

RAPORT DE FAZA – 15 septembrie 2009 Proiect PNI Idei 326/2007

Obiectivele fazei:

1. Studiul efectelor Ginkgolidei B asupra membranelor lipidice artificiale prin metoda BLM
2. Studiul efectelor Ginkgolidei B asupra receptorilor nicotinici de acetilcolina (rezultate preliminare)

Introducere

Extractele de Ginkgo biloba (Alkhonzadeh & Abassi, 2006; Dos Santos-Neto et al, 2006) sunt intrate in practica neurologica actuala, fiind indicate in principal pentru efectele lor de neuroprotectie. Extractul de Ginkgo biloba contine doua grupuri importante de substante: ginkgolidele si bilobalidele. in cadrul ginkgolidelor se remarca Ginkgolida B (GKB = BN 52021) ca fiind mai activa biologic. in boala Alzheimer, administrarea de GKB in cadrul unor studii clinice este asociata cu antagonizarea actiunii beta-amiloidului (Alkhonzadeh, 2006) si cu efecte moderate (mai putin semnificative decat in cazul inhibitorilor de cholinesteraza) asupra deficitului cognitiv (Dos Santos-Neto, 2006).

Mecanismele cunoscute de actiune ale GKB se pot incadra in trei categorii: actiune antiagreganta plachetara, actiune asupra neurotransmisiei (la nivel de receptori postsinaptici) si actiune neuroprotectoare, posibil legata de efectele asupra neuroreceptorilor. Activitatea antiagreganta plachetara a GKB se realizeaza prin interventia asupra factorului de activare plachetar PAF (Lynch, 2004 - review). Indirect, GKB actioneaza si asupra altor lanturi de reglare care implica PAF; inhibitia expresiei adrenotransferinei este un exemplu in acest sens (Amri et al, 2004).

GKB are efecte inhibitorii asupra receptorilor de glicina si GABA (Ivic et al, 2003; Lynch, 2004; Huang et al, 2004), cu specificitate mai mare asupra receptorilor de glicina decat asupra celor de GABA (Lynch, 2004). Efectele asupra receptorilor de glicina sunt voltaj-dependente (Lynch, 2004) si presupun legarea de receptorul deschis, cu un situs de legare probabil in interiorul canalului ionic (Ivic et al, 2003). si asupra receptorilor de GABA efectul este necompetitiv si maxim la concentratii de GKB de 10 μ M (Huang et al, 2004).

Sunt raportate, de asemenea, efecte antiapoptotice ale GKB pe o linie celulara de feocromocitom (Bonin et al, 2004). Extrem de interesant, si cu implicatii majore in tratamentul unor maladii incurabile (maladia Creutzfeld-Jacobs, cunoscuta si ca encefalopatie spongiforma sau "boala vacii nebune") este efectul raportat de Bate si colab (Bate et al, 2004), de inhibare a replicarii prionice in trei linii celulare infectate cu prioni.

Cercetarile efectuate de noi in etapele anterioare ale acestui proiect, asupra bistraturilor lipidice artificiale pe suport solid (metoda SSM), au aratat ca GKB potenteaza efectele anionilor Hofmeister la nivelul membranelor lipidice de DPPC, DPPC-colesterol si DOPG. In etapa prezenta ne-am propus completarea studiilor efectelor GKB asupra membranelor lipidice prin alta metoda, BLM (black lipid membranes), care sa ne permita obtinerea de informatii asupra fenomenelor de stare stationara asociate interactiunii GKB-lipid. In continuare, am extins studiul asupra receptorilor nicotinici de acetilcolina de tip muscular, in vederea obtinerii unor rezultate preliminare care sa permita orientarea cercetarilor in ultima etapa a proiectului de fata.

I. Studiul efectelor Ginkgolidei B asupra membranelor lipidice artificiale prin metoda BLM

Material si metoda

Metoda BLM. Metoda BLM (pentru detalii vezi Bamberg et al, 1979) presupune constructia unei membrane artificiale lipidice pe un orificiu cu diametrul de aproximativ 1 mm, situat pe peretele despărțitor dintre două compartimente ale unei cuve de teflon. Cele două compartimente sunt umplute cu soluții electrolitice. Metoda permite măsurarea în dinamică a parametrilor electrici ai membranei artificiale (capacitate, conductanță) cu ajutorul unor electrozi de Ag/AgCl₂ introduși în compartimente separate umplute cu soluții electrolitice, care comunică prin intermediul unor punți de agar cu cele două compartimente ale cuvei. Unul dintre electrozi este conectat la un generator de funcții, iar cel de-al doilea la un amplificator. Semnalele electrice filtrate și amplificate pot fi urmărite pe ecranului unui osciloscop.

