

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

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ЛУНЬКО ОЛЕСЯ ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 577.352.2

ДИСЕРТАЦІЯ

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

Спеціальність 03.00.02 – біофізика

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

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

Лунько О.В. _____

Науковий керівник: Марченко Сергій Михайлович доктор біологічних наук

Київ – 2021

АНОТАЦІЯ

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

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

В дисертаційній роботі викладені результати дослідження модуляції трансмембранних струмів поодиноких LCC (Large Conductance Cationic) каналів ядер нейронів Пуркінє. Гіпотетично, ці канали залучені до формування балансу іонів калію по обидва боки від зовнішньої та внутрішньої мембрани ядра, і таким чином, впливаючи на заряд ядерної оболонки, можуть мати значення для тривалості кальцієвого сигналу, проте їх амінокислотна послідовність, структура та фізіологічна роль невідомі. Для підтвердження, спростування чи розвитку цієї гіпотези бракує кількісного опису кінетики, а також ідентифікації фармакологічного профілю LCC-каналів. В цій роботі було знайдено перший блокатор для LCC-каналів – d-тубокурарин (dTC) та виявлено модулюючий вплив трьохвалентних іонів гадолінію, а також вплив галламіну. За допомогою аналізу β -розподілу було охарактеризовано швидкі конформаційні зміни LCC-каналів та вперше створено кінетичну модель їх опису. Було встановлено, що канал перебуває в одному відкритому стані, який зв'язаний з трьома закритими станами, які мають різні константи швидкості, та одним підрівнем. На прикладі швидкого блокатора LCC-каналів, галламіна, було продемонстровано ефективність використання встановленої моделі Маркова та методу аналізу β -розподілу для дослідження механізму блокування. Визначено, що галламін діє як класичний поровий блокатор, а також обчислено параметри чутливості блокатора до прикладеного мембранного потенціалу.

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

АННОТАЦИЯ

Луцько О.В. Модуляция Катионных каналов большой проводимости внутренней мембраны ядер нейронов Пуркинье мозжечка крыс - Рукопись.

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

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

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

SUMMARY

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

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

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

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

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ

Публікації, в яких висвітлені основні результати роботи:

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

Публікації, які засвідчують апробацію матеріалів дисертаційного дослідження:

1. Fedorenko O.A., **Semenova O.V.**, Marchenko S.M. Properties of the Large conductance cation channels from the nuclear envelope of neurons // Theses of the V congress of the Ukrainian Society for Neuroscience, Kyiv, 2011, p.108.

2. **Semenova O.V.**, Fedorenko O.A., Marchenko S.M. Investigation of activity of Large conductance channels in Purkinje neurons of rat cerebellum // *Fiziol. Zh.* - 2011; 57(5):102.
3. **Lunko O.V.**, Fedorenko O.A., Marchenko S.M. The meaning of allosteric interactions at clusterization of InsP3Rs in the intracellular signalisation // Theses of the VII International Symposium “Actual problems of biophysical medicine”, Kyiv, 2012, p. 86.
4. **Lunko O.V.**, Fedorenko O.A., Marchenko S.M. Effects of venoms on the Large conductance cation channel in the nuclear membrane of central neurons // Theses of the II Scientific Conference of Young Physiologists “Physiology: from Molecules to the Body”, Kyiv, 2012, p. 54.
5. Gruskovska I.V., Kalnytska O.V., **Lunko O.V.**, Fedorenko O. A., Marchenko S.M. Voltage-Dependent block by Gd³⁺ ions of Large conduction cation channels from inner nucleus membrane of rat Purkinje neurons // Thesis of the III Scientific Conference of Young Physiologists “Physiology: from Molecules to the Body”, Kyiv, 2013, p. 10.
6. **Lunko O.V.**, Lunko O.O., Gruskovska I.V., Marchenko S.M. Effect of dTC on Large conductance cationic channels of nuclei of Purkinje neurons in the cerebellum of rat // Theses of the International Conference “Mechanisms of functioning of physiological systems”, Lviv, 2014.
7. **Lunko O.V.**, Fedorenko O.A., Marchenko S.M. Gadolinium blocking effect of Large Conductance Cation Channels on inner nuclear membran of Purkinje neurons // Theses of XIX Congress Ukrainian Physiological Society with international participation dedicated to the 90th of Academician P.G. Kostyuk. *Fiziol. Zh.*, 2014, T. 60, № 3, p. 13.
8. **Lunko O.V.**, Lunko O.O., Hruskovska I.V., Marchenko S.M. Influence of different groups of metals on properties of Large conductance cationic channels of nuclear membrane of rats Purkinje neurons // Theses of the International scientific conference “Shevchenko Spring”, Kyiv, 2016.

9. **Лунько О.В.**, Лунько О.О., Ісаєва О.В., Марченко С.М. Модуляція Катіонних каналів великої провідності на внутрішній ядерній мембрані нейронів Пуркіньє мультивалентними іонами металів // Тези XX-го з'їзду Українського фізіологічного товариства ім.П.Г. Костюка. Фізіол. журн., Vol. 65, No. 3, 19-20, 2019.
10. Lunko O.O., **Lunko O.V.**, Krishtal O.O. A proposed algorithm for segmenting the single-channel time series // Тези XX-го з'їзду Українського фізіологічного товариства ім.П.Г. Костюка. Фізіол. журн., 2019, Vol. 65, No. 3, 19, 2019.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ	5
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	10
ВСТУП.....	11
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	16
1.1. СТРУКТУРА ТА ФУНКЦІЇ ОБОЛОНКИ ЯДРА	16
1.1.1. Потенціал спокою ядерної мембрани	18
1.1.2. Внутрішньоклітинний іонний склад.....	19
1.1.3. Проникність ядерної оболонки	21
1.1.4. Ядерні пори	21
1.2. ІОННІ КАНАЛИ ОБОЛОНКИ ЯДРА	23
1.2.1. Кальцієві канали	23
1.2.2. Катіонні та K^+ селективні канали.....	26
1.3. КАТІОННІ КАНАЛИ ВЕЛИКОЇ ПРОВІДНОСТІ.....	28
1.4. ІНШІ ТРАНСПОРТНІ СИСТЕМИ.....	31
1.5. МОДУЛЯЦІЯ ІОННИХ КАНАЛІВ	32
1.5.1. Типи модуляції.....	32
1.5.2. Механізми блокування	34
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	47
2.1. Виділення ядер нейронів Пуркіньє	47
2.2. ЕЛЕКТРОФІЗІОЛОГІЧНА РЕЄСТРАЦІЯ ТРАНСМЕМБРАННИХ СТРУМІВ	50
2.3. АНАЛІЗ ДАНИХ	54
2.3.1. Аналіз струмів через поодинокі іонні канали.....	54
2.3.2. Аналіз "β-розподілу"	57
2.3.3. Створення кінетичної моделі.....	66
2.3.4. Статистична обробка результатів досліджень.....	66
2.4. ВИКОРИСТАНІ РЕЧОВИНИ.....	67

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	69
3.1. ПОШУК БЛОКАТОРІВ LCC КНАЛІВ	69
3.1.1. Дослідження впливу екстрактів цілісних природніх отрут.....	69
3.1.2. Модуляція LCC-каналів іонами металів.....	75
3.1.3. Скринінг токсинів та анестетиків в якості блокаторів LCC-каналів.....	78
3.2. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА КІНЕТИКИ ПООДИНОКИХ LCC-КАНАЛІВ	90
3.2.1. Дослідження стаціонарної та нестаціонарної кінетики	94
3.2.2. Аналіз повільних та швидких подій стаціонарної кінетики LCC-каналів.....	97
3.2.3. Справжня та видима амплітуда струму LCC-каналів	106
3.3. МЕХАНІЗМ ВПЛИВУ ГАЛЛАМІНУ	107
РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	112
4.1. МОДЕЛЬ МАРКОВА LCC-КАНАЛІВ	112
4.1.1. Доцільність використання методу аналізу β -розподілу	112
4.1.2. Обмеження використання спрощеної моделі Маркова для обрахунку впливу швидких блокаторів.....	116
4.1.3. Залежність тривалості кінетичних станів LCC-каналів від трансмембранного потенціалу.....	117
4.1.4. Потенціал-залежний рівень підпровідності	119
4.2. Модуляція LCC-каналів швидкими та повільними блокаторами.....	123
ВИСНОВКИ	127
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	128

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВК – великі кальцій активовані калієві канали

dTC – d-тубокурарин

EDTA – етилендіамінтетраоцтова кислота

ER/SR – ендоплазматичний/саркоплазматичний ретикулум

HEPES – 4-(2-гідроксиетил)-1-піперазинетансульфонова кислота

INM – внутрішня ядерна мембрана

IP₃ – інозитол-1,4,5-трифосфат

IP₃Rs – інозитол-трифосфатні рецептори

LCC-канали – Катіонні канали великої провідності

mAChR – мускаринові-ацетилхолінові рецептори

nAChR – нікотинові-ацетилхолінові рецептори

NE – ядерна оболонка

NMDG – N-метил-D-глюкамін

NPC – комплекс ядерних пор

ONM – зовнішня ядерна мембрана

P_o – ймовірність відкритого стану

RyRs – рианодинові рецептори

SNR – співвідношення сигналу до шуму

TEA – тетраетиламоній

Tris – тріс-(гідроксиметил)-амінометан

VSD – домен сенсора потенціалу

ФГЙ – функція густини ймовірності

ВСТУП

Актуальність теми. Ядро – найважливіша органела, виникнення якої (разом з ендоплазматичним ретикулумом та мітохондріями) сформувало еволюційно новий домен організмів – еукаріоти. Структурно-функціональна організація ядра задіяна у збереженні та транскрипції генетичної інформації, що забезпечується синтезом РНК і переміщенням невеликих молекул та іонів крізь ядерну оболонку, утворену двома мембранами. Функції ядра здійснюються через різноманітні системи транспорту, які беруть участь у переміщенні молекул крізь оболонки ядра, а також вивільненні та поглинанні іонів, та які мають тонкий механізм взаєморегуляції. До цих транспортних систем належать іонні канали, які опосередковують фундаментальні клітинні процеси, починаючи від поділу клітини та закінчуючи її загибеллю. Зокрема, канали ядерної оболонки беруть участь в регуляції експресії генів, забезпеченні синаптичної пластичності, внутрішньоклітинній сигналізації тощо [1-5]. Механізми регуляції цих процесів залежать від закономірностей функціонування залучених іонних каналів та їх структурних особливостей, які визначають чутливість до зміни трансмембранного потенціалу та хімічних модуляторів. Зовнішні стимули викликають конформаційні зміни іонного каналу, які описуються кінетичними моделями з визначеною кількістю станів та константами швидкості переходу між ними. Структура та функції каналів тісно пов'язані між собою. Дослідження біофізичних властивостей каналів та їх модуляції має важливе значення, оскільки формує попередні уявлення про окремі елементи будови певного типу іонних каналів та відкриває можливості для їх подальшого вивчення [6, 7].

На теперішній час відомо багато різних іонних каналів, які існують в ядерній оболонці. Зокрема, були описані IP_3Rs та $RyRs$, низка катіонних та аніонних каналів, а також потенціал-керовані і кальційактивовані калієві канали [8-14]. Різні типи каналів були виявлені на оболонці ядра ооцитів, кардіоміоцитів, гепатоцитів, ацинарних клітин підшлункової залози, волокнах поперечносмугастих і гладеньких м'язів, нейронів ЦНС та інших клітин [15-21]. Фактично лише одиниці з цього різноманіття описаних каналів є детально дослідженими в аспекті їх кінетики,

структури та фізіологічної ролі. Відповідно, відсутність такої інформації у достатньому обсязі, ускладнює моделювання та комплексне розуміння процесів, до яких залучена ядерна оболонка та які опосередковують основні функції ядра. Відтак залишаються не з'ясованими механізми розвитку патологічних станів, пов'язаних з порушеннями цих процесів, та потенційні ефективні шляхи усунення цих станів [22].

В нейронах Пуркінє мозочку у внутрішній мембрані ядра найбільш розповсюджені спонтанноактивні Катіонні канали великої провідності (Large conductance cationic channels, LCC) [20]. Ці канали мають провідність 200 пСм, вони селективні до моновалентних катіонів, а щільність їх розташування в середньому складає 3-5 каналів на 1 мкм² поверхні мембрани ядра. У ядерній оболонці клітин ЦНС також були описані канали пірамідних нейронів ділянки CA1 та гранулярних нейронів гіпокампа із подібними характеристиками [23]. Ні амінокислотна послідовність LCC-каналів, ні їх структура, ні фізіологічна роль дотепер невідомі. Існує гіпотеза що, ці канали залучені до формування балансу іонів калію по обидва боки від зовнішньої та внутрішньої мембрани оболонки ядра. Таким чином, впливаючи на заряд ядерної оболонки, вони можуть впливати на тривалість кальцієвих сигналів в цитоплазмі та нуклеоплазмі клітин – найважливіших феноменів клітинної сигналізації [20]. Гіпотеза про компенсацію негативного заряду ядерної оболонки шляхом зворотного потоку позитивно заряджених іонів, яка пропонується для LCC-каналів не є унікальною, а висувається також для інших типів каналів ядерної оболонки або ендо-/саркоплазматичного ретикулума [24, 25]. Для підтвердження, спростування чи уточнення цієї гіпотези катастрофічно бракує експериментальних даних щодо біофізичних та фармакологічних характеристик вказаних каналів. Повідомлялося, що LCC-канали мають повільну кінетику [20], але відповідна модель до цього часу відсутня. Це принципово ускладнює моделювання процесів, до яких можуть бути залучені ці канали, та обмежує можливості визначення механізмів впливу модуляторів різної природи. Окрім цього, раніше не було виявлено жодних блокаторів LCC-каналів, а відсутність інформації про їх фармакологічний профіль є суттєвою перепорою на шляху до визначення

молекулярної ідентичності та фізіологічної ролі, яку вони виконують. Тому, для розвитку подальших фундаментальних досліджень LCC-каналів пошук таких сполук та опис механізму їх дії є виключно актуальною задачею.

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

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

Для досягнення цієї мети необхідно було вирішити наступні завдання:

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

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

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

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

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше знайдено блокатор LCC-каналів внутрішньої мембрани ядра – d-тубокурарин (dTc), охарактеризовано його

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

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

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

розроблено Олексієм Луньком. Визначення мети дослідження, планування роботи, обговорення результатів експериментів проводилися за участі наукового керівника.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації доповідались та обговорювались на:

- V конгрес Українського товариства нейронаук, Київ, 2011;
- VII International Symposium “Actual problems of biophysical medicine”, Kyiv, 2012;
- II Scientific Conference of Young Physiologists “Physiology: from Molecules to the Body”, Kyiv, 2012;
- III Scientific Conference of Young Physiologists “Physiology: from Molecules to the Body”, Kyiv, 2013;
- International Conference "Mechanisms of functioning of physiological systems" Lviv, 2014;
- XIX Congress of Ukrainian Physiological Society with international participation dedicated to the 90th of academician P.H. Kostyuk, Kyiv, 2014;
- International scientific conference "Shevchenko Spring", Kyiv, 2016;
- XX Congress Ukrainian Physiological Society with international participation dedicated to the 95th of academician P.H. Kostyuk, Kyiv, 2019.

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

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

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Структура та функції оболонки ядра

Ядро клітини вміщує генетичну інформацію організму, забезпечує молекулярні механізми, які лежать в основі процесу реплікації і транскрипції ДНК та відіграє критичну роль у регуляції різних клітинних функцій. Ця складна структура з унікальною будовою (Рис. 1.1) сформована внутрішньою (INM) та зовнішньою (ONM) мембранами, відокремленими між собою перинуклеарним простором, які разом складають ядерну оболонку (NE), що відмежовує ядро від цитоплазми. Перинуклеарний простір поєднаний з люменом ендо/саркоплазматичного ретикулула (ER/SR) і виконує роль кальцієвого депо клітини завдяки наявності в ньому підвищеної концентрації іонів кальцію [5, 26]. INM і ONM пронизують великі комплекси ядерних пор (NPC), які забезпечують двосторонній потік іонів та молекул [27, 28]. INM взаємодіє з ядерним матриксом, а ONM поєднана з ER/SR і містить рибосоми. Матрикс ядра – це мережа волокон, що знаходяться в нуклеоплазмі і є аналогом клітинного цитоскелету, яка разом з ламінами допомагає в організації генетичної інформації. Ламіни за будовою схожі до ядерного матриксу, але не поширюються по всьому об'єму нуклеоплазми, а локалізовані близько до поверхні INM [29, 30]. В нуклеоплазмі виявлено структуру з сайтами зв'язування для тапсигаргіну, IP_3 та рианодину, яку по аналогії до ER, названо нуклеоплазматичним ретикулулом (NR). Припускається, що NR може брати участь в кальцієвій сигналізації всередині ядра [31, 32].

INM та ONM містять унікальні набори трансмембранних білків ядерної оболонки, одні з яких можуть бути специфічними тільки до внутрішньої мембрани і взаємодіяти з хроматином (такі як LEM), тоді як інші контактують з люменом та зовнішньою мембраною (SUN) [33]. Білки SUN формують з'єднання з несприном на ONM, таким чином утворюючи лінкер нуклеоскелету та цитоскелету (LINC), який важливий для механічної трансдукції сигналу, що регулює геном, клітинну та ядерну механічну стійкість і забезпечує механічні з'єднання, необхідні для клітинної та ядерної міграції [34-36]. Багато білків INM взаємодіють з ДНК,

транскрипційними факторами і факторами сплайсингу [37, 38] сприяючи просторовій організації геному під час розвитку тканини. Порушення цього механізму взаємодії, такі як мутації білків, може призвести до низки патологічних станів, які називаються ламінопатіями, більшість з яких є тканинно-специфічними [39]. Зокрема, кілька сотень мутацій, асоційованих з різноманітними хворобами, були відмічені в гені LMNA, який кодує два основних архітектурні компоненти ядерної оболонки – білки проміжних ниток ламіни А і С [40].

Скринінг трансмембранних білків *Saccharomyces cerevisiae* виявив, що 6% всього геному дріжджів припадає на внутрішню мембрану ядра, а 35% із них співпадають з ендоплазматичним ретикуломом у вищих еукаріотів [42]. Вважається, що точний склад трансмембранних білків внутрішньої ядерної мембрани не повністю з'ясовано, тому що існує ймовірність, що білки, які містяться у невеликій

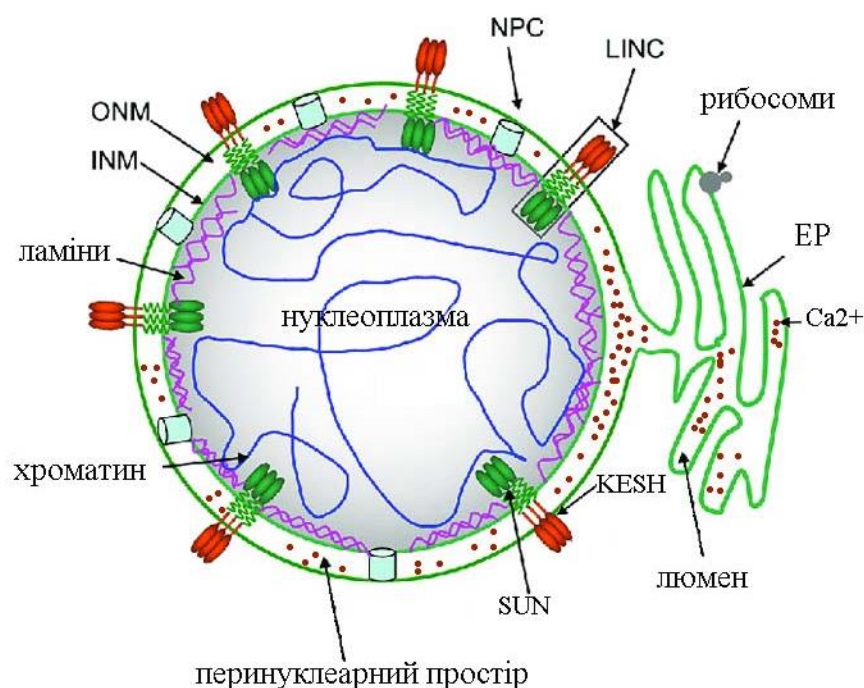


Рис. 1.1. Схематичне зображення ядра клітини з гранулярним ER, який містить рибосоми. Нуклеоплазма разом з хроматином огортається двома ядерними мембранами – внутрішньою (INM) та зовнішньою (ONM), між якими знаходиться перинуклеарний простір, що служить кальцієвим депо як і люмен ER. Обидві мембрани ядра поєднані комплексом ядерних пор (NPC). Ламіни розташовані на внутрішній поверхні внутрішньої мембрани ядра та є її маркером. INM та ONM додатково поєднані між собою лінкерами комплексів нуклеоскелету та цитоскелету (LINC), що складаються з білків доменів SUN та KESH. (Модифіковано з [41]).

кількості або ті, які мають селективні форми експресії відповідно до клітинного типу, залишаються не виявленими [43].

Ліпіди, як структурні елементи ядерної оболонки беруть участь в регуляції жорсткості як NE, так і ядерного матриксу. Вони залученні до процесу дублювання ДНК, регуляції експресії і транскрипції генів [44]. Загальний вміст глікофосфоліпідів у ядрах становить 3% від маси, тоді як 75% припадає на білки та 22% на ДНК. Серед глікофосфоліпідів найбільша кількість припадає на фосфатидилінозитолфосфат та інші поліфосфоінозитиди, які в загальному переважають в ядрі, порівняно з плазматичною мембраною, де їх кількість значно менша. На відміну від цього, холестеролу більше в плазматичній мембрані, ніж в ядерній. Сфінгомієлін - це найпоширеніший сфінголіпід в ядрі, який разом з фосфатидилхоліном частково пов'язаний з холестеролом та білками і утворює ліпідно-білкові комплекси та бере участь у передачі сигналів через NE [45, 46]. Сфінголіпіди та глікосфінголіпіди через прямі та опосередковані механізми впливу можуть сприяти захисту клітини шляхом регулювання $[Ca^{2+}]_i$ [47-49].

Різні типи клітин можуть мати різну форми ядер, що пов'язано з транскрипційною активністю клітини та регуляцію експресії генів [50]. Зміна форми ядра, спричинена синаптичною активністю полегшує передачу сигналів кальцію та може посилити транскрипцію регульовану кальцієвими сигналами [51].

1.1.1. Потенціал спокою ядерної мембрани

Перші функціональні дослідження ядерної мембрани були проведені на початку 60-х років Льовенштайном і Канно, які показали електричний опір, ємність та різницю потенціалу між ядром та цитоплазмою [52]. Для різних об'єктів дослідження ця різниця варіювалася і становила приблизно -15 мВ в клітинах слинної залози *Drosophila flavorepleta* [52] та 0 мВ в ооцитах амфібій [53]. Також вони продемонстрували, що порушення цілісності ядерної оболонки ліквідує різницю потенціалу між цитоплазмою та нуклеоплазмою [52, 53]. Крім цього, виявилось, що поверхня ядра у різних об'єктів може мати різний опір та ємність, що може бути пов'язано із структурними та функціональними особливостями ядерної

оболонки цих клітин [53], [54]. В перших петч-клемп експериментах на ядрах пронуклеусів мишей було зафіксовано потенціал спокою ядерної оболонки, який становив приблизно -10 мВ [55]. За допомогою петч-клемп в конфігурації whole nucleus, яка є аналогічною до whole cell, але на ядрі клітини, виміряли, що ядра морської зірки мають потенціал $4-30$ мВ по відношенню до цитоплазми, а також опір $10-20$ М Ω та вхідну ємність $20-50$ пФ [56]. В інших дослідженнях на ооцитах та на ядрах клітин печінки дорослих мишей виявили відсутність певного потенціалу спокою [57, 58].

На теперішній час приймається, що потенціал ядерної мембрани та ER коливається біля 0 мВ. Вважається, що це пов'язано із особливостями функціонування транспортуючих систем, локалізованих на цих органелах та їх проникністю [16, 59, 60].

1.1.2. Внутрішньоклітинний іонний склад

Процеси, які відбуваються всередині клітини, як і поза її межами, опосередковуються активністю іонних каналів, рушійною силою якої є електрохімічний градієнт [61]. Потік іонів через канал обумовлений не тільки зміною потенціалу на мембрані (або/і наявністю ліганда), але і їх концентрацією по обидва боки мембрани. Іонний склад цитоплазми, нуклеоплазми та люмену чи перинуклеарного простору може залежати від типу клітин і стадії їх розвитку та взаємопов'язаний з біофізичними характеристиками внутрішньоклітинних іонних каналів та їх функціонуванням в фізіологічних процесах.

Перші виміри іонного складу ядра були зроблені в 1949 році [62]. Вважається, що співвідношення K^+ в цитоплазмі та ядрі $0,9 \pm 0,2$, а концентрація Na^+ не відрізняється між цитоплазмою та іншими компартментами [63], але результати експериментальних даних досить сильно варіюються. Зокрема, в нуклеоплазмі ядер печінки концентрація іонів натрію становила 131 мМ, в той час як в цитоплазмі виявили 10 мМ, а концентрація іонів калію в нуклеоплазмі - 264 мМ [64]. Припускається, що виміряні в ооцитах співвідношення іонів відрізняються в залежності від стадії розвитку клітини. Наприклад, у *Rana temporaria* концентрація

іонів натрію в ядрі в різні періоди підвищувалася з 9 мМ до 190 мМ, а концентрація іонів калію, навпаки, зменшувалася з 126 мМ до 28 мМ [65-67]. В нейронах спинного мозку $[Na^+]_i$ в середньому ембріональному розвитку досягає ~ 60 мМ, а потім знижується до ~ 30 мМ в пізньому ембріональному розвитку [68]. Також відомо, що кардіоміоцити, які розвиваються, так само як і ті клітини, в яких є певні розлади, мають нижчий рівень експресії Na^+/K^+ -АТФази, що пов'язано з підвищенням внутрішньоклітинного рівня $[Na^+]_i$ [69].

В клітинах лінії НЕК293 за допомогою натрій-чутливого зонду виявлено дещо менший рівень іонів натрію в ядрі (~ 13 мМ), ніж у цитоплазмі (~ 18 мМ) за умов приближених до фізіологічних [70]. Подібне співвідношення розподілу іонів було виявлене в міоцитах шлуночків серця: на периферії клітини від 23 до 48 мМ, в центральній частині цитоплазми (на відстані від плазматичної мембрани) від 17 до 29 мМ, в ядерній оболонці від 43 до 71 мМ, в ядрі від 12 до 24 мМ [71]. Натомість, в гладеньких м'язах судин було виявлено, що $[Na^+]_i$ в цитоплазмі та ядрі має схожі значення (середня концентрація в цитоплазмі в спокої становила $4,4 \pm 0,3$ мМ та $4,5 \pm 0,4$ мМ в ядрі) [72]. В перинуклеарному просторі клітин лінії НЕК293 концентрація іонів натрію становила більше 25 мМ [70], а в люмені гепатоцитів в середньому 84 мМ, тоді як в нуклеоплазмі 5-20 мМ. На відміну від іонів натрію було показано, що концентрація іонів калію в люмені гепатоцитів становила 5 мМ [73].

Використовуючи генетично кодовані флюорисцентні зонди, чутливі до іонів калію показали, що $[K^+]_i$ відрізняється між внутрішньоклітинними компартментами та цитоплазмою. В ядрі клітини було виявлено найвищу концентрацію іонів калію для всіх клітинних ліній, які використовувалися в експерименті, з досить значним розкидом значень між ними. В лінії клітин НЕК293 концентрація іонів калію в нуклеоплазмі становила 150 мМ, в той час як в клітинній лінії HeLa перевищувала 350 мМ. Така різниця в значеннях, можливо, залежить від типу клітин, в яких може відрізнятися набір іонних каналів на мембранах ядра та інших органелах. Відповідно, має значення експериментальна клітинна лінія та умови культивування, а також інкубаційний період протягом якого були здійснені виміри [74].

Отже, як в цитоплазмі так і в нуклеоплазмі різних типів клітин концентрація іонів може значно варіюватися, що, в основному, може бути пов'язано із стадією розвитку цих клітин або патологічними процесами. Хоча, цілком ймовірно, що розбіжності можуть виникати і з інших причин, як то метод вимірювання чи умови виділення та культивування клітин.

1.1.3. Проникність ядерної оболонки

Проникність ядерної мембрани опосередкована механізмами специфічного транспорту [75]. А саме, за допомогою мікроелектродів чутливих до калію, натрію та хлору виявили, що ядро містить досить високу концентрацію натрію, яка корелює з піком максимальної швидкості метаболізму амінокислот через оболонку ядра клітин тимуса. Проникність NE виявлялася не однаковою на різних етапах розвитку клітин слинної залози комах та корелювала із загальним розвитком та функціональною активністю клітин [76]. Гормональний вплив є коефіцієнтом контролю розвитку проникності ядерної мембрани, оскільки додавання гормону росту (екдісону) збільшувало опір ядерної оболонки [77], а гормони, які зв'язуються з певними рецепторами, пов'язаними з G-білками, підвищують проникність NE із залученням цитоплазматичного Ca^{2+} . Таке короткострокове регулювання проникності може забезпечувати механізм, завдяки якому гормони дозволяють транскрипційним факторам та іншим регуляторним молекулам потрапляти в ядро, тим самим регулюючи транскрипцію генів у клітинах-мішенях [78].

Здатність ядерної оболонки до проникності та її регулювання тісно пов'язане з одною з найбільших відомих на цей час структур на ядрі, що називаються NPC.

1.1.4. Ядерні пори

ONM та INM розділені між собою невеликим простором товщиною приблизно всього лише 30–50 нм [79-81]. ONM є суміжною з ER та умовно поєднується з INM у тих місцях, де є NPC [82].

За допомогою електронної мікроскопії зафіксовано, що поверхня ядра досить щільно вкрита ядерними порами (Рис. 1.2), а їх радіус досягає приблизно 45 Å [83].

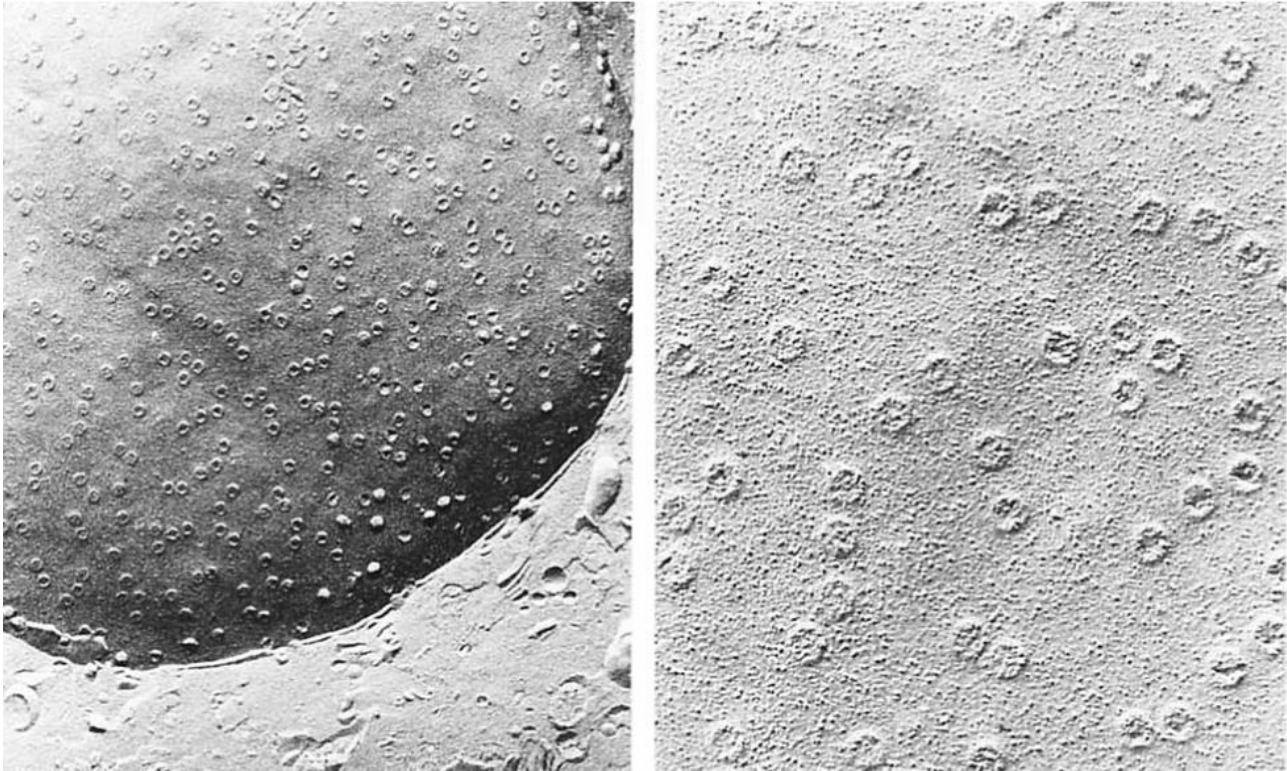


Рис. 1.2. Мікрофотографія, зроблена з використанням низьковольтного електронного мікроскопа, що показує типовий вигляд ядра клітини Пуркіньє (внутрішньої мембрани) з ядерними порами; зліва збільшення $\times 17000$, справа ділянка із збільшенням $\times 56000$ (За [84])

Кількість NPC тісно пов'язана з основними функціями, які виконує ядро клітини, а саме: чим активніше ядро в транскрипції, тим більше порових комплексів в його оболонці. Взагалі, NE клітини ссавців містить 3000–4000 порових комплексів, а частина загального трафіку, який проходить через них припадає на гістони та рибосоми. Кожен поровий комплекс має складну структуру, що представляє собою центральну пору та один або декілька відкритих водних каналів, по яких можуть пасивно дифундувати іони та молекули розміром приблизно до 40 кДа [85], тоді як білки, що перевищують 60 кДа не потрапляють в ядро. Шляхи вільної дифузії NPC еквівалентні наповненому водою циліндричному каналу діаметром приблизно 9 нм і довжиною 15 нм [86]. Більшість білків і рибонуклеїнових кислот (РНК) занадто великі, щоб дифундувати через NPC, тому такі молекули транспортуються із залученням процесу, який залежний від температури та енергії, а також цитозольних

факторів транспорту [87]. Зокрема, через NPC може здійснюватися транспорт проти градієнту концентрації із залученням малих G-білків (Ran) [88].

В нейронах ядерна оболонка пластична і реагує на активність клітини. При інтенсивній синаптичній активації ядерна оболонка нейронів гіпокампа утворює інвагінації та мікродомени [89]. Така складчаста структура має більшу кількість ядерних пор, що сприяє посиленню транспорту іонів між цитоплазмою та нуклеоплазмою [51]. Проникність ядерної оболонки визначається не тільки кількістю та розміром пор, але також їх розподілом та характеристиками середовищ, які вони з'єднують, так що велика кількість пор не обов'язково пропорційна більшій проникності [90].

NPC містить глікопротеїн 210, декілька доменів якого зв'язують Ca^{2+} в цистернах NE. Було визначено, що Ca^{2+} зв'язаний таким чином, може регулювати структуру NPC та виступати регулятором функції проникності. Зокрема, його виснаження призводить до конформаційних змін, які змінюють діаметр NPC, впливають на транспорт та селективність; всі ці зміни можуть бути згубними для клітини [91].

1.2. Іонні канали оболонки ядра

1.2.1. Кальцієві канали

Інозитол-1,4,5-трифосфат активовані (IP_3Rs) та рианодинові рецептори (RyRs) – два основні типи внутрішньоклітинних кальцієвих каналів. Вони мають схожу будову трансмембранних доменів, які утворюють пору каналу (~ 40% гомологічні), що може свідчити про те, що ці два канали еволюційно походять від спільного предка. Незважаючи на цю схожість в структурі, ці два типи рецепторів мають чітко розрізнені фізіологічні та фармакологічні профілі [92].

RyRs – найбільш поширені у збудливих клітинах, особливо у смугастих м'язах, де вони сприяють виникненню механізму збудження і скорочення, але їх розподіл в інших тканинах досить обмежений. Натомість, IP_3Rs локалізуються у різних типах клітин. На NE RyRs присутні в меншій кількості, в порівнянні з ER/SR, в той час як IP_3Rs більш розповсюджені [93], і їх густина в 4 рази вища саме на

внутрішній ядерній мембрані [94]. Типи IP_3Rs 1 і 2 найбільш поширені в центральній нервовій системі, особливо в мозочку [95], а тип 3 локалізується переважно в острівцях підшлункової залози, нирках та шлунково-кишкового тракту. Багато клітин містить всі три типи IP_3Rs і практично всі типи клітин мають принаймні одну форму цих рецепторів. Кожен ізотип рецепторів має унікальні біохімічні та біофізичні властивості, що може впливати на специфіку внутрішньоклітинного вивільнення Ca^{2+} [96].

IP_3Rs класично регулюються кальцієм в сигнальних шляхах, опосередкованих IP_3 , що виробляється, головним чином, метаболізмом фосфоліпази-С (PLC), фосфоінозитол-4,5-бісфосфату (PIP2) у відповідь на стимуляцію рецепторів, пов'язаних з G-білком (GPCR). Регуляція RyRs може відбуватися із залученням різних механізмів, проте найбільш дослідженою є регуляція кальцієм. Є два механізми активації RyRs іонами кальцію: 1) через збільшення концентрації кальцію в цитоплазмі, який надходить через L-тип кальцієвих каналів (calcium induced calcium release, CICR); 2) через збільшення концентрації іонів кальцію у внутрішньому депо (store overload induced Ca^{2+} release, SOICR) [97]. Регуляція RyRs типу 2 також може здійснюватися через алостеричне інгібування рецепторів кальциквестрином (CASQ2), який змінює чутливість до Ca^{2+} в цитоплазмі [98] у клітинах смугастих м'язів.

IP_3Rs мають дзвоноподібну залежність активності від концентрації кальцію, яка досягає піку при 250 нМ для каналів зовнішньої мембрани мозочка [99]. Також на їх активність впливає концентрація АТФ – із збільшенням концентрації від 100 мкМ до 2 мМ активність збільшується. RyRs мають високу спорідненість до рослинного алкалоїду рیانодину, який, завдяки високій афінності, використовували для їх очищення та виділення. При зв'язуванні з RyRs в низьких концентраціях рیانодин замикає канал у напіввідкритому стані [100], що призводить до виснаження Ca^{2+} з SR та подальшого переривання скоротливості [92]. RyRs зазвичай закриті при низькому $[Ca^{2+}]_i$ (~ 100–200 нМ). Активність каналу максимальна при $[Ca^{2+}]_i \sim 10$ мкМ, тоді як ще більше підвищення призводить до зниження рівня їх P_o [101].

Цікаво, що одні і ті ж речовини протилежно впливають на ці типи внутрішньоклітинних каналів. Найбільш широко використовуваним блокатором IP_3Rs є гепарин, до якого майже в однаковій мірі чутливі всі ізоформи [102], в той же час гепарин може активувати $RyRs$ [101]. Кофеїн, широко використовуваний як агоніст $RyRs$ пригнічує IP_3Rs [103].

IP_3Rs понад 90% часу перебувають у відкритому стані. Це неселективний катіонний канал, через який можуть проникати двовалентні лужноземельні катіони викликаючи зміну провідності у послідовності від більшої до меншої $Ba > Sr > Ca > Mg$. Такий же порядок провідності було зареєстровано для $RyRs$ [104, 105], хоча абсолютні значення були приблизно вдвічі більше. На інтактних ядрах провідність $RyRs$ сягала ~ 750 пСм для іонів калію [100]. Окрім одновалентних та двовалентних катіонів було показано, що $RyRs$ також можуть бути проникні до великих катіонів, таких як Tris і TEA, тому розмір їх пори оцінили приблизно в 40 \AA [106], в результаті чого, при кожному відкриванні каналу в 20 разів більше іонів кальцію вивільняється, ніж через IP_3Rs . Співіснування цих двох типів внутрішньоклітинних кальцієвих каналів, що активуються за допомогою різних механізмів дозволяє клітині вибирати між двома режимами вивільнення кальцію - швидким скиданням накопиченого Ca^{2+} через $RyRs$ (як у скелетних чи серцевих м'язах) або повільним витіканням через IP_3Rs (як у гладкій мускулатурі), або поєднувати обидва типи рецепторів для тонкої регуляції нейрональної кальцієвої сигналізації [99].

Окрім цього на ядерній оболонці виявлено інші канали з кальцієвою провідністю. Зокрема, показано наявність Ca^{2+} каналів типу R як у сарколемі, так і в мембранах ядерної оболонки. Ці канали активуються тривалою деполяризацією або стійкою специфічною стимуляцією GPCR, а їх провідність складає 24 пС (у симетричному Ca^{2+}) [107].

Розщеплений С-кінцевий фрагмент CcT дистального С-кінця $CaV_{1.2}$ присутній у гладком'язових клітинах артерій, де він знаходиться як в ядрі, так і в плазматичній мембрані та зменшує транскрипцію субодиниці $CaV_{1.2}$ гладком'язових клітин і зміщує потенціал-залежну активацію та інактивацію струму до більш деполяризуючих потенціалів [108]. Також дослідження на кардіоміоцитах і

нейронах показали, що фрагмент CSt транслокується в ядро і діє як ядерний фактор транскрипції [109].

1.2.2. Катіонні та K^+ селективні канали

Спонтанно-активовані катіонні канали NE вперше за допомогою методу петч-клемп зареєстровані на зиготах миші в 1990 році [110], а також ядрі морської зірки [56]. Згодом були описані на оболонці ядер кардіоміоцитів [111], печінки та кори головного мозку [18]. Зокрема, у фракції вентрикулярних кардіоміоцитів, які відповідали зовнішній ядерній оболонці, виявили канали з потенціал-залежною активністю. Ймовірність відкритого стану цих каналів збільшувалася при позитивних потенціалах та зменшувалася при негативних. Провідність каналу становила 181 ± 10 пСм в розчині KCl 50 mM *trans*/450 mM *cis*, з потенціалом реверсії -41 мВ. У фракціях, які відповідали внутрішній мембрані виявлено канали з низкою селективністю та провідністю 75 пСм [12]. На внутрішній мембрані ядер скелетних м'язів виявлено моновалентний низько селективний калієвий канал з провідністю 160 пСм [19], який переважно перебував у відкритому стані незалежно від потенціалу на мембрані.

Різні функціональні типи спонтанно-активованих каналів NE нейронів Пуркінє та гранулярних нейронів мозочка були описані в 2005 році [20]. На внутрішній мембрані ядра гранулярних нейронів гіпокампа було зареєстровано катіонний канал з провідністю 179 ± 15 пСм, який на позитивних потенціалах був майже весь час відкритим, а на негативних його активність зменшувалася [112]. Також були зареєстровані канали на зовнішній мембрані Т-лімфоцитів, які характеризувалися вхідним випрямленням та провідністю 152 пСм [113].

Великі кальцій-активовані калієві канали (ВК, KCa1.1 або Maxі-K) були зареєстровані на багатьох внутрішньоклітинних органелах в тому числі на ONM [17, 114] та INM [14]. Локалізацію цих каналів на внутрішньоклітинних органелах пояснюють з різними генетичними процесами, такими як альтернативний сплайсинг α - або β -субодиниці, які можуть регулювати трафік каналів до плазматичної мембрани [115]. ВК на плазматичній мембрані та всередині клітини відрізняються за

електрофізіологічними властивостями, що також вказує на те, що вони можуть бути ізоформою варіанту сплайсингу з субдиницями, які можуть модулювати їх біофізичні властивості [14].

Наявність ВК-каналів на внутрішньоклітинних органелах може бути пов'язана з функціями, які виконують певні типи клітин у визначений період часу. Наприклад, у клітинах гладкої мускулатури міометрія вагітної миші внутрішньоклітинні ВК виявлено в перинуклеарній області, що призводить до зменшення їх експресії на плазматичній мембрані і є механізмом, який готує м'яз матки до скорочень під час пологів, викликаючи більш високу скоротливість міометрію [116]. У клітинах подібних до фібробластів у пацієнтів з ревматоїдним артритом ВК локалізуються як на плазматичній мембрані так і на NE і їх функціонування може мати певне значення у розвитку патології [117].

Кальцій-активовані калієві канали середньої провідності $KCa_{3.1}$ (IKCa) були виявлені на NE в клітинах гладких м'язів дихальних шляхів як у здорових людей так і в тих, що страждають на респіраторні захворювання такі як важка астма, яка є стійкою до терапії з використанням глюкостероїдів. Блокада цих каналів призводила до значного зниження експресії проастматичних генів, стійких до флутиказону, а також відновлювала викликане флутиказоном фосфорилування $GR\alpha$ рецепторів та властивості трансактивації за рахунок пригнічення експресії цитокіну PP5, таким чином посилюючи активність кортикостероїдів при важкій астмі [118]. Також функціональні внутрішньоклітинні IKCa були ідентифіковані в людських плацентарних цитотрофобластах. Імунофлуоресцентне фарбування цитотрофобластів підтвердило експресію білка IKCa у моноядерних та багатоядерних клітинах незалежно від стадії диференціації [119].

В панкреатичних бета-клітинах з використанням кальцієвого іміджингу було виявлено K_{ATP} канал, який утворюється за рахунок колокалізації каналів вхідного випрямлення Kir6.2 з рецептором сульфонілсечовини, блокування якого призводило до зростання рівня нуклеарного кальцію [120]. За допомогою імуногістохімії також було виявлено канали Kir2.3 і 4.1 на ядрі клітин гліоми та астроцитах [121], а Kir2.2

на ядрах клітин спінального ганглію та ромбовидного мозку [122], але їх фізіологічна роль невідома.

Функціональні канали Kv1.3 експресуються в ядрі ракових клітин і беруть участь в активації факторів транскрипції після пригнічення їх транспортної активності [10]. На внутрішній мембрані ядра також можуть функціонувати калієві канали $K_v10.1$ і гіпотетично бути залученими до збереження балансу іонів калію всередині ядра [11].

1.3. Катіонні канали великої провідності

Вперше LCC-канали були загально охарактеризовані в 2005 році у роботі С. М. Марченка та співавторів [20]. Насамперед, варто зазначити, що характеристики цих каналів описані в загальних рисах і нічого не відомо про їх структуру та функцію, яку вони виконують в клітинах. Була визначена селективність та провідність (Рис. 1.3), а також були протестовані деякі блокатори та агоністи катіонних та кальцієвих каналів, які виявилися неефективними. Зокрема, було показано, що канали вирізняються селективністю до одновалентних катіонів, з найбільшою проникністю до іонів K^+ ($K^+ > Na^+ > Cs^+$).

