УДК 538.91Ф405; 548.5.01
УКПП 72.19.13
№ держреєстрації 0120U104113
Інв. № _____

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
Інститут фізики
03028, м. Київ, проспект Науки, 46;
тел. (044) 525 12 20, факс (044) 525 15 89, e-mail: fizyka@iop.kiev.ua

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор Інституту фізики
НАН України

член-кореспондент НАН України
_____ М.В. БОНДАР
«14» грудня 2021 р.

ЗВІТ
ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ
за договором від 23 квітня 2021 року №12/01/0043

ВПЛИВ ПРОТИВІРУСНИХ ТА ТРОМБОЛІТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ НА МОДЕЛЬНІ МЕМБРАНИ ВІРУСНИХ ЧАСТИНОК ТА КЛІТИН ЕУКАРІОТ

грантова підтримка Національного фонду досліджень України
у межах конкурсу "Наука для безпеки людини та суспільства"
(остаточний)

Науковий керівник НДР,
головний науковий співробітник
док. фіз.-мат. наук, професор _____ Г.І. ДОВБЕШКО

Рукопис закінчено 14 грудня 2021 р.

2021

Результати роботи розглянуто Вченою радою ІФ НАН України,
протокол № 13 від 14 грудня 2021 року

2

СПИСОК АВТОРІВ

Науковий керівник НДР головний науковий співробітник док. фіз.-мат. наук, проф.,	«10» грудня 2021 р.	Г.І. ДОВБЕШКО (реферат, розділи 1, 2, 7, 10 висновки)
Відповідальні виконавці:		
Провідний науковий співробітник, док. фіз.-мат. наук, с.н.с	«10» грудня 2021 р.	С.О. ЄСИЛЕВСЬКИЙ (розділи 4, 5, 8)
Старший науковий співробітник, канд. фіз.-мат. наук, старший дослідник	«10» грудня 2021 р.	О.П. ГНАТЮК (розділи 2,6,10)
Старший науковий співробітник, канд.х. н., с.н.с.	«10» грудня 2021 р.	Ю.М. БАРАБАШ (розділ 1,2)
Науковий співробітник канд. фіз.-мат. наук	«10» грудня 2021 р.	М.В. ОЛЕНЧУК (розділ 1,2)
Молодший науковий співробітник, канд. фіз.-мат. наук	«10» грудня 2021 р.	О.П. СТАНОВИЙ (розділ 7)
Старший науковий співробітник, доктор біол. наук, проф.	«13» грудня 2021 р.	Т.О. БОРИСОВА (розділи 8,9,13,14)
Старший науковий співробітник,. канд. біол. наук	«08» грудня 2021 р.	Н.Г. ПОЗДНЯКОВА (розділи 8, 9)

3

Старший науковий співробітник, канд. біол. наук	«08» грудня 2021 р.	Н.В. КРИСАНОВА (розділи 13, 14)
Науковий співробітник, канд. біол. наук	«08» грудня 2021 р.	А.О. ПАСТУХОВ (розділи 8, 9)
Молодший науковий співробітник	«06» грудня 2021 р.	І.Д. ПАНАС (розділ 8,9)
Науковий співробітник, канд. біол. наук	«14» грудня 2020 р.	К.О. ПИРШЕВ (розділ 3)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР 187 с., містить 14 розділів, 82 рис., 13 табл., 124 посилань.

Об'єкт дослідження: Як модельні об'єкти використані сильно викривлені мембрани штучних ліпосом (модель мембрани вірусної частинки), штучні ліпідні бішари (контрольна пласка мембрана) та мембрани терміналій нервових клітин (синаптосоми кортексу мозку щурів, зручна модель мембрани живої клітини, чутлива до амфіфільних речовин). Експерименти проведені відповідно до Європейських рекомендацій та міжнародних законів та політик з біоетики. Усі процедури відповідають інструкціям інститутів-виконавців. Протоколи досліджень *in vivo* затверджує Комітет з догляду та використання тварин Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ.

Предмет дослідження: ІЧ, Раман та флуоресцентні спектри, біохімічні показники, розрахункові дані.

Мета роботи: Метою роботи є дослідження молекулярних механізмів дії амфіфільних лікарських препаратів на ліпідні мембрани вірусних частинок та клітин, які інфікуються вірусами, за допомогою модельних об'єктів: Дослідження фізичних механізмів чутливості ліпідної мембрани вірусів та клітин, які інфікуються вірусами, до мембранотропних ліків. Оцінка можливості селективного впливу на вірусні мембрани за допомогою мембранотропних ліків на основі фізичних відмінностей вірусних та клітинних мембран. Оцінка можливість дизайну нових препаратів, які матимуть більший вплив на вірусні мембрани.

Методи дослідження: У проекті використано низку комплементарних експериментальних та розрахункових методик, які дозволяють вивчити взаємодію мембранотропних препаратів з мембранами. Це методи ІЧ та Раманівської спектроскопії, конфокальна мікроскопія, флуоресцентна спектроскопія з мембранними зондами, комп'ютерне моделювання методами молекулярної динаміки, біохімічні методи.

Результати та їх новизна: *вперше*

- Створено модельну мембрану in silico, що відповідає за ліпідним складом та кривизною мембрані вірусу SARS-CoV-2 та мембрані клітин легеневого епітелію людини
- Проведено симуляцію спонтанного вбудовування тікагрелору та ремдесивіру у створені мембрани та оцінено їх здатність до агрегації.
- Створено модельну мембрану in vitro та визначено вплив кривизни поверхні на впорядкування ліпідів.
- методами молекулярної динаміки показано що, ремдесивір і тікагрелор можуть спонтанно вбудовуватися у мембрану протягом перших 10-20 нс і залишатися інтеркальованим між ліпідами;
- показано, що вплив ремдесивіру та тікагрелору на синаптосоми відбувається через фосфатні групи фосфоліпідів, а також спричиняє зміни у водневому зв`язуванні; впливаючи сильніше на неактивні синаптосоми
- -зареєстровано та проаналізовано коливальні (ІЧ та Раман) спектри порошків ремдезивіру та тікагрелору, які відсутні в літературі, та синаптосом до та після дії препаратів, розроблено спектроскопічні маркери ремдезивіру, тікагрелору, синаптосом та їх взаємодії з препаратами
- -спостерігалося зменшення впорядкованості мембрани для тікагрелору в області концентрацій 2-100 мкМ, а ремдезивір у концентраціях до 100 мкМ не впливав на впорядкованість мембрани, а у концентрації 100 мкМ - збільшував впорядкованість
- зареєстровано збільшення провідності біліпідної мембрани (БЛМ) шляхом утворення стабільних потенціалозалежних іоноселективних пор в БЛМ. - - - показані прямі мембранотропні та нейротропні ефекти ремдесивіру та тікагрелору пов’язані з L-[^{14}C] глутаматом та [^{3}H]ГАМК

Практичне значення результатів: отримані результати можуть бути використані у подальших дослідженнях з дизайну противірусних лікарських препаратів проти мембрановмісних вірусів, включно з пандемічним SARS-CoV-2. Вони дозволяють оцінити перспективність нестандартного підходу до таргетування противірусних

препаратів безпосередньо до ліпідного компоненту вірусної оболонки. Розроблені в цій роботі модельні мембранні системи можуть надалі використовуватися для оцінки впливу найрізноманітніших хімічних речовин та наночастинок на клітинні мембрани з різною кривизною поверхні та ліпідним складом

Наукова продукція: Результати Проєкту опубліковані у 6 статті та 9 тезах конференцій.

Ключові слова: ліпідні мембрани, мембранотропні ліки, амфіфільні ліки, вірусні частинки, COVID-19, SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2)

ABSTRACT

Звіт про НДР 188 с., містить 14 розділів, 82 рис., 11 табл., 124 посилання.

Object of research: Strongly curved membranes of artificial liposomes (model of viral particle membrane), artificial lipid bilayers (control flat membrane) and membranes of nerve cell terminals of synaptosomes of rat brain cortex, convenient model of living cell membrane, sensitive amphiphilic substances). The experiments were conducted in accordance with European recommendations and international laws and policies on bioethics. All procedures comply with the instructions of the implementing institutes. In vivo research protocols are approved by the Committee for the Care and Use of Animals of the Institute of Biochemistry. O.V. Palladin of NASU.

Subject of research: IR, Raman and fluorescent spectra, biochemical parameters, calculated data.

Objective: The aim of the study is to investigate the molecular mechanisms of action of amphiphilic drugs on the lipid membranes of viral particles and cells infected with viruses using model objects: Evaluation of the possibility of selective action on viral membranes using membranotropic drugs based on physical differences between viral and cell membranes. Evaluate the possibility of designing new drugs that will have a greater impact on viral membranes.

Research methods: The project uses a number of complementary experimental and computational techniques that allow to study the interaction of membrane-tropic drugs with membranes. These are methods of IR and Raman spectroscopy, confocal microscopy, fluorescence spectroscopy with membrane probes, computer modeling by molecular dynamics, biochemical methods.

Results and their novelty: for the first time

- An in silico model membrane corresponding to the lipid composition and curvature of the SARS-CoV-2 virus membrane and the human lung epithelial cell membrane has been developed
- Simulation of spontaneous incorporation of ticagrelor and remdesivir into the created membranes was simulated and their ability to aggregation was evaluated.

- An in vitro model membrane was created and the influence of surface curvature on lipid ordering was determined.
- molecular dynamics methods have shown that remdesivir and ticagrelor can spontaneously integrate into the membrane during the first 10-20 ns and remain intercalated between lipids;
- it is shown that the effect of remdesivir and ticagrelor on synaptosomes occurs through phosphate groups of phospholipids, and also causes changes in hydrogen binding; affecting more inactive synaptosomes
- vibrational (IR and Raman) spectra of remdezivir and ticagrelor powders, which are absent in the literature, were registered and analyzed as well as for synaptosomes before and after the action of drugs, developed spectroscopic markers of remdesivir, ticagrelor, synaptosome and their interactions with drugs
- there was a decrease in the orderliness of the membrane for ticagrelor in the range of concentrations of 2-100 μm, and remdezivir in concentrations up to 100 μm did not affect the orderliness of the membrane, and in the concentration of 100 μm - increased orderliness
-an increase in the conductivity of the bilipid membrane (BLM) by the formation of stable potential-dependent ion-selective pores in the BLM has been registered
-displayed direct membranotropic and neurotropic effects of remdesivir and ticagrelor associated with L- [14C] glutamate and [3H] GABA.

Practical significance of the results: the results obtained can be used in further studies on the design of antiviral drugs against membrane-containing viruses, including pandemic SARS-CoV-2. They allow us to assess the viability of a non-standard approach to targeting antiviral drugs directly to the lipid component of the viral envelope.

The model membrane systems developed in this work can be further used to assess the effect of a variety of chemicals and nanoparticles on cell membranes with different surface curvatures and lipid composition.

Scientific products: The results of the project are published in 6 articles and 9 conference abstracts.

Key words: lipid membranes, membranotropic drugs, amphiphilic drugs, viral particles, COVID-19, SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2)

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, ОДИНИЦЬ ТА ТЕРМІНІВ 14

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ, НАВЧАЛЬНО-МЕТОДИЧНИХ ПРАЦЬ, ВИДАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДОСЛІДЖЕННЯ 15

ВСТУП 22

РОЗДІЛ 1. ОПРАЦЮВАННЯ ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ ПО ТЕМАТИЦІ ВІРУСНИХ МЕМБРАН, ЗОКРЕМА МЕМБРАНИ ВІРУСУ SARS-COV-2 25

1.1 Формулювання завдання. Опрацювання літературних даних по тематиці вірусних мембран, зокрема мембрани вірусу SARS-CoV-2. 25

1.2 Загальні відомості про структуру та реплікацію вірусів 25

1.3. Ліпідний склад мембранної оболонки вірусів. 28

1.4 Спектральні характеристики окремих фосфоліпідів та їх сумішей 31

1.5 Висновки до розділу. 36

РОЗДІЛ 2. МЕТОДИКИ ДОСЛІДЖЕНЬ. НАЛАШТУВАННЯ ПРИЛАДІВ ТА ЗАКУПІВЛЯ РЕАКТИВІВ ДЛЯ ЕКСПЕРИМЕНТІВ. НАЛАГОДЖУВАННЯ ПРОЦЕСІВ АДМІНІСТРУВАННЯ ТА КООРДИНАЦІЇ ПРОЕКТУ. 37

2.1. Формулювання завдання 37

2.2 Методики та обладнання для експериментальних досліджень 37

2.3 Методики розрахункових досліджень 44

2.3.1 Створення модельної мембрани in silico, що відповідає за ліпідним складом та кривизною мембрані вірусу SARS-CoV-2 44

2.3.2 Створення модельної мембрани in silico, що відповідає за ліпідним складом та кривизною мембрані клітин легеневого епітелію людини 45

2.3.3 Створення моделі молекули ремдесивіру 48

2.3.4. Протокол молекулярної динаміки 50

2.4. Висновки до розділу 2. 51

РОЗДІЛ 3. Створення модельної мембрани in vitro та визначення впливу кривизни поверхні на впорядкування ліпідів 52

3.1. Формулювання завдання. Створити модельну мембрану in vitro та визначити вплив кривизни поверхні на впорядкування ліпідів. 52

