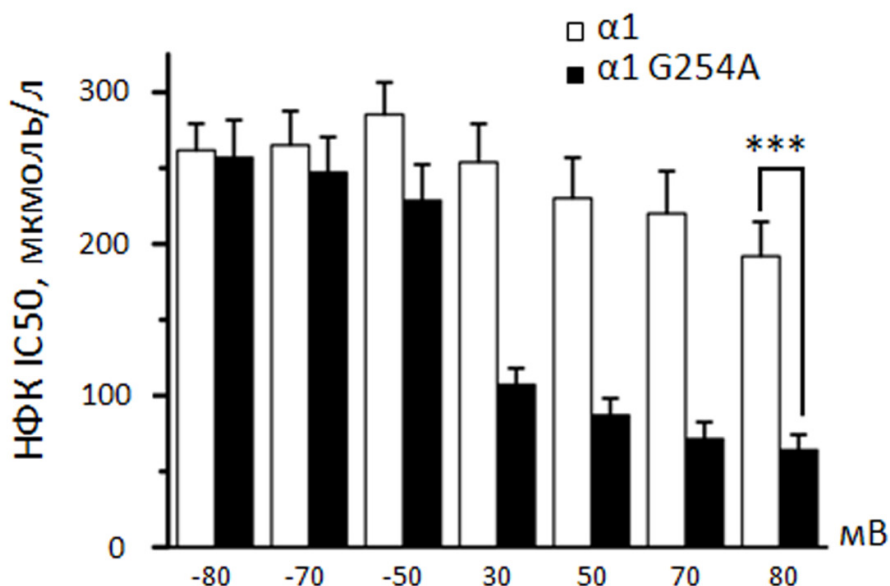


Рис. 3.3.12. Порівняння IC_{50} НФК для мутантних $\alpha 1$ G254A рецепторів та $\alpha 1$ -рецепторів дикого типу; струм індукований апілкацією 30 мкмоль/л гліцину; $\alpha 1$ - білі стовпчики, $\alpha 1$ G254A - чорні стовпчики; *** $p < 0,001$.

3.3.5. Дія ніфлумової кислоти на гетеромерні $\alpha 1\beta$ - та $\alpha 2\beta$ -гліцинові рецептори

Переважаючим підтипом гліцинових рецепторів у ЦНС хребетних є гетеромерний $\alpha 1\beta$ -рецептор (Lynch, 2004). Окрім того, кілька модуляторів гліцинових рецепторів мають різну спорідненість до гомомерних та гетеромерних рецепторів. Зокрема, пікротоксин (Pribilla et al., 1992) та гінкголіди (Kondratskaya et al., 2005). Спираючись на ці дані ми вважали за доцільне встановити особливості взаємодії гетеромерних гліцинових рецепторів із ніфлумовою кислотою.

Для доведення формування функціональних гетеромерних рецепторів нами було використано широкоуживаний «пikротоксिनний тест». Даний тест базується на тому, що пікротоксин блокує гетеромерні рецептори із набагато меншою ефективністю, ніж гомомерні (Pribilla et al., 1992; Shan et al., 2001). У наших експериментах під час аплікації 20 мкмоль/л пікротоксину лише $27 \pm 3\%$ ($n=12$) струму, опосередкованого гомомерними $\alpha 1$ -рецепторами (30 мкмоль/л гліцину), не були заінгібовані. В той самий час, для гетеромерних $\alpha 1\beta$ -рецепторів цей показник склав $75 \pm 2\%$ ($n=15$, рис.3.3.13, А, В). Подібна картина спостерігалася і у випадку $\alpha 2$ -рецепторів – лише $3 \pm 1\%$ ($n=6$) струму залишалися інтактними під час аплікації 20 мкмоль/л пікротоксину, тоді як для $\alpha 2\beta$ -рецепторів цей показник підвищився до $41 \pm 4\%$ ($n=7$, рис.3.3.13, Б).

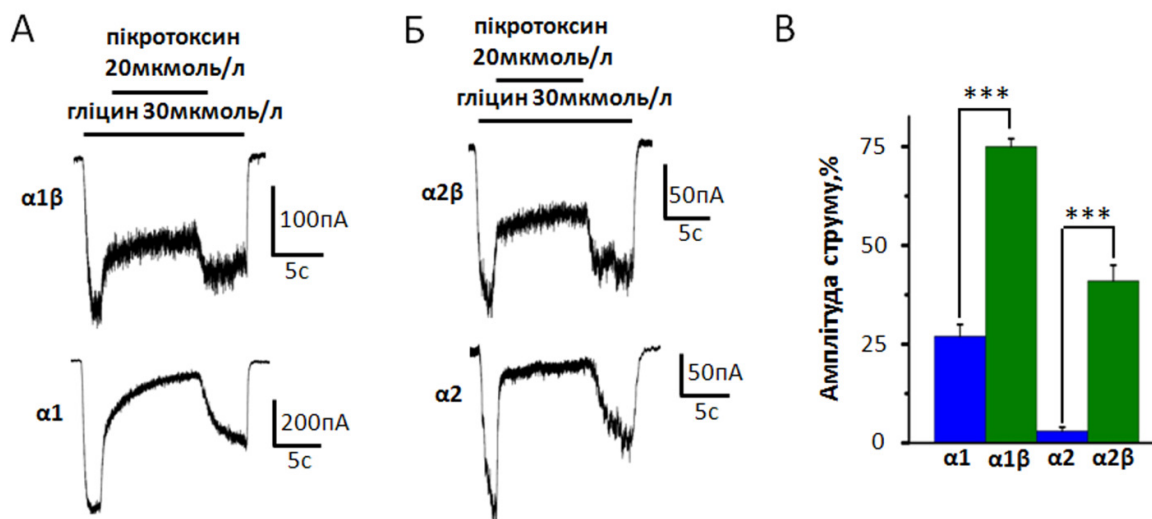


Рис. 3.3.13. Взаємодія гомомерних та гетеромерних рецепторів із пікротоксином. А. Пригнічення активності гетеромерних $\alpha 1\beta$ (верхня реєстрація) та $\alpha 1$ -рецепторів (нижня реєстрація) при аплікації 20 мкмоль/л пікротоксину (30 мкмоль/л гліцину, МП -30 мВ). Б. Інгібування гетеромерних $\alpha 2\beta$ (верхня реєстрація) та $\alpha 2$ -рецепторів (нижня реєстрація) при аплікації 20 мкмоль/л пікротоксину (30 мкмоль/л гліцину, МП -30 мВ). В. Амплітуда струму (% від контролю) при аплікації пікротоксину (20 мкмоль/л) для $\alpha 1$, $\alpha 1\beta$, $\alpha 2$, $\alpha 2\beta$ -рецепторів.

Для детального дослідження взаємодії ніфлумової кислоти із гетеромерними гліциновими рецепторами нами було використано «ремп» протокол. Подібно до гомомерних $\alpha 1$ -рецепторів для струмів, опосередкованих гетеромерними $\alpha 1\beta$ (30 мкмоль/л гліцину), було характерним вихідне випрямлення. Аналіз кривих залежності амплітуди струму від мембранного потенціалу показав, що вбудовування β -субодиниці суттєво не вплинуло на чутливість $\alpha 1$ -рецепторів до ніфлумової кислоти – IC_{50} при +80 мВ становила 150 ± 4 мкмоль/л, а при -80 мВ - 256 ± 32 мкмоль/л ($n=5$, рис.3.3.14, А)

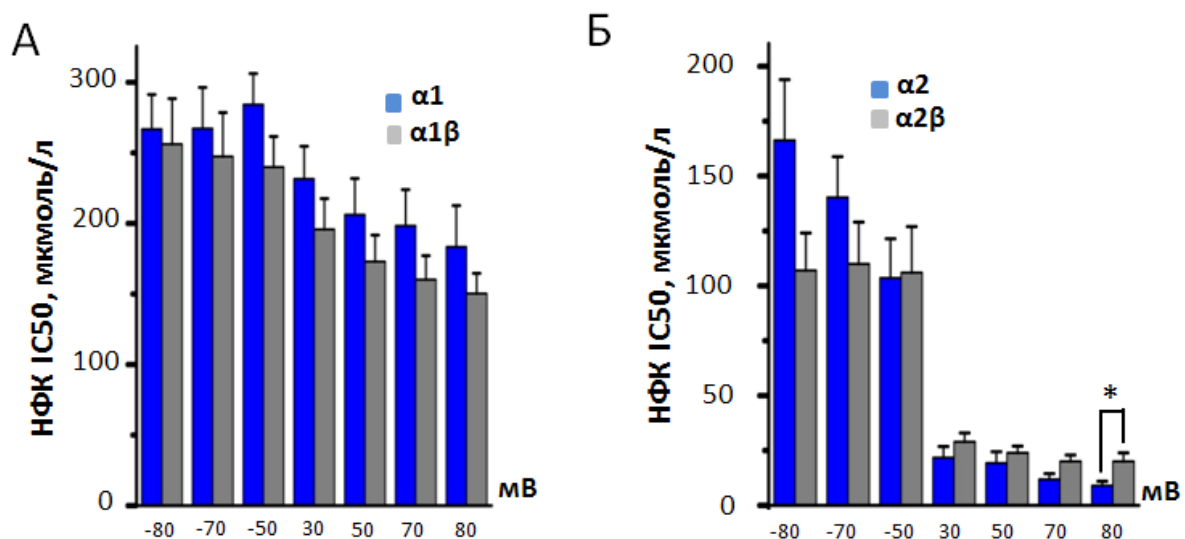


Рис. 3.3.14. Чутливість гетеромерних $\alpha 1\beta$ - та $\alpha 2\beta$ -рецепторів до НФК. А. IC_{50} НФК для $\alpha 1$ (сині стовпчики) та $\alpha 1\beta$ -рецепторів (сірі стовпчики) при різних МП. Б. IC_{50} НФК для $\alpha 2$ (сині стовпчики) та $\alpha 2\beta$ -рецепторів (сірі стовпчики) при різних МП, * $p < 0,05$.

Цікаво, що струми, опосередковані гетеромерними $\alpha 2\beta$ -рецепторами також мали вихідне випрямлення, на противагу рецепторам, сформованим лише $\alpha 2$ -субодиницями (рис.3.3.15 А, Б). Ступінь потенціалзалежності взаємодії $\alpha 2$ -рецепторів із ніфлумовою кислотою знизився внаслідок коекспресії β -субодиниці – IC_{50} при -80 мВ склала 107 ± 37 мкмоль/л, а при +80 мВ – 20 ± 8 мкмоль/л (рис. 3.3.14, Б).