Substanțe și soluții. Membranele lipidice artificiale au fost construite din diftanoil-fosfatidil-colina (DPPC), la care s-a adăugat octadecilamina în concentrație de 0.025% (procent masic) și, la o parte din membrane, colesterol. Toate lipidele au fost procurate de la Avanti Polar Lipids, iar octadecilamina de la Riedel-de Haen, Hannover, Germania. DPPC a fost depozitată sub forma de stoc în cloroform, cu concentrația de 20 mg/ml, iar colesterolul sub forma de pulbere anhidra. Soluțiile finale pentru construcția membranelor au fost realizate prin evaporarea în atmosfera de azot a unei cantități corespunzătoare din soluția stoc și redizolvarea în decan, și au avut concentrația de 1.5 g lipid/100ml; când a fost prezent, colesterolul a avut o concentrație de 10% din cantitatea totală de lipid din soluție. Pentru impregnarea orificiului unde se construiește membrana s-a realizat o soluție de DPPC în hexan, cu concentrația de 3.75 mg/ml.

GKB (Ginkgolida B din frunze de Ginkgo Biloba, puritate 90%, Sigma) a fost dizolvată ca stoc 100 mM în etanol (refrigerat), din care s-au realizat diluții succesive în apă ultrapură, până la concentrațiile dorite.

Compartimentele cuveții au fost umplute cu soluție de NaCl 100mM + HEPES 20 mM, pH 7 (NaOH) (substanțele procurate de la Sigma).

Protocol de lucru. După impregnarea orificiului cuveții cu 2 x 2 μ l soluție DPPC/hexan (cate 2 μ l pe fiecare parte a peretelui) și umplerea fiecăruia din cele două compartimente ale cuveții cu cate 2 ml soluție NaCl 100 mM + HEPES 20 mM (pH 7), membranele au fost construite utilizând 4 μ l soluție lipidică în decan. Stabilizarea membranei a fost urmărită prin monitorizarea parametrilor electrici (capacitate, conductanța), până când acestea au rămas constante la măsurători repetate la intervale de 10 minute (pentru majoritatea membranelor, durata totală a fost de aprox. 30 minute). Am urmărit variația parametrilor electrici (capacitate, conductanță) ai membranei lipidice artificiale în prezența unor concentrații progresiv crescute de GKB, pornind de la 1 nM până la 100 μ M (GKB a fost adăugată bilateral, în cantitatea necesară, din soluții de concentrații diferite obținute prin diluarea stocului în apa ultrapură, astfel încât cantitatea totală de soluție adăugată la un pas să nu depășească 20 μ l).

Prelucrarea datelor experimentale. Pentru fiecare măsurătoare în parte, valorile capacității și conductanței membranare au fost normalizate prin raportare la valorile acestor parametri înainte de adăugarea galantaminei (C_0 – capacitatea membranală inițială, G_0 – conductanța membranală inițială). Pentru fiecare tip de experiment, datele obținute pentru 5-6 membrane diferite au fost mediate. Prelucrarea statistică a datelor a fost realizată cu programul QtiPlot 0.9.7.4 (Copyright 2004-2008 Ion Vasilief, licență GNU-GPL).

Rezultate si discutii

Atat capacitatea cat si conductanta membranelor lipidice artificiale din DPPC, cu sau fara colesterol, s-a modificat in functie de concentratia de GKB adaugata. Valorile obtinute (dupa normalizarea la valoarea initiala, control, masurata in absenta ginkgolidei) sunt prezentate in tabelul 1.

Tabel 1-A. Variatia capacitatii membranare in functie de concentratia de GKB

GKB (μM)	DPPC	eroare (\pm)	DPPC-col	eroare (\pm)
0.000	1.000	0.000	1.000	0.000
0.001	1.02	0.037	1.010	0.012
0.010	1.07	0.05	1.05	0.02
0.100	1.14	0.09	1.06	0.03
1.000	1.29	0.18	1.08	0.03
10.000	1.37	0.2	1.1	0.04
100.000	1.380	0.232	1.108	0.042

Tabel 1-B. Variatia conductantei membranare in functie de concentratia de GKB

GKB (μM)	DPPC	eroare (\pm)	DPPC-col	eroare (\pm)
0.000	1.000	0.000	1.000	0.000
0.001	1.08	0.103	0.784	0.107
0.010	1.04	0.08	0.89	0.1
0.100	1.11	0.09	0.81	0.12
1.000	1.01	0.07	0.77	0.13
10.000	1	0.11	0.78	0.07
100.000	0.962	0.100	0.755	0.095

Dependenta capacitatii de concentratia de GKB urmeaza o curba teoretica de tip Hill, pe baza careia se pot estima parametrii procesului de interactiune al GKB cu membranele lipidice (afinitate, cooperativitate). Figura 1A prezinta variatia capacitatii membranare in functie de concentratia de GKB, pentru cele doua tipuri de membrane studiate. Parametrii rezultati in

urma fitarii datelor experimentale cu curbe teoretice de tip Hill $y = 1 + \frac{k_1 x^n}{k_2 + x^n}$ sunt prezentati in tabelul 2.