3.2. Методика отримання модельних мембран 52

3.3. Експеримент по визначенню впливу кривизни поверхні мембрани на впорядкування ліпідів 54

3.4. Визначення складу модельної мембрани для експериментів in vitro 60

3.5. Висновкидо розділу 3 61

РОЗДІЛ 4. ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ ТІКАГРЕЛОРУ ТА РЕМДЕСИВІРУ НА СТРУКТУРНІ ПАРАМЕТРИ МЕМБРАН *IN SILICO* 62

4.1. Формулювання завдання 62

4.2. Визначення ліпідного складу модельної мембрани 62

4.3. Висновки до розділу 4 65

РОЗДІЛ 5. ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ ТІКАГРЕЛОРУ ТА РЕМДЕСИВІРУ НА ДИНАМІЧНІ ПАРАМЕТРИ МЕМБРАН *IN SILICO* 66

5.1. Формулювання завдання 66

5.2. Сортування ліпідів навколо молекул ремдесивіру та тікагрелору 66

5.3. Висновки до розділу 5 71

РОЗДІЛ 6. ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ ТІКАГРЕЛОРУ ТА РЕМДЕСИВІРУ НА СТРУКТУРНІ ПАРАМЕТРИ МЕМБРАН ВЕЗИКУЛ ТА СИНАПТОСОМ *IN VITRO* ЗА ДОПОМОГОЮ ІЧ СПЕКТРОСКОПІЇ 73

6.1. Формулювання завдання 73

6.2. Характеристика використаних препаратів 73

6.3. FTIR спектральні дослідження впливу ремдесивіру та тікагрелору на синаптосоми 77

6.4. Вплив ремдесивіру на загальну ліпідну фракцію, виділену з синаптосом81

6.5. Визначення впливу ремдесивіру на мембранні міметики (ліпосоми) методом ІЧ спектроскопії. 82

6.6. Висновки до розділу 6 85

РОЗДІЛ 7. ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ ТІКАГРЕЛОРУ ТА РЕМДЕСИВІРУ НА СТРУКТУРНІ ПАРАМЕТРИ МЕМБРАН ВЕЗИКУЛ ТА СИНАПТОСОМ *IN VITRO* ЗА ДОПОМОГОЮ РАМАН СПЕКТРОСКОПІЇ 87

7.1. Формулювання завдання 87

7.2. Аналіз Раман спектрів ремдесивіру та тікагрелору 87

7.3. Аналіз Раман спектрів активних і неактивних синаптосом до та після дії ремдесивіру 91

7.4. Аналіз впливу ремдесивіру на мембранні міметики (ліпосоми) методом спектроскопії комбінаційного розсіювання 96

7.5 Аналіз впливу тікагрелору на синаптосоми методом спектроскопії комбінаційного розсіювання 99

7.6. Висновки до розділу 7 100

РОЗДІЛ 8. ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ ТІКАГРЕЛОРУ ТА РЕМДЕСИВІРУ НА СТРУКТУРНІ ПАРАМЕТРИ МЕМБРАН ВЕЗИКУЛ *IN VITRO* ЗА ДОПОМОГОЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЇ СПЕКТРОСКОПІЇ 102

8.1. Формулювання завдання 102

8.2. Моделювання вбудовування препаратів у мембрану 102

8.3. Визначення впливу тікагрелору та ремдесивіру на структурні параметри мембран везикул *in vitro* 103

8.4. Висновки до розділу 8 107

РОЗДІЛ 9. ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ ТІКАГРЕЛОРУ ТА РЕМДЕСИВІРУ НА СТРУКТУРУ, АГРЕГАЦІЮ ТА ЗЛИТТЯ МЕМБРАН ВЕЗИКУЛ ТА СИНАПТОСОМ IN VITRO ЗА ДОПОМОГОЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЇ СПЕКТРОСКОПІЇ 109

9.1. Формулювання завдання 109

9.2. Визначення впливу тікагрелору та ремдесивіру на структуру, агрегацію та злиття мембран везикул та синаптосом in vitro 109

9.3. Висновки до розділу 9 120

РОЗДІЛ 10. Визначити вплив холестеролу та гіпер-/гіпотермії на взаємодію препаратів із ліпідною мембраною нервових терміналів та модельних бішарів 122

10.1. Формулювання завдання. 122

10.2. Синаптосоми як модельні системи. 122

10.3. Візуалізація синаптосом методом конфокальної мікроскопії 124

10.4. Область OH-NH-CH валентних коливань 125

10.5. Область Амід I та Амід II 127

10.6. Визначення впливу холестеролу на взаємодію препаратів із ліпідною мембраною модельних мембранних міметиків 128

10.7. Висновки до розділу 10. 133

РОЗДІЛ 11. Оцінка можливості селективного впливу на вірусні мембрани за допомогою мембранотропних ліків на основі фізичних відмінностей вірусних та клітинних мембран. 134

11.1. Висновки до розділу 134

РОЗДІЛ 12. Розробка рекомендацій щодо дизайну нових препаратів, які матимуть більший вплив на вірусні мембрани. 135

12.1. Висновки до розділу 136

РОЗДІЛ 13. Визначити вплив мембранотропних препаратів на пороутворення у пласкій бішаровій мембрані. 138

13.1. Формулювання завдання. 138

13.2 Вплив ремдесивіру та тікагрелору на мембранну активність методом бішарових ліпідних мембран (БЛМ), що містять холестерол 138

13.3 Спонтанна генерація активних форм кисню (АФК) в нервових терміналях за присутності ремдесивіру та тікагрелору 143

13.5. Висновки до розділу 144

РОЗДІЛ 14. Дослідити дію препаратів на ключові характеристики синаптичної передачі у нервових терміналях головного мозку щурів: накопичення та вивільнення глутамату та ГАМК, єкзоцитоз, мембранній потенціал, ацидифікацию синаптичних везикул, спонтанну та стимульовану генерацію активних форм кисню. 145

14.1. Формулювання завдання. 145

14.2 Вивільнення L-[^{14}C] глутамату та [^{3}H] ГАМК з нервових закінчень за дії ремдесивіру 145

14.3 Позаклітинний рівень L-[^{14}C] глутамату і [^{3}H] ГАМК, а також тонічне витікання [^{3}H] ГАМК з нервових закінчень за дії ремдесивіру 147

14.4 Опосередковане транспортером накопичення L-[^{14}C] глутамату та [^{3}H] ГАМК нервовими закінченнями за дії ремдесивіру 149

14.5 Опосередковане транспортером стимульоване деполяризацією вивільнення L-[^{14}C] глутамату та [^{3}H] ГАМК з нервових закінчень за дії ремдесивіру 150

14.6 Вивільнення L-[^{14}C] глутамату та [^{3}H] ГАМК з нервових закінчень, опосередковане транспортером, стимульоване розсіюванням протонного градієнта синаптичних везикул за дії ремдесивіру 152

14.8. Висновки до розділу 164

ВИСНОВКИ 166

Рекомендації 168

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 169

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, ОДИНИЦЬ ТА ТЕРМІНІВ

FTIR – Fourier transform infrared – інфрачервона спктроскопія з перетворенням Фур'є

Raman – спектроскопія комбінаційного розсіяння

АО – флуоресцентний зонд акридиновий оранжевий

АФК – активні форми кисню

БЛМ – пласка бішарова ліпідна мембрана

ГАМК – -аміномасляна кислота

ДМСО – диметилсульфоксид

ДТТ - дитіотреітол

ЕДТА – (EDTA, ethylene diamine tetraacetic acid) етилендиамінтетраоцтова кислота

ЕГТА – (EGTA, ethylene glycol tetraacetic acid), етиленгліколь-біс-(2-аміноетил)-тетраоцтова кислота

ЦНС – центральна нервова система

DOPC – фосфатидилхолін

CL – кардіоліпін

SM – сфінгомієлін

Chol – холестерол

FCCP – протонофор карбонілціанід р-трифторметоксифенілгідразон

H2-DCFDA – флуоресцентний зонд 2',7'-дихлордигідрофлуоресцеїнадіацетат

PS – фосфатидилсерин

R18 – флуоресцентний зонд октадецилродамін

Rh 6G – флуоресцентний потенціал-чутливий зонд родамін 6G

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ, НАВЧАЛЬНО-МЕТОДИЧНИХ ПРАЦЬ, ВИДАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДОСЛІДЖЕННЯ

1. Dovbeshko G., Gnatyuk O., Dementjev A., Rutkauskas D., Kovalska E., Baldycheva A., Ilchenko O., Krasnenkov D., Kaplas T. Coherent anti-stokes Raman scattering spectroscopy (CARS) and imaging of DNA on graphene layers and glass covers / FlatChem.- 2021. - Vol.27. – p. 100243. https://doi.org/10.1016/j.flatc.2021.100243

   (Scopus and Web of Science, Q1)

Особистий внесок авторів: Г.І.Довбешко (Dovbeshko G.) брала участь у постановці задач, аналізі результатів і написанні статті, О.П. Гнатюк (Gnatyuk O.) проводила аналіз КАРС спектрів і зображень зразків. Інші співавтори, який не є учасниками проєкту, брали участь у реєстрації КАРС спектрів і зображень, (Dementjev A.), реєстрація Раман спектрів (Ilchenko O.), аналіз і обговорення результатів (Rutkauskas D.), характеризація ДНК за допомогою УФ спектроскопії (Krasnenkov D.), виготовленні графенових підложок (Kaplas T.), менеджмент розрахункових ресурсів (Kovalska E., Baldycheva A.)

2. Borisova T., Pozdnyakova N., Dudarenko M., Krisanova N., Andronati S. GABAA receptor agonist cinazepam and its active metabolite 3-hydroxyphenazepam act differently at the presynaptic site / European Neuropsychopharmacology. – 2021. – vol. 45. –P. 39-51. https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2021.03.013

   (Scopus and Web of Science, Q1)

Особистий внесок авторів: Т.О. Борисова (Borisova T.) брала участь в постановці задачі, аналізі і обговоренні результатів і в написанні статті, Н.В. Крисанова (Krisanova N.) одержувала синаптосоми для проведення експериментів, Н.Г. Позднякова (Pozdnyakova N.) проводила біохімічні експерименти і обробляла експериментальні дані. Інші співавтори, які не є учасниками проєкту, брали участь у проведенні експерименту (Dudarenko M.), постановці задачі, аналізі і обговоренні результатів (Andronati S.)

3. Yesylevskyy S., Khandelia H. EnCurv: Simple Technique of Maintaining Global Membrane Curvature in Molecular Dynamics Simulations //*Journal of Chemical*

Theory and Computation. – 2021. – Т. 17. – №. 2. – С. 1181-1193. https://doi.org/10.1021/acs.jctc.0c00800

(Scopus and Web of Science, Q1)

Особистий внесок авторів: С.О. Єсилевський (Yesylevskyy S.) поставив задачу, розробив аналітичну модель, провів розрахунки, використовуючи методи молекулярної динаміки, провів математичну обробку результатів розрахунку та їх інтерпретацію, написав рукопис. Інший співавтор, який не є учасником проєкту, провів менеджмент розрахункових ресурсів (Khandelia H.).

4. Afonina Uliana, Dovbeshko Galina. FTIR- ATR SPECTROSCOPY FOR STUDYING LIPID RAFTS TARGETING BY ANTIVIRAL DRUG REMDESIVIR II Міжнародна студентська наукова конференція «Пріоритетні напрями та вектори розвитку світової науки».- 2021.- Т.2. p. 78-81. DOI https://doi.org/10.36074/liga-inter-19.11.2021

Особистий внесок авторів: Г.І.Довбешко (Dovbeshko G.) постановка задачі, аналізі результатів і написання статті. Інший співавтор, який не є учасником проєкту, провів експериментальну роботу і обробку результатів (Afonina U.)

5. Krisanova N., Pozdnyakova N., Pastukhov A., Dudarenko M., Gnatyuk O., Afonina U., Pyrshev K., Dovbeshko G., Yesylevskyy S., Borisova T. Anti-SARS-CoV-2 drug remdesivir influences excitatory and inhibitory neurotransmission in cortex nerve terminals. Experimental Neurology (EXNR-21-765), [under review]

Особистий внесок авторів: Г.І.Довбешко (Dovbeshko G.) брала участь у постановці задач, аналізі результатів ІЧ досліджень і написанні статті, Т.О. Борисова (Borisova T.) брала участь у постановці задач, аналізі результатів і написанні статті, Н.В. Крисанова (Krisanova N.) одержувала синаптосоми для проведення експериментів, Н.Г. Позднякова (Pozdnyakova N.) брала участь в біохімічному експерименті з синаптосомами і обробці експериментальних даних, А.О. Пастухов (Pastukhov A.) брав участь в проведенні біохімічних експериментів, К.О. Пиршев (Pyrshev K.) брав участь в аналізі результатів біохімічних досліджень, О.П. Гнатюк (Gnatyuk O.) брала участь в реєстрації і аналізі ІЧ спектрів, С.О. Єсилевський (Yesylevskyy S.) брав

участь в постановці задачі, проводив розрахунки методами молекулярної динаміки. Інші співавтори, які не є учасниками проєкту, брали участь у підготовці таблиць і рисунків, роботою з текстом (Dudarenko M.), підготовці зразків до ІЧ досліджень (Afonina U.).