Крім цього, в підтвердження катіонної селективності LCC-каналів, базовий розчин KCl 150 мМ замінювали на LiCl та RbCl і за таких умов для іонів літію, на відміну від рубідію, спостерігалось зменшення величини вхідного струму [123]. Відомо, що деякі іонні канали проникні до великих катіонів, наприклад, TRPV1 може проводити TEA (130 Да), NMDG (195 Да) та FM1-43 (452 Да). Відповідно, ці канали мають достатньо великий розмір пори та провідність. До таких каналів також відносяться P2X та ASIC [124]. Провідність LCC-каналів у симетричному розчині KCl 150 мМ становить 198 ± 27 пСм (Рис. 1.3 В). За умови реєстрації в асиметричному розчині, а саме наявності у піпетці іонів K^+ в концентрації 155 мМ, а іонів Cl^- 150 мМ, та у ванночці іонів K^+ в концентрації 15 мМ, а іонів Cl^- 150 мМ – рівноважний потенціал для калію становив -59 мВ, а потенціал реверсії -48 мВ. Таким чином, обраховане співвідношення проникності для іонів хлору та калію (P_{Cl}/P_K) становило 0,05. Оскільки LCC виявилися непроникними до NMDG та майже

непроникними для іонів хлору, було узагальнено, що це низько-селективні калієві канали. Густина розташування каналів на мембрані оцінюється в середньому 3-5 каналів на 1 мкм^2 . По аналогії до багатьох подібних катіонселективних каналів, які були описані раніше на ER/SR та NE, було зроблено припущення, що LCC-канали гіпотетично можуть проводити іони калію в протилежну сторону до руху іонів кальцію через IP_3Rs , таким чином запобігаючи змінам потенціалу на обох мембранах ядра. На теперішній час питання про фізіологічну роль LCC-каналів залишається відкритим, оскільки немає відповідного ефективного блокатора.

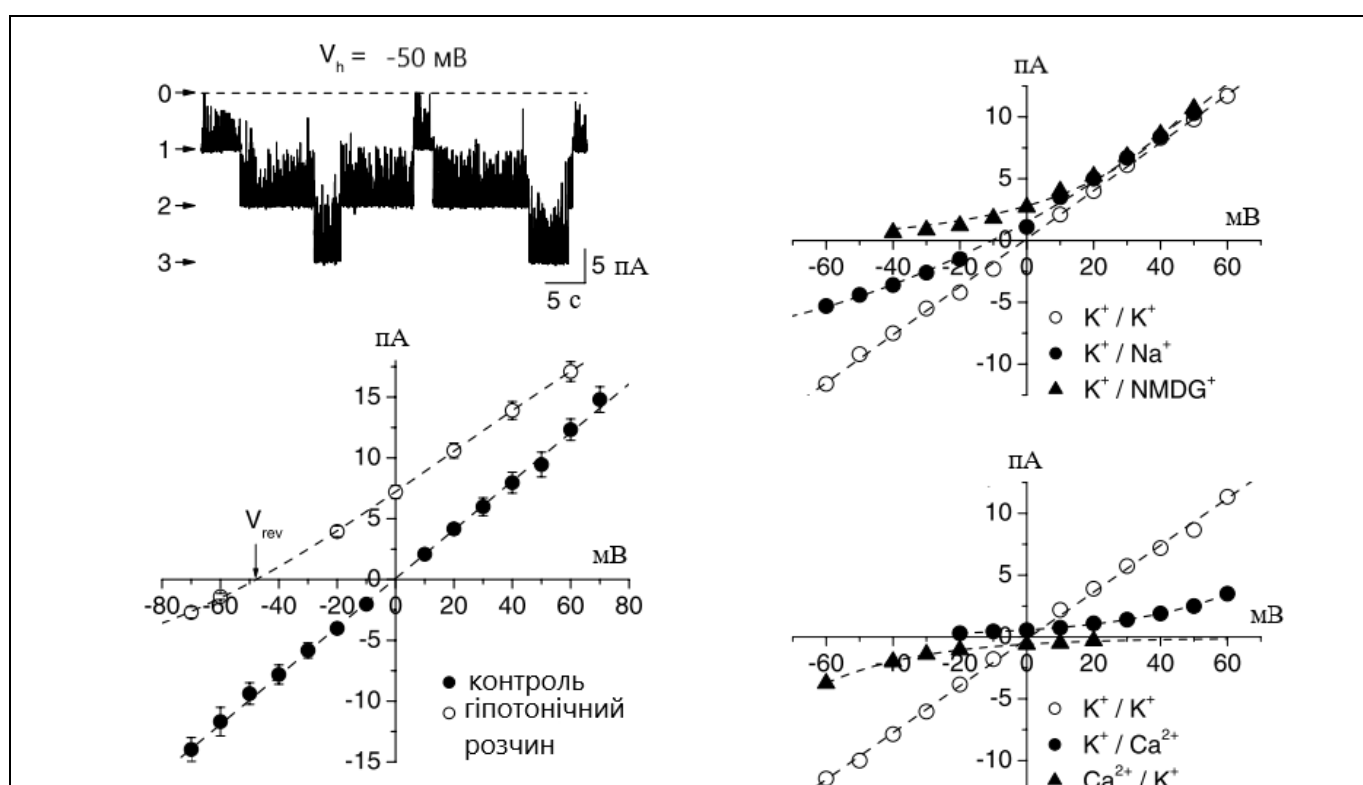


Рис. 1.3. Властивості LCC-каналів на ядерній оболонці нейронів Пуркінє мозочка щура. Потенціал реверсії LCC-каналів складає $-48,6 \text{ мВ}$ в гіпотонічному розчині. Канали селективні до одновалентних катіонів та непроникні для двовалентних катіонів та великих молекул як MNDG (За [20]).

Було показано, що активність LCC залежить від потенціалу на мембрані ядра [123]. На внутрішній мембрані ймовірність відкритого стану (P_o) збільшувалася із збільшенням позитивного потенціалу і навпаки, зменшувалася при зменшенні потенціалу (Рис. 1.4). Зокрема, було показано, що за умови 0 мВ $P_o \geq 0,8$ за наявності в петчі більше трьох LCC-каналів [23].

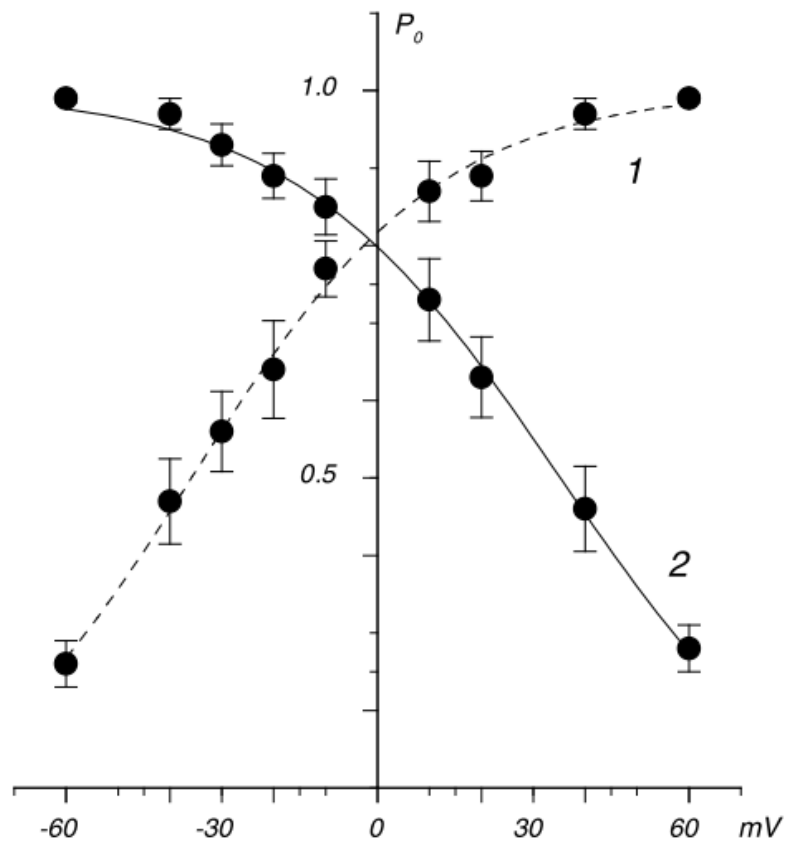


Рис. 1.4. Активність LCC-каналів на внутрішній (1) та зовнішній (2) мембрані нейронів Пуркінє мозочка щура в залежності від прикладеного мембранного потенціалу. P_o LCC-каналів на INM та ONM проявляють протилежну залежність від потенціалу (За [123]).

Також були чисельні спроби описати фармакологічний профіль LCC-каналів. В попередніх роботах було тестовано блокатори калієвих каналів (TEA 10 мМ і 4-AP 2мМ), рיאнодинових рецепторів (рутеніум червоний 10 μ М), інозитол-трифосфатних рецепторів (гепарин 0,02–0,4 мг/л), та ліганди кальцієвих каналів: рיאнодин, циклічна АДФ-рибоза, IP_3 та NAADP. Всі вище перелічені речовини не впливали на активність LCC-каналів [23].

На NE нейронів Пуркінє за допомогою електронної мікроскопії у великій кількості виявлено ядерні пори (15–22 на 1 μm^2) [84]. Відповідно до цього обговорювалася можливість, що LCC-канали можуть належати до комплексу ядерної пори, але таке припущення мало ймовірне, оскільки LCC-канали непроникні для аніонів, двовалентних катіонів, в тому числі для NMDG, тобто їх селективність

перевищує селективність NR [123]. Крім того, припускається, що провідність NR вимірюється в рази більшими значеннями [110], ніж провідність LCC-каналів.

Раніше повідомлялося, що LCC-канали мають повільну кінетику, але не було проведено відповідний аналіз. Ймовірно, що це може бути пов'язано з кількістю каналів в петчі, яка у переважній більшості випадків перевищує 1 канал, що технічно ускладнює калькуляцію експериментальних даних.

Отже, біофізичні характеристики LCC-каналів описані не в повній мірі і потребують детальнішого вивчення для подальшого розвитку структурно-функціональних досліджень. Крім того, відсутність відомостей про фармакологічний профіль цих каналів ускладнює визначення їх фізіологічної ролі, а також виділення відповідної білкової структури та амінокислотної послідовності. Все це створює потребу у більш детальному описі кінетики поодиноких LCC-каналів та пошуку блокаторів, які б ефективно інгібували трансмембранні струми через ці канали, що в свою чергу потребує побудови кінетичної моделі та розрахунку кінетичних параметрів.

1.4. Інші транспортні системи

Зовнішня ядерна мембрана містить АТФ-фазу, яка поглинає кальцій, що виходить із депо внаслідок активації IP_3Rs [125, 126]. На внутрішній ядерній мембрані методом імунологічної електронної мікроскопії виявлено субодиницю Na/K-АТФази плазматичної мембрани, яка функціонує як регулятор транскрипції [73, 127] та натрієво-кальцієвий обмінник (NCX) [128, 129] пов'язаний з гангліозидом GM1 для передачі Ca^{2+} з нуклеоплазми в перинуклеарний простір NE [130]. А також виявлено натрієвий/протонний обмінник [131], який може сприяти не тільки рівню регуляції рН, але і модулювати рівень натрію та кальцію через взаємодію з NCX.

Окрім цього відомі чисельні іонні канали різних типів, серед яких кальцієві, катіон-селективні, калієві та хлорні канали [12, 14, 15, 18, 110, 132-134].

Крім транспортерів та іонних каналів на мембранах ядра також було виявлено чисельні метаботропні рецептори, такі як глутаматні mGlu5 та mGlu1, які можуть

опосередковувати кальцієві сигнали через внутрішньоклітинні кальцієві канали, а також PGE₂, активація яких запускає індукцію c-fos та бере участь в регуляції експресії синтетази оксиду азоту в ендотеліальних клітинах, та рецептор лейкотрієну CysLT₁, який може відігравати вирішальну роль у проліферації в карциноматозних клітинах [135].

1.5. Модуляція іонних каналів

1.5.1. Типи модуляції

В широкому розумінні, термін модуляція означає зміни в часі параметрів (характеристик) певних регуляторних фізичних процесів по заданому закону. В контексті розуміння властивостей іонних каналів модуляція включає різні за своєю природою механізми, які призводять до зміни їх структури чи функції та узагальнює вплив таких протилежних процесів як, наприклад, потенціація, інгібування та блокування, які можуть бути наслідком дії багатьох різноманітних факторів. Фармацевтичні агенти та екзогенні клітинні месенджери не впливають на провідність каналу, але викликають зміни у ворітному механізмі іонного каналу (gating). Крім того, у багатьох випадках модуляція іонних каналів відбувається за фізіологічних умов ендогенними чинниками, а також під час розвитку патологій. Наприклад, коливання концентрації протонів, зміна мембранного потенціалу чи зв'язування з певними лігандами різного хімічного походження та будови. Окрім фізичної та хімічної природи діючого агенту, має значення індивідуальна структура тих чи інших каналів та рецепторів, що може створювати унікальні впливи, притаманні тільки для цього типу каналів.

Ворітний механізм може піддаватися модуляції в різних часових межах, в залежності від чинників, які впливають на канал. Швидка модуляція може відбуватися через зміну просторового положення субодиниць каналного комплексу. Тривала модуляція може бути досягнена шляхом ковалентної модифікації (наприклад, фосфорилування білка), що призводить до функціональної зміни, яка може тривати значно довше ніж початковий стимул, або не ковалентної

модуляції G-білками, яка передбачає взаємодію між різними мембранними білками, може забезпечити середні по тривалості зміни властивостей каналу [136].

По характеру дії модуляція може бути пряма чи алостерична. Алостерична модуляція може бути як позитивна так і негативна, а також може призводити до кооперації, коли зв'язування одного діючого агента збільшує чи зменшує афінність іншого [137-139].

Модулювати роботу каналу можуть структурні зміни субодиниць, які входять до його складу. Чисельні природні мутації змінюють функціонування білків, модулюючи їх провідність. Наприклад, різноманітні мутації в гені PSEN1 та PSEN2 призводять до порушень внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу [140, 141]. Зокрема, видалення дев'ятого екзону в гені PSEN1 (PS1 Δe9) належить до мутацій gain-on-function і модифікує не тільки білок PS1, а й функції сусідніх іонних каналів, таких як IP₃Rs та RyRs [142]. Крім того, використовуючи контрольований мутагенез в дослідженнях структури іонних каналів змінюють амінокислотну послідовність білків, які формують субодиниці каналу, таким чином також модулюючи роботу каналу та впливаючи на його ворітний механізм, з метою дослідження ролі того чи іншого компоненту структури, який може мати значення для характерної кінетики певного іонного каналу. Прикладів таких досліджень неймовірно багато, адже в поєднанні з функціональними дослідженнями вони надають безцінну інформацію в розумінні фундаментальних процесів кінетики іонних каналів в нормі та патології.

Блокування іонних каналів залежить від структури, властивостей та типу іонного каналу. Механізми блокування можуть бути простими та комплексними і значно відрізняються між собою для різних типів каналів та діючих речовин. Багато речовин, які ефективно модулюють та блокують певні типи іонних каналів не мають високої специфічності, проте, такі речовини можуть надати інформацію про особливості структури іонного каналу і як саме ця структура може визначати функції каналу. До таких речовин належать діючі агенти з добре відомою і відносно простою будовою.

1.5.2. Механізми блокування

Іони металів складають більшу частину періодичної системи хімічних елементів (таблиці Менделєєва), на них припадає приблизно четверть хімічних елементів земної оболонки; а отже вони досить розповсюджені в природі та мають велике значення для живих організмів. Фундаментальні знання про значення іонів металів у фізіологічних процесах були представлені відомим англійським лікарем та вченим Сіднеєм Рінгером в роботі, опублікованій в 1885 р. [143], де він доводив важливість використання солей металів та впливу їх концентрації на скорочення серця. Одновалентні іони лужних металів переважно функціонують як носії струму, тоді як двовалентні лужноземельні іони металів (група 2) функціонують як регулятори процесів, до яких залучений іонний канал [144].

Загалом, іони металів добре зарекомендували себе в аналізі біологічних структур та їх функцій: вони мають добре охарактеризовані атомну будову і невеликі відмінності в розмірах, що важливо для зондування структури іонних каналів за рахунок оцінки зміни їх кінетичних властивостей та ідентифікації сайтів зв'язування. Зокрема, їх використовують в якості інструментів при аналізі структури та функцій іонних каналів [145-150].

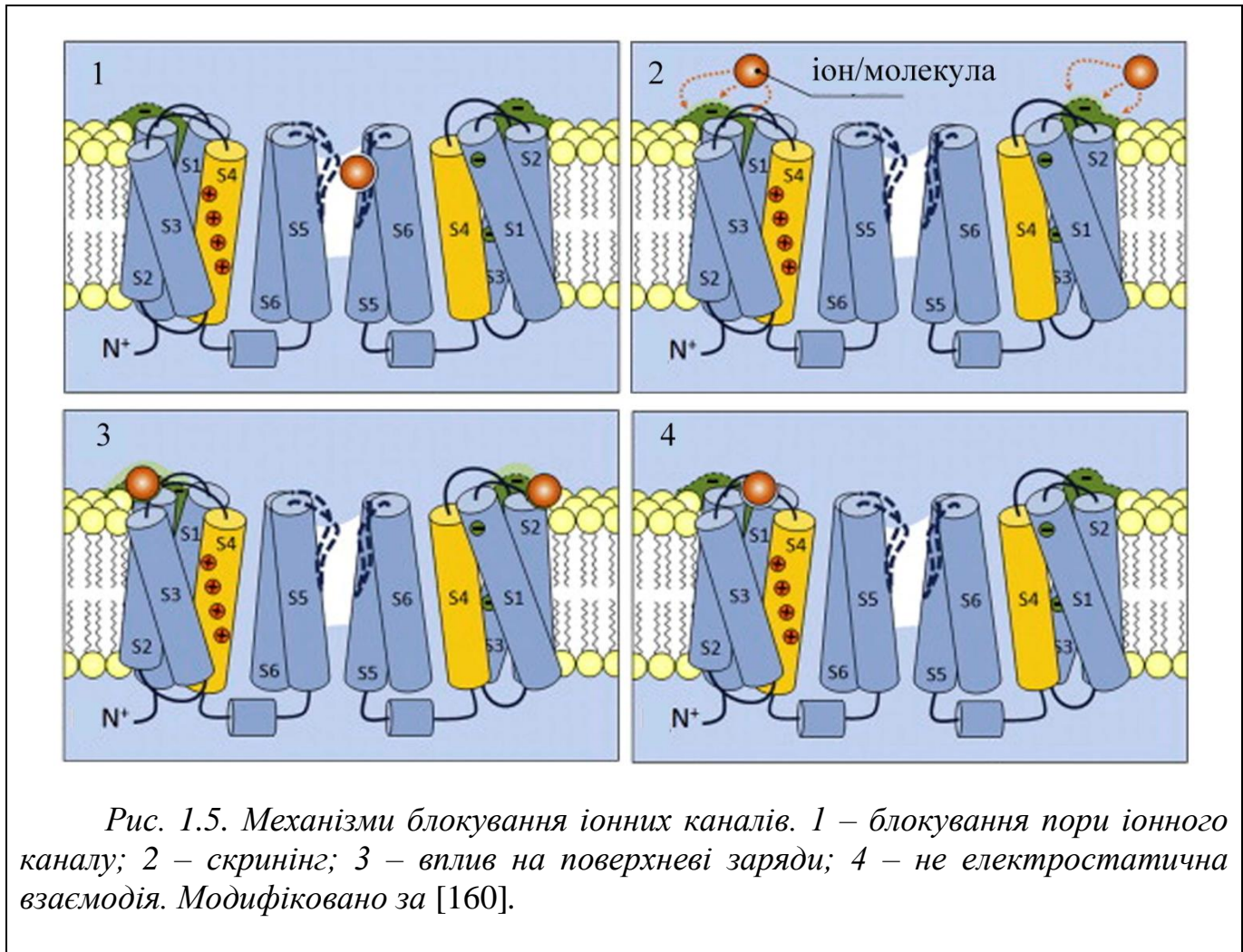
Завдяки високій специфічності, токсини, виділені із природних отрут, також часто використовуються як інструмент для характеристики молекулярної структури та функцій іонних каналів, а деякі групи токсинів розповсюджені у практичному використанні в медицині і досліджуються в терапевтичних цілях [151]. Суміші малих молекул, пептидів та білків, які виробляються різноманітними видами живих організмів, здатні специфічно впливати на функціонування широкого спектру молекулярних мішеней, в тому числі, на мембранні рецептори та іонні канали. Така властивість природних отрут пов'язана з великою кількістю структурно схожих амінокислотних послідовностей, що накопичувалися в процесі еволюції для полювання та захисту, спрямованого на виживання окремо взятого виду тварин чи рослин. Процес, який називається "еволюційним молекулярним моделюванням" надав змогу впливати на важливі молекулярні цілі в організмі тварин – іонні канали, внаслідок чого може змінюватися трансдукція сигналу [152].

Один з найбільших класів природних отрут – алкалоїди, які виробляються не лише рослинами, а й морськими тваринами та земноводними, певними бактеріями та грибами. Алкалоїди переважно містять атом нітрогену в своїй структурі, але не всі азотовмісні сполуки доцільно називати алкалоїдами. Наприклад, азотовмісний нейромедіатор дофамін класифікується як амін.

Використання блокаторів різного розміру та форми, від іонів металів порівняно малого розміру до величезних токсинів, як інструментів для дослідження архітектури пори та ворітного механізму іонного каналу, має важливе значення ще задовго до визначення структури каналів. Механізми впливу токсинів на іонні канали поділяються в залежності від їх хімічних властивостей та принципу дії. У випадку з натрієвими каналами токсини, орієнтовані на домени S1 – S4, що чутливі до потенціалу, можуть як гальмувати, так і полегшувати відкривання [153, 154], однак, у випадку дії на калієві та кальцієві потенціал-керовані канали в основному описано інгібування [155-157]. Вплив може бути здійснений на сенсор потенціалу безпосередньо, викликаючи зміни чутливості до потенціалу або на ворітний механізм каналу проникаючи в товщу біліпідного шару, що призводить до змін у функціонуванні каналів, а також ковалентно (незворотно) модифікуючи початкову структуру іонного каналу [158]. В загальному, так як і у випадку модуляції іонами металів, можна виділити декілька основних механізмів впливу. Узагальнення механізмів блокування, які часто зустрічаються і добре описані, представлено на прикладі потенціал-залежних каналів (Рис. 1.5).

Порові блокатори. Перший тип механізму описує випадки, коли діючі агенти безпосередньо блокують пору каналу, перекриваючи рух іонів до яких селективний канал. Це можуть бути конкурентні блокатори, які мають сайт зв'язування в порі іонного каналу. Такий механізм впливу в основному залежить від поданого потенціалу, оскільки потрапляючи всередину каналу на іони діє мембранний потенціал. Хоча блокування пори каналу не завжди може залежати лише від потенціалу. Класичний механізм блокування відкритих каналів описується простою моделлю, коли канали не можуть закритися разом із зв'язаним блокатором. Такий вплив пояснюється аналогією «ноги у дверях» (foot-in-the-door) [159], що означає,

що блокатор застрягає в порі іонного каналу і таким чином фізично запобігає зачиненню воріт каналу, в той же час перешкоджаючи руху іонів.



Існує безліч прикладів блокування пори іонних каналів іонами металів. Часом ці механізми поєднуються з іншими впливами. Барій має схожий до калію радіус, але вдвічі більший заряд і блокує ВК канали зв'язуючись із селективним фільтром [161, 162]. Це блокування залежить від концентрації іонів калію, який подовжує час блокування замикаючи Ba^{2+} всередині каналу [163, 164]. Іони лантанодів незначно відрізняються між собою по радіусу і всі близькі по радіусу до іонів кальцію, хоча при цьому не проникають через канал, тому використовуються у багатьох випадках для визначення молекулярної ідентичності та локалізації сайтів зв'язування для іонів кальцію в структурі каналів [165]. Блокування іонами гадолінію $Ca_{v1.2}$ та ітрію $Ca_{v3.1}$ відбувається, коли вони з'єднуються із сайтом зв'язування для кальцію

всередині пори, але приєднання також відбувається, коли канал знаходиться у закритому стані [166, 167]. Eu^{3+} може зв'язуватися з високоафінним сайтом активації для кальцію всередині пори RyR , але також може впливати і на низькоафінний сайт, який знаходиться на поверхні мембрани [168]. Іони La^{3+} та Gd^{3+} також можуть діяти як порові блокатори TRPC3 та TRPC6 [169].

В деяких випадках блокування пори може бути не потенціал-залежним. Наприклад, лантан блокує кальцієві струми через CRAC канали (STIM-Orai) з високою афінністю, але незалежно від зміни потенціалу, що вказує на наявність сайту зв'язування поза межами електричного поля [170]. Блокування кальцієвих каналів T -типу іонами лантаноїдів та нікелю в деяких випадках також не залежало від потенціалу [171]. Пізніше було визначено підтипи каналів, які мають різну чутливість до нікелю [172, 173], а ефекти блокування залежать від розташування сайтів зв'язування з різною афінністю, механізми блокування яких можуть бути комплексними. Наприклад, було продемонстровано наявність двох сайтів зв'язування для іонів Ni^{2+} з різною афінністю та неоднаковою чутливістю до потенціалу [174]. Сайт зв'язування з низькою афінністю знаходиться на поверхні каналу і викликає конформаційні зміни впливаючи на ворітний механізм, а високоафінний сайт знаходиться в порі каналу і чутливий до потенціалу, але іони Ni^{2+} можуть потрапляти на сайт зв'язування всередині пори через попередній низькоафінний і тому можуть конкурувати з іонами кальцію, таким чином зменшуючи ефективність блокування [175].

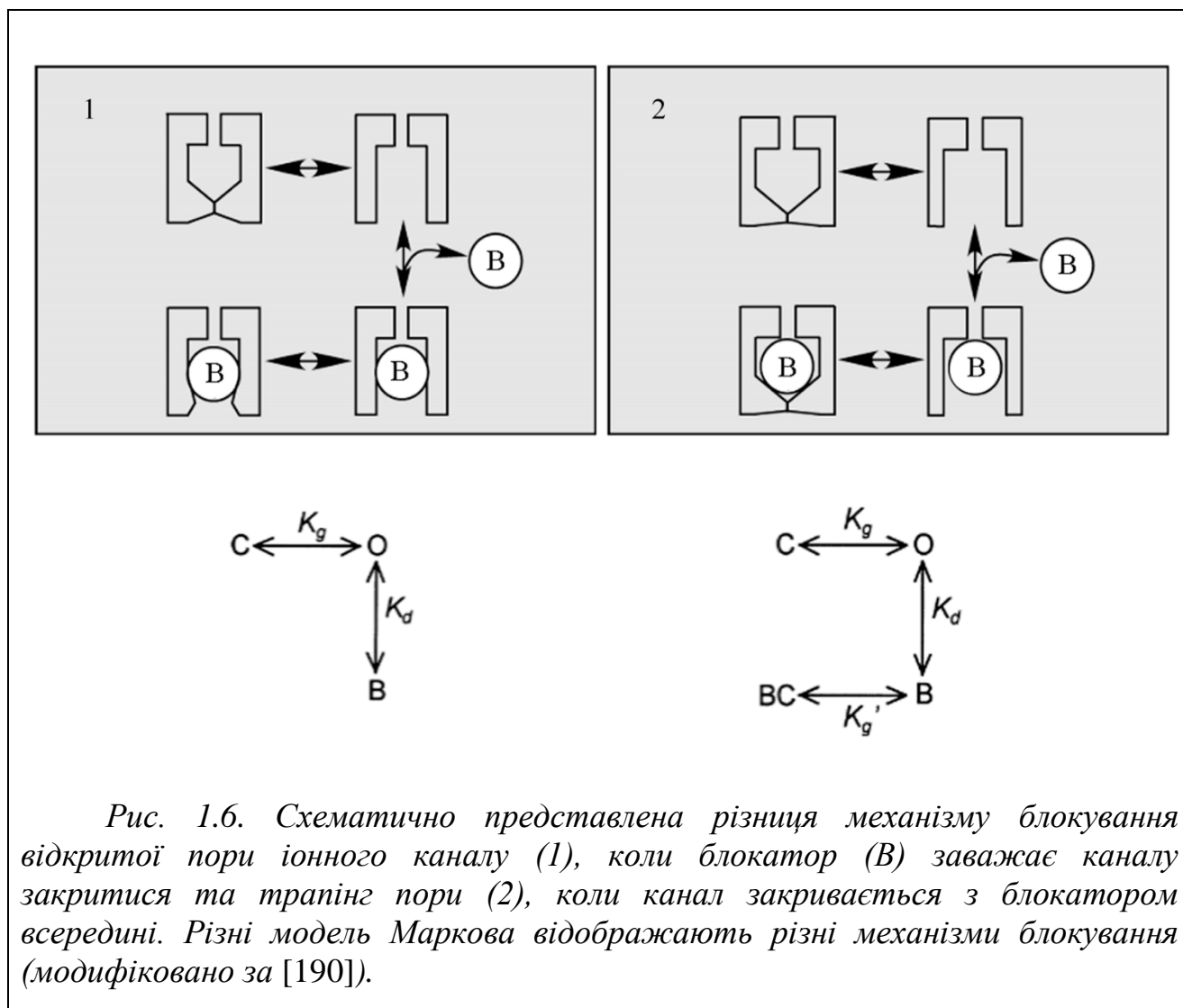
Крім вищеописаних механізмів блокування пори іонного каналу може відбуватися шляхом захоплення (або трапінгу, англ. *trapping*) іонів металів всередині каналу, таким чином, що блокатор залишається замкненим, поки ворота каналу знов не відкриються. Зокрема, такий механізм був описаний для блокування іонами барію калієвих каналів саркоплазматичного ретикулума [163] та для блокування NMDA -рецепторів іонами магнію [176, 177].

Низькомолекулярні та гідрофільні токсини часто виступають поровими блокаторами, які запобігають проведенню іонів, приєднуючись до відповідних сайтів зв'язування на субодиницях, які формують пору іонного каналу. До таких

речовин належать місцеві анестетики та нейротоксини. Для натрієвих каналів типовими прикладами токсинів порових блокаторів є гетероциклічні гуанідини, тетродотоксин (ТТХ) та сакситоксин (STX), а також пептид μ -конотоксин, а для калієвих каналів карибдотоксин (СТХ). В цілому, загальна характеристика механізму модуляції властивостей іонних каналів, що виникає внаслідок блокування пори не надто відрізняється від аналогічного впливу іонів металів та великих молекул.

Трапінг. Різновидом блокування пори може бути механізм, коли канал закривається разом із зв'язаним блокатором, таким чином, виникає захоплення блокатору всередині закритого каналу [178]. Невеликі блокатори можуть бути захоплені K^+ -каналами як у випадку ТЕА, що не змінює час закривання каналів [179]. У різних потенціал-керованих калієвих каналах, було виявлено захоплення антиаритмічних препаратів та амінопіридинових сполук [180-182]. Подібний процес також спостерігається у випадку впливу місцевих анестетиків на Na^+ -канали [183] та на нікотинові ацетилхолін-активовані канали на нервово-м'язових синапсах можуть, які захоплювати хлоризондамін [184].

Трапінг виявився корисним для зондування структури калієвих каналів у поєднанні із аналогами тетраетиламонію (ТЕА), які називаються четвертинними амоніями (QA) [184-186]. Використання такого підходу продемонструвало, що ворота активації більшості потенціал-залежних каналів розташовані у зовнішньому вестибюлі між сайтом зв'язування QA та внутрішньоклітинним розчином [187]. В залежності від типу взаємодії з ворітним механізмом іонного каналу можна визначити повний та частковий трапінг пори, що спостерігається для ліганд-керованих каналів. Наприклад, зв'язані молекули мемантину з рецепторами NMDA дисоціюють лише після видалення агоніста [188, 189]. Оскільки трапінг є різновидом порового блокування, то розрізнити ці механізми можна використовуючи кінетичну модель Маркова (Рис. 1.6).



Поверхневі заряди. Цей механізм модуляції охоплює випадки, коли позитивні іони металів мають сайти зв'язування на поверхні мембрани та впливають на сенсор потенціалу [191]. Поштовхом до пропозиції такого механізму було те, що різні двовалентні катіони викликали різний зсув потенціалу. Наприклад, відомо, що зміщення вольт-амперної характеристики для натрієвого струму відбувається в різній мірі в залежності від використаних іонів металів [191]. Цей механізм може бути важко розрізнити від попереднього, але принциповою відмінністю є те, що іони металів можуть мати сайти зв'язування на поверхні каналу, при цьому не викликаючи структурні зміни [191]. За таких умов зміщення вольт-амперної характеристики залежить від концентрації іонів металу і може бути обчислена концентраційна залежність, що проблематично у випадку механізму екранування.

Припускається, що константа зв'язування не залежить від стану, але локальна концентрація іона металу в місці зв'язування змінюється залежно від положення сенсора потенціалу. У відкритому стані сенсор потенціалу з позитивним зарядом переміщується у зовнішньому напрямку, тим самим відштовхуючи іони металів та знижуючи їх локальну концентрацію. Якщо змоделювати кінетику каналів при дії двох механізмів, виявиться, що різниця між ними полягає у швидкості зсуву активації та деактивації потенціал-залежних каналів, які однакові в першому випадку, тоді як у моделюванні другого випадку зв'язані іони металів зміщують активацію більше, ніж деактивацію. У першому випадку зв'язування не залежить від стану в якому знаходиться канал, тоді як у другому канал виявляє більшу спорідненість до іонів металу в закритому стані, ніж у відкритому, оскільки сенсор потенціалу відштовхує іон металу з каналу у відкритому стані завдяки електростатичному ефекту. По тому як зміщується активація та деактивація теоретично можна припустити скільки іонів металу зв'язані з каналом, так як більша кількість іонів може сильніше впливати на сенсор потенціалу і відповідно на зміщення кривих активації-деактивації [191].

Полівалентні катіони взаємодіють з нерівномірно розташованими негативними зарядами неподалік іонного каналу і таким чином змінюють електричне поле, яке оточує канал. Наприклад, струми NMDA-рецепторів блокувались концентраціями La^{3+} , що перевищували 100 мкМ та не залежали від мембранного потенціалу, при цьому збільшення концентрації La^{3+} змістило концентраційну криву для каїнату до нижчих концентрацій агоніста, не змінюючи максимального викликаного струму, що могло відбуватися або через підвищення спорідненості рецептора до ліганду, або через збільшення концентрації ліганду на поверхні мембрани, що може бути результатом зменшення поверхневого заряду мембрани [192]. Приклади впливу на поверхневий заряд були описані в класичних роботах на мембрані аксона гігантських кальмарів [193], на мембрані вузлів Ранв'є мієлінізованих волокон жаби [194, 195], нейронів моллюсків [196, 197] та інших.

Траїнг сенсора потенціалу. Деякі токсини виділені із природних отрут можуть впливати на канали, проникаючи в ліпідний шар клітинної мембрани, а

потім латерально дифундують, досягаючи місця зв'язування з каналом. Було виявлено, що декілька таких нейротоксинів утворюють комплекси, які складаються з токсину, зв'язаного з мембраною та рецептором-мішенню [198].

Перший приклад такої дії було виявлено для ханатоксину (HaTx), виділеного з отрути чілійського тарантула (*Grammostola spatulata*). HaTx спричиняє слабе інгібування каналів Shaker Kv та сильне інгібування каналів Kv2.1 та Kv4.2 [199]. Дослідження взаємодії показали, що канали, зв'язані з HaTx, можуть відкриватися, але залежність провідності від потенціалу $G(V)$ зміщується до більш позитивних потенціалів на мембрані [200]. Експерименти з використанням мутантів каналу Kv2.1, які виявляють слабе зв'язування та швидку дисоціацію HaTx, демонструють, що токсин швидше розв'язується з відкритими каналами [201]. Ці результати підтримують припущення про те, що токсин інгібує канал Kv2.1 шляхом стабілізації закритого стану [157].

Інший токсин (VSTx1) виділений із отрути тарантула теж гальмує сенсор потенціалу K^+ -каналів через вбудовування в ліпідну мембрану. Дія токсину в наномолярних концентраціях викликає повільну кінетику інгібування з повільними константами асоціації та дисоціації [202]. Секціонування мембрани токсином свідчить про те, що VSTx1, ймовірно, інгібує KvAP спочатку зв'язуючись з мембраною, а потім латерально дифундує, поки не знайде своє місце зв'язування на каналі. Цей механізм обумовлений фізико-хімічними властивостями молекули токсину та ліпідного бішару клітинної мембрани. Завдяки присутності як гідрофобних, так і гідрофільних залишків на поверхні токсин отримує доступ до місця зв'язування на VSD шляхом роз'єднання двох шарів ліпідної мембрани і поверхнево локалізується на межі ліпід-вода, вводячи в мембрану декілька гідрофобних амінокислот, в той час як основні залишки, які складають більшу частину, зберігаються у водній фазі [203]. Електростатичні взаємодії між зарядженими бічними ланцюгами на поверхні токсину та фосфатними групами ліпідів молекули відіграють ключову роль у визначенні місця розташування токсину [204]. Область токсину, що взаємодіє з мембраною, нагадує гідрофобний кластер, оточений кільцем позитивно заряджених амінокислот. Цей мотив вважається

важливим для розділення мембрани, оскільки було виявлено, що деякі токсини мають більшу спорідненість до мембран з великою кількістю негативно заряджених ліпідів (наприклад, фосфатидилгліцеролів), ніж до мембран з цвітер-іонними ліпідами (наприклад, фосфатидилхоліни) [205, 206]. Вважається, що контакт з мембраною підвищує спорідненість інгібування [202]. Крім того, було показано, що зв'язування з мембраною може викликати структурні зміни токсину [207], таким чином сприяючи потрібному розташуванню для зв'язування з іонними каналами. Токсини, подібні до NaTx інгібують K^+ -канали, модифікуючи ворітний механізм. Канали, зв'язані з токсином, можуть відкриватися і проводити іони, але енергія, необхідна для цього, значно більша, ніж для незв'язаних каналів, у випадку якщо би токсин працював через алостеричний механізм. По-друге, токсин має виражений вплив на рух VSD у відповідь на зміни потенціалу мембрани. По-третє, токсин не впливає безпосередньо з зовнішнього боку пори каналу, як можна було б очікувати для порового блокатора, а натомість тісно взаємодіє з визначеною областю на VSD [156]. Подібний механізм впливу токсинів через вбудовування в мембрану описують також для механочутливих каналів TREK-1 та SAC [208].

Здатність пептидів модулювати ворітний механізм каналу, зв'язуючись через мембрану, не можна передбачити, якщо брати до уваги лише з амфipатичну природу пептиду, наявність гiдрoфoбнoгo кластера в їх структурі та загальний заряду. Токсини Hd1a та хуветоксин-IV не зв'язуються з фосфоліпідними мембранами, тоді як токсини VsTx1, SGTx1, NaTx та ProTx-I демонструють властивість вбудовуватися в мембрану шляхом її роз'єднання, хоча вони всі є амфipатичними сполуками з гiдрoфoбним скупченням та аніонними і катіонними залишками розподіленими на поверхні, а також мають однаковий заряд [209]. На відміну від цього, поліпептидні токсини призводять до змін у ворітному механізмі каналів за допомогою захоплення VSD, яке відбувається через зв'язування із зовнішніми ділянками каналу. Механізм захоплення сенсора потенціалу може бути поширеною формою дії для поліпептидів, які є токсинами-модифікаторами, що діють на всі потенціал-чутливі іонні канали [158, 210]. Наприклад, токсин BrMT (6-бromo-2-меркаптотриптамін), який стабілізує сенсор потенціалу каналів Shaker у стані спокою і запобігає їх активації,

викликаючи ступінчасте уповільнення активації каналу. Із збільшенням концентрації BrMT в розчині канали активізуються прогресивно повільніше. Уповільнення активації супроводжується зменшенням пікової амплітуди струму I_K , через те, що BrMT стабілізує інактивований стан [211].

Трапінг сенсора потенціалу може здійснюватися різними способами: з зовнішнього або внутрішнього боку мембрани чи через товщу ліпідного шару, через електростатику та алостеричну модифікацію (як неконкурентний антагоніст). Таким чином, токсини, які впливають шляхом захоплення сенсора потенціалу, можна розділити на три основні групи залежно від впливу, який вони викликають.

1) токсини, які сповільнюють інактивацію, зв'язуючись з петлею S3 – S4 (α -токсини скорпіона, разом з токсинами морської анемони, δ -аратотоксином, δ -колотоксином та токсином тарантула JZTX).

2) токсини, які подовжують активацію, стабілізуючи активований стан, зв'язуючись із позаклітинними петлями S1 – S2 та S3 – S4 домену II Na-каналів (β -токсини скорпіона, токсин павука мегіотоксин 5).

3) токсини, які зменшують активність каналів (P_o) або сумарну амплітуду струму, зв'язуючись з лінкером S3 – S4 і перешкоджаючи руху S4 назовні, тим самим зміщують криву $G(V)$ у позитивному напрямку вздовж осі потенціалу [158].

Екранування. Механізм, який узагальнює випадки, коли позитивно заряджені сполуки екранують негативно заряджену поверхню (мембрану), модифікуючи електричне поле, таким чином зменшують концентрацію проникних іонів біля гирла каналу. Припущення про такий механізм впливу виникло в одних із перших досліджень впливу іонів Ca^{2+} , в яких було показано, що вони призводять до зсуву потенціал-залежності натрієвих та калієвих каналів на плазматичній мембрані [212]. Провідність, рівноважна активація і часові константи в таких випадках зміщуються в сторону позитивних потенціалів залежно від складу зовнішнього розчину. Такий ефект спостерігається для більшості багатовалентних іонів і ґрунтується на припущенні, що локальні поверхневі потенціали, які виникають за рахунок фіксованих на мембрані зарядів, розташованих близько до каналів, ефективно компенсують різницю напруги, “виміряну” сенсором потенціалу іонного каналу.

Іони, які мають протилежний заряд можуть нейтралізувати частину поверхневого заряду і зменшити його щільність, таким чином на поверхневі заряди сильно впливають зміни концентрації протилежно заряджених іонів. Оскільки такі зміни локальні, вплив поверхневих потенціалів не вимірюється безпосередньо у розчині, але відображаються через зміни в потенціал-залежності ворітного механізму іонного каналу [160]. Класично, цей вплив пояснюється теорією Гуї-Чапмана, відповідно до якої іони з однаковою валентністю і концентрацією в однаковій мірі змінюють поверхневий потенціал із значно вищою ефективністю екранування двовалентними іонами у порівнянні з одновалентними. В моделі Гуї-Чапмана іони розглядаються як точкові заряди, що знаходяться в безрозмірному середовищі, і передбачається, що вони однорідно розподілені по поверхні мембрани. Цей підхід використовує ряд спрощених припущень, включаючи те, що заряди ліпідів рівномірно розподілені по поверхні площини, але не дивлячись на це така теорія надає адекватний опис багатьох електростатичних явищ [213, 214]. Вважається, що ця модель в принципі не може описати всі явища, які відбуваються при взаємодії електролітів різного складу з біологічними мембранами, в основному по тій причині, що мембрани різних об'єктів відрізняються між собою біохімічним складом компонентів [215]. Також, використовуючи моделювання було зроблено передбачення, що не тільки від властивостей мембрани, але і в залежності від будови іонних каналів, складу їх субодиниць, екранізуючий вплив Gd^{3+} може відрізнитися в межах однієї родини іонних каналів і буде більшим для каналів типу Shaker (включаючи регулюючі домени для K^+ провідності, RCK1), ніж для Shaw (включаючи Raw3), Shab або Shal канали [216]. Крім того, варто зазначити, що токсини, так як і іони металів можуть викликати екранування мембрани, зменшуючи амплітуду струму і таким чином нагадувати вплив швидких блокаторів [217].

Неелектростатичний механізм. Цей механізм описує випадки, коли сполуки напряму взаємодіють із сайтом зв'язування каналу не через електростатичні сили. Зв'язування та супутній неелектростатичний вплив на ворота іонного каналу відбувається або через дію на сенсор потенціалу або на певну іншу частину воріт. В основі цього лежать механізми поєднання інших попередніх механізмів, при цьому

можна спостерігати зміщення константи відкривання та закривання каналу в протилежних напрямках [191]. Механізм, який сповільнює константи відкривання та закривання описаний для впливу іонів лантану та гадолінію [218], а також для магнію [219], який уповільнює кінетику активації, зв'язуючись у кишені між трансмембранними сегментами S2 та S3, де взаємодіє з двома кислотними залишками S3 [220]. Такий вплив магнію передбачений “паралельною” моделлю Маркова, яка передбачає незалежний рух чотирьох субодиниць каналу перед відкриванням пори та узгоджується з експериментальними даними [221]. Лантан, церій, неодим і гадоліній інгібують пуринові рецептор-канальні P2X1R і P2X2R в концентрації від 3 до 300 мкМ, що пов'язане, принаймні частково, з алостеричними механізмами впливу, оскільки припускається, що зв'язування гадолінію відбувається в сайті зв'язування АТФ і знижує спорідненість до АТФ [222].

Окрім блокування може відбуватися алостерична потенціація як наприклад у випадку дії лантаноїдів на GABA-рецептори, збільшуючи GABA стимульований струм через хлорні канали [223]. Вплив може бути комплексний і залежним від концентрації. Наприклад, La^{3+} в концентрації до 100 мкМ посилював струми, викликані впливом кайнату та квіскулату на NMDA-рецептори, тоді як більші концентрації призводили до блокування [192]. Також La^{3+} і Gd^{3+} можуть посилювати активність каналів TRPC4 та TRPC5, діючи на позаклітинний сайт зв'язування для катіонів [169]. Лантан впливає також як позитивний модулятор на м'язевий тип AChR, тоді як на три підтипи нейрональних рецепторів впливає як негативний модулятор [224].

Гідрофобні алкалоїди та жиророзчинні токсини часто можуть діяти на сайти зв'язування, які знаходяться всередині мембрани та змінювати чутливість до потенціалу через алостеричні механізми дії, переважно приєднуючись до конкретних конформацій каналу та стабілізувати унікальні функціональні стани, тим самим змінюючи активацію, інактивацію та навіть селективність [210]. Алостерична модифікація властивостей каналу здійснюється зв'язуванням токсинів із сайтом, який, наприклад, у натрієвих каналів розташований на шостому сегменті, який формує пору каналу (S6) у домені I, тому що точкові мутації в сегменті I-S6

роблять Na^+ -канали стійкими до батрахотоксину (ВТХ). Цей сайт дещо відокремлений як від пори каналу, так і від домену сенсора потенціалу. Прив'язка до нього посилює активацію каналів, сприяючи відкритому стану в поєднанні із запобіганням інактивації. До того ж, ВТХ може змінювати рух сусіднього сегменту сенсору потенціалу (S4) за допомогою непрямих взаємодій при зв'язуванні з сегментом S6. Відомо, що токсини, які зв'язуються із сайтами всередині мембрани з пороформуєчими сегментами унікальні для Na^+ -каналів [225].

Для ліганд-керованих каналів, як правило, алостеричні модулятори не є конкурентними інгібіторами. Алостерична модуляція рецептора є результатом зв'язування алостеричних модуляторів в іншому місці ("регуляторному сайті") від ендogenousного ліганду ("активний сайт") і посилює або гальмує вплив ендogenousного ліганду. Зазвичай алостеричний модулятор діє викликаючи конформаційну зміну молекули рецептора, що призводить до зміни спорідненості зв'язування ліганду.

