

Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН
України

Дисфункції іонних каналів: від молекулярних механізмів до новітніх стратегій корекції

на здобуття щорічної Премії
Президента України для молодих
вчених

ДРИНЬ Дарія Олегівна – к. б. н., науковий співробітник
Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАНУ

МЕЛЬНИК Марія Ігорівна - к. б. н., науковий співробітник
Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАНУ

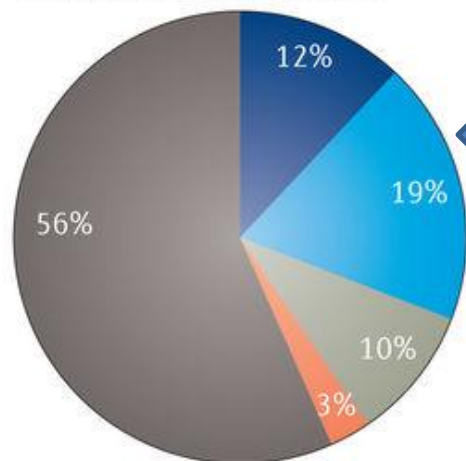
ГАЛАЙДИЧ Олег Вікторович - к. б. н., молодший науковий
співробітник Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАНУ

КИЇВ -
2020

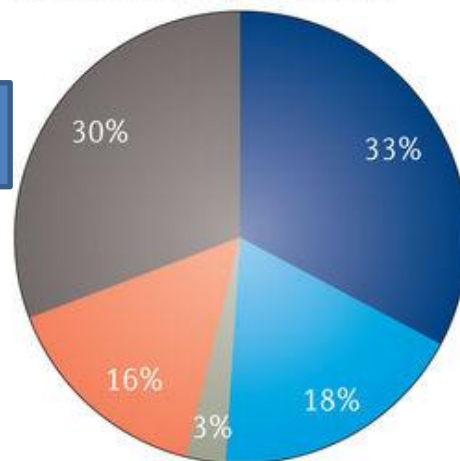
Іонні канали являються основними молекулярними мішенями для дії лікарських препаратів

Мішень дії лікарських препаратів	Мішені			Препарати		
	Загальна кількість	Низькомолекулярні мішені	Біологічні мішені	Загальна кількість	Низькомолекулярні сполуки	Біологічні сполуки
Білки людини	667	549	146	1194	999	195
Патогенні білки	189	184	7	220	215	5
Інші біомолекули людини	28	9	22	98	63	35
Інші патогенні біомолекули	9	7	4	79	71	8

Proportion of human protein drug targets in major families

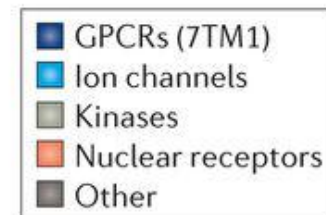


Proportion of small-molecule drugs that target major families

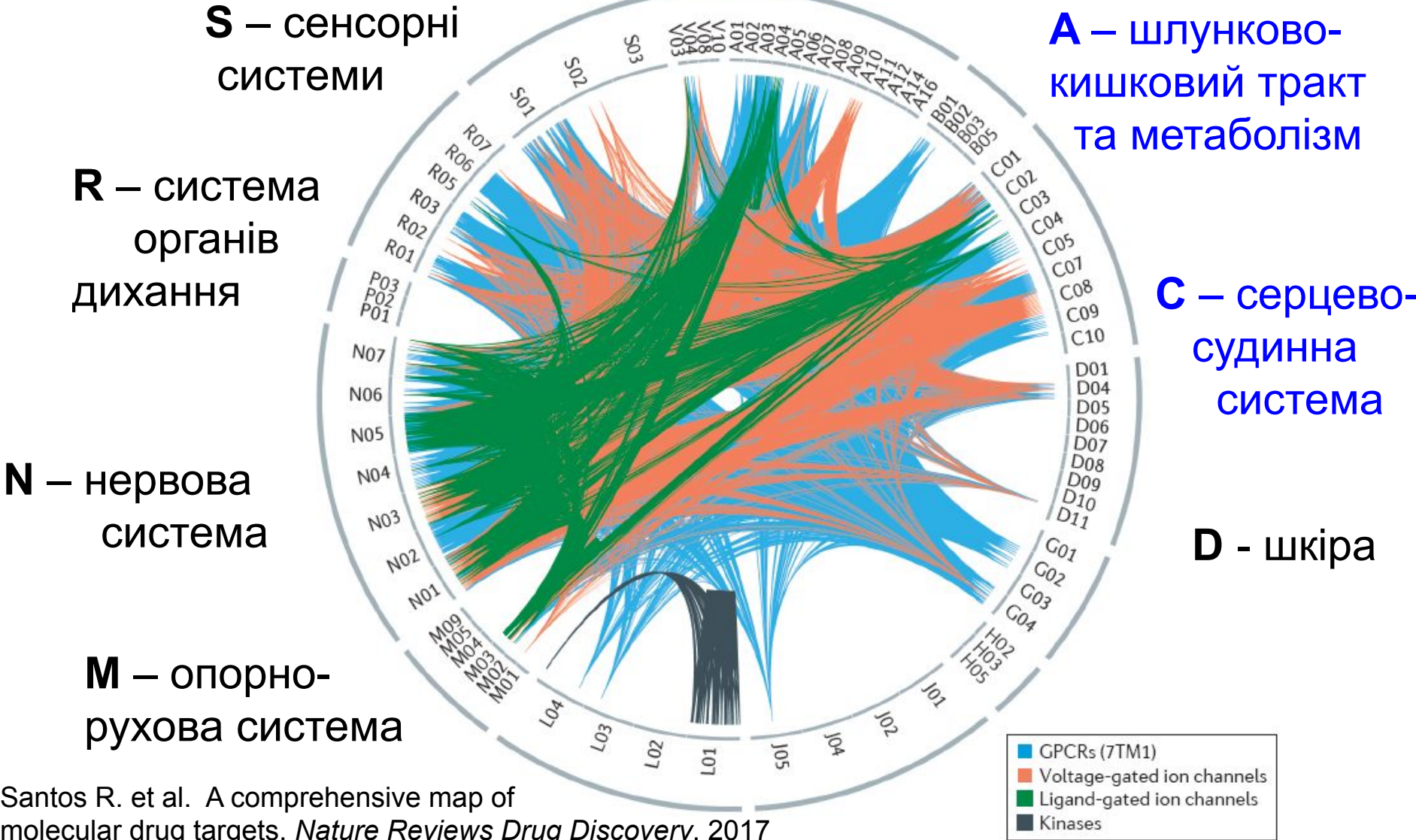


іонні канали

Основні класи білків:

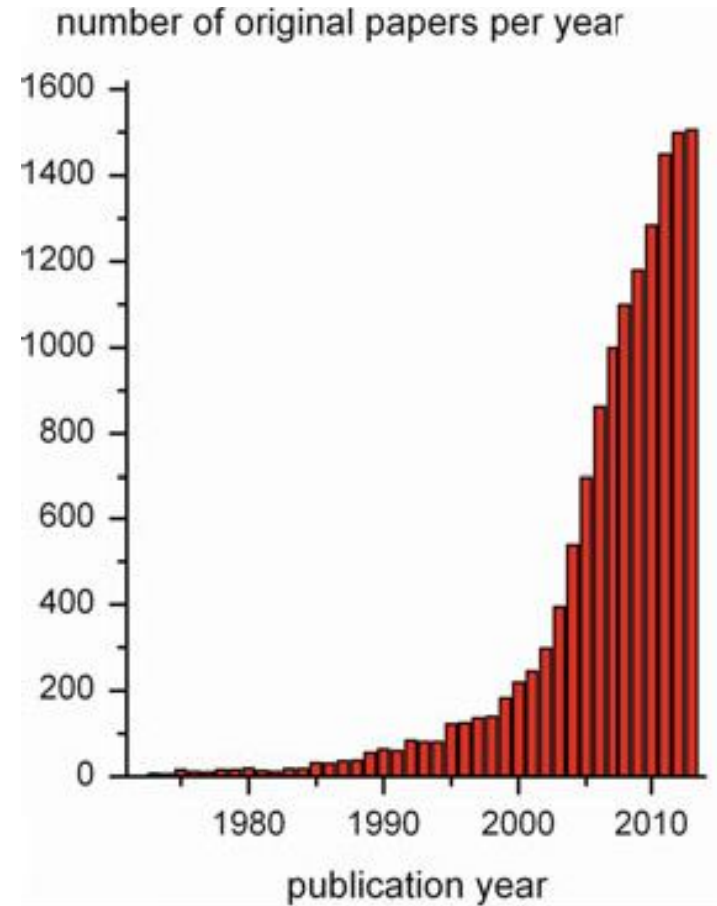
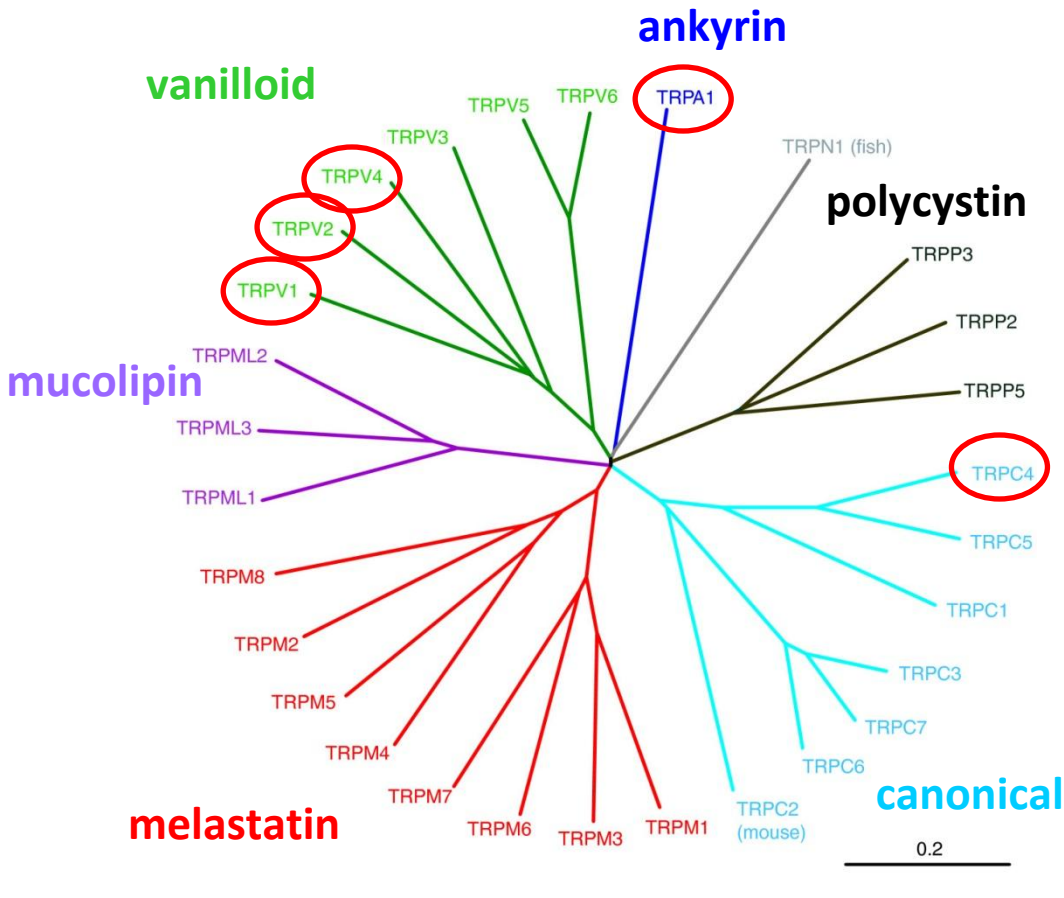


