КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики
доц. Олексій Юрійович Нипорко
Протокол №____ засідання кафедри
від “____” _____20___ р.

ВПЛИВ РЕМДЕСИВІРУ НА ПОТЕНЦІАЛ ПЛАЗМАТИЧНОЇ ТА МІТОХОНДРІАЛЬНОЇ МЕМБРАНИ

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра
студента спеціальності 091 Біологія
ОП «Біологія (високі технології)»
Світличної Катерини Андріївни

Науковий керівник від кафедри
професор кафедри молекулярної
біотехнології та біоінформатики
д.б.н. **Цимбалюк Ольга Володимирівна**

Робота виконана у відділі нейрохімії
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України
під керівництвом ст.н.сп., к.б.н **Наталії Володимирівни Крисанової**

Оцінка захисту роботи

_____

Київ − 2024 р.

АНОТАЦІЯ

Світлична К.А. Вплив ремдесивіру на потенціал плазматичної та мітохондріальної мембрани. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)».

У роботі проведено дослідження впливу ремдесивіру, противірусного препарату, активного проти SARS-CoV-2, на транспортування та вивільнення нейромедіаторів у нервових терміналях кори головного мозку щурів. Встановлено, що ремдесивір безпосередньо вбудовується в клітинні мембрани, що призводить до порушення мембранної структури та зменшення індукованого деполяризацією екзоцитотичного вивільнення нейромедіаторів, таких як глутамат і ГАМК. Отримані результати свідчать про вплив ремдесивіру на нейротрансмісію, що може мати наслідки для функціонування нервової системи. Застосування синаптосом, що зберігають особливості інтактних нервових терміналів, у поєднанні з зондами JC-1 та родаміну 6G дозволило оцінити вплив ремдесивіру на мембранний потенціал, що є ключовим для передачі нервового імпульсу. Отримані результати можуть бути використані для подальших досліджень нейротропних ефектів ремдесивіру та розробки точних стратегій дозування для мінімізації його негативного впливу на функціонування нервової системи.

Ключові слова: ремдесивір; плазматична мембрана; синапси; деполяризація мембрани; синаптосоми; амфіфільні сполуки; флуоресценція.

ЗМІСТ

ВСТУП 5

РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 7

1.1 Будова синапсу: Структура та функціональна динаміка 7

1.2 Вивчення структури мембрани та її ролі в активності нейронів 12

1.2.1 Поняття мембранного потенціалу в контексті синаптичної функції ... 16

1.2.2 Процеси деполяризації та їх значення у синаптичній передачі 19

1.3 Синаптосоми: Визначення, застосування та значення в нейрохімії 21

1.4 Вступ до амфіфільних сполук та пресинаптичної функції 26

1.4.1 Вплив амфіфільних сполук на функцію та цілісність мембран 28

1.4.2 Амфіфільні сполуки як інструменти для дослідження пресинаптичних механізмів 31

РОЗДІЛ ІІ. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ 36

2.1 Виділення синаптосом з головного мозку щурів 36

2.2 Визначення концентрації білку 37

2.3 Оцінка мембранного потенціалу синаптосом за допомогою зонду родамін 6G 38

2.4 Визначення мембранного потенціалу за допомогою зонду JC-1 39

2.5 Статистичний аналіз 40

РОЗДІЛ ІІІ. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ 41

3.1 Аналіз змін мембранного потенціалу за допомогою зонда родамін 6G. 41

3.2 Динаміка змін мембранного потенціалу за допомогою зонду JC-1 45

3.3 Співвідношення інтенсивності флуоресценції зонду JC-1 48

ВИСНОВКИ 52

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ..... 53

ВСТУП

Ремдесивір наразі є єдиним противірусним препаратом, який демонструє значну активність проти SARS-CoV-2 і дозволений FDA для екстреного застосування для лікування COVID-19. Ремдесивір був вперше розроблений як новий монофосфорамідатний проліки аналога аденозину з противірусною активністю проти гострої лихоманки Ебола. Фармакологічно активний нуклеозидтрифосфат ефективно утворювався в клітинах, інкубованих з ремдесивіром *in vitro*, і цей нуклеозидтрифосфат діяв як альтернативний субстрат і термінатор РНК-ланцюга для вірусної РНК-полімерази. Ремдесивір — це амфіфільна молекула, розроблена таким чином, щоб легко перетинати плазматичну мембрану клітини для швидкого внутрішньоклітинного метаболізму.

Цей противірусний препарат, активний проти SARS-CoV-2, виявляє різноманітні ефекти на транспортування та вивільнення нейромедіаторів у нервових терміналах кори головного мозку щурів. Препарат безпосередньо вбудовується в клітинні мембрани, впливаючи на вивільнення та поглинання нейромедіаторів у дозозалежний спосіб. Дослідження показують, що точний контроль за дозуванням ремдесивіру має вирішальне значення для запобігання потенційним нейромодулюючим діям на пресинаптичному рівні.

Актуальність роботи обумовлена тим, що ремдесивір є єдиним противірусним препаратом, затвердженим FDA для екстреного застосування у лікуванні COVID-19, і розуміння його можливих побічних ефектів на нейромедіаторну систему має велике значення для оптимізації лікувальних стратегій.

Об’єктом дослідження є ефекти ремдесивіру на плазматичну та мітохондріальну мембрани синаптосом.

Тому **метою даної** роботи є вивчення впливу ремдесивіру на потенціал плазматичної та мітохондріальної мембран.

Для досягнення мети дослідження, у роботі було вирішено наступні **завдання:**

1. Дослідити ефекти ремдесивіру на транспортування та вивільнення нейромедіаторів у нервових терміналях кори головного мозку щурів.
2. Перевірити можливість ремдесивіру безпосередньо вбудовуватися в клітинні мембрани,
3. Із використанням моделі синаптосом, що зберігають особливості інтактних нервових терміналей, у поєднанні з зондами JC-1 та родаміну 6G, оцінити вплив ремдесивіру на мембранний потенціал.
4. Дослідити вплив ремдесивір на динаміку деполяризації мітохондрій та оцінити зміни кількості дисфункціональних мітохондрій під впливом цього препарату.

РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Будова синапсу: Структура та функціональна динаміка

Структура і функції синапсів відіграють ключову роль в активності нейронів і передачі інформації в мозку. Багато видів синапсів у людському мозку поділяються на два загальні класи: електричні синапси та хімічні синапси. Ці два класи синапсів можна розрізнити на основі їхньої структури та механізмів, які вони використовують для передачі сигналів від нейрона "вище", який називається пресинаптичним елементом, до нейрона "нижче", який називається постсинаптичним. Електричні та хімічні синапси принципово відрізняються за своїми механізмами передачі. В електричних синапсах між пре- і постсинаптичними мембранами виникають щілинні з'єднання. Щілинні з'єднання містять коннексонні канали, які дозволяють струму пасивно текти від пресинаптичної клітини до постсинаптичної. У хімічних синапсах немає міжклітинної безперервності, а отже, немає прямого потоку струму від пре- до постсинаптичної клітини. Синаптичний струм проходить через постсинаптичну мембрану тільки у відповідь на секрецію нейромедіаторів, які відкривають або закривають постсинаптичні іонні канали після зв'язування з молекулами рецепторів на постсинаптичній мембрані [1].

У ссавців більшість синапсів є хімічними. Хімічні синапси можна відрізнити від електричних за кількома критеріями: вони використовують нейромедіатори для передачі сигналу, а везикули використовуються для зберігання і транспортування нейромедіатора від тіла клітини до терміналі; крім того, терміналь має дуже активну мембрану, а постсинаптична мембрана складається з товстої клітинної мембрани, що складається з багатьох

рецепторів. Між цими двома мембранами є дуже чітка щілина (легко візуалізується за допомогою електронної мікроскопії), і хімічний нейромедіатор, що вивільняється, повинен дифундувати через цю щілину, щоб викликати відповідь у рецептивному нейроні. Через це синаптична затримка, яка визначається як час, необхідний для передачі струму в пресинаптичному нейроні до постсинаптичного нейрона, становить приблизно від 0,5 до 1,0 мс. Електричний синапс зазвичай складається з 2 мембран, розташованих набагато ближче одна до одної, ніж у хімічному синапсі. Ці мембрани мають канали, утворені білками, відомими як коннексини, які забезпечують пряме проходження струму від одного нейрона до іншого і не залежать від нейромедіаторів. Синаптична затримка значно коротша в електричних синапсах порівняно з хімічними [2].

Синапси — це міжклітинні з'єднання між пресинаптичним нейроном і постсинаптичною клітиною, зазвичай також нейроном. Інформація надходить до пресинаптичного закінчення у вигляді потенціалу дії і передається до постсинаптичної клітини за допомогою хімічного нейромедіатора. Нейромедіатори упаковані в синаптичні везикули. Коли потенціал дії відкриває пресинаптичні потенціалкеровані Ca^{2+} канали, нейромедіатори вивільняються шляхом Ca^{2+}-залежного екзоцитозу синаптичних везикул, у синаптичну щілину, де вони активують постсинаптичні рецептори. Морфологічно синапси нагадують інші міжклітинні з'єднання з чітко протилежними пре- і постсинаптичними спеціалізаціями, які містять електронно-щільний матеріал на плазматичних мембранах. Екзоцитоз синаптичних везикул обмежений невеликою ділянкою пресинаптичної плазматичної мембрани, що містить цей електронно-щільний матеріал, яка отримав назву "активна зона". Нейронна інформація часто кодується спалахами або серіями потенціалів дії. Синапси обробляють такі

спалахи або пачки потенціалів дії у специфічний для синапсу спосіб, який передбачає залежні від використання зміни у вивільненні нейромедіатора під час спалаху або пачки (так звана короткочасна пластичність).

Синапси класифікуються за типом нейромедіатора, який вони використовують для передачі сигналів між нейронами. Глутаматергічні синапси використовують глутамат як нейромедіатор. Глутамат є головним збуджуючим нейромедіатором у центральній нервовій системі, який активує рецептори, викликаючи деполяризацію постсинаптичної мембрани, що сприяє генерації потенціалу дії. ГАМК-ергічні синапси використовують гамма-аміномасляну кислоту (ГАМК) як нейромедіатор. ГАМК є головним гальмівним нейромедіатором у центральній нервовій системі, який викликає гіперполяризацію постсинаптичної мембрани, знижуючи ймовірність генерації потенціалу дії. Ацетилхолінові синапси використовують ацетилхолін як нейромедіатор. Ацетилхолін може діяти як збуджуючий, так і гальмівний агент залежно від типу рецепторів (нікотинових або мускаринових). Він важливий для функціонування периферичної нервової системи (наприклад, у нейром'язових з'єднаннях) та центральної нервової системи. Дофамінергічні синапси використовують дофамін як нейромедіатор. Дофамін виконує різноманітні функції, включаючи регуляцію рухів, емоцій, мотивації та винагороди. Порушення в дофамінергічних шляхах пов'язують із такими захворюваннями, як хвороба Паркінсона та шизофренія. Норадренергічні синапси використовують норадреналін (норепінефрин) як нейромедіатор. Норадреналін грає роль у модуляції уваги, збудження та відповіді на стрес, а також бере участь у регуляції артеріального тиску і серцевого ритму. Серотонінергічні синапси використовують серотонін як нейромедіатор. Серотонін важливий для регуляції настрою, сну, апетиту та больових відчуттів. Дисбаланс серотоніну часто пов'язаний з депресією та

іншими психічними розладами. Ендорфінергічні синапси використовують ендорфіни як нейромедіатори. Ендорфіни діють як природні знеболювальні, знижуючи біль і викликаючи відчуття задоволення або ейфорії. Кожен тип нейромедіатора має специфічні рецептори та механізми дії, що визначають характер сигналу, який передається від одного нейрона до іншого. Це визначає різні функції та ролі нейромедіаторів у нервовій системі, забезпечуючи складні та різноманітні взаємодії між нейронами.

Синапси достовірно відрізняються один від одного за своїми властивостями, але й за основними синаптичними параметрами, такими як ймовірність вивільнення та постсинаптичний склад рецепторів. Мозок ссавців містить сотні різних типів нейронів, які формують і отримують синапси, що мають характерні властивості, які залежать як від пре-, так і від постсинаптичного нейрона. Як наслідок, ймовірно, існують сотні різних типів синапсів, які працюють за одним і тим же фундаментальним механізмом, але демонструють різні обчислювальні властивості [3].