6. O.P. Gnatyuk , U.K. Afonina, N. Krisanova, N. Pozdnyakova, T.O. Borisova, S.O. Karakhim and G.I. Dovbeshko Spectroscopic signatures of synaptosomes: ATR-IR spectroscopy data. Molecular Crystals and Liquid Crystals [under review]

Особистий внесок авторів: Г.І.Довбешко (G.I. Dovbeshko) брала участь у постановці задач, аналізі результатів ІЧ досліджень і написанні статті, О.П. Гнатюк (O.P. Gnatyuk) брала участь в проведенні ІЧ експериментів, Н.В. Крисанова (N. Krisanova) одержувала синаптосоми для проведення експериментів, Н.Г. Позднякова (N. Pozdnyakova) брала участь в експерименті з синаптосомами і обробці експериментальних даних, Т.О. Борисова (T.O. Borisova) брала участь в постановці задачі і аналізі експериментальних даних. Інші співавтори, які не є учасниками проєкту, брали участь у реєстрації конфокальних зображень (S.O. Karakhim), підготовці зразків до ІЧ досліджень (U.K. Afonina).

ТЕЗИ

7. O. Gnatyuk, G. Dovbeshko, U. Afonina, N. Krisanova, N. Pozdnyakova, T. Borisova Spectroscopic signature of remdesivir and its interaction with synaptosome XXV Galyna Puchkovska International School Seminar "Spectroscopy of Molecules and Crystals" (XXV ISSSMC). Kyiv, Ukraine, September 21-24, 2021. p. 96

Особистий внесок авторів: Г.І.Довбешко (G.I. Dovbeshko) брала участь у постановці задач, аналізі результатів ІЧ досліджень, О.П. Гнатюк (O. Gnatyuk) брала участь в проведенні ІЧ експериментів і систематизації даних та підготовці тез, Н.В. Крисанова (N. Krisanova) брала участь у синтезі синаптосом для проведення експериментів, Н.Г. Позднякова (N. Pozdnyakova) брала участь в експерименті з синаптосомами і обробці експериментальних даних, Т.О. Борисова (T.O. Borisova) брала участь в постановці задачі і аналізі експериментальних даних. Інший

співавтор, що не є учасником проєкту, брав участь у підготовці зразків до ІЧ досліджень (U. Afonina) та оформленню тез.

8. U.K. Afonina, O.P. Gnatyuk, K.O. Pyrshev, G.I. Dovbeshko REMDESIVIR DOES INHIBIT THE FORMATION OF LIPID RAFTS 7th International Conference NANOBIOPHYSICS:Fundamental and Applied Aspects, 4 – 8 October 2021 , Kharkiv, Ukraine.p.25

Особистий внесок авторів: Г.І.Довбешко (G.I. Dovbeshko) брала участь у постановці задач, аналізі результатів ІЧ досліджень, О.П. Гнатюк (O.P. Gnatyuk) брала участь в проведенні ІЧ експериментів і систематизації даних, підготовці тез, К.О. Пиршев (K.O. Pyrshev) брав участь в постановці задачі і аналізі даних експерименту. Інший співавтор, що не є учасником проєкту, брав участь у підготовці зразків до ІЧ досліджень (U.K. Afonina) та оформленню тез.

9. U.K. Afonina, O.P. Stanovyi, G.I. Dovbeshko, M.V. Olenchuk, A.O. Pastukhov, N.G. Pozdnyakova, N.V. Krisanova, T.O. Borisova. Spectral characteristics of isolated presynaptic nerve terminals // XVII International scientific conference for students and PhD students ‘Youth and progress of biology’: International scientific conference, Lviv, Ukraine, 19–21 April 2021 – Lviv, 2021. – P. 30.

Особистий внесок авторів: Г.І.Довбешко (G.I. Dovbeshko) брала участь у постановці задач, аналізі результатів досліджень, О.П. Становий (O.P. Stanovyi) проводив реєстрацію спектрів комбінаційного розсіювання, М.В. Оленчук (M.V. Olenchuk) брала участь в підготовці експериментальних зразків та написанні тез, А.О. Пастухов (A.O. Pastukhov) брав участь в проведенні біохімічних експериментів, Н.Г. Позднякова (N. Pozdnyakova) брала участь в експерименті з синаптосомами і обробці експериментальних даних, Н.В. Крисанова (N. Krisanova) брала участь у синтезі синаптосом, Т.О. Борисова (T.O. Borisova) брала участь в постановці задачі і аналізі експериментальних даних. Інші співавтори, що не є учасником проєкту, брали участь у підготовці зразків до ІЧ досліджень та оформленню тез (U. Afonina).

10. G.I. Dovbeshko, S.O. Yesylevskyy, U.K. Afonina, O.P. Gnatyuk, O.P.Stanovyi, N. Krisanova, N. Pozdnyakova, A. Pastukhov, K.O. Pyrshev, T.O. Borisova, M.V. Bogdanov.

Spectroscopic signatures of real and mimetic membranes as diagnostic markers for the interaction of anti-viral drug Remdesivir with the cell membranes XXV Galyna Puchkovska International School Seminar "Spectroscopy of Molecules and Crystals" (XXV ISSSMC). Kyiv, Ukraine, September 21-24, 2021. p. 18

Особистий внесок авторів: Г.І.Довбешко (G.I. Dovbeshko) брала участь у постановці задач, аналізі результатів досліджень, О.П. Гнатюк (O. Gnatyuk) брала участь в проведенні ІЧ експериментів, систематизації даних та підготовці тез, Н.В. Крисанова (N. Krisanova) брала участь у синтезі синаптосом для проведення експериментів, Н.Г. Позднякова (N. Pozdnyakova) брала участь в експерименті з синаптосомами і обробці експериментальних даних, А.О. Пастухов (A. Pastukhov) брав участь в проведенні біохімічних експериментів, Т.О. Борисова (T.O. Borisova) брала участь в постановці задачі і аналізі експериментальних даних, К.О. Пиршев (K.O. Pyrshev) брав участь в постановці задачі і аналізі даних експерименту, Єсилевський (S.O. Yesylevskyy) брав участь в постановці задачі, проводив розрахунки методами молекулярної динаміки, О.П. Становий (O.P. Stanovyi) проводив реєстрацію спектрів комбінаційного розсіювання. Інші співавтори, що не є учасником проєкту, брали участь у підготовці зразків до ІЧ досліджень та оформленню тез (U. Afonina), постановці задач і аналізі результатів (M.V. Bogdanov).

11. Barabash Yu.M., Olenchuk M.V. A technique liposomal forms preparation as carriers of water-soluble and water-insoluble drugs 7th International Conference NANOBIOPHYSICS:Fundamental and Applied Aspects, 4 –8 October 2021, Kharkiv, Ukraine. p.27

Особистий внесок авторів: Ю.М. Барабаш (Barabash Yu.M.) брав участь у постановці експерименту, аналізі даних і підготовці матеріалів, М.В. Оленчук (Olenchuk M.V.) брала участь у проведенні експерименту, аналізі даних та оформленні тез.

12. Barabash Yu.M. Identification of Hidden Parameters of Conformational States During Photoexcitation of Protein Macromolecules XXV Galyna Puchkovska International School Seminar "Spectroscopy of Molecules and Crystals" (XXV ISSSMC). Kyiv, Ukraine,

September 21-24, 2021. p. 176

Особистий внесок автора: Ю.М. Барабаш (Barabash Yu.M.) провів експеримент, проаналізував і систематизував дані та підготував тези.

13. G.I. Dovbeshko, S.O. Yesylevskyy, U.K. Afonina, O.P. Gnatyuk, M.V. Olenchuk, Krisanova N., Pozdnyakova N., Pastukhov A., Pyrshev K., Borisova T., Bogdanov M. THE EFFECT OF TICAGRELOR ON THE STRUCTURAL PROPERTIES OF SYNAPTOSOMES: IR SPECTROSCOPY STUDIES XIV Міжнародна конференція по біоніці і прикладній біофізиці, Київ, Україна, 4-5 листопада 2021року, p. 18

Особистий внесок авторів: Г.І.Довбешко (G.I. Dovbeshko) брала участь у постановці задач, аналізі результатів досліджень, О.П. Гнатюк (O. Gnatyuk) брала участь в проведенні ІЧ експериментів, систематизації даних та підготовці тез, Н.В. Крисанова (N. Krisanova) брала участь у синтезі синаптосом для проведення експериментів, Н.Г. Позднякова (N. Pozdnyakova) брала участь в експерименті з синаптосомами і обробці експериментальних даних, А.О. Пастухов (A. Pastukhov) брав участь в проведенні біохімічних аналізів, Т.О. Борисова (T.O. Borisova) брала участь в постановці задачі і аналізі експериментальних даних, К.О. Пиршев (K.O. Pyrshev) брав участь в постановці задачі і аналізі даних експерименту, Єсилевський (S.O. Yesylevskyy) брав участь в постановці задачі, проводив розрахунки методами молекулярної динаміки, М.В. Оленчук (M.V. Olenchuk) брала участь в підготовці зразків. Інший співавтор, що не є учасником проєкту, брав участь у підготовці зразків до ІЧ досліджень та оформленню тез (U. Afonina).

14. G.I. Dovbeshko, S.O. Yesylevskyy, U.K. Afonina, O.P. Gnatyuk, M.V. Olenchuk, Krisanova N., Pozdnyakova N., Pastukhov A., Pyrshev K., Borisova T., Bogdanov M. THE EFFECT OF LOW TEMPERATURES ON THE STRUCTURAL PROPERTIES OF SYNAPTOSOMES: FTIR SPECTROSCOPY DATA XIV Міжнародна конференція по біоніці і прикладній біофізиці, Київ, Україна, 4-5 листопада 2021року, p. 22

Особистий внесок авторів: Г.І.Довбешко (G.I. Dovbeshko) брала участь у постановці задач, аналізі результатів досліджень, Єсилевський (S.O. Yesylevskyy) брав участь в постановці задачі, проводив розрахунки методами молекулярної динаміки, О.П.

Гнатюк (O. Gnatyuk) брала участь в проведенні ІЧ експериментів, систематизації даних та підготовці тез, М.В. Оленчук (M.V. Olenchuk) брала участь в підготовці зразків, Н.В. Крисанова (Krisanova N.) брала участь у синтезі синаптосом, Н.Г. Позднякова (Pozdnyakova N.) брала участь в синтезі синаптосом і обробці експериментальних даних, А.О. Пастухов (A. Pastukhov) брав участь в проведенні біохімічних аналізів, К.О. Пиршев (K.O. Pyrshev) брав участь в постановці задачі і аналізі даних експерименту, Т.О. Борисова (T.O. Borisova) брала участь в постановці задачі і аналізі експериментальних даних. Інший співавтор, що не є учасником проєкту, брав участь у підготовці зразків до ІЧ досліджень та оформленню тез (U. Afonina).

15. Yesylevskyy S., Khandelia H. MAINTAINING GLOBAL MEMBRANE CURVATURE IN MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS USING ENCURV TECHNIQUE // 7th International Conference NANOBIOPHYSICS:Fundamental and Applied Aspects, 4 –8 October 2021, Kharkiv, Ukraine. p.106

Особистий внесок авторів: С.О. Єсилевський (Yesylevskyy S.) поставив задачу, розробив аналітичну модель, провів розрахунки, використовуючи методи молекулярної динаміки, провів математичну обробку результатів розрахунку та їх інтерпретацію, написав рукопис. Інший співавтор, який не є учасником проєкту, провів менеджмент розрахункових ресурсів (Khandelia H.).

ВСТУП

Робота присвячена дослідженню молекулярних механізмів впливу лікарських засобів, які зараз використовуються для лікування COVID 19, а саме, противірусного препарату ремдесивір та тромболітичного препарату тікагрелор, безпосередньо на ліпідні мембрани вірусних частинок та клітин, які інфікуються вірусами. Взаємодіючи з мембраною, ці препарати можуть мати безпосередній вплив на конформаційну стабільність та формування третинної/четвертинної структури мембранних білків, а також впливати на проникнення вірусних частинок у клітину та на роботу мембранних рецепторів, що задіяні у зв’язуванні вірусу. Тому такі дослідження можуть мати не тільки пряме прикладне значення для підвищення ефективності терапії COVID 19, але і дозволять зрозуміти, чи можливо впливати безпосередньо на мембрану вірусу за допомогою лікарських препаратів, з метою зменшення його здатність до інфікування.

Незважаючи на значний прогрес, ліпідні мембрани мембрановмісних вірусів, до яких відноситься і SARS-CoV-2, досі залишаються вивченим недостатньо. Зокрема, невідомо чи можливий таргетний вплив лікарських препаратів на ліпідний компонент вірусних частинок і чи можливо досягти селективності такого впливу завдяки використанню різних фізичних характеристик вірусних та клітинних мембран.

Для розв’язання поставленої задачі в роботі запропоновано мультидисциплінарний підхід, що включає експериментальні та розрахункові методи. Коливальна спектроскопія (ІЧ та Раман) біологічних молекул, клітин, вірусів завдяки її високій чутливості та можливостям дозволяє без використання люмінесцентних маркерів досліджувати взаємодії між ДНК, білками, ліпідами та іншими молекулами, визначати структурні та конформаційні властивості біополімерів, досліджувати молекулярні процеси в клітинах та їх органелах. Люмінесцентні методи дозволяють отримувати інформацію про конкретні і специфічні місця зв'язування молекул, тому використання цих двох методів дає вичерпну інформацію для подальшого розуміння процесів в живих біологічних

структурах. Перевагами коливальної спектроскопії є мала кількість речовини, що необхідна для отримання спектру (часто це окремі клітини і макромолекули), а також можливість швидко за відповідними спектральними маркерами проводити конформаційний аналіз, на відміну від методів ЯМР або рентгеноструктурного аналізу. Недоліком є складність отриманої спектральної інформації та необхідність мати експериментальний досвід та спектроскопічну базу даних, оскільки для конформаційного аналізу різних біомолекул є свій набір спектральних маркерів. Для люмінесцентних методів складним питанням є специфічність взаємодій.