Механізми блокування можуть бути комплексними і одна й та сама речовина може діяти різними способами. Наприклад, лідокаїн блокує натрієві канали впливаючи двома способами: швидко та потенціал-залежно блокуючи пору каналу і повільно блокуючи інактивований канал. Із цитоплазматичного боку мембрани вплив лідокаїну потенціал-залежний, і навпаки, із зовнішнього боку мембрани не залежить від потенціалу [226]. Більшість подібних до лідокаїну речовин мають потенціал-залежний вплив, який зростає із збільшенням негативного потенціалу, але, наприклад, вплив фенілгідразину слабо залежить від потенціалу [227].

Отже, можна узагальнити, що взаємодія іонних каналів з різними речовинами, які модулюють активність цих каналів, може бути опосередкована різними механізмами, або їх комбінацією, що в свою чергу пов'язано із структурно-функціональними особливостями іонного каналу. При аналізі цих механізмів центральну роль відіграють кінетичні моделі, які дають можливість передбачити характер зміни активності іонних каналів під дією модуляторів та оцінити відповідні кінетичні характеристики.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Виділення ядер нейронів Пуркінє

Всі експериментальні процедури були проведені згідно з Директивою № 2010/63/ЄС про захист тварин, що використовуються з науковою метою, і вказівок комітету з питань біоетики Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця (витяг з протоколу № 1/18). Експерименти проводили на щурах лінії Вістар віком 2-3 тижні (P14-21). Тварини такого віку були вибрані для експериментальних процедур виключно для зручності проведення хірургічних маніпуляцій. У тварин молодшого віку мозок більш м'який і внаслідок цього підлягає значній деформації при виділенні з черепної коробки та нарізанні зрізів, а у старших з'являється більша кількість сполучної тканини, що в кінцевому результаті зменшує кількість виділених ядер на об'єм експериментальної камери.

Після декапітації тварини, мозочок швидко виділяли і промивали розчином, який містив (у мМ): глюконат-К – 150, НЕРЕС-КОН – 5 (рН 7,3). Мозочок анатомічно відділений від півкуль головного мозку і дещо виступає над довгастим мозком, тому його легко розрізнити і швидко відокремити від прилеглих відділів мозку за допомогою заокругленого шпателя. Виділений мозочок переносили на холодну пластину та нарізали на тонкі зрізи завтовшки приблизно 1 мм. З одного мозочка брали 5-6 зрізів та поміщали по одному зрізу в ємності з 1 мл розчину для інкубації (такого ж самого складу як і для промивання). Загальний час хірургічних маніпуляцій складав не більше 3 хв. Ємності із зрізами розміщувалися в спеціальній підставці з кригою, щоб не допускати нагрівання зразків. Підставку із зразками залишали в морозильнику з температурою $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ щонайменше на 3 год. В замороженому стані зразки могли зберігатися досить тривалий час без шкоди для іонних каналів в оболонці ядра.

Перед експериментом зразки розморожували і гомогенізували шляхом пропускання через голку для ін'єкцій із внутрішнім діаметром 0,34 мм (23G). Здійснюючи цю процедуру уникали виникнення в розчині бульбашок повітря. Для отримання фракції, яка містить ядра, гомогенат центрифугували протягом 5 хв

(1000g) використовуючи центрифугу MiniSpin (Eppendorf, Німеччина). За таких умов важчі залишки зруйнованих клітин, в тому числі ядра, збиралися в нижній частині епандорфу, утворюючи осад. Супернатант, що складався з розчину із дрібними залишками клітини, обережно відтягували голкою. До осаду додавали 1 мл базового розчину KCl і перемішували з осадом за допомогою піпетки. Отриману суміш, в кількості 40-60 мкл, додавали до базового розчину в робочій камері на інвертованому мікроскопі Leica DMIRB (Leica Microsystems, Німеччина), де ядра осідали протягом 2-3 хв та щільно прикріплювалися до поверхні скла експериментальної камери. Рештки клітин, які залишалися в експериментальній камері, відмивали проточною аплікацією базового розчину. Швидкість аплікації становила 1 мл за 20 с. Таким чином, майже за 2 хв в робочій камері мікроскопу залишалися в основному ядра різних нейронів мозочку та невелика кількість залишків клітин, яка не заважала отримати вільний доступ мікропіпеткою до ядер.

Попередні варіації методу ізоляції ядер нейронів мозочку включали їх виділення із тонкого зрізу (300 мкм завтовшки) за допомогою мікропіпетки [20]. Такий спосіб дозволяв отримати ядра з точно морфологічно розрізненого шару нейронів Пуркінє. Тіло клітини Пуркінє має грушоподібну форму, від якої відходить безліч дендритів, рясно розгалужених в площині, перпендикулярній до звивин мозочка. Відомо, що нейрони Пуркінє одні з найбільших клітин головного мозку. Їх діаметр складає 25-40 мкм [228]. Ядра нейронів Пуркінє можна було легко відрізнити від інших також завдяки їх розміру. Чисельні фотографії, отримані за допомогою електронного мікроскопу, демонструють, що ядро нейронів Пуркінє має діаметр 8-12 мкм, із світлою нуклеоплазмою та контрастно темним ядерцем [229, 230]. Тому згодом процедура виділення ядер була спрощена, оскільки їх можна практично безпомилково розпізнати серед інших ядер завдяки особливостям їх морфології та по тій простій причині, що інших ядер такого великого розміру в мозочку немає [231]. З огляду на цей факт, ядра нейронів Пуркінє – це зручний об'єкт для фундаментального дослідження локалізованих в мембранах іонних каналів, оскільки їх проста ідентифікація значно економить час підготовки до електрофізіологічних експериментів.

Також, попередні варіанти методу ізоляції включали етап інкубації в 1% розчині цитрату натрію протягом 30-60 хв [20]. Згодом виявилось, що доступ до внутрішньої мембрани може бути отримано без інкубації в цитраті, а її ідентифікацію можна здійснити відповідно до потенціал-залежної активності LCC-каналів на внутрішній та зовнішній мембрані. Ймовірно, що механічного впливу, який здійснюється під час руйнування тканини тонкого зрізу мозочка при пропусканні через голку невеликого діаметру, виявляється цілком достатньо, щоб цитоархітектура клітини була зруйнована в тій мірі, щоб відділити окремі клітинні органели. Зовнішня мембрана тісно поєднана з ER, тому можна припустити, що в результаті механічного впливу і відділення ER від ядра, зовнішня мембрана відривається від внутрішньої легше ніж від ER. Таке припущення може ґрунтуватися на відомостях про з'єднання між ER та зовнішньою мембраною та між зовнішньою і внутрішньою мембраною, а також відомостях про відстань між цими структурними компонентами. Відомо, що зовнішня мембрана ядра безпосередньо переходить в гранулярний ER, тобто ці дві структури нерозривно поєднані, в той час, як із внутрішньою ядерною мембраною, вважається, немає безпосереднього зв'язку [232]. Натомість зовнішня та внутрішня мембрани поєднані точково, за посередництва окремих структурних елементів, які називаються ядерними порами. Це білкові структури, які пронизують простір між зовнішньою та внутрішньою мембраною. Вочевидь, зв'язок, який утворюється між цими мембранами за допомогою поодиноких білкових вкраплень не настільки міцний як безперервний перехід біліпідного шару на межі зовнішньої мембрани та ER. На чисельних мікрофотографіях ядер різних клітин можна спостерігати рибосоми у великій кількості на меншій відстані від зовнішньої ядерної мембрани, ніж зовнішня мембрана від внутрішньої. Оскільки рибосоми розташовані в мембрані гранулярного ER, то таким чином можна оцінити відстань між зовнішньою мембраною та ER і порівняти з відстанню до внутрішньої мембрани. У першому випадку така відстань буде меншою, що свідчить на користь того, що зв'язок між зовнішньою мембраною та ER може бути важче порушити за рахунок механічного впливу ніж між зовнішньою та внутрішньою мембраною. Ці припущення повністю

узгоджуються з експериментально отриманими результатами, які свідчать, що очищення внутрішньої мембрани можна досягнути внаслідок дуже простої процедури виділення ядра, яка описана вище. Найбільш доступна нам верифікація доступу до очищеної внутрішньої ядерної мембрани може бути проведена електрофізіологічним методом. В попередніх роботах було показано, що активність LCC-каналів на внутрішній та зовнішній мембрані потенціал-залежна [23]. На зовнішній мембрані канали досягають максимуму активності при негативних потенціалах, а на внутрішній навпаки, при позитивних. Якщо так, то LCC-канали, які ми реєструємо, використовуючи метод виділення з мінімальною кількістю маніпуляцій, знаходяться на внутрішній мембрані ядра, оскільки мають чітко виражену потенціал-залежну активність, яка досягає максимуму значення P_0 при позитивних потенціалах на мембрані (Рис. 1.4). Маніпуляції після розморожування зразку займали не більше 10 хвилин. В результаті виконання описаної процедури ядра були придатними для patch-clamp реєстрації струмів.

2.2. Електрофізіологічна реєстрація трансмембранних струмів

Ядра нейронів Пуркінє візуально легко відрізнити серед інших через їхній великий розмір (Рис. 2.1). До експериментальної камери мікроскопу була підключена LCD- камера, зображення від якої подавалося на монітор (Рис. 2.2). За

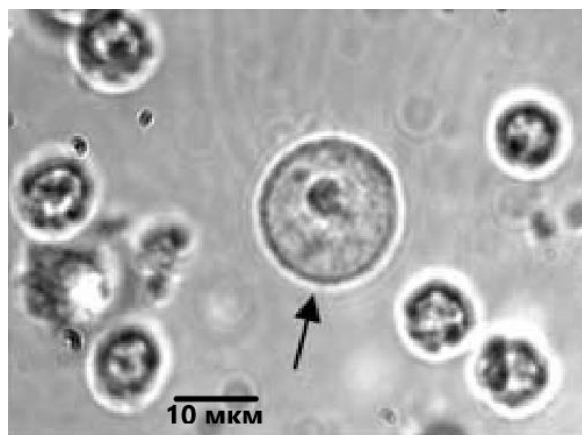
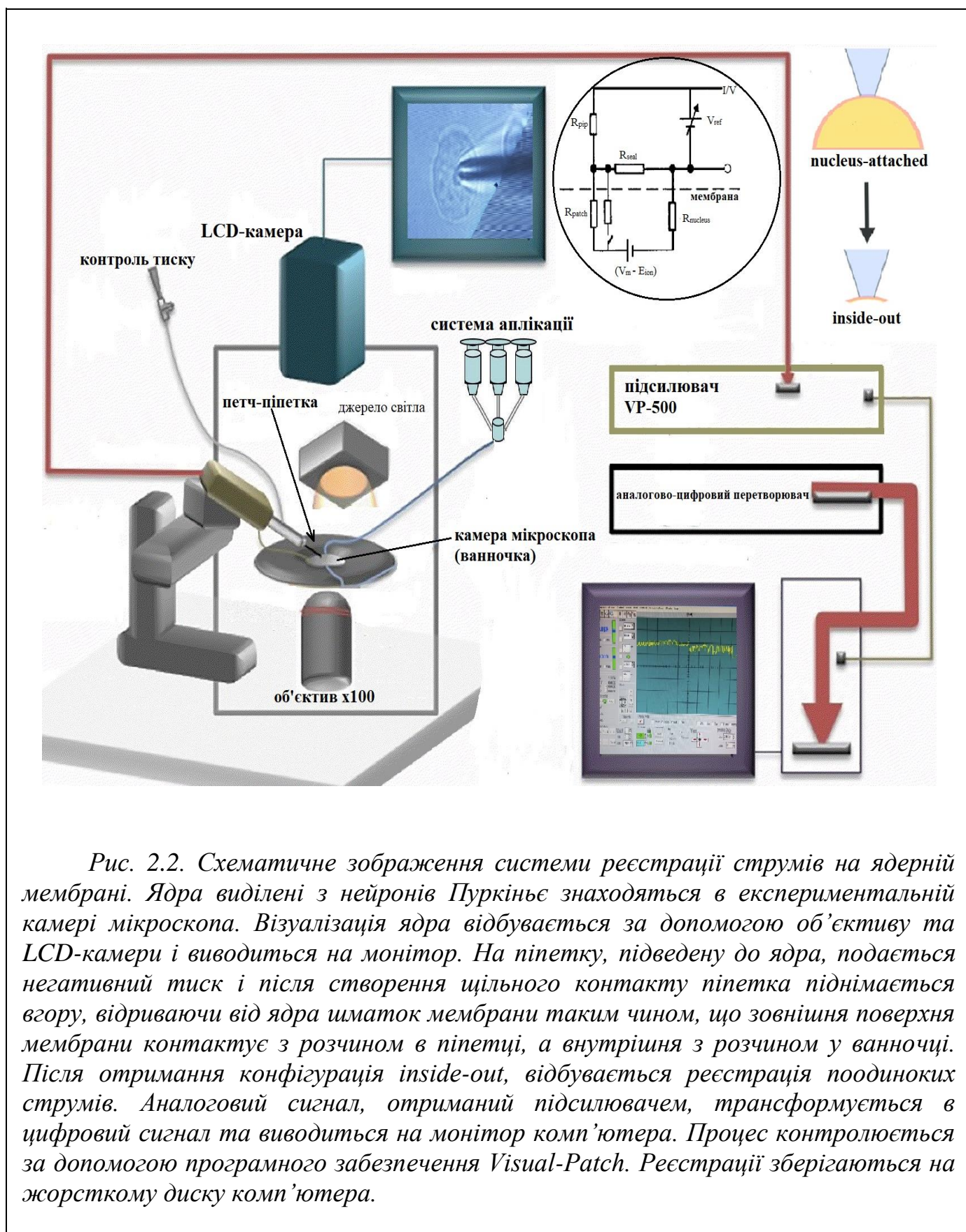


Рис. 2.1. Фотографія ядер, отриманих з нейронів. Ядро нейрону Пуркінє виділяється великим розміром серед ядер інших клітин. Збільшення $\times 100$ (За [20]).



допомогою цієї камери проводився пошук ядер при збільшенні $\times 100$, які на вигляд за своїми розмірами були ідентифіковані як ядра нейронів Пуркінє. Струми поодиноких іонних каналів на внутрішній мембрані ядер нейронів Пуркінє реєстрували на ізольованій ділянці мембрани ядра із використанням методу patch-clamp в конфігурації inside-out у режимі фіксації потенціалу. Ця конфігурація утворюється так само як і на плазматичній мембрані (Рис. 2.2). Для цього піпетку, яка утворювала щільний контакт з мембраною, відривали від ядра, таким чином клаптик мембрани залишався приєднаним до піпетки.

Петч-піпетки виготовляли з боросилікатного скла (Sutter Instruments, США), опір яких варіював від 10 до 15 МОм. Довжина скляних заготовок (трубочок) з філаментом становила 7,5 см, товщина зовнішнього діаметру 1,5 мм, а внутрішнього – 0,86 мм. Для виготовлення піпеток користувалися пулером РС-10 (Narishige, Японія), використовуючи високу та низьку температуру плавлення. Трубочка із боросилікатного скла закріплювалася в пристрої вертикально, таким чином, щоб нагрівний елемент розділяв її посередині. Спочатку виставлялася висока температура 81,3 °С. При нагріванні трубочка розтягувалася до фіксованої межі за рахунок вантажу, прикріпленого до її нижньої частини. Потім нагрівний елемент знов виставлявся посередині і виставлялася нижча температура 67,4 °С. Діаметр піпеток становив приблизно 1 мкм. Контроль цілісності піпеток та їх діаметру проводили візуально за допомогою оптичного мікроскопа при збільшенні $\times 40$. Реєстрацію струмів поодиноких каналів здійснювали при кімнатній температурі (20-22°C) в симетричному базовому розчині, що містив (у мМ): КСІ – 150, НЕРЕС – 5, НЕРЕС-К – 5 (рН – 7,3). Реєстрації струмів поодиноких каналів здійснювали з використанням підсилювача VP-500 (Bio-Logic, Кле, Франція) з п'ятиполюсним фільтром нижніх частот Бесселя (5 кГц), оцифровували з частотою 20 кГц.

Щоб отримати реєстрації максимально доступної якості виконувалися наступні вимоги: уникнути спотворення сигналу, застосовуючи оптимальну частоту фільтрування та не втратити важливу інформацію про швидкі події одиночного каналу під час реєстрації, застосовуючи максимальну доступну частоту оцифрування та фільтрування сигналу. Із збільшенням частоти оцифрування

реєстрації зростає високочастотний шум, який може бути викликаний обладнанням, що застосовується в експерименті (як то шум підсилювача), і не нести ніякої додаткової корисної інформації. Тому для визначення оптимальної частоти реєстрації бралось до уваги співвідношення сигналу до шуму. Рекомендується застосовувати співвідношення 4:1 [233], але це не завжди можливо використовувати на практиці при максимальній частоті підсилювача 100 кГц і в більшій мірі підходить для реєстрацій струмів при великих значеннях поданого мембранного потенціалу (>100 мВ), коли амплітуда струму має достатню величину. Керуючись таким співвідношенням було визначено, що для реєстрації LCC-каналів з метою характеристики їх кінетики, оптимально оцифровувати реєстрації струмів з частотою 20 кГц та фільтром 5 кГц. Наприклад, для порівняння, за умови використання оцифровки 50 кГц та фільтру 10 кГц величина шуму становитиме більше 1,2-1,5 пА, що буде призводити до спотворення сигналу, оскільки провідність LCC-каналів в симетричному KCl 155 мМ становить приблизно 210 пСм, що відповідає амплітуді струму приблизно 4,2 пА при поданому потенціалі +20 мВ.

Загалом, для аналізу одиночних каналів бажано вибирати частоту оцифровки так, щоб частота дискретизації була щонайменше у 5 разів більша [234]. Частота оцифровки 20 кГц та фільтр 5 кГц були максимально допустимими в заданих експериментальних умовах враховуючи також, що реєстрації з більшою роздільною здатністю, які зберігалися на жорсткому диску комп'ютера були надто великого об'єму, щоб робити тривалі записи (довші ніж декілька десятків хвилин). Також в окремих експериментах використовувалася оцифровка з частотою 5 кГц та фільтрування з частотою 1 кГц.

Реєстрації поодиноких каналів контролювали за допомогою програмного забезпечення Visual-Patch v.1.27. Перед початком запису реєстрації струмів компенсували різницю потенціалу між прямим та індиферентним електродами, після цього перевіряли наявність каналів у петчі, змінюючи потенціал від 0 мВ до +40 мВ, коли ймовірність відкритого стану LCC-каналів стабільно велика і відповідно до амплітуди струму можна оцінити їх кількість. При наявності каналів у

петчі та за умови достатньої якості реєстрації (відсутність завад, шумів, артефактів, стабільність базової лінії) робили запис і зберігали на жорсткому диску комп'ютера у форматі *.D0. За допомогою програмного забезпечення BioTools файли конвертували в формат *.DAT, який доступний для подальшого аналізу в багатьох популярних пакетах програм (Clampfit, QuB, WinEDR). Мембранний потенціал змінювали в діапазоні від -80 до $+80$ мВ з кроком 20 мВ.

2.3. Аналіз даних

2.3.1. Аналіз струмів через поодинокі іонні канали

Початковий візуальний аналіз реєстрацій струмів через поодинокі проводився за допомогою програми “Clampfit 9.0” (Axon Instruments Inc., США). В першу чергу відбиралися реєстрації з наявністю одного каналу в петчі. Це важлива вимога для проведення кількісного аналізу кінетики іонних каналів, оскільки велика кількість каналів у петчі ускладнює цей процес.

В окремих випадках для узагальненої оцінки впливу модуляторів (таких як, наприклад, природні отрути), були використані реєстрації з декількома каналами в петчі. Кількість каналів під час реєстрації визначали при потенціалі на мембрані $+40$ мВ, коли активність LCC-каналів, як було показано раніше, максимальна [23]. Тоді максимальну кількість каналів (N) вираховували за допомогою формули:

$$N = \frac{I_{max}}{I_u}, \quad (2.1)$$

де I_{max} максимальна амплітуда струму під час реєстрації; I_u - амплітуда струму одиночного каналу при заданому потенціалі. Значення N приймається незмінним протягом всього часу реєстрації.

P_o визначається як співвідношення часу перебування каналів у відкритому стані за умови наявності одного каналу в петчі до загального часу реєстрації і виражається формулою:

$$P_o = \frac{t_o}{T}, \quad (2.2)$$

де t_o – сумарний проміжок часу, коли канал перебував у відкритому стані; T – загальний час реєстрації.

У випадку, коли каналів у петчі більше одного, ймовірність відкритого стану для всіх каналів в петчі (NP_o), тобто для максимальної кількості каналів, вираховували за допомогою формули:

$$NP_o = \sum_{i=0}^n \frac{it_i}{T}, \quad (2.3)$$

де n – кількість зареєстрованих рівнів струму через ідентичні поодинокі канали, які відкриті на вибраній для аналізу ділянці часу, t_i – час, протягом якого певна кількість каналів перебувала у відкритому стані на i рівні.

Тоді P_o визначали відповідно до формули:

$$P_o = \frac{NP_o}{N}. \quad (2.4)$$

Подальший аналіз кінетики струмів LCC-каналів відбувався за допомогою MATLAB 2015a.

В даній роботі приймали за основу припущення, що розподіл часових інтервалів закритого (та відкритого) стану в реєстраціях струмів поодиноких каналів відповідає кількості конформацій іонного каналу. Інтервали часу закритого (або відкритого) стану мають експоненційний розподіл у вигляді:

$$f(t) = ke^{-t/\tau}, \quad (2.5)$$

де $f(t)$ – кількість інтервалів за час тривалості одного біну на гістограмі, τ – константа часу, k – константа швидкості ($k = 1/\tau$). Розподіл перебування каналу у закритому стані розраховували на основі гістограм, де по осі абсцис інтервали тривалості подій відображали у логарифмічній шкалі, а по осі ординат було представлено кількість подій. Функція, що описує розподіл інтервалів, має вигляд:

$$f(t) = \sum_{i=1}^n P_i e^{[\ln(t) - \ln(\tau_i)] e^{\ln(t) - \ln(\tau_i)}}, \quad (2.6)$$

де P_i – відносний внесок кожної моноекспоненційної компоненти, яка відповідає дискретним станам іонного каналу при формуванні сумарної функції струму каналу;

τ_i – константа часу експоненційної функції, яка відповідає середньому часу перебування каналу у кожному із станів. Кількість експонент, які описують гістограму розподілів часових інтервалів закритого (та відкритого) стану відповідає кількості станів в моделі Маркова, в яких перебуває іонний канал. Цей підхід, який є модифікацією експоненційного розподілу інтервалів, був введений Сігвардом і Сіном [235], які запропонували використання логарифмічної шкали, що краще показує пік розподілу гістограми, трансформувавши спадаючі експоненти, які були вперше запропоновані Коуном і Хоуксом [236]. В цій роботі такий підхід використовувався тільки для тривалих закритих станів, а інтервали закритих станів, які були менше за 300 мс аналізували іншим способом – за допомогою аналізу β -розподілу.

Для аналізу тривалих подій велика роздільна здатність не обов'язкова, тому для визначення функції густини ймовірності (ФГЙ) перебування каналів у відкритому чи закритому стані ЛСС-каналів використовували записи з частотою фільтрування від 1 кГц та частотою оцифрування від 5 кГц відповідно. З використанням алгоритму створеного для цієї мети на початковому етапі здійснювали відокремлення ділянок реєстрації після зміни потенціалу, щоб уникнути можливого залучення до аналізу тих подій, які виникають в нестационарному стані.

Експериментальні значення P_o були описані кривою:

$$f(V) = \frac{1}{1 + e^{\frac{z\delta F}{RT}(V - V_{1/2})}}, \quad (2.7)$$

де $V_{1/2}$ – константа потенціалу, δ – електрична дистанція, $z\delta$ характеризує потенціал-залежність процесу.

Для кінетичної моделі, в якій закриті стани та підрівні зв'язані з одним відкритим станом, та не пов'язані між собою, взаємозв'язок між константами швидкостей переходу між усіма явними станами кінетичної моделі та ймовірністю відкритого стану іонного каналу оцінювали за співвідношенням:

$$P_o = \prod_{i=1}^{N_1} \frac{k_{C_iO}}{k_{C_iO} + k_{OC_i}} \prod_{j=1}^{N_2} \frac{k_{S_jO}}{k_{S_jO} + k_{OS_j}}, \quad (2.8)$$

де k_{C_iO} та k_{OC_i} – константи швидкості переходу між відкритим станом та i -тим закритим станом, де k_{S_jO} та k_{OS_j} – константи швидкості переходу між відкритим станом та j -тим підрівнем, N_1 та N_2 – кількість закритих станів та підрівнів відповідно.

Залежність рівноважної константи дисоціації (K_d) визначали за формулою:

$$K_d(V) = K_d(0) \exp\left(\frac{\pm z\delta FV}{RT}\right), \quad (2.9)$$

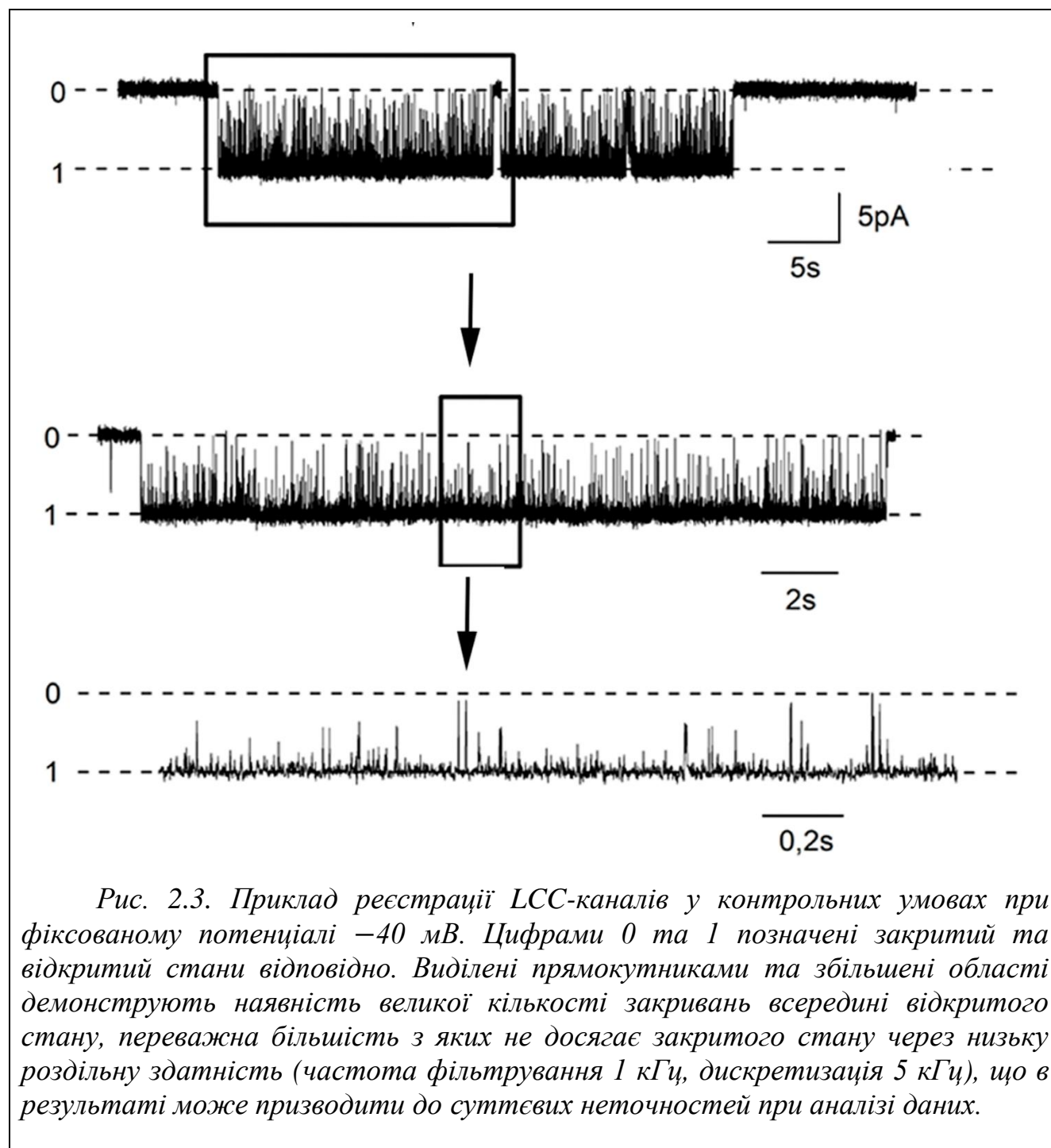
де $K_d(0)$ – рівноважна константа дисоціації при 0 мВ, z – валентність блокатора, δ – ефективна електрична дистанція, V – трансмембранний потенціал, інші константи мають стандартне значення.

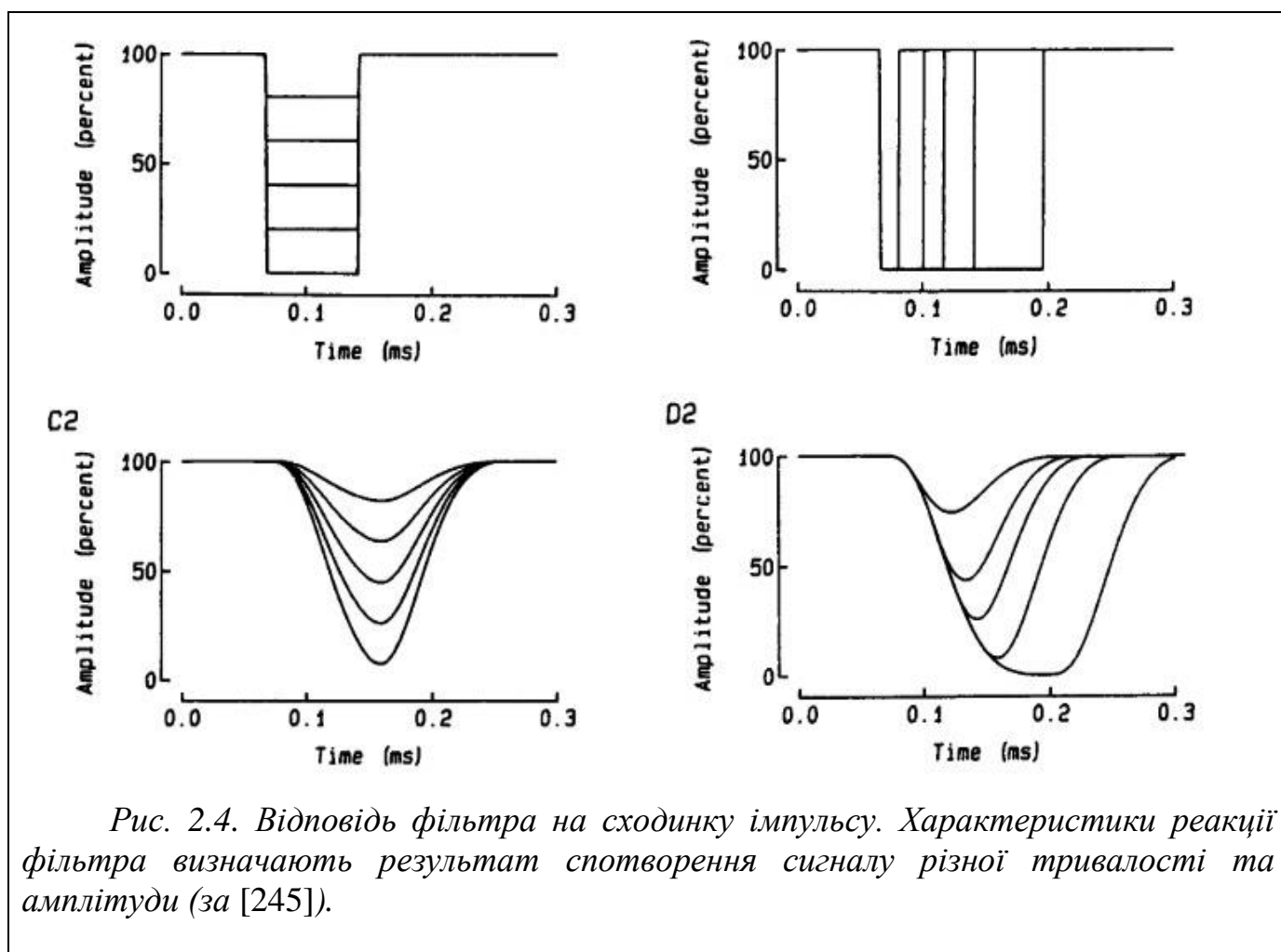
2.3.2. Аналіз "β-розподілу"

Реєстрації LCC-каналів містять чисельні швидкі події (Рис. 2.3). Наявність таких подій пов'язана з тим, що через недостатню частоту оцифрування та фільтрування ці події відображаються не повністю, а спотворено. Такі характеристики фільтра як його частота та полюсність визначають реакцію на імпульс у формі сходинки. На Рис. 2.4 показано як спотворюється вхідний сигнал різної амплітуди та тривалості.

Швидкі події мають велике значення для інтерпретації кінетики поодиноких іонних каналів та впливають на характер розподілу ФГЙ, тому для запобігання помилок в інтерпретації кінетики іонних каналів було приділено багато уваги вирішенню цієї задачі [237-243]. В результаті було досягнуто високого рівня відповідності (правдоподібності) кінетичних моделей до експериментальних даних за рахунок корекції пропущених подій, але все ж підхід на основі виставлення порогу половини максимальної амплітуди не може збільшити початкову роздільну здатність реєстрації та пропускає (ігнорує) часові проміжки, тривалістю порядку десятків мікросекунд або ж шум, який походить від реєструючої системи може

прийматися як струм іонного каналу [244]. Тому, щоб провести ідеалізацію, швидкі події, які по значенню близькі до шуму, часто прибирають із реєстрацій разом із шумом для проведення аналізу реєстрацій струму поодиноких іонних каналів (наприклад, додатковим фільтруванням).





Альтернативний і більш тонкий підхід полягає у симуляції реєстрацій безпосередньо, не намагаючись реконструювати події в реєстраціях без шуму [246, 247], оскільки дані, отримані на основі відновлених розподілів часу перебування у певних станах повністю залежать від акуратності відновлення. Наприклад, найбільш наглядні випадки, коли провідність каналу невелика і співвідношення сигналу до шуму досить слабе, тоді існує ймовірність втратити швидкі події, що буде ускладнювати подальший аналіз або навпаки, врахувати шум як події, які належать до кінетики іонного каналу. Це стосується не тільки каналів з малою амплітудою струму, але і каналів з досить великою провідністю, таких як LCC-канали (провідність приблизно 200 пСм), оскільки швидкі події асоціюються окремими конформаційними станами іонного каналу. Попередньо, середню тривалість перебування іонного каналу в певній конформації оцінити за розподілом частоти амплітуди струму. За наявності великої кількості подій дуже короткої тривалості

розподіл амплітудних гістограм перетворюються з гауссівського на асиметричний, який наближається до β -розподілу [248, 249]. Таким чином, для вибору кінетичних моделей час перебування каналу в кінетичних станах можна оцінити на основі розподілу частоти амплітуди струму емпірично.

Фіцх'ю у своїй теоретичній роботі 1983 року [250] запропонував аналіз асиметричного сигналу, який можна застосувати до реєстрацій поодиноких іонних каналів, описаних моделлю Маркова із двох станів. В наступному році Єлен, базуючись на цій роботі, використав спрощений підхід до аналізу, застосувавши аналіз β -розподілу [248] для опису амплітудної гістограми з фільтром першого порядку та моделі Маркова із двох станів використавши співвідношення:

$$B(a, b) = \int_0^1 y^{a-1} (1 - y)^{b-1} dy, \quad (2.10)$$

де $B(a, b)$ – β -функція, a, b – частоти амплітудного розподілу з використанням фільтра першого порядку у моделі Маркова з двома станами. Це дало можливість оцінити константи швидкості переходу за співвідношеннями: $a = \alpha\tau$ та $b = \beta\tau$. Проте, такий підхід мав істотні обмеження.

У подальшому було запропоновано коректуючий коефіцієнт для фільтрів вищого порядку, оскільки рівняння, використане Єленом, обмежене фільтром першого порядку і може не надати бажаного результату з фільтрами 4-го і вищого порядку, які в основному застосовуються для реєстрацій поодиноких каналів. Тому, через непрактичність, цей підхід спочатку не отримав широкого розповсюдження. Лише з часом стали можливими вдосконалення методу β -розподілу завдяки збільшенню потужності комп'ютерів [251]. Покращений метод заснований на аналізі розподілів амплітуди струму має переваги в порівнянні з попередніми підходами, оскільки може застосовуватися як до кінетичних моделей з багатьма станами, так і до даних, фільтрованих за допомогою фільтрів вищого порядку як 4- або 8-полісного фільтра Бесселя. Виходячи з припущення про стохастичну природу іонних каналів, теоретичний розподіл амплітуди зареєстрованих струмів виводиться безпосередньо шляхом генерації симуляції струмів, які зазнають спотворення в залежності від параметрів фільтра та шуму установки [251]. Використання

моделювання для створення симульованих ділянок реєстрацій для побудови теоретичних амплітудних гістограм, що відповідають фільтрам вищого порядку та кінетичним моделям із багатьма станами, стало можливим завдяки прогресу обчислювальних можливостей комп'ютерів. Що важливо, в цьому випадку аналіз максимально враховує всі події, які утворюють експериментальні гістограми. Таким чином можна відновити стохастичний процес з досягненням збільшення роздільної здатності.

В цілому, метод досить простий у використанні і не потребує значних математичних розрахунків. В цьому підході враховується те, що усереднення швидких флуктуацій між рівнями провідностей іонного каналу спричиняє відхилення амплітудної гістограми від нормального розподілу та утворює додатковий шум в реєстраціях. Ці відхилення надають інформацію про константи швидкості залучені до процесу, який описується кінетичною моделлю. На основі передбачуваної моделі Маркова симулюється ділянка реєстрації із урахуванням всіх факторів, які впливали на формування відповідної експериментальної реєстрації, таких як частота фільтрування та частота дискретизації, а також величина шуму установки. В матриці моделі всім можливим рівням провідності шляхом підбору надається прогнозоване значення константи швидкості переходу. Шляхом повторення циклу симуляції підбираються такі константи швидкостей, які генерують розподіл амплітуд найбільш наближених до експериментального, що оцінювалося через суму похибок за формулою:

$$\sum_{i=1}^{N_I} \frac{(A_{exp,i} - A_{theo,i})^2}{A_{exp,i} + 0.1}, \quad (2.11)$$

де $A_{exp,i}$ та $A_{theo,i}$ – кількість подій, які потрапляють і-тий інтервал експериментальної та теоретичної амплітудних гістограм, N_I – кількість точок в амплітудній гістограмі [252].

Зазвичай константи швидкості та кількість станів кінетичної моделі наперед невідомі і визначаються методом підбору. Початкова ймовірна кількість станів в моделі Маркова може бути попередньо визначена з візуального аналізу амплітудної

гістограми. У разі відхилення теоретичної амплітудної гістограми від експериментальної топологія кінетичної моделі може змінюватися для досягнення задовільного результату [233].

Наявність дуже швидких подій також може впливати на амплітуду струму, що створює відхилення вимірної за допомогою стандартних методів (видимої) амплітуди струму від справжньої амплітуди струму. Помилки у вимірах рівня струму призводять до помилкових констант швидкості у передбачуваній моделі Маркова. Значення видимої амплітуди струму, які відхиляються від справжньої можуть виникати як наслідок швидкого процесу в основі ворітного механізму іонних каналів [253, 254]. Особливо, також це стає помітно при використанні "швидких" блокаторів, коли видима амплітуда струму суттєво зменшується, хоча насправді реальна амплітуда струму залишається незмінною, а змінюється стохастичний процес.

На теперішній час аналіз β -розподілу надає найбільш вичерпну інформацію про швидкі події, але цей підхід недоречно використовувати для аналізу подій тривалістю порядку сотні мілісекунд та більше. Аналіз швидких подій LCC-каналів здійснювали використовуючи пакет скриптів " β -dist" для MATLAB, спеціально створений для цієї мети Олексієм Луньком (у вільному доступі). Інтерфейс

програми

представлено

на

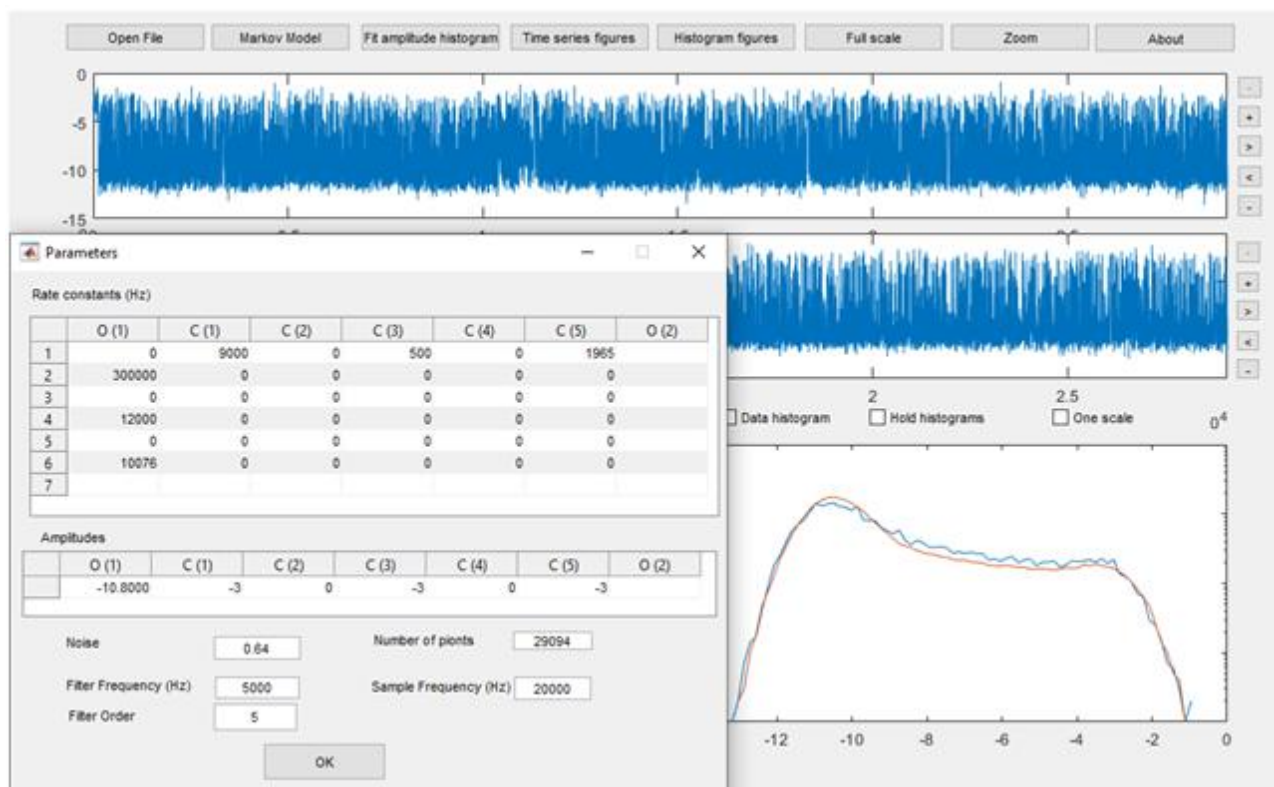


Рис. 2.5.

Для аналізу було вибрано реєстрації, які містили один канал із стабільною базовою лінією без будь-яких артефактів. Аналізувалися ділянки з відкритим станом і без тривалих закривань для побудови амплітудної гістограми. Важливо, щоб гістограма була достатньо згладженою, тобто кількість точок в реєстраціях була достатньою для досягнення задовільної точності визначення параметрів. По гістограмах (їх формі) візуально визначалася приблизна кількість станів в моделі Маркова та константи швидкості переходів між ними. Додатково вносилися значення амплітуди струму та шуму. Для визначення величини шуму створювалися окремі гістограми побудовані по реєстраціям базової лінії (закритого стану), де підбиралося відповідне точне значення (приклад Рис. 3.17). Також алгоритм програми потребує введення порядку фільтра, величини фільтрування та частоти дискретизації. На основі зазначеної інформації створюється симуляція з подальшим підбором найбільш правдоподібних констант швидкостей переходів. Підбір

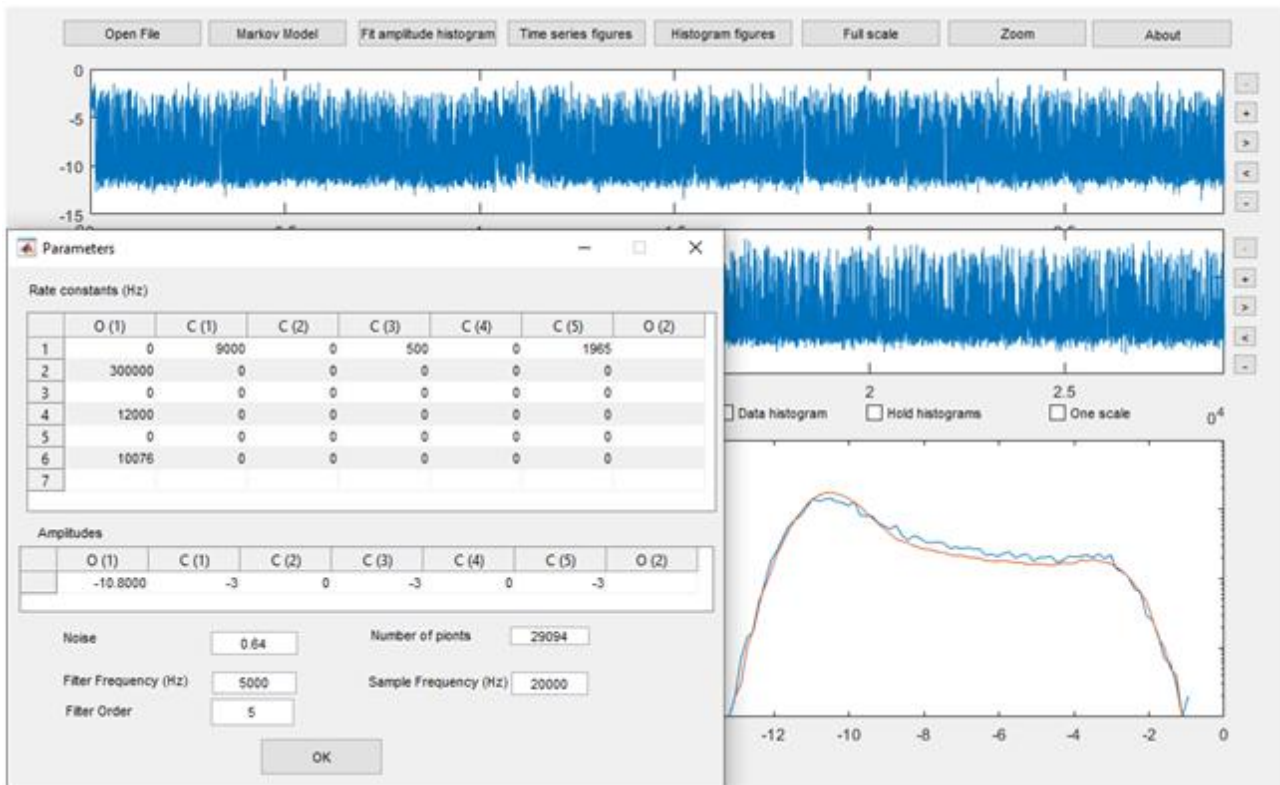


Рис. 2.5. Інтерфейс програми “ β -dist” для аналізу швидких подій. Вікно на передньому плані включає матрицю переходів між станами, в яких перебуває іонний канал, куди вводяться константи швидкості переходів між певними станами. Також вводяться амплітуди струму для кожного стану, попередньо визначене значення величини шуму та відомі параметри реєструючої системи як фільтрування, частота дискретизації та порядок низькочастотного фільтру. У вікні на задньому плані зверху представлено експериментальну та симульовану ділянку реєстрації і відповідні амплітудні гістограми у вікні знизу справа.