Пресинаптичний термінал складається з декількох структурних та функціональних компонентів. Білки цитоматриксу та білок цитоскелету (актин) забезпечують структурний каркас. Активна зона є критично важливим місцем для вивільнення нейромедіаторів. Багато важливих молекулярних механізмів локалізуються в активній зоні, наприклад, компоненти SNARE, потенціалкеровані Ca^{2+}-канали, молекули клітинної адгезії тощо. Кожен нервовий термінал має близько 100-200 синаптичних везикул. Синаптичний пухирець, крихітний ендосомний компартмент (діаметром ~40 нм), містить нейромедіатор який прямо та/або опосередковано асоціюється з більш ніж сотнею білків для належного функціонування [4]. Нейромедіатори вивільняються в синаптичну щілину після того, як потенціал дії викликає приплив іонів Ca2+ через

потенціалкеровані кальцієві іонні канали та активує екзоцитоз везикул. Для прямої передачі вивільнені нейромедіатори зв'язуються з відповідними рецепторами, щоб викликати відповідь. Рецептори також розташовані на пресинаптичній мембрані клітини, що забезпечує авторегуляцію кількості вивільненого нейромедіатора [5].

Постсинаптична частина синапсу спеціалізована для прийому нейромедіаторного сигналу, вивільненого з пресинаптичної терміналі, і перетворення його в електричні та біохімічні зміни в постсинаптичній клітині. Кардинальними функціональними компонентами постсинаптичної спеціалізації збуджувальних і гальмівних синапсів є іонотропні рецептори (ліганд-керовані канали) для глутамату і γ-аміномасляної кислоти (ГАМК) відповідно. Ці рецепторні канали зосереджені на постсинаптичній мембрані і вбудовані в щільну і багату білкову мережу, що складається з якірних і каркасних молекул, сигнальних ферментів, цитоскелетних компонентів, а також інших мембранних білків. Збудлива та гальмівна постсинаптичні спеціалізації суттєво відрізняються за молекулярною організацією. Постсинаптична щільність збуджувальних синапсів особливо складна і динамічна за складом і регуляцією; вона містить сотні різних білків, багато з яких необхідні для когнітивних функцій і причетні до розвитку багатьох нейрологічних порушень.

Гальмівні та збуджувальні синапси відрізняються за рецепторами нейромедіаторів та морфологією, але мають спільні принципи організації (наприклад, диференціація за допомогою адгезії та збірка білків на основі скафолду). Збуджувальні синапси у ссавців виникають переважно на крихітних виступах, які називаються дендритними шипиками. На відміну від них, гальмівні синапси формуються на дендритах, або на тілах клітин і початкових сегментах аксонів. Постсинаптична сторона збуджувальних

синапсів відрізняється від гальмівних не тільки вмістом рецепторів нейромедіаторів, але й морфологією, молекулярним складом та організацією. Частково через їх більшу кількість і відмінну структуру, про постсинаптичну організацію центральних збуджувальних (глутаматергічних) синапсів відомо набагато більше [6].

1.2 Вивчення структури мембрани та її ролі в активності нейронів

Мембрана нейрона — це місце, де запускається більшість процесів, що беруть участь у збереженні та функціонуванні нейронів. Ці дії вимагають участі мембранозв'язаних молекулярних агентів, які об'єднуються в білкові/ліпідні кластери, щоб ініціювати молекулярну обробку та передачу сигналу. Крім того, численні нейропатологічні явища беруть свій початок у цій структурі та/або є наслідком мембранної дисфункції [7]. Більшість механізмів, що беруть участь у підтримці та функціонуванні нейронів, активуються на мембрані нейрона. Для виконання цих функцій необхідні мембранозв'язані молекулярні агенти, які взаємодіють у білкових/ліпідних кластерах, щоб розпочати молекулярну обробку та передачу сигналу [8].

Мембрана нейрона — це також активна структура з механічними властивостями, які модулюють електрофізіологію. Транспорт білків, фаза ліпідного бішару, тиск і жорсткість мембрани можуть впливати на поширення потенціалу дії. Зростаюча кількість доказів вказує на те, що механіка та електрофізіологія нейронів пов'язані між собою і разом формують мембранний потенціал у тісній координації з іншими фізичними властивостями [9]. Фосфоліпідний бішар нейрональної мембрани складається з декількох класів фосфоліпідів; найбільш поширеними в мозку ссавців є

фосфатидилхолін, фосфатидилетаноламін, сфінгомієлін, фосфатидилсерин і фосфатидилінозитол. Фосфоліпіди самі по собі дуже гетерогенні, кожен клас представляє підгрупу сполук з різним жирнокислотним складом. Фосфатидилхолін і фосфатидилетаноламін, найпоширеніші фосфоліпіди в мозку, синтезуються за допомогою цитидиндифосфат (ЦДФ) - холінового шляху і ЦДФ-етаноламінового шляху відповідно. Разом ці шляхи також відомі як шлях Кеннеді. Сфінгомієлін зазвичай утворюється з комбінації цераміду та фосфохолінової одиниці фосфатидилхоліну [10]. Холестерин має вирішальне значення для підтримання стабільної архітектури нейронної мембрани, а збої в гомеостазі холестерину сприяють прогресуючій нейродегенерації. Холестерин є важливим компонентом мієліну, а отже, необхідний для росту, диференціації та збереження мозку. Цей стерол також бере участь в особливому складі мікродоменів мембранних рафтів, які є основними місцями розташування білкових сигнальних кластерів, пов'язаних з нейропротекцією. Попри те, що холестерин в основному знаходиться у мозку у вільному стані, невелика частка (~5%) етерифікованого холестерину модулює ріст мозку і збільшує мієлінізацію, викликаючи витончену регуляцію цього стеролу. Дійсно, порушення вмісту холестерину в мембрані нейронів пов'язане, серед іншого, з хворобою Альцгеймера, пріонними захворюваннями та розладами аутичного спектру [11]. Різні мембранні канали складаються з білків, вбудованих у фосфоліпідний бішар, які дозволяють пасивний потік заряджених іонів. Існують окремі канали для іонів Na^+, K^+ та кальцію (Ca^{2+}). Внутрішня частина аксона має заряд приблизно -90 мілівольт (мВ), з відносно більшою концентрацією іонів K^+ по відношенню до зовнішньої. Існує пасивний витік іонів K^+ назовні та іонів Na^+ всередину, що призводить до того, що внутрішня частина аксона стає менш негативною по відношенню до зовнішньої. Існує АТФ-залежний Na^+/K^+

насос, який імпортує K^+ та експортує Na^+ у співвідношенні два K+ на кожні три Na^+. Це підтримує нормальний мембранний потенціал спокою і запобігає спонтанній деполяризації. Оскільки підтримання поділу іонних зарядів через мембрану вимагає енергії, цей механізм зупиняється, коли постачання енергії припиняється [12]. Спрямований характер синаптичної передачі проявляється в асиметричній ультраструктурі та молекулярному складі пре- та постсинаптичних компартментів. Пресинаптичні відділи характеризуються наявністю від сотень до тисяч синаптичних везикул, заповнених нейромедіаторами, та активними зонами - спеціалізованими ділянками пресинаптичної плазматичної мембрани, де синаптичні везикули стикуються, зливаються і вивільняють нейромедіатор у синаптичну щілину. Активна зона характеризується наявністю електронно-щільного матриксу білків, які демонструють решітчасту організацію, в якій регулярні масиви електронно-щільних пучків з'єднані між собою тонкими ниткоподібними матеріалами. Ця структура, відома як цитоскелетний матрикс або "пресинаптична сітка ", вважається полегшує регульовану транслокацію синаптичних везикул до плазматичної мембрани активної зони, і, своєю чергою, визначає місце стикування синаптичних везикул та злиття. Постсинаптичний рецепторний апарат також характеризується електронно-щільним потовщенням, яке називається постсинаптичною щільністю, центральною функцією якого є обмеження рецепторів відповідного типу під активною зоною. Постсинаптичний рецепторний апарат і цитоскелетний матрикс, схоже, утримуються транс-синаптичними молекулами клітинної адгезії і білками позаклітинного матриксу.

Сучасні дослідження показують, що три окремі комплекси допомагають визначити активну зону. Перший комплекс є значною мірою структурним, і вважається, що він утримує активну зону у відповідності до

постсинаптичною щільністю і кластеризує кальцієві канали в активній плазматичній мембрані. Вона включає молекули клітинної адгезії, включаючи нейролігін, нейрексин і N-кадгерин, а також синаптичні молекули клітинної адгезії (SynCAM) і нейрональні молекули клітинної адгезії (NCAM), а також цитоскелетні білки, такі як пікколо, фагот, ERC/Cast, ліприн, кальцій/кальмодуліннезалежна серинова протеїнкіназа (CASK), веліс, Munc18-interacting proteins (*Mints*) і спектрин10,12. Другий комплекс бере участь у стикуванні та злитті синаптичних везикул і містить компоненти комплексу SNARE, включаючи синтаксин і Snap25, а також Rim, Rab3a, Munc13, Munc18 і кальцієві канали типу N і P/Q14,15. Перш ніж відбудеться злиття, синаптичні везикули проходять етапи праймінгу, і такі молекули, як Rim, Munc13 і Munc18, мають вирішальне значення для цього етапу. Білкові комплекси, які беруть участь в ендоцитозі синаптичних везикул, включають клатрин, динамін і сімейство адаптерних білків, що містять SH3-домен26,27.

Постсинаптично, PDZ-домени, що містять білки, такі як SAP90/PSD95 (білок постсинаптичної щільності 95), є багато, і вважається, що вони утворюють спеціалізовані білкові комплекси навколо певних підкласів іонотропних

глутаматних рецепторів (NMDAR (N-метил-D-аспартат), AMPAR (α-аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазол пропіонової кислоти). Рецептор тирозинкінази EphB також прив'язаний до постсинаптичної щільності, і він є чудовим кандидатом для регуляції рекрутування нейромедіаторних рецепторів з ендосомальних пулів. Вважається, що такі білки, як NARP та ефрін-B, сприяють кластеризації рецепторів AMPA та NMDA рецепторів, відповідно [13].

1.2.1 Поняття мембранного потенціалу в контексті синаптичної функції

Мембранний потенціал відіграє ключову роль у синаптичній функції, впливаючи на передачу сигналів між клітинами, вивільнення нейромедіаторів. Мембранний потенціал спокою нейрона, як і будь-якої живої клітини, встановлюється молекулярними помпами, які активно підтримують градієнти концентрації іонів натрію (Na^+) та калію (K^+). Стосовно позаклітинної рідини, внутрішня частина клітини містить високу концентрацію іонів K^+ і низьку концентрацію іонів Na^+. Постійний тиск на ці електрично заряджені іони змушує їх текти через мембрану за відповідними градієнтами концентрації (Na^+ на вході, K^+ на виході), є аналогом тиску, який відчувають електрони і який рухає їх від негативної до позитивної клеми акумулятора, якщо є відповідний шлях для струму. Електричний тиск на кожний з цих іонів може бути представлений за допомогою батареї, напруга якої передає величину і напрямок градієнта концентрації іонів; той факт, що батареї Na^+ і K^+ спрямовані в протилежні боки, виявиться критично важливим для електричної сигналізації.

Оскільки мембрано-ліпідний бішар сам по собі непроникний для іонів, струми можуть протікати тільки через "іонні канали", спеціально сконструйовані пори в мембрані, утворені великими білковими комплексами, що охоплюють всю мембрану. Іонні канали як правило, досить селективні щодо того, які іони можуть протікати через них, що дало початок номенклатурі "натрієвих каналів", "калієвих каналів". тощо. Крім того, певні іонні канали відкриті тонічно, тоді як інші можуть відкриватися і закриватися під контролем різних сигналів. Наприклад, деякі канали відкриваються і закриваються у відповідь на зміну мембранного потенціалу, як це відбувається при виробництві потенціалу, інші - у відповідь на хімічні

сигнали, як це відбувається при виробленні синаптичних потенціалів [14]. Мембранний потенціал клітини в стані спокою називається мембранним потенціалом спокою (Vr). Оскільки за умовчанням потенціал поза клітиною дорівнює нулю, то потенціал спокою дорівнює Vin. Його звичайний діапазон становить від -60 мВ до -70 мВ. Всі електричні сигнали містять в собі короткочасні зміни мембранного потенціалу спокою, які спричинені електричними струмами через клітинну мембрану. Електричний струм переноситься іонами, як позитивними (катіонами), так і негативними (аніонами). Напрямок струму умовно визначають як напрямок сумарного руху позитивного заряду. Таким чином, в іонному розчині катіони рухаються в напрямку електричного струму, а аніони - у протилежному. У нервовій клітині в стані спокою немає сумарного руху заряду через мембрану. Коли виникає сумарний потік катіонів або аніонів в клітину або з неї, поділ заряду через мембрану, що перебуває в стані спокою, порушується, змінюючи електричний потенціал мембрани. Зменшення або зміна напрямку поділу зарядів, що призводить до менш негативного мембранного потенціалу, називається деполяризацією. Збільшення поділу зарядів, що призводить до більш негативного мембранного потенціалу, називається гіперполяризацією. Зміни мембранного потенціалу, які не призводять до відкриття закритих іонних каналів, є пасивними реакціями мембрани та називаються електротонічними потенціалами. Гіперполяризаційні відповіді майже завжди пасивні, так само як і невеликі деполяризації. Однак, коли деполяризація наближається до критичного рівня, або порогу, клітина реагує активно, відкриваючи потенціалкеровані іонні канали, що призводить до виникнення потенціалу дії "все або нічого".