Іонні канали та G-білки є молекулярними мішенями для дії лікарських препаратів зазначеної органної специфікації



Santos R. et al. A comprehensive map of molecular drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2017

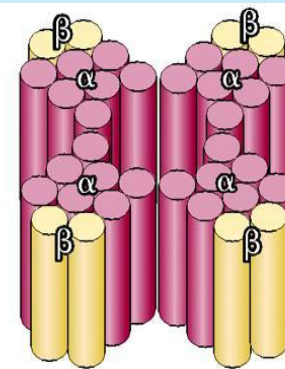
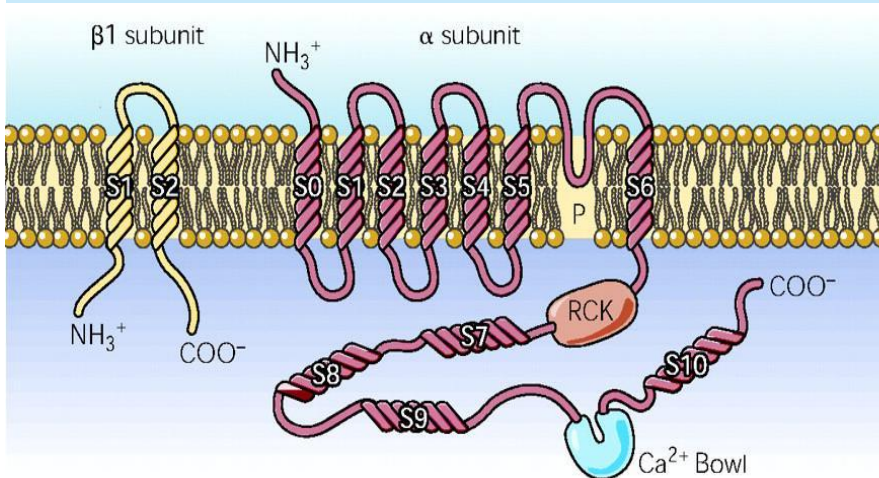
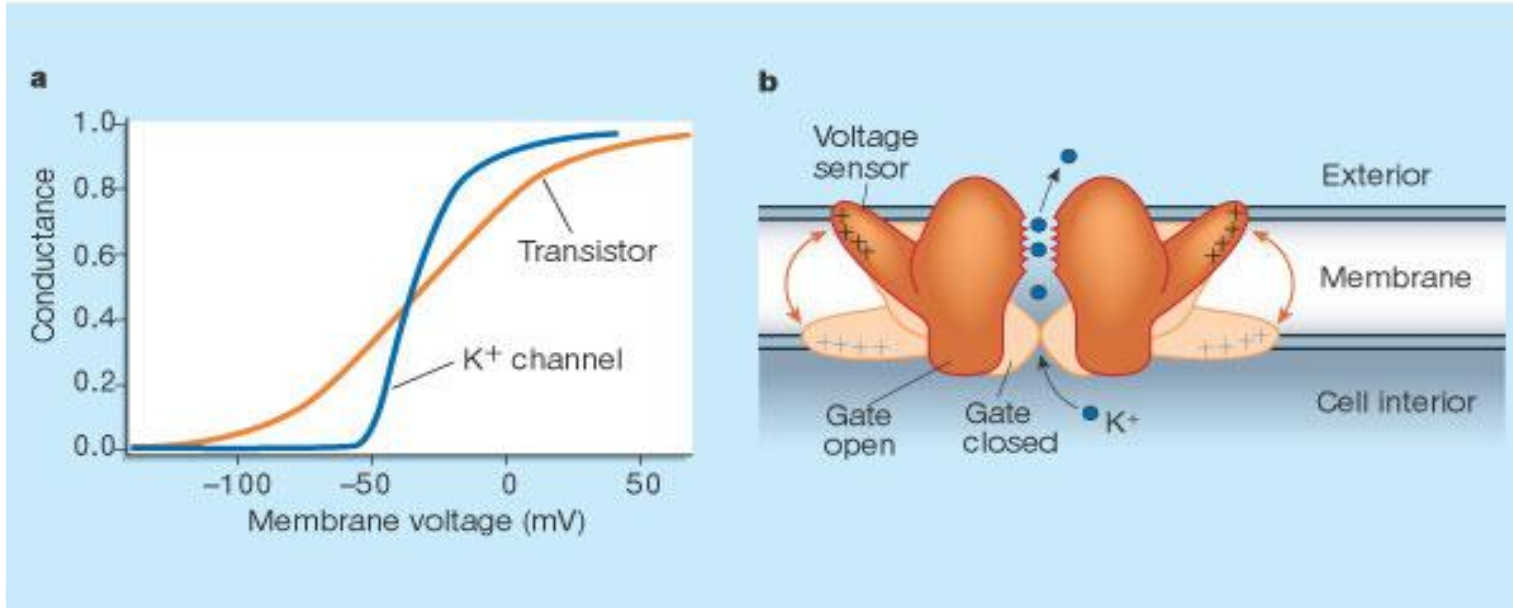
Родина катіонних кальційпроникних TRP каналів являється потенційною мішенню дії лікарських препаратів для корекції патологій, що пов'язані з дисфункцією цих каналів, і актуальність таких досліджень зростає щороку



Філогенетичне дерево людських TRP-каналів

“TRPs mediate sensory transduction, not only in a classical sense, for the entire multicellular organism, but also at the level of single cells” (D. Clapham)

Кальційчутливі калієві канали великої провідності (ВК_{Ca}) відіграють важливу роль для підтримання судинного тону та являються перспективними мішенями для дії лікарських препаратів



структура
ВК_{Ca} каналу

Від молекули до функції, а потім дисфункції та нових стратегій фармакологічної корекції

Метою циклу робіт було дослідження ролі:

- осмо-, термо- та механочутливого TRPV4
- термочутливих TRPV1 та TRPA1
- рецептор-керованого TRPC4
- ВКса-каналів

у васкулопатіях різної етіології, включаючи діабетичні та гіпоксичні зміни, порушеннях скоротливої функції кишечника, зокрема внаслідок дії загальних анестетиків та виникнення запального процесу, розвитку реакції свербіння при контактному дерматиті, а також випробування новітніх фармакологічних модуляторів цих іонних каналів різної природи з метою корекції зазначених патологічних станів.

- Розробка кількісних методів функціональної оцінки клітин диференційованих з людських індукованих стовбурових плюрипотентних клітин (ліПСК) як платформи для виявлення патофізіологічних фенотипів та скринінгу фармакологічних препаратів на донор-специфічних клітинах людини *in vitro*.

Проблематика дослідження

Об'єкт дослідження.

Функціональна експресія, механізми активації і функції TRP- та VK_{Ca} -каналів у гладеньком'язових клітинах в нормі та за умов патологій різного генезу, а також гладеньком'язові та ендотеліальні клітини диференційовані з лІПСК.

Предмет дослідження.

Взаємозв'язок ключових ланок TRP- та VK_{Ca} - опосередкованої сигналізації у взаємодії з іншими каналами і рецепторами у регуляції тону судин і скоротливої функції кишечника.

Кількісна оцінка кінетики вивільнення кальцію, клітинного скорочення, запальних реакцій, ендотеліального бар'єру та васкулогенезу для виявлення патофізіологічних станів.