повторюється поки не буде отримано оптимального результату, як це показано на Рис. 2.6.

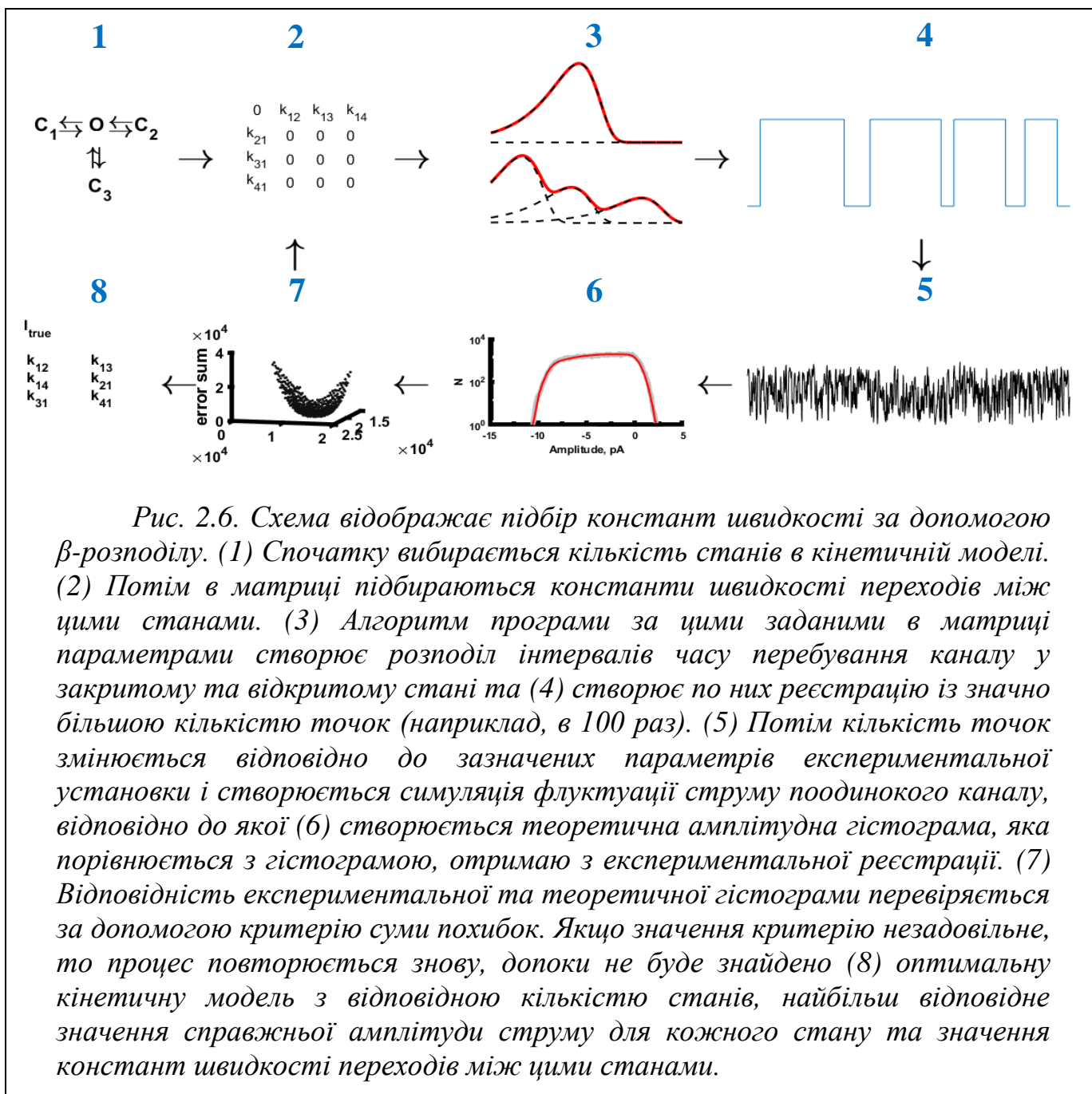


Рис. 2.6. Схема відображає підбір констант швидкості за допомогою β -розподілу. (1) Спочатку вибирається кількість станів в кінетичній моделі. (2) Потім в матриці підбираються константи швидкості переходів між цими станами. (3) Алгоритм програми за цими заданими в матриці параметрами створює розподіл інтервалів часу перебування каналу у закритому та відкритому стані та (4) створює по них реєстрацію із значно більшою кількістю точок (наприклад, в 100 раз). (5) Потім кількість точок змінюється відповідно до зазначених параметрів експериментальної установки і створюється симуляція флуктуації струму поодинокого каналу, відповідно до якої (6) створюється теоретична амплітудна гістограма, яка порівнюється з гістограмою, отриманою з експериментальної реєстрації. (7) Відповідність експериментальної та теоретичної гістограми перевіряється за допомогою критерію суми похибок. Якщо значення критерію незадовільне, то процес повторюється знову, доки не буде знайдено (8) оптимальну кінетичну модель з відповідною кількістю станів, найбільш відповідне значення справжньої амплітуди струму для кожного стану та значення констант швидкості переходів між цими станами.

Метою такого процесу є збільшення роздільної здатності аналізу для ідентифікації швидких подій. Алгоритм програми спочатку створює за заданими переходами в матриці кінетичної моделі симуляцію із дуже великою роздільною здатністю (в теорії до безкінечності) і потім видає результат відповідно до заданих параметрів реєстрації, накладаючи шум та зменшуючи частоту дискретизації. За допомогою симуляцій генерується безперервний процес Маркова, при цьому коректно враховується всі часові інтервали, виведені за попередньою моделлю, в тому числі і коротші, ніж частота дискретизації реєструючої системи. При цьому

можна порівняти наскільки співпадають експериментальна та теоретична (симульована) гістограми за відповідним критерієм згідно формули (2.11). Для кращої візуалізації крім гістограми програма також відображає просимульовані реєстрації струму, що допомагає краще зорієнтуватися у підборі констант швидкостей переходу, адже відомо, що різні константи швидкості переходу можуть утворювати дуже схожі розподіли гістограм, тому дуже важливо візуально оцінити наскільки вибрані константи швидкості переходу дійсно відповідають оригінальним експериментальним реєстраціям, порівнявши їх із симуляціями. Застосування підходу симуляції був вибраний для створення теоретичних гістограм замість детермінованого алгоритму, оскільки немає прямої процедури розрахунку β -розподілу для фільтрів вище першого порядку [233].

Значення амплітуди струму введене на початку аналізу теж може коректуватися відповідно до найкращого розподілу. Це пов'язано з тим, що початково є інформація лише про видиму амплітуду струму, а справжня амплітуда невідома, тому вона визначається в процесі підбору.

Для блокторів вводили додатковий стан блокування з аналогічним визначенням відповідних констант швидкості.

2.3.3. Створення кінетичної моделі

Створення моделі Маркова для LCC-каналів відбувалося при поєднанні методів визначення швидких та повільних констант швидкості на реєстраціях з фіксованим потенціалом в діапазоні від -80 мВ до +80 мВ з кроком в 20 мВ. Спочатку були обчислені константи швидкості переходів між станами моделі в пакеті скриптів для MATLAB “ β -dist” та підібрана мінімальна кінетична модель. Потім були визначені константи швидкості для тривалих подій за допомогою аналізу ФГЙ, які були включені до попередньо створеної моделі.

2.3.4. Статистична обробка результатів досліджень

Дані були проаналізовані за допомогою пакету скриптів “ β -dist” для програмного забезпечення MATLAB, “Clampfit 9.0” (Axon Instruments Inc., США) та Origin 8.5 (OriginLab, США). Результати представлено як середнє

значення \pm стандартна помилка середнього значення. Для визначення впливу гадолінію було використано непарний тест Стьюдента.

2.4. Використані речовини

Всі електрофізіологічні дослідження проводилися із використанням базового розчину (та його модифікацій) із додаванням досліджуваних агентів. Склад зазначено в наведених нижче таблицях (Таблиця 2.1, Таблиця 2.2).

Аплікація здійснювалася за допомогою протоку, в результаті чого базовий розчин повністю заміщувався розчином з певною концентрацією діючої речовини. Відомо, що солі лантаноїдів в розчині з часом утворюють осад, через що важко контролювати їх концентрацію [255], так як вона може змінюватись, тому всі використані в експериментах лантаноїди готували безпосередньо перед аплікацією. Розчини галламіну також використовували в день приготування.

Цілісні екстракти отрут були надані завідуючим лабораторією молекулярної токсикології д.х.н. Уткіним Ю. М. (інститут біоорганічної хімії ім. академіків М. М. Шемякіна та Ю. А. Овчиннікова). Зразки природних отрут були отримані у вигляді порошку та зберігалися в сухому темному місці при кімнатній температурі. Перед експериментом отрути розчинялися у деіонізованій воді та були додані, на відміну від всіх інших використаних речовин, через локальну аплікацію в кількості 10 мкл у робочу камеру об'ємом 200 мкл. Отруту *H. laoticus* розводили в концентрації 0,021 г/л, *B. fasciatus* – 0,050 г/л, *B. arietans* – 0,059 г/л, *V. renardi* – 0,054 г/л, *N. kaouthia* – 0,052 г/л. Розчинені отрути зберігали при температурі 3-5°C.

В роботі в основному були використані реактиви виробництва Sigma (США) для приготування розчину для базового розчину та його модифікацій.

Таблиця 2.1

Склад базового розчину

назва	Молекулярна вага (MW)	Концентрація, мМ
KCl	74.56	150
HEPES	238.31	5
HEPES-K	76.40	5

Таблиця 2.2

Розчин з кальцієм

назва	Молекулярна вага (MW)	Концентрація, мМ
KCl	74.56	150
TRIS	121.14	10
EDTA	292.24	0.5
CaCl ₂	110.98	1

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Пошук блокаторів LCC-каналів

LCC-канали вперше були описані в роботі С.М. Марченка в 2005 році [20]. Було визначено основні біофізичні характеристики такі як проникність та провідність цих каналів. Також було зроблено припущення про фізіологічну роль LCC-каналів у компенсації різниці потенціалів на ядерній мембрані. Гіпотеза про фізіологічну роль базується на особливостях локації LCC-каналів саме на оболонці ядра, де у великій кількості було зареєстровано інозитол-трифосфатні рецептори [256]. Активація окремих груп IP_3Rs (кластерів) призводить до виходу великої кількості іонів кальцію із депо в перинуклеарному просторі, який знаходиться між двома мембранами ядра, в цитоплазму і нуклеоплазму. Таким чином потенціал ядерної мембрани може різко змінитися до великих негативних значень, що призведе до швидкого припинення кальцієвого сигналу [60]. Зворотній потік позитивно заряджених іонів може запобігти розвитку такого сценарію. Вважається, що LCC-канали могли би забезпечити зворотний потік, проводячи іони калію у всередину перинуклеарного простору, що сприяло би компенсації негативного заряду на мембранах ядра. Просте для розвитку подальших досліджень LCC-каналів критично бракує відомостей про потентні блокатори, які могли би бути корисними для перевірки гіпотези про фізіологічну роль та дослідження структурно-функціональних зв'язків зазначених іонних каналів. З цією метою було поставлено завдання знайти речовини, які здатні модулювати трансмембранні струми через LCC-канали.

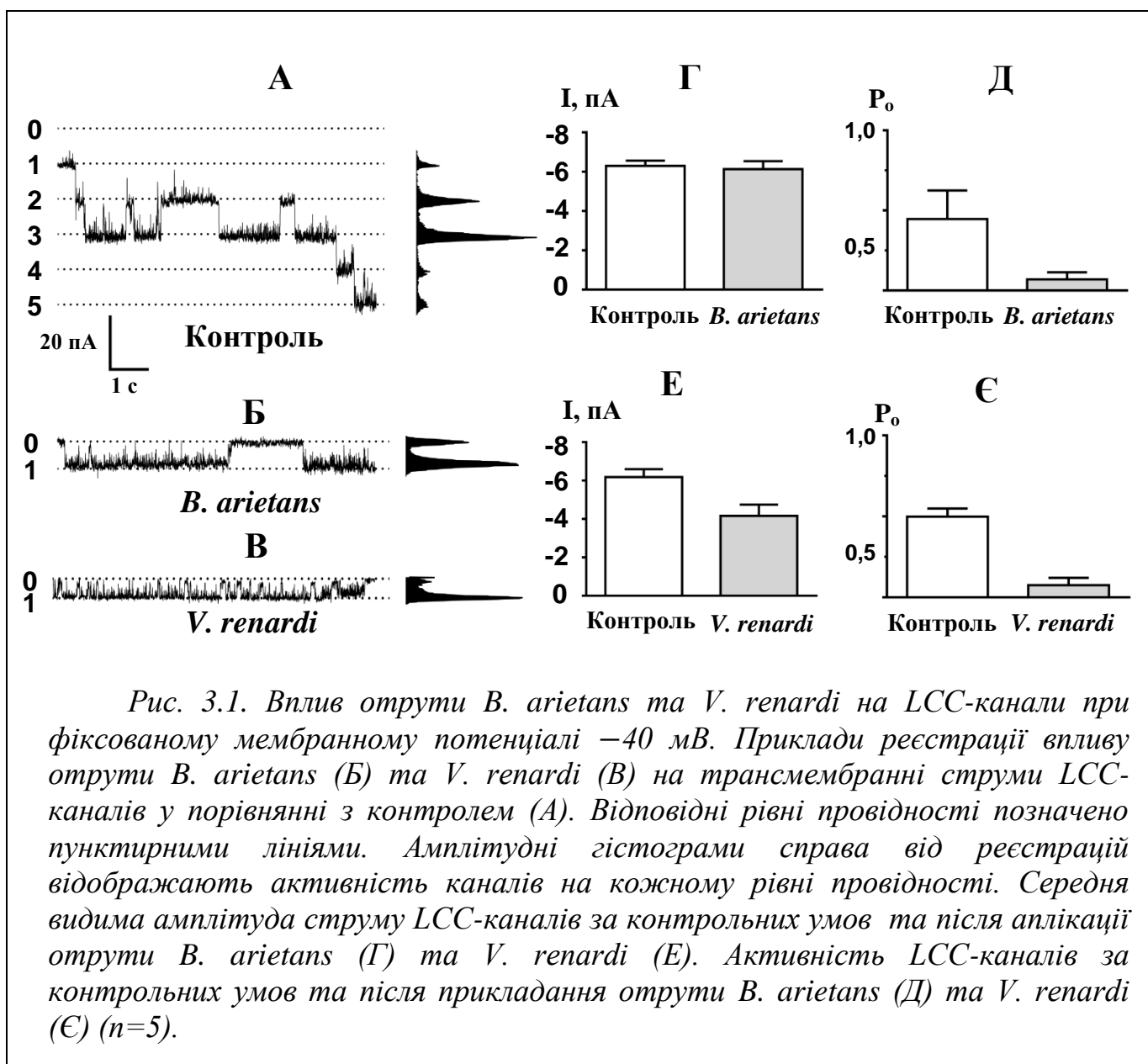
3.1.1. Дослідження впливу екстрактів цілісних природних отрут

Завдяки своїй високій афінності та специфічності зв'язування у низьких концентраціях, компоненти природних отрут використовуються як фармакологічний інструмент для ідентифікації структури нових типів іонних каналів [151]. На цьому етапі роботи, спрямованій на пошук специфічного блокатора LCC-каналів, необхідно було визначити які із отрут можуть представляти найбільший інтерес для

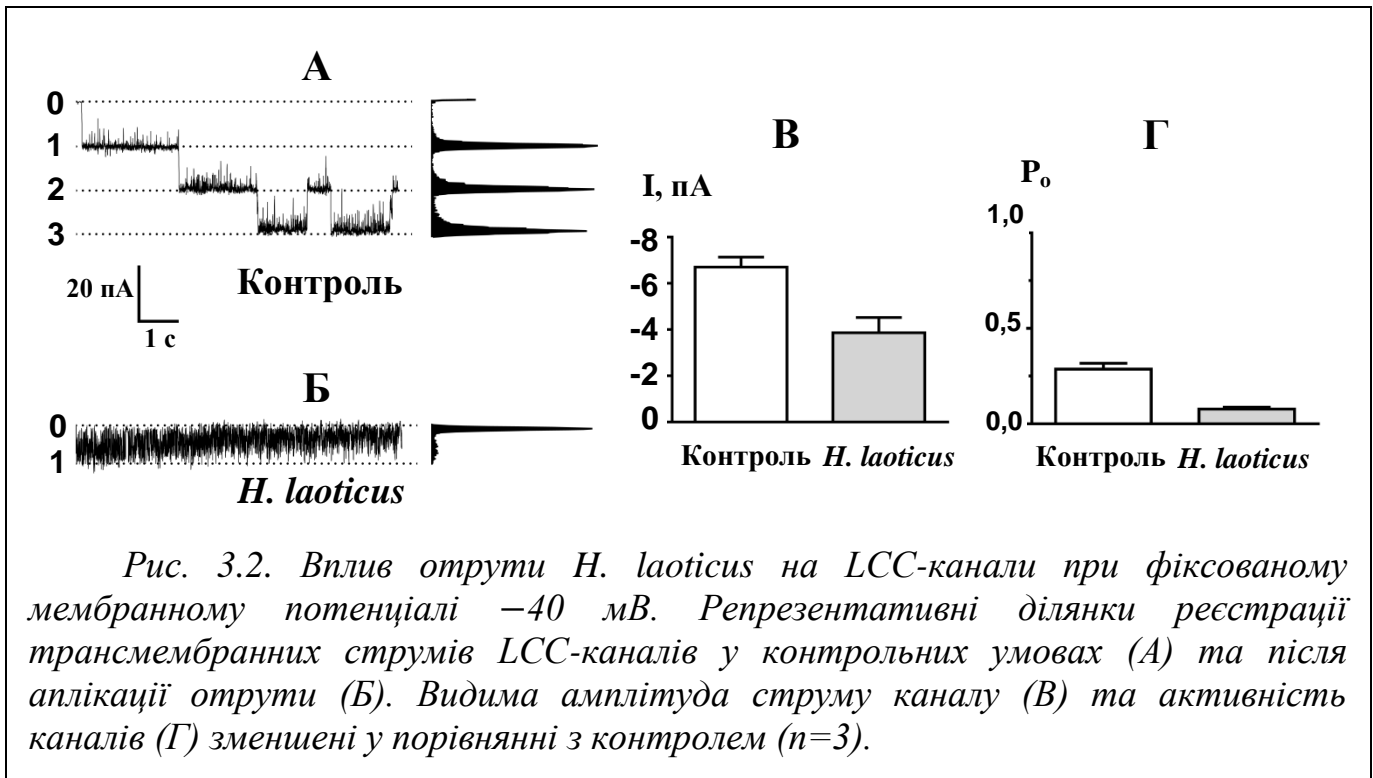
подальших досліджень, а саме для фракціонування та виділення сполуки, яка би виступала ефективним блокатором LCC-каналів. Для пошуку потенційного блокатора LCC-каналів було досліджено вплив на біофізичні властивості LCC-каналів внутрішньої мембрани ядер нейронів Пуркінє комплексу токсинів п'яти отруйних тварин: крайта стрічкового (*Bungarus fasciatus*), гадюки шумливої (*Bitis arietans*), гадюки степової (*Vipera renardi*), кобри моноклевої (*Naja kaouthia*) і скорпіона лісового (*Heterometrus laoticus*).

Отрути були розведені в деіонізованій воді: *H. Laoticus* розводили в кількості 0,021 г/л, *B. fasciatus* – 0,050 г/л, *B. arietans* – 0,059 г/л, *V. renardi* – 0,054 г/л, *N. kaouthia* – 0,052 г/л та додавали 10 мкл у робочу камеру об'ємом 200 мкл через локальну аплікацію. Експериментально була підібрана умовна концентрація, яка би дозволяла виявити максимальний вплив тієї чи іншої отрути, з можливістю попередньої оцінки. Так як отрути представляють суміш різних, в тому числі неідентифікованих компонентів, визначення точної концентрації неможливе.

Впливи гадюки степової *V. renardi* та шумливої *B. arietans* виявилися порівняно малоефективними. Після аплікації відбувалося зменшення видимої амплітуду струму та P_o на 35% і 86% (Рис. 3.1 Г, Е) та 3% і 84% (Рис. 3.1 Д, Є), відповідно. Обидві отрути були використані в максимально можливій кількості. Ймовірно, що обидві отрути містять компоненти, які одночасно впливають як на видиму амплітуду струму, так і на P_o , але з огляду на більшу умовну концентрацію у порівнянні з іншими отрутами їх вплив виявляється менш цікавим для подальшого виділення окремого блокуючого компоненту. Вплив отрути *B. arietans* виявився найслабшим, розвивався доволі довго і здебільшого характеризувався лише активності каналів.

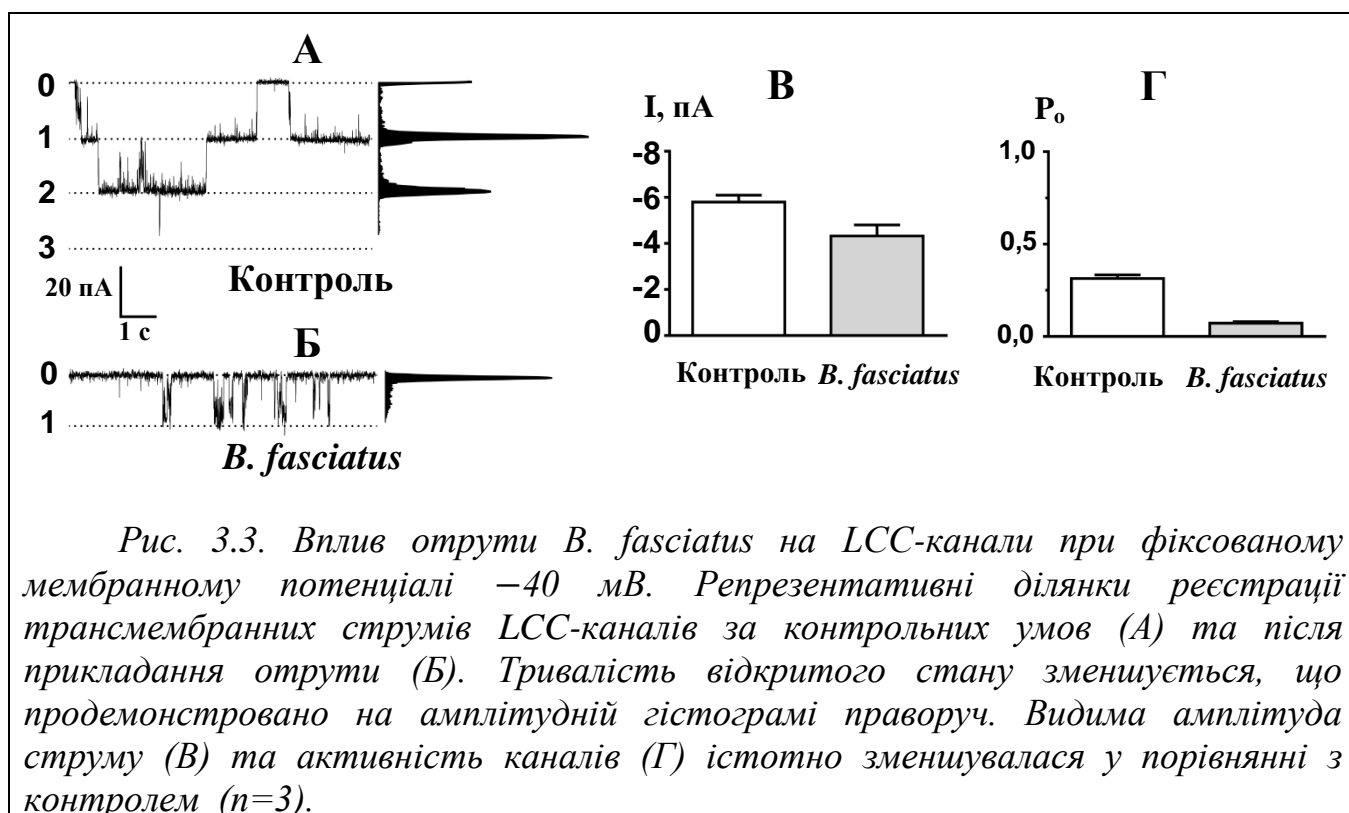


Отрута скорпіона *H. laoticus* викликала виражене швидке блокування з одночасним збільшенням шуму відкритого стану та зменшенням струму (Рис. 3.6). Вплив розвивався приблизно через 2-4 с після аплікації. Видима амплітуда струму знижувалася на 43%, а ймовірність відкритого стану на 76%.

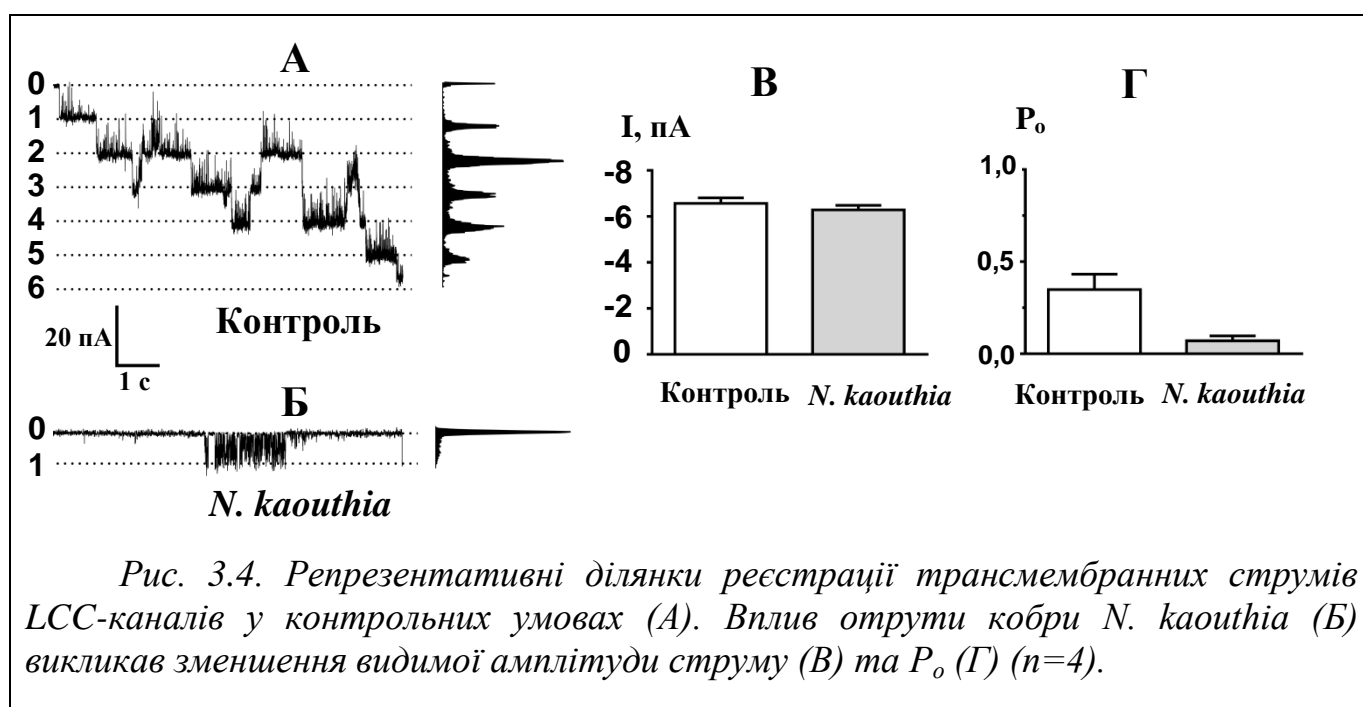


Отрута крайта *V. fasciatus* викликала блокування, що відрізнялося від впливу отрути скорпіона (

Рис. 3.3). Видима амплітуда струму зменшувалася на 26% і була менш спотворена швидким блокуванням, вказуючи на те, що сукупна дія компонентів отрути викликає більш повільний тип блокування. P_o зменшувалася на 77% порівняно з контролем. Вплив цієї отрути виявлявся приблизно через 10 с після локальної аплікації, що відповідало найдовшому часу серед інших. Вплив цієї отрути був один із найефективніших і виявляв властивості повільного блокатора.



У впливі отрути кобри *N. kaouthia* (Рис. 3.4) поєднувалися як швидке блокування, при якому видима амплітуда струму змінювалася лише на 5%, так і повільне блокування, якому відповідало тривале закривання каналу та зменшення P_o на 80%. Вплив розвивався через декілька секунд після аплікації.



Через те, що в експериментах були задіяні цілісні, неочищені отрути, механізм дії на іонні канали, швидше за все, комплексний, оскільки одночасно може відбуватися вплив різних компонентів отрути на структуро-формуєчі області LCC-каналів. Таким чином аналіз впливу цих речовин має значення лише для попередньої оцінки їх ефективності та для подальшої роботи з використанням фракціонування та виділення з їх складу окремих білків чи пептидів, молекулярну структуру і вагу яких можна було би визначити.

Серед досліджених речовин отрути чотирьох змій (*N. kaouthia*, *B. fasciatus*, *V. renardi*, *B. arietans*) містять токсини, які є ефективними блокаторами ацетилхолінових рецепторів нікотинового типу (nicotinic acetylcholine receptors, nAChRs) [257-260]. Вони відносяться до рецепторів м'язового типу і їх блокування у ссавців компонентами отрут призводить до зупинки дихання та смерті. Найчастіше як блокатори AChRs використовуються нейротоксини кобри та крайта. На відміну від змій, отрути яких було використано в наших дослідженнях, отрута *H. laoticus* не несе фатальних наслідків для людини. В комплексі цієї отрути містяться переважно пептиди та білки, декілька з яких були охарактеризовані як блокатори потенціал-залежних калієвих каналів [261, 262]. Локальна аплікація екстракту отрути *H. laoticus* на LCC-канали в межах до 10 с призводила до різкої зміни кінетики каналів. Вже в перші секунди після аплікації ефект виявлявся як виражений flicker-блок зі зменшенням амплітуди струму. Такий ефект діючої речовини класично характеризується як вплив швидкого блокатора [61]. Реєстрація flicker-блок або швидкого блокування (швидкі флуктуації між відкритим і закритим або блокованим станами) виникає тоді, коли частота переходу між станами більша за частоту зрізу фільтра системи, за допомогою якої здійснюється реєстрація струмів. У такому випадку при швидких константах асоціації блокатора реєструється зменшення амплітуди струму [233].

Порівнюючи ефективність впливу використаних отрут на амплітуду струмів та ймовірність відкритого стану каналів було визначено, що потенційно у всіх екстрактах містяться сполуки, що надалі можуть бути використані як блокатори

LCC-каналів Таблиця 3.1, але за попередньою оцінкою найбільш ефективними виявилися отрути *H. laoticus*, *B. fasciatus* та *N. kaouthia*.

Таблиця 3.1

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

3.1.2. Модуляція LCC-каналів іонами металів

Вплив іонів кальцію та магнію

Іони металів ефективно використовуються для дослідження структурно-функціональних особливостей іонних каналів різних типів, оскільки мають невеликий радіус та здатні проникати в пору іонного каналу на різну глибину, що надає змогу оцінити місце розташування сайту зв'язування.

Раніше було показано, що LCC-канали нечутливі до фізіологічних концентрацій кальцію, проте великі концентрації (~100 мМ) інгібували струми LCC-каналів [20]. Також іони кальцію в концентрації до 10 мМ зменшували провідність моновалентних катіонних каналів на внутрішній ядерній мембрані смугастих м'язів [19], що може вказувати на наявність низькоафінного сайту зв'язування. Отже, щоб визначити наявність сайтів зв'язування у LCC-каналів для двовалентних іонів металів було досліджено вплив іонів кальцію та магнію.

Для визначення впливу Ca^{2+} на потенціалзалежність LCC, було досліджено зміну P_o у безкальцієвому розчині та з концентрацією вільного кальцію 1 мМ при потенціалі -40 мВ та +40 мВ. Аплікація іонів кальцію здійснювалася як на зовнішню так і на внутрішню сторону мембрани. За цих умов відбувалися не суттєві

зміни кінетики каналів, які при позитивних потенціалах були у межах похибки (Рис. 3.5).

Раніше було описано вплив іонів кальцію на проникність NE клітин печінки [16], а саме, що Ca^{2+} в концентрації до 1 мМ пригнічує калієву провідність. Можна припустити, що набір каналів варіюється на NE різних типів клітин. Припускалося, що LCC-канали можуть бути віднесені до ВК каналів, які були зареєстровані на внутрішньоклітинних мембранах, проте 1 мМ кальцію активує ВК канали до максимальних значень P_o (0.98) при заданому потенціалі +30 мВ [263], а у випадку LCC-каналів після аплікації кальцію суттєвих змін активності каналів на позитивних потенціалах не спостерігалось.

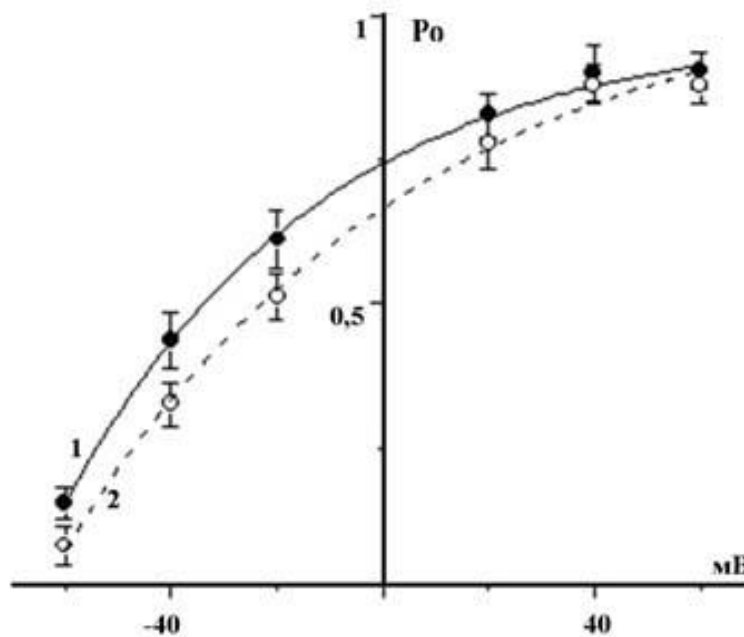


Рис. 3.5. Активність LCC-каналів у розчині з концентрацією кальцію 1 мМ (1) та у безкальцієвому розчині (2) ($n=5-7$).

Також було перевірено вплив іонів магнію в концентрації до 10 мМ. За умови дії Mg^{2+} в концентрації 1 мМ не виявлено суттєвих змін, проте після аплікації 10 мМ виникав незначний flicker-блок, що виявлявся у збільшенні частоти переходів між рівнями провідності LCC-каналів.

Отримані результати свідчать про те, що в LCC-каналів, найбільш ймовірно, відсутній сайт зв'язування для іонів кальцію, проте може бути низькоафінний сайт зв'язування для магнію.

Модуляція LCC-каналів іонами гадолінію

Іони лантаноїдів широко використовуються для зондування пори іонних каналів. Було досліджено вплив іонів Gd^{3+} в концентрації 100 мкМ при потенціалах -40 мВ та $+40$ мВ. Вплив Gd^{3+} змінювався в залежності від поданого потенціалу на мембрані. За умови впливу Gd^{3+} в концентрації 100 мкМ (Рис. 3.6) відбувалося блокування, що яке проявлялося як наявність тривалих інтервалів відсутності струму через іонний канал, при цьому активність каналів (P_o) зменшувалася (Рис. 3.7).

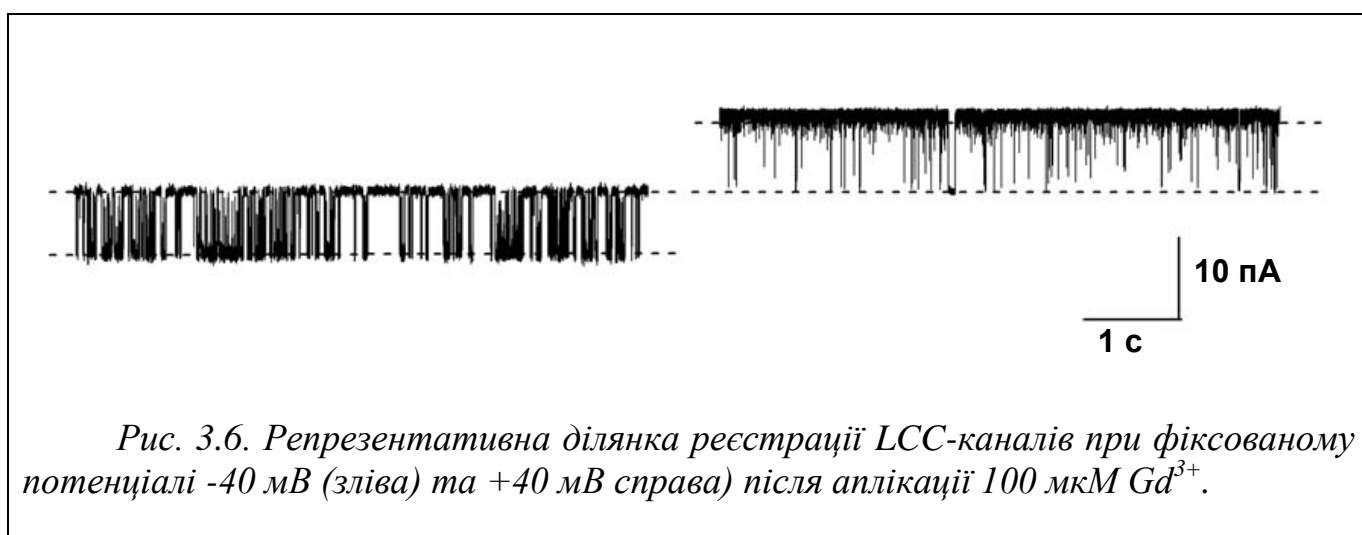


Рис. 3.6. Репрезентативна ділянка реєстрації LCC-каналів при фіксованому потенціалі -40 мВ (зліва) та $+40$ мВ (справа) після аплікації 100 мкМ Gd^{3+} .

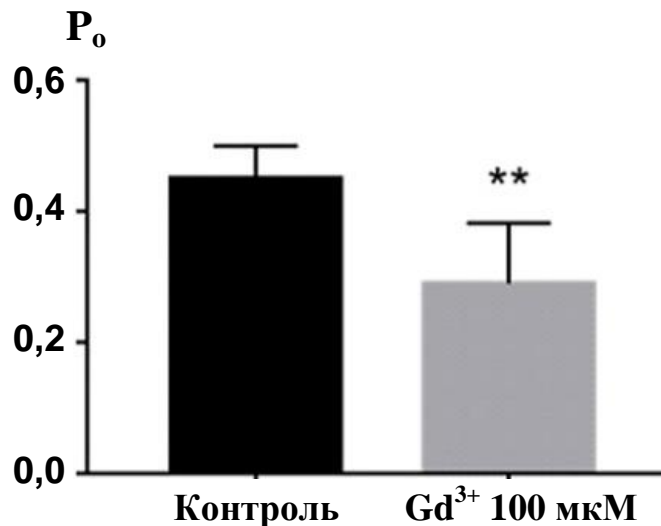


Рис. 3.7. Впливу іонів Gd^{3+} на ймовірність перебування LCC-каналів у відкритому стані (P_o) при фіксованому потенціалі -40 мВ ($n=4$).

Очевидно, що гадоліній діє як порівняно повільний блокатор LCC-каналів. Амплітуда струму при дії іонів Gd^{3+} майже не відхиляється від контрольних значень в концентрації 100 мкМ, коли вплив на кінетику каналів ставав достатньо помітним.

Лантаноїди мають іонні радіуси та координаційні числа, подібні до Ca^{2+} , тому часто використовуються в дослідженнях кальцієвих каналів і подібно до іонів кальцію зв'язуються з групами донорів оксигену. У випадку LCC-каналів, які селективні до моновалентних катіонів вплив іонів гадолінію виявився ефективним на відміну від іонів кальцію. Найбільш ймовірно, що іони Gd^{3+} проникають в пору каналу та блокують проходження іонів калію.

3.1.3. Скринінг токсинів та анестетиків в якості блокаторів LCC-каналів

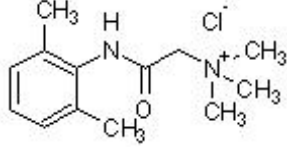
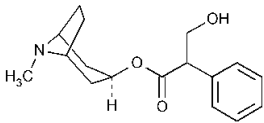
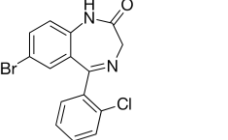
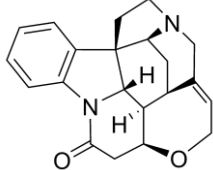
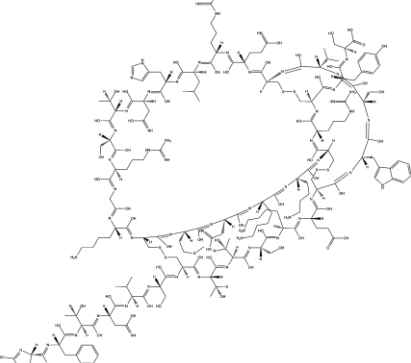
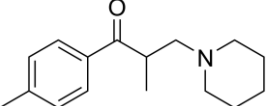
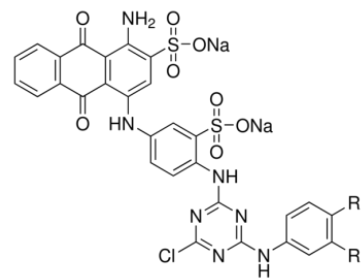
Велика провідність LCC-каналів, яка становить приблизно 200 пС, та щільне розташування на мембранах ядра може свідчити про можливий значний внесок функціонування цього типу каналів у розподілі іонів калію всередині клітини, але дослідження фізіологічної ролі ускладнюється відсутністю ефективного та специфічного блокатора. Тому для опису фармакологічного профілю та аналізу зміни біофізичних характеристик LCC-каналів було проведено скринінг токсинів та анестетиків. З цією метою були протестовані відомі блокатори інших типів іонних

каналів. Було проведено скринінг восьми потенційних блокаторів LCC-каналів. А саме:

- 1) QX-222 – блокатор потенціал-залежних натрієвих каналів;
- 2) атропін (алкалоїд з беладони) – блокатор М-холінорецепторів;
- 3) анксиолітик феназепам – агоніст та інгібітор GABA_A [264-266];
- 4) індоліний алкалоїд стрихнін, який виявляє широкий спектр дії на різні іонні канали; це – антагоніст гліцин-активованих хлорних каналів, блокатор NMDA рецепторів та натрієвих каналів, блокує кальцій-активовані канали малої провідності (SK) в концентрації K_i 180 ± 18 μ м та нікотині-ацетилхолінові рецептори (nAChR) рецепторів з різною концентрацією в залежності від композиції субодиниць, [267-269].
- 5) компонент отрути жовтого скорпіона *Leiurus quinquestriatus* карибдотоксин (CTX), який неселективно блокує BK канали, а також потенціал-керовані калієві канали Kv1.3 [270, 271].
- 6) антагоніст nAChR рецепторів толперизон;
- 7) антагоніст АТФ-викликаного входу кальцію (RB2) [272].

Жоден із них в концентрації від 100 мкМ до 1 мМ не змінював кінетику LCC-каналів. Список використаних сполук наведений в Таблиця 3.2.

Таблиця 3.2

	Сполуки	Структурна формула	Максимальна концентрація використана для LCC-каналів	Антагоніст/блокатор
1	QX-222		1 мМ	Na _v
2	Атропін		1 мМ	mAChR
3	Феназепам		1 мМ	GABA _A
4	Стрихнін		500 мкМ	NMDA, GlyR, SK, nAChR, mAChR
5	СТХ		100 мкМ	BK, K _v
6	Толперизон		1 мМ	nAChR
7	RB2		500 мкМ	АТФ-активовані канали

Модуляція LCC-каналів тубокурарином

Першим блокатором з відомою молекулярною структурою, який вдалося знайти в процесі скринінгу, виявився d-тубокурарин (dTC). Це велика молекула із складною структурою (Рис. 3.8) та масою 609.7 г/моль (хімічна формула $C_{37}H_{41}N_2O_6$). При реєстрації LCC-каналів в конфігурації inside-out на ізольованій ділянці внутрішньої мембрани ядра dTC був добавлений у ванночку (експериментальну камеру), тобто з нуклеарного боку мембрани.