Tabel 2. Parametrii curbelor teoretice Hill de fitare a datelor experimentale

	k1	k2	n
DPPC	0.399 \pm 0.018	0.424 \pm 0.106	0.58 \pm 0.077
DPPC-col	0.112 \pm 0.016	0.335 \pm 0.254	0.372 \pm 0.134

Nu se observa diferente semnificative intre afinitatea legarii GKB la bistratul lipidic de DPPC (reflectata de parametrul k_2), in prezenta si in absenta colesterolului, date care confirma rezultatele obtinute de noi in etapa anterioara a proiectului (cand fenomenul a fost studiat prin metoda SSM). Nici intre coeficientii Hill nu exista diferente semnificative din punct de vedere statistic (un coeficient usor mai mic se poate nota, totusi, in cazul in care colesterolul este prezent in membrana). Coeficientii subunitari sugereaza legarea GKB la mai mult de o molecula de fosfolipid. Este interesant de remarcat faptul ca in cazul membranelor lipidice pe suport solid s-au obtinut diferente intre cooperativitatea legarii ginkgolidei la DPPC singura si legarea la sistemul DPPC-colesterol. O posibila explicatie consta in diferentele structurale dintre cele doua tipuri de modele membranare – membranele BLM sunt bistraturi lipidice propriu-zise, pe cand membranele SSM reprezinta un monostrat lipidic atasat unui strat de aur tiolat. In plus, in cazul experimentelor BLM expunerea membranelor la GKB este prelungita, nefiind redusa la perioada de incubatie de 20 minute urmata de spalare, ca in cazul membranelor SSM. Astfel, prin experimentele BLM sunt surprinse si fenomene care au loc la o scara de timp mult mai mare, comparativ cu experimentele SSM.

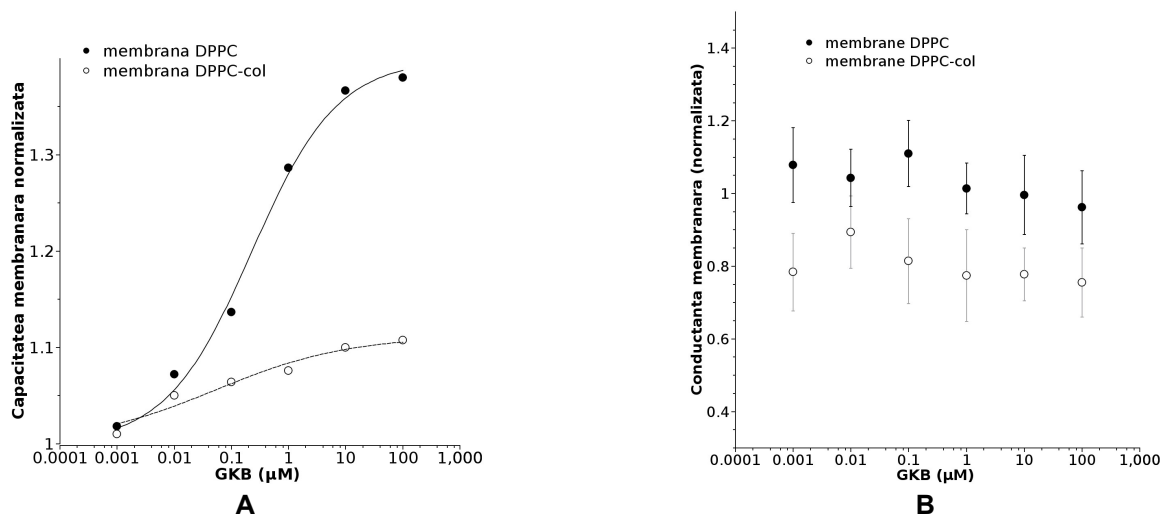


Fig. 1. A. Dependenta capacitatiei membrana de concentratia de GKB. Punctele reprezinta datele experimentale, iar liniile curbele de fitare cu o functie Hill. **B.** Modificarile conductantei membranelor de DPPC si DPPC-colesterol in functie de concentratia de GKB aplicata in cuve.