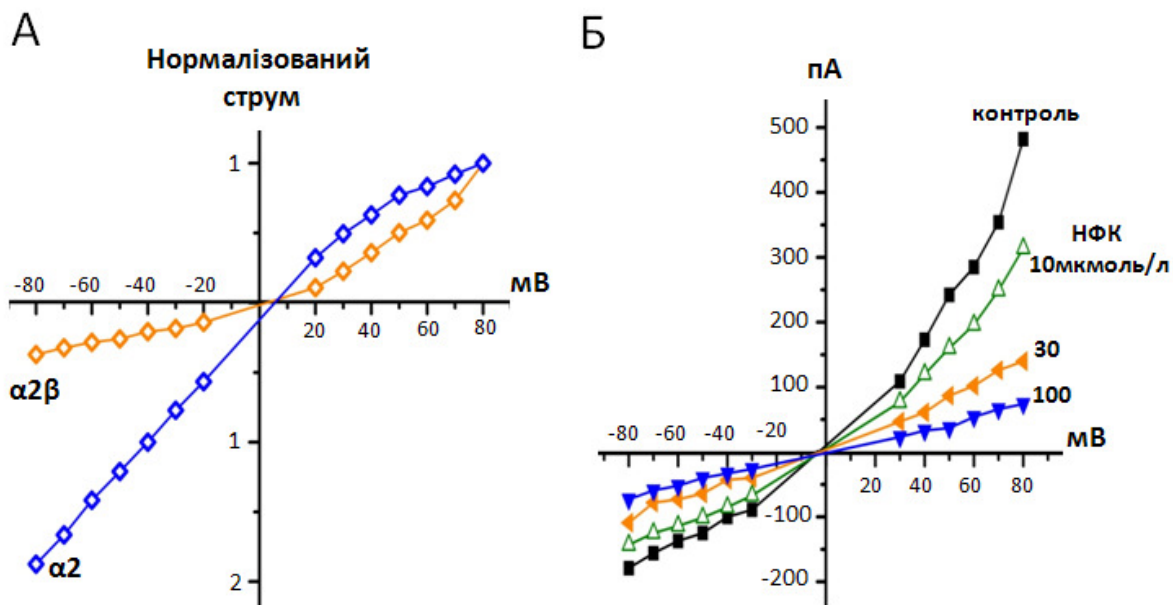


Рис. 3.3.15. Потенціалзалежність струмів опосередкованих $\alpha 2\beta$ в контролі та при дії НФК. А. Репрезентативні криві залежності амплітуди струму від МП для $\alpha 2\beta$ - (жовтий) та $\alpha 2$ -рецепторів (синій). Б. Репрезентативні криві залежності амплітуди струму від МП для $\alpha 2\beta$ -рецепторів в контролі (30 мкмоль/л, чорні квадрати) та при аплікації НФК: 10 мкмоль/л (пусті зелені трикутники), 30 мкмоль/л (перевернуті жовті трикутники), 100 мкмоль/л (сині трикутники).

Таким чином, β -субодиниця не мала значного впливу на взаємодію гліцинового рецептора із ніфлумовою кислотою, однак нами було відмічене зниження рівня потенціалзалежності взаємодії ніфлумової кислоти із $\alpha 2\beta$ -рецепторами, порівняно із $\alpha 2$.

Нам вдалося показати, що ніфлумова кислота, являючись блокатором потенціалкерованих Cl^- -каналів має здатність пригнічувати роботу лігандкерованих гліцинових рецепторів. При цьому вона демонструє різну спорідненість до різних субодиниць рецептора та, найімовірніше, виступає блокатором пори каналу.

3.4. Характеристика потенціалактивованих та лігандкерованих іонних каналів, що експресуються нейронами отриманими з ПСК людини

Генерація нейронів із індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (ПСК) є революційним методом, що надав прижиттєвий доступ до нейронів людини. Зокрема, даний тип нейронів може бути використаний для дослідження функціонування гліцинових рецепторів як у нормі, так і у випадку різних патологій ЦНС.

Співробітниками інституту *Medical Genetics and Functional Genomics (INSERM, Aix-Marseille Université, Marseille, France)* було розроблено новий протокол генерації нейронів із фібробластів людини, що не вимагає використання клітин-годувальниць та формування ембріодних тілець. Даний протокол представляє собою вискоєфективний та низькозатратний метод генерації нейронів із соматичних клітин людини (Badja et al., 2014).

Електрофізіологічне дослідження нейронів людини, отриманих із використанням даного методу, мало на меті охарактеризувати потенціалкеровані та лігандкеровані іонні канали, експресовані ними. У дослідженні було використано клітини, що культивувалися протягом 7-35 днів після індукції остаточної диференціації.

Потенціал спокою досліджуваних клітин коливався в межах від -20 до -60 мВ і становив у середньому -39 ± 3 мВ ($n=17$), вхідний опір складав 634 ± 136 МОм ($n=19$).

3.4.1 Дослідження натрієвих та калієвих потенціалкерованих каналів індукованих нейронів людини

Для реєстрації струмів, опосередкованих потенціалкерованими натрієвими та калієвими каналами, було використано метод покрокової зміни мембранного потенціалу. Більшість досліджених клітин (32 із 37) демонстрували наявність потенціалкерованих вхідного та вихідного струмів при деполяризації мембрани від -80 до +120 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 вибіркового антагоніста потенціалкерованих натрієвих каналів – тетродотоксину (TTX) (рис. 3.4.1, А).

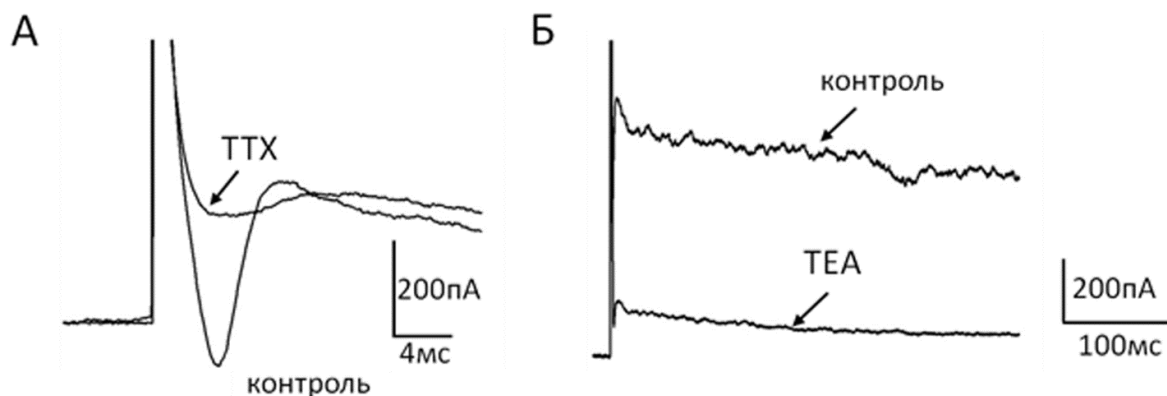


Рис. 3.4.1. Струми опосередковані потенціалкеруваними каналами нейронів, генерованих з ІПСК. А. Вхідний натрієвий струм у контролі та після аплікації TTX при МП -20 мВ. Б. Вихідний калієвий струм у контролі та після аплікації TEA при МП $+30$ мВ.

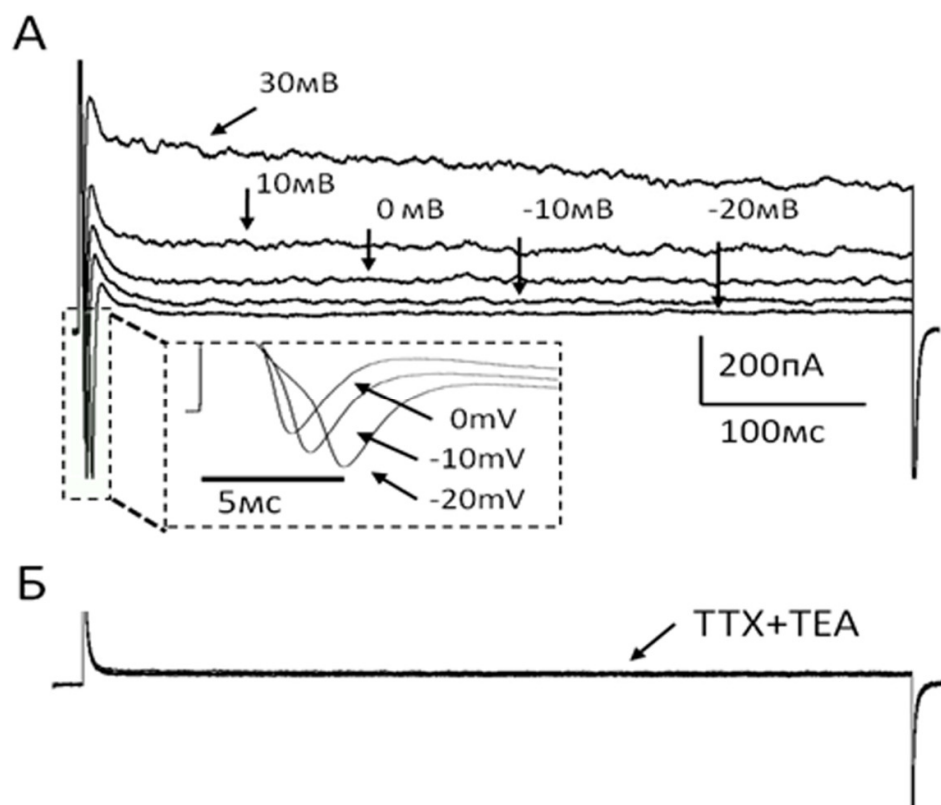


Рис. 3.4.2. Вхідний натрієвий та вихідний калієвий струми при різних значення мембранного потенціалу в контролі (А) та під час аплікації ТТХ та ТЕА (Б).

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 (ТЕА), що є специфічним блокатором потенціалкерованих калієвих каналів (рис.3.4.1, Б). Середня амплітуда вихідного струму при +30 мВ становила 453пА (n=32). Нами було відмічено зростання амплітуди калієвого струму, залежно від тривалості культивування клітин. На сьомий день культивування максимальна амплітуда калієвих струмів становила 272 ± 96 пА (n=5), в той час як на 35-й день цей показник сягнув 694 ± 52 пА (n=5). Одночасна аплікація тетродотоксину та тетраетиламонію спричинювала блокаду вхідного та вихідного потенціалактивованих струмів (рис.3.4.2, А, Б).

Отже, нейрони, що були отримані в результаті диференціації ПСК, володіють головними характеристиками притаманними збудливим клітинам центральної нервової системи – експресують на своїй поверхні потенціалкеровані натрієві та калієві канали, а отже здатні генерувати потенціали дії.

3.4.2 Встановлення наявності лігандкерованих іонних каналів на нейронах, що походять з індукованих плюрипотентних клітин людини

Визначення особливостей функціонування нейронів генерованих з ПСК передбачає характеристику лігандкерованих рецепторів, що ними експресуються. Для встановлення наявності даного підтипу рецепторів на поверхні нейронів, отриманих з ПСК, нами було застосовано метод швидкої аплікації специфічних агоністів, зокрема гліцину, ацетилхоліну та γ -аміномасляної кислоти (рис.3.4.3).

Середня амплітуда струму, індукованого 1 ммоль/л гліцину склала 223 ± 64 мкмоль/л ($n=19$), а ГАМК-індукованого 368 ± 65 ($n=25$).

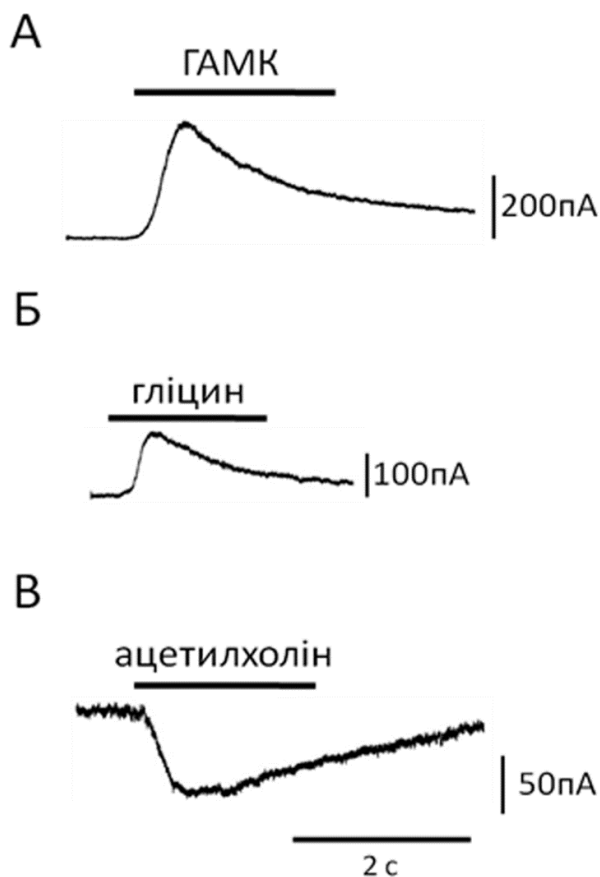


Рис. 3.4.3. Іонні струми індуковані аплікацією агоністів лігандкерованих іонотропних каналів: ГАМК (А), гліцином (Б) та ацетилхоліном (В).