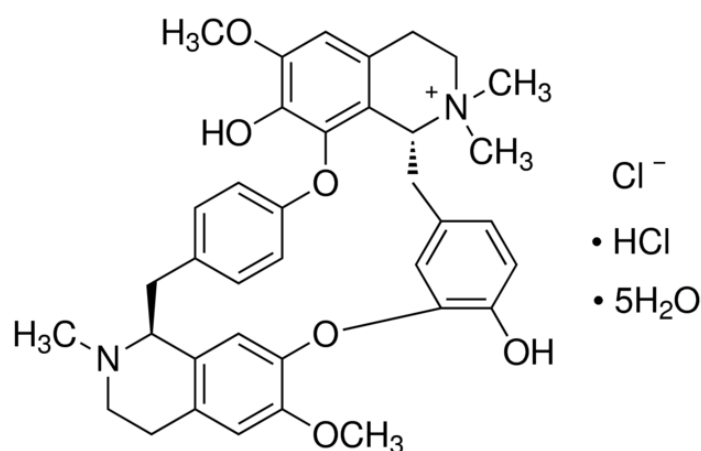


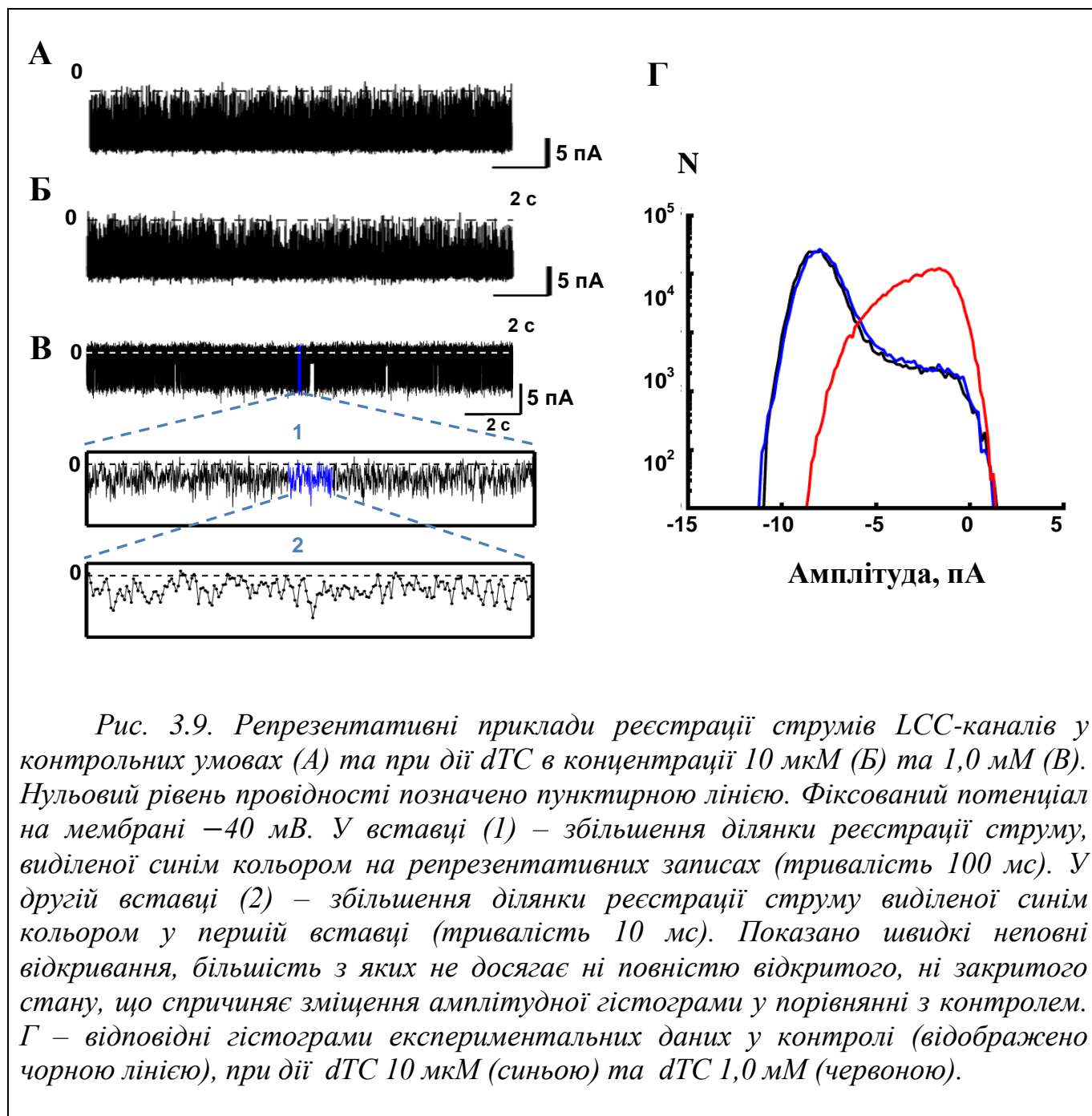
Рис. 3.8. Структурна формула dTC.

Аплікації всіх речовин, окрім природніх отрут, здійснювалися через проточну аплікацію, таким чином повністю заміщуючи базовий розчин на еквімолярний розчин KCl з певною концентрацією діючої речовини.

Вплив dTC розвивався в межах 30 с. Коли dTC потрапляв в експериментальну камеру, то спочатку спостерігалось зменшення струму витоку, що поступово, в межах декількох секунд, супроводжувалося зміною провідності поодинокого каналу.

Блокування LCC-каналів залежало від концентрації dTC. При аплікації 10 мкМ у порівнянні з контролем (Рис. 3.9) вплив dTC виявлявся досить слабо, але помітно збільшувалася кількість швидких закривань всередині відкритого стану та дещо збільшувався шум відкритого стану. Такі зміни майже не супроводжувалися

зменшенням видимої амплітуди струму. Із збільшенням концентрації вплив dTC на LCC-канали посилювався, досягаючи максимуму при аплікації 1–2 мМ (Рис. 3.9).

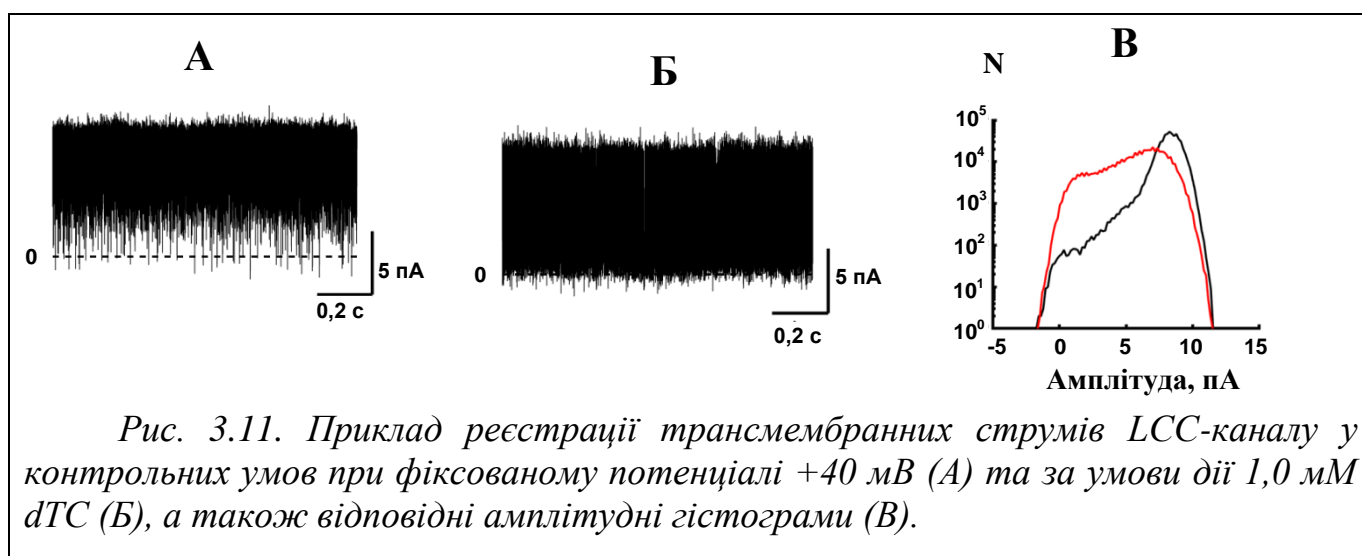


Блокування LCC-каналів тубокурарином було потенціал-залежним. Невеликі концентрації, такі як 10 мкМ майже не виявляли впливу при позитивних потенціалах, але порівняно з контролем (Рис. 3.10) ефект виявлявся сильніше із збільшенням негативного потенціалу на мембрані. При цьому також спостерігалось збільшення кількості швидких подій та шум відкритого стану. Крім цього, після

аплікації dTC виникали триваліші закривання всередині відкритого стану, які не спостерігалися в контрольних умовах.



За умови збільшення концентрації dTC до 1,0 мМ блокування проявлялося не тільки при негативних потенціалах на мембрані, але також і при позитивних потенціалах. При цьому видима амплітуда струму каналів змінювалася в меншій мірі, ніж в умовах впливу при -40 мВ чи -80 мВ. У порівнянні з контролем у разі прикладеного потенціалу $+40$ мВ шум відкритого стану збільшується, внаслідок чого змінювалися значення видимої амплітуди струму (Рис. 3.11, Б). Подібне зміщення змінює форму амплітудної гістограми та ускладнює визначення видимої амплітуди струму.



Концентраційний вплив dTC на LCC-канали при фіксованому потенціалі -40 мВ показано на Рис. 3.12.

За умови, що dTC знаходився всередині піпетки в концентрації 100 мкМ не спостерігалось ніякого впливу, але 1 мМ виявляв ефект, який, схоже, не залежав від потенціалу, і розвивався протягом тривалого часу. В межах 10 хв відбувалося блокування аналогічне аплікації 1мМ у ванночку. Відмивання dTC з ванночки тривало більше 5 хв, поки канал повністю відновлювався до контрольного рівня струму.

Характерною рисою впливу dTC є виникнення швидких закривань в межах відкритого стану (показано на вставці зі збільшенням на Рис. 3.9) з одночасним зменшенням амплітуди струму та збільшенням шуму відкритого стану LCC-каналів, що виникає по мірі збільшення концентрації dTC в зовнішньому розчині. Внаслідок збільшення шуму змінюється розподіл амплітудної гістограми струму як показано на Рис. 3.9, таким чином, що нормальний гауссівський розподіл зміщується, створюючи так званий β -розподіл [248]. Такий вплив із збільшенням шуму відкритого стану каналу притаманний для швидких блокаторів [233]. Виникнення видимого зменшення амплітуди струму може бути через швидкість взаємодії блокатора з каналом, внаслідок чого з'являються швидкі події блокування, які відбуваються поза межами роздільної здатності реєструючої системи.

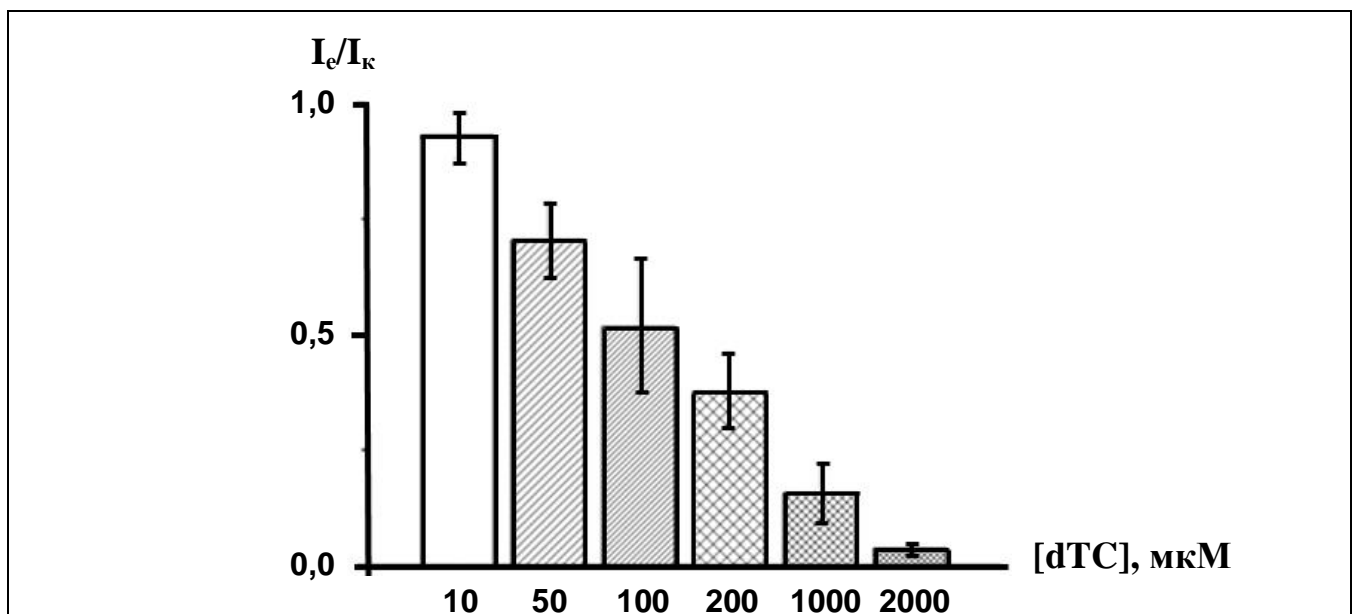


Рис. 3.12. Вплив dTC на LCC-канали. Співвідношення видимої амплітуди струму в контролі та у за умови дії різних концентрацій dTC в діапазоні від 10 мкМ до 2 мМ при фіксованому потенціалі -40 мВ (n=4-5).

Модуляція LCC-каналів галламіном

Галламін – синтетичний недеполяризуючий блокатор з молекулярною вагою 423,633 (Рис. 3.13). Це фенольний ефір, хімічна формула $C_{30}H_{60}N_3O_3$. Галламін (флексіділ) виявився ефективним для розслаблення скелетних м'язів, діючи подібною до тубокурарину та використовувався як допоміжний засіб для анестезії. Галламін впливає на mAChR як конкурентний антагоніст на постсинаптичній мембрані [273], з'єднуючись з холінергічними рецепторними в м'язах і конкурентно блокує трансмітерну дію ацетилхоліну та запобігає активації процесу скорочення м'язів, а також може впливати на пресинаптичні нікотиніві-ацетилхолінові рецептори, що пригнічує вивільнення ACh [274].

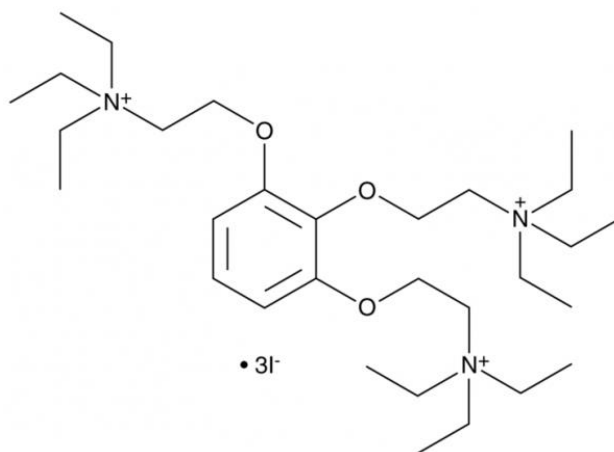


Рис. 3.13. Структурна формула галламіну триетіюідиду.

Галламін, доданий до експериментальної камери у концентрації 10 мкМ викликав виникнення швидкого блокування LCC-каналів при позитивних та негативних мембранних потенціалах. У концентрації 100 мкМ на позитивних потенціалах галламін викликав ледь помітне швидке блокування LCC-каналів (Рис. 3.14). У концентрації 100 мкМ при потенціалі -40 мВ (Рис. 3.15, Рис. 3.16) збільшується шум відкритого стану з одночасним зменшенням видимої амплітуди струму, порівняно з контролем. Вплив був також потенціал-залежним. Ефект розвивався в середньому через 30 с після аплікації. Вплив галламіну подібний до впливу dTC, але більш виражений при дії меншої концентрації.

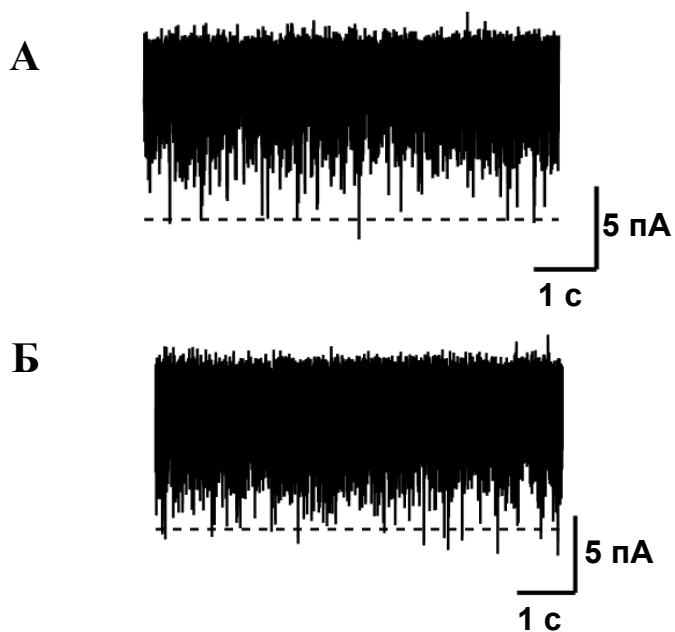


Рис. 3.14. Репрезентативні записи струмів одиночних каналів до (А) та після (Б) аплікації галаміну в концентрації 100 мкМ при фіксованому потенціалі +40 мВ.

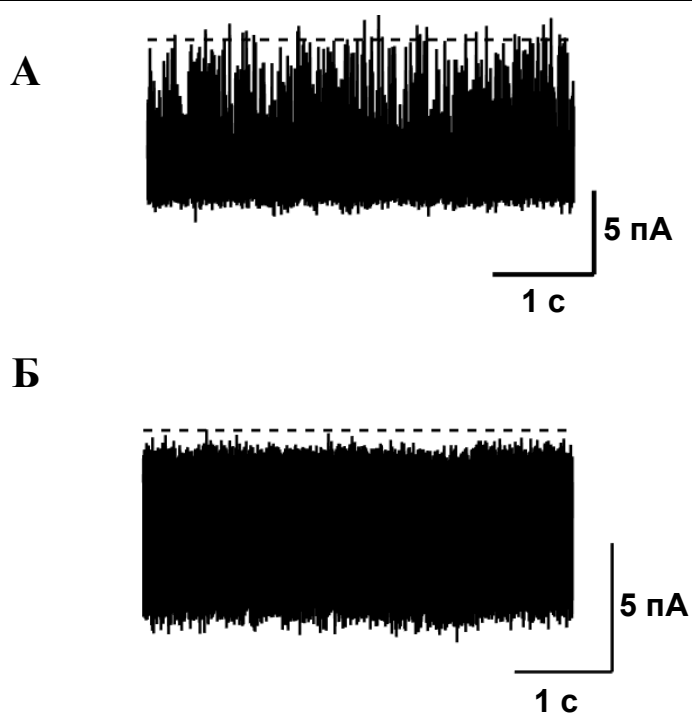


Рис. 3.15. Репрезентативні записи струмів одиночних каналів до (А) та після (Б) аплікації галаміну в концентрації 100 мкМ при фіксованому потенціалі -40 мВ.

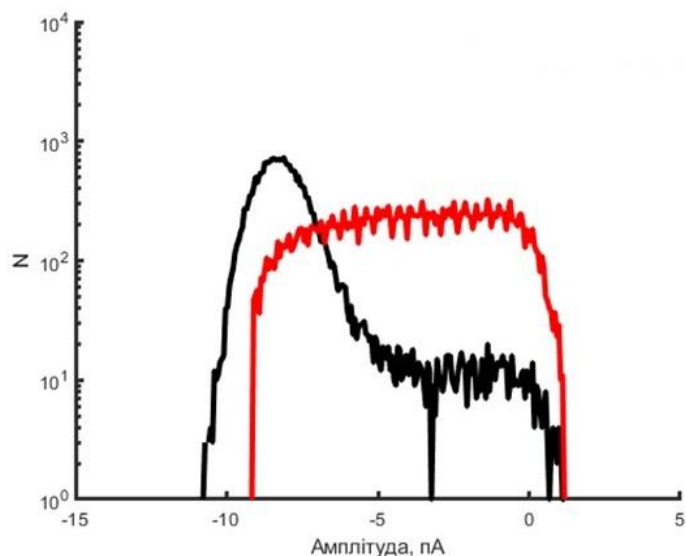


Рис. 3.16. Амплітудна гістограма струмів LCC-каналів при фіксованому потенціалі -40 мВ. Чорний колір – амплітудна гістограма за контрольних умов, червоний колір – при дії галламіну 100 мкМ.

На позитивних потенціалах в концентрації до 100 мкМ ефект проявлявся досить слабо, а із збільшенням негативного потенціалу на мембрані – посилювався. Проте за умови впливу концентрації 1 мМ блокування розвивалося як на позитивних так і на негативних потенціалах.

Галламін, як і dTC, виявився швидким блокатором для LCC-каналів. Це вказує на те, що блокатор приєднується до відкритого стану каналу, а процес від'єднання відбувається з константами швидкості дисоціації приблизно того ж порядку, що і частота фільтрування експериментальної установки або навіть більшою. Такий тип блокування також називають флікерінг (англ. flickering) або мерехтіння. Кількісний аналіз впливу швидких блокаторів ускладнений виникненням великої кількості швидких подій у вигляді неповних переходів між рівнями провідності, які не досягають ні нульового, ні повністю відкритого рівня. Із збільшенням концентрації ефект галламіна та dTC посилювався і досягав насичення приблизно при концентрації 1 мМ.

Адекватна оцінка впливу швидких блокаторів вимагає точного методу аналізу із врахування швидких подій [275]. Інші способи обчислення можуть призводити до

похибок і така оцінка виявляється досить грубою, оскільки технічні параметри реєструючої системи впливають на отримані сигнали, таким чином, від них напряду залежать початкові дані, взяті до аналізу. У випадку з реєстраціями поодиноких іонних каналів це особливо важливо. Перевірку правильності підходу забезпечує відповідність теоретичної моделі та експериментальних результатів. Швидкий блокатор приєднується до певного конформаційного стану іонного каналу і створює додатковий стан блокування. Справжня амплітуда струму каналу в такому випадку не змінюється [233], тому чітко виявити дозо-залежність та механізм впливу швидких блокаторів шляхом обрахунку зміни видимої амплітуди струму, яка яскраво виражається із збільшенням концентрації через збільшення шуму відкритого стану поодинокого іонного каналу, впливає на точність отриманих результатів і може призводити до помилок в їх інтерпретації.

Аналіз швидкого блокування галламіном проводили за допомогою використання аналізу β -розподілу. Для цього спочатку треба було встановити величину шуму та амплітуду базового рівня (нуля). На Рис. 3.17 представлено результати підбору параметрів шуму (стандартне відхилення розподілу Гаусса та амплітуда базового рівня), які генерують симуляцію іонних струмів, що мають найбільшу відповідність до експериментальних реєстрацій, отриманих при фіксованому потенціалі -40 мВ. Таким способом визначали найбільш відповідні параметри для кожної реєстрації окремо. Відповідність параметрів тут і надалі визначали за допомогою критерію, розрахованого за формулою (2.11). Мінімум цього критерію вказував на значення параметрів, які генерували найбільш відповідну до експериментальної теоретичну амплітудну гістограму.

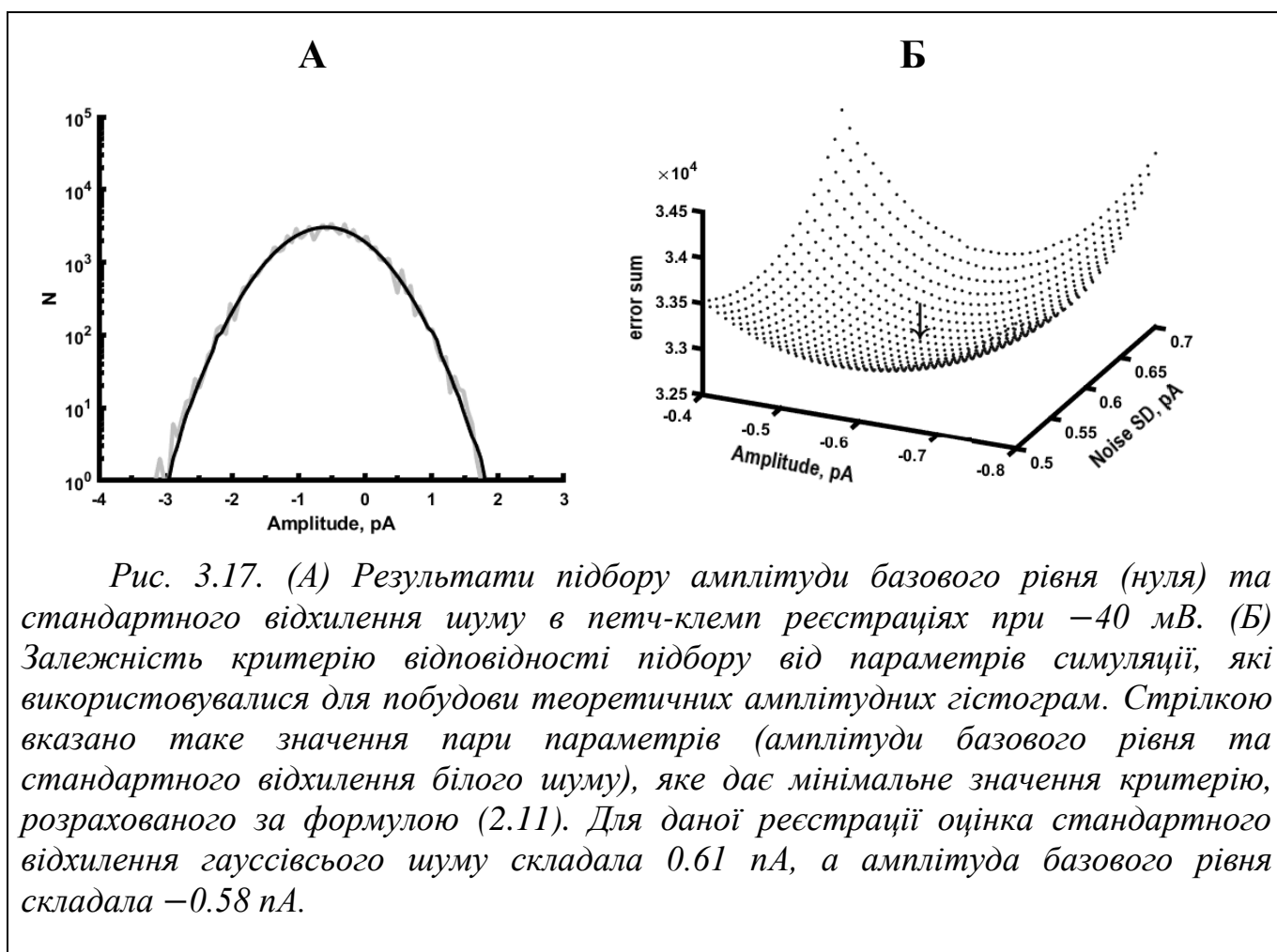


Рис. 3.17. (А) Результати підбору амплітуди базового рівня (нуля) та стандартного відхилення шуму в петч-клемп реєстраціях при -40 мВ. (Б) Залежність критерію відповідності підбору від параметрів симуляції, які використовувалися для побудови теоретичних амплітудних гістограм. Стрілкою вказано таке значення пари параметрів (амплітуди базового рівня та стандартного відхилення білого шуму), яке дає мінімальне значення критерію, розрахованого за формулою (2.11). Для даної реєстрації оцінка стандартного відхилення гауссівського шуму складала 0.61 нА, а амплітуда базового рівня складала -0.58 нА.

Маючи параметри, які відповідають шуму експериментальної установки та величині амплітуди базового рівня, ми визначили справжньою амплітуду струму, а також константи асоціації та дисоціації швидкого блокатора (k_{off} та k_{on}). Спочатку, ми вирішили використати спрощену кінетичну модель, яка містить всього два основних стани – один відкритий стан та один блокований стан:



Така спрощена модель виявилася достатньо адекватною для того, щоб підібрати параметри блокування галламіном у концентрації 100 мкМ при фіксованому потенціалі -40 мВ (Рис. 3.18). Константи асоціації та дисоціації становили 17880 ± 975 і 12790 ± 922 відповідно ($n = 5$).

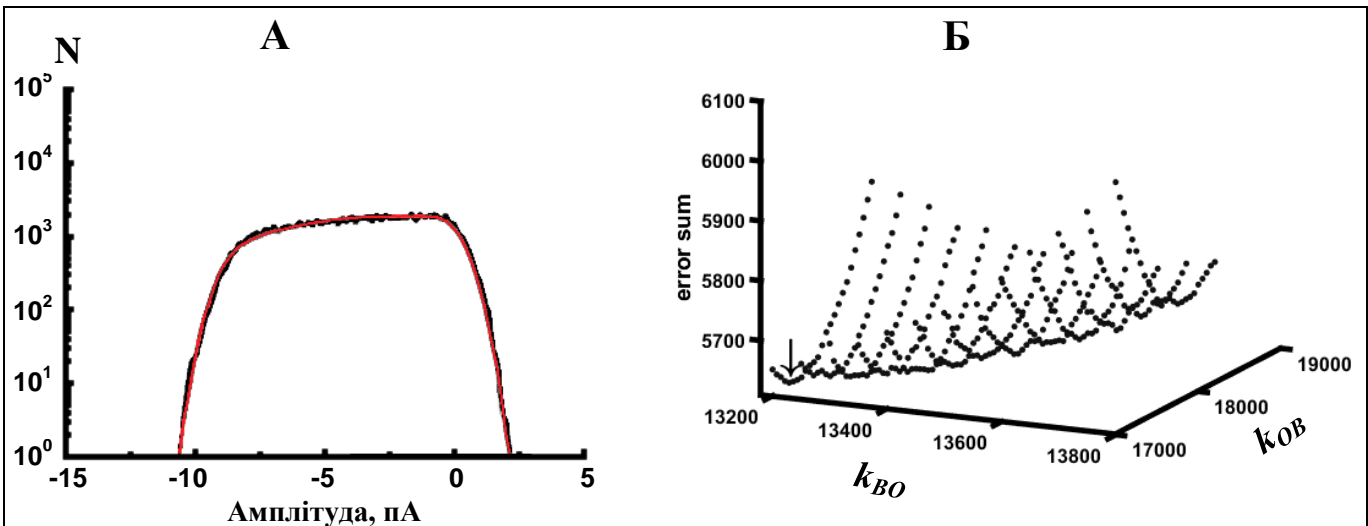


Рис. 3.18. (А) Результати підбору експериментальної амплітудної гістограми, отриманої при дії галламіну (100 мкМ) на LCC-канали при фіксованому потенціалі -40 мВ (червона лінія). (Б) Залежність критерію відповідності підбору від параметрів симуляції, які використовувалися для побудови теоретичних амплітудних гістограм. Стрілкою вказано значення пари параметрів (швидкості асоціації та дисоціації), яке відповідає мінімальному значенню критерію. Для даної реєстрації константи асоціації і дисоціації становили 17350 та 13200 відповідно.

Проте, вже при фіксованому потенціалі $+40$ мВ адекватно підібрати параметри блокування було неможливо. Це пов'язано з тим, що ефект блокування за цих умов занадто слабкий і в реєстрації значна частина подій відноситься до активності самих іонних каналів, яка не спотворена дією блокатора. Тому, очевидно, що для адекватної оцінки блокування для широкого діапазону концентрацій блокатора та фіксованого потенціалу необхідно у повній мірі встановити кінетичні параметри LCC-каналів у контрольних умовах.

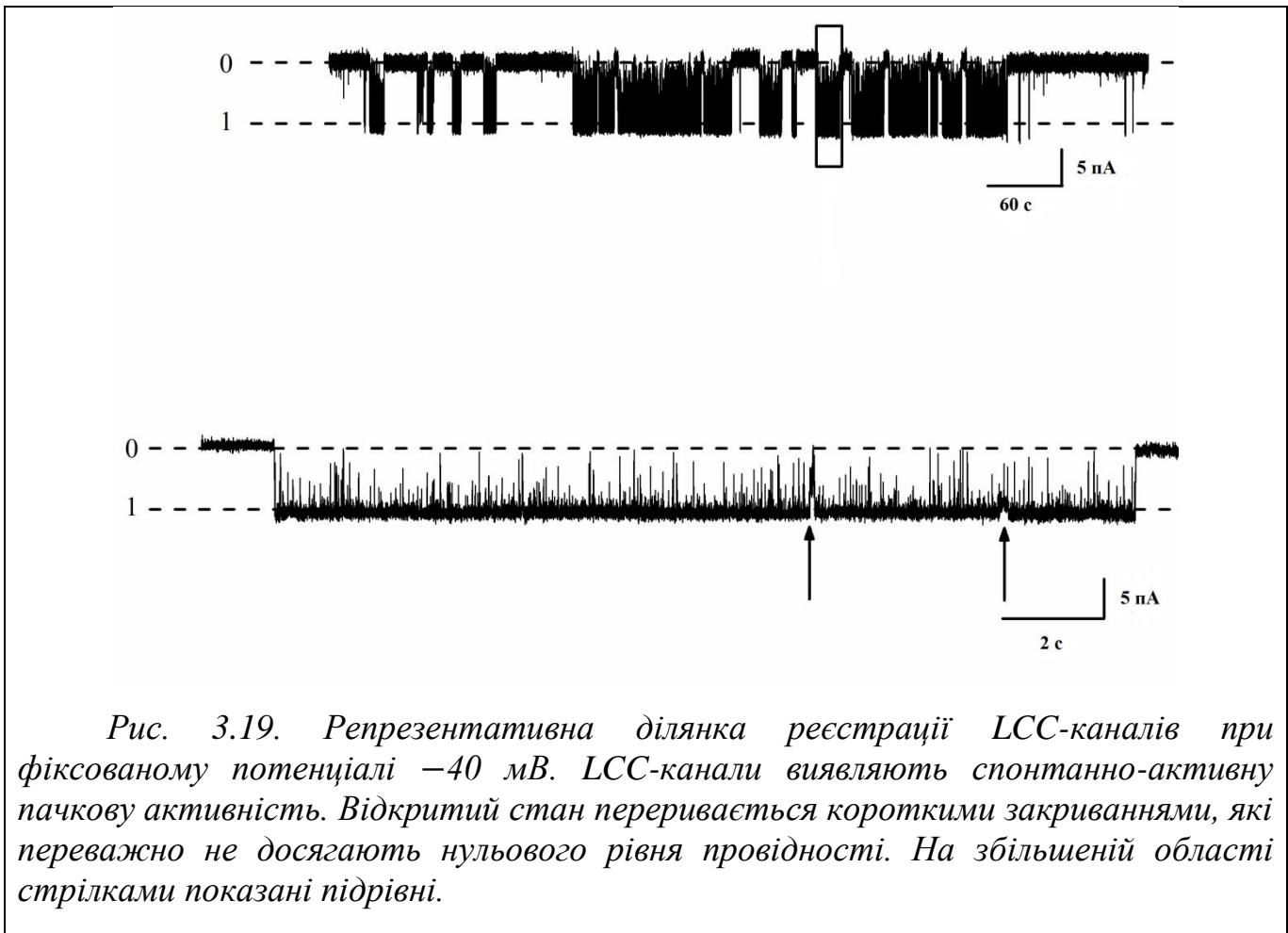
3.2. Загальна характеристика кінетики поодиноких LCC-каналів

Початковим завданням даної роботи було знайти блокатор для LCC-каналів і описати його вплив на кінетику цих каналів. Вперше було виявлено різний модулюючий вплив високомолекулярних сполук – dTC і галламіну, та іонів металів. Оскільки органічні сполуки виявилися швидкими блокаторами виникло питання про адекватність підходу аналізу даних і представлення результатів дози-ефекту. Інша складність в тому, що кінетика каналів невідома, відповідно, неможливо описати її

зміни під дією модуляторів. Таким чином, за наявності потентних, але швидких блокаторів залишався би неосвітленим величезний масив даних, який розкривав би особливості структурно-функціональних зв'язків LCC-каналів внаслідок взаємодії із хімічними сполуками. Відповідно, без ґрунтовного фундаментального аналізу LCC-канали на теперішній час залишаються незрозумілим і малоцікавим об'єктом дослідження, як і багато інших раніше описаних іонних каналів на ядерній оболонці, які не були детально охарактеризовані. Це напряму впливає на моделювання внутрішньоклітинних процесів та сигналів, які їх опосередковують, та до яких залучені LCC-канали та інші слабо охарактеризовані типи іонних каналів.

Отже, щоб коректно проаналізувати вплив швидких блокаторів на амплітуду струму, необхідно знати до якої конформації каналу приєднується блокатор, відповідно, потрібно проаналізувати швидкі події за контрольних умов. Таким чином, виникло завдання описати кінетику LCC-каналів, яка включає велику кількість швидких подій.

Для аналізу кінетики LCC-каналів було відібрано 46 реєстрацій тривалістю в загальному від $\sim 1,5$ хв до ~ 20 хв, які містили 1 канал. При візуальному аналізі помітно, що кінетика LCC-каналів має так званий "пачковий" характер активності, а саме, виникнення декількох поспіль тривалих відкритих станів (пачок), які перериваються довгими закриваннями [276] як продемонстровано на Рис. 3.19.



При уважному розгляді реєстрацій не важко помітити, що ділянки, де LCC-канали перебувають у відкритому стані, перериваються короткими (швидкими) закриваннями (Рис. 3.19). Велика кількість таких подій припадає на неповні закривання, які вважаються надто швидкими (англ. *unresolved events*), щоб бути зареєстрованими та оцифрованими в повній мірі реєструючою системою [240]. Іншими словами, тривалість цих подій надто мала, щоб повноцінно відобразитися на реєстраціях поодиноких каналів, що створює складності в їх аналізі. Оскільки більшість алгоритмів для калькуляції тривалості певного класу подій в реєстрації струмів поодиноких каналів базуються на підході їх ідеалізації, то швидкі події часто бувають втраченими (англ. *missed events*), що створює неточності в обрахунках та, як наслідок, може призвести до помилок в інтерпретації результатів [277-280].

Амплітудні гістограми ділянок реєстрації LCC-каналів демонструють відхилення розподілу амплітуди відкритого стану від гуссівського розподілу, так що гістограма виглядає дещо розтягнутою, видовженою в бік нульового рівня провідності (Рис. 3.20). На реєстрації поодиноких каналів можна визначити, що такому розподілу амплітуд відповідають події, які найчастіше зустрічаються в межах відкритого стану. Тривалість таких подій змінюється залежно від потенціалу на мембрані, що проявляється по мірі збільшення рівня потенціалу в обидва напрямки від нуля. Крім того, швидким подіям на гістограмі відповідає видовжений розподіл між закритим і відкритим станом (Рис. 3.20).

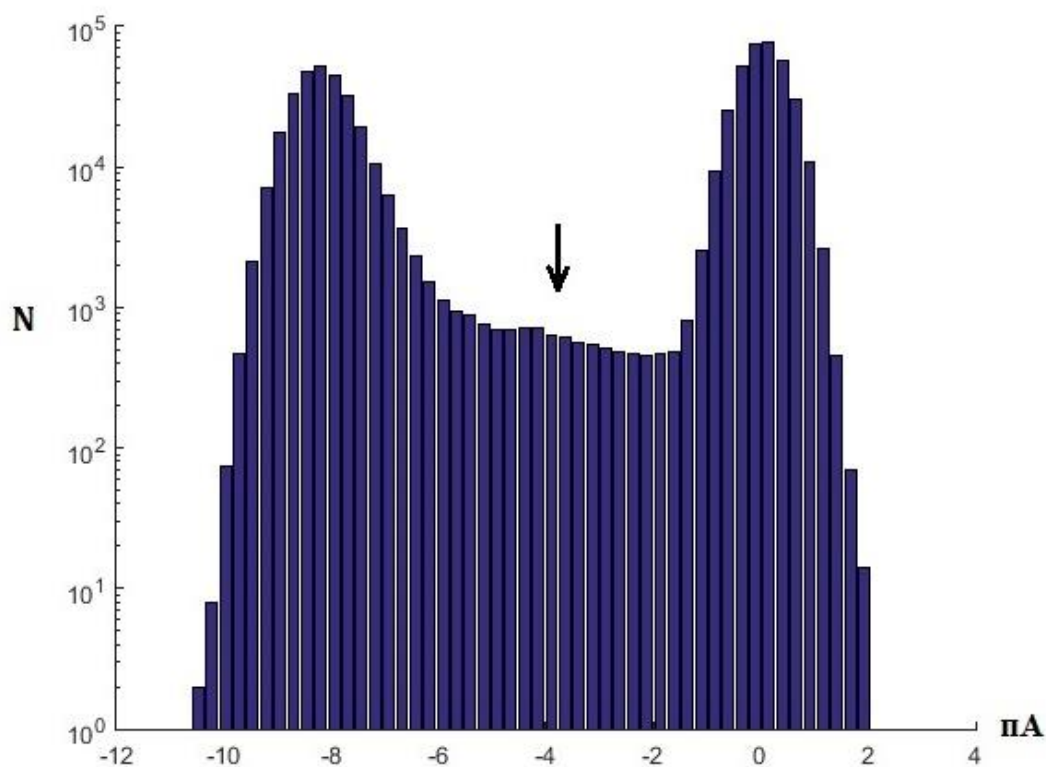


Рис. 3.20. Амплітудна гістограма струму LCC-каналів (-40 мВ). Стрілкою вказано швидкі події, які створюють відхилення розподілу від нормального.

При фіксованому потенціалі -20 мВ і $+20$ мВ амплітудні гістограми майже цілком дзеркально відображають одна одну через малу амплітуду струму повної провідності каналу та відносно великий шум системи реєстрації. Ці обмеження

заважають розрізнити потенціал-залежність різних подій в реєстраціях струмів LCC-каналів. Із збільшенням значення негативного потенціалу (від -20 мВ до -80 мВ) нерівномірний розподіл на амплітудних гістограмах стає все більш виразним за рахунок зменшення шуму та збільшення амплітуди струму. При цьому добре помітно, що розподіл амплітуди між повністю відкритим та нульовим рівнем провідності на позитивних та негативних потенціалах дещо відрізняється.

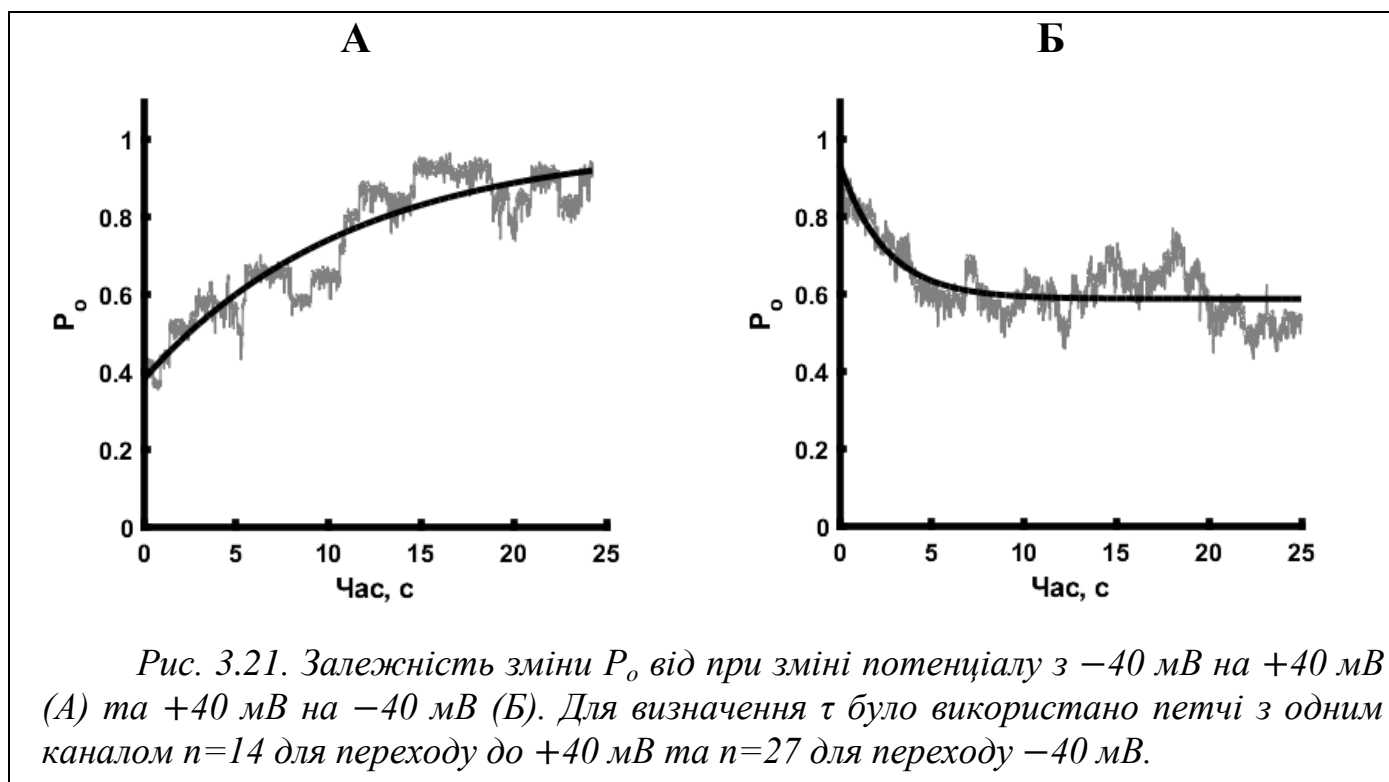
Крім закритого та відкритого стану LCC-канали чітко демонструють наявність багатьох підрівнів, які мають значні варіації як по амплітуді, так і по своїй тривалості та частоті виникнення. Деякі підрівні добре помітні на реєстраціях поодиноких LCC-каналів (показано стрілками Рис. 3.19), в той час як інші можуть бути виявлені лише в процесі аналізу амплітудних гістограм.

Таким чином, в результаті візуального аналізу реєстрацій можна зробити підсумок, що в цілому кінетика LCC-каналів включає дві компоненти – повільну та швидку, а також чисельні підрівні, які якісно відмінні між собою. Наявність двох різних компонент і багатьох підрівнів вимагає акуратного аналізу даних із застосування аналітичного підходу з достатньою чутливістю для ідентифікації та характеристики швидких подій в реєстраціях струму поодиноких LCC-каналів.

3.2.1. Дослідження стаціонарної та нестаціонарної кінетики

Для уникнення великого розкиду результатів аналізу важливо знати стаціонарні та нестаціонарні характеристики іонного каналу. Для цього було обчислено параметри релаксації LCC-каналів по зміні ймовірності відкритого стану при переході між потенціалами. Було досліджено нестаціонарну кінетику при зміні потенціалу від -40 мВ до $+40$ мВ та в протилежному напрямку. Аналогічно було досліджено зміни параметрів струму для мембранного потенціалу -80 мВ та $+80$ мВ. Встановлено, що процес релаксації іонного каналу має властивості гістерезису, тобто час релаксації в одному напрямку відрізняється від часу при переході між тими самими потенціалами, але в зворотному напрямку. При переході від -40 мВ до $+40$ мВ час релаксації (τ) становив $11,10$ с (Рис. 3.21, А). У зворотному напрямку час релаксації був коротшим – $2,48$ с (Рис. 3.21, Б). Для переходів від -80 мВ до $+80$

мВ час затримки був 1,58 с (Рис. 3.22, А), у той час як у зворотному напрямку – 6,32 с (Рис. 3.22, Б).



Для оцінки стаціонарної кінетики LCC-каналів було досліджено потенціал-залежність ймовірності відкритого стану для одного каналу в петчі. Для цього були відібрані реєстрації, тривалість яких була від 30 с до більше ніж 20 хв. Для того, щоб уникнути нестационарної активності при переходах між потенціалами перші 10 с реєстрації не бралися до розрахунків. Залежність P_o (показано на Рис. 3.23, описувалася функцією Больцмана з параметрами $V_{1/2} = -37,4$ мВ та $z\delta = -1,56$ з формули (2.7).