Conductanta membrana s-a modificat, de asemenea, in functie de concentratia de GKB aplicata in cuvele BLM (Fig. 1B.), insa modificarile au fost mai putin semnificative. Se observa cum profilurile de dependenta sunt similare, cu o scadere mai accentuata a conductantei in prezenta colesterolului (asociata probabil si cu efectul de rigidizare membrana datorat colesterolului). Cele mai marcare diferente se noteaza la concentratia de 1 nM de GKB, unde conductanta membranelor care contin colesterol scade semnificativ, pe cand in cazul membranelor DPPC se inregistreaza doar o usoara crestere a conductantei.

Figura 2 prezinta comparativ curbele de insertie ale GKB pe SSM si pe BLM, pentru cele doua tipuri de membrane analizate. Se observa cum prezenta colesterolului determina modificari mai importante ale curbelor de insertie obtinute prin cele doua metode, sugerand existenta unor diferente structural-arhitecturale intre cele doua tipuri de membrane, mai accentuate in prezenta colesterolului.

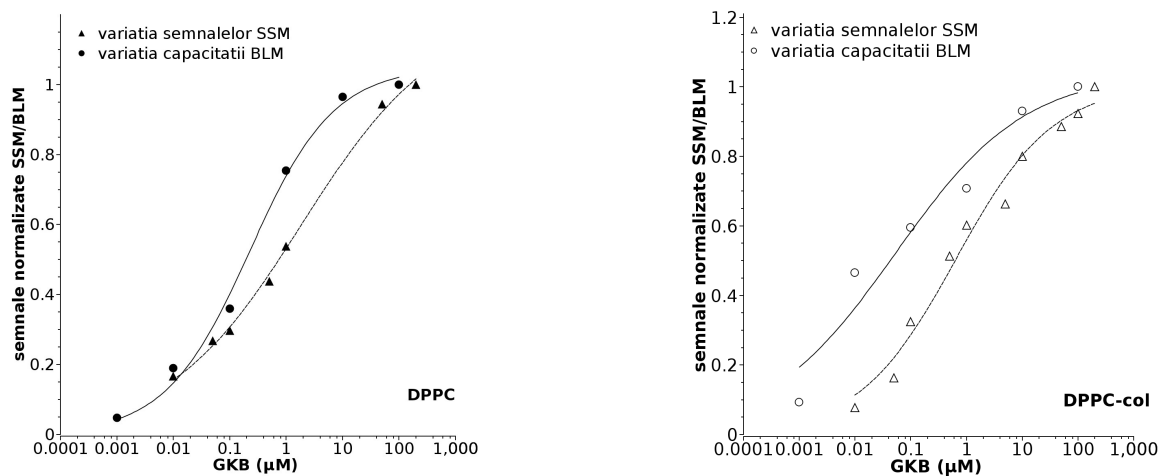


Fig. 2. Curbe de insertie comparative ale GKB pe SSM si BLM, pe membrane de DPPC si DPPC-col

Concluzii

- datele obtinute prin metoda BLM confirma interactiunea GKB cu bistraturile lipidice artificiale, insertia respectand o curba Hill; o molecula de GKB se leaga de 2-3 molecule de fosfolipid
- prezenta colesterolului nu influenteaza semnificativ interactiunea GKB cu bistraturile lipidice artificiale de tip BLM, din punctul de vedere al afinitatii legarii sau cooperativitatii legarii
- membranele care contin colesterol prezinta o scadere a conductantei (in raport cu concentratia de GKB aplicata), comparativ cu membranele construite exclusiv din DPPC; scaderea este mai marcata la conentratii mici de GKB, sub 10 μM

- se observa similitudinea profilului de interacțiune GKB-DPPC obținute prin metoda BLM și metoda SSM, cu diferențe legate de cooperativitatea legării explicabile prin diferențele structural-arhitecturale ale celor două tipuri de membrane
- prezența colesterolului induce diferențe structural-arhitecturale semnificative între membranele de DPPC-col de tip SSM și BLM, evidențiate prin diferențe ale curbelor de afinitate-insertie

II. Studiul efectelor Ginkgolidei B asupra receptorilor nicotinici de acetilcolina (ACh) (rezultate preliminare)

Material și metoda

Metoda patch-clamp (Axon Guide, 2003) permite măsurarea diferenței de potențial dintre un electrod atașat celulei în (diferite configurații) și un electrod situat în soluția din exteriorul celulei. Am efectuat măsurători în configurația cell-attached, care au permis vizualizarea activității electrice a canalelor ionice izolate.