Пропонується особливу увагу звернути на спорідненість досліджуваних препаратів до ліпідних агрегатів, таких як клітинні мембрани, що, в принципі, на сучасному етапі досліджено слабо. Відомо, що для коректного розпізнавання рецепторів на поверхні клітини-господаря S-глікопротеїн вірусу SARS-CoV-2 потребує наявності у мембрані ліпідних рафтів, тому ліпідний склад запропонованих модельних мембрани (мембранних міметиків) був підібраний таким чином, щоб забезпечити утворення рафтів.

Ще однією важливою особливістю, що може мати безпосередній вплив на вбудовування чи проходження препарату через мембрану, є її кривизна. Вірусна частинка має характерний розмір порядку 100 нм, тому її мембрана є помітно викривленою, тоді як плазматична мембрана клітини може в середньому вважатися пласкою. Введення в мембрану амфіфільних речовин може значно впливати на вираженість цих ефектів кривизни, як підсилюючи, так і нівелюючи їх вплив.

Окрім штучних ліпідних мембран, як моделі використовувались синаптосоми – пресинаптичні нервові терміналі. Синаптосоми є особливо важливими модельними системами, оскільки в них зберігається мітохондріальна біоенергетична функція, рецептори, збудливість мембрани. Раманівська спектроскопія активно застосовувалась для дослідження окремих синаптосом, ці дані можна знайти в роботах японських вчених [1]. Однак досі не було проведено детального аналізу Раман спектрів синаптосом, що налічує кілька десятків смуг. Основна увага була зосереджена на двох смугах - це Амід 1 близько 1657 см-1 та смуга деформаційного

коливання CH2 - 1445 см-1. Пізніше коливальні спектри синаптосом досліджувались у зв'язку з хворобою Паркінсона та онкологією. ІЧ спектри синаптосом подані в літературі тільки в області валентних CH коливань авторами з Єгипту [2,3], однак детального аналізу всього спектрального діапазону також немає [4]. Тому в ході виконання проекту була поставлена задача проаналізувати дані ІЧ і Раман спектроскопії в широкому діапазоні частот (3800-500 см-1), а також визначити спектральні маркери препаратів ремдезивіру та тікагрелору, що відсутні на даний час в літературі та дослідити особливості в структурі синаптосом під дією цих препаратів. Пандемія COVID-19 може значно посилити тягар нейрологічних захворювань через “тривалі нейрологічні наслідки COVID”, і нами, на основі отриманих нище даних, запропоновано рекомендації, що треба враховувати для подолання нейрологічних симптомів та наслідків COVID 19 [119].

РОЗДІЛ 1. ОПРАЦЮВАННЯ ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ ПО ТЕМАТИЦІ ВІРУСНИХ МЕМБРАН, ЗОКРЕМА МЕМБРАНИ ВІРУСУ SARS-COV-2

1.1 Формулювання завдання. Опрацювання літературних даних по тематиці вірусних мембран, зокрема мембрани вірусу SARS-CoV-2.

1.2 Загальні відомості про структуру та реплікацію вірусів

Задачею даного проекту є створення моделей ліпідної оболонки вірусів, включаючи вірус SARS-CoV-2, вивчення та вироблення стратегії по впливу на ліпідний бішар амфіфільних та гідрофобних препаратів, що може бути застосованим в медичній практиці. Ця задача є актуальною у зв'язку з пандемією коронавіруса та є недостатньою вивченою щодо ліпідних мембран мембрановмісних вірусів. Як відомо, основний акцент при відпрацюванні методики лікування робиться на геномні властивості вірусних частинок та специфічні білки, що обумовлюють впізнавання вірусів рецепторами клітини-хазяїна. В той же час досі не відомо, чи можливо впливати безпосередньо на мембрану віруса за допомогою лікарських препаратів, щоб зменшити його здатність до інфікування. Властивості ліпідної мембрани таких вірусів критично важливі на різних етапах їх життєвого циклу, особливо при проникненні у клітину. Зокрема, вірус SARS-CoV-2 проникає в клітини шляхом злиття мембран вірусної частинки і плазматичної мембрани клітини. Для коректного розпізнавання рецепторів на поверхні клітини-господаря S-глікопротеїн вірусу SARS-CoV-2 потребує наявності у мембрані ліпідних рафтів, або рідинно-впорядкованої фази, яка складається із сфінго- або фосфоліпідів з насиченими ацильними ланцюгами та холестеролу. Інша фаза —рідинно-невпорядкована складається переважно з фосфоліпідів з ненасиченими ацильними ланцюгами. Ці фази створюють специфічне мікрооточення для різних типів мембранних білків, оптимальне функціонування яких залежить від перебування у ліпідній фазі з певними фізичними характеристиками. Сучасна фармація виробляє все більшу кількість гідрофобних та амфіфільних препаратів. Через погану розчинність у воді такі препарати мають сильну спорідненість до ліпідних агрегатів,

таких як клітинні мембрани, ліпопротеїни крові, бактеріальні та вірусні оболонки, тощо. Ця спорідненість, зазвичай, вважається нецікавим неспецифічним ефектом, тому взаємодії поширених лікарських препаратів із мембранами та ліпідними агрегатами вивчені дуже слабко. Останні дослідження свідчать про те, що пряме вбудовування лікарських препаратів у мембрани може мати далекосяжні наслідки для функціонального стану білків та формування їх третинної/четвертинної структури. Зокрема, це прямо чи опосередковано впливатиме на проникнення вірусних частинок у клітину та на роботу мембранних рецепторів, задіяних у зв'язуванні віруса. Не зважаючи на те, що мембрана вірусних частинок прямо походить від мембрани клітини-хазяїна, між ними існує суттєва відмінність на фізичному рівні, а саме, кривизна. Вірусна частинка має характерний розмір порядка 100 нм, тому її мембрана є помітно викривленою, тоді як плазматична мембрана клітини може в середньому вважатися пласкою. Базуючись на результатах наших попередніх досліджень, де було показано, що кривизна та асиметрія мембрани здатні сильно впливати на фізичні характеристики мембрани (впорядкованість, розподіл холестеролу, проникність), нами спочатку моделюється мембрана вірусної частинки (in silico та in vitro, а потім проводиться дослідження дії двох амфіфільних лікарських препаратів - ремдесивіру та тікагрелору - які використовуються у терапії COVID19, на ліпідні мембрани вірусних частинок та клітин, які інфікуються вірусами (in silico та in vitro). Ремдесивір -це амфіфільний антивірусний препарат з доведеною ефективністю проти SARS-CoV-2.Тікагрелор використовується у складі симптоматичної терапії як тромболітичний препарат для дослідження молекулярних механізмів дії. Саме для нього у пілотних дослідженнях було показано значний вплив на структуру

Вірус SARS-CoV-2 проникає в клітини ендоцитоз-залежним механізмом, орієнтуючись на наявність рецепторів до S-глікопротеїну та відповідних протеаз, необхідних для його активації [5]. Відповідно показано, що ефекти коронавіруса є холестерол-залежними [6]. Показано, що нервова система не є безпосередньою мішенню для дії коронавіруса SARS-CoV-2 [7]. Однак, при інфікуванні

коронавірусом спостерігаються нейрологічні симптоми, які можуть бути наслідком цитокінового шторму та/або неспецифічного впливу лікарських препаратів.

Не зважаючи на те, що основною мішенню для більшості лікарських препаратів є рецептори на поверхні плазматичної мембрани клітин, що призводить до подальшої активації сигнальних каскадів. В свою чергу, амфіфільні препарати спроможні безпосередньо взаємодіяти з ліпідним бішаром, змінюючи його структурну організацію. В даній роботі розпочата робота по дослідженню неспецифічної дії мембранотропних препаратів на особливості структурної організації модельних ліпідних систем, мембран клітин та нервових терміналів (синаптосом).

Попередньо нами було показано, що температура та вміст холестеролу визначають властивості мембран синаптосом та, відповідно, активність транспорту та екзоцитозу глутамату [8]. При взаємодії з клітинами господаря віруси повинні перетинати клітинну мембрану принаймні двічі, для проникнення в клітину та вивільнення з клітини, що може відбутися кількома різними шляхами – через тимчасові локальні порушення цілісності мембрани клітини господаря, шляхом злиття мембран чи шляхом лізису клітини. Шлях входження вірусу в клітину залежить від білків, що знаходяться на поверхні вірусу, та від наявних рецепторів на поверхні клітин господаря. Включаються також неспецифічні взаємодії, що збільшують час знаходження вірусу на поверхні клітини господаря. Набагато менше відомо про роль вірусних ліпідів на відміну від нуклеїнових кислот та білків. Крім того, багато вірусів взаємодіють із компонентами клітинної мембрани під час їх реплікації та часто індукують цитоплазматичні мембранні структури, в яких відбувається реплікація та складання геному [9]. Останні дослідження показали також важливу роль кривизни мембрани.

1.3. Ліпідний склад мембранної оболонки вірусів.

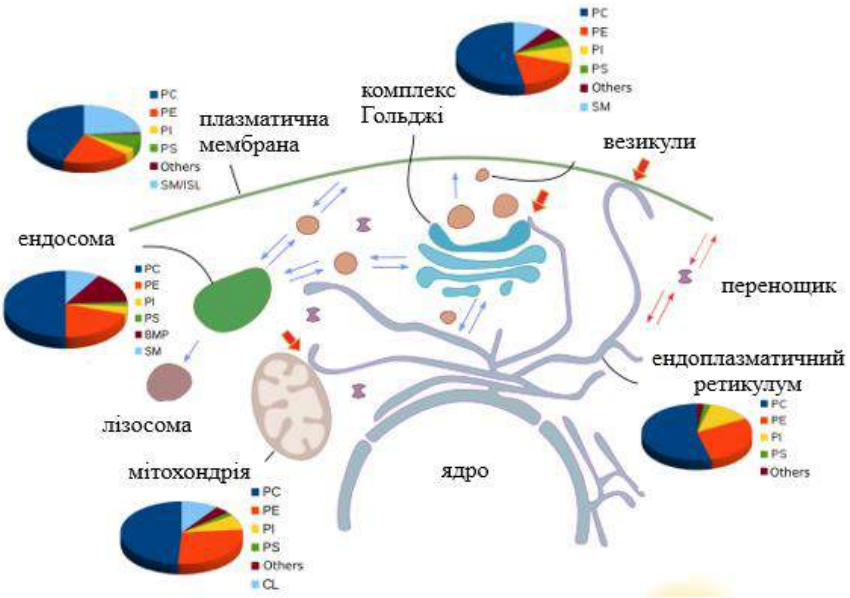


Рисунок 1.1 Основні органели клітини ссавців та їхній ліпідний склад. PC - фасфатидилхолін; PE – фосфатидилетаноламін; PI-фосфатидилінозитол; PS – фосфатидилсерин; CL – кардіоліпін; BMP- біс моноацилгліцерол фосфат; SM – сфінгомієлін; SL – сфінголіпід [10]

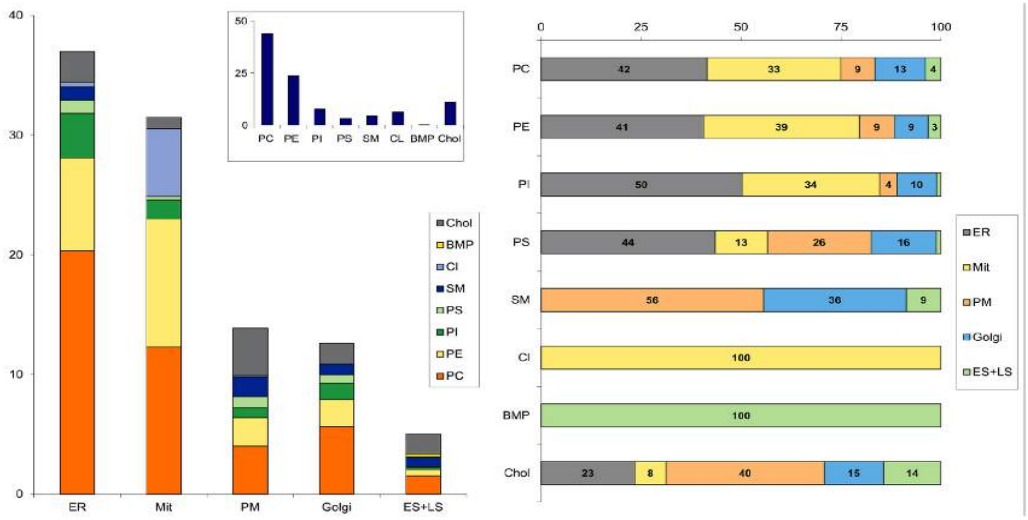


Рисунок 1.2 Кількісний склад різних ліпідів та їх відносна кількість в органелах клітини ссавців. PC - фасфатидилхолін; PE – фосфатидилетаноламін; PI-фосфатидилінозитол; PS – фосфатидилсерин; CL – кардіоліпін; BMP- біс моноацилгліцерол фосфат; SM – сфінгомієлін; SL – сфінголіпід, Chol – холестерол; ER – ендоплазматичний ретикулум; Mit- мітохондрія; PM- Golgi- Комплекс Ґольджі; ES+LS [10]

Бактерії, археї та еукаріоти поділяють гліцерин як основу більшості своїх ліпідів. Типовими бактеріальними фосфоліпідами є фосфатидилсерин (PS), фосфатидилетаноламін (PE), фосфатидилгліцерин (PG) та кардіоліпін (CL), які також містяться в еукаріотах. PG і CL синтезуються в мітохондріях і обмежуються ними. У мітохондріях також міститься (бактеріальний) фермент PS-декарбоксилаза (PSD), який синтезує половину клітинного PE. Фосфатидилхолін (PC) та фосфатидилінозитол (PI) є іншими основними еукаріотичними гліцерофосфоліпідами. Завдяки своїм двом жирним ацильним ланцюгам і великій полярній головці PC має циліндричну форму. Оскільки ентропія найвища, коли ліпідні хвости відвернуті від води, а молекули води мають максимальну свободу («гідрофобний ефект»), молекули PC збираються в двошаровий шар. Типовий PC містить один насичений і один ненасичений ланцюг. Він утворює рідкокристалічну мембрану з багатьма характеристиками біомембран. Однак, біомембрани, як правило, містять від п'яти до десяти основних класів ліпідів (див. Рис 1.1-1.3), які необхідні для таких процесів, як злиття та везикулярний трафік, сортування мембран та передача сигналу.