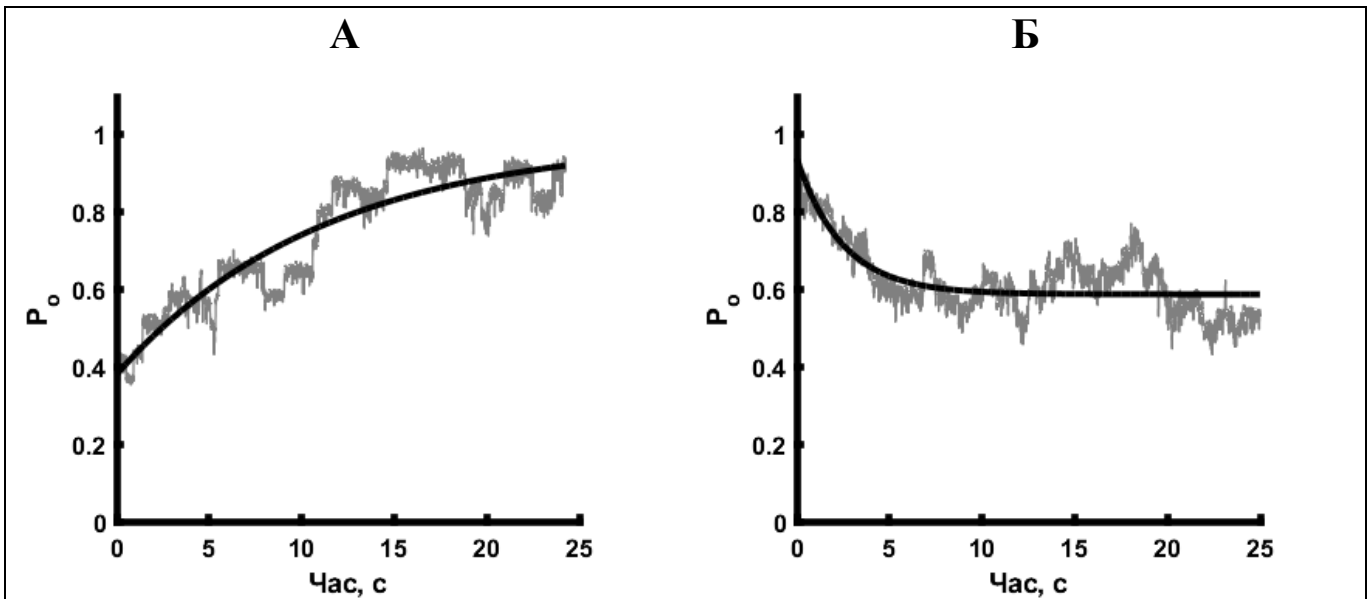


Рис. 3.22. Час затримки перед першим закриванням та відкриванням LCC-каналів (латентність) при зміні потенціалу з -80 мВ на $+80$ мВ (А) та $+80$ мВ на -80 мВ (Б). Для визначення τ було використано петчі з одним каналом $n=11$ для переходу до $+80$ мВ та $n=4$ для переходу до -80 мВ.

Раніше було показано значення P_o LCC-каналів за умови наявності різної кількості каналів в петчі (Рис. 1.4), що може впливати на виникнення як позитивної, так і негативної кооперації, тому більш точне значення може бути отримано, коли в петчі реєструється тільки один канал. В результаті обчислень ми виявили, що значення активності LCC-каналів за умови одного каналу в петчі при 0 мВ становить $0,9$ (Рис. 3.23).

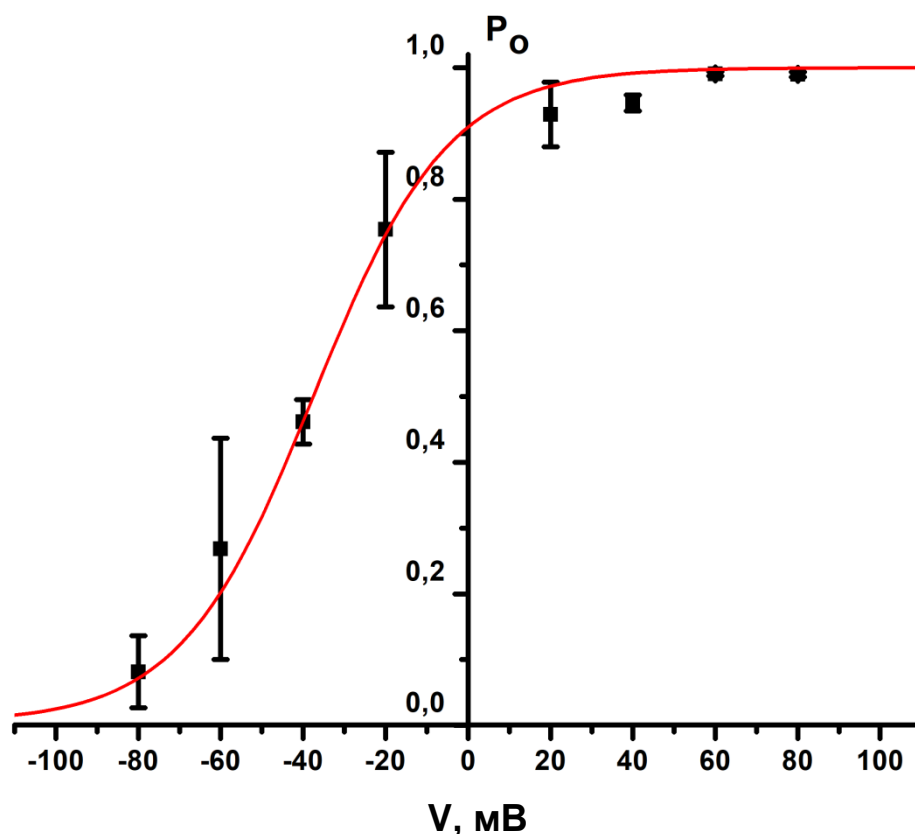


Рис. 3.23. Ймовірність відкритого стану (P_o) LCC-каналів за умови наявності лише одного каналу в петчі. Експериментальні точки були отримані за стаціонарних умов при потенціалах -80 мВ ($n=6$), -60 мВ ($n=3$), -40 мВ ($n=22$), -20 мВ ($n=8$), $+20\text{ мВ}$ ($n=9$), $+40\text{ мВ}$ ($n=31$), $+60\text{ мВ}$ ($n=7$), $+80\text{ мВ}$ ($n=4$).

3.2.2. Аналіз повільних та швидких подій стаціонарної кінетики LCC-каналів

Дослідження механізмів, які лежать в основі функціонування іонних каналів, вказують, що канали можуть існувати в ряді дискретних кінетичних станів з оборотними переходами між цими станами [281-283]. За умови, що швидкості переходів між станами не змінюватимуться з часом, розподіли тривалості таких інтервалів будуть описуватися сумами експонент, при цьому їх кількість для розподілів тривалості відкритого та закритого станів буде відповідати кількості цих станів. Для аналізу кінетики поодиноких іонних каналів цей підхід вперше використали на початку 80-х років Девід Коун та Алан Хоукс, які описали поодинокі ацетил-холінові рецептори [236]. Підхід заснований на ідеалізації

реєстрацій поодиноких каналів добре описує кінетичні стани іонного каналу, які достатньо довгі, щоб досягнути нульового рівня провідності, але в процесі ідеалізації до аналізу не завжди можуть бути включені швидкі події. Відомі неодноразові спроби вирішення питання обчислення швидких подій [233, 237, 251, 284]. Із них найбільш інтуїтивно зрозумілим і простим у використанні видається підхід на основі симуляції амплітудних гістограм та аналізу β -розподілу.

Візуальний аналіз реєстрації при -80 мВ виявив багато подій різного типу, які неможливо було виділити в окремі групи через їхню малу частоту повторень. До таких подій відносилися ділянки з нульовою провідністю і тривалістю більше 500 мкс, різні підрівні, а також тривалі флуктуації між різними рівнями провідності, які неможливо асоціювати з конкретними стабільними станами (Рис. 3.24). Через те, що такі події зустрічаються порівняно рідко ми назвали їх рідкісними або нехарактерними для кінетики LCC-каналів. Для адекватного аналізу β -розподілу амплітудної гістограми вручну було знайдено та видалено з подальшого аналізу всі вищезазначені нехарактерні події. Таким чином, амплітудна гістограма зазнавала змін, які відображали внесок цих подій. Остаточний, “очищений” варіант амплітудної гістограми був взятий для аналізу і підбору відповідних кінетичних параметрів. На Рис. 3.25 показано результат підбору теоретичної кривої розподілу амплітуд для мембранного потенціалу -80 мВ, яка була отримана шляхом симуляції

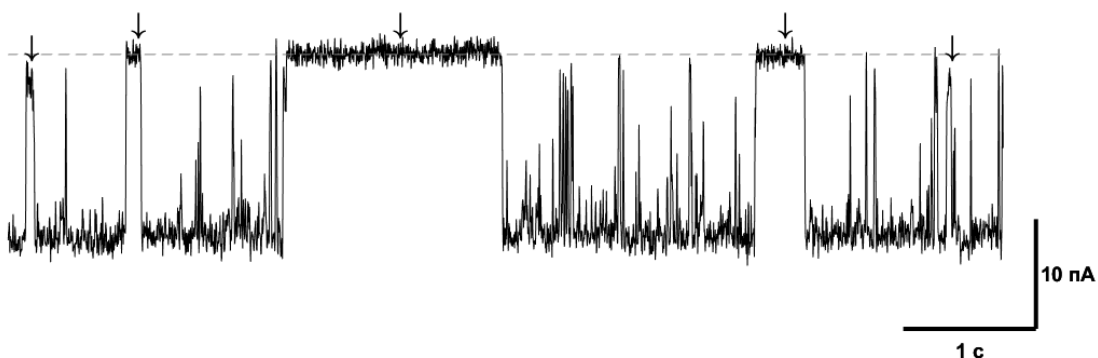


Рис. 3.24. Репрезентативна ділянка реєстрації струмів LCC-каналів при потенціалі -80 мВ. Стрілками позначені події (два підрівня та три повних закривання), які були виключені для побудови амплітудної гістограми та подальшого аналізу.

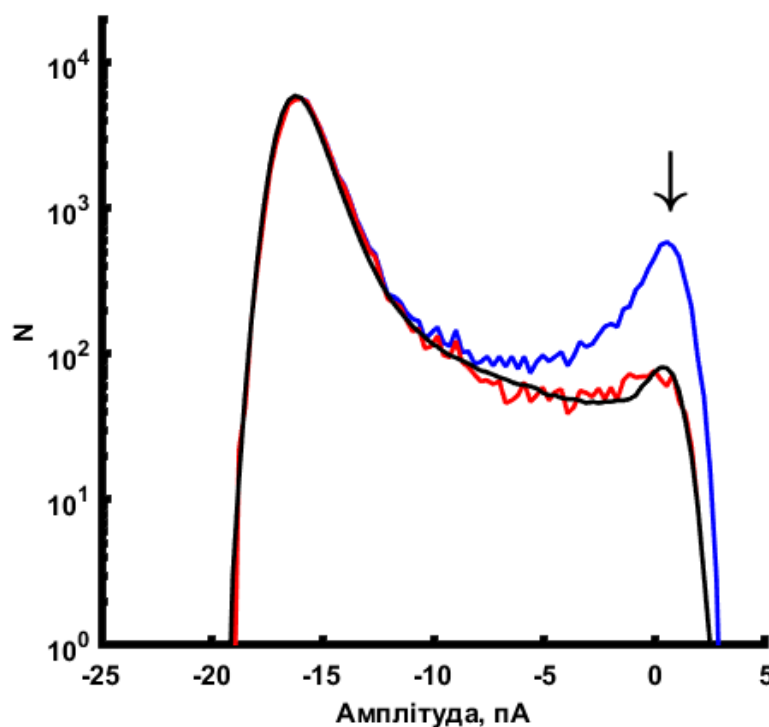


Рис. 3.25. Амплітудні гістограми побудовані при потенціалі -80 мВ до (синя крива) та після (червона крива) видалення різних подій (позначено стрілкою), які рідко повторюються (серед яких повні закривання тривалістю більше 500 мкс, підрівні різної амплітуди та тривалості, високочастотні флуктуації, тощо). Теоретична крива розподілу амплітуд (чорна крива) отримана в результаті підбору відповідної моделі Маркова та констант переходу.

флуктуацій струму для одного відкритого стану, зв'язаного переходами з трьома закритими станами. Таким чином, відповідна топологія моделі Маркова, яку вдалося підібрати для негативних потенціалів на мембрані, включала в себе тільки основні характерні стани, через які проходять LCC-канали. Такий самий спосіб аналізу та підбору кінетичних параметрів було застосовано і до ділянок реєстрацій при інших негативних потенціалах (-40 мВ та -60 мВ).

Візуальний аналіз струмів при потенціалі $+80$ мВ виявив більш однорідну картину у порівнянні з результатами аналізу при негативних потенціалах (Рис. 3.26). В реєстрації струму також були наявні підрівні різної тривалості, які зустрічалися значно рідше, ніж при негативних потенціалах. Повні закривання, які би мали достатню тривалість для того, щоб було чітко видно їх початок та кінець, були практично відсутні. Так само були відсутні високочастотні флуктуації між різними

рівнями провідності, які спостерігалися при негативних потенціалах. Все це дає можливість легко вибрати тривалі ділянки без потреби видалення рідкісних подій. Наявність великої кількості швидких подій при стабільній базовій лінії полегшує аналіз компонентів кінетичної моделі.

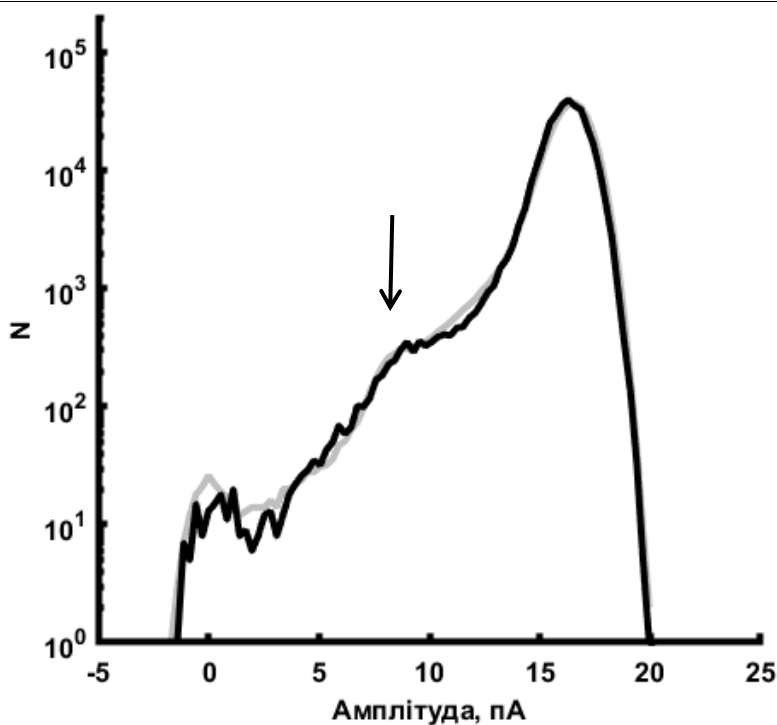


Рис. 3.26. Амплітудні гістограми побудовані в умовах фіксації трансмембранного потенціалу +80 мВ. Стрілкою вказано наявність підрівня, який не відрізнити на репрезентативних реєстраціях.

Для аналізу теоретичної кривої на позитивних потенціалах було застосовано ту саму топологію моделі, що і при негативних потенціалах, проте несподівано виявилось, що амплітудна гістограма побудована для реєстрації при потенціалі +80 мВ містить компоненту, яка відсутня на негативних потенціалах, оскільки після багатьох циклів підбору теоретична амплітудна гістограма не співпадала з експериментальною. Ця компонента відповідала стану, який часто повторювався і тому не можна було уникнути її або виключити з аналізу. Це спонукало нас внести додатковий стан в матрицю кінетичною моделі, з провідністю приблизно 50% від максимальної (Рис. 3.26), який, очевидно, відповідає підрівню іонного каналу. Після цього розрахована теоретична крива розподілу амплітуди добре накладається на експериментальну, включаючи ділянку, яка відповідає підрівню. Аналогічні

результати спостерігалися також на інших значеннях потенціалів. Таким чином, було повністю проаналізовано за допомогою аналізу β -розподілу швидкі події в реєстраціях, які є найбільш характерними подіями кінетики LCC-каналів та складають основну частину моделі Маркова.

Відповідно до потенціал-залежності ймовірності відкритого стану, починаючи з +40 мВ, спостерігалися також повільні події (більше декількох десятків мікросекунд). Частота та тривалість їх збільшувалася по мірі зростання негативної поляризації мембрани. При потенціалах менше ніж -60 мВ, P_o іонного каналу мало дуже мале значення, а тривалість повних закривань була настільки великою, що їх розподіл неможливо було адекватно оцінити в стандартних експериментальних умовах через їх незначну кількість. Тому для аналізу повільних подій ми взяли потенціал, при якому ймовірність відкритих та закритих станів була приблизно однакова (-40 мВ). Для аналізу повільних подій було відібрано інтервали, тривалість яких більше 300 мс і побудовано розподіл часу перебування каналу у закритому стані, який описувався відповідною ФГЙ. На

Рис. 3.27 показано розподіл частоти часових інтервалів у вигляді, запропонованому Сігвартом і Сіном [235] з піком, який відповідає середньому значенню часу перебування каналу у відповідному (або закритому) стані.

Для отриманих даних було встановлено, що константа часу для повільних подій $\tau=5,56$. Маючи всі значення констант швидкостей переходу, крім константи, яка відповідає переходу до найдовших закривань, можна легко розрахувати останню за формулою:

$$k_{oc_3} = \frac{1}{P_o(V)} (gf_{oc_1} \times gf_{oc_2} \times k_{c_3o}) - k_{c_3o}, \quad (3.1)$$

де gf_{oc_1} та gf_{oc_2} – фактори ворітного механізму, які обраховуються як співвідношення $gf_{oc_1} = \frac{k_{c_1o}}{k_{c_1o} + k_{oc_1}}$ та $gf_{oc_2} = \frac{k_{c_2o}}{k_{c_2o} + k_{oc_2}}$, $P_o(V)$ – ймовірність відкритого стану при заданому потенціалі (-40 мВ). Обрахунки показали, що $k_{oc_3} = 0,0755 \text{ c}^{-1}$.

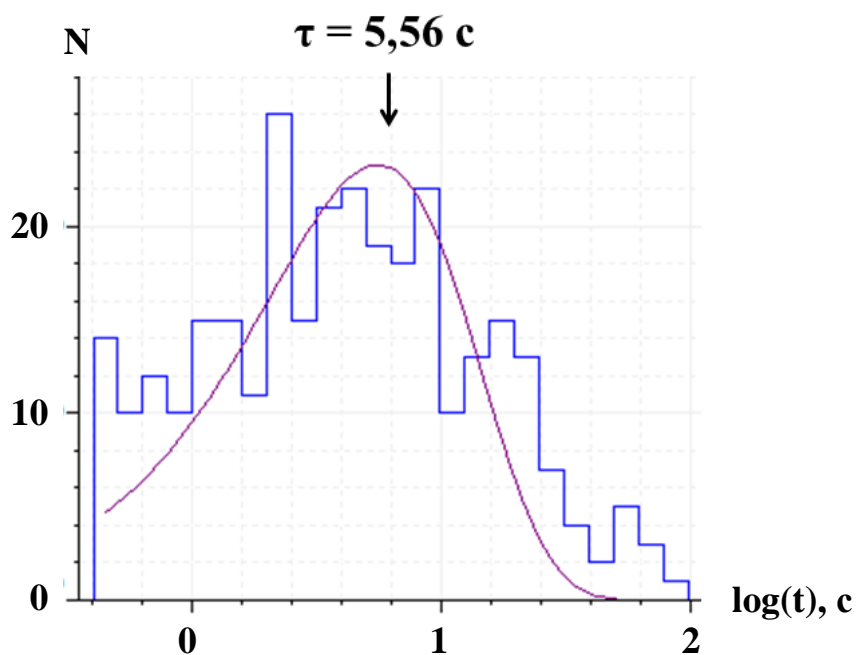


Рис. 3.27. Розподіл частоти часових інтервалів закритого стану LCC-каналів при мембранному потенціалі -40 мВ. По шкалі абсцис відкладено часові інтервали закритих станів, в яких перебуває канал, а по шкалі ординат – кількість цих подій. Теоретична крива (фіолетовий колір) підібрана з відповідними параметрами за формулою (2.6). Сумарний час реєстрацій взятий для аналізу складає 2 години 16 хв.

Виходячи з отриманих результатів можна оцінити внесок швидких подій до формування загального значення P_0 . Ми можемо оцінити значення P_0 за умови відсутності швидких подій за формулою:

$$P_0 = \frac{k_{C_3O}}{k_{C_3O} + k_{OC_3}}. \quad (3.2)$$

В такому випадку P_0 складає 0,495 при -40 мВ, що відрізняється від значення, яке отримано з експериментальних даних ($P_0=0,460$) на 0,035. Це означає, що швидкі події зменшують P_0 на 7%.

Аналіз швидких та повільних подій дає можливість отримати кінетичну модель, яка адекватно описує переходи між основними конформаційними станами. Результат аналізу даних свідчить про те, що модель Маркова складається з одного

відкритого стану, трьох закритих станів (з швидкою, середньою та повільною кінетикою) та одного підрівня (Рис. 3.28).

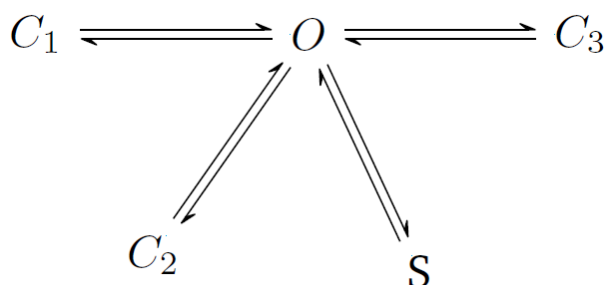


Рис. 3.28. Модель Маркова для LCC-каналів, отримана в результаті аналізу швидких та повільних подій в реєстраціях струмів поодиноких каналів. Кінетична модель складається з основних станів, а саме одного відкритого стану, який зв'язаний з трьома закритими станами: C_1 (швидкий закритий стан), C_2 (середній закритий стан), C_3 (повільний закритий стан), S (швидкий підрівень). Модель передбачає відсутність переходу між закритими станами напряму, а тільки через основний відкритий стан.

Побудована кінетична модель Маркова адекватно описує флуктуації струмів, які відповідають переходам між цими основними станами в отриманих реєстраціях. Наявність інших подій, таких як різні підрівні, а також нестабільні флуктуації між різними рівнями провідності, які не можна віднести до основних станів, вказує на додаткові конформаційні стани, які ми не включали в основну модель через те, що вони рідко зустрічаються.

Аналіз швидких подій показав, що константи швидкості переходів між станами змінювалися в залежності від потенціалу. На Рис. 3.29 показано, що на позитивних потенціалах для всіх станів константи швидкості переходу від певного, окремо взятого закритого стану або підрівня до відкритого стану збільшувалися по мірі збільшення величини позитивного потенціалу. На негативних потенціалах константи переходу для підрівня неможливо було оцінити через їх дуже малу частоту.

На Рис. 3.30 показано залежність констант при переходах у зворотному напрямку (від відкритого до закритого стану або підрівня). Для повільного закритого стану C_3 константа переходу зменшувалася при зміні потенціалу від -80

мВ до +80 мВ, у той час як константа переходу для C_2 не змінювалася. Тривалість стану C_2 при потенціалі -80 мВ складала в середньому 111 мкс, а при потенціалі $+80$ мВ – 20 мкс. Повільний стан C_3 при потенціалі $+80$ мВ характеризувався середнім часом життя 119 мкс, але вже при потенціалі -40 мВ це значення різко зростало до 5,56 с. Така залежність в значній мір обумовлює ймовірність відкритого стану LCC-каналів.

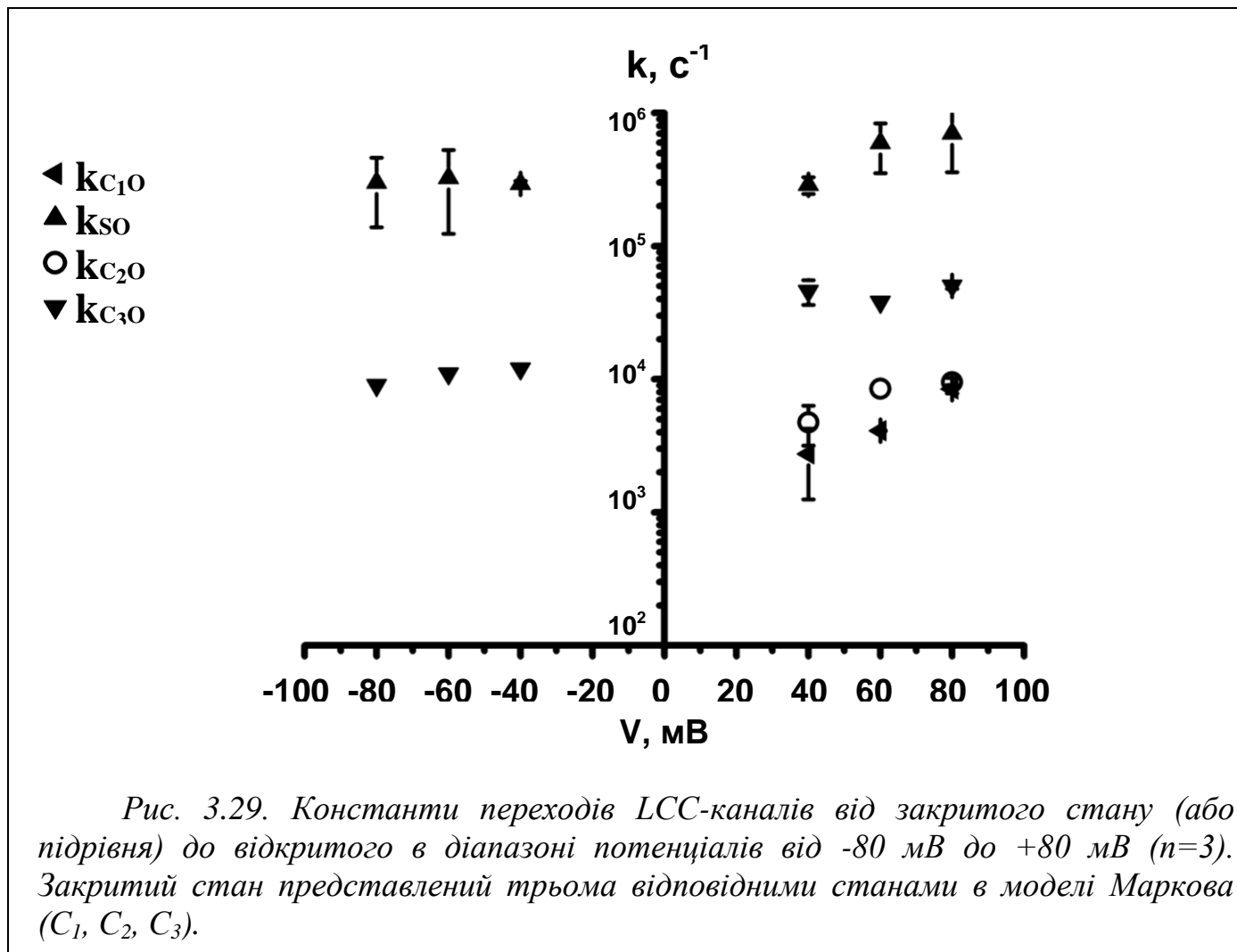
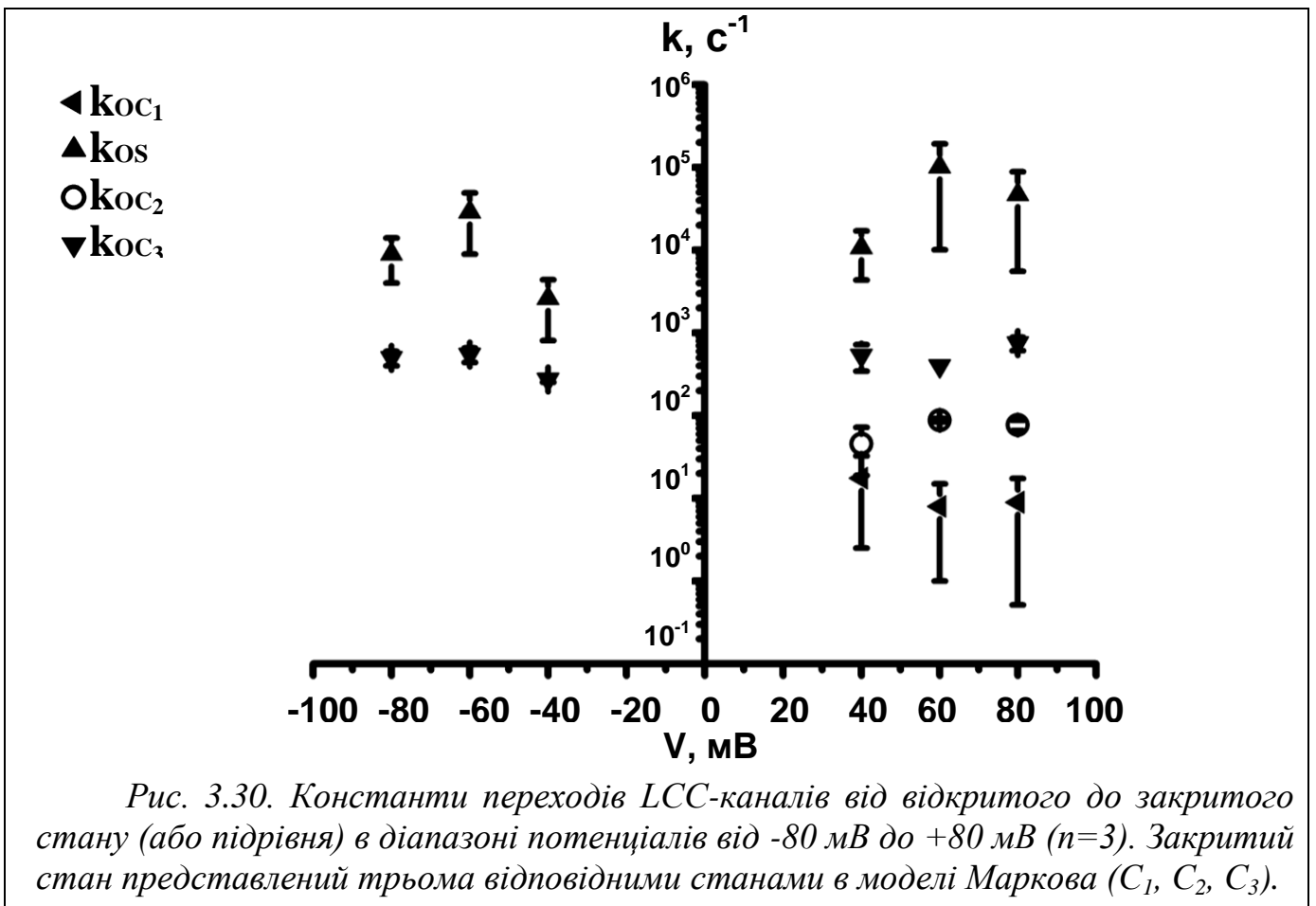


Рис. 3.29. Константи переходів LCC-каналів від закритого стану (або підрівня) до відкритого в діапазоні потенціалів від -80 мВ до $+80$ мВ ($n=3$). Закритий стан представлений трьома відповідними станами в моделі Маркова (C_1 , C_2 , C_3).

Таким чином, можна стверджувати, що стан C_3 має “фізіологічне” значення, оскільки робить найбільший внесок в тривалість проходження іонів калію через канал. При більш негативних значеннях потенціалу (менше -80 мВ) оцінити тривалість життя стану C_3 експериментально неможливо через те, що LCC-канали перебувають практично весь час у закритому стані і дуже рідко відкриваються. Відповідно кількість переходів від стану O до стану C_3 теж занадто мала, щоб можна

було отримати певну статистику подій. Також, на позитивних значеннях потенціалу з'являється підрівень, константа переходу до якого від стану O збільшувалася з потенціалом. Середній час перебування LCC-каналів в підрівні складав 105 мкс в умовах потенціалу +80 мВ. Швидкості переходів від основного відкритого стану (O) до швидкого закритого (C_1) та у зворотному напрямку мають великі числові значення, що фактично на межі роздільної здатності аналізу β -розподілу, через що можливі похибки в оцінці часу перебування у швидкому закритому стані C_1 . При аналізі таких подій критично важливим є вплив різного роду шуму та нестабільності базової лінії. При цьому, на користь наявності дуже швидких закривань та відкривань свідчить значний шум відкритого стану, який добре видно при візуальній оцінці амплітудної гістограми. Підбір параметрів, які відповідають переходам у стан C_3 та у зворотному напрямку і описують зміни в амплітудній гістограмі, викликані цими подіями, свідчить про дуже коротку тривалість C_1 , яка за розрахунками в середньому становить 1,4 мкс при +80 мВ та 3,3 мкс при -80 мВ.



Тривалість відкритого стану, відповідно до встановленої в даній роботі моделі Маркова, визначається переважно швидкістю переходу в стан C_1 , в той час як інші стани не роблять значного внеску в тривалість часу життя основного стану O . За підрахунками для основного відкритого стану іонного каналу середній час перебування становить 104 мкс при -80 мВ, а при позитивних потенціалах від $+60$ мВ до $+80$ мВ – в межах від 10 до 25 мкс.

Таким чином, найбільший внесок в потенціал-залежну кінетику LCC-каналів був за рахунок констант переходу для станів C_2 та C_3 . З використанням симуляції було визначено, що цим станам відповідають події (закривання) середньої та довгої тривалості. Події, які відповідають стану C_2 , не досягають закритого стану за умови використання фільтру 5 кГц та частоти дискретизації 20 кГц, а події, які відповідають стану C_3 – це добре помітні тривалі закривання на негативних потенціалах.

3.2.3. Справжня та видима амплітуда струму LCC-каналів

Попередні дослідження показали, що амплітуда струму для певних іонних каналів може змінюватися нелінійно при впливі великих потенціалів (більше 100 мВ), ймовірно, по причині обмеженої дифузії іонів із зовнішнього розчину до вестибюлю іонного каналу [61, 285, 286]. За допомогою методу β -розподілу було показано, що зменшення амплітуди струму при великих потенціалах пов'язане із швидкістю проникнення іонів калію через селективний фільтр каналу. Так як збільшення потенціалу збільшує швидкість проходження іонів, то це може призводити до зменшення концентрації проникаючих іонів у вестибюлі іонного каналу і, як наслідок, виникають настільки швидкі події, які реєструюча система при оптимальній доступній роздільній здатності не ідентифікує в повній мірі, таким чином ці події призводять до зменшення видимої амплітуди струму.

Активність LCC-каналів потенціал-залежна і досягає максимуму при дії позитивних потенціалів, починаючи з $+40$ мВ. Це значить, що на великих позитивних потенціалах ймовірність каналів постійно знаходиться у відкритому стані практично стовідсоткова (Рис. 3.23).

За допомогою методу аналізу β -розподілу та з використанням вибраної моделі Маркова було перевірено чи відрізняється справжня та видима амплітуда струму LCC-каналів, і чи це залежить від потенціалу на мембрані ядра в межах від -80 до $+80$ мВ. Результати вказують на незначні відхилення справжньої амплітуди струму від видимої (Рис. 3.31) в цьому діапазоні потенціалів.. Також було встановлено справжню амплітуду струму підрівня, який зустрічається на позитивних потенціалах.

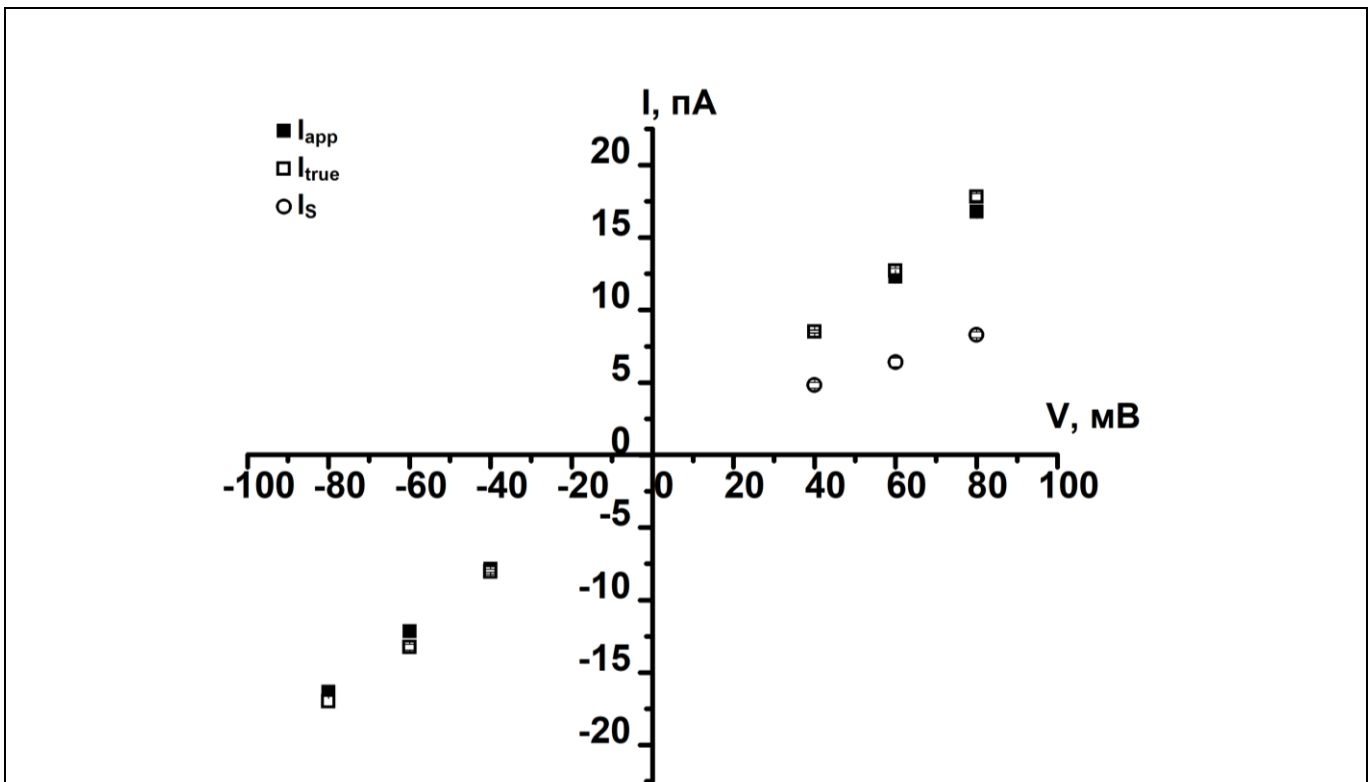


Рис. 3.31. Вольт-амперна характеристика LCC-каналів. Чорним кольором на графіку показано видиму амплітуду струму, визначену як різницю амплітуди струму між рівнями провідності іонного каналу за допомогою курсорів у Clampfit. Справжню амплітуду було визначено в результаті аналізу β -розподілу ($n=4-5$).

3.3. Механізм впливу галламіну

В процесі пошуку блокаторів було показано, що галламін впливає на LCC-канали з боку нуклеоплазми. З протилежного боку мембрани, що відповідає перинуклеарному простору, галламін в концентрації 100 мкМ не виявив ніякого впливу на кінетику LCC-каналів ($n=2$), що вказує на відсутність доступного сайту зв'язування.

Аплікація галламіна з боку нуклеоплазми викликає сильний flicker-блок. Для аналізу механізму дії галламіна ми попередньо встановили модель Маркова для LCC-каналів. Для того, щоб визначити параметри швидкого блокування було використано аналіз β -розподілу. Аналіз амплітудних гістограм почали з припущення класичного порового блокування, що передбачає наявність в моделі Маркова стану блокування, який зв'язаний з відкритим станом (Рис. 3.32).

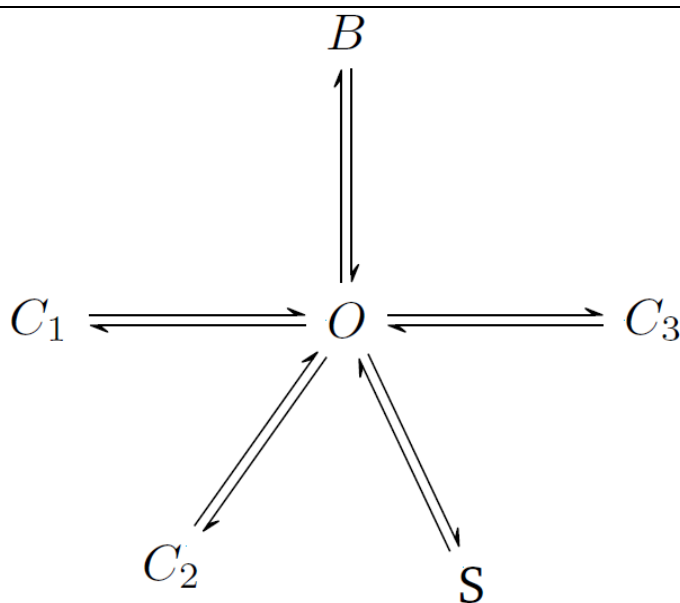


Рис. 3.32. Модель Маркова для опису блокування галламіном LCC-каналів. Модель передбачає механізм класичного блокування пори іонного каналу, при якому блокований канал не може закритися до того часу, поки блокатор не від'єднається.

Аналіз β -розподілу амплітудних гістограм, отриманих при наявності галламіну показав, що модель адекватно описує експериментальні дані у великому діапазоні потенціалів та концентрацій. Дія галламіну була перевірена в концентраціях 10 мкМ, 100 мкМ та 1 мМ з боку нуклеоплазми. Були підібрані константи асоціації та дисоціації для впливу галламіна при різних концентраціях та потенціалах. На Рис. 3.33 показано приклад підбору теоретичної амплітудної гістограми для впливу галламіну в концентрації 1 мМ при мембранному потенціалі +40 мВ. В процесі підбору була використана модель Маркова для LCC-каналів, в якій стан блокатор був зв'язаний з відкритим станом каналу (Рис. 3.32).

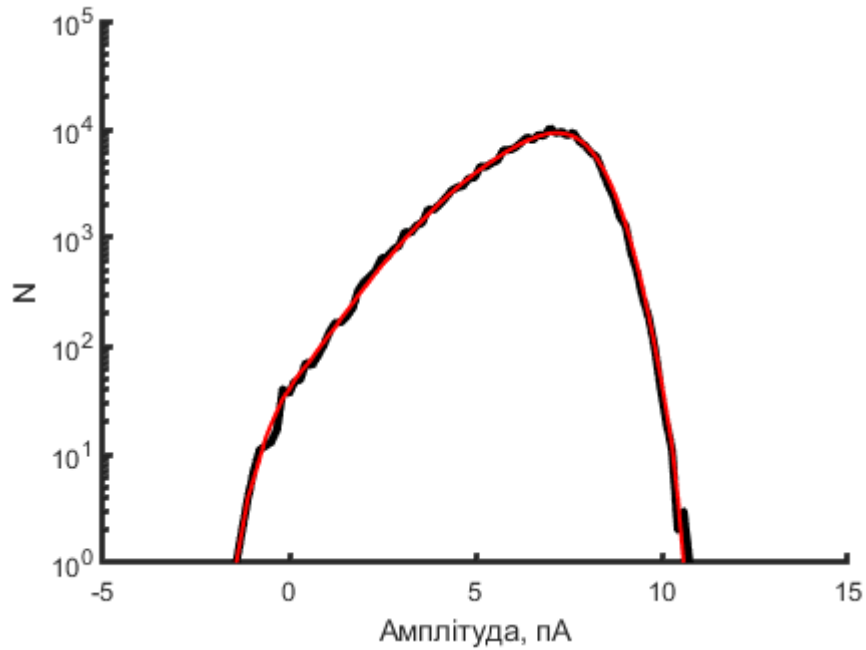


Рис. 3.33. Накладання теоретичної кривої амплітудної гистограми на експериментальну в результаті аналізу β -розподілу при дії концентрації 1 мМ галламіну при мембранному потенціалі +40 мВ. Швидке блокування галламіном викликає сильне зменшення амплітуди струму внаслідок збільшення шуму відкритого стану. Теоретична крива (червоного кольору) була підібрана з константами асоціації $k_{on}=10623 \text{ c}^{-1}$ та дисоціації $k_{off}=51943 \text{ c}^{-1}$.

На Рис. 3.34 показано концентраційну залежність констант асоціації та дисоціації. Константи дисоціації для фіксованого потенціалу практично не змінювалися зі зміною концентрації, а константи асоціацій були пропорційними до концентрації блокатора. Рівноважні константи дисоціації для фіксованого потенціалу рахували в точці перетину кривих k_{on} та k_{off} .

За формулою (2.9) для експериментальних рівноважних констант дисоціації була підібрана залежність у вигляді функції потенціалу з параметрами $K_d(0)=390$ мкМ та $z\delta=0.922$ (Рис. 3.35).