Culturi de celule. Celule ale liniei de rhabdomyosarcom caucazian uman TE 671 (ECACC No. 89071904), care exprimă nativ receptori nicotinici de tip muscular (Ostwald *et al* 1989, Schoepfer *et al* 1988), au fost cultivate în mediu DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium*, cu GlutaMAX™ și concentrație crescută de glucoză 4.5 g/l, și fără piruvat de sodiu, GIBCO-Invitrogen), suplimentat cu 10 % (v/v) ser bovin fetal și antibiotice (50 I.U./ml penicilină și 50 U.G/ml streptomycină). Culturile au fost menținute la 37°C în atmosferă umidificată (aer) cu un conținut de 5% CO₂. La fiecare 4-5 zile au fost efectuate subculturi prin tripsinizare, în momentul în care culturile au atins ~50-60% confluență.

Electrofiziologie. Măsurătorile electrofiziologice, prin metoda patch-clamp, au fost efectuate la 24-72 ore după subcultură cu ajutorul unui amplificator PC-10 (HEKA), în condiții de *voltage clamp*, în configurația *whole-cell* și *cell-attached* (Hamill *et al.*, 1981). Potențialul electric al membranei a fost menținut la -70 mV în timpul măsurătorilor. Toate experimentele au fost efectuate la temperatura camerei.

Substanțe și soluții. Curenții celulari au fost măsurați în soluția de baie cu compoziția (în mM): 135 NaCl, 3 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 30 HEPES (pH 7.4/NaOH). Pentru experimentele cell-attached, soluția din pipetă a avut compoziția identică cu soluția de baie, adăugându-i-se acetilcolina și/sau GKB la concentrațiile de studiat. Pentru experimentele de control în *whole-cell*, soluția de pipetă a conținut (în mM): 140 CsCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 5 HEPES, 11 EGTA (pH 7.2/CsOH). Soluțiile de ACh, GKB (solubilizate în soluție de baie) au fost preparate proaspăt înaintea experimentului din soluții stoc cu concentrația 1 mM, respectiv 100mM, menținute înghețate. Toate substanțele au fost procurate de la Sigma.

Analiza datelor. Înregistrările au fost realizate cu programul Pulse (HEKA), filtrate la 1.33 kHz și esanționate la 4 kHz, cu o amplificare de 100 mV/pA. Analiza datelor a fost realizată cu programul Clampfit 9.2 (Axon Instruments) și QtiPlot (Copyright 2004-2008 Ion Vasilief, licență GNU-GPL).

Rezultate și discuții

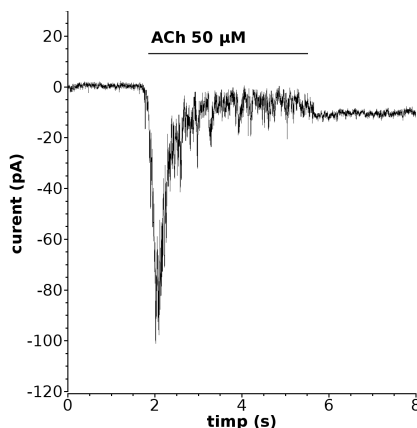


Fig. 3. Curent whole-cell determinat de aplicarea a 50 μM ACh.

Prezența receptorilor nicotinici pe linia celulară TE 671 a fost confirmată prin experimente-control, în configurația whole-cell. Figura 3 prezintă un exemplu de curent obținut în această configurație, la aplicarea unei concentrații de 50 μM ACh.

Am efectuat experimente în configurația cell-attached, aplicând aceleiași celule, succesiv, ACh singură, ACh + GKB și GKB singur. Substanțele au fost introduse în soluția de pipetă. Măsurătorile de control, fără substanța activă în soluția din pipetă, au confirmat că în absența ACh probabilitatea de deschidere a canalelor ionice ale receptorului nicotinic este neglijabilă (0-3 deschideri la 5-10 minute). Am urmărit probabilitatea de deschidere a canalelor ionice (de subliniat că este vorba de o probabilitate aparentă de deschidere, deoarece canalele se desensibilizează), conductanța canalelor și constanta de timp de revenire din desensibilizare care poate fi estimată, după cum au arătat Auerbach și Akk (1998), pe baza distribuției statistice a intervalurilor de timp în care canalele sunt închise (intervaluri *inter-event*). Constanta de timp de revenire din starea desensibilizată este constanta de timp a curbei exponențiale de fitare a distribuției intervalurilor *inter-event*.

Figura 4 prezintă un exemplu, pentru o celulă, a tipurilor de deschideri obținute la aplicarea substanțelor active. Aspecte asemănătoare au fost întâlnite la toate celulele testate (numărul de celule va fi specificat în continuare, pentru fiecare tip de experiment în parte).