Варто зазначити, що струми, опосередковані гліциновими та ГАМК-рецепторами, були зареєстровані вже на 7-й день після стимуляції диференціації культивування, в той час як іонний струм у відповідь на аплікацію ацетилхоліну вперше було зареєстровано лише на 21-й день культивування.

Для підтвердження хлорної вибіркової ГАМК-індукованого струму нами було визначено його потенціал реверсії. Як показано на рис.3.4.4 він становив – 50 мВ, що є близьким для теоретично обрахованого потенціалу реверсії для даної концентрації хлору.

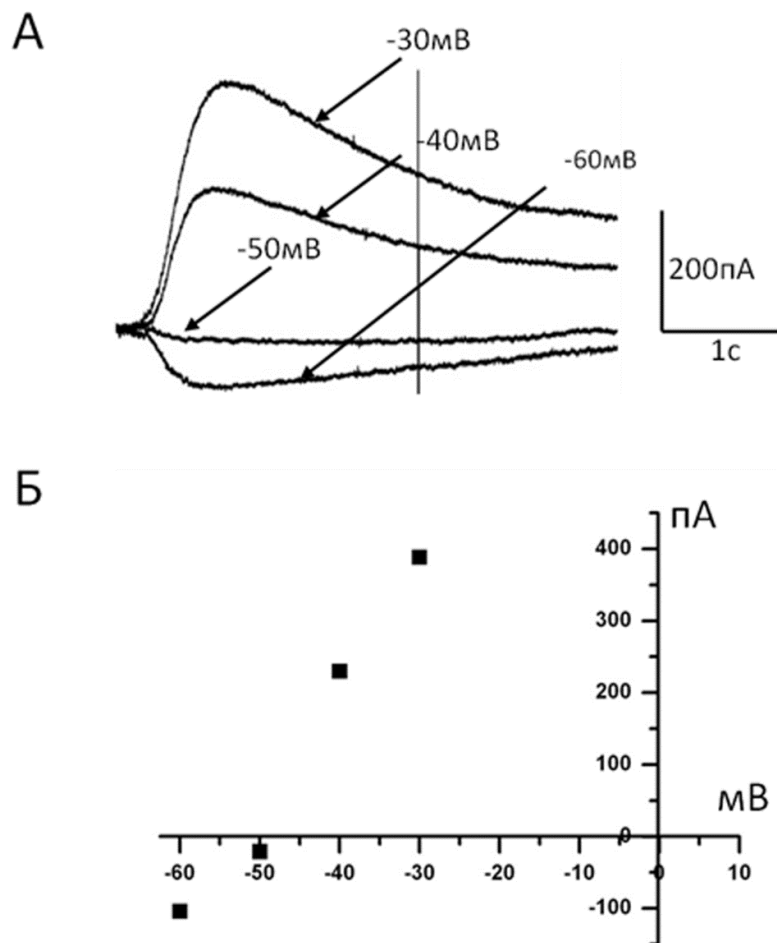
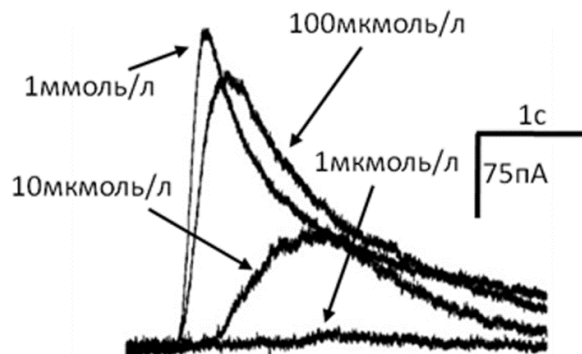


Рис. 3.4.4. Потенціалзалежність струмів опосередкованих ГАМК-рецепторами індукованих нейронів. А. Реєстрації ГАМК-індукованих струмів при різних значеннях мембранного потенціалу; Б. Крива залежності амплітуди струму, опосередкованого ГАМК-рецепторами, від МП.

ЕД₅₀ ГАМК для рецепторів, експресованих генерованими нейронами, варіювала в досить широкому діапазоні від 6 до 65 мкмоль/л і в середньому складала 22 ± 4 мкмоль/л ($n=18$) (рис.3.4.5). Варто зазначити, що чутливість ГАМК рецепторів до агоніста може сильно коливатися в залежності від субодиничної композиції, локалізації у ЦНС та стадії розвитку (Mehta et al., 1988; Hsiao et al., 1998). У наших експериментах було відмічено тенденцію до зниження чутливості рецептора до ГАМК зі зростанням терміну культивування.

На 8-й день у культурі ED_{50} для ГАМК становила 19 ± 4 мкмоль/л ($n=6$), в той час як на 21-й день її значення збільшилося до 35 ± 19 мкмоль/л ($n=3$).

А



Б

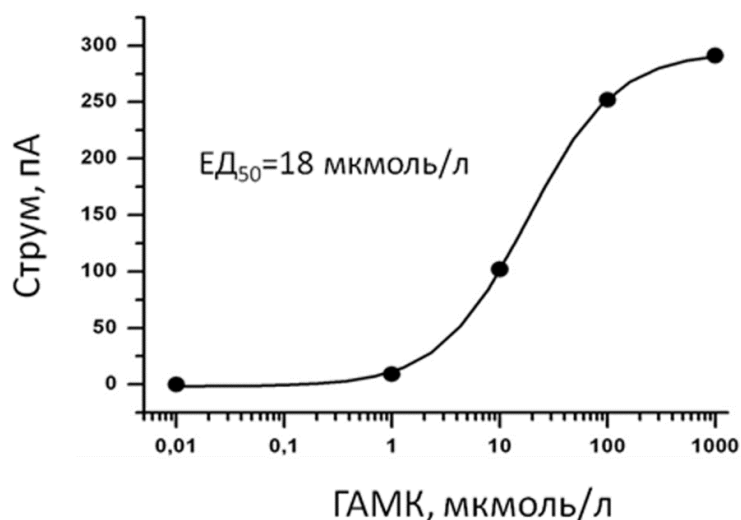


Рис. 3.4.5. ED_{50} ГАМК для ГАМК-рецепторів, експресованих індукованими нейронами. А. Реєстрації струмів, індукованих різними концентраціями ГАМК. Б. Крива залежності амплітуди струму від концентрації аплікованої ГАМК.

Отже, нами було продемонстровано, що нейрони генеровані з ІПСК людини експресують на своїй поверхні потенцалкеровані та лігандкеровані іонні канали, що є важливою ознакою приналежності даних клітин до нейронального

типу. Нами вперше було показано, що даний тип нейронів експресує на своїй поверхні гліцинові рецептори.

Розробка та вдосконалення методів генерації нейронів з фібробластів людини, а також вивчення властивостей отриманих нейронів є важливими напрямками як фундаментальних, так і медичних досліджень. Це дозволить більш точно встановити причини розвитку нейрологічних захворювань та розробити індивідуальні стратегії терапії. Окрім того, дана система може бути використана для вивчення молекулярних особливостей функціонування нейронів.

РОЗДІЛ 4

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Функціонування ЦНС визначається взаємодією двох основних синаптичних сигналів – збудження і гальмування. Гліцинові рецептори є важливим компонентом системи швидкої гальмівної нейротрансмісії у ЦНС. Локалізуючись переважно у спинному мозку та стовбурі мозку, вони відіграють провідну роль у регуляції активності мотонейронів, процесах дихання та обробки больових відчуттів (Schmid et al., 1991; Malosio et al., 1991; Harvey et al., 2004). Окрім того, гліцинові рецептори експресовані у різних зонах головного мозку, де вони беруть участь у контролі збудливості нейрональних мереж. Зокрема, дану функцію виконують гліцинові рецептори локалізовані у гіпокампі (Chattipakorn and McMahon 2002; Brackmann et al., 2004).

4.1. Модуляція експресії гліцинових рецепторів під дією КГД

Аналіз літератури показав, що рівень активності гліцинових рецепторів гіпокампа може впливати на стан нервової тканини після КГД (Tanabe et al., 2010; Yao et al., 2012). Однак, вивчення даного процесу ускладнюється тим фактом, що агоніст гліцинових рецепторів є також ко-агоністом НМДА рецепторів (Johnson and Ascher, 1987). Зміщення балансу між гліцинергічною та глутаматергічною системами може суттєвим чином вплинути на функціонування нейрональних мереж гіпокампа та життєздатність нейронів.

Нервова тканина є високо вразливою до впливу киснево-глюкозної депривації. Нами було показано, що через 1 та 4 години після початку реоксигенації спостерігаються значні зміни енергетичного метаболізму мітохондрій пірамідних нейронів CA1 зони гіпокампа. Зокрема, через 1 год після КГД активність мітохондрій, визначена шляхом забарвлення клітин *MitoTracker Orange*, підвищується. Ці зміни свідчать про зниження рівня АТФ у клітині та необхідність компенсування втрати за рахунок посилення мітохондріального метаболізму (Folbergova et al., 1992). Однак, порушення цілісності електрон-

транспортного ланцюга мітохондрій, підвищення продукції вільних радикалів та дизрегуляція кальцієвого гомеостазу (Lipton, 1999) призводять до зниження рівня активності мітохондрій з часом. Даний ефект спостерігався нами через 4 год після КГД.

Надмірне виділення агоніста НМДА рецепторів, глутамата, з пресинаптичного закінчення є одним із пошкоджуючих факторів при ішемії мозку. Надактивація НМДА рецепторів призводить до деполяризації клітин, підвищення частоти генерації потенціалів дії, порушення іонного та енергетичного метаболізму, запуску катаболічних процесів (Lipton 1999). Головним наслідком підвищення концентрації глутамату у синаптичній щілині є активація НМДА-рецепторів, що спричинює збільшення концентрації кальцію у постсинаптичних нейронах (Goldberg and Choi, 1993). Являючись вторинним посередником багатьох внутрішньоклітинних сигнальних каскадів, кальцій може суттєво змінювати функціональний стан нейронів (Hanson et al., 1994; Logica et al., 2016). Поміж іншим, кальцій, надходження якого опосередковане НМДА рецепторами, сприяє активації протеїнкіназ: CaMKII (Coultrap et al., 2011) та PKC (Nishizuka, 1992).

Варто зазначити, що активація НМДА рецепторів вимагає присутності у синаптичній щілині його агоніста – глутамату та ко-агоніста – гліцину (Johnson and Ascher, 1987). Здатність гліцину одночасно виступати ко-активатором збудливих НМДА-рецепторів та агоністом гальмівних гліцинових рецепторів є цікавим феноменом, роль якого для функціонування ЦНС остаточно не встановлена. Особливого значення це явище набуває в умовах дії патологічних чинників, коли спостерігається порушення злагодженої взаємодії двох систем, зокрема, при КГД. Раніше було показано, що гліцин, в умовах ішемії, може мати як цитопротективну так і цитотоксичну дію (Newell et al., 1995; Weber and Taylor, 1994). Однак, важливий на нашу думку показник – зміна кількості гліцинових рецепторів, експресованих на поверхні пірамідних нейронів, після ішемії не був досліджений.

Нами було показано, що через 1 та 4 год після КГД площа флуоресценції гліцинових рецепторів на поверхні пірамідних нейронів CA1 зони гіпокампа знижується. Ми припускаємо, що цей ефект спричинений інтерналізацією гліцинових рецепторів, внаслідок активації каскаду реакцій фосфорилування.