Хлорид активно виводиться з більшості, але не з усіх нейронів у нервовій системі дорослої людини. Якщо цього не відбувається, він пасивно розподіляється таким чином, щоб перебувати в рівновазі всередині і зовні клітини. За більшості фізіологічних умов об'ємні концентрації Na^+, K^+ та Cl^- всередині та зовні клітини є постійними. Зміни мембранного потенціалу, які генерують нейронні сигнали (потенціали дії, синаптичні потенціали та рецепторні потенціали), спричинені суттєвими змінами відносної проникності мембрани для цих трьох іонів. Ці зміни проникності, спричинені відкриттям іонних каналів, змінюють сумарний розподіл заряду через мембрану, але спричиняють лише незначні зміни в об'ємній концентрації іонів.

Дві суперницькі вимоги визначають функціональний дизайн нейронів. По-перше, щоб максимізувати пропускну здатність нервової системи, нейрони повинні бути маленькими, щоб велика їх кількість могла поміститися в головному і спинному мозку. По-друге, щоб максимізувати здатність тварини реагувати на зміни в навколишньому середовищі, нейрони повинні швидко передавати сигнали. Ці дві адаптивні функції обмежені матеріалами, з яких виготовлені нейрони. Крім того, різні іонні канали, які відкриті у стані спокою і створюють потенціал спокою, також погіршують сигнальну функцію нейрона, оскільки вони роблять клітину негерметичною та обмежують відстань, на яку сигнал може пасивно поширюватися. Щоб компенсувати ці фізичні обмеження, нейрони використовують потенціалкеровані канали для генерації потенціалів дії. Потенціал дії постійно регенерується вздовж аксона і, таким чином, проводиться без затухання. Для шляхів, в яких швидка передача сигналів є особливо важливою, проведення потенціалу дії посилюється або мієлінізацією аксона, або збільшенням діаметра аксона, або і тим, і іншим [15].

1.2.2 Процеси деполяризації та їх значення у синаптичній передачі

Швидка деполяризація мембрани необхідна для відкриття потенціалкерованих натрієвих каналів і запуску потенціалу дії. Такої деполяризації можна досягти штучно, ввівши мікроелектрод в аксон і подавши струм, позаклітинно стимулюючи аксон електродом або навіть механічно зачепивши нерв - наприклад, коли ми зачіпаємо нашу "веселу кісточку" (ліктьовий нерв біля ліктя). Природні деполяризації діляться на дві категорії. Для більшості нейронів синаптичний вхід до дендритів і тіла клітини забезпечує необхідну деполяризацію. Сенсорні нейрони, такі як рецептори розтягування в м'язах або шкірні рецептори в шкірі, поширюють потенціали дії централізовано; сенсорний сигнал на периферії створює деполяризацію, яка називається рецепторним або генераторним потенціалом, що відкриває натрієві канали для вироблення потенціалів дії [16].

Процес деполяризації мембрани є динамічним і відбувається дуже швидко. Потенціалкеровані натрієві канали розташовані навколо соми нейрона, але найбільш сконцентровані в ділянці, яка називається аксонним бугром, тобто в основі аксона, коли він виступає з клітини. Коли досягається поріг збудження, кількість Na^+, яка потрапляє на аксонний бугор, є такою, що дифузія змушує іони рухатися вниз по аксону до синаптичної терміналі. Аксон загорнутий у мієлін, який діє як ізолятор, що запобігає обміну іонів. Через певні проміжки між мієліном розташовані вузли Ранв'є - невеликі проміжки, в яких відкриваються потенціалкеровані Na^+ і K^+ канали. Деполяризація аксона "стрибає" від вузла до вузла, що називається сальтаторною провідністю, поки деполяризація не досягне синаптичної терміналі [17].

Швидкі збуджувальні постсинаптичні потенціали - це деполяризації мембрани тривалістю менше 50 мс. Вони виявляються на синапсах як у мієнтеральних, так і в підслизових сплетіннях, де вони є найбільш помітними у нейронах з S-типом електрофізіологічної поведінки у всіх спеціалізованих органах травного тракту. Більшість швидких збуджувальних постсинаптичних потенціалів опосередковані ацетилхоліном на нікотинових постсинаптичних рецепторах. Дія серотоніну на серотонінергічні рецептори підтипу 5-НТ3 і пуринові нуклеотиди на пуринергічні рецептори Р2Х поводяться подібно до швидких збуджувальних постсинаптичних потенціалів. Повільна активаційна деполяризація мембрани, що триває від кількох секунд до кількох хвилин після припинення вивільнення нейромедіатора з пресинаптичної терміналі, визначає повільні збуджувальні постсинаптичні потенціали. Підвищена збудливість, що відображається тривалими серіями імпульсів, є ознакою повільної збудливої постсинаптичної нейротрансмісії. Підвищена збудливість проявляється експериментально у вигляді повторюваних спайкових розрядів під час деполяризуючих імпульсів струму. Нейрони АН-типу, які в неактивному стані вистрілюють лише один спалах на початку деполяризуючого імпульсу струму, у відповідь на деполяризуючі імпульси будуть вистрілювати повторно, коли діє повільний збуджуючий постсинаптичний потенціал. При активації повільними синаптичними входами поведінка нейронів АН-типу дуже схожа на поведінку нейронів S-типу, і їх можна сплутати з ними, якщо вони перебувають в активованому стані через постійне вивільнення передавача або паракринного медіатора, що імітує повільне синаптичне збудження. Постспайкова гіперполяризація в нейронах типу АН пригнічується під час повільної збудливої нейротрансмісії. Пригнічення АН є

частиною механізму, який дозволяє повторювані спайкові розряди з підвищеною частотою під час підвищеного стану збудливості [18].

1.3 Синаптосоми: Визначення, застосування та значення в нейрохімії

Виділення синаптосом і синаптичних везикул з мозку ссавців стало великим проривом у вивченні клітинної та молекулярної функції нервової системи. Синаптосоми досі широко використовуються для вивчення синаптичної передачі. Вперше ця робота була виконана на початку 1960-х років Віктором Віттакером та його колегами з Інститут фізіології тварин у Бабрахамі, поблизу Кембриджу, Великобританія.

Синаптосома — це пресинаптична частина нервового закінчення з, як правило, постсинаптичною мембраною в ділянці з'єднання пре- і постсинаптичної мембрани, яка залишається з пресинапсом під час гомогенізації та центрифугування. Пресинаптична частина синаптосоми — структура зі збереженою цитоплазмою (синаптоплазмою), синаптичними везикулами, мітохондріями та деякими іншими клітинними компонентами.

Використовуючи синаптосоми, можна вивчати *in vitro* молекулярні механізми секреції нейромедіаторів і метаболізму нейромедіаторних систем. Дослідження синаптосом *in vivo* зустрічаються рідше, але вони не менш важливі. Мозок - це дуже складний орган, в якому нейрон існує в постійному взаємозв'язку з багатьма іншими нейронами. Ці взаємодії відбуваються в основному через синапси. Важливо не забувати про сигнальні молекули, які надходять до мозку через кров, спинномозкову рідину та внутрішньоклітинний матрикс. Функціональна відповідь пресинапсів відображає інтегровану відповідь нейрона на стимул. Тому важливо знати, чи ідентичні патерни синаптичних функцій *in vitro* та *in vivo*. Моделі *in vivo*

використовуються для дослідження впливу на весь організм, наприклад, моделі навчання моделі адаптації та нейропатології. Тоді синаптосоми або субсинаптичні компоненти зі структур мозку можуть бути ізольовані.

Синаптична реакція вимірюється синаптичними ключовими показниками, які визначаються в дослідженнях *in vitro*. Важливо, що біохімічні методи

дозволяють оцінити дуже тонкі метаболічні та функціональні зміни в синапсах. Таким чином досліджується зв'язок між функцією нервової системи та синаптичними процесами. Можна досліджувати реакцію певних структур мозку і навіть певних популяцій нейронів на зовнішні впливи. Використовуючи нейромедіатори як маркери, можна виявити участь нейромедіаторних систем у механізмах різних функцій мозку. Крім того, дослідження синаптосом *in vivo* має додаткові можливості. За допомогою біохімічних параметрів можна оцінити не тільки метаболічні зміни, але й кількісні (синаптогенез, редукцію, дегенерацію, інше) та морфо-структурні (трансформація) реорганізації в синаптичному пулі. Це можливо при порівняльних дослідженнях синаптичної мембрани та субфракцій синапсу і синаптоплазми. Субфракції синаптичної мембрани та синаптоплазми є найбільшими складовими частинами пресинапсу. Тому кореляція між біохімічними мембранними і цитозольними біохімічними параметрами може відображати реакцію пресинапсу як структурної одиниці [18].

Експерименти з синаптосомами відіграли важливу роль у першій ідентифікації нейромедіаторів, включаючи доказ того, що амінокислоти, такі як глутамат, дійсно є нейромедіаторами. Типові підходи, що застосовуються в дослідженнях нейромедіаторів, включають в себе вольоване навантаження і виявлення викликаного вивільнення радіоактивно мічених нейромедіаторів, в т.ч. ГАМК, глутамат, ацетилхолін, дофамін і норадреналін, або виявлення

ендогенного вивільнення за допомогою високоефективної рідинної хроматографії. В останні роки синаптосоми, отримані з нокаутованих мишей, використовували для дослідження ролі синаптичних білків. Синаптосоми та препарати синаптичних везикул також піддавалися протеомному та фосфопротеомному аналізу. В одному знаковому дослідженні білкові та ліпідні компоненти препарату синаптичних везикул були ретельно охарактеризовані, що дозволило виявити понад 80 інтегральних мембранних білків і понад 100 інших периферичних білків, пов'язаних з синаптичними везикулами. Ці протеомні дослідження, по-перше, каталогізували неймовірну кількістт нейронально-специфічних білків, що функціонують у синапсі, і, по-друге, підкреслили величезний масив посттрансляційних модифікацій, яких зазнають ці білки, і як вони змінюються у відповідь на синаптичну активність. Розглядаючи мережі синаптичних білок-білкових взаємодій і те, як вони регулюються в нормі і при захворюванні, є актуальним завданням синаптичних досліджень і, безсумнівно, буде і надалі підтримуватися експериментальними підходами з використанням препаратів синаптосом. Дійсно, в останній літературі про синаптосоми переважають дослідження генів, які мутують при захворюваннях, і включає підготовку синаптосом з посмертного мозку пацієнтів [19].

Синаптосоми є зручним інструментом для нейрохімічних та електрофізіологічних досліджень завдяки збереженню ферментативної та метаболічної активності, а також є видатним дослідницьким інструментом для розуміння механізмів синаптичної дисфункції. Синаптосоми можна легко приготувати за стандартною процедурою; після того, як тканину гомогенізують у 0,32 М сахарозі та центрифугують. Після першого центрифугування надосадову рідину додатково центрифугують для отримання грубої фракціїї сиинаптосом (P2). Якщо потрібен більш високий

ступінь чистоти, зразки можуть бути отримані шляхом центрифугування в градієнті щільності (Percoll, Ficoll або сахароза). Крім того, синаптосоми можуть бути отримані з посмертної тканини людського мозку і використані для вивчення патогенезу захворювань, а також синтезу та вивільнення нейромедіаторів у мозку пацієнтів. Кілька патологій, таких як хвороба Гантінгтона, хвороба Паркінсона, хвороба Альцгеймера та бічний аміотрофічний склероз, були вивчені за допомогою моніторингу синаптичної дисфункції через синаптосоми. Крім того, було виявлено, що синаптосоми зазнають функціональних змін при гострому впливі лігандів рецепторів/модуляторів ферментів *in vitro*. Ці зміни зберігаються і після видалення тригерних агентів, але вони також можуть адаптуватися і підтримувати структуру тканини походження, що хронічно піддається впливу хімічних речовин. Використовуючи техніку захоплення, мембранонепроникні агенти різних розмірів, присутні в середовищі гомогенізації, можуть бути інтерналізовані для вивчення внутрішньоклітинних механізмів. Нещодавно було описано синаптосоми, які вивільняють екзосоми та позаклітинні везикули, здатні брати участь у фізіологічній та патологічній нейротрансмісії.

Вестерн-блот аналіз є поширеним лабораторним методом дослідження синаптосомних білків, новосинтезованих і неправильно сформованих, утворення білкових комплексів, та виявлення аутоімунних захворювань. Його застосування для характеристики синаптосом або синаптосомних білків є усталеною практикою в дослідженнях, пов'язаних з нейрозапаленням. Цей метод дозволяє легко аналізувати наявність і кількість специфічних білків на синаптичному рівні. Для підтвердження очищення отриманих фракцій використовували біохімічний аналіз, електронну мікроскопію та вестерн-блот.