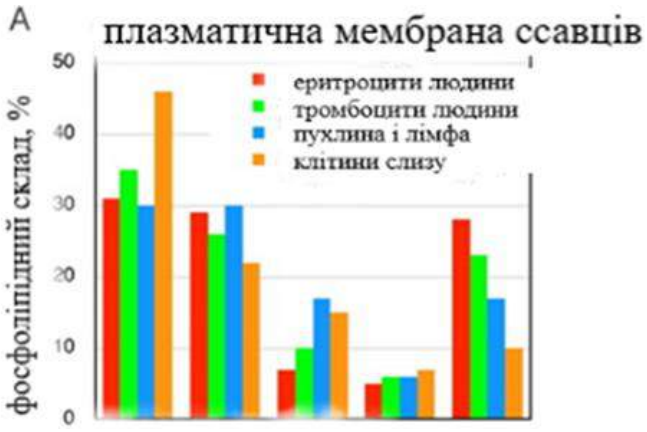


Рисунок 1.3. а) Кількісний склад основних ліпідів в плазматичній мембрані ссавців

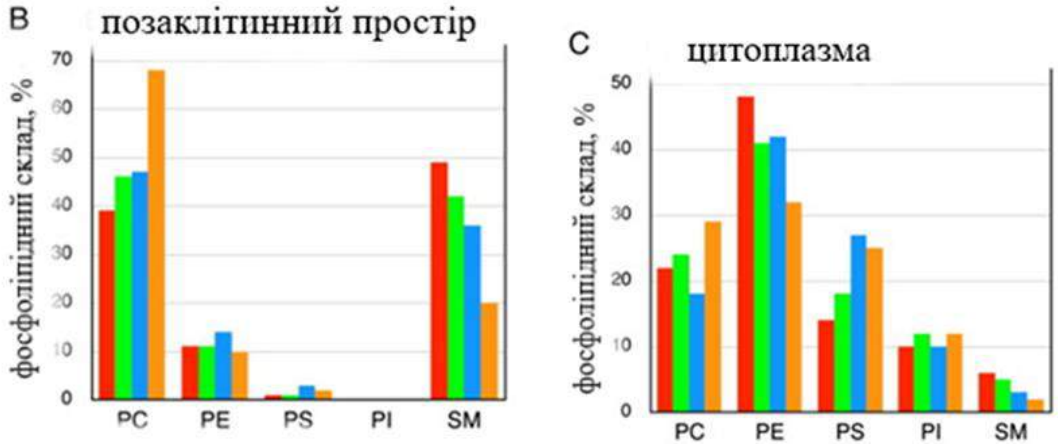


Рисунок 1.3. Кількісний склад основних ліпідів в в) позаклітинному просторі і с) цитоплазмі клітин ссавців. PC - фасфатидилхолін; PE – фосфатидилетаноламін; PI-фосфатидилінозитол; PS – фосфатидилсерин; SM – сфінгомієлін. [10]

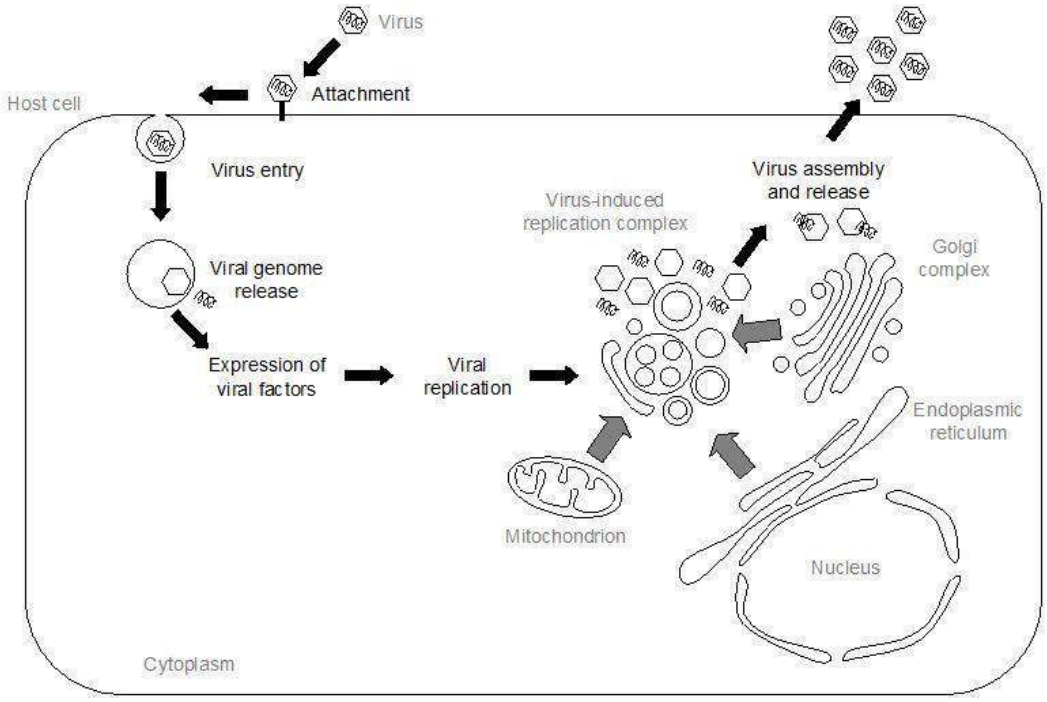


Рисунок 1.4 Схематичний вигляд циклу реплікації вірусу. [11]

Вхід вірусу в клітину-хазяїна до початку їх реплікативного циклу передбачає приєднання частинки вірусу до певного(их) рецептора(-ів), розташованого на поверхні клітини, до впровадження вірусного геному в клітину-хазяїна. Останнє може відбуватися шляхом інтерналізації цілої вірусної частинки, що утворює свого роду хвилинного «троянського коня» [11], або шляхом безпосереднього проникнення вірусного геному з плазматичної мембрани. Під час цих процесів

різноманітні специфічні ліпіди відіграють безліч ролей, які можуть різнитися залежно від вірусів (таблиці 1.1).

Таблиця 1.1- Приклади ліпідів, необхідних для потрапляння вірусу в клітину

Вірус	Ліпід	Функція	посилання
VSV	фосфатидилсерин	Клітинний рецептор	[12]
	LBPA	Кофактор для злиття мембран	[13, 14]
SV40	GM1	Клітинний рецептор	[15]
	холестерол	Ендоцитоз, опосередкований ліпідно-рафтовою кавеолою	[16]
DENV	LBPA	Кофактор для злиття мембран	[17]
VACV	фосфатидилсерин	Індукція вірусної інтерналізації	[18]
SARS	Холестерол	Забезпечення взаємодії S-протеїну з ACE2	[19]

Скорочення, використані в таблиці: DENV, вірус денге; LBPA, лізобісфосфатидна кислота; SV40, Вірус SV40; VACV, вірус коров'ячої віспи; VSV, Вірус везикулярного стоматиту.

1.4 Спектральні характеристики окремих фосфоліпідів та їх сумішей

Для створення везикул ми використали наступні фосфоліпіди:

18:1 (Δ9-Cis) PE (DOPE) 18:1 1,2-диолеіл-sn-гліцеро-3-фосфоетаноламін

18:1 (Δ9-Cis) PC (DOPC) 1,2- диолеіл-sn-гліцеро-3-фосфохолін

18:1 PS (DOPS) 1,2- диолеіл-sn-гліцеро-3-фосфо-L-серін

18:1 (Δ9-Cis) PG 1,2- диолеіл-sn-гліцеро-3-фосфо-(1'-rac-гліцерол)

Окрім цього до складу всіх моделей входить холестерол, який є складовим клітинної мембрани. За допомогою цих фосфоліпідів можна створити композиції в тому числі з нескомпенсованим зарядом на поверхні.

Протокол отримання міцелярних структур включає:

- розчинення фосфоліпідів в хлороформі,

- випаровування хлороформу за допомогою сушки газоподібним азотом
- ресуспензування ліпідів у воді
- заморожування суспензії фосфоліпідів, розморожування та ультразвукова обробка

Суттєвим недоліком такого протоколу є отримання везикул різного розміру, що неможливо контролювати за таких умов експерименту. Інший шлях – за допомогою екструдера з порами різного діаметра, що дозволяє отримати везикули строго каліброваного розміру.

Перш ніж перейти до створення модельних мембран, ми проаналізували окремі фосфоліпіди, визначили їх спектральні характеристики та провели віднесення коливань (рис. 1.5).

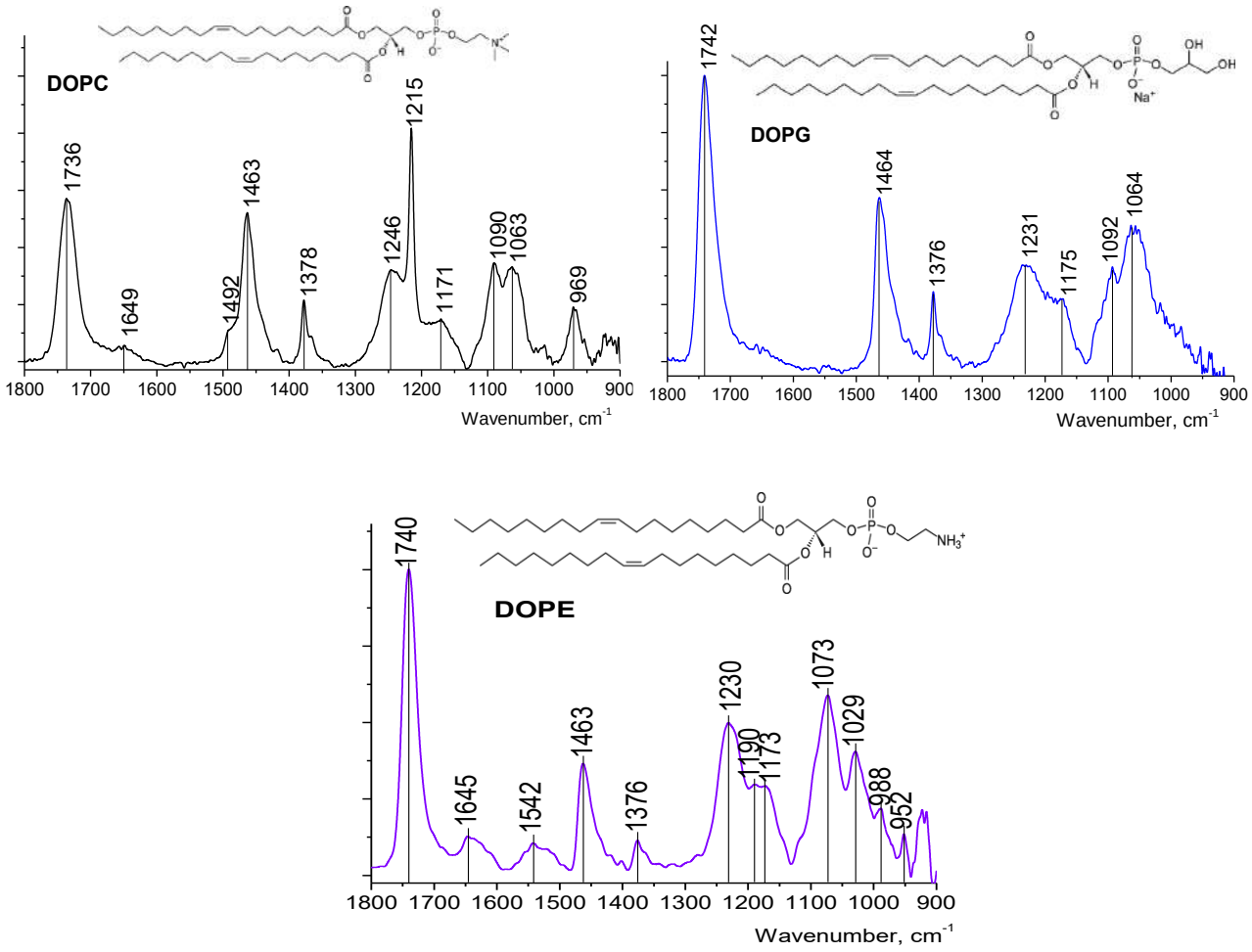


Рисунок 1.5. FTIR спектри поглинання DOPC, DOPE, PG в області 1800-900 см$^{-1}$

Таблиця 1.2 - Віднесення основних смуг поглинання до відповідних молекулярних груп