Інтерналізація гліцинових рецепторів є малодослідженим питанням. Однак, Huang та колегами було показано, що ендоцитоз гліцинових рецепторів може бути стимульований активацією РКС. Дана протеїнкіназа регулює ендоцитоз гліцинових рецепторів, що відбувається за динеїнзалежним механізмом. У амінокислотній послідовності гліцинового рецептора було ідентифіковано тирозиновий та ділейциновий мотиви, що, імовірно, відповідають за взаємодію гліцинового рецептора із динеїном та забезпечують рекрутування рецепторів до вкритих клатрином ендоцитозних везикул (Huang et al., 2007).

Нам вдалося продемонструвати, що астроцити гіпокампа також мають на своїй поверхні гліцинові рецептори. Дослідження експресії лігандкерованих іонних каналів астроцитами різних відділів ЦНС набуло своєї актуальності у 80-х – 90-х роках ХХ-го століття, коли було показано, що астроцити мають АМПА та ГАМК рецептори (Backus et al., 1989), а також відіграють важливу роль у регуляції синаптичної передачі (Araque et al., 1999; Rusakov et al., 2011).

Значна увага дослідників була приділена вивченню гліцинових рецепторів локалізованих на астроцитах спинного мозку (Kirchhoff et al., 1996; Pastor et al., 1995). Продемонстровано, що стимуляція гліцинових та ГАМК_A рецепторів, локалізованих на астроцитах спинного мозку, призводить до їх деполяризації та послідуєючої активації потенціалзалежних калієвих та кальцієвих каналів (Kirchhoff and Kettenmann, 1992; Kirchhoff et al., 1996). Підвищення концентрації кальцію всередині астроцитів (що також може здійснюватись за рахунок активації НМДА рецепторів (Papura and Verkhratsky, 2012) є складним, багатофакторним процесом, значення якого остаточно не встановлене. Ймовірно його роль полягає у стимуляції виділення нейротрансмітерів із астроцитів (Papura et al., 2011).

Нами було показано, що на противагу пірамідним нейронам, кількість гліцинових рецепторів локалізованих на поверхні астроцитів гіпокампа суттєво не змінюється під впливом КГД. Це свідчить про відмінності у реакції двох типів нервових клітин гіпокампа на КГД, а також, про відмінності механізмів інтерналізації гліцинових рецепторів, що їм притаманні. Окрім того, раніше було показано, що астроцити є менш вразливими до змін клітинного метаболізму викликаного КГД, ніж нейрони (Jones et al., 2011).

Досить детально в умовах ішемії було досліджено зміни експресії НМДА рецепторів. Зокрема, було показано, що при ішемії знижується рівень поверхневої експресії GluA2-субодиниць рецептора, головною особливістю яких є непроникність до іонів Ca^{2+} . Як результат, внутрішньоклітинна концентрація Ca^{2+} збільшується (Gorter et al., 1997; Pellegrini-Giampietro et al., 1992). В той самий час, підвищення рівня експресії GluN3A-субодиниць НМДА рецептора має цитопротективний ефект, за рахунок зниження проникності каналів НМДА рецепторів до Ca^{2+} (Nakanishi et al., 2009).

Особливості експресії гліцинових рецепторів за умов КГД, їх роль у розвитку наслідків ішемічного епізоду та можливість використання гліцинових рецепторів у якості мішені для нейропротективних препаратів потребують подальшого вивчення.

4.2. Фармакологічна модуляція гліцинових рецепторів

4.2.1. Гінкголева кислота – новий позитивний модулятор гліцинових рецепторів

Проблема модуляції гліцинових рецепторів притягує увагу дослідників протягом десятиліть. Було встановлено, що потенціація роботи гліцинових рецепторів може здійснюватися такими фармакологічними агентами як івермектин, еанол, анастетики та канабіноїди (Webb and Lynch, 2007; Yevenes and Zeilhofer, 2011). Однак, даним речовинам притаманна низька вибірковість – вони здатні впливати на значну кількість іонних каналів ЦНС (Lynagh and Lynch,

2012; Yevenes and Zeilhofer, 2011). Тому пошук специфічних модуляторів гліцинових рецепторів залишається актуальним питанням.

Нами було показано, що гінголева кислота є високоефективним потенціатором $\alpha 1$ -гліцинових рецепторів – вона проявляє свою активність у наномолярних концентраціях (30-100 нмоль/л). Висока концентрація кислоти (25 мкмоль/л) спричинювала незначне інгібування $\alpha 2$ -рецепторів, в той час як амплітуда струмів, опосередкованих $\alpha 3$ - та ГАМК_A-рецепторами, не зазнавала змін під час аплікації гінголевої кислоти, що свідчить про вибірковість її дії на $\alpha 1$ -гліцинові рецептори. Дія гінголевої кислоти на гетеромерні $\alpha 1\beta$ та $\alpha 2\beta$ підтипи рецептора була подібною до тієї, що ми спостерігали на гомомерних варіантах: потенціація $\alpha 1\beta$ струмів, та незначне пригнічення $\alpha 2\beta$.

Детальне дослідження взаємодії гінголевої кислоти із $\alpha 1$ -гліциновими рецепторами дозволило встановити її наступні особливості: (і) потенціація супроводжувалась зсувом кривих концентраційної залежності вліво та зниженням значення ED_{50} для гліцину, що говорить про здатність гінголевої кислоти впливати на середню тривалість відкритого стану каналу; (ii) ефект потенціації розвивався повільно – протягом хвилин та залежав від концентрації гінголевої кислоти. Під час аплікації 30 нмоль/л гінголевої кислоти початок потенціації спостерігався лише через 2-3 хвилини, в той час як висока концентрація кислоти (25 мкмоль/л) призводила до збільшення струму на 150% уже після 30 с аплікації.

Варто зазначити, що зниження амплітуди гліциніндукованих струмів до контрольного значення, після припинення аплікації гінголевої кислоти, відбувалося повільно та, зазвичай, не було повним. Існує кілька можливих причин цього явища – повільне від'єднання гінголевої кислоти від сайту зв'язування на гліциновому рецепторі та акумуляція кислоти у місці взаємодії із ним.

З метою встановлення сайту взаємодії гінголевої кислоти із $\alpha 1$ -субодиницею гліцинового рецептора нами було здійснено дослідження аімнокислотних послідовностей різних субодиниць рецептора, із використанням

бази амінокислотних послідовностей UniProt, та проведено аналіз попередніх робіт, присвячених встановленню амінокислотних залишків, відповідальних за взаємодію рецептора із модулюючими речовинами.

Встановлення механізмів та локусів взаємодії модуляторів із гліциновим рецептором є важливим напрямком його дослідження. По-перше, розуміння принципу дії фармакологічних агентів дозволить передбачати їх вплив на різні субодиниці гліцинового рецептора; по-друге, може відкрити нові подробиці молекулярної фізіології гліцинового рецептора, роль окремих структурних компонентів та амінокислотних залишків у його функціонуванні.

Амінокислотний залишок A52, розміщений у зовнішньоклітинному домені, бере участь у взаємодії $\alpha 1$ -гліцинового рецептора з етанолом. Було показано, що ступінь потенціації $\alpha 1$ -рецепторів переважає ступінь потенціації $\alpha 2$ -рецепторів, при цьому амінокислотна заміна в $\alpha 1$ -субодиниці (коли аланін було заміщено на характерний для $\alpha 2$ -субодиниці серин) призводить до зниження ефективності її взаємодії з етанолом (Mascia et al., 1996). Це дозволяє припустити, що A52 задіяна у формуванні одного із сайтів зв'язування етанолу. Пізніше було продемонстровано, що залишки розміщені в TM2 та TM3 доменах, S267 та A288 відповідно, також впливають на взаємодію гліцинового рецептора з етанолом, імовірно, формуючи інший сайт (Mihic et al., 1997).

Для TM2 та TM3-доменів гліцинового рецептора характерна висока консервативність. Важливо відмітити, що другий трансмембранний домен кожної субодиниці приймає участь у формуванні іонної пори, тоді як третій контактує із біліпідною мембраною. Амінокислотні послідовності $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -субодиниць відрізняються лише за двома позиціями: одним амінокислотним залишком в другому та одним в третьому трансмембранних доменах. Однак, ці дві відмінності є причиною того, що $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -рецептори по-різному відповідають на дію декількох біоактивних речовин.

Зокрема, рецептори сформовані $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -субодиницями демонструють різну чутливість до блокатора ціанотрифенілборату: він ефективно інгібує $\alpha 1$ -рецептори дикого типу, але не діє на $\alpha 2$ (Rundstrom et al., 1994). При цьому

заміна амінокислоти G254 на А у TM2 значно знижує спорідненість $\alpha 1$ -рецепторів до ціанотрифенілборату. Окрім того, амінокислотний залишок, що знаходиться у позиції 254 і різнить $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -субодиниці визначає основний стан провідності каналу. Заміна гліцину в $\alpha 1$ -рецепторі на аланін (характерний для $\alpha 2$) спричинює появу у нього нової провідності, що зазвичай властива лише каналам, сформованим $\alpha 2$ -субодиницями (Bormann et al., 1993).

Фітоканабіноїд Δ^9 -тетрагідроканабінол, що є головним психоактивним компонентом марихуани, володіє здатністю безпосередньо впливати на активність гліцинових рецепторів, сприяючи підвищенню амплітуди струму, опосередкованого $\alpha 1$ - та $\alpha 3$ -субодиницями. Потенціація $\alpha 2$ -субодиниці була менш яскраво виражена. Дослідження Xiong та співробітників (2011) показало, що важливу роль у субодиничній вибірковості потенціюючої дії Δ^9 -тетрагідроканабінолу відіграє TM3, а зокрема, S296 ($\alpha 1$) та S307 ($\alpha 3$), що на відміну від A303 ($\alpha 2$) здатні формувати гідроксильний зв'язок із ОН групою тетрагідроканабінолу. Імовірно, така взаємодія є головною причиною позитивної модуляції $\alpha 1$ - та $\alpha 3$ -рецепторів під дією Δ^9 -тетрагідроканабінолу (Xiong et al., 2011).

У даній роботі нами було показано, що відмінність у відповіді $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -рецепторів на аплікацію гінкголевої кислоти обумовлена трьома амінокислотними залишками, що різнять ці дві субодиниці гліцинового рецептора. Мутація T59A/A261G/A303S, що передбачає заміну трьох амінокислот у $\alpha 2$ -субодиниці на відповідні амінокислоти з $\alpha 1$, робить $\alpha 2$ -гліцинові рецептори чутливими до потенціюючої дії гінкголевої кислоти.

Амінокислоти, на вивченні яких була сфокусована наша увага, відіграють важливу роль у формуванні сайтів взаємодії гліцинового рецептора з модулюючими речовинами. Наше дослідження, вперше демонструючи амінокислотні залишки, що є необхідними для потенціації $\alpha 1$ -рецепторів гінкголевою кислотою, підтверджує провідне значення A52, G254 та S296 як ключових локусів модуляції роботи рецептора.

4.2.2. Ніфлумова кислота – інгібітор гліцинових рецепторів

У ході пошуку нових модуляторів гліцинових рецепторів нами було встановлено, що ніфлумова кислота, являючись добре відомим блокатором хлорвибіркових потенціалкерованих іонних каналів, володіє здатністю пригнічувати роботу гліцинових рецепторів. Отримані нами результати свідчать про те, що ніфлумова кислота є потенціалзалежним блокатором пори каналу гліцинового рецептора.