Автори циклу робіт мають компліментарні наукові інтереси та технічну експертизу як в галузі дослідження іонних каналів, так і в кількісних методах функціональної оцінки на рівні популяцій клітин, які обґрунтовано потребують подальших досліджень у контексті каналопатій.

Методи дослідження

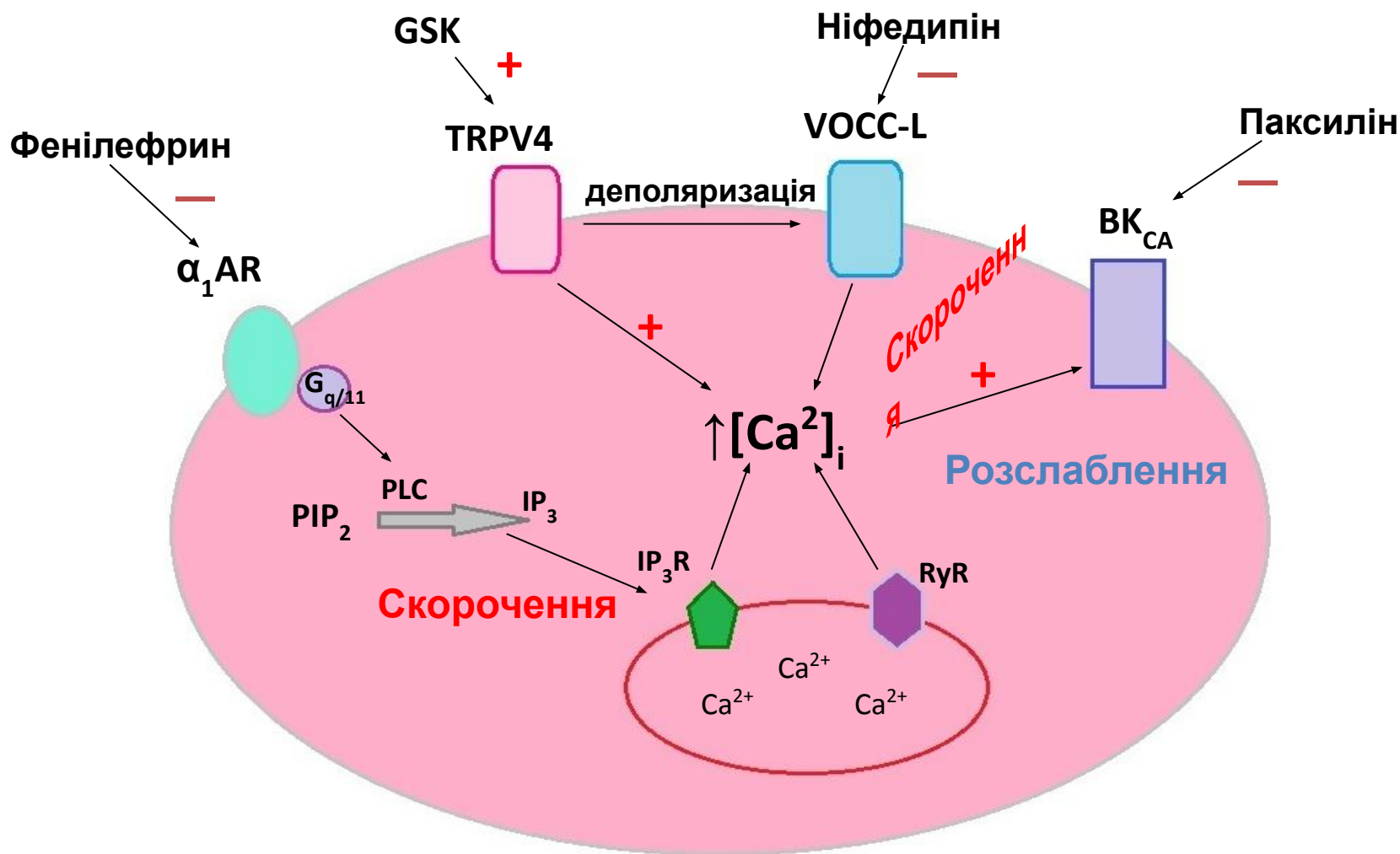
Для вирішення поставлених завдань буде застосований комплексний і міждисциплінарний підхід, який базується на використанні низки сучасних біофізичних, біохімічних, цитологічних, фізіологічних та фармакологічних методів:

- Петч-клемп в конфігурації *whole-cell* та *cell-attached*
- Тензометрія
- Фармакологічний аналіз
- Біоінформатика (програми TMRPres2D, UniProt, BLAST, ClustalX 2.1)
- Флуоресцентна мікроскопія живих клітин
- Кількісна обробка зображень та автоматичний аналіз даних
- Мікрофлюїдика

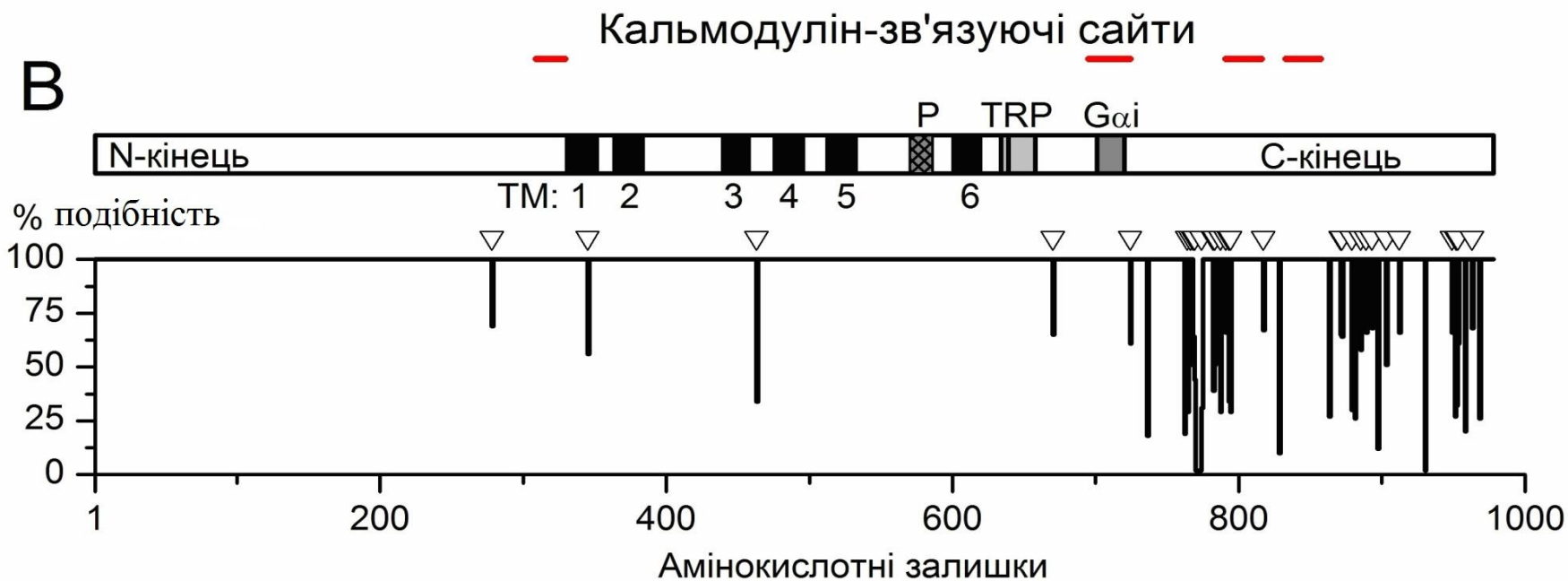
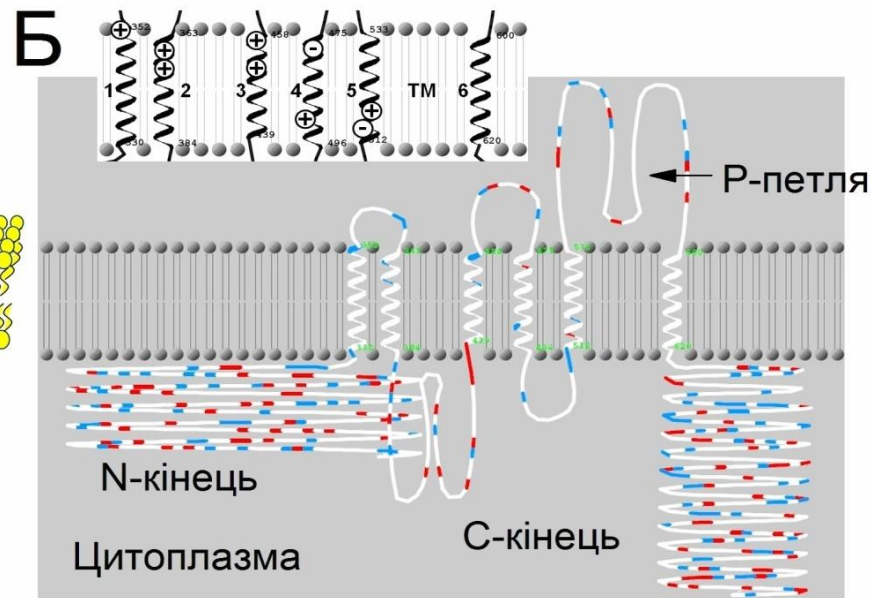
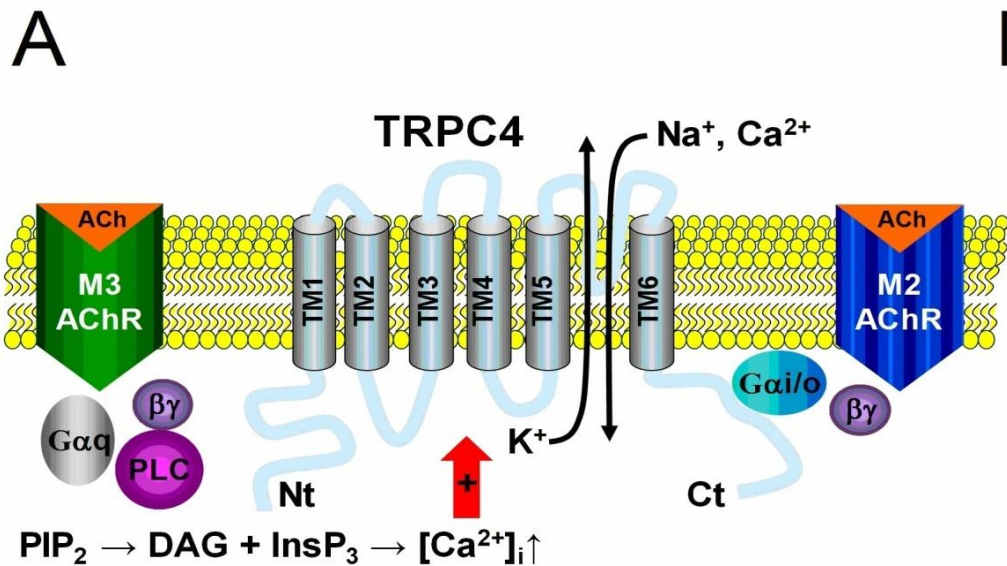
Було використані такі експериментальні моделі патологій:

- стрептозотоцин-індукований діабет
- гіпоксично-індукована легенева гіпертензія
- контактний атопічний дерматит

Узагальнююча схема, яка пояснює двофазну відповідь легеневих артерій, попередньо скорочених ФЕ, внаслідок активації TRPV4-каналів їх селективним агоністом GSK.



Біоінформатичний аналіз TRPC4 протеїну



Порівняльний аналіз біофізичних властивостей mI_{KAT} миші і морської свинки

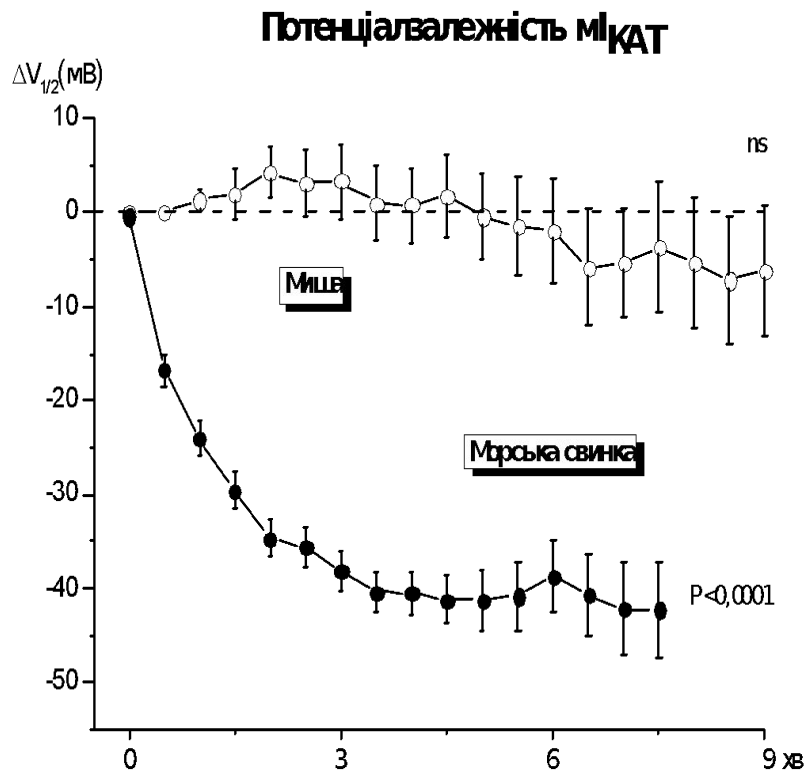


Рис.1 Найбільші відміни спостерігалися у взаємодії G-білків з С-кінцем каналу.