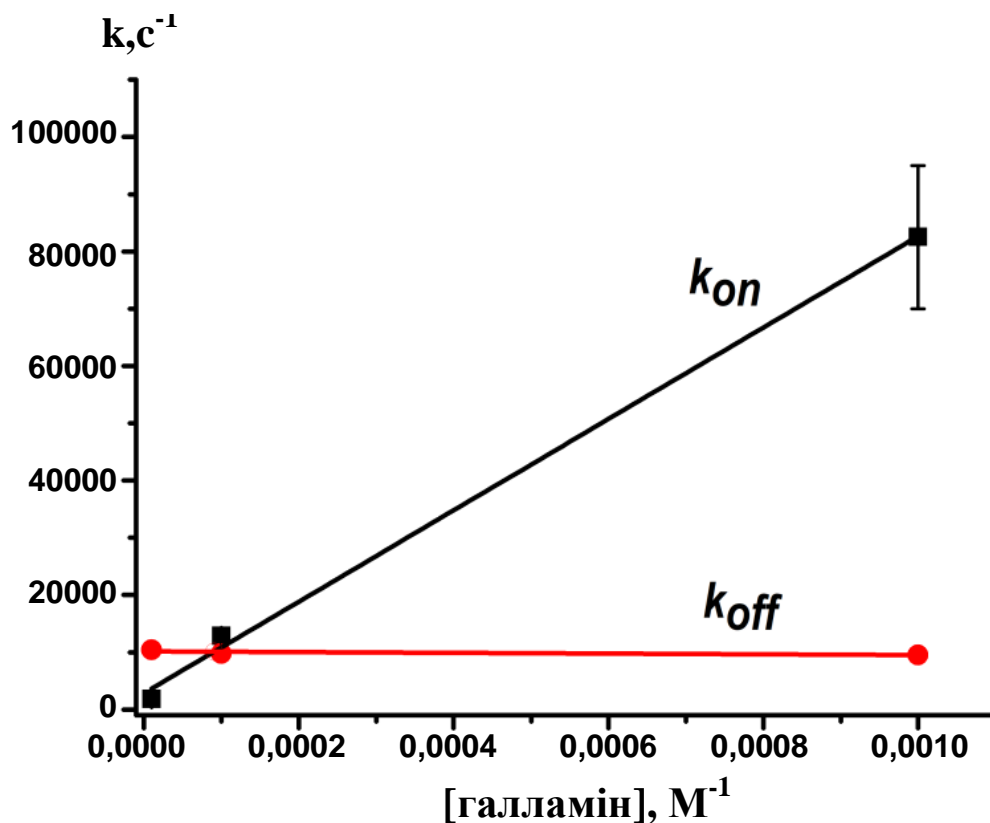


Рис. 3.34. Концентраційна залежність констант швидкостей асоціації (k_{on}) та дисоціації (k_{off}) галламіна при фіксованому потенціалі -40 мВ. Значення констант відображені у вигляді середнього значення та стандартної помилки середнього значення ($n=4$). Результати лінійної апроксимації для наступних значень $k_{ON}=1,13 \times 10^8 \pm 0,21 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$, $k_{off}=10158 \pm 303 s^{-1}$. При фіксованому потенціалі -40 мВ рівноважна константа дисоціації K_d (точка, в якій $k_{on}=k_{off}$) становила 90 мкМ.

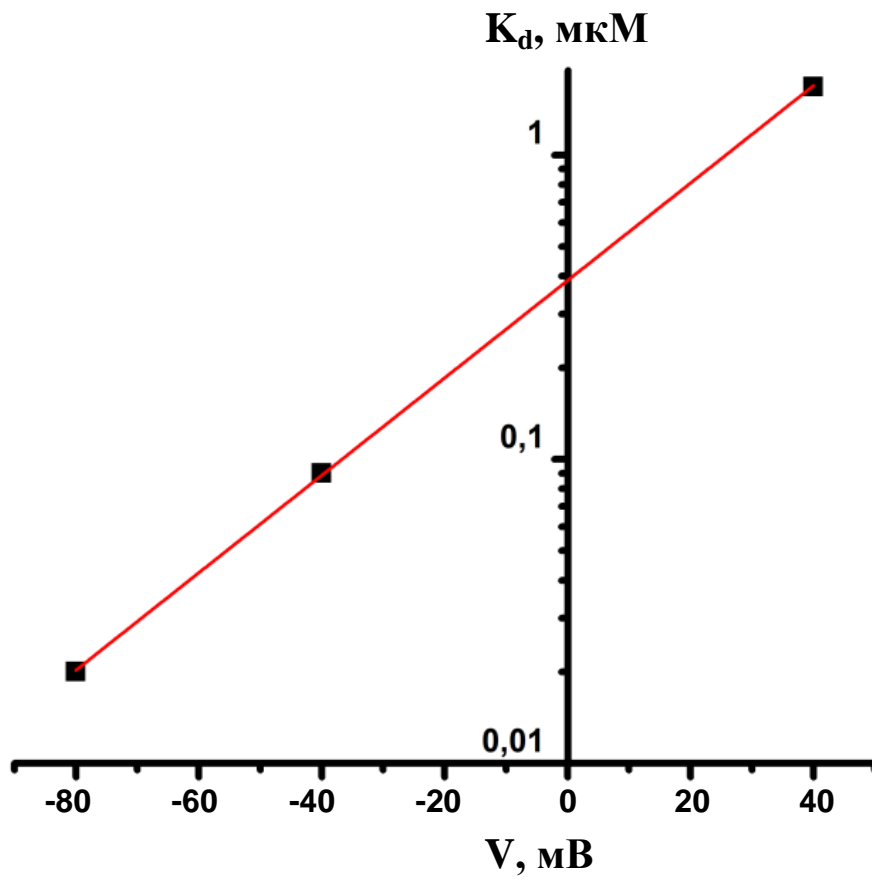


Рис. 3.35. Рівноважна константа дисоціації (Б) визначена як функція потенціалу за формулою (2.9). Розраховані значення параметрів $K_d(0)=390 \mu\text{M}$ та $z\delta=0,922$.

РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

LCC-канали вперше були описані більше 15 років тому, але досі їхня фізіологічна роль залишається невідомою. Тому пошук ефективних блокаторів таких каналів є виключно актуальним. Вирішення цього питання дозволить визначити амінокислотну послідовність та структурні особливості цих іонних каналів. Ефективність блокаторів у якості фармакологічних інструментів для встановлення фізіологічної ролі була продемонстрована для низки інших іонних каналів у ядерній оболонці, таких як калієві канали, ВК-канали та хлорні канали [114, 120, 287]. Проте на момент початку цієї роботи не було відомо жодного блокатора для LCC-каналів. Таким чином, основною метою було протестувати різні хімічні сполуки в якості блокатора. В результаті було знайдено перший блокатор – dTC. Подальші дослідження, проведені в цій дисертаційній роботі, виявили вплив різних діючих речовин та дозволили встановити інші швидкі та повільні блокатори LCC-каналів.

4.1. Модель Маркова LCC-каналів

4.1.1. Доцільність використання методу аналізу β -розподілу

Яскравим прикладом, який свідчить про важливість аналізу швидких подій, є випадки, коли провідність іонного каналу невелика, а SNR мале. Кінетика каналу залишається “прихована” за шумом, через що складно відрізнити які події відносяться до активності каналу, а які – до шуму експериментальної установки. В таких випадках ймовірність втратити швидкі події неминуча, що буде ускладнювати подальший аналіз або, навпаки, можна помилково врахувати шум установки як події, що належать каналу. Як в першому, так і в другому випадку це призводить до хибної інтерпретації результатів. Це стосується не тільки каналів з малою амплітудою струму, але і каналів з досить великою провідністю, такі як LCC-канали. Це важливо, оскільки швидкі події пов’язані з конформаційними станами, які відповідають структурним змінам каналу. У випадку з іонними каналами, в реєстраціях яких значення SNR мале, взагалі неможливо створити кінетичну модель

без спеціальних методів аналізу, яку би можна було надалі ефективно використовувати для вирішення різних задач. Для іонних каналів, які велику провідність, а шум реєструючої системи відносно незначний, то є можливість проаналізувати іонні струми і створити кінетичну модель. Питання полягає в тому, наскільки будуть коректними такі моделі і у яких випадках можуть бути застосовані.

На перший погляд високі вимоги до точності аналізу можуть здаватися надмірними та занадто часозатратними. Проте, коли це стосується мети дослідження, то деталі можуть стати основою для вирішення конкретних задач. Так, дослідження структурно-функціонального зв'язку іонного каналу можна розглянути як з точки зору біофізики, так і фізіології. Біофізика – наука про найбільш прості та фундаментальні взаємодії, які лежать в основі біологічних процесів; вивчає живу природу через фізичні та фізико-хімічні явища. Фізіологія – наука про процеси діяльності окремих клітин, органів і в цілому всього організму. У фізіології акцент виставлено на процес функціонування, а в біофізиці на механізм взаємодії. Тому іонні канали з одного боку можна досліджувати для того, щоб прослідкувати до якого сигнального шляху вони залучені та як їх регуляція впливає на організм в цілому, а з другого боку – для того, щоб дослідити властивості самого іонного каналу, охарактеризувати його кінетичні параметри, що важливо для розуміння міжмолекулярної взаємодії та є фундаментом для фармакології та медицини, а отже для покращення та порятунку людського життя.

Аналіз струмів поодиноких каналів на основі β -розподілу – це досить тонкий та чутливий метод, що дозволяє визначити дуже короткотривалі коливання струму, які відбуваються в часових проміжках порядку декількох мікросекунд, що надає можливість описати конформаційні стани каналу, які недоступні для аналізу з використанням інших аналітичних підходів. При цьому, у випадку аналізу LSC-каналів була би втрачена інформація як мінімум про два конформаційні стани кінетичної моделі цих каналів, а саме: 1) стан, тривалість якого приблизно 2 мкс (C_1) та 2) швидкий підрівень (S), який можна визначити лише при позитивних значеннях потенціалу. Ці стани, порівняно зі станом C_3 , тривалість якого складає порядку декількох секунд за умов позитивних потенціалів, мають відносно невеликий внесок

у загальну активність LCC-каналів, але кожному із них відповідає конкретна структура з певною амінокислотною послідовністю, яка може містити сайти зв'язування для різних фармакологічних сполук. Ігнорувати швидкі події в реєстрації поодиноких каналів – значить ігнорувати структуру каналу. Навіщо потрібно знати структуру каналу, мабуть, найбільш промовисто може пояснити вручення Нобелівської премії Родеріку Маккінону та Пітеру Егеру в 2003 році “за відкриття, пов'язані з іонними каналами в клітинних мембранах: за вивчення структури і механізму дії іонних каналів”. Це відкриття стало можливим завдяки чисельним попереднім роботам в області електрофізіології, а також корисним для подальших досліджень в фізіології та медицині. Таким чином, важливо розуміти експериментальні цілі і мету дослідження. Окрім фундаментального значення, відомості про структуру каналів можуть бути важливі для синтезу молекул в процесі скринінгу сполуки з найбільшою афінністю до певного типу іонного каналу.

Детальне дослідження кінетики LCC-каналів на внутрішній мембрані ядер Пуркіньє з використанням методу β -розподілу дозволило створити кінетичну модель, в якій виявилось п'ять станів: один відкритий, три закритих і один підрівень. Це мінімальна кількість станів, яка дозволяє створити адекватну модель, яка описує основні рівні провідності. Важливе місце в цій моделі відводиться швидким подіям, які знаходяться за межами пропускної здатності реєструючої системи, та вказують на існування дуже коротких в часовому вимірі конформаційних змін іонного каналу. Таким чином, їх характеристика має велике значення для інтерпретації структурно-функціональних зв'язків LCC-каналів та їх кінетики.

За умови впливу негативних потенціалів візуально спостерігаються як мінімум 2 класи подій: довгі закривання тривалістю від декількох секунд до десятків секунд та короткі закривання, які добре помітні всередині відкритого стану. В той час, як довгі події притаманні реєстраціям іонних каналів в основному при негативних потенціалах, швидкі події присутні при дії всього діапазону трансмембранного потенціалів.

Оцінка внеску швидких подій показала, що їх наявність зменшує загальне значення P_o . Розрахунки проведені в цій роботі свідчать, що при фіксації трансмембранного потенціалу -40 мВ за відсутності швидких подій іонний канал перебував би на 7% частіше у відкритому стані. Також на сумарну активність іонних каналів додатково можуть впливати інші події, які не були включені до аналізу, а саме підрівні різної амплітуди, різної тривалості та неспецифічні флуктуації з різними рівнями провідності, які не можна було віднести до основних станів вибраної оптимальної кінетичної моделі, з п'ятьма станами.

Константи переходів між рівнями провідності LCC-каналів залежали від потенціалу. Зокрема, для закритого стану C1 величина константи переходу могла варіюватися від 10^5 s^{-1} до 10^6 s^{-1} . Попередні дослідження вказують на те, що такі високі значення можуть характеризувати роботу селективного фільтру [233]. Яка структура відповідає за ці події в LCC-каналів невідомо, але ймовірно, що це не пов'язано з воротами каналу. Внесок цієї найшвидшої константи в загальну кінетику LCC-каналів порівняно невеликий. Проте варто взяти до уваги, що всі переходи між станами в моделі Маркова пов'язані між собою і точне визначення всіх констант швидкості залежить від правильності визначення кожної із них. Невірно визначена константа або неврахований рівень провідності впливають на точність моделі, що призводить до подальшої невідповідності опису експериментальних даних, наприклад, при дослідженні модулюючих впливів різної природи.

В цілому, створена в даній роботі кінетична модель в результаті аналізу швидких подій, без включення повільних станів, по топології нагадує модель Маркова, яку використовують для дослідження K_{cv} каналів. Незважаючи на свою мінімальну структуру, канали K_{cv} виявляють селективність, складну спонтанну активність і можуть бути заблоковані типовими блокаторами калієвих каналів [244]. Варто зазначити, що для цього типу каналів не повідомлялося про наявність додаткових станів, таких як підрівні, на противагу отриманим нами результатам, які описують кінетику LCC-каналів. Модель Маркова K_{cv} описує всі наявні в реєстрації стани (крім тривалих закритих станів), які складаються з одного відкритого та трьох закритих станів (повільного, середнього та швидкого). У випадку LCC-каналів було

встановлено схожу топологію кінетичної моделі, проте ми були вимушені відкидати з реєстрацій ділянки, які містили різні стани провідності (в основному підрівні), які не можна віднести до жодного із станів моделі. Такі події ми назвали неспецифічними та не включали до основної кінетичної моделі. Тим не менше, події які ми не могли проаналізувати відносяться до певних структур, які вказують на те, що LCC-канали можуть мати складну будову у порівнянні з K_{CV} каналами.

4.1.2. Обмеження використання спрощеної моделі Маркова для обрахунку впливу швидких блокаторів

Вплив швидкого блокатора можна ідентифікувати за зменшенням амплітуди струму в реєстраціях поодиноких іонних каналів. Таке зменшення викликане роздільною здатністю реєструючої системи. В даній роботі для обрахунку впливу швидких блокаторів ми використовували фільтр 5 кГц та оцифровували реєстрації з частотою 20 кГц. Це значить, що ми отримували реєстрацію сигналу з інтервалом у 50 мкс. Зміна конформації іонного каналу – це певна подія, яка відображається на реєстрації струму, і щоб ідентифікувати цю подію потрібно більше ніж одна точка. Таким чином, чим більше точок ми отримуємо за певну одиницю часу, тим точніше ми можемо визначити кількість конформаційних станів, в яких перебуває іонний канал. Відомо, що флуктуації струмів поодиноких каналів містять події, тривалість яких може складати доли мікросекунд, а то й десятки наносекунд [288]. Мікросекундні події не відображаються в повній мірі навіть за умови досить високої роздільної здатності. Це яскраво продемонстровано в роботах Шрьодер та співавторів, які досліджують швидкі мікросекундні флуктуації струму, використовуючи частоту оцифровування 200 кГц [244]. Якщо асоціація та дисоціація блокатора відбувається швидше ніж 50 мкс, то у випадку роздільної здатності, яку ми використовували в цій роботі, ми не можемо ідентифікувати такі події блокування від їх початку до завершення. Буде реєструватися приблизно лише одна точка із декількох подій і в результаті спостерігатиметься зменшення видимої амплітуди струму, оскільки за 50 мкс відбувається певна кількість блокувань, протягом яких іони не проходять через канал, але самих блокувань система

реєстрації не може зафіксувати. Вплив галламіну потенціал-залежний, тому велика ймовірність, що ця молекула приєднується саме до відкритого стану LCC-каналу. Отже, для кількісного опису цього блокатора ми використали кінетичну модель із двома станами – відкритим і блокованим. Така модель виявилася достатньою лише за обмежених умов, а саме при дії великих концентрацій галламіну (від 100 мкМ) та негативних потенціалах на мембрані. Це пов'язано з тим, що кінетика LCC-каналів також включає швидкі конформаційні стани (швидкі закривання). Якщо швидкі блокуючі стани, викликані галламіном виникають настільки часто, що ми не спостерігаємо переходів у інші стани так, що наявністю цих станів можна знехтувати, то використовуючи таку модель можна зробити попередню оцінку впливу цього блокатора. Проте, при умові дії галламіну в менших концентраціях асоціація із сайтом зв'язування відбувається рідше ніж частота виникнення швидких закривань, таким чином відбувається реєстрація переходів іонного каналу в інші стани, крім відкритого та блокованого. Отже, без окремої оцінки тривалості швидких закритих станів та визначення їх констант швидкості неможливо обрахувати $K_d(0)$ та встановити механізм дії галламіну.

4.1.3. Залежність тривалості кінетичних станів LCC-каналів від трансмембранного потенціалу

Таблиця 4.1 містить оцінку середньої тривалості (τ) та частоти подій, які відносяться до різних станів LCC-каналів, для найбільших рівнів позитивного потенціалу (+80 мВ) та негативного потенціалу (−80 мВ), які були використані в цій роботі. Оцінку значень для інших потенціалів можна легко вирахувати з графіків поданих на Рис. 3.29 та Рис. 3.30. Прослідковується чітка тенденція до скорочення тривалості життя усіх встановлених станів зі зміною трансмембранного потенціалу в сторону більш негативної поляризації.

Отримані результати свідчать, що швидкий стан C_1 характеризується дуже коротким часом тривалості у порівнянні з роздільною здатністю (50 мкс) застосованої системи реєстрації. Середній стан C_2 також має занадто короткий час життя для того, щоб бути адекватно відображеним у петч-клемп реєстраціях.

Відповідно до параметрів фільтру та оцифрування, які використовувалися в даній дисертаційній роботі, для того, щоб перехід між станами повністю був відображеним у реєстрації, подія мусить мати тривалість як мінімум у 4 рази довшою за час оцифрування, що становить 200 мкс. Таким чином, і стан C_1 , і стан C_2 генерують шум в реєстраціях поодиноких каналів і визначають форму амплітудної гістограми між двома рівнями провідності (закритого і відкритого стану). Стан C_3 відповідає за “фізіологічну” функцію іонного каналу, оскільки повністю визначає активність (P_o) LCC-каналів. Це дає нам підстави зробити припущення, що найповільніший стан відноситься до структури іонного каналу, яка виконує функцію воріт. Якщо припущення вірне, то рух частини структури іонного каналу, яка відповідає за ворітний механізм, досить інтенсивний в умовах великих значень позитивного потенціалу.

Таблиця 4.1

Стан кінетичної моделі	Позитивні потенціали (+80 мВ)		Негативні потенціали (-80 мВ)	
	Частота виникнення подій	τ	Частота виникнення подій	τ
O (швидкий відкритий)	часто	25 мкс	часто	104 мкс
C_1 (швидкий закритий)	дуже часто	1,4 мкс	дуже часто	3,3 мкс
C_2 (середній закритий)	часто	20 мкс	рідко	111 мкс
C_3 (повільний закритий)	дуже рідко	119 мкс	дуже рідко	неможливо ідентифікувати/ 5,56 с (-40 мВ)
S (швидкий підрівень)	часто	105 мкс	неможливо ідентифікувати	неможливо ідентифікувати

Викликає інтерес можлива роль структур, які відповідають за наявність станів C_1 , та C_2 у встановленій адекватній кінетичній моделі. У попередній роботі було показано, що мутація амінокислоти Ser42, яка відповідає за регуляцію гнучкості

селективного фільтра у бактеріальних калієвих каналів K_{cv} , призводить до зміни залежності швидкості переходу до основного відкритого стану від середнього закритого стану, який характеризується часом життя приблизно 100 мкс [244] у діапазоні потенціалів від -160 мВ до +160 мВ. Для LCC-каналів такої тривалості перебування відповідає стан C_2 у встановленій в цій роботі адекватній кінетичній моделі, оскільки для стану C_1 такий час на 2-3 порядки менший. Проте підтвердження або спростування цієї гіпотези можливе лише з використанням молекулярних методів та лише після того, як вдасться встановити молекулярну ідентичність LCC-каналів.

4.1.4. Потенціал-залежний підрівень провідності

LCC-канали містять чисельні підрівні, які значно відрізняються між собою як по тривалості, так і по амплітуді струму. Цікавою особливістю LCC-каналів є виникнення часто повторюваного підрівня на позитивних потенціалах. Його наявність була досить несподіваною, оскільки на позитивних потенціалах розподіл подій початково, при візуальному аналізі, виглядав однорідним. Кінетична поведінка багатьох каналів включає різні стани підпровідності [289]. Можливі пояснення підрівнів, пов'язаної з конформаційними переходами, що впливають на шлях проведення іонів – це переміщення субодиниць каналу у відповідь на дію потенціалу під час активації та деактивації каналів або зв'язування лігандів [245, 290]. Деякі підрівні LCC-каналів дуже короткі, а інші тривають кілька мілісекунд. Для каналів ядерної оболонки наявність підрівнів було описано на пронуклеусах миші та ядер печінки [55]. K^+ -селективний канал з провідністю 200 пС на мембрані ядра пронуклеусів знаходився у повністю відкритому стані лише 10% від загального часу запису. Гістограма амплітуди струму показала два чітко відокремлених піки: один належав до стану максимальної провідності, а інший вважається підрівнем з провідністю приблизно 55 пС. Інші підрівні цих ядерних каналів траплялися рідко, тому їх не можна було відрізнити на амплітудних гістограмах. Також повідомлялося про підрівень каналу, зареєстрованого на біліпідних шарах, отриманого з везикул ER з провідністю приблизно 60% від основного рівня струму [291]. Найбільш

поширений підрівень LCC-каналів дуже короткий по тривалості і може бути охарактеризований як швидкі події, що не досягають повного рівня провідності, з амплітудою приблизно 50% від основного рівня струму, але аналіз амплітудної гістограми, з використанням методу аналізу β -розподілу, чітко показав наявність підрівню на позитивних потенціалах (Рис. 3.26). Загальна тривалість цього підрівню становить дуже малу частку від загальної активності відкритого стану. В нашому випадку, основний рівень провідності LCC-каналів є переважаючим порівняно з каналами ядерної мембрани, описаними на пронуклеусі. Виражена залежність від потенціалу вказує на те, що такий тип підрівня стає дуже рідкісним на негативних потенціалах, і тому його не можна розрізнити на амплітудній гістограмі. При менш виражених негативних потенціалах мембрани ніж -40 мВ співвідношення сигналу до шуму занадто низьке для виявлення та характеристики будь-яких подій LCC-каналів. Інші підрівні з різними амплітудами та тривалістю були рідкісними явищами та недостатніми для включення в аналіз. Деякі підрівні LCC-каналів з'явилися перед відкриванням та закриванням каналу, схоже до того, як це було описано для подібних підрівнів ВК каналів [245].

У деяких випадках події, схожі на підрівень, можуть з'являтися як наслідок недостатньої роздільної здатності. Це швидкі події, виникнення яких є наслідком спотворення сигналу, але за допомогою моделювання було визначено, що вони, насправді, відповідають повністю закритому стану [238]. Наприклад, передбачалося, що всі стани, які викликають ефекти мерехтіння, описані для рецепторів ацетилхоліну, можуть бути визначені як закриті стани з недостатньою роздільною здатністю [292], а не підрівні. Підрівень LCC-каналів, який присутній на позитивних потенціалах, створює пік на амплітудній гістограмі, який можна відокремити від плато, що утворене подіями інших станів. Таким чином, використання аналізу β -розподілу виключає врахування помилкового підрівню, який насправді може бути повністю закритим станом, що спотворений системою реєстрації, оскільки такі підрівні мають зовсім іншу справжню амплітуду струму, яка абсолютно відрізняється від амплітуди інших станів провідності в моделі Маркова.

У більшості досліджень для виявлення підрівню використовуються різні методи, засновані на виявленні порогових подій. Наприклад, Шрьодер та ін. використовували детектор Хінклі для визначення розподілу підрівнів [293]. В цій роботі не було використано пороговий детектор або додатковий алгоритм для оцінки підрівню. До початку аналізу ми не мали ніякого уявлення про те, що серед подій з високою швидкістю на позитивних потенціалах насправді може бути стан підпровідності. Розрізнення між швидкими закриваннями та швидким підрівнем не є очевидним при початковому попередньому аналізі репрезентативних реєстрацій і його виявлення вимагає уважного аналізу даних [245]. Після багаторазового повторного аналізу амплітудних гістограм LCC-каналів при позитивних потенціалах з використанням різних констант швидкості для побудови моделі Маркова не було збігу експериментальної та теоретичної амплітудної гістограми, що призвело до припущення, що певні події можуть бути викликані якимось іншим конформаційним станом, який має іншу амплітуду ніж повністю закритий та відкритий рівні провідності. Після цього припущення було внесено значення для підрівню, визначеного за допомогою ітераційного методу. Лише у цьому випадку був найкращий збіг теоретичної та експериментальної гістограми, що підтверджувало попередню гіпотезу про наявність підрівня. В результаті було встановлено, що певна ділянка амплітудної гістограми, яка знаходиться після піку відкритого стану, генерується за рахунок амплітуди струму, що відповідає підрівню (Рис. 3.26).

Очевидно, що цей підрівень визначає ще один стан конформації LCC-каналу так само, як і інші стани в моделі Маркова. Виникає питання, до яких структур іонного каналу належать конформаційні зміни, які спричинили підрівні LCC-каналів? Для пояснення цього явища в інших типів каналів було запропоновано різні гіпотези, включаючи багатопорову структуру іонного каналу [294, 295], що пізніше було підтверджено для CLC (двопорові хлоридні канали) [296]. Наявність підрівнів іонних каналів не є необхідним показником того, що один іонний канал має більше ніж одну пору [297]. LCC-канали більшу частину часу переходять між повністю відкритим та закритим станами з провідністю приблизно 200 пС і переходять до

підрівнів на позитивних потенціалах менше ніж в 10% від загального часу, тому малоймовірно, що вони проводять іони як двопорові іонні канали з сімейства CLC. Таким чином, можна припустити, що найпоширеніший підрівень LCC-каналів індукований якимось іншим фактором. Було висловлено гіпотезу, що підрівні, виявлені в калієвому каналі (Kv2.1), залежать від конформаційних змін із залученням однієї або двох субодиниць замість 4 субодиниць одночасно, як це було передбачено раніше класичною теорією, представленою Ходжкіним та Хакслі [298], внаслідок чого змінюється шлях проникнення іонів, що призводить до зменшення повного рівня провідності до стану підпровідності [299]. Пізніше було чітко продемонстровано, що механізм появи підрівню залежить від конформації пори. У цьому випадку іони проходять на рівнях підпровідності при потенціалах, коли високі порогові субодиниці не були активовані, а канал досягає максимального відкритого рівня лише тоді, коли всі чотири субодиниці активуються, що сприяє найбільш стабільній конформації каналу. Крім того, мутації у VSD каналоутворюючого комплексу ІК-каналів показали, що поява підрівнів відповідає активації менше 4-х субодиниць каналу [300]. Цілком можливо, що різні підрівні LCC-каналів можуть з'являтися внаслідок різних змін конформації, включаючи глобальні зміни такі як рух субодиниць, так само, як і менш істотні зміни у фільтрі селективності.

Таким чином, модель Маркова, створена на основі аналізу β -розподілу, надає можливість інтерпретації структурних змін LCC-каналів, що відбуваються внаслідок модуляції трансмембранним потенціалом. Яскравим прикладом цього є стан підпровідності, який проявляється на позитивних потенціалах, в той час як при дії негативних потенціалів зустрічається настільки рідко, що його наявність неможливо ідентифікувати. Це може вказувати на особливість структури LCC-каналів, яка включає компонент, що впливає на рух іонів в залежності від заданого мембранного потенціалу та викликає виникнення неповного рівня провідності.

4.2. Модуляція LCC-каналів швидкими та повільними блокаторами

Було показано, що модуляція LCC-каналів може здійснюватися шляхом блокування сполуками, які по-різному впливають на кінетику каналів, викликаючи швидке та повільне блокування.

Перш за все, швидкі блокатори характеризуються зменшенням провідності каналів, що можна визначити за допомогою амплітудної гістограми, які відображають "видиму" амплітуду струму, яка зменшується внаслідок обробки аналогового сигналу цифровим перетворювачем. Відповідно, роздільна здатність напряму залежить від фільтру та оцифрування сигналу, що надходить від підсилювача. Натомість, повільними блокаторами вважаються такі, що збільшують тривалість перебування поодиноких каналів у стані з нульовою провідністю [61] і таким чином вплив низької роздільної здатності в цьому випадку може бути менш суттєвим. Як швидкі, так і повільні блокатори можуть мати різні механізми дії. Позитивно заряджений блокатор притягується негативним зарядом на мембрані, потрапляючи в поле дії потенціалу в порі іонного каналу, таким чином, перешкоджаючи руху іонів до яких селективний даний тип каналу.

У досліджених екстрактах отрут містилися компоненти, які викликали як швидке так і повільне блокування. Найбільш однорідним видавався вплив отрути скорпіона *H. Laoticus* (Рис. 3.2), оскільки в результаті його дії виникало виключно швидке блокування. В отруті міститься суміш компонентів, які можуть зовсім по-різному впливати на LCC-канали і мати різну афінність. Можна припустити, що в цій отруті міститься компонент, який: а) єдиний з усіх інших впливає на провідність LCC-каналів; б) має найбільшу афінність серед усіх інших, так що зв'язуючись з каналом перебиває можливий вплив всіх інших компонентів. Натомість отрути кобри та крайта ймовірно містили декілька компонентів, які по-різному впливали на LCC-канали. Отрута кобри (Рис. 3.4) сильно зменшувала P_o , викликаючи виникнення дуже тривалих блокованих станів. В той же час, відкритий стан переривався швидкими подіями блокування, створюючи ефект flicker-блоку, але при цьому пікова амплітуда струму змінювалася менше у порівнянні з впливом інших отрут (Таблиця 3.1). Отрута крайта (Рис. 3.3) викликала вплив, схожий на повільне

блокування, але при цьому одночасно зменшувалася амплітуда струму. Цікаво, що таке зменшення амплітуди не супроводжувалося flicker-блоком, тобто не виникало видимих швидких переходів між закритим та блокованим станом, але частково супроводжувалося збільшенням шуму відкритого стану, що може значить, що певний компонент отрути впливав із більшою швидкістю константи асоціації та високою швидкістю дисоціації у порівнянні з іншими. Ці спостереження вказують на те, що в отрутах скорпіона, кобри та крайта присутні компоненти, які викликають швидке блокування LCC-каналів, але діють з різними кінетичними характеристиками. Додатково в отрутах кобри та крайта можуть міститися компоненти, які викликають повільне блокування. Отрути двох гадюк були малоефективні, оскільки вплив їх компонентів можна прирівняти до механізму екранування, який, в даному випадку, може нагадувати швидке блокування.

Оскільки окремі компоненти з цілісних отрут не виділені, то опис їх впливу може слугувати лише попередньою оцінкою для подальшої роботи по визначенню високоафінного блокатора для LCC-каналів.

Іони гадолінію, галламін та тубокурарин мають визначену молекулярну масу і для них може бути обчислена рівноважна константа дисоціації для характеристики бімолекулярної взаємодії. Ці сполуки виявляли ознаки порових блокаторів, але мали різну афінність. Вплив галламіну починав розвиватися при менших концентраціях у порівнянні з іншими, а також виявляв яскраво-виражений flicker-блок, тому видавався найбільш цікавим як приклад аналізу швидких подій.

В даній роботі було встановлено, що галламін виявляє flicker-блок з високими значеннями константи асоціації та дисоціації. Аналіз блокування був проведений із застосування встановленої моделі LCC-каналів із додаванням блокованого стану. Це дало можливість досить точно визначити фармакокінетичні параметри блокування. Оскільки константа асоціації набагато вища ніж константи переходу від відкритого стану до закритих станів із середньою та повільною швидкістю переходів (C_2 і C_3), то при великих константах асоціації канал достатньо часто перебуває в блокованому стані і набагато рідше перебуває в закритих станах C_2 і C_3 . Теоретичні криві амплітудних гістограм з підібраними константами асоціації та дисоціації дуже добре

накладається на експериментальні точки амплітудних гістограм та відповідають мінімальному значенню суми похибки (Рис. 3.33). Це свідчить про те, що вибрана модель чітко описує механізм блокування з додаванням одного стану блокування. Такий механізм впливу вказує, що галламін є класичним поровим блокатором та приєднується до відкритої пори LCC-каналу, таким чином канал не може перейти в звичайні конформаційні закриті стани, поки галламін не від'єднається. Враховуючи розмір молекули галламіна, можна припустити, що пора LCC-каналу з боку нуклеоплазми має достатньо великий розмір за умови, що молекула галламіну повністю проникає в канал.

Значення $z\delta$ для галламіну складає 0,922. Це порівняно велике значення, яке вказує, що вплив галламіну досить чутливий до зміни мембранного потенціалу. Оскільки заряд галламіну $3+$, то із збільшенням негативного потенціалу молекула сильніше притягується до мембрани, а зі збільшенням позитивного потенціалу сильніше відштовхується. В даній роботі було встановлено, що величина рівноважної константи дисоціації ($K_d(0)$) галламіну відносно велика (390 мкМ), проте завдяки високій чутливості до дії потенціалу константа дисоціації при потенціалах менше -80 мВ стає меншою за 10 мкМ.

Галламін виявився найбільш потентним блокатором з усіх речовин, ефективність яких була доведена в цій роботі. Разом з dTC ця сполука відноситься до ряду недеполяризуючих агентів ацетил-холінових рецепторів. Для nAChR кінцевої пластини скелетних м'язів галламін, як і тубокурарин, може впливати як конкурентний антагоніст так і поровий блокатор [274, 301]. Для LCC-каналів галламін виявляє потенціал-залежне блокування пори, яке розвивається із збільшенням концентрації, а константа дисоціації блокатора не залежить від концентрації, що вказує на відсутність інших сайтів зв'язування. Відомо, що електричне поле розподіляється вздовж іонного каналу нерівномірно. Це означає, що електрична дистанція блокування лише приблизно свідчить про локацію сайту зв'язування для блокатора. Тим не менше, наявність ефекту галламіну при +80 мВ з великою ймовірністю вказує на те, що він неглибоко проникає в пору LCC-каналу, у

порівнянні з гадолінієм, який не впливає в аналогічній концентрації при потенціалі +40 мВ.

Як галламін, так і dTC мають велику кількість мішеней в організмі. Крім ацетил-холінових рецепторів dTC впливає в різних концентраціях на велику кількість іонних каналів та рецепторів, які мають зовсім різну структуру, що не дивно, беручи до уваги, що це алкалоїд, який зазнавав зміни природним шляхом протягом еволюції, з метою вражати як можна більше мішеней в організмі живих істот. Синтетичний галламін має простішу структуру і впливає на меншу кількість мішеней у порівнянні з dTC (за відомостями на 2019 рік). Галламін ефективно блокує малі кальцій-активовані калієві канали з IC_{50} від 3 до 98 мкМ в залежності від підтипу [302, 303], а також глутамат-активовані синаптичні канали в концентрації до 5 мкМ [304]. $K_d(0)$ галламіну для LCC-каналів становить 390 мкМ, відповідно, галламін має порівняно меншу спорідненість до LCC-каналів ніж до вищезазначених каналів, що може свідчити про відмінності в структурі цих каналів, за умови більш детального порівняння механізму блокування, як це було зроблено, наприклад, для впливу dTC на BK та $K_{v1.3}$ канали [305].

Отже, коротко підсумовуючи, можна заключити, що LCC-канали мають складну кінетичну поведінку. Основна модель складається з 5 станів: один відкритий, один підрівень і три закритих. Крім основних станів кінетика LCC-каналів включає велику кількість інших станів провідності, які дуже відрізняються між собою. Створити адекватну модель Маркова вдалося за допомогою використання аналізу β -розподілу, який дозволяє оцінити константи швидкостей переходів, частота виникнення яких набагато більша за частоту реєструючої системи. Ефективність застосування цього потужного аналітичного методу була продемонстрована на прикладі швидкого блокування LCC-каналів галламіном. Модель Маркова передбачає, що галламін – класичний поровий блокатор для LCC-каналів, який проявляє чітку залежність константи асоціації від концентрації та має яскраво виражений потенціал-залежний ефект. Також, в цій роботі в результаті скринінгу було вперше виявлено декілька інших потентних блокаторів, а саме тубокурарин та гадоліній, які по-різному модулюють кінетику LCC-каналів.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено перший блокатор для LCC-каналів – тубокурарин. Виявлено, що іони гадолінію та галламін також є потентними блокаторами.
2. Визначено, що тубокурарин та галламін мають характеристики швидких блокаторів та проявляють залежність від мембранного потенціалу.
3. Показано, що спрощена кінетична модель, яка складається з двох станів – одного відкритого та одного блокованого – придатна для адекватної оцінки фармакокінетичних характеристик бімолекулярної взаємодії між іонним каналом та блокатором лише за умови високих значень константи асоціації. У випадку впливу галламіну на LCC-канали з нуклеоплазматичного боку ці умови задовольняються при високих концентраціях блокатора та негативних потенціалах фіксованого мембранного потенціалу.
4. Вперше створено кінетичну модель Маркова для LCC-каналів, яка адекватно описує флуктуації провідності струму через канали. Основна топологія моделі складається з одного відкритого стану, одного підрівня та трьох закритих станів. Модель передбачає, що переходи між основними закритими станами та підрівнем відбуваються тільки через відкритий стан. Встановлено залежність кінетичних параметрів переходу від закритих станів і підрівня до відкритого стану та в зворотному напрямку.
5. На прикладі галламіну охарактеризовано модуляцію провідності LCC-каналів. За допомогою методу аналізу β -розподілу та з використанням створеної кінетичної моделі визначено константи асоціації та дисоціації блокування галламіном, величина яких значно перевищує частоту фільтрування реєструючої установки. Встановлено залежність рівноважної константи дисоціації для галламіну від трансмембранного потенціалу. Показано, що механізм дії галламіну має властивості класичного порового блокатора.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Hardingham GE, Chawla S, Johnson CM, Bading H. Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature*. 1997; 385:260-5.
2. Hardingham GE, Cruzalegui FH, Chawla S, Bading H. Mechanisms controlling gene expression by nuclear calcium signals. *Cell Calcium*. 1998; 23:131-4.
3. Zhang SJ, Zou M, Lu L, Lau D, Ditzel DAW, Delucinge-Vivier C, Aso Y, Descombes P, Bading H. Nuclear calcium signaling controls expression of a large gene pool: Identification of a gene program for acquired neuroprotection induced by synaptic activity. *PLoS Genet*. 2009; 5:
4. Bading H. Nuclear calcium signalling in the regulation of brain function. *Nat Rev Neurosci*. 2013; 14:593-608.
5. Gerasimenko J, Maruyama Y, Tepikin A V., Petersen OH, Gerasimenko O. Calcium signalling in and around the nuclear envelope. *Biochem Soc Trans*. 2003; 31:76-8.
6. Doyle DA. Structural changes during ion channel gating. *Trends Neurosci*. 2004; 27:298-302.
7. Magleby KL. Structural biology: Ion-channel mechanisms revealed. *Nature*. 2017; 541:33-4.
8. Mak DOD, Foskett JK. Single-channel inositol 1,4,5-trisphosphate receptor currents revealed by patch clamp of isolated *Xenopus* oocyte nuclei. *J Biol Chem*. 1994; 269:29375-8.
9. Gerasimenko O V., Gerasimenko J V., Tepikin A V., Petersen OH. ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca²⁺ from the nuclear envelope. *Cell*. 1995; 80:439-44.
10. Jang SH, Byun JK, Jeon W-I, et al. Nuclear localization and functional characteristics of voltage-gated potassium channel Kv1.3. *J Biol Chem*. 2015;

290:12547-57.

11. Chen Y, Sánchez A, Rubio ME, Kohl T, Pardo LA, Stühmer W. Functional kv10.1 channels localize to the inner nuclear membrane. *PLoS One*. 2011; 6:
12. Rousseau E, Michaud C, Lefebvre D, Proteau S, Decrouy A. Reconstitution of ionic channels from inner and outer membranes of mammalian cardiac nuclei. *Biophys J*. 1996; 70:703-14.
13. Tabares L, Mazzanti M, Clapham DE. Chloride channels in the nuclear membrane. *J Membr Biol*. 1991; 123:49-54.
14. Singh H, Stefani E, Toro L. Intracellular BKCa (iBKCa) channels. *J Physiol*. 2012; 590:5937-47.
15. Bustamante JO. Nuclear ion channels in cardiac myocytes. *Pflügers Arch Eur J Physiol*. 1992; 421:473-85.
16. Assandri R, Mazzanti M. Ionic permeability on isolated mouse liver nuclei: Influence of ATP and Ca²⁺. *J Membr Biol*. 1997; 157:301-9.
17. Maruyama Y, Shimada H, Taniguchi J. Ca(2+)-activated K(+)-channels in the nuclear envelope isolated from single pancreatic acinar cells. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 1995; 430:148-50.
18. Draguhn A, Börner G, Beckmann R, Buchner K, Heinemann U, Hucho F. Large-conductance cation channels in the envelope of nuclei from rat cerebral cortex. *J Membr Biol*. 1997; 158:159-66.
19. Yarotsky V, Dirksen RT. Monovalent cationic channel activity in the inner membrane of nuclei from skeletal muscle fibers. *Biophys J*. 2014; 107:2027-36.
20. Marchenko SM, Yarotsky V V., Kovalenko TN, Kostyuk PG, Thomas RC. Spontaneously active and InsP3-activated ion channels in cell nuclei from rat cerebellar Purkinje and granule neurones. *J Physiol*. 2005; 565:897-910.
21. Franco-Obregón A, Wang HW, Clapham DE. Distinct ion channel classes are expressed on the outer nuclear envelope of T- and B-lymphocyte cell

lines. *Biophys J*. 2000; 79:202-14.

22. Ashcroft FM. From molecule to malady. *Nature*. 2006; 440:440-7.
23. Fedorenko OA, Yarotsky V, Duzhy D, Marchenko SM. The large-conductance ion channels in the nuclear envelope of central neurons. *Pflügers Arch*. 2010; 460:1045-50.
24. Takeshima H, Venturi E, Sitsapesan R. New and notable ion-channels in the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum: do they support the process of intracellular Ca(2+) release? *J Physiol*. 2015; 593:3241-51.
25. Yamashita M, Sugioka M, Ogawa Y. Voltage- and Ca²⁺-activated potassium channels in Ca²⁺ store control Ca²⁺ release. *FEBS J*. 2006; 273:3585-97.
26. Gerasimenko O V, Gerasimenko J V, Tepikin A V., Petersen OH. Calcium transport pathways in the nucleus. *Pflugers Arch*. 1996; 432:1-6.
27. Gerace L, Foisner R. Integral membrane proteins and dynamic organization of the nuclear envelope. *Trends Cell Biol*. 1994; 4:127-31.
28. Hetzer MW. The nuclear envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010; 2:1-16.
29. Prunuske AJ, Ullman KS. The nuclear envelope: Form and reformation. *Curr Opin Cell Biol*. 2006; 18:108-16.
30. Burke B, Stewart CL. The nuclear lamins: Flexibility in function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013; 14:13-24.
31. Avedanian L, Jacques D, Bkaily G. Presence of tubular and reticular structures in the nucleus of human vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2011; 50:175-86.
32. Malhas A, Goulbourne C, Vaux DJ. The nucleoplasmic reticulum: Form and function. *Trends Cell Biol*. 2011; 21:362-73.
33. Worman HJ, Schirmer EC. Nuclear membrane diversity: Underlying tissue-specific pathologies in disease? *Curr Opin Cell Biol*. 2015; 34:101-12.
34. Östlund C, Folker ES, Choi JC, Gomes ER, Gundersen GG, Worman

HJ. Dynamics and molecular interactions of linker of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex proteins. *J Cell Sci.* 2009; 122:4099-108.

35. Malviya AN, Rogue P, Vincendon G. Stereospecific inositol 1,4,5-[³²P]trisphosphate binding to isolated rat liver nuclei: evidence for inositol trisphosphate receptor-mediated calcium release from the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87:9270-4.

36. Crisp M, Liu Q, Roux K, Rattner JB, Shanahan C, Burke B, Stahl PD, Hodzic D. Coupling of the nucleus and cytoplasm: Role of the LINC complex. *J Cell Biol.* 2006; 172:41-53.

37. Dauer WT, Worman HJ. The Nuclear Envelope as a Signaling Node in Development and Disease. *Dev Cell.* 2009; 17:626-38.

38. Davidson PM, Lammerding J. Broken nuclei - lamins, nuclear mechanics, and disease. *Trends Cell Biol.* 2014; 24:247-56.

39. Chi YH, Chen ZJ, Jeang KT. The nuclear envelopathies and human diseases. *J Biomed Sci.* 2009; 16:1-8.

40. Serebryannyy LA, Ball DA, Karpova TS, Misteli T. Single molecule analysis of lamin dynamics. *Methods.* 2019; 157:56-65.

41. Zeng X, Li K, Yuan R, Gao H, Luo J, Liu F, Wu Y, Wu G, Yan X. Nuclear envelope-associated chromosome dynamics during meiotic prophase I. *Front Cell Dev Biol.* 2018; 5:1-13.

42. Smoyer CJ, Jaspersen SL. Patrolling the nucleus: inner nuclear membrane-associated degradation. *Curr Genet.* 2019; 65:1099-106.

43. Cheng L, Baboo S, Lindsay C, Brusman L, Martinez-Bartolomé S, Tapia O, Zhang X, Yates JR, Gerace L. Identification of new transmembrane proteins concentrated at the nuclear envelope using organellar proteomics of mesenchymal cells. *Nucleus.* 2019; 10:126-43.

44. Garcia-Gil M, Albi E. Nuclear Lipids in the Nervous System: What they do in Health and Disease. *Neurochem Res.* 2017; 42:321-36.

45. Casares D, Escribá P V., Rosselló CA. Membrane lipid composition:

Effect on membrane and organelle structure, function and compartmentalization and therapeutic avenues. *Int J Mol Sci.* 2019; 20:

46. Cascianelli G, Villani M, Tosti M, Marini F, Bartoccini E, Viola Magni M, Albi E. Lipid Microdomains in Cell Nucleus. *Mol Biol Cell.* 2008; 19:5289-95.

47. Ledeen RW, Wu G. Sphingolipids of the nucleus and their role in nuclear signaling. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2006; 1761:588-98.

48. Ledeen RW, Wu G. Nuclear sphingolipids: metabolism and signaling. *J Lipid Res.* 2008; 49:1176-86.

49. Romanauska A, Köhler A. The Inner Nuclear Membrane Is a Metabolically Active Territory that Generates Nuclear Lipid Droplets. *Cell.* 2018; 174:700-715.e18.

50. Skinner BM, Johnson EEP. Nuclear morphologies: their diversity and functional relevance. *Chromosoma.* 2017; 126:195-212.

51. Wittmann M, Queisser G, Eder A, Wiegert JS, Bengtson CP, Hellwig A, Wittum G, Bading H. Synaptic Activity Induces Dramatic Changes in the Geometry of the Cell Nucleus: Interplay between Nuclear Structure, Histone H3 Phosphorylation, and Nuclear Calcium Signaling. *J Neurosci.* 2009; 29:14687-700.

52. Loewenstein WR, Kanno Y. Some electrical properties of the membrane of a cell nucleus. *Nature.* 1962; 195:462-4.

53. Kanno Y, Loewenstein WR. A study of the nucleus and cell membranes of oocytes with an intra-cellular electrode. *Exp Cell Res.* 1963; 31:149-66.

54. Loewenstein WR, Kanno Y. Some Electrical Properties of a Nuclear Membrane Examined with a Microelectrode. *J Gen Physiol.* 1963; 46:1123-40.