Нещодавно було досліджено різні методи виділення синаптосом і продемонстровано, що різні препарати підходять для кількох напрямків досліджень. Під час процесу ізоляції необхідно враховувати можливість контамінації, особливо мітохондріальних і гліальних структур. Збагачення синаптосом можна виявити за допомогою імунореактивності на маркерні білки синаптофізин і Psd-95. Для протеомного аналізу синаптосоми є ідеальними мішенями. Одночасний якісний і кількісний аналіз тисяч білків можливий завдяки нещодавно доступним методам розділення і виявлення білків. Ці білки формують структурні та функціональні властивості синапсу. Цікаво, що синаптосоми були запропоновані як мітохондріальна транспортна система, яка може бути використана для лікування багатьох розладів мозку, пов'язаних з мітохондріальною дисфункцією. Протеомний підхід продемонстрував наявність білків, які беруть участь у механізмах злиття мембран, включаючи SNARE і SNAP-25. Більше того, мітохондріальна дисфункція відіграє вирішальну роль у деяких нейродегенеративних захворюваннях та нейрозапаленні через її участь в апоптичному процесі та продукуванні ROS.

Конфокальна мікроскопія - це сучасний метод мікроскопії. Основною перевагою конфокальної мікроскопії над іншими видами мікроскопії є її здатність блокувати розфокусоване світло від освітлених зразків за допомогою отворів. Вона часто використовується з флуоресцентною оптикою для отримання висококонтрастних зображень з високою роздільною здатністю. На відміну від оптичних мікроскопів, конфокальні мікроскопи використовують сфокусований лазерний промінь для сканування всієї поверхні зразка в різних z-площинах. Тому ці мікроскопи ідеально підходять для дослідження товстих зразків, таких як біоплівки, зрізи тканин і синаптосоми. За допомогою конфокальної мікроскопії можна було

спостерігати зміни Ca^{2+} в цитоплазмі та ендоплазматичному ретикулумі, пов'язані з нейрозапаленням. Рекомендується використовувати флуоресцентні маркери для легкої візуалізації пре- і постсинаптичних терміналей глутаматергічних синаптосом за допомогою конфокальної мікроскопії [20].

1.4 Вступ до амфіфільних сполук та пресинаптичної функції

Амфіфільні молекули — це сполуки, які мають як полярні, так і неполярні ділянки та мають як гідрофільні, так і ліпофільні властивості. Амфіфільні молекули мають принаймні одну гідрофільну частину і принаймні одну ліпофільну частину. Однак амфіфільна молекула може мати кілька гідрофільних і ліпофільних молекул. Ліпофільний мотив зазвичай являє собою вуглеводневий фрагмент, що складається з атомів вуглецю та водню. Ліпофільний мотив є гідрофобним і неполярним. Фосфоліпіди - найпоширеніший тип амфіфільних сполук, що містяться в клітинних мембранах. Фосфоліпіди складаються з полярної фосфатної групи (гідрофільної головки), приєднаної до молекули гліцерину, і двох неполярних ланцюгів жирних кислот (гідрофобних хвостів). Така структура дозволяє фосфоліпідам формувати ліпідний бішар завдяки гідрофобним взаємодіям між хвостами жирних кислот, тоді як гідрофільна головна група взаємодіє з водою.

Ліпіди — це невеликі амфіпатичні молекули, які не розчиняються у воді та самозбираються у складні структури у водному середовищі. Нервова система особливо збагачена ліпідами і підтримує більш різноманітний ліпідний склад, ніж інші тканини. Таке ліпідне різноманіття пов'язане з еволюцією вищих когнітивних здібностей у приматів і залежить від віку та

статі, активності нейронів, а також від стресу і травм. Крім того, зміни ліпідного спектру пов'язані з широким спектром неврологічних і психіатричних захворювань, що паралельно викликає інтерес до ліпідних біомаркерів і ліпідомодифікуючої терапії. Позитивні результати доклінічних досліджень вже призвели до випробувань, заснованих на застосуванні ліпідомодифікуючих препаратів або специфічних ліпідних дієт, зокрема, для лікування пацієнтів з хворобою Альцгеймера або бічним аміотрофічним склерозом.

Нейрони передають інформацію на великі відстані і мають пресинаптичну терміналь, яка спеціалізована для вивільнення нейромедіаторів. Ця терміналь функціонально призначений для ремоделювання мембран. У синапсах плазматична мембрана за допомогою ендоцитарних механізмів інтенсивно реструктурується, утворюючи синаптичні везикули, які сортуються і транспортуються, а потім швидко зливаються з плазматичною мембраною при відкритті потенціалкерованих іонних каналів. Хоча ми зазвичай думаємо, що ці події відбуваються завдяки білковим механізмам, молекули мембранних ліпідів відіграють ключову роль. Синапси збагачені холестерином і поліненасиченими жирними кислотами, а нейротрансмісія вимагає декількох специфічних ліпідів, включаючи фосфатидилінозитолфосфати. Крім того, пресинаптичний термінал містить численні ліпідо-метаболізуючі ферменти, які локально змінюють ліпідні структури і пов'язані з неврологічними захворюваннями.

Пресинаптичні терміналі — це високоефективні машини для ремоделювання мембран. Синаптичні везикули зливаються з плазматичною мембраною протягом 1 мс після надходження потенціалу дії, і термінал може підтримувати цикли злиття везикул з частотою 100 Гц або вище. Екзоцитоз синаптичних везикул просторово організований таким чином, щоб

відбуватися в активних зонах, які звернені до скупчення рецепторів нейромедіаторів на постсинаптичних клітинах. Активні зони містять основні механізми екзоцитозу, включаючи Q-SNAREs Syntaxin 1 і SNAP25, а також кілька основних білків активних зон (наприклад, RIM, RIM-BP, unc-13, ліприн-альфа-1 і ELKS), які опосередковують стикування і праймінг синаптичних везикул і рекрутують потенціалкеровані кальцієві канали. Другий важливий етап реорганізації мембрани відбувається після екзоцитозу, коли термінал реінтерналізує мембрану. Пресинаптичний ендоцитоз пов'язаний у часі і просторі з вивільненням синаптичних везикул, і без цієї компенсації екзоцитоз розширив би плазматичну мембрану, білки і ліпіди стали б неправильно локалізованими, і терміналь зрештою втратила би синаптичні везикули. Мембранні ліпіди, особливо негативно заряджені фосфатидилсерин (PtdSer) і PtdInsPs на цитозольній поверхні плазматичної мембрани, функціонують на багатьох етапах циклу синаптичних везикул, а електростатичний заряд цих ліпідів є центральним для пресинаптичного екзо- та ендоцитозу і допомагає поєднати ці два процеси [21].

1.4.1 Вплив амфіфільних сполук на функцію та цілісність мембран

Встановлено, що біологічно активні амфіфільні сполуки, наприклад, четвертинні амонійні солі, спричиняють підвищену плинність ліпідних мембран і чинять деструктивний вплив на біологічні мембрани. У присутності цих сполук збільшується швидкість проникнення іонів через ліпідні мембрани. Ці ефекти проявляються за досить високих концентрацій досліджуваних сполук (понад 10% моль сполуки/моль лецитину), що може свідчити про те, що біологічно активні амфіфільні сполуки (в тому числі й

іонні) інгібують процес гемолізу еритроцитів за малих концентрацій і прискорюють його за вищих концентрацій [22].

Плинність мембран залежить від складу ліпідів; фосфоліпідні бішари зазвичай текучі при фізіологічних температурах, хоча їх індивідуальна температура плавлення (Tm) залежить від таких властивостей, як довжина ланцюга, ступінь ненасиченості та форма головної групи. Вище температури плавлення ліпіди знаходяться в рідкій рідкокристалічній фазі, а нижче - у більш твердій гелеподібній фазі; плинність зменшується з пониженням температури]. Комбінація різних ліпідів, таким чином, визначає плинність мембрани. На товщину мембрани і бічний тиск може впливати довжина ланцюга і насиченість ліпідів. Дослідження Кантора показало, що наявність подвійних зв'язків ближче до головних груп ліпідів збільшує бічний тиск, а присутність холестерину впливає як на товщину, так і на як на товщину, так і на бічний тиск. Товщина і плинність мембран, а також ліпідна упаковка можуть також впливати на проникність для розчинів; водопроникність може бути зменшена присутністю певних ліпідів, таких як холестерину та сфінголіпідів. Поверхневий заряд мембран визначається загальним зарядом катіонних і аніонних функціональних груп головних груп ліпідів, що входять до складу мембрани. Фосфатидилетаноламін і фосфатидилхолін є цвіттер-іонними, тоді як фосфатидилсерин і фосфатидилінозитол мають негативний заряд і містяться у великій кількості у внутрішній оболонці; тому вони вносять значний внесок у загальний негативний заряд мембрани, який, у свою чергу, генерує поверхневий потенціал. Порушення мембрани молекулярними або фізичними методами може змінити ці властивості і вплинути на стабільність та функцію мембрани. Крім того, правильне функціонування мембранних білків сильно залежить від їхнього ліпідного

оточення, а отже, зміни ліпідних компонентів мають супутні зміни в активності мембранних білків [23].

Гангліозиди — це глікофосфінголіпіди плазматичної мембрани, які є дуже поширеними в нервовій системі, де вони відіграють ключову роль у кількох сигнальних шляхах і клітинній адгезії. Їхні структури зазнають значних змін під час ембріонального розвитку, а їхній розподіл демонструє значні відмінності між ділянками мозку. Ранні дослідження також показали, що вони можуть індукувати ріст нейронів in vitro шляхом екзогенного додавання до клітин. Ці знахідки та їхня велика кількість у нервовій системі порівняно з екстраневральними тканинами призвели до гіпотези, що вони відіграють важливу роль у нормальному функціонуванні нейронів. Генетичні моделі на мишах, де біосинтез гангліозидів спрямований, показали, що гангліозиди важливі для нормальної стабілізації мієлін-аксонів, а їхня присутність необхідна для нормального розвитку мозку. Повідомляється, що гангліозиди збагачені мікродоменами мембрани, щільно упакованими разом з холестерином і сфінгомієліном. Вважається, що ці мембранні мікродомени або ліпідні рафти створюють відносно впорядковану фазу порівняно з навколишньою мембраною, яка діє як платформа і впливає на організацію клітинних сигнальних молекул. У мембрані гангліозиди в основному вбудовані в зовнішній листок з їх гідрофобним церамідним фрагментом, що складається з довголанцюгового аміноспирту, сфінгозину, з'єднаного з жирною кислотою за допомогою амідного зв'язку. Їх варіабельний олігосахаридний ланцюг складається з різної кількості нейтральних цукрів і принаймні однієї сіалової кислоти, яка забезпечує негативний заряд при фізіологічному pH. Як їхній цукровий ланцюг, так і ліпідний хвіст мають специфічні фізико-хімічні властивості, які сприяють утворенню мікродоменів. Наприклад, їхня здатність утворювати мережу водневих

зв'язків на межі розділу ліпідів і води, геометрія олігосахаридної головної групи, взаємодія вуглеводів з водою, а також довгі, насичені алкільні ланцюги - все це свідчить про їхню роль у формуванні рідинно-впорядкованих мікродоменів у мембрані. Відомо, що холестерин модулює плинність мембрани і взаємодіє переважно з довгими насиченими алкільними ланцюгами, такими як у гангліозидах, взаємодія з якими також сприяє утворенню рідинно-впорядкованих мікродоменів.

1.4.2 Амфіфільні сполуки як інструменти для дослідження пресинаптичних механізмів

Амфіфільні сполуки відіграють важливу роль у вивченні пресинаптичних механізмів. Розуміння пресинаптичних механізмів має вирішальне значення для розробки фармакологічних препаратів, спрямованих на лікування неврологічних розладів. Амфіфільні сполуки можуть слугувати каркасом для розробки нових лікарських засобів, які модулюють пресинаптичну функцію. Флуоресцентні β-блокатори, такі як RCTM-3, є цінними інструментами для вивчення пресинаптичних механізмів завдяки своїй здатності контролювати накопичення всередині секреторних везикул, як показано в дослідженні. Використання радіоактивно мічених молекул продемонструвало, що адренергічні β-блокатори (β-Bs) накопичуються та секретуються хромафінними клітинами. Більше того, нещодавно було продемонстровано, що β-Bs можуть проявляти свої відстрочені ефекти як антигіпертензивні засоби через механізм, який не пов'язаний безпосередньо з їх здатністю бути блокаторами β-рецепторів, а скоріше, з їх прогресуючим накопиченням у секреторних везикулах

симпатичних клітин. Інші класичні препарати, такі як амфетаміни, тирамін або гідралазин, також можуть поглинатися секреторними везикулами, тим самим витісняючи природний нейромедіатор. Такі речовини, що мають таку властивість, зазвичай називають фальшивими нейромедіаторами. Дійсно, коли накопичений матеріал має специфічну активність, як це відбувається з β-Bs, ко-секреція викликає фармакологічний антагонізм катехоламінів на синаптичному з'єднанні [24]. Гангліозиди - це високоамфіфільні сполуки, розташовані в плазматичній мембрані. Вони найбільш поширені в нервових тканинах, де їх порушення регуляції, як припускають, може бути пов'язане з різними патологічними станами. Зважаючи на їхню важливість, необхідні ефективні аналітичні методи для визначення індивідуальних гангліозидів у біологічних зразках. Гангліозиди нерівномірно розподілені в плазматичних мембранах і переважно розташовані в мембранних мікродоменах, так званих ліпідних рафтах, разом з холестерином, сфінголіпідами та мембранними білками. Вони беруть участь у кількох біологічних функціях, таких як адгезія клітин і розпізнавання клітин через цукроспецифічні взаємодії з глікан-зв'язуючими білками. Взаємодіючи латерально з іншими мембранними компонентами, вони можуть брати участь у диференціації та рості нейронів, а також у модуляції активності тирозинкінази рецепторів. Порушення регуляції гангліозидів у нервових тканинах пов'язане з різними патологічними станами. Для визначення індивідуальних гангліозидів у біологічних зразках необхідні ефективні аналітичні методи. Аналіз гангліозидів може дати уявлення про їхню концентрацію, структуру та зміни під час розвитку [25].