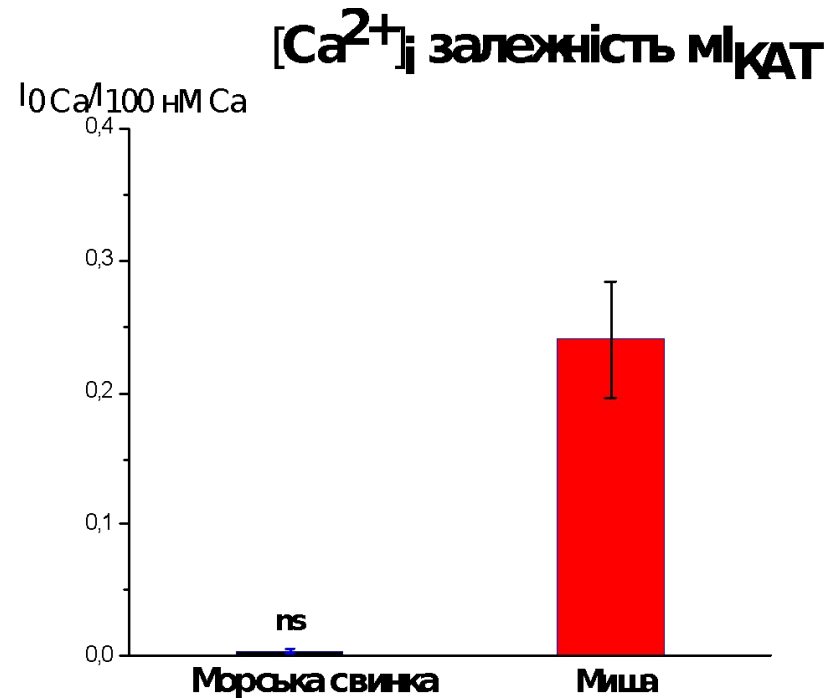
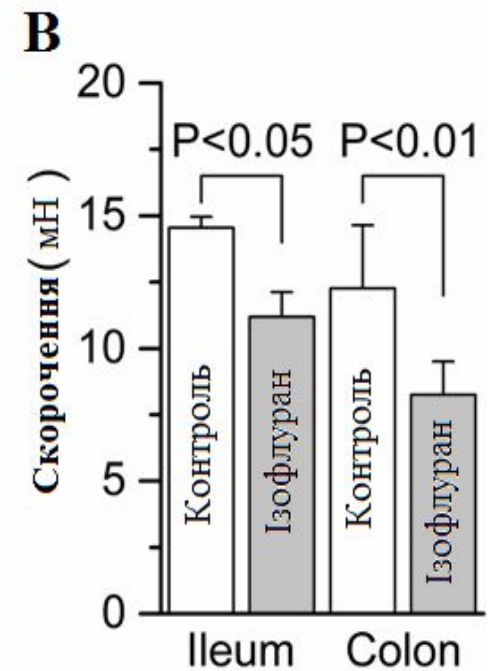
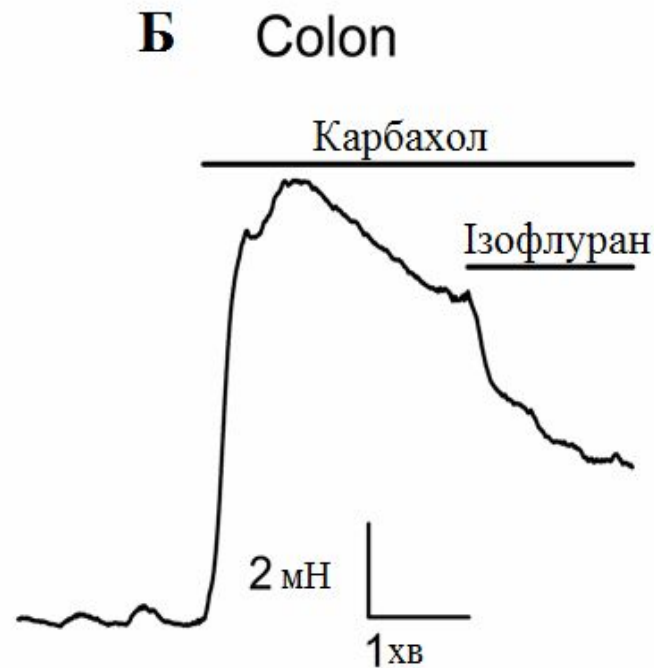
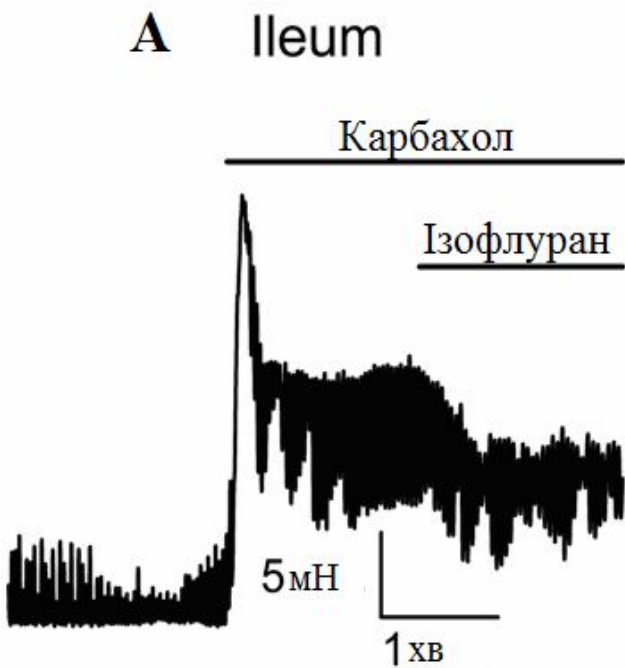
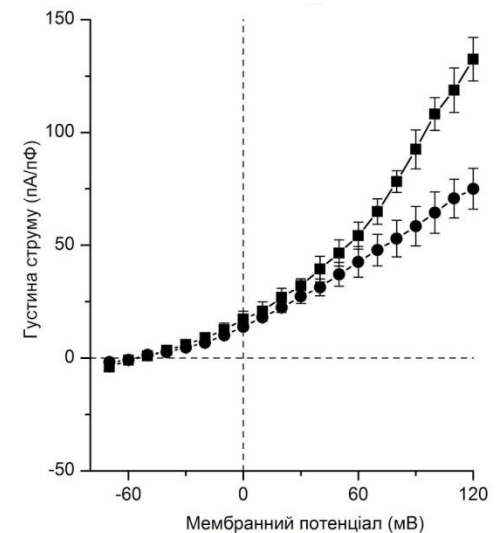
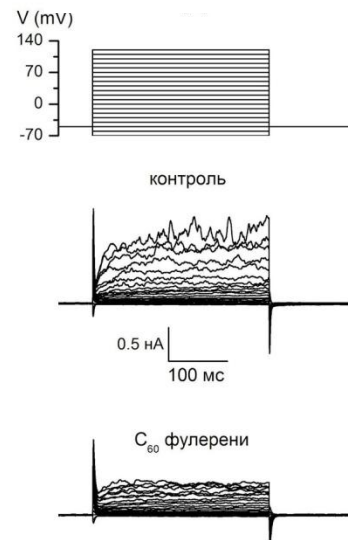
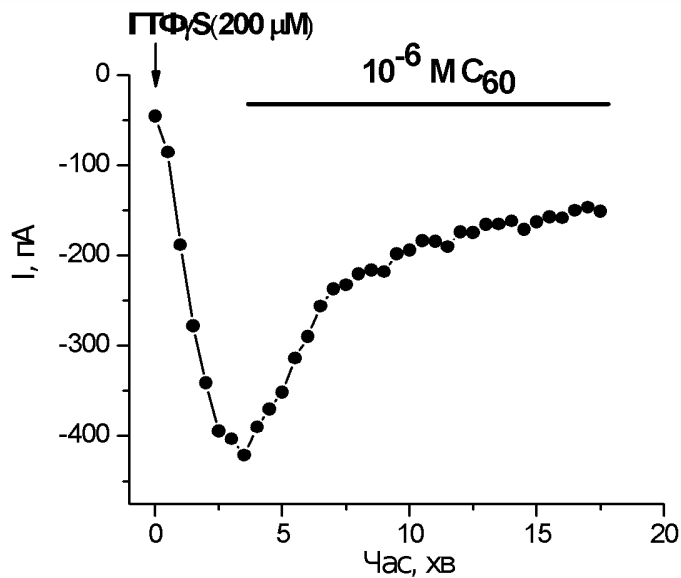
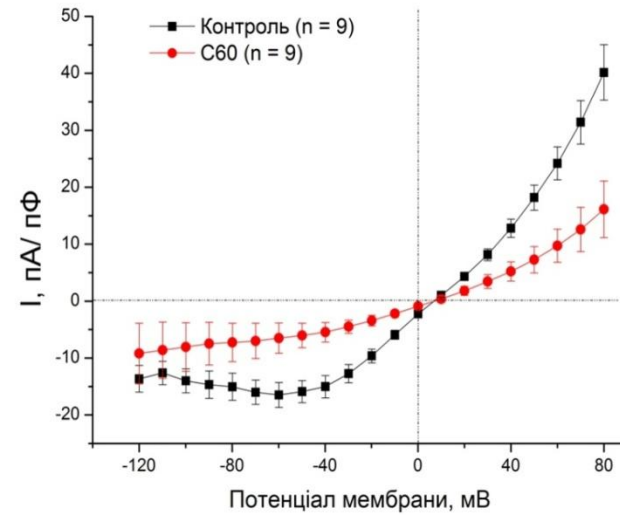
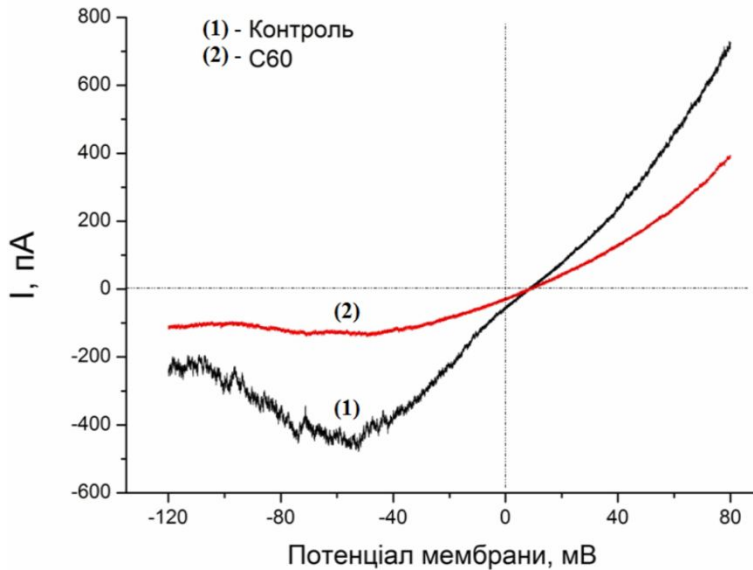


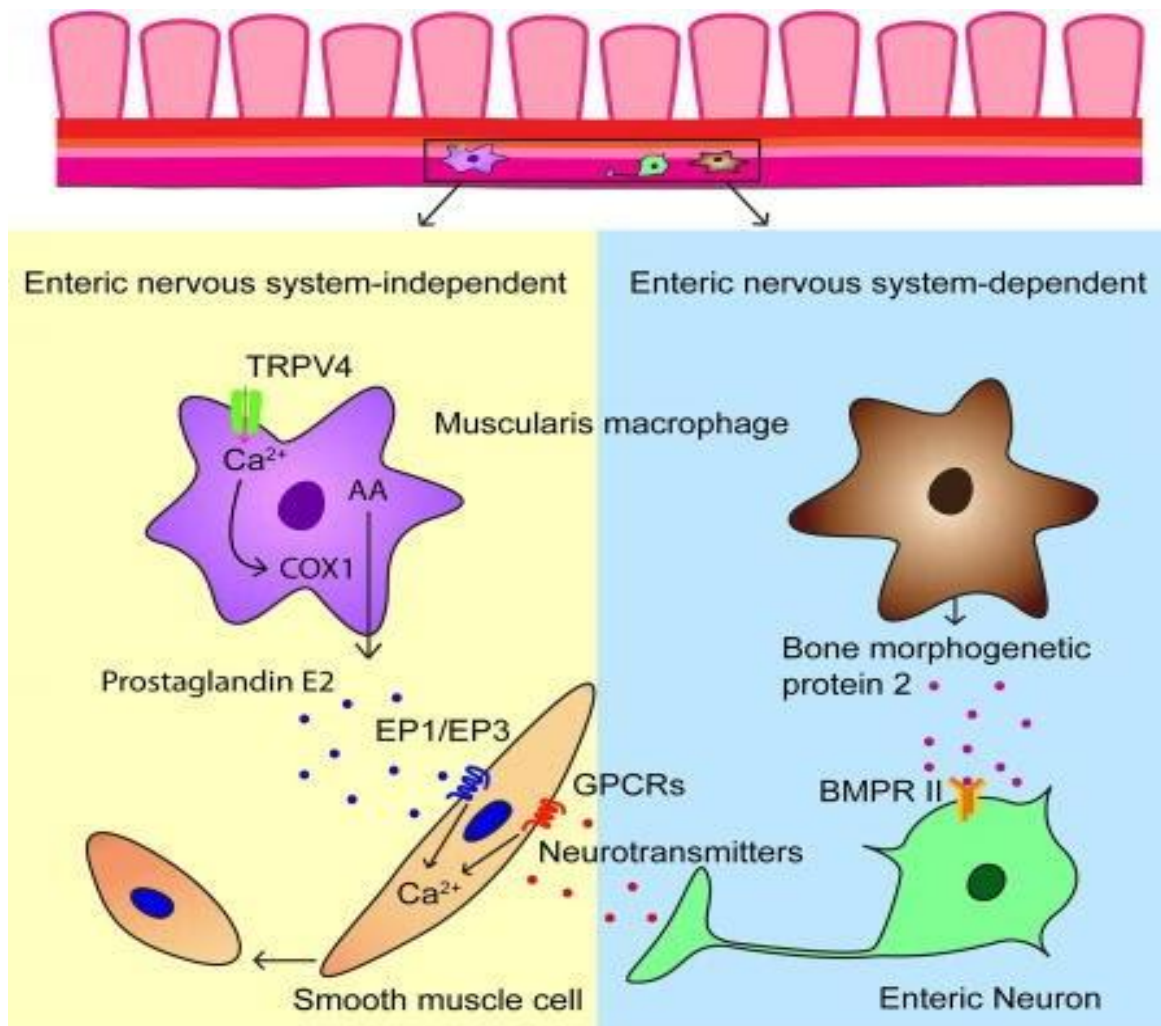
Рис.2 Порівняльний аналіз $[Ca]_i$ залежності у морської свинки ($n = 3$) і миші ($n = 5$) у відповідь на карбахол.