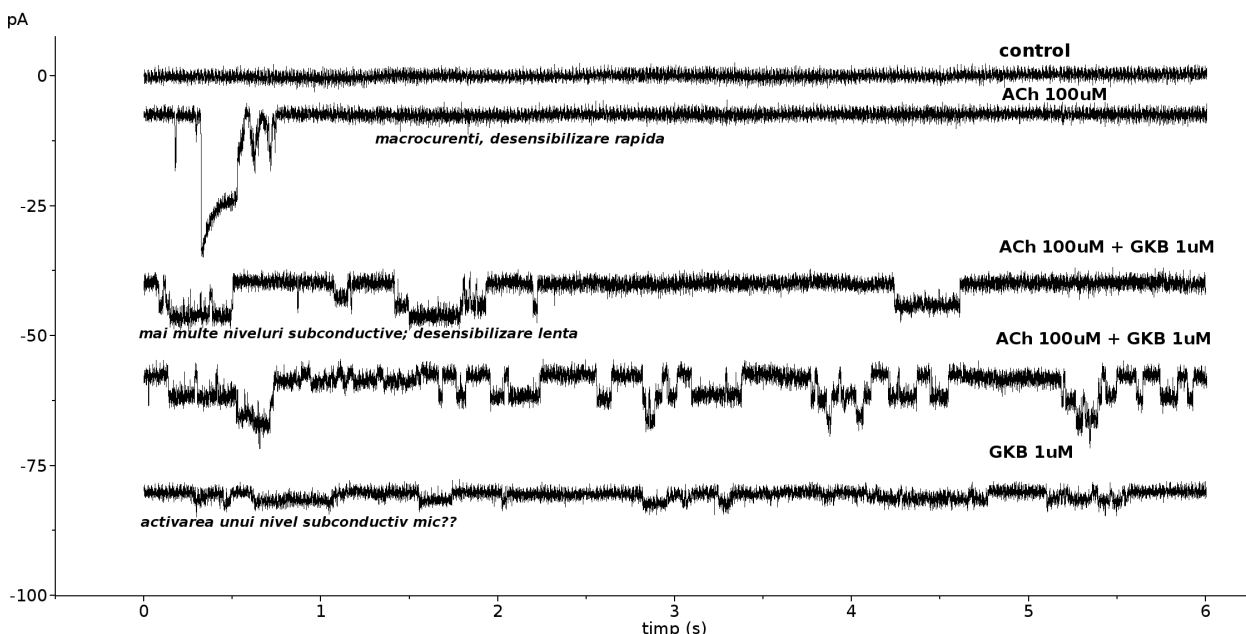


Fig. 4. Exemplu de curenti single-channel obtinuti la aplicarea de ACh 100 μM, ACh 100 μM + GKB 1 μM sau GKB 1 μM, in configuratia cell-attached, la nivelul aceleiasi celule.

Aplicarea de ACh singura determina activarea precoce, relativ simultana, cu desensibilizare rapida, a receptorilor dintr-un patch membranar, ceea ce se traduce din punct de vedere electrofiziologic prin macrocurenti pe patch (a doua inregistrare de sus, in figura 5). Prezenta concomitenta a GKB pare sa influenteze echilibrul activare – desensibilizare al receptorilor din patch; activarea are loc in decursul unei perioade mai lungi de timp, si desensibilizarea este aparent mai lenta. Se observa un aspect interesant – prezenta GKB induce, pe acest patch, deschiderea unor niveluri subconductive ale receptorului nicotinic. In inregistrarea obtinuta prin aplicare de GKB, la nivelul aceleiasi celule, se observa deschiderea exclusiv a unor canale de conductanta mica (posibil, niveluri subconductive ale receptorului nicotinic). Posibilitatea ca GKB sa actioneze direct asupra receptorului si sa il activeze trebuie studiata in experimentele noastre ulterioare, in configuratia whole-cell.

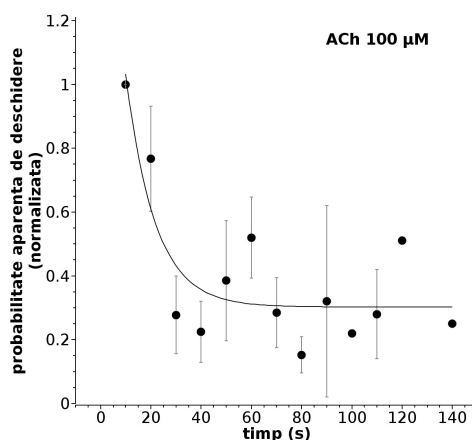


Fig. 5. Scaderea in timp a probabilitatii aparente de deschidere a receptorului nicotinic pentru ACh.