Гомомерні $\alpha 1$, $\alpha 2$ та $\alpha 3$ -гліцинові рецептори мають різну спорідненість до ніфлумової кислоти: $\alpha 1$ -рецептори продемонстрували найвище значення IC_{50} - 197 ± 18 мкмоль/л ($n=10$) при $+80$ мВ, тоді як для $\alpha 2$ - та $\alpha 3$ -гліцинових рецепторів цей показник був значно нижчим і складав 9 ± 2 мкмоль/л ($n=8$) та 16 ± 6 мкмоль/л ($n=7$) відповідно. Інгібування всіх трьох субодиниць залежало від мембранного потенціалу – його ефективність значно підвищувалась при позитивних потенціалах. Цей ефект був особливо яскраво вираженим для $\alpha 2$ -рецепторів. Спираючись на потенціалзалежність інгібуючої дії ніфлумової кислоти на гліцинові рецептори, нами було висунуто припущення, що сайт її взаємодії із рецептором знаходиться у порі каналу та, відповідно, сформований ТМ2-доменами.

При дослідженні впливу ніфлумової кислоти на рецептори, сформовані $\alpha 1$ -субодиницями нами було відмічено, що ефективність їх взаємодії залежить від концентрації агоніста – зі збільшенням концентрації гліцину IC_{50} для ніфлумової кислоти знижувалася, особливо при позитивних мембранних потенціалах. Підвищення концентрації гліцину до 100 мкмоль/л призвело до падіння IC_{50} для ніфлумової кислоти до 90 ± 8 мкмоль/л ($n=10$), що статистично достовірно ($p < 0,001$) нижче, ніж при коаплікації ніфлумової кислоти із 30 мкмоль/л гліцину.

На противагу $\alpha 1$ -рецепторам, для $\alpha 2$ -гліцинових рецепторів даний ефект не спостерігався – при підвищенні концентрації гліцину IC_{50} НФК залишалася практично незмінною. Ми припускаємо, що причиною цього є відмінності у кінетиці відкритого стану каналів $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -гліцинових рецепторів. Дослідження поодиноких каналів, сформованих $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -субодиницями, проведене Takahashi

та співробітниками (Takahashi et al., 1992), показало, що середня тривалість відкритого стану каналу $\alpha 2$ -рецептора перевищує середню тривалість відкритого стану $\alpha 1$ -каналу майже у 100 разів ($\alpha 1$ – 2,38мс; $\alpha 2$ – 174мс). Ймовірно, різниця у ефективності блокування $\alpha 1$ -струмів індукованих 30 та 100мкмоль/л гліцину обумовлена збільшенням тривалості відкритого стану каналу при підвищенні концентрації агоніста. Дане явище не було характерним для $\alpha 2$ -рецепторів, оскільки при аплікації ненасичуючої концентрації гліцину середня тривалість відкритого стану їх каналів була достатньою для розвитку максимального ефекту ніфлумової кислоти. Ці результати підтвердили наше припущення щодо пори каналу як визначального місця взаємодії ніфлумової кислоти із рецептором.

Іншою особливістю взаємодії $\alpha 2$ -рецепторів із ніфлумовою кислотою була наявність залишкового струму при одночасному відмиванні гліцину та кислоти. Найімовірніше, це свідчить про вищу спорідненість рецептора до гліцину, ніж до ніфлумової кислоти, яка відмивалася швидше за агоніст.

Побідне явище також спостерігалось при дослідженні інгібування $\alpha 2$ -гліцинових рецепторів пікротином (Wang et al., 2007). При цьому пікротин, подібно до ніфлумової кислоти, проявляв значну потенціалзалежність при взаємодії із гліциновим рецептором. Було висунуто припущення, що він є блокатором пори каналу, а сайт їх взаємодії знаходиться на рівні позиції 2' TM2-домену.

Іонний канал гліцинового рецептора утворений TM2 доменами кожної із п'яти субодиниць, що беруть участь у його формуванні (Lynch, 2004). Припускаючи, що саме цей домен відіграє ключову роль у взаємодії ніфлумової кислоти із гліциновим рецептором, ми проаналізували амінокислотні послідовності TM2 доменів $\alpha 1$, $\alpha 2$ та $\alpha 3$ -субодиниць із використанням бази даних амінокислотних послідовностей білків UniProt. Нами було відмічено, що вони відрізняються між собою лише за 2' позицією пори (254 за нумерацією $\alpha 1$ -субодиниць), у якій $\alpha 1$ -рецептори містять G, а $\alpha 2$ та $\alpha 3$ – A. Саме цим, ймовірно,

і визначається відмінність у чутливості різних субодиниць рецептора до ніфлумової кислоти.

Для перевірки даної гіпотези ми здійснили точкову мутацію у $\alpha 1$ -субодиниці гліцинового рецептора, замінивши G254 на A. Електрофізіологічне дослідження впливу ніфлумової кислоти на мутантні $\alpha 1$ -рецептори продемонструвало, що (i) для даної взаємодії характерна яскраво виражена потенціалзалежність; (ii) $\alpha 1$ G254A є більш чутливим до ніфлумової кислоти, ніж $\alpha 1$ дикого типу; (iii) подібно до $\alpha 2$ -рецепторів IC_{50} для ніфлумової кислоти не залежала від концентрації агоніста. Однак, дана мутація не призвела до підвищення чутливості до рівня $\alpha 2$ -субодиниці. Згідно із цим ми припускаємо, що гліциновий рецептор має кілька сайтів взаємодії із ніфлумовою кислотою. Дослідження взаємодії ніфлумової кислоти із гетеромерними рецепторами показало, що вбудовування β -субодиниці у $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -рецептори не справляють значного впливу на їх чутливість до ніфлумової кислоти.

У даному дослідженні нами продемонстровано, що ніфлумова кислота пригнічує роботу гліцинових рецепторів різної субодиничної композиції. Окрім того, нам вдалося ідентифікувати один із сайтів взаємодії гліцинових рецепторів із ніфлумовою кислотою і підтвердити, таким чином, важливу роль 2' амінокислоти TM2 домену у взаємодії із блокаторами каналу.

Раніше вже було показано, що дана амінокислота може брати участь у взаємодії гліцинового рецептора із модулюючими речовинами. Зокрема, мутація G254A робила $\alpha 1$ -рецептори більш чутливими до інгібуючої дії тутіну. Однак, варто зазначити, що на протипагу ніфлумовій кислоті, для тутіну не була характерною залежність від мембранного потенціалу (Fuentealba et al., 2011). Більше того, відмінність у основних станах провідності каналів сформованих $\alpha 1$ - (86pS) та $\alpha 2$ -субодиницями (111pS) також визначається даною амінокислотою (Bormann et al., 1993). Точкова мутація G254A надає $\alpha 1$ -рецепторам додаткову провідність (107pS).

Отже, кілька отриманих нами результатів свідчать на користь того, що ніфлумова кислота є блокатором пори гліцинових рецепторів. Зокрема, (i)

потенціалзалежність дії ніфлумової кислоти; (ii) для $\alpha 1$ -рецепторів спостерігалось підвищення ефективності блокування при збільшенні концентрації гліцину; (iii) мутація G254A у TM2 домені $\alpha 1$ -субодиниці призводила до зростання її чутливості до ніфлумової кислоти.

4.3. Нейрони генеровані із фібробластів людини – перспективна система для дослідження гліцинових рецепторів

У даній роботі нами також було досліджено можливість використання нейронів, генерованих із індукованих плюрипотентних стовбурових клітин людини, отриманих із фібробластів, для вивчення гліцинових рецепторів. Нами було показано, що індуковані нейрони є функціональними і здатними до генерації потенціалів дії, оскільки містять на своїй поверхні потенціалкеровані натрієві та калієві канали. Окрім того, вони експресують іонотропні лігандкеровані рецептори: гліциновий, нікотиновий ацетилхоліновий та ГАМК_A.

У ході даної роботи було розроблено новий спрощений та високоефективний протокол диференціації нейронів із ИПСК. Методика отримання із фібробластів людини функціональних нейронів, що володіють усіма генетичними характеристиками, притаманними даному організму, відкриває нові можливості для вивчення молекулярних механізмів виникнення нейрологічних захворювань та розробки стратегій їх лікування. Зокрема, спадкових порушень роботи гліцинових рецепторів, що спричинюють гіперплексію.

Гіперплексія – нейрологічне захворювання, спричинене мутаціями генів, що кодують $\alpha 1$ - та β -субодиниці гліцинового рецептора. Характерним симптомом гіперплексії є довготривале неконтрольоване скорочення м'язів тіла у відповідь на неочікуваний тактильний, чи акустичний стимули, що може супроводжуватись мимовільним падінням. Причиною появи симптомів гіперплексії є нездатність мутантних гліцинових рецепторів забезпечувати ефективну швидку гальмівну нейропередачу в центральній нервовій системі (Shiang et al., 1993). Значна частина гіперплексичних мутацій локалізовані у

TM2-домені, або у лінкерних ділянках, що поєднують його з іншими трансмембранними доменами. Амінокислотні заміни в TM2 домені, що визначає іонну провідність та вибірковість, порушують процес відкривання каналу. Це призводить до зменшення провідності каналу та амплітуди струмів, опосередкованих гліциновими рецепторами (Laube et al., 2002).

На сьогоднішній день, дослідження механізмів виникнення гіперплексії передбачає виявлення мутацій гліцинового рецептора, що спричинює захворювання, та електрофізіологічне дослідження даних мутантних рецепторів із використанням гетерологічних систем експресії. Варто зазначити, що застосування гетерологічних систем ускладнює інтерпретацію отриманих результатів і не дозволяє дослідити особливості регуляції експресії та трафіку рецепторів у цитоплазматичній мембрані. Досить часто при дослідженні гіперплексії у якості моделі використовуються лінії мишей, що є носіями відповідних мутацій гліцинового рецептора та відтворюють більшість фенотипових ознак захворювання (Schaefer et al., 2012). Однак, дана модель також має певні обмеження, що особливо проявляються при розробці стратегій лікування.

Таким чином, використання нейронів генерованих із фібробластів конкретного пацієнта, що є носієм певної патології гліцинового рецептора, перш за все надасть прижиттєвий доступ до нервової тканини людини та дозволить більш точно охарактеризувати зміни, спричинені даною патологією. Окрім того, це значно полегшить розробку індивідуальної терапії, оскільки, відомо, що сприйнятливість до фармакологічних препаратів може значно варіювати в залежності від фізіологічних особливостей пацієнта.