Ефект ізофлурану на карбахол-індуковані скорочення кишечника



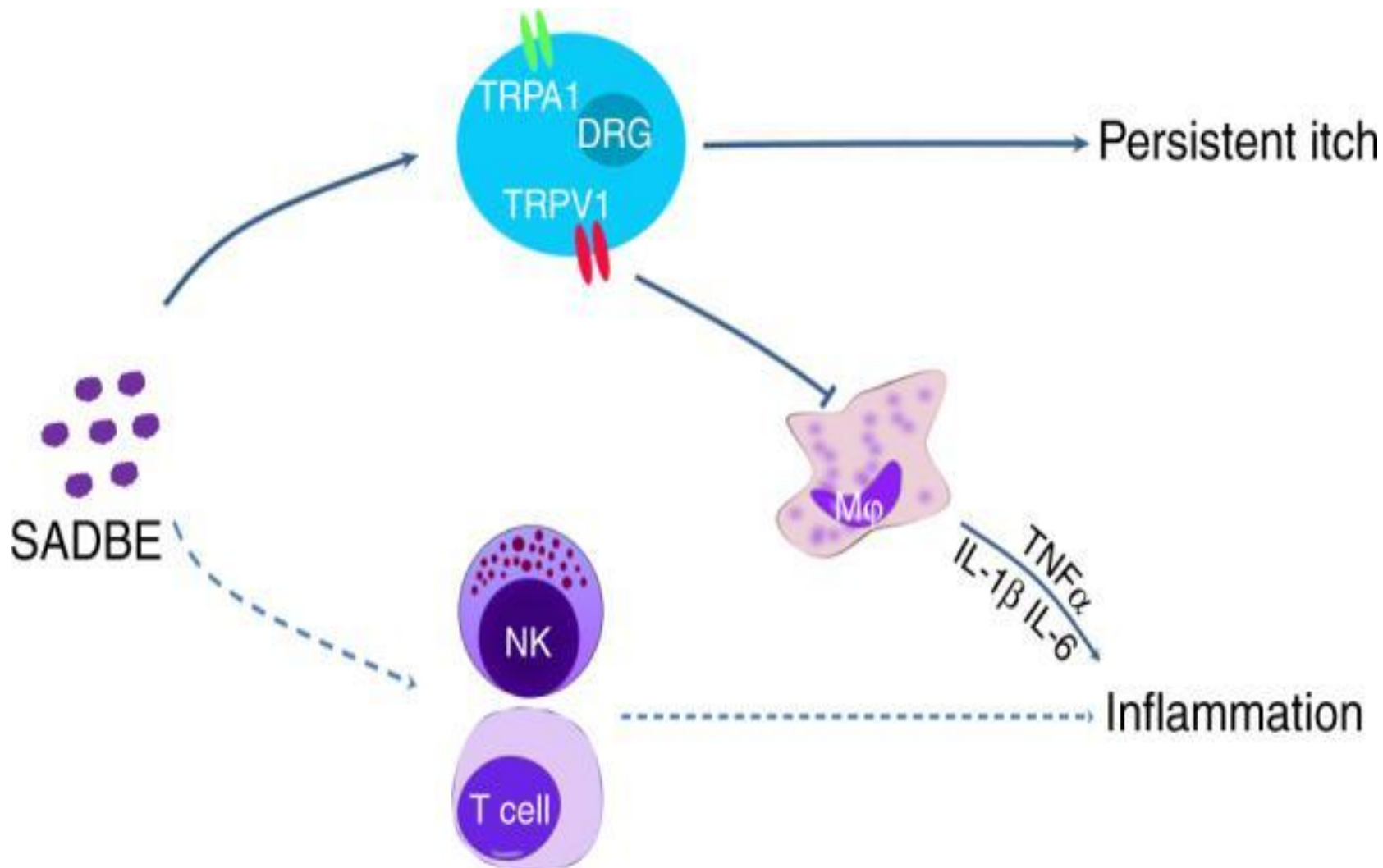
Інгібуюча дія фулеренів C_{60} на мускариновий катіонний та калієвий струми у гладеньких м'язах тонкого кишечника миші



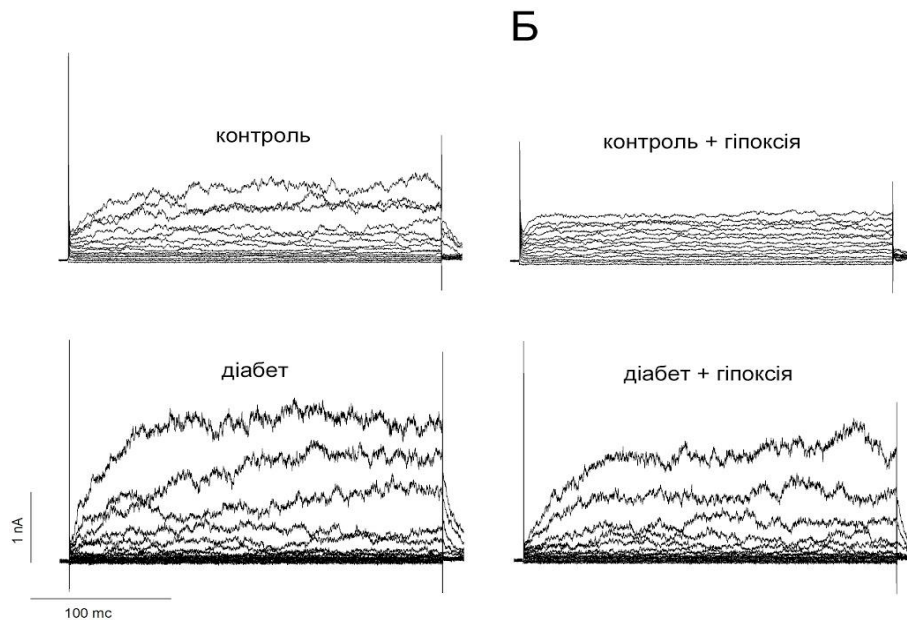
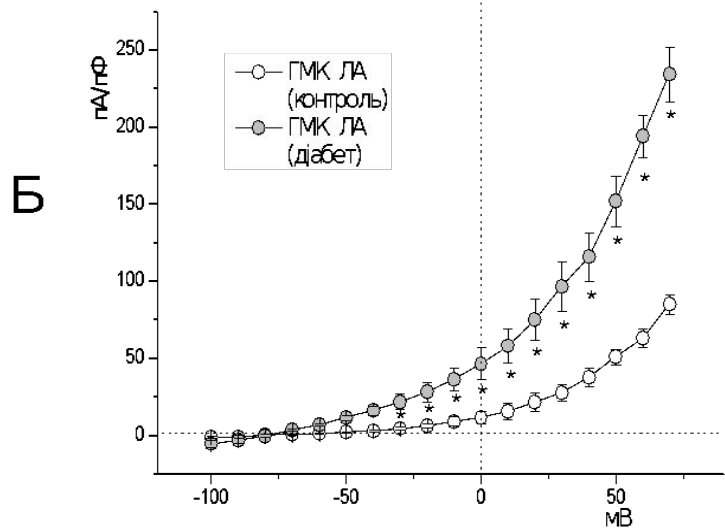
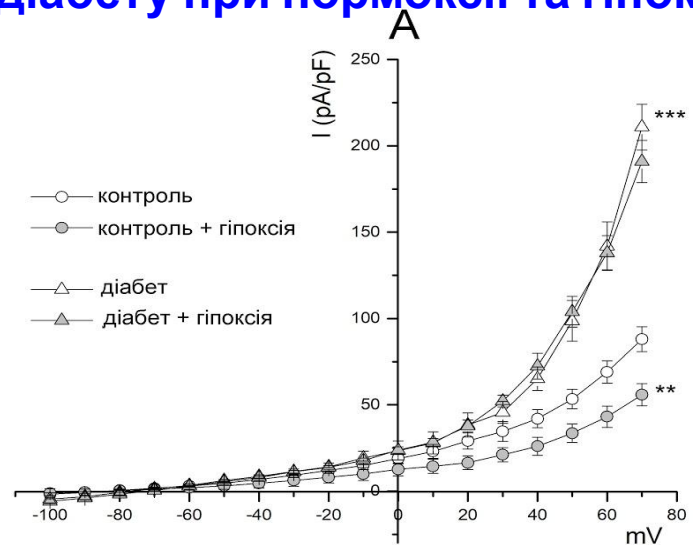
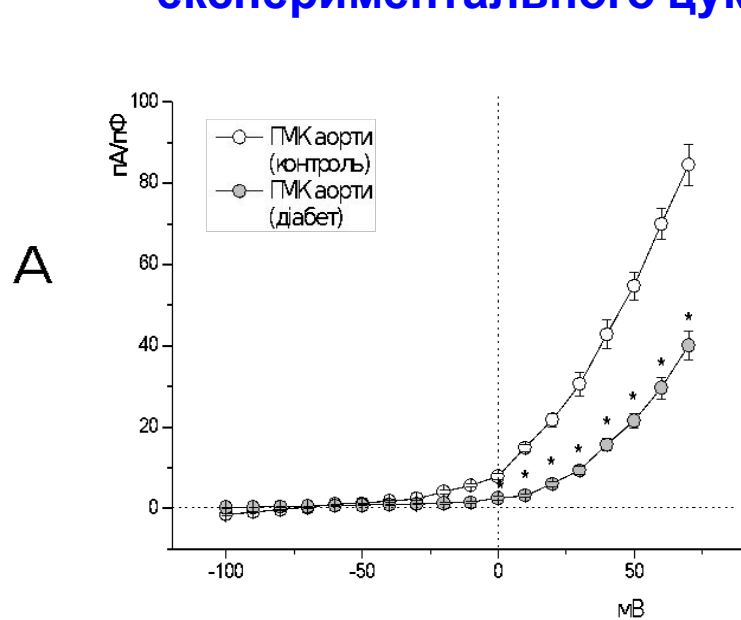