55. Mazzanti M, DeFelice LJ, Smith EF. Ion channels in murine nuclei during early development and in fully differentiated adult cells. *J Membr Biol.* 1991; 121:189-98.

56. Dale B, DeFelice LJ, Kyojuka K, Santella L, Tosti E. Voltage Clamp of the Nuclear Envelope. *Proc R Soc B Biol Sci.* 1994; 255:119-24.

57. Danker T, Mazzanti M, Tonini R, Rakowska A, Oberleithner H. Using

atomic force microscopy to investigate patch-clamped nuclear membrane. *Cell Biol Int.* 1997; 21:747-57.

58. Matzke AJM, Matzke MA. The electrical properties of the nuclear envelope, and their possible role in the regulation of eukaryotic gene expression. *J Electroanal Chem Interfacial Electrochem.* 1991; 320:357-70.

59. Garcia AM, Miller C. Channel-mediated monovalent cation fluxes in isolated sarcoplasmic reticulum vesicles. *J Gen Physiol.* 1984; 83:819-39.

60. Gillespie D, Fill M. Intracellular calcium release channels mediate their own countercurrent: The ryanodine receptor case study. *Biophys J.* 2008; 95:3706-14.

61. Hille B. *Ion Channels of Excitable Membranes* (3rd ed). 2001;

62. Abelson PH, Duryee WR. Radioactive sodium permeability and exchange in frog eggs. *Biol Bull.* 1949; 96:205-17.

63. Somlyo A, Shuman H, Somlyo A. Elemental distribution in striated muscle and the effects of hypertonicity: Electron probe analysis of cryo sections. *J Cell Biol.* 1977; 74:828-57.

64. Moore RD, Morrill GA. A possible mechanism for concentrating sodium and potassium in the cell nucleus. *Biophys J.* 1976; 16:527-33.

65. Paine PL, Pearson TW, Tluczek LJM, Horowitz SB. Nuclear sodium and potassium. *Nature.* 1981; 291:258-61.

66. Dick DAT, Ho-Yen DO. Intracellular sodium and potassium concentrations in oocytes of *Bufo bufo* at the beginning of maturation. *J Physiol.* 1974; 241:509-14.

67. Cannon JD, Dick DAT, Ho-Yen DO. Intracellular sodium and potassium concentrations in toad and frog oocytes during development. *J Physiol.* 1974; 241:497-508.

68. Lindsly C, Gonzalez-Islas C, Wenner P. Elevated intracellular Na⁺ concentrations in developing spinal neurons. *J Neurochem.* 2017; 140:755-65.

69. Louch WE, Koivumäki JT, Tavi P. Calcium signalling in developing

cardiomyocytes: Implications for model systems and disease. *J Physiol.* 2015; 593:1047-63.

70. Meyer J, Untiet V, Fahlke C, Gensch T, Rose CR. Quantitative determination of cellular [Na⁺] by fluorescence lifetime imaging with CoroNaGreen. *J Gen Physiol.* 2019; jgp.201912404.

71. Kondratev D, Gallitelli MF. Increments in concentrations of sodium and calcium in cell compartments of stretched mouse ventricular myocytes. *Cell Calcium.* 2003; 34:193-203.

72. Borin ML, Goldman WF, Blaustein MP. Intracellular free Na⁺ in resting and activated A7r5 vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 1993; 264:

73. Garner MH. Na,K-ATPase in the nuclear envelope regulates Na⁺: K⁺ gradients in hepatocyte nuclei. *J Membr Biol.* 2002; 187:97-115.

74. Bischof H, Rehberg M, Stryeck S, et al. Novel genetically encoded fluorescent probes enable real-time detection of potassium in vitro and in vivo (Reviewers' comments). *Nat Commun.* 2017; 8:1422.

75. Allfrey VG, Meudt R, Hopkins JW, Mirsky AE. Sodium-dependent "transport" reactions in the cell nucleus and their role in protein and nucleic acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1961; 47:907-32.

76. Ito S, Loewenstein WR. Permeability of a nuclear membrane: Changes during normal development and changes induced by growth hormone. *Science* (80-). 1965; 150:909-10.

77. Loewenstein WR, Kanno Y, Ito S. Permeability of nuclear membranes. *Ann N Y Acad Sci.* 1966; 137:708-16.

78. O'Brien EM, Gomes DA, Sehgal S, Nathanson MH. Hormonal Regulation of Nuclear Permeability. *J Biol Chem.* 2006; 282:4210-7.

79. Callan H., Tomlin S. Experimental studies on amphibian oocyte nuclei I. Investigation of the structure of the nuclear membrane by means of the electron microscope. *Proc R Soc London Ser B - Biol Sci.* 1950; 137:367-78.

80. Franke WW, Scheer U, Krohne G, Jarasch ED. The nuclear envelope and the architecture of the nuclear periphery. *J Cell Biol.* 1981; 91:
81. Feldherr CM, Akin D. The permeability of the nuclear envelope in dividing and nondividing cell cultures. *J Cell Biol.* 1990; 111:1-8.
82. Gerace L, Burke B. Functional organization of the nuclear envelope. *Annu Rev Cell Biol.* 1988; 4:335-74.
83. Paine PL, Moore LC, Horowitz SB. Nuclear envelope permeability. *Nature.* 1975; 254:109-14.
84. Garcia-Segura LM, Lafarga M, Berciano MT, Hernandez P, Andres MA. Distribution of nuclear pores and chromatin organization in neurons and glial cells of the rat cerebellar cortex. *J Comp Neurol.* 1989; 290:440-50.
85. Hoelz A, Debler EW, Blobel G. The Structure of the Nuclear Pore Complex. *Annu Rev Biochem.* 2011; 80:613-43.
86. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* 2002;
87. Sweet DJ, Gerace L. Taking from the cytoplasm and giving to the pore: soluble transport factors in nuclear protein import. *Trends Cell Biol.* 1995; 5:444-7.
88. Fahrenkrog B, Aebi U. The nuclear pore complex: Nucleocytoplasmic transport and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4:757-66.
89. Wiegert JS, Bading H. Activity-dependent calcium signaling and ERK-MAP kinases in neurons: A link to structural plasticity of the nucleus and gene transcription regulation. *Cell Calcium.* 2011; 49:296-305.
90. Martins TV, Evans MJ, Wysham DB, Morris RJ. Nuclear pores enable sustained perinuclear calcium oscillations. *BMC Syst Biol.* 2016; 10:55.
91. Strasser C, Grote P, Schäuble K, Ganz M, Ferrando-May E. Regulation of nuclear envelope permeability in cell death and survival. *Nucleus.* 2012; 3:540-51.
92. Santulli G, Nakashima R, Yuan Q, Marks AR. Intracellular calcium release channels: an update. *J Physiol J Physiol S.* 2017; 59510:3041-51.

93. Guihard G, Proteau S, Rousseau E. Does the nuclear envelope contain two types of ligand-gated Ca²⁺ release channels? *FEBS Lett.* 1997; 414:89-94.
94. Humbert JP, Matte N, Artault JC, Köppler P, Malviya AN. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane vindicating regulation of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-trisphosphate: Discrete distribution of inositol phosphate receptors to inner and outer nuclear membranes. *J Biol Chem.* 1996; 271:478-85.
95. Maeda N, Niinobe M, Mikoshiba K. A cerebellar Purkinje cell marker P400 protein is an inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP₃) receptor protein. Purification and characterization of InsP₃ receptor complex. *EMBO J.* 1990; 9:61-7.
96. Berridge MJ. Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Exp Biol.* 1997; 200:315-9.
97. Zhang JZ, Waddell HMM, Jones PP. Regulation of RYR2 by sarcoplasmic reticulum Ca²⁺. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2015; 42:720-6.
98. Stevens SCW, Terentyev D, Kalyanasundaram A, Periasamy M, Györke S. Intra-sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ oscillations are driven by dynamic regulation of ryanodine receptor function by luminal Ca²⁺ in cardiomyocytes. *J Physiol.* 2009; 587:4863-72.
99. Bezprozvanny I, Ehrlich BE. The inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP₃) receptor. *J Membr Biol.* 1995; 145:205-16.
100. Wagner LE, Groom LA, Dirksen RT, Yule DI. Characterization of ryanodine receptor type 1 single channel activity using “on-nucleus” patch clamp. *Cell Calcium.* 2014; 56:96-107.
101. Bezprozvanny IB, Ondrias K, Kaftan E, Stoyanovsky DA, Ehrlich BE. Activation of the calcium release channel (ryanodine receptor) by heparin and other polyanions is calcium dependent. *Mol Biol Cell.* 1993; 4:347-52.
102. Saleem H, Tovey SC, Molinski TF, Taylor CW. Interactions of antagonists with subtypes of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) receptor. *Br J Pharmacol.* 2014; 171:3298-312.

103. Bezprozvanny I, Bezprozvannaya S, Ehrlich BE. Caffeine-induced inhibition of inositol(1,4,5)-trisphosphate-gated calcium channels from cerebellum. *Mol Biol Cell*. 1994; 5:97-103.
104. Lindsay AR, Manning SD, Williams AJ. Monovalent cation conductance in the ryanodine receptor-channel of sheep cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J Physiol*. 1991; 439:463-80.
105. Sitsapesan R, Williams AJ. The gating of the sheep skeletal sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-release channel is regulated by luminal Ca²⁺. *J Membr Biol*. 1995; 146:577.
106. Tinker A, Lindsay AR, Williams AJ. A model for ionic conduction in the ryanodine receptor channel of sheep cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J Gen Physiol*. 1992; 100:495-517.
107. Bkaily G, Avedanian L, Al-Khoury J, Ahmarani L, Perreault C, Jacques D. Receptors and ionic transporters in nuclear membranes: new targets for therapeutical pharmacological interventions. *Can J Physiol Pharmacol*. 2012; 90:953-65.
108. Bannister JP, Leo MD, Narayanan D, Jangsangthong W, Nair A, Evanson KW, Pachuau J, Gabrick KS, Boop FA, Jaggar JH. The voltage-dependent L-type Ca²⁺ (CaV1.2) channel C-terminus fragment is a bi-modal vasodilator. *J Physiol*. 2013; 591:2987-98.
109. Gomez-Ospina N, Tsuruta F, Barreto-Chang O, Hu L, Dolmetsch R. The C Terminus of the L-Type Voltage-Gated Calcium Channel CaV1.2 Encodes a Transcription Factor. *Cell*. 2006; 127:591-606.
110. Mazzanti M, DeFelice LJ, Cohen J, Malter H. Ion channels in the nuclear envelope. *Nature*. 1990; 343:764-7.
111. Bustamante JO. Nuclear ion channels in cardiac myocytes. *Pflügers Arch Eur J Physiol*. 1992; 421:473-85.
112. Федоренко ОА, Дужий ДЄ, Марченко СМ. Ядерні іонні канали гранулярних нейронів зубчатої звивини. *Fiziol Zh*. 2007; 53:9-15.

113. Федоренко ОА, Волкова ТМ, Марченко СМ. Новий катіонний канал ядерної мембрани Т-лімфоцитів. *Fiziol Zh.* 2006; 52:17-21.

114. Li B, Jie W, Huang L, et al. Nuclear BK channels regulate gene expression via the control of nuclear calcium signaling. *Nat Neurosci.* 2014; 17:1055-63.

115. Chen L, Jeffries O, Rowe ICM, Liang Z, Knaus HG, Ruth P, Shipston MJ. Membrane trafficking of large conductance calcium-activated potassium channels is regulated by alternative splicing of a transplantable, acidic trafficking motif in the RCK1-RCK2 linker. *J Biol Chem.* 2010; 285:23265-75.

116. Eghbali M, Toro L, Stefani E. Diminished Surface Clustering and Increased Perinuclear Accumulation of Large Conductance Ca²⁺-activated K⁺ Channel in Mouse Myometrium with Pregnancy. *J Biol Chem.* 2003; 278:45311-7.

117. Hu X, Laragione T, Sun L, Koshy S, Jones KR, Ismailov II, Yotnda P, Horrigan FT, Gulko PS, Beeton C. KCa1.1 potassium channels regulate key proinflammatory and invasive properties of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *J Biol Chem.* 2012; 287:4014-22.

118. Chachi L, Shikotra A, Duffy SM, Tliba O, Brightling C, Bradding P, Amrani Y. Functional K Ca 3.1 Channels Regulate Steroid Insensitivity in Bronchial Smooth Muscle Cells. *J Immunol.* 2013; 191:2624-36.

119. Díaz P, Wood AM, Sibley CP, Greenwood SL. Intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels modulate human placental trophoblast syncytialization. *PLoS One.* 2014; 9:1-12.

120. Quesada I, Rovira JM, Martin F, Roche E, Nadal A, Soria B. Nuclear KATP channels trigger nuclear Ca²⁺ transients that modulate nuclear function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99:9544-9.

121. Olsen ML, Sontheimer H. Mislocalization of Kir channels in malignant glia. *Glia.* 2004; 46:63-73.

122. Stonehouse AH, Grubb BD, Pringle JH, Norman RI, Stanfield PR, Brammar WJ. Nuclear immunostaining in rat neuronal cells using two anti-Kir2.2

ion channel polyclonal antibodies. *J Mol Neurosci*. 2003; 20:189-93.

123. Fedorenko EA, Dyzhii DE, Marchenko SM. Large-conductance cationic channels in the nuclear envelope of Purkinje neurons from the rat cerebellum. *Neurophysiology*. 2007; 39:99-104.

124. López-Romero AE, Hernández-Araiza I, Torres-Quiroz F, Tovar-Y-Romo LB, Islas LD, Rosenbaum T. TRP ion channels: Proteins with conformational flexibility. *Channels (Austin)*. 2019; 13:207-26.

125. Lanini L, Bachs O, Carafoli E. The calcium pump of the liver nuclear membrane is identical to that of endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 1992; 267:11548-52.

126. Nicotera P, Orrenius S, Nilsson T, Berggren PO. An inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} pool in liver nuclei. *Proc Natl Acad Sci*. 1990; 87:6858-62.

127. Pestov NB, Ahmad N, Korneenko T V., Zhao H, Radkov R, Schaer D, Roy S, Bibert S, Geering K, Modyanov NN. Evolution of Na,K-ATPase β m-subunit into a coregulator of transcription in placental mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104:11215-20.

128. Secondo A, Esposito A, Petrozziello T, et al. $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger 1 on nuclear envelope controls PTEN/Akt pathway via nucleoplasmic Ca^{2+} regulation during neuronal differentiation. *Cell death Discov*. 2018; 4:12.

129. Secondo A, Petrozziello T, Tedeschi V, Boscia F, Pannaccione A, Molinaro P, Annunziato L. Nuclear localization of NCX: Role in Ca^{2+} handling and pathophysiological implications. *Cell Calcium*. 2020; 86:102143.

130. Ledeen RW, Wu G. Sodium-calcium exchangers in the nucleus: An unexpected locus and an unusual regulatory mechanism. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1099:494-506.

131. Bkaily G, Nader M, Avedanian L, Jacques D, Perrault C, Abdel-samad D, Orléans-juste PD, Gobeil F, Hazzouri KM, D'Orléans-Juste P. Immunofluorescence revealed the presence of NHE-1 in the nuclear membranes of

rat cardiomyocytes and isolated nuclei of human, rabbit, and rat aortic and liver tissues. *Can J Physiol Pharmacol.* 2004; 82:805-11.

132. Mazzanti M, Innocenti B, Rigatelli M. ATP-dependent ionic permeability on nuclear envelope in in situ nuclei of *Xenopus* oocytes. *FASEB J.* 1994; 8:231-6.

133. Stehno-Bittel L, Lückhoff A, Clapham DE. Calcium release from the nucleus by InsP3 receptor channels. *Neuron.* 1995; 14:163-7.

134. Valenzuela SM, Martin DK, Por SB, Robbins JM, Warton K, Bootcov MR, Schofield PR, Campbell TJ, Breit SN. Molecular cloning and expression of a chloride ion channel of cell nuclei. *J Biol Chem.* 1997; 272:12575-82.

135. Jong YJI, Schwetye KE, O'Malley KL. Nuclear localization of functional metabotropic glutamate receptor mGlu1 in HEK293 cells and cortical neurons: Role in nuclear calcium mobilization and development. *J Neurochem.* 2007; 101:458-69.

136. Levitan IB. Modulation of Ion Channels in Neurons and Other Cells. *Annu Rev Neurosci.* 1988; 11:119-36.

137. Jakubík J, El-Fakahany EE. Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmaceuticals.* 2010; 3:2838-60.

138. Rothberg BS. Allosteric modulation of ion channels: the case of maxi-K. *Sci STKE.* 2004; 2004:pe16.

139. Bowie D, David Lange G, Mayer ML. Activity-dependent modulation of glutamate receptors by polyamines. *J Neurosci.* 1998; 18:8175-85.

140. De Strooper B. Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease. *EMBO Rep.* 2007; 8:141-6.

141. Lee SH, Park KH, Ho WK, Lee SH. Postnatal developmental changes in Ca²⁺homeostasis in supraoptic magnocellular neurons. *Cell Calcium.* 2007; 41:441-50.

142. Bezprozvanny I, Mattson MP. Neuronal calcium mishandling and the

pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 2008; 31:454-63.

143. Ringer S. A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *J Physiol.* 1883; 4:29-42.

144. Brink F. The role of calcium ions in neural processes. *Pharmacol Rev.* 1954; 6:243-98.

145. Winegar BD, Kelly R, Lansman JB. Block of current through single calcium channels by Fe, Co, and Ni. Location of the transition metal binding site in the pore. *J Gen Physiol.* 1991; 97:351-67.

146. Shuba YM. Models of calcium permeation through T-type channels. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2014; 466:635-44.

147. Lansman JB, Hess P, Tsien RW. Blockade of current through single calcium channels by Cd²⁺, Mg²⁺, and Ca²⁺. Voltage and concentration dependence of calcium entry into the pore. *J Gen Physiol.* 1986; 88:321-47.

148. Lacinová E. T-type calcium channel blockers – new and notable. *Gen Physiol Biophys.* 2012; 30:403-9.

149. Díaz D, Bartolo R, Delgadillo DM, Higueldo F, Gomora JC. Contrasting effects of Cd²⁺ and Co²⁺ on the blocking/unblocking of human Cav3 channels. *J Membr Biol.* 2005; 207:91-105.

150. Tarasenko AN, Kostyuk PG, Eremin A V., Isaev DS. Two types of low-voltage-activated Ca²⁺ channels in neurones of rat laterodorsal thalamic nucleus. *J Physiol.* 1997; 499:77-86.

151. Dutertre S, Lewis RJ. Use of venom peptides to probe ion channel structure and function. *J Biol Chem.* 2010; 285:13315-20.

152. Wink M. Interference of alkaloids with neuroreceptors and ion channels. *Stud Nat Prod Chem.* 2000; 21:3-122.

153. Bosmans F, Swartz KJ. Targeting voltage sensors in sodium channels with spider toxins. *Trends Pharmacol Sci.* 2010; 31:175-82.

154. Wang J, Yarov-Yarovoy V, Kahn R, Gordon D, Gurevitz M, Scheuer T, Catterall WA. Mapping the receptor site for α -scorpion toxins on a Na⁺ channel

voltage sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108:15426-31.

155. French RJ, Zamponi GW. Voltage-gated sodium and calcium channels in nerve, muscle, and heart. *IEEE Trans Nanobioscience*. 2005; 4:58-69.

156. Swartz KJ. Tarantula toxins interacting with voltage sensors in potassium channels. *Toxicon*. 2007; 49:213-30.

157. Milescu M, Lee HC, Bae CH, Kim J Il, Swartz KJ. Opening the shaker K⁺ channel with hanatoxin. *J Gen Physiol*. 2013; 141:203-16.

158. Börjesson SI, Elinder F. Structure, function, and modification of the voltage sensor in voltage-gated ion channels. *Cell Biochem Biophys*. 2008; 52:149-74.

159. Yeh JZ, Armstrong CM. Immobilisation of gating charge by a substance that simulates inactivation. *Nature*. 1978; 273:387-9.

160. Neumaier F, Dibué-Adjei M, Hescheler J, Schneider T. Voltage-gated calcium channels: Determinants of channel function and modulation by inorganic cations. *Prog Neurobiol*. 2015; 129:1-36.

161. Armstrong CM, Taylor SR. Interaction of barium ions with potassium channels in squid giant axons. *Biophys J*. 1980; 30:473-88.

162. Vergara C, Latorre R. Kinetics of Ca²⁺-activated K⁺ channels from rabbit muscle incorporated into planar bilayers: Evidence for a Ca²⁺ and Ba²⁺ blockade. *J Gen Physiol*. 1983; 82:543-68.

163. Miller C. Trapping single ions inside single ion channels. *Biophys J*. 1987; 52:123-6.

164. Neyton J, Miller C. Potassium blocks barium permeation through a calcium-activated potassium channel. *J Gen Physiol*. 1988; 92:549-67.

165. Lansman JB. Blockade of current through single calcium channels by trivalent lanthanide cations. Effect of ionic radius on the rates of ion entry and exit. *J Gen Physiol*. 1990; 95:679-96.

166. Babich O, Reeves J, Shirokov R. Block of CaV1.2 channels by Gd³⁺ reveals preopening transitions in the selectivity filter. *J Gen Physiol*. 2007; 129:461-

75.

167. Obejero-Paz CA, Gray IP, Jones SW. Y3+ block demonstrates an intracellular activation gate for the α 1G T-type Ca^{2+} channel. *J Gen Physiol.* 2004; 124:631-40.

168. Sárközi S, Komáromi I, Jóna I, Almássy J. Lanthanides Report Calcium Sensor in the Vestibule of Ryanodine Receptor. *Biophys J.* 2017; 112:2127-37.

169. Chen X, Sooch G, Demaree IS, White FA, Obukhov AG. Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) Channels: Then and Now. *Cells.* 2020; 9:

170. McNally BA, Yamashita M, Engh A, Prakriya M. Structural determinants of ion permeation in CRAC channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106:22516-21.

171. Mlinar B, Enyeart JJ. Block of current through T-type calcium channels by trivalent metal cations and nickel in neural rat and human cells. *J Physiol.* 1993; 469:639-52.

172. Lee J, Gomora JC, Cribbs LL, Perez-Reyes E. Nickel Block of Three Cloned T-Type Calcium Channels: Low Concentrations Selectively Block α 1H. *Biophys J.* 1999; 77:3034-42.

173. Perez-Reyes E. Three for T: molecular analysis of the low voltage-activated calcium channel family. *Cell Mol Life Sci.* 1999; 56:660-9.

174. Obejero-Paz CA, Gray IP, Jones SW. Ni^{2+} block of Cav3.1 (α 1G) T-type calcium channels. *J Gen Physiol.* 2008; 132:239-50.

175. Nosal O V, Lyubanova OP, Naidenov VG, Shuba YM. Complex modulation of Ca(v)3.1 T-type calcium channel by nickel. *Cell Mol life Sci.* 2013; 70:1653-61.

176. Ascher P, Nowak L. The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. *J Physiol.* 1988; 399:247-66.

177. Sobolevsky AI, Yelshansky M V. The trapping block of NMDA receptor channels in acutely isolated rat hippocampal neurones. *J Physiol.* 2000;

526:493-506.

178. Armstrong CM. Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. *J Gen Physiol.* 1971; 58:413-37.

179. Clay JR. Quaternary ammonium ion blockade of IK in nerve axons revisited. Open channel block vs. state independent block. *J Membr Biol.* 1995; 147:577.

180. Wagoner PK, Oxford GS. Aminopyridines block an inactivating potassium current having slow recovery kinetics. *Biophys J.* 1990; 58:1481-9.

181. Choquet D, Korn H. Mechanism of 4-aminopyridine action on voltage-gated potassium channels in lymphocytes. *J Gen Physiol.* 1992; 99:217-40.

182. Kirsch GE, Drewe JA. Gating-dependent mechanism of 4-aminopyridine block in two related potassium channels. *J Gen Physiol.* 1993; 102:797-816.

183. Hille B. Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. *J Gen Physiol.* 1977; 69:497-515.

184. Neely A, Lingle CJ. Trapping of an open-channel blocker at the frog neuromuscular acetylcholine channel. *Biophys J.* 1986; 50:981-6.

185. Armstrong CM, Hille B. Voltage-gated ion channels and electrical excitability. *Neuron.* 1998; 20:371-80.

186. Sobolevsky AI, Koshelev SG, Khodorov BI. Probing of NMDA channels with fast blockers. *J Neurosci.* 1999; 19:10611-26.

187. Neher E, Steinbach JH. Local anaesthetics transiently block currents through single acetylcholine-receptor channels. *J Physiol.* 1978; 277:153-76.

188. Kotermanski SE, Wood JT, Johnson JW. Memantine binding to a superficial site on NMDA receptors contributes to partial trapping. *J Physiol.* 2009; 587:4589-604.

189. Chen HSV, Lipton SA. Mechanism of memantine block of NMDA-activated channels in rat retinal ganglion cells: Uncompetitive antagonism. *J Physiol.* 1997; 499:27-46.

190. Li W, Aldrich RW. Unique Inner Pore Properties of BK Channels Revealed by Quaternary Ammonium Block. *J Gen Physiol.* 2004; 124:43-57.
191. Elinder F, Århem P. Metal ion effects on ion channel gating. *Q Rev Biophys.* 2003; 36:373-427.
192. Reichling DB, MacDermott a B. Lanthanum actions on excitatory amino acid-gated currents and voltage-gated calcium currents in rat dorsal horn neurons. *J Physiol.* 1991; 441:199-218.
193. Chandler WK, Hodgkin AL, Meves H. The effect of changing the internal solution on sodium inactivation and related phenomena in giant axons. *J Physiol.* 1965; 180:821-36.
194. Mozhayeva GN, Naumov AP. Effect of surface charge on the steady-state potassium conductance of nodal membrane. *Nature.* 1970; 228:164-5.
195. Hille B, Woodhull AM, Shapiro BI. Negative surface charge near sodium channels of nerve: divalent ions, monovalent ions, and pH. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1975; 270:301-18.
196. Kostyuk PG, Krishtal OA, Shakhovalov YA. Separation of sodium and calcium currents in the somatic membrane of mollusc neurones. With an Appendix by Yu A. Shakhovalov. *J Physiol.* 1977; 270:545-68.
197. Kostyuk PG, Mironov SL, Doroshenko PA, Ponomarev VN. Surface charges on the outer side of mollusc neuron membrane. *J Membr Biol.* 1982; 70:171-9.
198. Agwa AJ, Peigneur S, Chow CY, Lawrence N, Craik DJ, Tytgat J, King GF, Henriques ST, Schroeder CI. Gating modifier toxins isolated from spider venom: Modulation of voltage-gated sodium channels and the role of lipid membranes. *J Biol Chem.* 2018; 293:9041-52.
199. Swartz KJ, MacKinnon R. An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula. *Neuron.* 1995; 15:941-9.
200. Lee HC, Wang JM, Swartz KJ. Interaction between Extracellular Hanatoxin and the Resting Conformation of the Voltage-Sensor Paddle in Kv

Channels in response to changes in membrane voltage (Aggarwal and MacKinnon. *Neuron*. 2003; 40:527-36.

201. Phillips LR, Milescu M, Li-Smerin Y, Mindell JA, Kim J Il, Swartz KJ. Voltage-sensor activation with a tarantula toxin as cargo. *Nature*. 2005; 436:857-60.

202. Lee SY, MacKinnon R. A membrane-access mechanism of ion channel inhibition by voltage sensor toxins from spider venom. *Nature*. 2004; 430:232-5.

203. Mihailescu M, Krepiy D, Milescu M, Gawrisch K, Swartz KJ, White S. Structural interactions of a voltage sensor toxin with lipid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111:E5463-70.

204. Bemporad D, Sands ZA, Wee CL, Grottesi A, Sansom MSP. Vstx1, a modifier of Kv channel gating, localizes to the interfacial region of lipid bilayers. *Biochemistry*. 2006; 45:11844-55.

205. Lau CHY, King GF, Mobli M. Molecular basis of the interaction between gating modifier spider toxins and the voltage sensor of voltage-gated ion channels. *Sci Rep*. 2016; 6:1-13.

206. Henriques ST, Deplazes E, Lawrence N, et al. Interaction of tarantula venom peptide ProTx-II with lipid membranes is a prerequisite for its inhibition of human voltage-gated sodium channel NaV 1.7. *J Biol Chem*. 2016; 291:17049-65.

207. Ryu JH, Jung HJ, Konishi S, Kim HH, Park ZY, Kim J Il. Structure-activity relationships of ω -Agatoxin IVA in lipid membranes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017; 482:170-5.

208. Kennard LE, Chumbley JR, Ranatunga KM, Armstrong SJ, Veale EL, Mathie A. Inhibition of the human two-pore domain potassium channel, TREK-1, by fluoxetine and its metabolite norfluoxetine. *Br J Pharmacol*. 2005; 144:821-9.

209. Deplazes E, Henriques ST, Smith JJ, King GF, Craik DJ, Mark AE, Schroeder CI. Membrane-binding properties of gating modifier and pore-blocking toxins: Membrane interaction is not a prerequisite for modification of channel gating. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2016; 1858:872-82.

210. Catterall WA, Cestèle S, Yarov-Yarovoy V, Yu FH, Konoki K, Scheuer

T. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*. 2007; 49:124-41.

211. Sack JT, Aldrich RW. Binding of a gating modifier toxin induces intersubunit cooperativity early in the Shaker K channel's activation pathway. *J Gen Physiol*. 2006; 128:119-32.

212. Frankenhaeuser B, Hodgkin AL. The action of calcium on the electrical properties of squid axons. *J Physiol*. 1957; 137:218-44.

213. Mathias RT, Baldo GJ, Manivannan K, McLaughlin S. Discrete Charges on Biological Membranes. *Electrified Interfaces Physics, Chem Biol*. 1992; 473-90.

214. Winiski AP, McLaughlin AC, McDaniel R V., Eisenberg M, McLaughlin S. An Experimental Test of the Discreteness-of-Charge Effect in Positive and Negative Lipid Bilayers. *Biochemistry*. 1986; 25:8206-14.

215. Peitzsch RM, Eisenberg M, Sharp KA, McLaughlin S. Calculations of the electrostatic potential adjacent to model phospholipid bilayers. *Biophys J*. 1995; 68:729-38.

216. Elinder F, Århem P. The modulatory site for the action of gadolinium on surface charges and channel gating. *Biophys J*. 1994; 67:84-90.

217. Green WN, Weiss LB, Andersen OS. Batrachotoxin-modified sodium channels in planar lipid bilayers: Ion permeation and block. *J Gen Physiol*. 1987; 89:841-72.

218. Armstrong CM, Cota G. Modification of sodium channel gating by lanthanum: Some effects that cannot be explained by surface charge theory. *J Gen Physiol*. 1990; 96:1129-40.

219. Terlau H, Ludwig J, Steffan R, Pongs O, Stühmer W, Heinemann SH. Extracellular Mg²⁺ regulates activation of rat eag potassium channel. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 1996; 432:301-12.

220. Tang CY, Bezanilla F, Papazian DM. Extracellular Mg²⁺ modulates slow gating transitions and the opening of *Drosophila* ether-a-go-go potassium channels. *J Gen Physiol*. 2000; 115:319-37.

221. Zagotta WN, Hoshi T, Aldrich RW. Shaker Potassium Channel Gating

III: Evaluation of kinetic models for activation. *J Gen Physiol.* 1994; 103:321-62.

222. Coddou C, Yan Z, Obsil T, Pablo Huidobro-Toro J, Stojilkovic SS. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol Rev.* 2011; 63:641-83.

223. Narahashi T, Ma JY, Arakawa O, Reuveny E, Nakahiro M. GABA receptor-channel complex as a target site of Mercury, copper, zinc, and lanthanides. *Cell Mol Neurobiol.* 1994; 14:599-621.

224. García-Colunga J, Miledi R. Opposite effects of lanthanum on different types of nicotinic acetylcholine receptors. *Neuroreport.* 1997; 8:3293-6.

225. Wang S-Y, Wang GK. Point mutations in segment I-S6 render voltage-gated Na⁺ channels resistant to batrachotoxin. *Proc Natl Acad Sci.* 1998; 95:2653-8.

226. Zamponi GW, Doyle DD, French RJ. Fast lidocaine block of cardiac and skeletal muscle sodium channels: one site with two routes of access. *Biophys J.* 1993; 65:80-90.

227. Zamponi GW, French RJ. Amine blockers of the cytoplasmic mouth of sodium channels: a small structural change can abolish voltage dependence. *Biophys J.* 1994; 67:1015-27.

228. Herndon RM. The fine structure of the Purkinje cell. *J Cell Biol.* 1963; 18:167-80.

229. Nern C, Wolff I, Macas J, von Randow J, Scharenberg C, Priller J, Momma S. Fusion of Hematopoietic Cells with Purkinje Neurons Does Not Lead to Stable Heterokaryon Formation under Noninvasive Conditions. *J Neurosci.* 2009; 29:3799-807.

230. Zhou FC, Resendiz M, Lo CL, Chen Y. Cell-wide DNA de-methylation and re-methylation of purkinje neurons in the developing cerebellum. *PLoS One.* 2016; 11:1-23.

231. Zagon IS, McLaughlin PJ. Morphological identification and biochemical characterization of isolated brain cell nuclei from the developing rat cerebellum. *Brain Res.* 1979; 170:443-57.

232. English AR, Voeltz GK. Endoplasmic Reticulum Structure and Interconnections with Other Organelles. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013; 1-16.
233. Schroeder I. How to resolve microsecond current fluctuations in single ion channels: The power of beta distributions. *Channels.* 2015; 9:262-80.
234. Magleby KL. Ion channels. Preventing artifacts and reducing errors in single-channel analysis. *Methods Enzymol.* 1992; 207:763-91.
235. Sigworth FJ, Sine SM. Data transformations for improved display and fitting of single-channel dwell time histograms. *Biophys J.* 1987; 52:1047-54.
236. Colquhoun D, Hawkes AG. On the stochastic properties of single ion channels. *Proc R Soc London - Biol Sci.* 1981; 211:205-35.
237. Colquhoun D, Sakmann B. Fast events in single-channel currents activated by acetylcholine and its analogues at the frog muscle end-plate. *J Physiol.* 1985; 369:501-57.
238. Colquhoun D. Practical analysis of single channel records. *Microelectrode Tech Plymouth Work Handb.* 1987; 101-39.
239. Colquhoun D, Sigworth FJ. Fitting and Statistical Analysis of Single-Channel Records. *Single-Channel Rec.* 1995; 483-587.
240. Hawkes AG, Jalali A, Colquhoun D. The distributions of the apparent open times and shut times in a single channel record when brief events cannot be detected. *Philos Trans R Soc London Ser A Phys Eng Sci.* 1990; 332:511-38.
241. Hawkes AG, Jalali A, Colquhoun D. Asymptotic Distributions of Apparent Open Times and Shut Times in a Single Channel Record Allowing for the Omission of Brief Events. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1992; 337:383-404.
242. Colquhoun D, Hawkes AG, Srodzinski K. Joint Distributions of Apparent Open and Shut Times of Single-Ion Channels and Maximum Likelihood Fitting of Mechanisms. *Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci.* 1996; 354:2555-90.
243. Colquhoun D, Hatton CJ, Hawkes AG. The quality of maximum likelihood estimates of ion channel rate constants. *J Physiol.* 2003; 547:699-728.

244. Rauh O, Hansen U-P, Mach S, Hartel AJW, Shepard KL, Thiel G, Schroeder I. Extended beta distributions open the access to fast gating in bilayer experiments-assigning the voltage-dependent gating to the selectivity filter. *FEBS Lett.* 2017; 591:3850-60.

245. Ferguson WB, McManus OB, Magleby KL. Opening and closing transitions for BK channels often occur in two steps via sojourns through a brief lifetime subconductance state. *Biophys J.* 1993; 65:702-14.

246. Fredkin DR, Rice JA. Maximum likelihood estimation and identification from single-channel recordings. *Proc R Soc Lond B.* 1992; 242:125-32.

247. Albertsen A, Hansen U-P. Estimation of kinetic rate constants from multi-channel recordings by a direct fit of the time series. *Biophys J.* 1994; 67:1393-403.

248. Yellen G. Ionic permeation and blockade in Ca^{2+} -activated K^{+} channels of bovine chromaffin cells. *J Gen Physiol.* 1984; 84:157-86.

249. Pietrobon D, Prod'hom B, Hess P. Interactions of protons with single open L-type calcium channels. pH dependence of proton-induced current fluctuations with Cs^{+} , K^{+} , and Na^{+} as permeant ions. *J Gen Physiol.* 1989; 94:1-21.

250. Fitzhugh R. Statistical properties of the asymmetric random telegraph signal, with applications to single-channel analysis. *Math Biosci.* 1983; 64:75-89.

251. White PJ, Ridout MS. The estimation of rapid rate constants from current-amplitude frequency distributions of single-channel recordings. *J Membr Biol.* 1998; 161:115-29.

252. Schroeder I, Hansen U-P. Saturation and Microsecond Gating of Current Indicate Depletion-induced Instability of the MaxiK Selectivity Filter. *J Gen Physiol.* 2007; 130:83-97.

253. Hille B. *Ionic Channels of Excitable Membranes* (2nd ed). 1992;

254. Townsend C, Horn R. Interaction between the pore and a fast gate of the cardiac sodium channel. *J Gen Physiol.* 1999; 113:321-31.

255. Evans CH. Biochemistry of the Lanthanides. 1990;
256. Федоренко ОА, Луцько ОВ, Марченко СМ. Вплив міжмолекулярної взаємодії на функціональні властивості інозитолтрифосфатних рецепторів ядер. Доповіді НАНУ. 2012; 168-71.
257. Nasiripourdori A, Taly V, Grutter T, Taly A. From toxins targeting ligand gated ion channels to therapeutic molecules. *Toxins (Basel)*. 2011; 3:260-93.
258. Gorbacheva EV, Starkov VI, Tsetlin VI, Utkin YN, Vulfus CA. Viperidae snake venoms block nicotinic acetylcholine receptors and voltage-gated Ca²⁺ channels in identified neurons of fresh-water snail *Lymnaea stagnali*. *Biochem Suppl Ser A Membr Cell Biol*. 2008; 2:14-8.
259. Harvey AL, Anderson AJ. Dendrotoxins: Snake toxins that block potassium channels and facilitate neurotransmitter release. *Pharmacol Ther*. 1985; 31:33-55.
260. Vulfus CA, Spirova EN, Serebryakova M V., et al. Peptides from puff adder *Bitis arietans* venom, novel inhibitors of nicotinic acetylcholine receptors. *Toxicon*. 2016; 121:70-6.
261. Vandendriessche T, Kopljar I, Jenkins DP, et al. Purification, molecular cloning and functional characterization of HelaTx1 (*Heterometrus laoticus*): The first member of a new κ -KTX subfamily. *Biochem Pharmacol*. 2012; 83:1307-17.
262. Quintero-Hernández V, Jiménez-Vargas JM, Gurrola GB, Valdivia HH, Possani LD. Scorpion venom components that affect ion-channels function. *Toxicon*. 2013; 76:328-42.
263. Rothberg BS, Magleby KL. Gating kinetics of single large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in high Ca²⁺ suggest a two-tiered allosteric gating mechanism. *J Gen Physiol*. 1999; 114:93-124.
264. Kopanitsa M V., Yakubovska LM, Rudenko OP, Krishtal OA. Modulation of GABA_A receptor-mediated currents by benzophenone derivatives in isolated rat Purkinje neurones. *Neuropharmacology*. 2002; 43:764-77.
265. Kopanitsa M V., Zhuk O V., Zinkovsky VG, Krishtal OA. Modulation

of GABAA receptor-mediated currents by phenazepam and its metabolites. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2001; 364:1-8.

266. Houamed KM, Bilbe G, Smart TG, Constanti A, Brown DA, Barnard EA, Richards BM. Expression of functional GABA, glycine and glutamate receptors in *Xenopus* oocytes injected with rat brain mRNA. *Nature.* 1984; 310:318-21.

267. Yamamoto D. Dynamics of strychnine block of single sodium channels in bovine chromaffin cells. *J Physiol.* 1986; 370:395-407.

268. Mußhoff U, Madeja M, Bloms-Funke P, Speckmann EJ. Effects of the epileptogenic agent strychnine on membrane currents elicited by agonists of the NMDA and non-NMDA receptors in *Xenopus* oocytes. *Comp Biochem Physiol -- Part A Physiol.* 1995; 111:65-71.

269. Cahalan MD. Local anesthetic block of sodium channels in normal and pronase-treated squid giant axons. *Biophys J.* 1978; 23:285-311.

270. Miller C, Moczydlowski EG, Latorre R, Phillips M. Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca^{2+} channels from mammalian skeletal muscle. *Nature.* 1985; 24:316-8.

271. Zhao Y, Huang J, Yuan X, Peng B, Liu W, Han S, He X. Toxins targeting the Kv1.3 Channel: Potential immunomodulators for autoimmune diseases. *Toxins (Basel).* 2015; 7:1749-64.

272. Nakazawa K, Inoue K, Fujimori K, Takanaka A. Effects of ATP antagonists on purinoceptor-operated inward currents in rat pheochromocytoma cells. *Pflügers Arch Eur J Physiol.* 1991; 418:214-9.

273. Clark AL, Mitchelson F. The Inhibitory Effect of Gallamine on Muscarinic Receptors. *Br J Pharmacol.* 1976; 58:323-31.

274. Colquhoun D, Sheridan RE. The modes of action of gallamine. *Proc R Soc London - Biol Sci.* 1981; 211:181-203.

275. Brauser A, Schroeder I, Gutschmann T, Cosentino C, Moroni A, Hansen U-P, Winterhalter M. Modulation of enrofloxacin binding in OmpF by Mg^{2+} as revealed by the analysis of fast flickering single-porin current. *J Gen Physiol.* 2012;

140:69-82.

276. Colquhoun D, Hawkes AG. On the stochastic properties of bursts of single ion channel openings and of clusters of bursts. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1982; 300:1-59.

277. Blatz AL, Magleby KL. Correcting single channel data for missed events. *Biophys J.* 1986; 49:967-80.

278. Magleby KL, Weiss DS. Estimating kinetic parameters for single channels with simulation. A general method that resolves the missed event problem and accounts for noise. *Biophys J.* 1990; 58:1411-26.

279. Silberberg SD, Magleby KL. Preventing errors when estimating single channel properties from the analysis of current fluctuations. *Biophys J.* 1993; 65:1570-84.

280. Sivilotti L, Colquhoun D. In praise of single channel kinetics. *J Gen Physiol.* 2016; 148:79-88.

281. Del Castillo J, Katz B. Interaction at end-plate receptors between different choline derivatives. *Proc R Soc London Ser B - Biol Sci.* 1957; 146:369-81.

282. Bezanilla F, Armstrong CM. Inactivation of the sodium channel. *J Gen Physiol.* 1977; 70:548-66.

283. Neher E, Stevens CF. Conductance Fluctuations and Ionic Pores in Membranes. *Annu Rev Biophys Bioeng.* 1977; 6:345-81.

284. Shelley C, Magleby KL. Linking Exponential Components to Kinetic States in Markov Models for Single-Channel Gating. *J Gen Physiol.* 2008; 132:295-312.

285. Läuger P. Diffusion-limited ion flow through pores. *Biochim Biophys Acta.* 1976; 455:493-509.

286. Andersen OS. Ion movement through gramicidin A channels. Single-channel measurements at very high potentials. *Biophys J.* 1983; 41:119-33.

287. Valenzuela SM, Mazzanti M, Tonini R, Qiu MR, Warton K, Musgrove E a, Campbell TJ, Breit SN. The nuclear chloride ion channel NCC27 is involved in

regulation of the cell cycle. *J Physiol.* 2000; 529 Pt 3:541-52.

288. Hartel AJW, Ong P, Schroeder I, Giese MH, Shekar S, Clarke OB, Zalk R, Marks AR, Hendrickson WA, Shepard KL. Single-channel recordings of RyR1 at microsecond resolution in CMOS-suspended membranes. *Proc Natl Acad Sci.* 2018; 115:E1789-98.

289. Fox JA. Ion channel subconductance states. *J Membr Biol.* 1987; 97:1-8.

290. Ruiz ML, Karpen JW. Single cyclic nucleotide-gated channels locked in different ligand-bound states. *Nature.* 1997; 389:389-92.

291. Fox JA. Conductance and selectivity properties of a substate of the rabbit sarcoplasmic reticulum channel. *Biophys J.* 1985; 47:573-6.

292. Auerbach A, Sachs F. Flickering of a nicotinic ion channel to a subconductance state. *Biophys J.* 1983; 42:1-10.

293. Schröder I, Huth T, Suitchmezian V, Jarosik J, Schnell S, Hansen U-P. Distributions-per-Level: A Means of Testing Level Detectors and Models of Patch-Clamp Data. *J Membr Biol.* 2004; 197:49-58.

294. Miller C. Open-state substructure of single chloride channels from *Torpedo* electroplax. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1982; 299:401-11.

295. Kazachenko VN, Geletyuk VI. The potential-dependent K⁺ channel in molluscan neurones is organized in a cluster of elementary channels. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 1984; 773:132-42.

296. Ludewig U, Pusch M, Jentsch TJ. Two physically distinct pores in the dimeric CIC-0 chloride channel. *Nature.* 1996; 383:340-3.

297. Dani JA, Fox JA. Examination of subconductance levels arising from a single ion channel. *J Theor Biol.* 1991; 153:401-23.

298. Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. 1952. *Bull Math Biol.* 1990; 52:25-71; discussion 5-23.

299. Chapman ML, VanDongen HMA, VanDongen AMJ. Activation-

dependent subconductance levels in the drk1 K channel suggest a subunit basis for ion permeation and gating. *Biophys J.* 1997; 72:708-19.

300. Westhoff M, Eldstrom J, Murray CI, Thompson E, Fedida D. IKs ion-channel pore conductance can result from individual voltage sensor movements. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019; 116:7879-88.

301. Colquhoun D, Sheridan RE. Modes of action of gallamine at the neuromuscular junction [proceedings]. *Br J Pharmacol.* 1979; 66:78P-79P.

302. Dunn PM, Benton DCH, Campos Rosa J, Ganellin CR, Jenkinson DH. Discrimination between subtypes of apamin-sensitive Ca^{2+} -activated K^{+} channels by gallamine and a novel bis-quaternary quinolinium cyclophane, UCL 1530. *Br J Pharmacol.* 1996; 117:35-42.

303. Benton DCH, Garbarg M, Moss GWJ. The Relationship between Functional Inhibition and Binding for KCa_2 Channel Blockers. *PLoS One.* 2013; 8:

304. Cull Candy SG, Miledi R. Block of glutamate-activated synaptic channels by curare and gallamine. *Proc R Soc London - Biol Sci.* 1983; 218:111-8.

305. Rossokhin A, Teodorescu G, Grissmer S, Zhorov BS. Interaction of d-tubocurarine with potassium channels: molecular modeling and ligand binding. *Mol Pharmacol.* 2006; 69:1356-65.