Місцеві анестетики, такі як тетракаїн, бупівакаїн, лідокаїн, прилокаїн і прокаїн, виявляють амфіфільний вплив на обертальну рухливість між поверхнею мембрани та вуглеводневим вмістом. Тетракаїн, що належить до

сімейства аміноефірів місцевих анестетиків, відзначається своєю амфіфільністю, а його жиророзчинне ароматичне кільце сприяє проникненню через ліпідні шари. Ці сполуки виявляють дезорганізуючий вплив на вуглеводневу внутрішню частину мембрани, але впорядковують її на межі розділу мембран, що вказує на їхній вплив на плинність мембран. Фізичний стан мембранних ліпідів відіграє вирішальну роль у різних мембранних процесах, включаючи проникність мембрани для іонів натрію, кальцію та калію. Ліпідний склад мембран, наприклад, співвідношення холестерину і фосфоліпідів, може впливати на властивості і функції мембрани, що підкреслює важливість ліпідно-білкових взаємодій в мембранній біології [26]. Амфіфільні сполуки, такі як кобіцистат, продемонстрували інгібуючий вплив на реплікацію SARS-CoV-2 через злиття мембран, опосередковане спайковим білком. Ці сполуки у поєднанні з противірусними препаратами, такими як ремдесивір, демонструють синергічний ефект, пригнічуючи реплікацію вірусу. Противірусна активність кобіцистату проявляється через пригнічення мембранного злиття, опосередкованого спайковим білком, що підкреслює його потенціал як терапевтичного кандидата для лікування COVID-19 [27].

Ремдесивір, противірусний препарат, активний проти SARS-CoV-2, виявляє різноманітні ефекти на транспортування та вивільнення нейромедіаторів у нервових терміналах кори головного мозку щурів. Препарат безпосередньо вбудовується в клітинні мембрани, впливаючи на вивільнення та поглинання нейромедіаторів у дозозалежний спосіб. Дослідження показують, що точний контроль за дозуванням ремдесивіру має вирішальне значення для

запобігання потенційним нейромодулюючим діям на пресинаптичному рівні.

У дослідженні співчутливого застосування ремдесивір продемонстрував перспективність у лікуванні важких випадків COVID-19. Моделювання молекулярної динаміки показує взаємодію ремдесивіру з ліпідними бішарами, проливаючи світло на його мембранотропні ефекти [28]. Ремдесивір, також відомий як GS-5734, є аналогом 1'-ціанозаміщеного аденозиннуклеотиду, який спочатку був розроблений як противірусний засіб проти вірусу Ебола1, але згодом було показано, що він послаблює вірусне навантаження ряду РНК-вірусів, включаючи респіраторно-синцитіальний вірус (РСВ) та β-коронавіруси, такі як SARS-CoV, MERS-CoV та SARS-CoV-2. Показано, що Ремдесивір не має значної інгібуючої активності щодо РНК людини Pol II та мітохондріальної РНК-полімерази (h-mtRNAP)1. Нещодавно було показано, що Ремдесивір виявляє захисну дію *in vitro* проти неалкогольної жирової хвороби печінки, пригнічуючи прозапальну сигналізацію, опосередковану STING6 [29].

Цей новий член сімейства нуклеотидних аналогів, раніше показав чудові противірусні ефекти і проникнення в клітини, а також, як передбачається, має протигліобластоматозну дію. В експериментах *in vitro* ремдесивір значно пригнічував ріст клітин ГБМ, зі значеннями IC50 значно нижчими, ніж у нормальних клітинних ліній або тих же клітинних ліній, оброблених темозоломідом. Більше того, у численних моделях на мишах ремдесивір не тільки виразно пригнічував прогресування та покращував прогноз ГМРЛ, але й демонстрував багатообіцяючий профіль біобезпеки, що проявлявся у відсутності значної втрати маси тіла, дисфункції печінки або нирок чи структурних пошкоджень органів після введення препарату. Крім того, дослідивши анти-ГГМ механізм за допомогою РНК-секвенування, вчені виявили, що RDV може індукувати апоптоз клітин ГГМ шляхом посилення стресу ендоплазматичного ретикулуму (ЕР) та активації PERK-

опосередкованої розгорнутої білкової реакції. Таким чином, ці результати вказують на те, що ремдесивір може слугувати новим агентом для лікування ГПМК шляхом посилення стресу ЕР та індукції апоптозу в клітинах ГПМК [30].

РОЗДІЛ ІІ. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Виділення синаптосом з головного мозку щурів

Виділення синаптосом з мозку є важливим кроком у неврологічних дослідженнях, оскільки дозволяє вивчати синаптичну функцію та вивільнення нейромедіаторів. Цей метод уможливлює очищення синаптичних нервових терміналей, надаючи дослідникам цінний інструмент для вивчення молекулярних механізмів, що лежать в основі синаптичної передачі. Синаптосоми, зберігаючи структурну та функціональну цілісність дають можливість вивчати складні процеси вивільнення та зворотного захоплення нейромедіаторів. Крім того, виділення та подальший аналіз синаптосомальних білків і мембранного потенціалу може дати уявлення про патофізіологію різних неврологічних розладів.

У цьому дослідженні ми використовували метод Котмана [32] з невеликими модифікаціями для виділення синаптосом з мозку щурів. Для отримання нервових терміналей проводили декапітацію щурів лінії Wistar. Отримані тканини гомогенізують використовуючи скляний гомогенізатор Поттера. 10% гомогенат центрифугували 2 рази, при 2,500g 5 хв, для відокремлення ядер, кровоносних судин, зруйнованих нервових клітин, подальше центрифугування надосадової рідини при 12,000g 10хв, що дозволяло отримати грубу мітохондріальну фракцію, яка містила мітохондрії, синаптосоми та мієлінізовані залишки.

Останній осад розводили в розчині Кребс-Рінгера (126 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1,4 мМ $MgCl_2$, 1,0 мМ NaH_2PO_4, 20 мМ HEPES, 10 мМ D-глюкози (pH 7,4)). Визначення потенціалу проводилось в середовищі Кребс-Рінгера,

насичали киснем. Всі процедури виділення та зберігання синаптосом проводилися при +4С.

2.2 Визначення концентрації білку

Концентрацію білку визначали за методом Лоурі в модифікації Ларсона [33]. Метод ґрунтується на двох різних реакціях. Перша полягає в утворенні комплексу іонів міді з амідними зв'язками, що утворює відновлену мідь у лужних розчинах. Цей комплекс називається хромофор Біурета і зазвичай стабілізується додаванням тартрату. Друга реакція - відновлення реактиву Фоліна (фосфомолібдату і фосфовольфрамової кислоти), в першу чергу комплексом відновленої міді з амідними зв'язками, а також залишками тирозину, триптогану, гістидину, цистину і цистеїну в білках, причому останню реакцію каталізує одновалентний іон міді. Додавання дитиотреїтолу (ДДТ) в процедурі Лоурі через 3 хвилини після додавання реактиву Фоліна призводить до негайної появи забарвлення, при цьому поглинання збільшується на 35-60% на масу використаного білка.

До контрольних зразків додавали 10 мкл буфера Кребса-Рінгера (126 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1,4 мМ $MgCl_2$, 1,0 мМ NaH_2PO_4, 20 мМ HEPES, 10 мМ D-глюкози (pH 7,4)), а до досліджуваних зразків - суспензію синаптосом. Потім об'єм доводили до 300 мкл 25 мМ NaCl і додавали 3 мл реактиву Лоурі С. Потім до контрольного зразка додавали 300 мкл реагенту Фоліна і через 15 с до кожного наступного зразка. Реагент Фоліна розводили до концентрації 1 н водою з 2-кратним розведенням; через 3 хв до першого зразка додавали 300мкл 20 mM DTT і через 15 с до кожного наступного зразка.

Оптичну густину розчину білка визначали за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 740 нм.

2.3 Оцінка мембранного потенціалу синаптосом за допомогою зонду родамін 6G

Мембранний потенціал синаптосом контролювали за допомогою потенціометричного флуоресцентного барвника родаміну 6G у концентрації 0,5 мкМ, що ґрунтується на його потенціалзалежному зв'язуванні з мембранами. Суспензію синаптосом попередньо інкубували при 37°C протягом 10 хвилин, після чого її додавали в термостатовану кювету при перемішуванні. Флуоресцентні виміри проводили на спектрофлуориметрі Hitachi 620-10-S при довжині хвилі збудження 528 нм та емісії 551 нм (ширина щілин – 5 нм). У кювету з магнітною мішалкою до суспензії синаптосом додавали родамін 6G (кінцева концентрація – 0,5 мкМ) та реєстрували зміну інтенсивності флуоресценції зонду до досягнення стаціонарного значення (Ft).

Після досягнення стабільного рівня флуоресценції (Ft), до кювети додавали ремдесивір у різних концентраціях і реєстрували кінетику вивільнення зонду, а також новий стаціонарний рівень флуоресценції. Відношення (F) як показник мембранного потенціалу оцінювали за рівнянням $F = Ft/F0$, де F0 є апроксимацією кривої до нульової точки часу.

Додатково слід зазначити, що використання родаміну 6G як барвника дозволяє отримати інформацію про зміни мембранного потенціалу синаптосом у режимі реального часу, що є важливим для оцінки впливу

різних агентів, таких як ремдесивір, на функціональний стан мітохондрій та загальний енергетичний статус клітин.

2.4 Визначення мембранного потенціалу за допомогою зонду JC-1

Для того, щоб оцінити зміни мембранного потенціалу в ізольованих нервових терміналях був використанний катіонний мембранопроникний барвник JC-1 (5,5`,6,6`-тетрахлор-1,1`,3,3`-тетраетилбензимідазолілкарбоціаніну йодид). Доволі часто мітохондріальний потенціал застосовують у якості маркера мітохондріальної активності, а також у ролі одного із чинників активації апоптозу. Завдяки цьому, даний параметр може охарактеризувати як функціонування мітохондрій, так і стан клітини в цілому. Під час збільшення мембранного потенціалу JC-1 активно накопичується в мітохондріях клітини, а згодом утворює концентраційно-залежні агрегати. Вимірювання динаміки та спектрів флуоресценції проводилося із використанням спектрофлуориметра «Hitachi» 650-10 S, Японія.

Для визначення потенціалу мембрани в кювету з магнітною мішалкою до суспензії синаптосом (кінцева концентрація білка 0,16 мг/мл, навантажували зондом в буфері Кребс-Рінгера), додавали розчин JC-1 (концентрація – 2 мкМ) та інкубували протягом 30 хвилин при 37ºС в темряві, а далі реєстрували зміну інтенсивності флуоресценції зонду до досягнення стаціонарного значення. Потім в кювету додавали розчин ремдизивіру в різних концентраціях та реєстрували кінетику вивільнення.

При визначенні динаміки флуоресценції зонду реєстрували зміни в часі інтенсивності цього показника, довжини хвиль становили: 488 нм – збудження, 585 нм – емісія. Для порівняння впливу досліджуванних сполук спочатку реєстрували спектри флуоресценції зонду JC-1, які прописували від 510 нм до 610 нм, при довжині хвилі збудження 488 нм, ширині спектральних щілин 5 нм, швидкості 30 нм/хв. Потім визначали співвідношення інтенсивності флуоресценції на довжинах хвиль емісії 530 нм та 585 нм.