Макрофаги кишечника, що експресують TRPV4-канали, сприяють рухливості шлунково-кишкового тракту, безпосередньо впливаючи на функцію гладеньком'язових клітин кишечника, незалежну від ентеральної нервової СИСТЕМИ

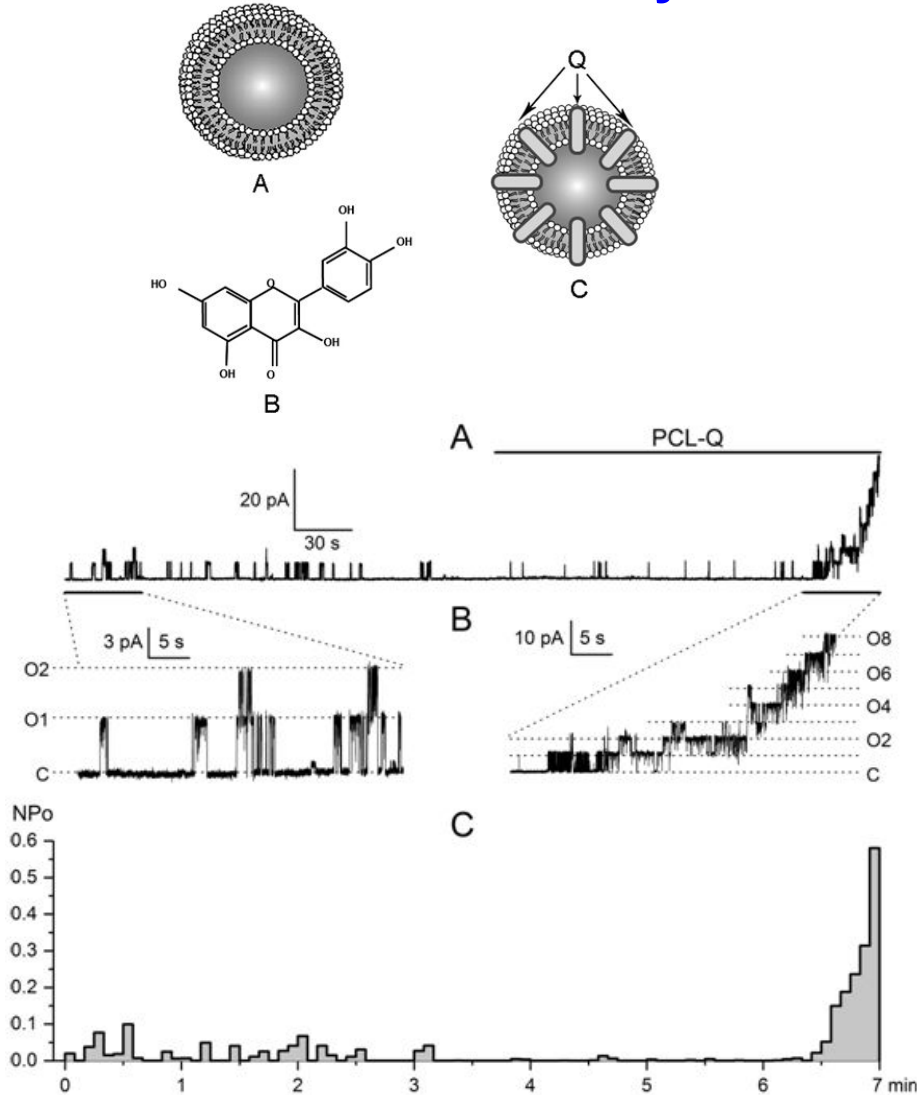
Сенсорні TRP-канали діють по-різному при запаленні шкіри та хронічному свербіжу у моделі atopічного дерматиту



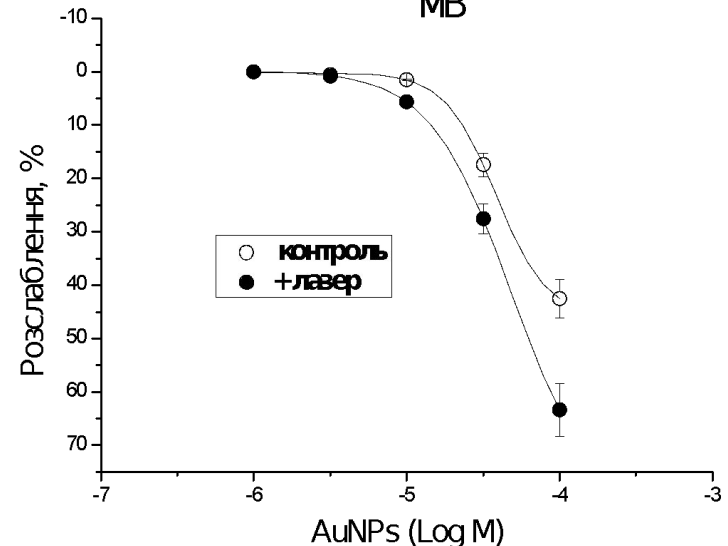
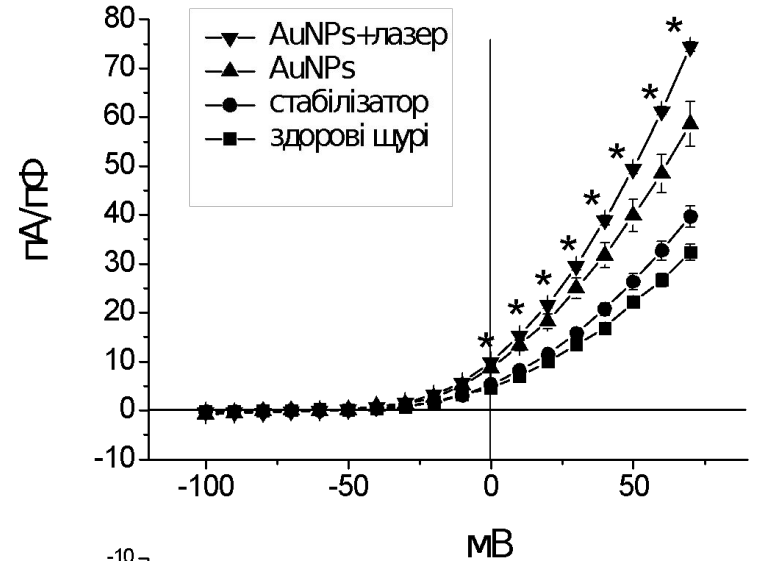
Зміни загального калієвого струму гладеньком'язових клітин аорти, зовнішньо- та внутрішньолегених артерій щурів за умов експериментального цукрового діабету при нормоксії та гіпоксії



Ліпосомальний кверцетин та наночастинки золота є активаторами калієвих каналів у гладеньком'язових клітинах тонкого кишечника миші та легневих артерій щурів



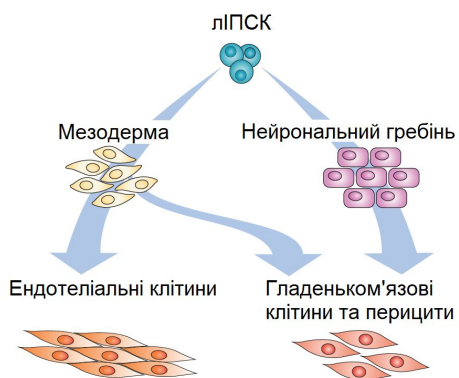
Активуючий ефект ліпосомального кверцетину на поодинокі калієві канали



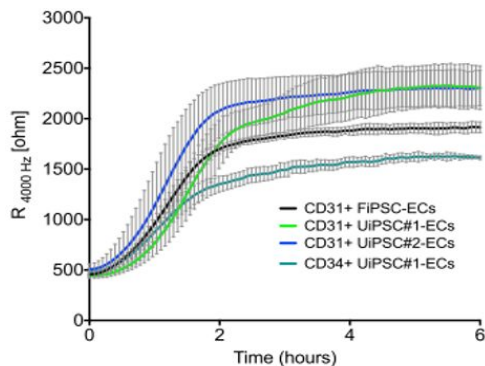
Наночастинки золота збільшують калієвий струм та розслаблюють судини

Функціональний аналіз ендотеліальних клітин диференційованих з людських індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (ліПСК-ЕК)