Am efectuat un prim tip de analiza, pentru a ne asigura ca deschiderile observate sunt intr-adevar receptori nicotiniци pentru ACh. Probabilitatea aparenta de deschidere a receptorilor, in inregistrările cell-attached, se calculeaza ca perioada de timp in care receptorii sunt deschisi raportata la perioada totala a inregistrării. Probabilitatea astfel calculata coincide cu

probabilitatea reala de deschidere doar in cazul receptorilor care nu se desensibilizeaza. In cazul receptorului nicotinic ne asteptam ca probabilitatea aparenta de deschidere sa scada in timp. Pentru a evidentia acest lucru, am efectuat masuratori control (n=4) in care inregistrarea a fost impartita in intervale de timp de 10 secunde, si am calculat pentru fiecare interval de timp in parte probabilitatea aparenta de deschidere. Figura 5 prezinta rezultatele acestor masuratori, observandu-se o scadere exponentiala in timp a probabilitatii aparente de deschidere a receptorului nicotinic. Constanta de timp calculata a fost de 11.56 ± 5.11 s, si reflecta echilibrul dintre procesul de desensibilizare si revenire din desensibilizare. Aceasta valoare concorda cu valoarea obtinuta intr-o etapa anterioara a proiectului, prin masuratori in configuratia whole-cell (pentru ACh 100 μ M, constanta de timp caracteristica echilibrului desensibilizare – revenire din desensibilizare a fost de 5.87 ± 0.56 s, deci din punct de vedere statistic nu exista diferente semnificative intre aceste valori) (Popescu & al, 2009).

In continuare, am analizat parametrii cinetici ai receptorilor nicotinici pentru ACh pentru 3 concentratii diferite de ACh (20 μ M, 50 μ M si 100 μ M), aplicata singura sau impreuna cu GKB 1 μ M. Fig. 6 prezinta rezultatele obtinute referitor la probabilitatea aparenta de deschidere medie si constanta de timp de revenire din desensibilizare. Se observa faptul ca probabilitatea de deschidere, asa cum este de asteptat, nu este influentata semnificativ de concentratia de ACh (in intervalul de concentratii testat). Adausul de GKB 1 μ M nu influenteaza semnificativ probabilitatea de deschidere. Procesul de revenire din desensibilizare este usor mai rapid la concentratii mai mari de ACh, prezenta GKB inducand insa modificari semnificative din punct de vedere statistic.

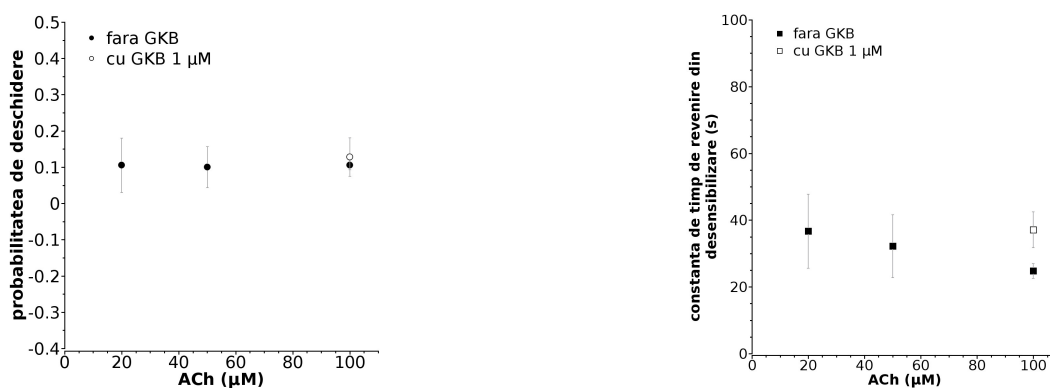


Fig. 6. Dependenta probabilitatii aparente de deschidere si a constantei de timp de revenire din desensibilizare de concentratia de ACh \pm GKB

Cel mai semnificativ efect al GKB s-a inregistrat asupra conductantei receptorului nicotinic deschis (Fig. 7.). Cand GKB 1 μ M a fost co-aplicat impreuna cu ACh, valorile conductantei canalului ionic al receptorului s-au dublat. Acest aspect sugereaza un posibil efect de potentare allosterica al GKB.