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 CA1 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 лігандкеровані гліцинові рецептори, що свідчить про можливість їх використання в модельних дослідженнях при вивченні цього типу рецепторів в нормі та при патології.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Andermann F., Keene D.L., Andermann E., Quesney L. F. Startle disease or hyperekplexia: further delineation of the syndrome // *Brain*. – 1980. – №103. – P. 985–97.
2. Araque A., Parpura V., Sanzgiri R.P., Haydon P.G. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner // *Trends in neurosciences*. – 1999. – №22(5). – P. 208-15.
3. Backus K. H., Kettenmann H., Schachner M., Pharmacological Characterisation of the glutamate receptor in cultured astrocytes // *J. Neurosci Res*. – 1989. – №22(3). – P. 274-82.
4. Badja C., Maleeva G., El-Yazidi C., Barruet E., Lasserre M., Tropel P., Bregestovski P., Magdinier F. Efficient and cost-effective generation of mature neurons from human induced pluripotent stem cells // *Stem cells translational medicine*. – 2014. – №3(12). – P. 1467.
5. Banks P., Franks N. P., Dickinson R. Competitive inhibition at the glycine site of the N-methyl-d-aspartate receptor mediates xenon neuroprotection against hypoxia–ischemia // *Anesthesiology*. – 2010. – №112(3). – P. 614-622.
6. Bano D., Nicotera P. Ca²⁺ signals and neuronal death in brain ischemia // *Stroke*. – 2007. – №38. – P. 674-676.
7. Baysal-Kirac L., Tuzun E., Erdag E., Ulusoy C., Vanli-Yavuz E.N., Ekizoglu E., Gokyigit A. Neuronal autoantibodies in epilepsy patients with peri-ictal autonomic findings. *J Neurology*. – 2016. – №263(3). – P. 455-466.
8. Bode A., Lynch J. W. Analysis of hyperekplexia mutations identifies transmembrane domain rearrangements that mediate glycine receptor activation // *J Biol Chem*. – 2013. – №288. – P. 33760–71.
9. Bode A., Wood S.E., Mullins J.G., Keramidas A., Cushion T.D., Thomas R.H., Pickrell W.O., Drew C.J., Masri A., Jones E.A., Vassallo G., Born A.P., Alehan F., Aharoni S., Bannasch G., Bartsch M., Kara B., Krause A., Karam E. G., Matta S., Jain V., Mandel H., Freilinger M., Graham G. E., Hobson E.,

- Chatfield S., Vincent-Delorme C., Rahme J.E., Afawi Z., Berkovic S.F., Howell O.W., Vanbellinghen J.F., Rees M.I., Chung S.K., Lynch J.W. New hyperekplexia mutations provide insight into glycine receptor assembly, trafficking, and activation mechanisms // *J Biol Chem.* – 2013. – №288. – P. 33745–59.
10. Bormann J., Rundstrom N., Betz H., Langosch D. Residues within transmembrane segment M2 determine chloride conductance of glycine receptor homo- and hetero-oligomers // *EMBO J.* – 1993. – №12. – P. 3729–37.
 11. Bowery N.G., Smart T.G. GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history // *Brit J Pharmacol.* – 2006. – №147. – P. 109-19.
 12. Brackmann M., Zhao C., Schmieden V., Braunewell K.H. Cellular and subcellular localization of the inhibitory glycine receptor in hippocampal neurons // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2004. – №324(3). – P. 1137-1142.
 13. Brejc K., Dijk W. J., Klaassen R. V., Schuurmans M., Der Oost J., Smit A. B., Sixma T. K. Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors // *Nature.* – 2001. – №411. – P. 269–76.
 14. Brennand K.J., Simone A., Jou J., Gelboin-Burkhart C., Tran N., Sangar S., McCarthy S. Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells // *Nature.* – 2011. – №473(7346). – P. 221-225.
 15. Carvajal-González A., Leite M.I., Waters P., Woodhall M., Coutinho E., Balint B., Press R. Glycine receptor antibodies in PERM and related syndromes: characteristics, clinical features and outcomes // *Brain.* – 2014. – №137(8). – P. 2178-2192.
 16. Chattipakorn S.C., McMahon L.L. Pharmacological characterization of glycine-gated chloride currents recorded in rat hippocampal slices // *J Neurophysiol.* – 2002. – №87(3). – P. 1515-1525.
 17. Chattipakorn S.C., McMahon L.L. Strychnine-sensitive glycine receptors depress hyperexcitability in rat dentate gyrus // *J Neurophysiol.* – 2003. – №89(3). – P. 1339-1342.

18. Choi D.W. Ischemia-induced neuronal apoptosis // *Curr Opin Neurobiol.* – 1996. – №6(5). – P. 667-672.
19. Chung S.K., Bode A., Cushion T.D., Thomas R.H., Hunt C., Wood S.E., Pickrell W.O., Drew C.J., Yamashita S., Shiang R., Leiz S., Longardt A.C., Raile V., Weschke B., Puri R. D., Verma I. C., Harvey R.J., Ratnasinghe D.D., Parker M., Rittey C., Masri A., Lingappa L., Howell O.W., Vanbellinghen J.F., Mullins J.G., Lynch J.W., Rees M.I. GLRB is the third major gene of effect in hyperekplexia // *Hum. Mol. Genet.* – 2013. – №22. – P. 927–940.
20. Chung S.K., Vanbellinghen J.F., Mullins J.G., Robinson A., Hantke J., Hammond C.L., Gilbert D.F., Freilinger M., Ryan M., Kruer M.C., Masri A., Gurses C., Ferrie C., Harvey K., Shiang R., Christodoulou J., Andermann F., Andermann E., Thomas R.H., Harvey R.J., Lynch J.W., Rees M.I. Pathophysiological mechanisms of dominant and recessive GLRA1 mutations in hyperekplexia // *J Neurosci.* – 2010. – №30. – P. 9612–20.
21. Claes L., Del-Favero J., Ceulemans B., Lagae L., Van Broeckhoven C., De Jonghe P. De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy // *Am J Hum Genet.* – 2001. – №68. – P. 1327-1332.
22. Corringer P.J., Le Novère N., Changeux J. P. Nicotinic receptors at the amino acid level // *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* – 2000. – №40. – P. 431–58.
23. Coultrap S.J., Vest R.S., Ashpole N.M., Hudmon A., Bayer K.U. CaMKII in cerebral ischemia // *Acta Pharmacol Sin.* – 2011. – №32(7). – P. 861-872.
24. Cowan C.A., Atienza J., Melton D.A., Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells // *Science.* – 2005. – №309(5739). – P. 1369-1373.
25. Cushman D.W., Cheung H.S. Effect of substrate concentration on inhibition of prostaglandin synthetase of bull seminal vesicles by anti-inflammatory drugs and fenamic acid analogs // *Biochim Biophys Acta.* – 1976. – №424(3). – P. 449-459.

- 26.Dage J.L., Colvin E.M., Fouillet A., Langron E., Roell W.C., Li J., Merchant K.M. Pharmacological characterisation of ligand-and voltage-gated ion channels expressed in human iPSC-derived forebrain neurons // *Psychopharmacol.* – 2014. – №231(6). – P. 1105-1124.
- 27.David-Watine B., Goblet C., De Saint Jan D., Fucile S., Devignot V., Bregestovski P., Korn H. Cloning, expression and electrophysiological characterization of glycine receptor alpha subunit from zebrafish // *Neuroscien.* – 1999. – №90. – P. 303–17.
- 28.Dellisanti C.D., Yao Y., Stroud J.C., Wang Z.Z., Chen L. Crystal structure of the extracellular domain of nAChR alpha1 bound to alpha-bungarotoxin at 1.94 Å resolution // *Nat. Neurosci.* – 2007. – №10. – P. 953–62.
- 29.Devine M.J., Ryten M., Vodicka P., Thomson A.J., Burdon T., Houlden H., Schapira A.H. Parkinson's disease induced pluripotent stem cells with triplication of the α -synuclein locus // *Nature Commun.* – 2011. – №2. – P. 440.
- 30.Du J., Lu W., Wu S., Cheng Y., Gouaux E. Glycine receptor mechanism elucidated by electron cryo-microscopy // *Nature.* – 2015. – №526. – P. 224–9.
- 31.Eichler S.A., Förster B., Smolinsky B., Jüttner R., Lehmann T.N., Fähring M., Meier J.C. Splice-specific roles of glycine receptor $\alpha 3$ in the hippocampus // *Eur J Neurosci.* – 2009. – №30(6). – P. 1077-1091.
- 32.Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // *Nature.* – 1981. – №292(5819). – P. 154-156.
- 33.Folbergrova J., Memezawa H., Smith M.L., Siesjö B.K. Focal and perifocal changes in tissue energy state during middle cerebral artery occlusion in normo- and hyperglycemic rats // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 1992. – №12(1). – P. 25-33.
- 34.Fuentealba J., Muñoz B., Yévenes G., Moraga-Cid G., Pérez C., Guzmán L., Aguayo L.G. Potentiation and inhibition of glycine receptors by tutin // *Neuropharmacol.* – 2011. – №60(2). – P. 453-459.
- 35.Gaspard N. Autoimmune Epilepsy // *Continuum.* – 2016. – №22(1, Epilepsy). – P. 227-245.

36. Goldberg M.P., Choi D. W. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury // *J Neurosci.* – 1993. – №13(8). – P. 3510-3524.
37. Gorter J.A., Petrozzino J.J., Aronica E.M., Rosenbaum D.M., Opitz T., Bennett M.V., Zukin, R. S. Global ischemia induces downregulation of Glur2 mRNA and increases AMPA receptor-mediated Ca²⁺ influx in hippocampal CA1 neurons of gerbil // *J Neurosci.* – 1997. – №17(16). – P. 6179-6188.
38. Grenningloh G, Rienitz A, Schmitt B, Methfessel C, Zensen M, Beyreuther K, Gundelfinger ED, Betz H. The strychnine-binding subunit of the glycine receptor shows homology with nicotinic acetylcholine receptors // *Nature.* – 1987. – №328. – P. 215-20.
39. Grenningloh G., Pribilla I., Prior P., Multhaup G., Beyreuther K., Taleb O., Betz H. Cloning and expression of the 58 kd β subunit of the inhibitory glycine receptor // *Neuron.* – 1990. – №4. – P. 963-970.
40. Grenningloh G., Schmieden V., Schofield P. R., Seeburg P. H., Siddique T., Mohandas T. K., Becker C., Betz H. Alpha subunit variants of the human glycine receptor: primary structures, functional expression and chromosomal localization of the corresponding genes // *EMBO J.* - 1990. - №9. – P. 771–6.
41. Grossman C. J., Wiseman J., Lucas F.S., Trevethick M.A., Birch P.J. Inhibition of constitutive and inducible cyclooxygenase activity in human platelets and mononuclear cells by NSAIDs and Cox 2 inhibitors // *Inflamm Res.* – 1995. – №44(6). – P. 253-257.
42. Halestrap A.P. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die // *Biochem Soc Trans.* – 2006. – №34(2). – P. 232-237.
43. Hanson P.I., Meyer T., Stryer L., Schulman H. Dual role of calmodulin in autophosphorylation of multifunctional CaM kinase may underlie decoding of calcium signals // *Neuron.* – 1994. – №12(5). – P. 943-956.
44. Harvey R. J., Depner U. B., Wässle H., Ahmadi S., Heindl C., Reinold H., Smart T. G., Harvey K., Schütz B., Abo-Salem O. M., Zimmer A., Poisbeau P., Welzl H., Wolfer D. P., Betz H., Zeilhofer H. U., Müller U. GlyR alpha3: an

- essential target for spinal PGE₂-mediated inflammatory pain sensitization // Science. – 2004. – №304. – P. 884–7.
45. Haverkamp S., Müller U., Harvey K., Harvey R. J., Betz H., Wässle H. Diversity of glycine receptors in the mouse retina: localization of the $\alpha 3$ subunit // J. Comp. Neurol. – 2003. – №465. – P. 524–39.
 46. Hawthorne R., Cromer B.A., Ng H.L., Parker M.W., Lynch J.W. Molecular determinants of ginkgolide binding in the glycine receptor pore // J Neurochem. – 2006. – №98(2). – P. 395–407.
 47. Haythornthwaite A., Stoelzle S., Hasler A., Kiss A., Mosbacher J., George M., Fertig N. Characterizing human ion channels in induced pluripotent stem cell-derived neurons // J Biomol Screen, 2012. – №17. – P. 1264 – 72.
 48. Heinze L., Harvey R. J., Haverkamp S., Wässle H. Diversity of glycine receptors in the mouse retina: localization of the $\alpha 4$ subunit // J. Comp. Neurol. – 2007. – №500. – P. 693–707.
 49. Hilf R.J., Dutzler R. Structure of a potentially open state of a proton-activated pentameric ligand-gated ion channel // Nature. – 2009. – №457. – P. 115–8.
 50. Hosl K., Reinold H., Harvey R.J., Müller U., Narumiya S., Zeilhofer H.U. Spinal prostaglandin E receptors of the EP2 subtype and the glycine receptor $\alpha 3$ subunit, which mediate central inflammatory hyperalgesia, do not contribute to pain after peripheral nerve injury or formalin injection // Pain. – 2006. – №126(1). – P. 46–53.
 51. Hota S.K., Barhwal K., Singh S., Sairam M., Ilavazhagan G. NR1 and GluR2 expression mediates excitotoxicity in chronic hypobaric hypoxia // J Neurosci Res. – 2008. – №86(5). – P. 1142–52.
 52. Hsiao S.H., Mahoney J.C., West J.R. Development of GABAA receptors on medial septum/diagonal band (MS/DB) neurons after postnatal ethanol exposure // Brain Res. – 1998. – №810. – P. 100–13.
 53. Huang R., He S., Chen Z., Dillon G.H., Leidenheimer N.J. Mechanisms of homomeric $\alpha 1$ glycine receptor endocytosis // Biochem. – 2007. – №46(41). – P. 11484–93.