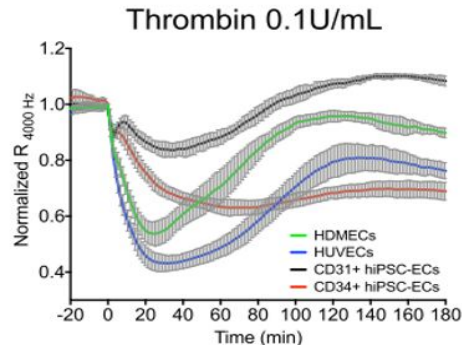
Диференція ліПСК



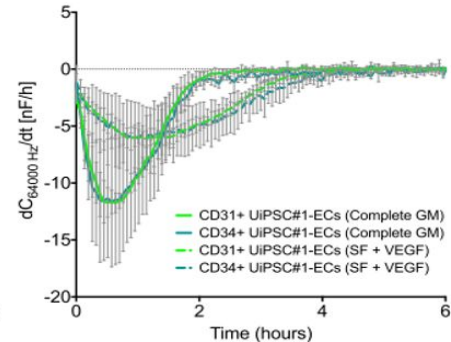
Бар'єрна функція



Ефект судинозвужувальних препаратів

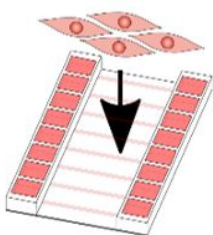


Клітинна міграція

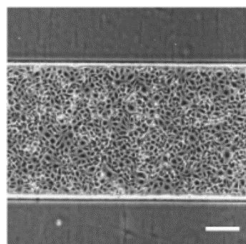


Адгезія лейкоцитів під фізіологічним потоком до ліПСК-ЕК стимульованих про-запальним фактором ($TNF\alpha$)

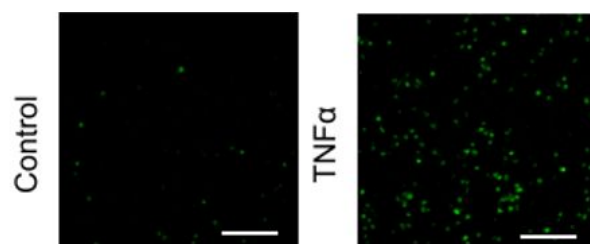
Мікрогідродинамічна система



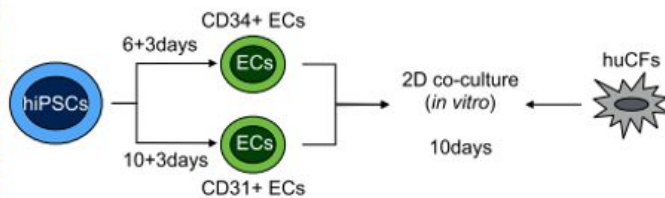
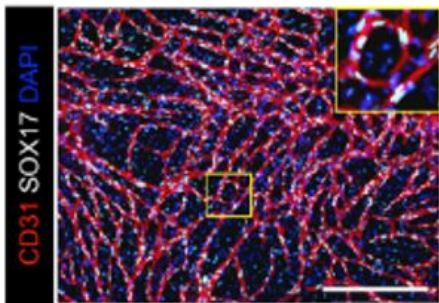
ліПСК-ЕК в каналі



Адгезія лейкоцитів до ліПСК-ЕК після стимуляції



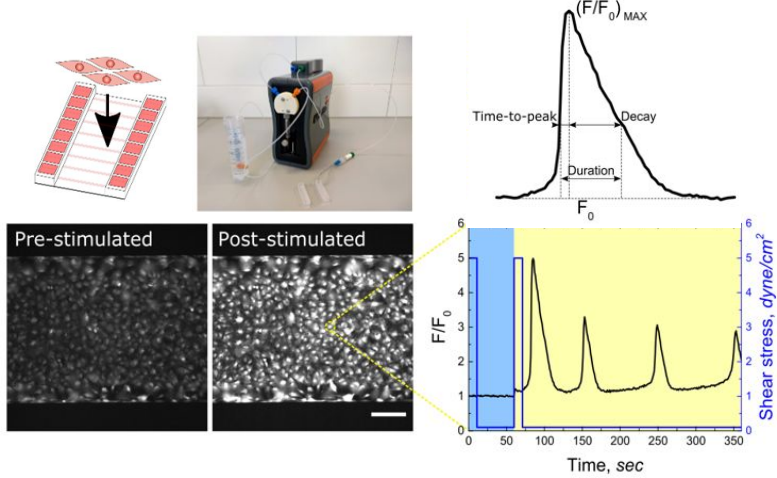
Формування протосудин з ліПСК-ЕК в ко-культурі зі стромальними клітинами



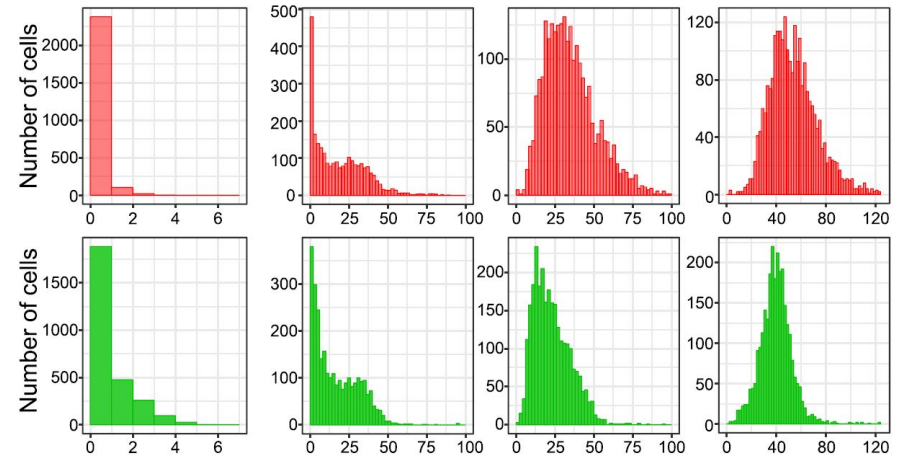
Функціональний аналіз гладеньком'язових клітин диференційованих з людських індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (ліПСК-ЕК)

Вивільнення внутрішньоклітинного кальцію під дії судинозвужувальних препаратів

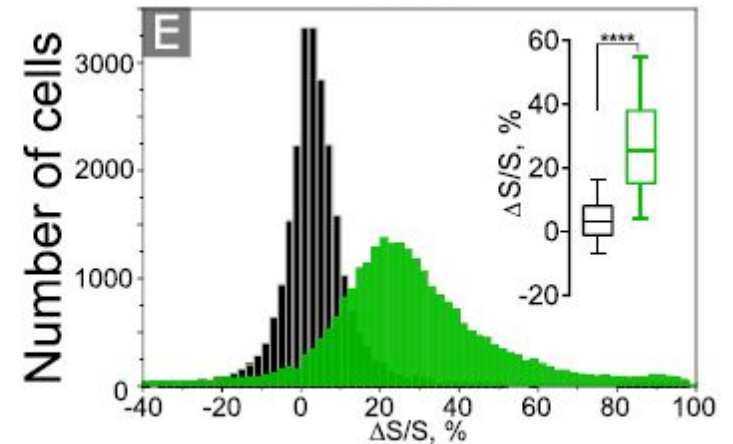
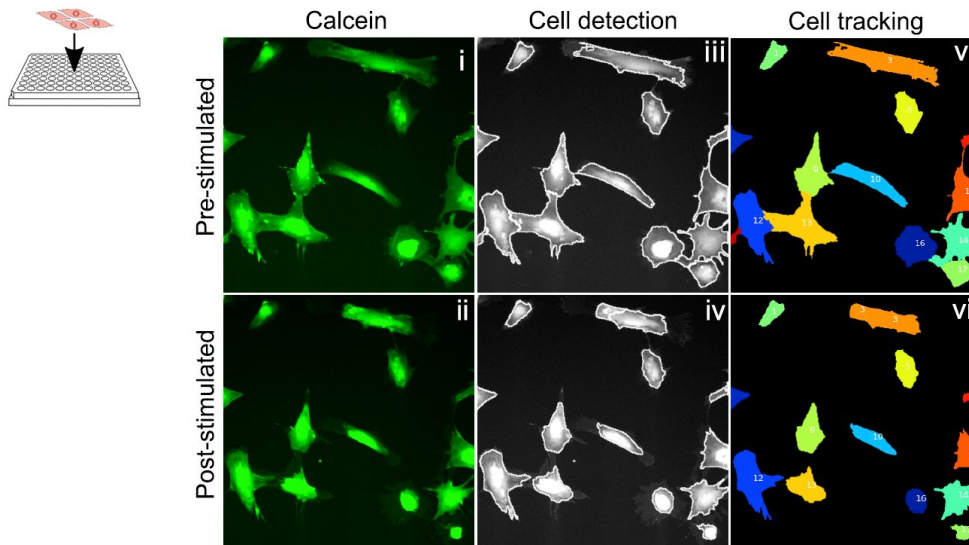
Мікрогідродинамічна система



Точне визначення кінетичних параметрів вивільнення кальцію



Скорочення ліПСК-диференційованих гладеньком'язових клітин



ВИСНОВКИ



- 1) Дослідили роль: TRPV4, TRPV1 та TRPA1, TRPC4, BKсa-каналів у нормі та патології судин, включаючи діабетичні та гіпоксичні зміни, порушеннях скоротливої функції кишечника, зокрема внаслідок дії загальних анестетиків та виникнення запального процесу, розвитку реакції свербіння при контактному дерматиті;
- 2) Вивчили вплив новітніх фармакологічних модуляторів перелічених іонних каналів з метою корекції зазначених патологічних станів;
- 3) Розробили кількісні методи функціональної оцінки гладеньком'язових та ендотеліальних клітин диференційованих з індукованих плюрипотентних стовбурових клітин людини.

Кількість публікацій: 38, 22 статей (17 – у англomовних журналах з імпакт-фактором), 16 тез доповідей. Загальна кількість посилань на публікації авторів/ h-індекс роботи, згідно баз даних складає відповідно: Web of Science – 47/6, Scopus–51/7, Google Shcolar –78/ 9. Отримано 1 патент України на винахід.

IF = 3.8

IF = 11.9

IF = 21.5

IF = 2.7

IF = 5.5

IF = 6.5

IF = 3.2