2.5 Статистичний аналіз

Експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики із використанням програми Microsoft Excel. Перевірку вибірок на їх приналежність до нормально розподілених генеральних сукупностей здійснювали за допомогою тесту Шапіро-Уілка. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами вибірок використовували t-тест. Достовірними вважали результати за умови значення ймовірності $p < 0.05$. Результати представлені як середнє арифметичне ± стандартна похибка середнього, n – кількість дослідів.

РОЗДІЛ ІІІ. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Аналіз змін мембранного потенціалу за допомогою зонда родамін 6G

У даному дослідженні було проведено аналіз впливу різних хімічних агентів, включаючи KCl, DMSO та ремдизевір у різних концентраціях, на мембранний потенціал клітин з використанням потенціометричного флуоресцентного зонда родамін 6G. Мембранний потенціал є критично важливим показником функціонального стану клітин, оскільки він відображає енергетичний статус клітин і їхню здатність підтримувати гомеостаз.

Родамін 6G є ліпофільним та катіонним зондом, що легко проходить крізь мембрану і зосереджується в примембранному просторі, згідно величини мембранного потенціалу. За цих умов спостерігається гасіння флуоресценції зонду, в той же час зростання сигналу флуоресценції свідчить про деполяризацію мембрани. Родамін 6G дозволяє вимірювати сумарний потенціал плазматичної мембрани та мітохондрій. Цей метод є надзвичайно чутливим і точним для виявлення навіть незначних змін у мембранному потенціалі, що робить його незамінним інструментом для вивчення клітинних процесів.

У дослідженні було проаналізовано зміну інтенсивності флуоресценції родаміну 6G під впливом різних концентрацій ремдизевіру, а також KCl та DMSO. Це дозволило оцінити деполяризацію та реполяризацію клітинних мембран у відповідь на ці агенти. Особлива увага була приділена впливу ремдизевіру, який є відомим противірусним препаратом, на мембранний потенціал клітин. Результати дослідження допоможуть краще зрозуміти механізми дії ремдизевіру на клітинному рівні та його вплив на енергетичний

стан клітин, що має важливе значення для розробки нових терапевтичних підходів та вдосконалення існуючих методів лікування.

На графіку (Рис. 3.1) зображено динаміку навантаження зонду родамін 6G у синаптосоми, що демонструє, як флуоресценція виходить на плато і далі не змінюється спонтанно. Для обчислення відносної деполяризації, спричиненої ремдесивіром, використовували деполяризацію, спричинену 35 мМ KCl, як стандартну і умовно позначали її як 100%. Відносно її значення для кожного з випадків за пропорцією обраховували деполяризацію, спричинену ремдесивіром. DMSO був використаний як розчинник для ремдесивіру і досліджувався як нульова проба.

Перші 600 секунд відображають навантаження зонду у синаптосоми, додавання всіх агентів відбувалося на 600-й секунді.

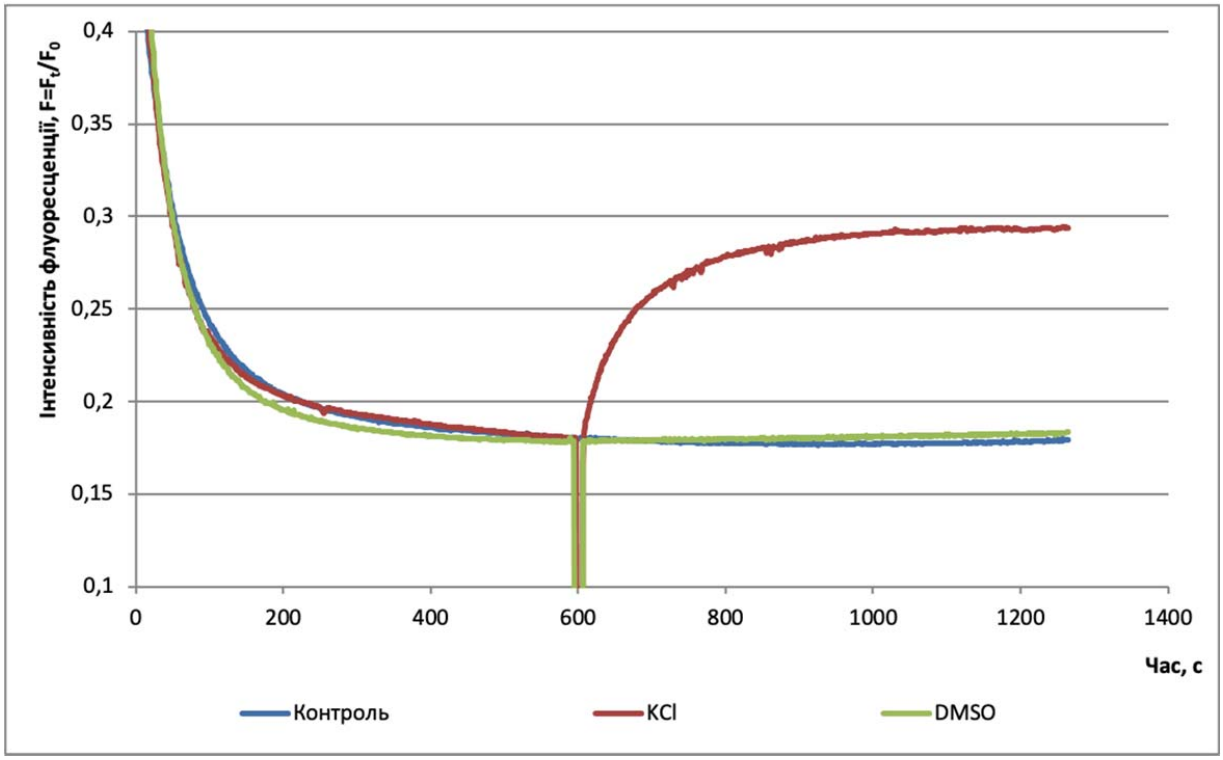

Рис 3.1. Зміна інтенсивності флуоресценції зонда родамін 6G (F=Ft/F0) в залежності від часу для контрольної групи, групи з додаванням KCl та DMSO

На графіку (Рис. 3.2) показано зміну інтенсивності флуоресценції зонду родамін 6G з часом для контрольної групи (синя лінія) та груп з додаванням різних концентрацій ремдесивіру (1 мкМ - зелена лінія, 2.5 мкМ - фіолетова лінія, 5 мкМ - блакитна лінія, 10 мкМ - помаранчева лінія). Початкове зниження інтенсивності флуоресценції у всіх групах відбувається в перші 200 секунд, після чого спостерігається стабілізація.

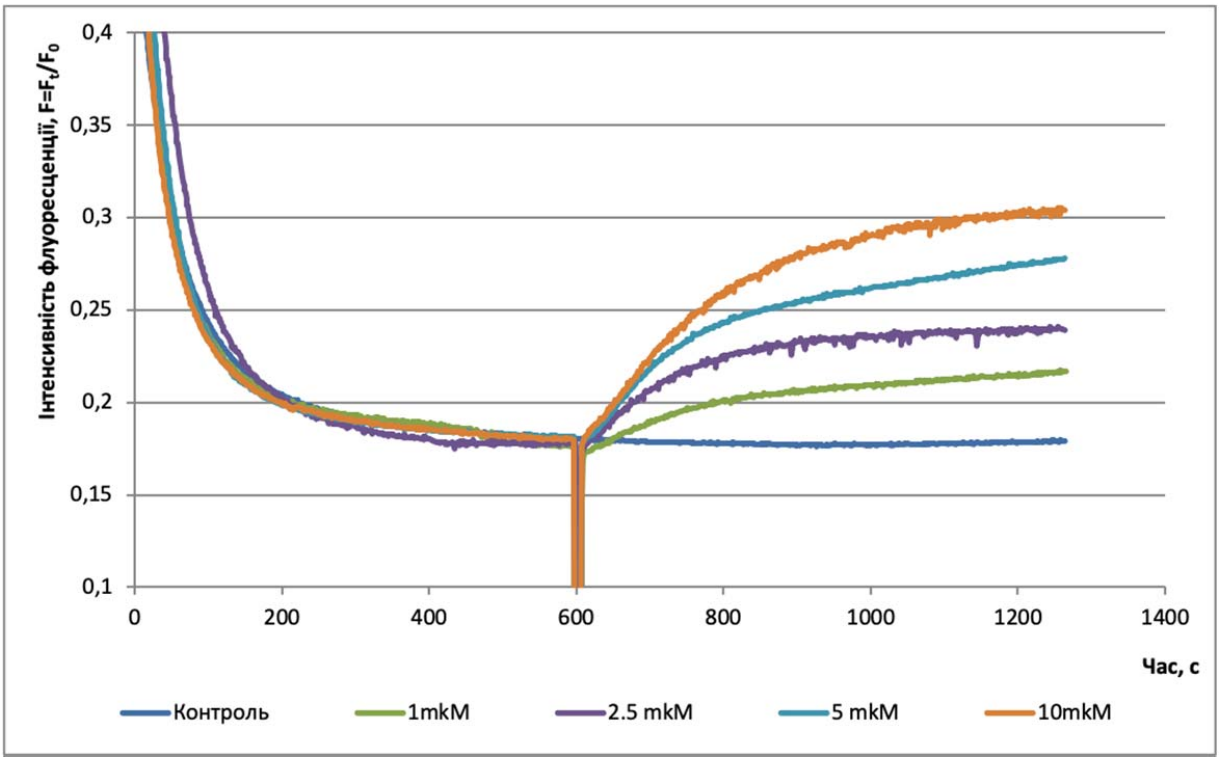

Рис 3.2. Зміна інтенсивності флуоресценції зонда родамін 6G (F/F0) з часом для контрольної групи та груп з додаванням різних концентрацій ремдизевіру

На графіку (Рис. 3.3) зображено зміну інтенсивності флуоресценції зонда родамін 6G (F/F0) з часом для трьох груп: контрольної (синя лінія), з додаванням KCl (червона лінія) та з додаванням ремдесивіру в концентрації 10 мкМ (помаранчева лінія). У контрольній групі спостерігається початкове зниження інтенсивності флуоресценції в перші 200 секунд, після чого стабілізація на рівні близько 0.2, що свідчить про початкову деполяризацію та стабілізацію мембранного потенціалу. У групі з KCl спостерігається різке зниження інтенсивності флуоресценції до 600 секунди, після чого інтенсивність різко збільшується та стабілізується на вищому рівні, що вказує на значну деполяризацію мембран під впливом KCl з подальшою реполяризацією. У групі з ремдесивіром 10 мкМ поведінка подібна до групи з

KCl, з початковим різким зниженням інтенсивності флуоресценції до 600 секунди, після чого інтенсивність поступово зростає та стабілізується на рівні вищому за контрольну групу.

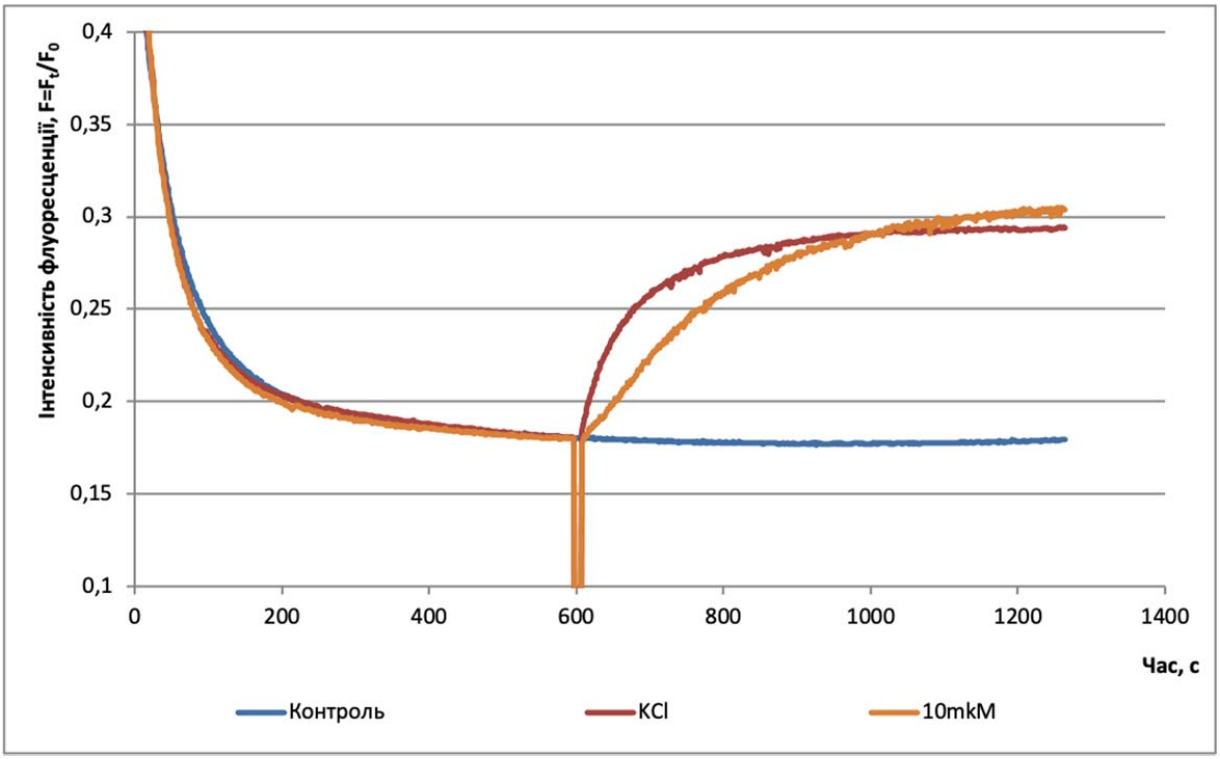

Рис 3.3. Зміна інтенсивності флуоресценції зонда родамін 6G (F/F0) з часом для контрольної групи та груп з додаванням KCl і ремдизевіру в концентрації 10 мкМ

3.2 Динаміка змін мембранного потенціалу за допомогою зонду JC-1

Сучасні дослідження продемонстрували, що ремдесивір безпосередньо вбудовується в клітинні мембрани, що призводить до порушення мембранної структури. Таке вбудовування призводить до зменшення індукованого деполяризацією екзоцитотичного вивільнення нейромедіаторів, таких як глутамат і ГАМК, що в кінцевому підсумку погіршує нейротрансмісію.