54. Huang X., Chen H., Michelsen K., Schneider S., Shaffer P.L. Crystal structure of human glycine receptor-[agr] 3 bound to antagonist strychnine // *Nature*. – 2015. – №526. – P. 277-80.
55. Israel M.A., Yuan S.H., Bardy C., Reyna S.M., Mu Y., Herrera C., Carson C.T. Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells // *Nature*. – 2012. – №482(7384). – P. 216-220.
56. Jembrek M, Vlainic J. GABA receptors: pharmacological potential and pitfalls // *Curr Pharmaceut Des*. – 2015. – №21(34). – P. 4943-59.
57. Jiao J., Yang Y., Shi Y., Chen J., Gao R., Fan Y., Gao S. Modeling Dravet syndrome using induced pluripotent stem cells (iPSCs) and directly converted neurons // *Hum Mol Genet*. – 2013. – №22(21). – P. 4241-52.
58. Johnson J.W., Ascher P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons // *Nature*. – 1987. – №325. – P. 529-31.
59. Jones S.M., Novak A.E., Elliott J.P. Primary culture of cellular subtypes from postnatal mouse for in vitro studies of oxygen glucose deprivation // *J Neurosci Methods*. – 2011. – №199(2). – P. 241-248.
60. Kehoe J., Buldakova S., Acher F., Dent J., Bregestovski P., Bradley J. Aplysia cys-loop glutamate-gated chloride channels reveal convergent evolution of ligand specificity // *J. Mol. Evol*. – 2009. – №69. – P. 125–41.
61. Keramidas A., Moorhouse A.J., Schofield P.R., Barry P.H. Ligand-gated ion channels: mechanisms underlying ion selectivity // *Prog. Biophys. Mol. Biol*. – 2004. – №86. – P. 161–204.
62. Kim E.Y., Schrader N., Vannier C. Deciphering the structural framework of glycine receptor anchoring by gephyrin // *EMBO J*. – 2006. – №25. – P. 1385–95.
63. Kirchhoff F., Kettenmann H. GABA triggers a $[Ca^{2+}]_i$ increase in murine precursor cells of the oligodendrocyte lineage // *Eur J Neurosci*. – 1992. – №4(11). – P. 1049-1058.

64. Kirchhoff F., Mülhardt C., Pastor A., Becker C. M., Kettenmann H. Expression of glycine receptor subunits in glial cells of the rat spinal cord // *J Neurochem.* – 1996. – №66(4). – P. 1383-1390.
65. Kirchner A., Breustedt J., Rosche B., Heinemann U.F., Schmieden V. Effects of taurine and glycine on epileptiform activity induced by removal of Mg^{2+} in combined rat entorhinal cortex–hippocampal slices // *Epilepsia.* – 2003. – №44(9). – P. 1145-52.
66. Kirsch J., Betz H. The postsynaptic protein gephyrin localization is regulated of the glycine receptor-associated by the cytoskeleton // *J Neurosci.* – 1995. – №75. – P. 4148-56.
67. Kneussel M., Betz H. Receptors, gephyrin and gephyrin-associated proteins: novel insights into the assembly of inhibitory postsynaptic membrane specializations // *J. Physiol.* – 2000. – №525. – P. 1–9.
68. Kondratskaya E.L., Betz H., Krishtal O.A., Laube B. The β subunit increases the ginkgolide B sensitivity of inhibitory glycine receptors // *Neuropharmacology.* – 2005. – №49. – P. 945-51.
69. Kondratskaya E.L., Lishko P.V., Chatterjee S.S., Krishtal O.A. BN52021, a platelet activating factor antagonist, is a selective blocker of glycine-gated chloride channel // *Neurochem Internat.* – 2002. – №40(7). – P. 647-53.
70. Kriks S., Shi, J.W., Piao J., Ganat Y.M., Wakeman D.R., Xie Z., Yang L. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease // *Nature.* – 2001. – №480(7378). – P. 547-51.
71. Langosch D., Thomas L., Betz H. Conserved quaternary structure of ligand gated ion channels: the postsynaptic glycine receptor is a pentamer // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1988. – №85. – P. 7394–8.
72. Lape R., Plested A.J., Moroni M., Colquhoun D., Sivilotti L.G. The $\alpha 1K276E$ startle disease mutation reveals multiple intermediate states in the gating of glycine receptors // *J. Neurosci.* – 2012. – №32. – P. 1336–52.

73. Laube B., Maksay G., Schemm R., Betz H. Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses // Trends Pharmacol Sci. – 2002. – №23(11). – P. 519-27.
74. Levi S., Logan S.M., Tovar K.R., Craig A.M. Gephyrin is critical for glycine receptor clustering but not for the formation of functional GABAergic synapses in hippocampal neurons // J Neurosci. – 2004. – №24(1). – P. 207-217.
75. Liantonio A., Giannuzzi V., Picollo A., Babini E., Pusch M., Conte Camerino D. Niflumic acid inhibits chloride conductance of rat skeletal muscle by directly inhibiting the CLC-1 channel and by increasing intracellular calcium // Br J Pharmacol. – 2007. – №150(2). – P. – 235-247.
76. Lipinska G., Baldwin D.S., Thomas K.G. Pharmacology for sleep disturbance in PTSD // Hum Psychopharmacol. – 2016. – №31(2). – P. 156-63.
77. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons // Physiol rev. – 1999. - №79(4). – P. 1431-568.
78. Liu Z.H., Zeng S. Cytotoxicity of ginkgolic acid in HepG2 cells and primary rat hepatocytes // Toxicol lett. - 2009. – №187(3). – P. 131-136.
79. Logica T., Riviere S., Holubiec M.I., Castilla R., Barreto G.E., Capani F. Metabolic changes following perinatal asphyxia: role of astrocytes and their interaction with neurons // Front in Aging Neurosci. – 2009. – №8. – P. 116.
80. LoPachin R.M., Gaughan C.L., Lehning E.J., Weber M.L., Taylor C.P. Effects of ion channel blockade on the distribution of Na, K, Ca and other elements in oxygen-glucose deprived CA1 hippocampal neurons // Neurosci. – 2001. – №103(4). – P. 971-983.
81. Lozovaya N., Yatsenko N., Beketov A., Tsintsadze T., Burnashev N. Glycine receptors in CNS neurons as a target for nonretrograde action of cannabinoids // J Neurosci. – 2005. – №25(33). – P. 7499-506.
82. Lu Y., Zhang J., Ma B., Li K., Li X., Bai H., Chen Q. Glycine attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting neuronal apoptosis in mice // Neurochem Internat. – 2012. – №61(5). – P. 649-658.

83. Lushnikova I.V., Voronin K.Y., Malyarevskyy P.Y., Skibo G.G. Morphological and functional changes in rat hippocampal slice cultures after short-term oxygen-glucose deprivation // *J Cell Mol Med.* – 2004. – №8(2). – P. 241-8.
84. Lynagh T., Lynch J. Molecular mechanisms of Cys-loop ion channel receptor modulation by ivermectin // *Front Mol Neurosci.* – 2012. – №5. – P. 60.
85. Lynch J.W. Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel // *Physiol. Rev.* – 2004. – №84. – P. 1051–95.
86. Lynch J.W. Native glycine receptor subtypes and their physiological roles // *Neuropharmacology.* – 2009. – №56. – P. 303–9.
87. Maksay G., Bíró T. Dual cooperative allosteric modulation of binding to ionotropic glycine receptors // *Neuropharmacol.* – 2002 – №43(7). – P. 1087-98.
88. Maksay G., Biro T., Laube B. Hyperekplexia mutation of glycine receptors: decreased gating efficacy with altered binding thermodynamics // *Biochem. Pharmacol.* – 2002. – №64. – P. 285–8.
89. Maleeva G., Buldakova S., Bregestovski P. Selective potentiation of alpha 1 glycine receptors by ginkgolic acid // *Front Mol Neurosci.* – 2015. – №8. – P. 64.
90. Malosio M., Marqueze B., Pouey A., Kuhse J., Betz H. Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain // *EMBO J.* – 1991. – №10. – P. 2401–9.
91. Martin G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells // *Proc Nat Acad Sci.* – 1981. – №78(12). – P. 7634-8.
92. Mascia M.P., Machu T.K., Harris R.A. Enhancement of homomeric glycine receptor function by longchain alcohols and anaesthetics // *Brit J Pharmacol.* – 1996. – №119(7). – P. 1331-6.
93. Mehta A.K., Ticku M.K. Developmental aspects of benzodiazepine receptors and GABA-gated chloride channels in primary cultures of spinal cord neurons // *Brain Res.* – 1988. – №454. – P. 156–63.

94. Meier J.C., Henneberger C., Melnick I., Racca C., Harvey R.J., Heinemann U., Grantyn R. RNA editing produces glycine receptor $\alpha 3P185L$, resulting in high agonist potency // *Nature Neurosci.* – 2005. – №8(6). – P. 736-44.
95. Mihic S. J., Ye Q., Wick M. J., Koltchine V.V., Krasowsk M.D., Finn S.E., Harris R.A. Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABAA and glycine receptors // *Nature.* – 1997. – №389(6649). – P. 385-9.
96. Miller P.S., Smart T. G. Binding, activation and modulation of Cys-loop receptors // *Trends Pharm Sci.* – 2010. - №31(4). – P. 161-174.
97. Montori S., DosAnjos S., Poole A., Regueiro-Purriños M.M., Llorente I.L., Darlison M.G., Martínez-Villayandre B. Differential effect of transient global ischaemia on the levels of γ -aminobutyric acid type A (GABAA) receptor subunit mRNAs in young and older rats // *Neuropath Appl Neurobiol.* – 2012. – №38(7). – P. 710-22.
98. Mori M., Gähwiler B.H., Gerber U. β -Alanine and taurine as endogenous agonists at glycine receptors in rat hippocampus in vitro // *J Physiol.* – 2002. – №539(1). – P. 191-200.
99. Nakanishi N., Tu S., Shin Y., Cui J., Kurokawa T., Zhang D., Lipton S.A. Neuroprotection by the NR3A subunit of the NMDA receptor // *J Neurosci.* – 2009. – №29(16). – P. 5260-5.
100. Newell D.W., Barth A., Papermaster V., Malouf A.T. Glutamate and non-glutamate receptor mediated toxicity caused by oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures // *J Neurosci.* – 1995. – №15(11). – P. 7702-11.
101. Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C // *Science.* – 1992. – №258(5082). – P. 607-14.
102. Nori S., Okada Y., Yasuda A., Tsuji O., Takahashi Y., Kobayash, Y., Toyama Y. Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice // *Proc Nat Acad Sci.* – 2011. – №108(40). – P. 16825-30.