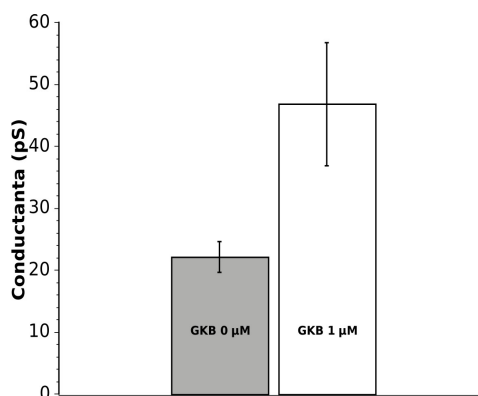


Fig. 7. Conductanta receptorilor nicotinici activati de ACh si de ACh + GKB

Concluzii (proiectarea experimentelor din faza finala a proiectului)

Experimentele preliminare dedicate efectelor GKB asupra receptorilor nicotinici pentru ACh sugereaza urmatoarele aspecte:

- GKB afecteaza semnificativ conductanta receptorilor nicotinici, posibil printr-un efect de potentare allosterica
- Prezenta GKB influenteaza cinetica de revenire din desensibilizare a receptorului nicotinic pentru ACh
- Este posibil ca legarea GKB la receptorul nicotinic sa induca modificari conformationale asociate cu deschideri pariale ale receptorului (obiectivate prin existenta de niveluri subconductive in inregistrari single-channel)

Datele obtinute pana in acest moment orienteaza experimentele pe care le vom efectua in ultima etapa a proiectului in urmatoarele directii:

1. studiul, in configuratia whole-cell, al efectelor coaplicarii de GKB si ACh (comparativ cu un control – ACh monoaplicata) si confirmarea sau infirmarea unei (sub)activari a receptorului exclusiv de catre GKB
2. studiul efectelor GKB asupra desensibilizarii receptorului nicotinic, utilizand protocele de aplicare de tip 2 pulsuri in configuratia whole-cell
3. studiul cineticii de activare-desensibilizare a receptorului in prezenta GKB prin studii single-channel
4. realizarea unui model de actiune a GKB asupra receptorului nicotinic pentru ACh de tip muscular.

Bibliografie selectiva

1. Akhonzadeh, S, S.H. Abbasi, Herbal medicine in treatment of Alzheimer's Disease, *Am J Alzheimer's Dis Other Demen*, **21(2)**:113-118, 2006.
2. Amri, Hakima., W. Li, K. Drieu, V. Papadopoulos, Identification of the Adrenocorticotropin and GinkgolideB-Regulated 90-Kilodalton Protein (p90) in Adrenocortical Cells as a Serotransferrin Precursor Protein Homolog (Adrenotransferrin), *Endocrinology* **145(4)**:1802-1809, 2004.
3. Auerbach, A., Akk, G., Desensitization of mouse nicotinic acetylcholine receptor channels. A two gate mechanism. *J. Gen. Physiol* **112**, 181-197 (1998).
4. Bamberg, E., H. J. Apell, N. A. Dencher, W. Sperling, H. Stieve, P. Lauger, Photocurrents generated by bacteriorhodopsin on planar bilayer membranes, *Biophys. Struct. Mechanism*, 1979, 5, 277-290
5. Bate C & al, Phospholipase A2 inhibitors or Platelet-Activating Factor Antagonists Prevent Prion Replication, *J. Biol.Chem*, **279(35)**:36405-36411, 2004.
6. Bonin F et al, Anti-Apoptotic actions of the Platelet activating factor acetylhydrolase I alpha2 catalytic subunit, *J. Biol. Chem.*, **279(59)**:52425-52436, 2004.
7. Dos Santos-Neto L.L. et al, The use of herbal medicine in Alzheimer's disease – A systematic review, *eCAM* **3(4)**:441-445, 2006
8. Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J., Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391**, 85-100 (1981).
9. Huang S.H. et al, Ginkgolides, diterpene trilactones of Ginkgo Biloba, as antagonists at recombinant $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ L GABA A receptors, *Eur. J. Pharmacol.*, **494**:131-138, 2004.
10. Ivic L. et al, Terpene Trilactones from Ginkgo biloba are antagonists of cortical glycine and GABA A receptors, *J. Biol. Chem*, **278(49)**:49279-49285, 2003.
11. Lynch, Joseph, Molecular Structure and Function of the Glycine Receptor Chloride Channel, *Physiol. Rev.* **84**:1051-1095, 2004
12. Oswald, R.E., Papke, R.L., Lukas, R.J., Characterization of nicotinic acetylcholine receptor channels of the TE671 human medulloblastoma clonal line. *Neurosci. Lett* **96**, 207-212 (1989).
13. Popescu A., T. Moura, C. Ganea, A. Bicho, Galantamine modulates the recovery from desensitization of nicotinic receptors in TE 671 cells, *Rom. Biotechnol. Letters*, 2009, **14(1)**:4104-4118.
14. Schoepfer, R., Luther, M., Lindstrom, J., The human medulloblastoma cell line TE671 expresses a muscle-like acetylcholine receptor. Cloning of the alpha-subunit cDNA. *FEBS Letters* **226**, 235-240 (1988).