Частоти, см-1			Віднесення
DOPC	DOPG	DOPE	
1736	1749	1740	C=O валентне
1649		1645	C=O валентне, O-H деформаційне
		1542	N-H валентне
1492			деформаційне C-H2
1463	1464	1463	деформаційне C-H2
1378	1376	1376	деформаційне C-H3
1246	1236	1230	асиметричне валентне PO2-
1215			асиметричне валентне PO2-
		1190	валентне C-C, C-O
1171	1175	1173	валентне C-C
1090	1092	1073	симетричне валентне PO2-
1063	1064	1029	C-O
		988	C-O
969		952	C-C

Перші 3 ліпіди мають подібну структуру головки фосфоліпідів, однак вони мають різну довжину хвостів (14, 16 і 18 атомів вуглецю). Крім того, фосфоліпідний DOPE характеризується подвійним зв’язком C = C. Область 3050–2700 см-1 віднесена до валентних коливань груп CH_2 та CH_3 і є особливістю конформації фосфоліпідних хвостів. Наявність подвійного зв'язку C = C різко впливає на спектри фосфоліпідів у всіх спектральних діапазонах. Спектральні дані можуть бути використані як дата бібліотеки для подальшого вивчення.

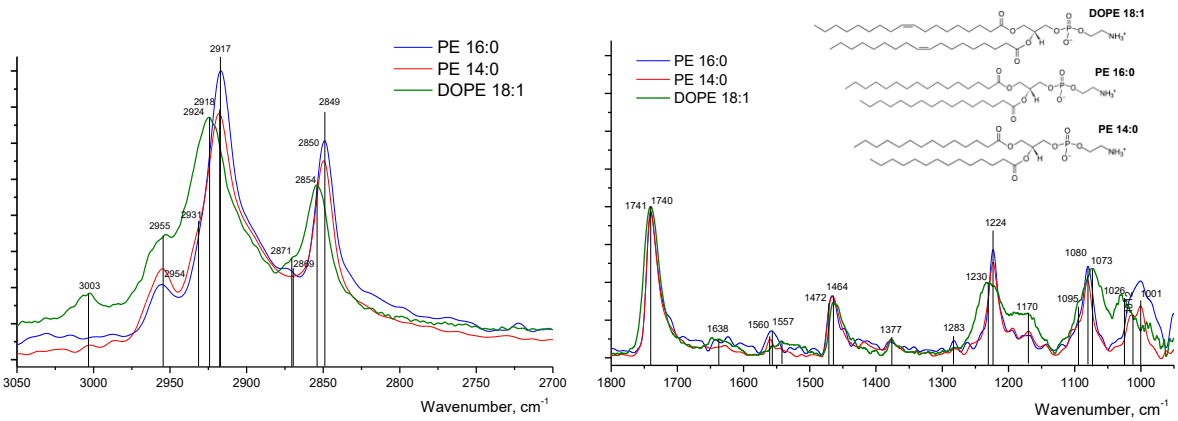


Рисунок 1.6 FTIR спектри поглинання фосфоліпідів, нанесених на прозору в ІЧ-області CaF2 підкладку в області 3050-2700 см$^{-1}$ та 1800-900 см$^{-1}$.

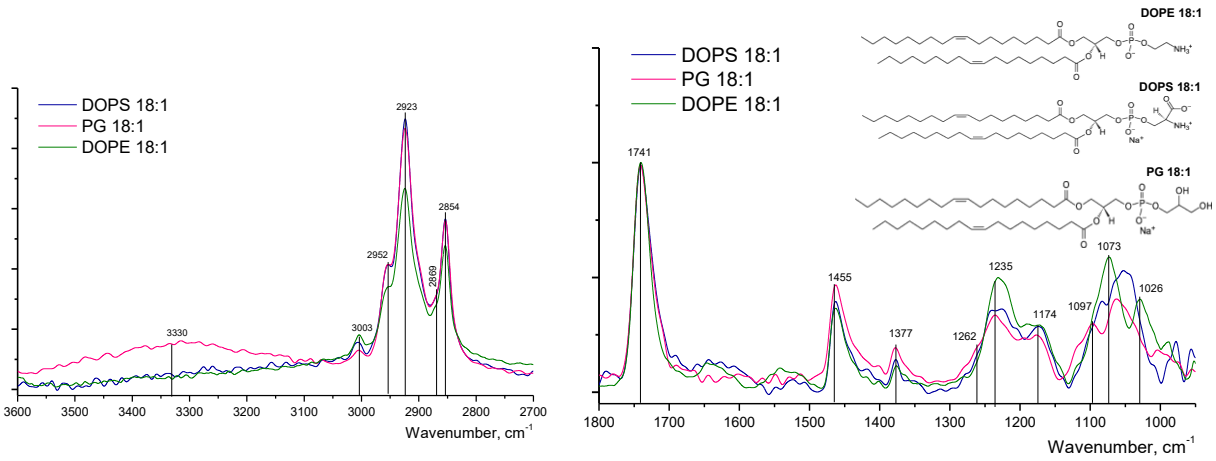


Рисунок 1.7 FTIR спектри поглинання фосфоліпідів, нанесених на прозору в ІЧ-області CaF2 підкладку в області 3050-2700 см$^{-1}$ та 1800-900 см$^{-1}$.

Фосфоліпіди DOPE, PG та DOPS не відрізняються будовою хвостів, тому в області поглинання CH_2-CH_3 валентних та деформаційних будь-яких особливостей та частотних зсувів немає. Однак відмінності є у будові фосфоліпідних головок, зокрема PG містить групи ОН, що відображається в ІЧ-спектрах – в області 3330 см$^{-1}$ є смуга вал. ОН. Основні відмінності спостерігаються в області 1000-1200 см$^{-1}$, де знаходиться поглинання фосфатних молекулярних груп.

Таблиця 1.3 - Віднесення основних смуг поглинання до відповідних молекулярних груп

PE 14:0	PE 16:0	DOPE 18:1	DOPS 18:1	PG 18:1	Віднесення
				3330	валентне OH
		3003	3003	3003	валентне CH
2954	2953	2955	2952	2952	валентне CH_3 асим.
2931	2932				
2918	2916	2924	2923	2923	валентне CH_2 асим.
	2869	2871	2869	2869	валентне CH_3 сим.
2850	2849	2854	2854	2854	валентне CH_2 сим.
1741	1740	1740	1741	1741	валентне C=O
		1638			C=C
1560		1557			C-NH_3+
1472	1472				деф CH_2
1464		1464	1465	1465	деф CH_2
1377	1377	1377	1377	1377	деф CH_3
1283	1283	1283			
1224	1224	1230	1235	1235	валентне PO_2^-
1169	1169	1170	1174	1174	C-O
1094	1094	1095		1097	валентне PO_2^- сим.
1080	1080	1073			C-O
1012		1026			C-O
1001	987	988			C-O

Для характеристики наведених спектрів використовувалися дані з наступних літературних джерел: [20-25] . Ці спектральні дані можуть бути використані для

створення бібліотеки коливальних маркерів окремих фосфоліпідів та будуть корисними для подальшого аналізу фосфоліпідних композицій та модельних мембран.

1.5 Висновки до розділу.

Опрацьовано літературні дані по тематиці вірусних мембран, зокрема мембрани вірусу SARS-CoV-2, проаналізовано можливий її ліпідний склад.

РОЗДІЛ 2. МЕТОДИКИ ДОСЛІДЖЕНЬ. НАЛАШТУВАННЯ ПРИЛАДІВ ТА ЗАКУПІВЛЯ РЕАКТИВІВ ДЛЯ ЕКСПЕРИМЕНТІВ. НАЛАГОДЖУВАННЯ ПРОЦЕСІВ АДМІНІСТРУВАННЯ ТА КООРДИНАЦІЇ ПРОЕКТУ.

2.1. Формулювання завдання

Характеризація розрахункових та експериментальних методик, що були застосовані для виконання завдань проекту.

2.2 Методики та обладнання для експериментальних досліджень

Досліджувані зразки аналізували за допомогою приладу INVENIO-R (Bruker, Німеччина). У експериментах FTIR використовували два типи препаратів синаптосом різного функціонального стану. Перший - це функціонально активні синаптосоми, що визначається за допомогою барвника, а саме, препарати синаптосом мали високу здатність накопичувати потенційно чутливий флуоресцентний барвник родамін 6G. Рівень накопичення становив 0,2 au, розрахований як F = Ft /F0, де F0 та Ft-інтенсивність флуоресценції родаміну 6G за відсутності та наявності синаптосом відповідно. F0 розраховували шляхом екстраполяції функції експоненціального розпаду до t = 0. Другий -функціонально інертні синаптосоми, які протягом декількох тижнів зберігали в морозильній камері при -24 °C. Вони характеризувалися низькою здатністю накопичувати потенційно чутливий флуоресцентний барвник родамін 6G. Рівень накопичення був меншим за 0,95 а.е.

Для реєстрації спектрів FTIR-ATR 20 мкл суспензії синаптосом наносили на кристал ZnSe приставки Bio-ATR. Зразок висушували у кюветній камері спектрометра протягом 1 години в потоці азоту при кімнатній температурі, фіксуючи стан синаптосом на поточний момент. Спектри реєструвались до того часу, поки інтенсивність смуги OH на 3400 $см^{-1}$ не переставала змінюватись і такий спектр аналізувався нами. Для спектрів FTIR-ATR була проведена корекція базової лінії та нормалізація відносно смуги Аміду I з максимумом в області 1652 $см^{-1}$. Ми

припускаємо, що кількість білка є постійною в синаптосомах в обох станах, тому така нормалізація є коректною.

Для виконання роботи були закуплені всі заплановані реактиви, а також обладнання, в тому числі приставка BioATRCell II та Міні-екструдер Аванті.

BioATRCell II - це приставка порушеного повного внутрішнього відбивання (Attenuated Total Reflectance) для FTIR спектрометра INVENIO-R, призначена для дослідження спектрів розчинів та суспензій у водному середовищі (Рисунок 2.1). Використовується для широкого спектру аналітичних задач, як конформаційна динаміка під дією температури, pH чи інших чинників, процеси агрегації чи фібриляції, зв’язування з лігандом, тощо.

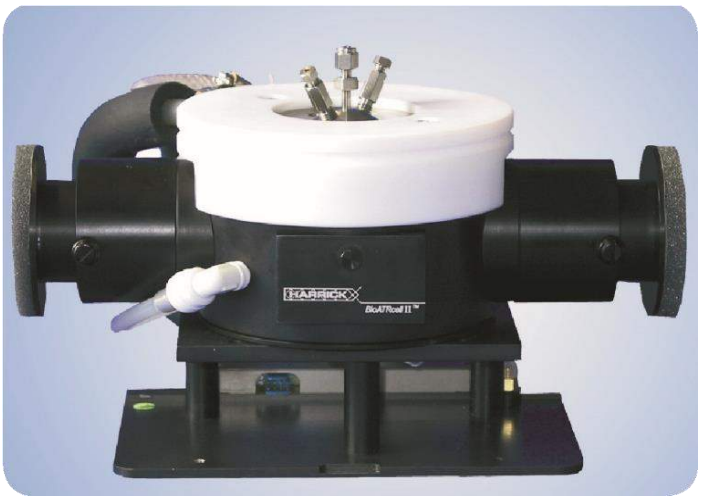


Рисунок 2.1 Приставка BioATRCell II

Суттєвою перевагою цього інструменту є можливість контролю температури, що розширює області застосування приставки та робить її ідеальним інструментом для дослідження розчинів таких біополімерів, як білки, ДНК/РНК, ліпіди тощо. При цьому можливо досліджувати дуже малі об’єми зразка (ефективна довжина оптичного шляху приставки в спектральному діапазоні 1500-2000 $см^{-1}$ становить приблизно 6 мкм, а мінімальний об'єм зразка може бути меншим 10 мкл) що особливо важливо при роботі з дорогими препаратами, такими як фосфоліпіди. Абсолютно герметична камера виключає будь-які втрати зразка в процесі температурних вимірювань.

Для керування параметрами реєстрації спектрів за допомогою приставки та для встановлення температурних режимів, використовується спеціальний

програмний пакет (O/PRO), що синхронізує спектроскопічну систему з приставкою та проводить користувача через процедуру вимірювання.

BioATRCell II має дві моди вимірювання:

- з інжекційним адаптером для проточних вимірювань досліджуваних розчинів. Різні адаптери дозволяють впорскувати розчин зразка через з'єднувачі роз’єми або шприци.
- з термоадаптером для статичних вимірювань досліджуваних розчинів та їх динаміки (конформаційні зміни, спричинені температурою, наявність ліганда, дією зовнішніх чинників, тощо).