103. Okabe S., Forsberg-Nilsson K., Spiro A.C., Segal M., McKay R.D. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro // *Mech Dev.* – 1996. – №59(1). – P. 89-102.
104. Okamoto S., Takahashi M. Induction of retinal pigment epithelial cells from monkey iPS cells // *Inves Ophthalmol Vis Sci.* – 2011. – №52(12). – P. 8785-90.
105. Parpura V., Grubišić V., Verkhratsky A. Ca²⁺ sources for the exocytotic release of glutamate from astrocytes // *Biochim Biophys Acta.* – 2011. – №1813(5). – P. 984-991.
106. Parpura V., Verkhratsky A. Astrocytes revisited: concise historic outlook on glutamate homeostasis and signaling // *Croat Med J.* – 2012. – №53(6). – P. 518-28.
107. Paşca S.P., Portmann T., Voineagu I., Yazawa M., Shcheglovitov A., Paşca A.M., Bernstein J.A. Using iPSC-derived neurons to uncover cellular phenotypes associated with Timothy syndrome // *Nature Med.* – 2011. – №17(12). – P. 1657-1662.
108. Pastor A., Chvátal A., Syková E., Kettenmann H. Glycine and GABA-activated currents in identified glial cells of the developing rat spinal cord slice // *Eur J Neurosci.* – 1995. – №7(6). – P. 1188-98.
109. Pellegrini-Giampietro D.E., Zukin R.S., Bennett M.V., Cho S., Pulsinelli W.A. Switch in glutamate receptor subunit gene expression in CA1 subfield of hippocampus following global ischemia in rats // *Proc Nat Acad Sci.* – 1992. – №89(21). – P. 10499-503.
110. Pfeiffer F., Graham D., Betz H. Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord // *J Bio Chem.* – 1982. – №257(16). – P. 9389-93.
111. Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signaling // *Nat Rev Neurosci.* – 2003. – №4(11). – P. 873-84.
112. Pless S.A., Millen K.S., Hanek A.P., Lynch J.W., Lester H.A., Lummis S.C., Dougherty D.A. A cation- π interaction in the binding site of the glycine

- receptor is mediated by a phenylalanine residue // *J. Neurosci.* – 2008. – №28. – P. 10937–42.
113. Pribilla I., Takagi T., Langosch D., Bormann J., Betz H. The atypical M2 segment of the beta subunit confers picrotoxinin resistance to inhibitory glycine receptor channels // *The EMBO journal.* –1992. – №11. – P. 4305.
 114. Prior P., Schmitt B., Grenningloh G., Pribilla I., Multhaup G., Beyreuther K., Betz H. Primary structure and alternative splice variants of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein // *Neuron.* – 1992. – №8(6). – P. 1161-70.
 115. Rajendra S., Vandenberg R.J., Pierce K.D., Cunningham A.M., French P.W., Barry P.H., Schofield P.R. The unique extracellular disulfide loop of the glycine receptor is a principal ligand binding element // *EMBO J.* – 1995. – №14(13). – P. 2987.
 116. Rees M.I., Lewis T.M., Kwok J.B., Mortier G.R., Govaert P., Snell R.G., Schofield P.R., Owen M.J. Hyperekplexia associated with compound heterozygote mutations in the beta-subunit of the human inhibitory glycine receptor (GLRB) // *Hum. Mol. Genet.* – 2002. – №11. – P. 853–60.
 117. Rundstrom N., Schmieden V., Betz H., Bormann J., Langosch D. Cyanotriphenylborate: subtype-specific blocker of glycine receptor chloride channels // *Proc Nat Acad Sci.* – 1994. – №91(19). – P. 8950-4.
 118. Rusakov D.A., Zheng K., Henneberger C. Astrocytes as regulators of synaptic function: a quest for the Ca²⁺ master key // *Neuroscientist.* - 2011. – №17(5). – P. 513-23.
 119. Satyan K.S., Jaiswal A.K., Ghosal S., Bhattacharya S.K. Anxiolytic activity of ginkgolic acid conjugates from Indian *Ginkgo biloba* // *Psychopharmacology.* – 1998. – №136(2). – P. 148-52.
 120. Saul B., Kuner T., Sobetzko D., Brune W., Hanefeld F., Meinck H.M., Becker C.M. Novel GLRA1 missense mutation (P250T) in dominant hyperekplexia defines an intracellular determinant of glycine receptor channel gating // *J. Neurosci.* – 1999. – №19. – P. 869–77.

121. Schaefer N., Vogel N., Villmann C. Glycine receptor mutants of the mouse: what are possible routes of inhibitory compensation // *Front Mol Neurosci.* – 2012. – №5. – P. 98.
122. Schmid K., Böhmer G., Gebauer K. Glycine receptor-mediated fast synaptic inhibition in the brainstem respiratory system // *Respiration Physiol.* – 1991. – №84(3). – P. 351-61.
123. Seiler N., Sarhan S. Synergistic anticonvulsant effects of a GABA agonist and glycine // *Gen Pharmacol.* – 1984. – №15(4). – P. 367-9.
124. Shan Q., Haddrill J.L., Lynch J.W. A single β subunit M2 domain residue controls the picrotoxin sensitivity of $\alpha\beta$ heteromeric glycine receptor chloride channels // *J Neurochem.* – 2001. – №76(4). – P. 1109-20.
125. Shiang R., Ryan S. G., Zhu Y. Z., Hahn A., O'Connell P., Wasmuth J. Mutations in the alpha 1 subunit of the inhibitory glycine receptor cause the dominant neurologic disorder, hyperekplexia // *Nat. Genet.* – 1993. – №5. – P. 351-8.
126. Sinkkonen S.T., Mansikkamäki S., Möykkynen T., Lüddens H., Uusi-Oukari M., Korpi E.R. Receptor subtype-dependent positive and negative modulation of GABAA receptor function by niflumic acid, a nonsteroidal anti-inflammatory drug // *Mol Pharmacol.* – 2003. – №64(3). – P. 753-63.
127. Stoppini L., Buchs P.A., Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue // *J Neurosci Methods.* – 1991. – №37(2). P. 173-82.
128. Tada M., Takahama Y., Abe K., Nakatsuji N., Tada T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells // *Curr Biol.* – 2001. – №11(19). – P. 1553-8.
129. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // *Cell.* – 2007. – №131(5). – P. 861-72.
130. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell.* – 2006. – №126(4). – P. 663-76.

131. Takahashi T., Momiyama A., Hirai K., Hishinuma F., Akagi H. Functional correlation of fetal and adult forms of glycine receptors with developmental changes in inhibitory synaptic receptor channels // *Neuron*. - 1992. - №9(6). - P. 1155-61.
132. Tanabe M., Nitta A., Ono H. Neuroprotection via strychnine-sensitive glycine receptors during post-ischemic recovery of excitatory synaptic transmission in the hippocampus // *J Pharmacol Sci*. - 2010. - №113(4). P. 378-86.
133. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // *Science*. - 1998. - №282(5391). - P. 1145-7.
134. Tsuji O., Miura K., Okada Y., Fujiyoshi K., Mukaino M., Nagoshi N., Higashi H. Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury // *Proc Nat Acad Sci*. - 2010. - №107(28). - P. 12704-9.
135. Ude C., Schubert-Zsilavecz M., Wurglics M. Ginkgo biloba extracts: a review of the pharmacokinetics of the active ingredients // *Clinical Pharmacokin*. - 2013. - №52(9). - P. 727-49.
136. Unwin N. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution // *J. Mol. Biol*. - 2005. - №346. - P. 967-89.
137. Vandenberg R J., French C.R., Barry P.H., Shine J., Schofield P.R. Antagonism of ligand-gated ion channel receptors: two domains of the glycine receptor alpha subunit form the strychnine-binding site // *Proc Nat Acad Sci*. - 1992. - №89(5). - P. 1765-9.(a)
138. Vandenberg R.J., Handford C.A., Schofield P.R. Distinct agonist-and antagonist-binding sites on the glycine receptor // *Neuron*. - 1992. - №9(3), 491-6. (b)
139. Wang D.S., Buckinx R., Lecorrone H., Mangin J.M., Rigo J.M., Legendre P. Mechanisms for picrotoxin and picrotin blocks of $\alpha 2$ homomeric glycine receptors // *J Bio Chem*. - 2007. - №282(22). - P. 16016-35.

140. Watanabe E., Akagi H. Distribution patterns of mRNAs encoding glycine receptor channels in the developing rat spinal cord // *Neuroscience research*. – 1995. – №23. – P. 377-82.
141. Webb T.I., Lynch J.W. Molecular pharmacology of the glycine receptor chloride channel // *Curr. Pharm. Des.* – 2007. – №13. –P. 2350–67.
142. Weber M.L. and Taylor C.P. Damage from oxygen and glucose deprivation in hippocampal slices is prevented by tetrodotoxin, lidocaine and phenytoin without blockade of action potentials // *Brain Res.* – 1994. - №664(1). - P. 167-177.
143. Wernig M., Zhao J.P., Pruszak J., Hedlund E., Fu D., Soldner F., Jaenisch R. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease // *Proc Nat Acad Sci.* – 2008. – №105(15). – P. 5856-61.
144. White M.M., Aylwin M. Niflumic and flufenamic acids are potent reversible blockers of Ca² (+)-activated Cl-channels in *Xenopus* oocytes // *Mol Pharmacol.* – 1990. – №37(5). – P. 720-4.
145. Wilmut I., Young L., Campbell K.H. Embryonic and somatic cell cloning // *Reprod Fertil Dev.* – 1998. – №10(8). – P. 639-44.
146. Xiong W., Cheng K., Cui T., Godlewski G., Rice K. C., Xu Y., Zhang L. Cannabinoid potentiation of glycine receptors contributes to cannabis-induced analgesia // *Nat Chem Biol.* – 2011. – №7(5). – P. 296-303.
147. Xu T.L., Gong N. Glycine and glycine receptor signaling in hippocampal neurons: diversity, function and regulation // *Prog Neurobiol.* – 2010. – №91(4). – P. 349-61.
148. Yagi T., Ito D., Okada Y., Akamatsu W., Nihei Y., Yoshizaki T., Suzuki N. Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells // *Hum Mol Gen.* – 2011. – №20(23). – P. 4530-9.
149. Yamanaka S. The winding road to pluripotency (Nobel Lecture) // *Angewandte Chem Internat.* – 2013. – №52. – P. 13900-9.

150. Yao W., Ji F., Chen Z., Zhang N., Ren S.Q., Zhang X.Y., Lu W. Glycine exerts dual roles in ischemic injury through distinct mechanisms // *Stroke*. – 2012. – №43(8). – P. 2212-20.
151. Yevenes G.E., Zeilhofer H.U. Allosteric modulation of glycine receptors // *Brit J Pharmacol*. – 2011. – №164(2). – P. 224-236.(a)
152. Yevenes G.E., Zeilhofer H.U. Molecular sites for the positive allosteric modulation of glycine receptors by endocannabinoids // *PLoS One*. – 2011. – №6(8), e23886.(b)
153. Young A.B., Snyder S.H. Strychnine binding associated with glycine receptors of the central nervous system // *Proc Nat Acad Sci*. – 1973. – №70(10). – P. 2832-6.
154. Zeilhofer H.U. The glycinergic control of spinal pain processing // *Cel Mol Life Sci*. – 2005. – №62(18). – P. 2027-35.
155. Zeng H., Guo M., Martins-Taylor K., Wang X., Zhang Z., Park J.W., Chen F.P. Specification of region-specific neurons including forebrain glutamatergic neurons from human induced pluripotent stem cells // *PloS One*. – 2010. – №5(7). – e11853.
156. Zhang L.H., Gong N., Fei D., Xu L., Xu T.L. Glycine uptake regulates hippocampal network activity via glycine receptor-mediated tonic inhibition // *Neuropsychopharmacol*. – 2008. – №33(3). – P. 701-711.
157. Zhorov B.S., Bregestovski P.D. Chloride channels of glycine and GABA receptors with blockers: Monte Carlo minimization and structure-activity relationships // *Biophys J*. – 2000. – №78(4). – P. 1786-803.
158. Zuliani L., Ferlazzo E., Andrigo C., Casano A., Cianci V., Zoccarato M., Morra M. Glycine receptor antibodies in 2 cases of new, adult-onset epilepsy // *Neurol-Neuroim Neuroinflam*. – 2014. - № 1(2). - e16.