Синаптосоми, відділені від аксонів нервові закінчення, які зберігають всі особливості інтактних нервових терміналей, використовуються для дослідження процесів нейросекреції. Отже, головним завданням цієї дослідницької роботи було оцінити вплив ремдесивіру на мембранний потенціал, який є основною характеристикою, яка відповідає за процес передачі нервового імпульсу.

Зонд JC-1 — це флуоресцентний барвник, який використовується для вимірювання мембранного потенціалу мітохондрій в живих клітинах. Його дія заснована на потенціал-залежному накопиченні в мітохондріях: при низькому мембранному потенціалі JC-1 залишається в мономерній формі, випромінюючи зелену флуоресценцію (~529 нм), тоді як при високому мембранному потенціалі він утворює агрегати, які випромінюють червону флуоресценцію (~590 нм). Співвідношення червоної та зеленої флуоресценції вказує на здоров'я мітохондрій, а зменшення цього співвідношення означає деполяризацію.

На основі графіка (Рис. 3.4) зміни інтенсивності флуоресценції для зонду JC-1 можна зробити висновок, що ремдесивір впливає на стан мембранного потенціалу мітохондрій. У контрольній групі, де ремдесивір не додавався, інтенсивність флуоресценції залишається стабільною, що свідчить про збереження мітохондріального потенціалу на постійному рівні. Натомість у групі з додаванням ремдесивіру спостерігається поступове зниження інтенсивності флуоресценції, що вказує на деполяризацію мітохондріальної мембрани. Це може свідчити про те, що ремдесивір впливає на мітохондріальну функцію, знижуючи мембранний потенціал, що є важливим показником метаболічної активності та здоров'я клітин. Таким чином, можна припустити, що ремдесивір може викликати зміни в енергетичному стані клітин шляхом впливу на мітохондрії.

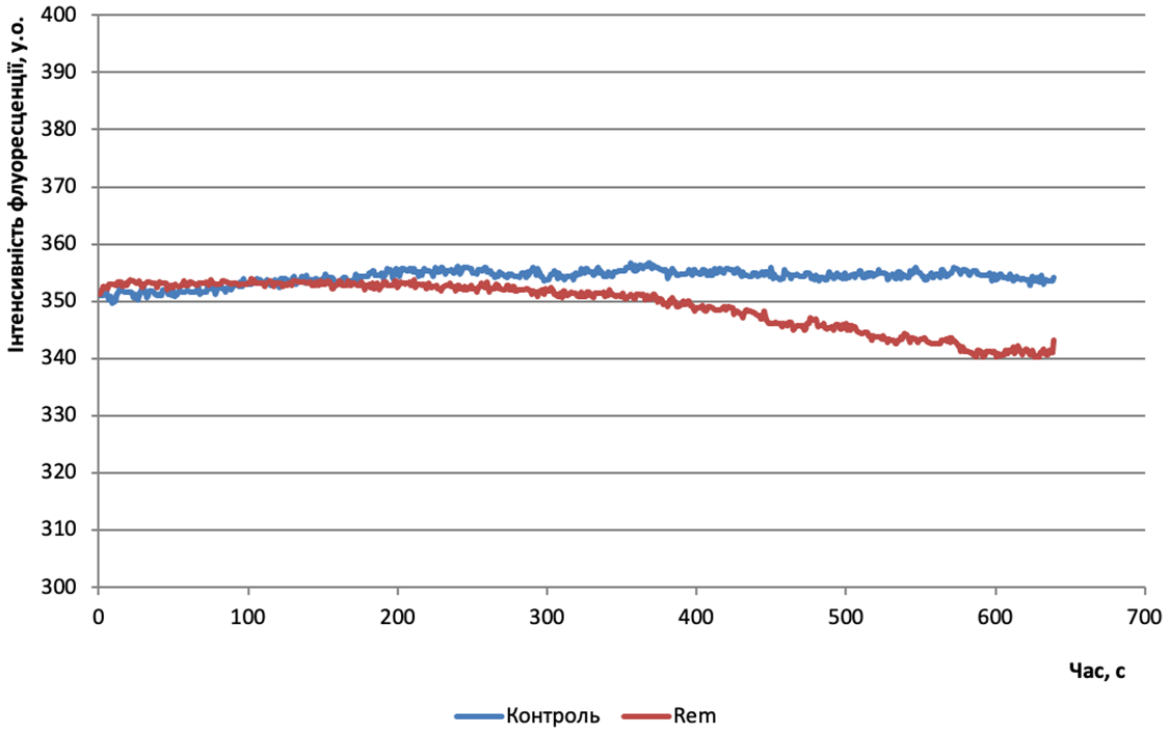

Рис 3.4. Зміна інтенсивності флуоресценції зонда JC1 з часом для контрольної групи (синя лінія) та групи з додаванням ремдизевіру (червона лінія)

На графіку (Рис 3.1.) зображено динаміку інтенсивності флуоресценції зонда JC1 у залежності від часу для двох груп: контрольної та з додаванням ремдизевіру. Стабільна інтенсивність флуоресценції в контрольній групі свідчить про збереження мітохондріального потенціалу, тоді як поступове зниження інтенсивності флуоресценції в присутності ремдизевіру вказує на деполяризацію мітохондріальної мембрани, що може бути наслідком порушення енергетичного стану клітин під впливом препарату.

3.3 Співвідношення інтенсивності флуоресценції зонду JC-1

На графіку (Рис 3.2) зображені спектри флуоресценції зонда JC-1 для контрольної групи (синя лінія) та групи з додаванням ремдизевіру (червона лінія). В обох випадках спостерігається пікове значення інтенсивності флуоресценції приблизно при 580 нм, що відповідає агрегованій формі JC-1 в мітохондріях, свідчачи про поляризовану мітохондріальну мембрану. У контрольній групі пікова інтенсивність флуоресценції є вищою, ніж у групі з ремдизевіром, що свідчить про вищу концентрацію JC-1 у агрегованій формі, характерній для поляризованих мітохондрій. У групі з ремдизевіром спостерігається зменшення пікової інтенсивності флуоресценції, що може вказувати на деполяризацію мітохондріальних мембран під впливом ремдизевіру, оскільки менша кількість JC-1 перебуває в агрегованій формі, характерній для поляризованих мембран. Таким чином, зменшення інтенсивності піку флуоресценції у присутності ремдизевіру свідчить про деполяризацію мітохондріальних мембран, що може бути наслідком негативного впливу препарату на енергетичний стан клітин. Зниження інтенсивності флуоресценції вказує на те, що ремдизевір може спричиняти зниження метаболічної активності клітин через вплив на мітохондріальний потенціал.

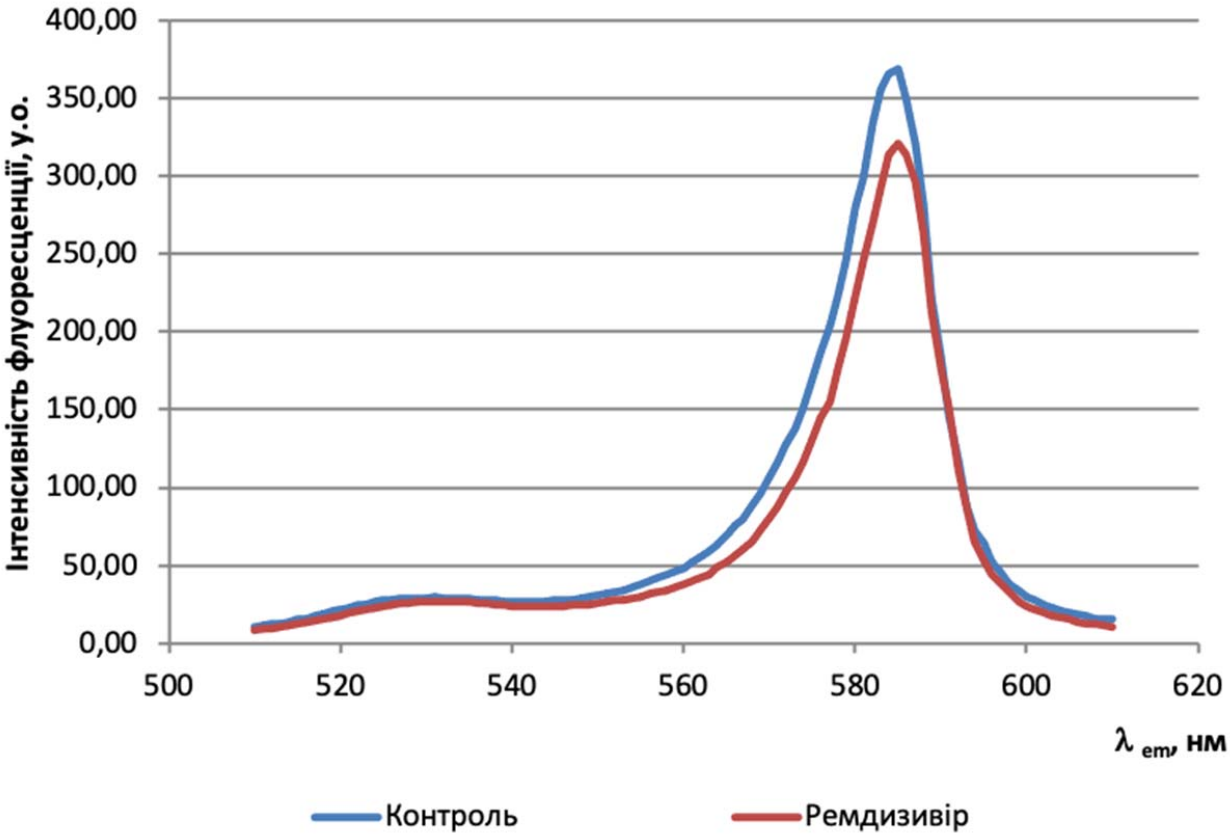

Рис 3.5. Спектри флуоресценції зонду JC-1

Співвідношення інтенсивності флуоресценції зонда JC-1 відноситься до вимірювання відносних рівнів червоної флуоресценції (585 нм) до зеленої флуоресценції (530 нм), випромінюваної барвником при його накопиченні в мітохондріях клітин. JC-1 є катіонним барвником, який демонструє потенціал-залежне накопичення в мітохондріях, утворюючи мономери і випромінюючи зелену флуоресценцію при низькому мембранному потенціалі мітохондрій і утворюючи агрегати і випромінюючи червону флуоресценцію при високому мембранному потенціалі мітохондрій. Потенціал мітохондріальної мембрани є критичним показником здоров'я клітини. Здорові клітини з неушкодженою функцією мітохондрій мають вищий рівень

співвідношення червоної та зеленої флуоресценції. Клітини, що перебувають у стані стресу, апоптозу або з порушеною функцією мітохондрій, демонструють нижчий рівень флуоресценції.

Як ми можемо побачити з графіку (Рис. 3.6) при контролі інтенсивність флуоресценції зонду JC-1 вища, ніж при додаванні ремдизивіру. Вищий рівень флуоресценції свідчить про здорові та функціональні мітохондрії.