Відкрита конструкція камери для зразків дозволяє легко чистити приставку, що робить BioATRCell II особливо придатним для вимірювання суспензій або агрегуючих речовин. Для досягнення оптимальної чутливості та співвідношення сигнал/шум, у оптичній системі використовується фотоелектричний детектор MCT з охолодженням рідким азотом.

Виконання автоматизованих експериментів зі зміною температури в діапазоні від 4 до 95°C з використанням BioATRCell II дозволяє спектроскопічно контролювати та фіксувати динаміку досліджуваних процесів.

Технічні особливості:

- Необхідний об'єм досліджуваного зразка всього 10 мкл
- статичний режим, проточний та режим діалізу
- автоматизовані температурні дослідження в діапазоні (4 - 95°C)
- датчик температури безпосередньо в камері для зразків
- інертний інтерфейс для зразка (тефлон та нержавіюча сталь)
- 6 мкм ефективна довжини оптичного шляху

В роботах [26-27] наведено приклади застосування такої приставки саме для задач дослідження модельних мембран. Зокрема в роботі [27] досліджували ліпіди в бішарі, який був сформований прямо на кристалі ATP з везикул, які попередньо формувались за допомогою екструдера. Потім готові везикули в водному

середовищі поміщали на кристал і чекали деякий час, поки на кристалі сформується бішар, після чого залишки везикул промивали і заливали бішар буферним розчином.

Така методика дозволяє отримати стабільний бішар та є оптимальною для наших експериментальних задач і буде використана в подальшому. Поки бішар знаходиться в розчині, і його можна використовувати для дослідження взаємодії з лігандами, які можна додати в розчин. При цьому фазовий склад мембрани зміниться і це можна побачити за змінами спектральних характеристик. Для спектроскопічного аналізу в роботі [27] досліджували смуги валентні CH в області 2950-2880 $см^{-1}$ і C=O 1730 в області $см^{-1}$.

Міні-екструдер Avanti (рисунок 2.2) дозволяє ефективно та швидко отримувати гігантські одношарові везикули шляхом екструзії (LUVET).

Рисунок 2.2 Міні екструдер Аванті

Конструкція цього пристрою повністю розбірна і дозволяє швидко очищати всі використані деталі, що забезпечує швидку зміну експериментального розчину для отримання везикул з різних ліпідних композицій. За допомогою цього екструдера створюються одношарові ліпосоми без додаткового використання розчинників або поверхнево активних речовин. Необхідний розмір везикул визначається діаметром пор полікарбонатної мембрани. В комплекті іде 100 мембран. Корпус екструдера зроблений з нержавіючої сталі доступними також є комплектуючі та запасні частини.

Параметри реєстрації даних в Раман-спектроскопії

У дослідженнях за допомогою КР спектроскопії використовувались два прилади. Першим приладом реєструвались спектри порошків ремдесивіру та тікагрелору. Спектри комбінаційного розсіяння порошку ремдесивіру та тікагрілору записувались за допомогою раманівського спектрометра miniRamanPro фірми Lightnovo (Данія). Використовувались 2 лазери 785 нм і 660 нм для різних областей спектра- 600-1800 $см^{-1}$ та 2800-3300 $см^{-1}$, відповідно.Точність визначення хвильового числа- 0.5 $см^{-1}$. Параметри реєстрації: експозиція 100 мсек, 30 спектрів усереднювались. Потужність лазерів 80 мВт (для 785 лазера) і 35 мВт (для 660 лазера) відповідно.

Спектри КР синаптосом під впливом препаратів та без них, а також меппінг синаптосом реєстрували за допомогою інвертованого раманівського мікроскопа, оснащеного об'єктивом 40х (з апертурою 1,0). Для збудження зразка використовували неперервний лазер з довжиною хвилі збудження 532 нм (Verdi G, Coherent Inc.) з максимальною потужністю 30 мВт. Розсіяне назад світло від зразка збиралось об'єктивом та відфільтровувалось за допомогою двох лазерно-блокуючих фільтрів (RazorEdge 0° Longpass фільтр, Semrock). Раманівське розсіяне світло було сфокусовано на вхідній щілині монохроматора (IsoPlane 320, Princeton Instruments), встановленому на 30 мкм, щоб відхилити не сфокусоване світло і мати високу спектральну роздільну здатність. Монохроматор спектрометра оснащений дифракційною решіткою 600 ліній/мм, розрахункова спектральна роздільна здатність становила приблизно 2 $см^{-1}$. Спектри були отримані з використанням ПЗЗ матриці із зворотною засвіткою (PyLoN: 400BR-eXcelon CCD, Princeton Instruments), кріогенно охолодженою при -120 °C. Точність положення хвильового числа визначалась за допомогою еталонних зразків- поліетилена та світловодів і складала - 0.5 $см^{-1}$.

Досліджувані зразки синаптосом, виділеної ліпідної фракції і штучних модельних ліпідних систем були додатково осаджені за допомогою центрифугування та нанесені на підложки CaF_2.

Таблиця 2.1 - Параметри, за яких реєстрували КР спектри :

Довжина хвилі світла опромінюючого лазера	531.82 нм
Потужність лазера	0.02 Вт
Експозиція	40 с
Розмір щілини	50 мкм
Діафрагма	1
Температура	20 0 С

Люмінесцентний спектрометр

Спектрометр FS5 (рисунок 2.3) - це високотехнологічне комплексне рішення, поєднане в одному приладі, що дозволяє вимірювати спектри флуоресценції, спектри поглинання в УФ та видимій області, а також час затухання флуоресценції. Прилад є двоканальним, що суттєво розширює можливості експериментатора та дозволяє легко додати другий детектор для вимірювання часу затухання чи NIR флуоресценції. Ця система має гарантоване співвідношення сигнал/шум > 6000:1 при збудженні 350 нм та випромінюванні на 397 нм, з часом інтегрування 1 секунда і спектральною шириною смуги 5 нм.

Рисунок 2.3 Люмінесцентний спектрометр FS5 Edinburg instruments, придбаний за кошти проекту.

Окрім того, дана модель має ряд суттєвих переваг:

-в оптичній схемі приладу використовуються сучасні голографічні решітки з ефектом зменшеного розсіяння світла.

-тримач для твердих зразків вертикально нахилений і розміщений лінійно щоб максимізувати сигнал від зразків різної товщини, від тонких плівок до товстих кристалів або рідин з високою оптичною густиною.

-Можливість встановити тримачі фільтрів у різних місцях для максимального зменшення розсіяного світла.

-внутрішні стінки приладу покриті спеціальним покриттям з високим поглинання розсіяного світла

Час затухання флуоресценції вимірюється за допомогою методу підрахунку одиночних фотонів з кореляцією в часі (Time-Correlated Single-Photon Counting Technique), що є власне квантовим, високочутливим методом, менш чутливим до шумів. Це дозволяє вимірювати часи затухання менше 30 пс. Роздільна здатність TCSPC матриці становить 305 фс. Для більш тривалих часів затухання використовується багатоканальний метод Multi-Channel Scaler, що забезпечує швидку та ефективну реєстрацію сигналу. Інтегруюча сфера з покриттям з політетрафторетилену для вимірювання квантового виходу є найбільшою з доступних для цього класу приладів (150 мм), що зебезпечує найвичу можливу точність.

FS5 використовує запатентовані монохроматори фокусною відстанню 225 мм. Це забезпечує кращу якість зображення та вищу оптичну пропускну здатність, підвищену роздільну здатність та підвищену чутливість. Монохроматори герметично закриті для збереження часу експлуатації. Можливість контролю температури зразка в широкому діапазоні від 77 К до 600 °С за умови використання різних аксесуарів. Прилад укомплектований набором фільтрів для відсікання небажаних сигналів і шумів, що суттєво покращує якість отриманих результатів. Стандартний детектор FS5 підтримується на рівні 5°С, що мінімізує фоновий шум, тепловий дрейф та забезпечує кращі результати в стаціонарному режимі та продовжує термін експлуатації детектора.

Прилад повністю автоматизований та має дуже зручний інтерфейс, що дозволяє оператору легко міняти тримачі для зразків, інтегруючу сферу, тощо і при

цьому програма автоматично розпізнає підключене обладнання і пропонує зміни в налаштуваннях. Ряд вимірювань здійснюється за замовчуванням і не потребує втручання оператора. Наприклад, після вимірювання збудження, автоматично слідує вимірювання люмінесценції, автоматично слідує вимірювання TCSPC, потім анізотропія тощо).

Основною перевагою моделі FS5 є також можливість доукомплектації додатковими модулями, як от мікроскопом, додатковими джерелами, додатковим лазером для дослідження ап-конверсії (квантового виходу та часу життя), що ми плануємо зробити в майбутньому

2.3 Методики розрахункових досліджень

2.3.1 Створення модельної мембрани in silico, що відповідає за ліпідним складом та кривизною мембрані вірусу SARS-CoV-2

Як відомо, вірус SARS-CoV-2 формує свою мембранну оболонку у едоплазматичному ретикулумі (ER), тому ліпідний склад його мембрани має відповідати складу мембрани ER легеневого епітелію. В літературі практично не існує робіт, де було б проведено кількісну ліпідоміку мембрани ER включно з аналізом розподілу ліпідних хвостів. Проте, наявні надійні дані щодо розподілу типів ліпідів [28]. Згідно з цими даними має місце наступний розподіл по типам ліпідів:

Фосфоліпід	Відсоток
PC	55
PE	20
PS	5
PI	10
CHOL	10

У єдиній роботі, де було проведено кількісний аналіз наявності різних типів ліпідних хвостів у макрофагах [29] було отримано дуже сильно відмінні вмісти

різних типів ліпідів, зокрема майже вдвічі нижчий вміст PC. Це може бути викликано особливостями макрофагів як імунних клітин, але у будь-якому разі не підходить для наших цілей. Тому для побудови модельної вірусної мембрани за основу було взято модель плазматичної мембрани легеневого епітелію людини в якій вміст основних класів ліпідів було відповідним чином модифіковано. Вміст холестеролу було знижено до 10%, всі сфінголіпіди та цераміди були видалено, а вміст PC було відповідно підвищено. Асиметрію мембрани було збережено, а зайві молекули фосфатидилхолінів було пропорційно перерозподілено між обома моношарами мембрани. Фінальний вміст ліпідів наведено у таблиці на Рисунку 2.4.

ER membrane		
	For 64 lipids per monolayer	
	Outer	**Inner**
DPPC	9	2
PLPC	6	1
POPC	20	4
DOPC	10	2
SOPC	8	2
SAPC	5	1
POPI		5
SAPI		7
DOPE		4
SOPE		4
PLA20		12
SAPE		6
SOPS		4
DOPS		2
SAPS		2
PSM		
CER160		
CER180		
CER241		
CHOL	6	6
	64	*64*

Рисунок 2.4 Склад модельної мембрани, що відповідає мембрані віруса SARS-CoV-2.

2.3.2 Створення модельної мембрани in silico, що відповідає за ліпідним складом та кривизною мембрані клітин легеневого епітелію людини

Для створення моделі плазматичної мембрани клітин легеневого ендотелію людини було проведено огляд літератури щодо кількісної ліпідоміки різних типів клітин легень. Не зважаючи на велику кількість таких робіт, не всі з них послідовно

повідомляють про молярну частку ліпідів у плазматичній мембрані, а обмежуються лише відносним вмістом ліпідів у кількох зразках різного типу. Деякі автори працюють із зразками цілих тканин легень, тоді як деякі концентруються лише на поверхнево-активній речовині легеневого сурфактанту. Дослідження, які не повідомляють про кількісний склад ліпідів, а лише показують відносну різницю між типами клітин або експериментальними та контрольними групами, не несуть для нас користі та були відкинуті.

У роботі [30] вивчалася тільки плазматична мембрана легеневих клітин та вміст холестеролу. Однак, автори повідомляють лише про вміст класів ліпідів та класів жирних кислот хвостів, без детальної розшифровки їх взаємовідношень.

У роботі [31] досліджувалися цілі клітини, що призводить до перемішування плазматичної мембрани та мембран всіх внутрішніх органел. Повідомлялися лише відмінності між типами клітин без молярної фракції ліпідів.

Найбільш релевантним для нас могло б бути дослідження [32], оскільки у ньому вивчалися клітини інфіковані коронавірусом (але не пандемічним SARS-CoV2, а іншим). Однак і тут повідомлялися лише відмінності між зараженими та здоровими клітинами.

У роботі [33] було проведено якісну повну ліпідоміку, але на цілих клітинах різного типу. Досліджувані типи клітин не було охарактеризовано у достатніх деталях. Вміст PE у цій роботі дуже сильно відрізняється від інших робіт, що не викликає довіри.

У роботі [34] теж було проведено якісну повну ліпідоміку, але на цілих клітинах. Типи клітин було детально охарактеризовано. Однак, в роботі повідомляється лише відсоток ліпідів всередині кожного типу, а не в цілому по зразку.

В результаті ми використали наступну процедуру для побудови моделі мембрани.

1. Було взято молярні фракції ліпідів кожного типу усереднені між роботами [30] та [33].