Для проведення кількісного аналізу впливу ремдесивіру на мітохондріальний мембранний потенціал за допомогою зонду JC-1 було використано наступну методику: контрольна група без ремдесивіру прийнята за 100% інтенсивності флуоресценції. Виміряна інтенсивність флуоресценції у групах з додаванням ремдесивіру порівнюється з контрольною групою. На графіку представлено співвідношення інтенсивності флуоресценції зонду JC-1 на довжинах хвиль емісії 585 та 530 нм для контрольної групи та групи з додаванням ремдесивіру. Контрольна група (без ремдесивіру) показала інтенсивність флуоресценції, яку прийнято за 100%. Група з ремдесивіром показала інтенсивність флуоресценції приблизно на рівні 90% від контрольної. Відносні значення інтенсивності флуоресценції були розраховані як відсотки від контрольної групи: контрольна група - 100%, група з ремдесивіром - приблизно 90%. Це свідчить про те, що ремдесивір спричинив зниження інтенсивності флуоресценції приблизно на 10%, що вказує на деполяризацію мітохондріальних мембран під впливом ремдесивіру. Кількісний аналіз показує, що ремдесивір спричиняє зниження мембранного потенціалу мітохондрій на приблизно 10% порівняно з контрольною групою..

Ці дані підкреслюють важливість точного контролю дозування під час противірусної терапії для запобігання потенційним нейромодуляторним

ефектам на пресинаптичному рівні та наголошують на необхідності подальших досліджень нейротропних ефектів ремдесивіру.

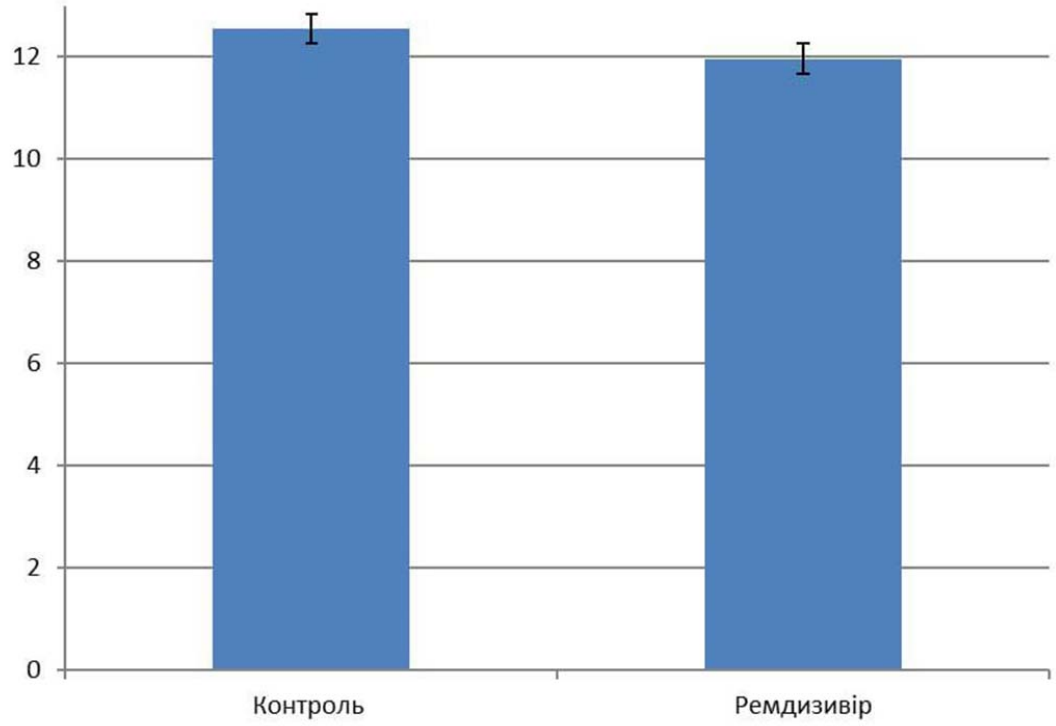

Рис 3.6. Співвідношення інтенсивності флуоресценції зонда JC-1 на довжинах хвиль емісії 585 та 530 нм для контрольної групи та групи з додаванням ремдизевіру (n = 5)

ВИСНОВКИ

1. Дослідження продемонстрували, що ремдесивір, противірусний препарат, активний проти SARS-CoV-2, впливає на транспортування та вивільнення нейромедіаторів у нервових терміналах кори головного мозку щурів.
2. Встановлено, що ремдесивір безпосередньо вбудовується в клітинні мембрани, що призводить до порушення мембранної структури, та зменшує індуковане деполяризацією екзоцитотичне вивільнення нейромедіаторів, таких як глутамат і ГАМК. Це впливає на нейротрансмісію, що може мати наслідки для функціонування нервової системи. Використання синаптосом, що зберігають особливості інтактних нервових терміналів, у поєднанні з зондами JC-1 та родаміну 6G дозволило оцінити вплив ремдесивіру на мембранний потенціал, що є ключовим для передачі нервового імпульсу.
3. Результати показали, що ремдесивір прискорює явище деполяризації мітохондрій, що свідчить про наявність більшого числа дисфункціональних мітохондрій під впливом цього препарату. Дані також підтвердили, що контроль дозування ремдесивіру має велике значення для запобігання потенційним негативним ефектам на нейромедіаторну систему. Висновки нашої роботи підкреслюють важливість подальших досліджень нейротропних ефектів ремдесивіру та необхідність розробки точних стратегій дозування для мінімізації його негативного впливу на функціонування нервової системи.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Purves, Dale, et al. *Neuroscience*. 2nd ed., New York Oxford University Press, 2001.
2. Caire, Michael J, and Matthew Varacallo. “Physiology, Synapse.” *Nih.gov*, StatPearls Publishing, 13 Nov. 2018, www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526047/.
3. Südhof, Thomas C. “The Presynaptic Active Zone.” *Neuron*, vol. 75, no. 1, 2012, pp. 11–25, www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22794257, https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.012.
4. Bae, J. R., & Kim, S. H. (2017). Synapses in neurodegenerative diseases. *BMB Reports*, *50*(5), 237–246. https://doi.org/10.5483/bmbrep.2017.50.5.038
5. Shin, M., Wang, Y., Borgus, J. R., & Venton, B. J. (2019). Electrochemistry at the Synapse. *Annual review of analytical chemistry (Palo Alto, Calif.)*, *12*(1), 297–321. https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061318-115434
6. Sheng, M., & Kim, E. (2011). The Postsynaptic Organization of Synapses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(12), a005678–a005678. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005678
7. Marin, R. (2013). The neuronal membrane as a key factor in neurodegeneration. *Frontiers in Physiology*, *4*. https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00188

8. Chen, X. (2022). Neuronal membrane and Mechanisms Appeared on the Membrane Surface. *Bio Web of Conferences/BIO Web of Conferences*, *55*, 01024. https://doi.org/10.1051/bioconf/20225501024
9. Jerusalem, A., Al-Rekabi, Z., Chen, H., Ercole, A., Malboubi, M., Tamayo-Elizalde, M., Verhagen, L., & Contera, S. (2019). Electrophysiological-mechanical coupling in the neuronal membrane and its role in ultrasound neuromodulation and general anaesthesia. *Acta Biomaterialia*, *97*, 116–140. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.07.041
10. Van Wijk, N., Broersen, L. M., De Wilde, M. C., Hageman, R. J., Groenendijk, M., Sijben, J. W., & Kamphuis, P. J. (2013). Targeting Synaptic Dysfunction in Alzheimer's Disease by Administering a Specific Nutrient Combination. *Journal of Alzheimer's Disease*, *38*(3), 459–479. https://doi.org/10.3233/jad-130998
11. Marin, R. (2013b). The neuronal membrane as a key factor in neurodegeneration. *Frontiers in Physiology*, *4*. https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00188
12. Slutsky, D. J. (2006). Electrodiagnostic Testing of the Upper Extremity. In *Elsevier eBooks* (pp. 319–355). https://doi.org/10.1016/b978-0-443-06667-2.50029-0
13. Ziv, N. E., & Garner, C. C. (2004). Cellular and molecular mechanisms of presynaptic assembly. *Nature Reviews. Neuroscience*, *5*(5), 385–399. https://doi.org/10.1038/nrn1370
14. Mel, B. W., & Kolb, B. (2015). Neurons and Dendrites, Integration of Information in. In *Elsevier eBooks* (pp. 703–707). https://doi.org/10.1016/b978-0-08-097086-8.55030-2
15. Kandel, E. R., & Al, E. (2013). *Principles of neural science*. Mcgraw-Hill Medical.

16. Caldwell, J. (2009). Action Potential Initiation and Conduction in Axons. In *Elsevier eBooks* (pp. 23–29). https://doi.org/10.1016/b978-008045046-9.01642-9
17. Mobley, A. S. (2019). Introduction to Adult Neurogenesis. In *Elsevier eBooks* (pp. 97–116). https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811014-0.00005-6
18. Zakharova, E., & Dudchenko, A. (2014). Synaptic Soluble and Membrane-Bound Choline Acetyltransferase as a Marker of Cholinergic Function In Vitro and In Vivo. In *InTech eBooks*. https://doi.org/10.5772/58307
19. Evans, G. J. (2015). The Synaptosome as a Model System for Studying Synaptic Physiology. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2015*(5), pdb.top074450. https://doi.org/10.1101/pdb.top074450
20. Trebesova, H., & Grilli, M. (2023). Synaptosomes: A Functional Tool for Studying Neuroinflammation. *Encyclopedia*, *3*(2), 406–418. https://doi.org/10.3390/encyclopedia3020027
21. Lauwers, E., Goodchild, R., & Verstreken, P. (2016). Membrane Lipids in Presynaptic Function and Disease. *Neuron*, *90*(1), 11–25. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.02.033
22. Podolak, M., Man, D., Waga, S., & Przestalski, S. (1996). Bimodal Effect of Amphiphilic Biocide Concentrations on Fluidity of Lipid Membranes. *Zeitschrift Für Naturforschung. C, a Journal of Biosciences*, *51*(11–12), 853–858. https://doi.org/10.1515/znc-1996-11-1214
23. Routledge, S. J., Linney, J. A., & Goddard, A. D. (2019). Liposomes as models for membrane integrity. *Biochemical Society Transactions*, *47*(3), 919–932. https://doi.org/10.1042/bst20190123
24. Beltran, B., Carrillo, R., Martin, T., Martin, V. S., Machado, J. D., & Borges, R. (2011). Fluorescent β-Blockers as Tools to Study Presynaptic

Mechanisms of Neurosecretion. *Pharmaceuticals*, *4*(5), 713–725. https://doi.org/10.3390/ph4050713

25. Geda, O., Tábi, T., & Szökő, V. (2021). Development and validation of capillary electrophoresis method for quantification of gangliosides in brain synaptosomes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *205*, 114329. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114329
26. Yun, I., Cho, E. S., Jang, H. O., Kim, U. K., Choi, C. H., Chung, I. K., Kim, I. S., & Wood, W. (2002). Amphiphilic effects of local anesthetics on rotational mobility in neuronal and model membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta. Biomembranes*, *1564*(1), 123–132. https://doi.org/10.1016/s0005-2736(02)00409-1
27. Shytaj, I. L., Fares, M., Gallucci, L., Lucic, B., Tolba, M. M., Zimmermann, L., Adler, J. M., Xing, N., Bushe, J., Gruber, A. D., Ambiel, I., Taha Ayoub, A., Cortese, M., Neufeldt, C. J., Stolp, B., Sobhy, M. H., Fathy, M., Zhao, M., Laketa, V., & Diaz, R. S. (2022). The FDA-Approved Drug Cobicistat Synergizes with Remdesivir To Inhibit SARS-CoV-2 Replication *In Vitro* and Decreases Viral Titers and Disease Progression in Syrian Hamsters. *MBio*, *13*(2). https://doi.org/10.1128/mbio.03705-21
28. Krisanova, N., Pozdnyakova, N., Pastukhov, A., Dudarenko, M., Shatursky, O., Gnatyuk, O., Afonina, U., Pyrshev, K., Dovbeshko, G., Yesylevskyy, S., & Borisova, T. (2022). Amphiphilic anti-SARS-CoV-2 drug remdesivir incorporates into the lipid bilayer and nerve terminal membranes influencing excitatory and inhibitory neurotransmission. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1864*(8), 183945. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2022.183945
29. Warren, T. K., Wells, J., Panchal, R. G., Stuthman, K. S., Garza, N. L., Van Tongeren, S. A., ... & Bavari, S. (2016). Therapeutic efficacy of the small

molecule GS-5734 against Ebola virus in rhesus monkeys. Nature, 531(7594), 381-385.

30. Li, Y. N., & Su, Y. (2020). Remdesivir attenuates high fat diet (HFD)-induced NAFLD by regulating hepatocyte dyslipidemia and inflammation via the suppression of STING. Biochemical and Biophysical Research Communications, 526(2), 381-388.

31. Remdesivir inhibits the progression of glioblastoma by enhancing endoplasmic reticulum stress. (2023). Biomedicine & Pharmacotherapy, 157, 114037.

32. Larson, E., Howlett, B., & Jagendorf, A. (1986). Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination. *Analytical Biochemistry*, *155*(2), 243–248. https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90432-x

33. Larson, E., Howlett, B., & Jagendorf, A. (1986b). Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination. *Analytical Biochemistry*, *155*(2), 243–248. https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90432-x