2. Деталі щодо вмісту ліпідних хвостів всередині кожного типу було взято з роботи [34] для бронхіальних ендотеліальних клітин. Було враховано лише ті типи хвостів, що мають вміст >5% для кожного типу.
3. На жаль, в роботі Zemski нема розподілу для сфінгомієлінів (SM) та відсутні кераміди (CER), тому для цих двох класів було взяті дані з роботи [33]. Дані щодо вмісту ді- та тригліцеридів враховано не було, бо вони, скоріш за все, не відносяться до плазматичної мембрани.
4. Для всіх поліненасичених ліпідних хвостів було використано арахідонову кислоту 20:4.
5. Якщо відповідного ліпіду не було у стандартній базі даних сервісу CHARMM-GUI, ми використовували найбільш близький до нього.
6. Асиметрію ліпідів було враховано згідно до відомих на сьогодні співвідношень для інших клітин людини. На зовнішній моношар було поміщено всі PC, SM, CER, а на внутрішній – всі PS, PI, PE (включно з плазмалогенами).
7. Композицію було зведено до 64 ліпідів на моношар шляхом округлення.

Отриманий ліпідний склад мав практично рівні площі на ліпід згідно оцінці сервісу CHARMM-GUI, що говорить про його високу якість.

Крім асиметричного розподілу, характерного для нормальних клітин, було також згенеровано повністю симетричний розподіл, характерний для пошкоджених та апоптичних клітин. Обидва розподіли наведено на Рисунку 2.5

Asymmetric				Symmetric		
	For 64 lipids per monolayer				For 64 lipids per monolayer	
	Outer	Inner			Outer	Inner
DPPC	5			DPPC	2	2
PLPC	3			PLPC	2	2
POPC	11			POPC	5	5
DOPC	6			DOPC	3	3
SOPC	4			SOPC	2	2
SAPC	3			SAPC	1	1
POPI		4		POPI	2	2
SAPI		6		SAPI	3	3
DOPE		4		DOPE	2	2
SOPE		5		SOPE	3	3
PLA20		15		PLA20	8	8
SAPE		8		SAPE	4	4
SOPS		7		SOPS	3	3
DOPS		1		DOPS	1	1
SAPS		3		SAPS	1	1
PSM	11			PSM	5	5
CER160	7			CER160	4	4
CER180	2			CER180	1	1
CER241	1			CER241	1	1
CHOL	11	11		CHOL	11	11
	64	*64*			*64*	*64*

Рисунок 2.5 Ліпідний склад модельних мембран.

2.3.3 Створення моделі молекули ремдесивіру

Протягом підзвітного періоду було створено геометрію молекули мембранотропного лікарського препарату ремдесивіру для подальшого використання у симуляціях методом атомістичної молекулярної динаміки. Для цього структуру молекули було побудовано за допомогою сервісу CHARMM GUI Ligand modeler. Особливу увагу було приділено правильній стереоспецифічності всіх хіральних центрів.

Геометрію молекули ремдесивіру було оптимізовано методом функціоналу густини на рівні теорії b3lyp/6-31G++ за допомогою програмного пакету NWChem 6.8. Точкові заряди було апроксимовано стандартним методом фітування зарядової густини ESP та симетризовано по топологічній еквівлентності атомів. Останній крок є важливим через те, що у процесі молекулярної динаміки топологічно еквівалентні атоми можуть вільно мінятися місцями у ході молекулярних обертань і тому мають бути повністю еквівалентними в термінах класичного силового поля.

За допомогою сервісу CHARMM GUI було створено топологію молекули для силового поля CHARMM36 у форматі пакету Gromacs. Отримані точкові заряди було перенесено у згенеровану топологію та віднормовано для точного отримання цілого заряду молекули.

Отриману топологію було піддано мінімізації енергії у пакеті Gromacs 2020.2, що показало її стійкість та готовність до подальшого використання (Рисунку 2.6).

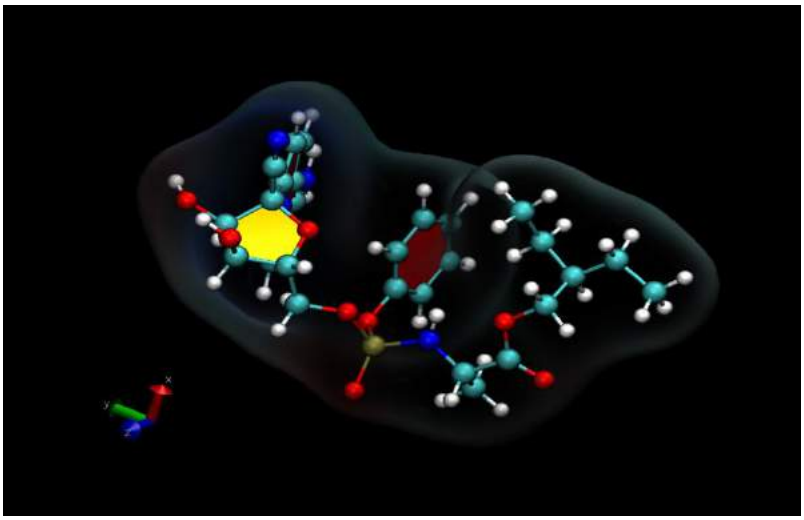


Рисунок 2.6 Оптимізована геометрія молекули ремдесивіру.

Нарешті, було створено початкову конфігурацію мембранної біцели, що буде використовуватися у подальших розрахунках за допомогою методів, опублікованих у наших попередніх роботах (Рис. 2.7). Біцелу було попередньо врівноважено за допомогою програмного пакету Gromacs 2020.2 р параметрами наведеними нижче:

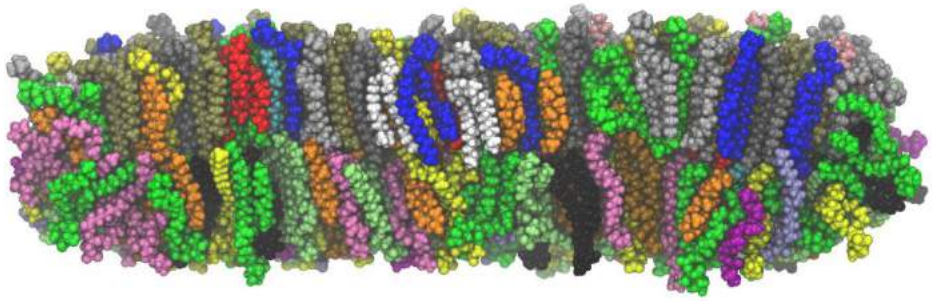


Рисунок 2.7 Структура асиметричної мембранної біцели після попереднього врівноваження. Кожен тип ліпідів показано своїм кольором. Малюнок отримано за

допомогою програми VMD 1.9.3 та трасирувальника променів Tachyon з об'ємно-оклюзійним освітленням.

Топологію молекули тікагрелору було створено раніше аналогічним чином і використано в даній роботі без змін.

2.3.4. Протокол молекулярної динаміки

Топології ремдесивіру та тікагрелору було згенеровано за допомогою сервісу CHARMM GUI ligand builder [35-36] . Молекули було оптимізовано квантовомеханічно на рівні теорії 6-31G з використанням пакету NWChem 6.6 [37]. Було розраховано часткові заряди ESP, які було усереднено по еквівалентних атомах і перенесено у згенеровані топології.

Мембрани було побудовано за допомогою сервісу CHARMM GUI membrane builder [35-36] згідно зі складом наведеним у таблиці 1 з 64 ліпідами на моношар. Для отримання мембранних міцел мембрану було дупліковано у напрямі X для створення видовженої системи з 384 ліпідами. Систему було сольватовано з розрахунку 50 молекул води на ліпід та додано іони з розрахунку 0.15 M NaCl з необхідною кількістю додаткових контріонів для нейтралізації системи. Систему було конвертовано у мембранну міцелу періодичну у напрямку Y [38-43]. Змішування ліпідів з різних моношарів у районі «шапок» міцели зробило неможливим за рахунок селективних потенціалів відштовхування як описано у наших попередніх роботах [38-44]. Кривизна бішарової частини міцели підтримувалася алгоритмом EnCurv [122] з форсованою кривизною 50 $нм^{-1}$. Міцелу було врівноважено протягом 200 нс.

У випадку плаского бішару моделювалася вихідна система з 64 ліпідами у кожному моношарі з використанням аналогічних параметрів але без форсованої кривизни. В цьому випадку система моделювалася протягом 300 нс.

Молекули ремдесивіру та тікагрелору додавалися до системи вручну і розташовувалися безпосередньо над зовнішнім моношаром. Для міцели додавалося по три молекули, для бішару - по одній. Центри мас лігандів утримувалися близько

до мембрани за рахунок обмежуючого напів-гармонічного потенціалу, що вмикався на відстані 2.5 нм від центру бішару у напрямку нормалі мембрани. Для міцели інший обмежуючий напів-гармонічний потенціал утримував молекули лігандів від дифузій у шапки біцели.

Всі симуляції виконувалися з використанням пакету Gromacs [45] версій 2019.2 та 2020.4 з патчем для підтримки Plumed [46;47] та плагіном EnCurv [122;124]. Використовувалося силове поле CHARMM36 [48]. Тиск в 1 атм. утримувався баростатом Парнелло-Рамана [49]. Для міцели використовувався анізотропний баростат у напрямку Y ([50] Cherniavskyi, Ramseyer et al. 2016; [122], для бішару – напів-ізотропний незалежно у площині XY та напрямку Z. Використовувалася схема відсічки Верлета [51] та метод PME для врахування електростатичних взаємодій на великій відстані [52] з відсічкою 1.2 нм. Використовувався термостат Velocity rescale [53] для підтримки температури 320K. Крок інтегрування складав 2 фс зі зв’язками атомів водню перетвореними у жорсткі в`язі. Траєкторії аналізувались скриптами, написаними за допомогою бібліотеки молекулярного моделювання Pteros [54].

2.4. Висновки до розділу 2.

Охарактеризовано експериментальні та розрахункові методики, використані в проекті та подано технічні характеристики обладнання, придбаного за кошти проекту.

РОЗДІЛ 3. СТВОРЕННЯ МОДЕЛЬНОЇ МЕМБРАНИ IN VITRO ТА ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ КРИВИЗНИ ПОВЕРХНІ НА ВПОРЯДКУВАННЯ ЛІПІДІВ

3.1. Формулювання завдання. Створити модельну мембрану in vitro та визначити вплив кривизни поверхні на впорядкування ліпідів.

3.2. Методика отримання модельних мембран

Малі моноламелярні везикули (від. англ. Small unilamellar vesicles, SUV) були отримані за допомогою обробки суспензії ліпідів класичним методом [55] . Розчин ліпідів в хлороформі висушували поки вони не утворюють ліпідну плівку та розчиняли у Na/HEPES буфері (pH 7.5) для одержання 400 мкМ концентрації. Результатом відшарування ліпідів від поверхні є утворення мультиламелярних везикул, які забарвлюють розчин у білий колір (ця суміш може бути використана для виготовлення великих моноламелярних везикул). Надалі обробка ультразвуком відбувається за допомогою приладу УЗД-150 з титановим зондом. Під час процесу озвучування розчин ставав прозорим та набував опалесцентного забарвлення, що свідчило про утворення малих моноламелярних везикул.

Великі моноламелярні везикули (від англ. Large unilamellar vesicles, LUV) були отримані класичним методом екструзії як описано в [56]. Суспензія багатоламелярних везикул підлягала екструзії з використанням екструдера Avanti (США). Розмір фільтрів був спочатку 0,2 мкМ (7 пасажів), потім 0,1 мкМ (10 пасажів). Такий підхід призводить до утворення LUV із діаметром ~0,11 мкМ, як було показано за допомогою Malvern Zetamaster 300 (Велика Британія). Na/HEPES (pH 7,5) буфер був використаний в цих експериментах.

Гіганські везикули з плазматичної мембрани (Giant Plasma Membrane Vesicles, GPMVs) були виготовлені за класичним протоколом [57]. Клітини CHO висаджені в чашках Петрі до 70% конфлюентності були відмиті буфером GPMV (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 2 мМ $CaCl_2$, pH 7,4) та надалі інкубувалися з 25 мМ парафармальдегідом (PFA) та 2 мМ дітіотреітолом (DTT) впродовж 1 години за

37°C. Впродовж цього періоду клітини починають продукувати екзосомальні везикули з плазматичної мембарни. GPMVs були зібрані за допомогою осадження на льоду.

Флуоресцентний зонд на мембрани PA

Для детекції інтегрального упорядкування ліпідів в мембранних структурах клітин був застосований зонд push-pull pyrene, PA [58] .

GPMVs та SUV були забарвлені із додаванням стокового розчину зонду PA в DMSO до 1 мл везикул до кінцевої концентрації 0.1 мкМ (<0.25% DMSO від об'єму). В експериментах використовувався 20 мМ HEPES буфер з pH 7.4. Концентрація ліпідів була 200 мкМ.

Спектри флуоресценції записувалися за допомогою спектрофлуориметра PTI Quanta Master40 із збудженням 405 нм за кімнатної температури. Всі спектри нормалізувалися відповідно суспензії клітин (або ліпосом) без барвника. Для статистичного аналізу дані були розраховані як співвідношення "червоного"/"синього" (600/500 нм) ліній інтенсивності за допомогою програмного забезпечення OriginPro software.

Флуоресцентний зонд NR12S

Флуоресцентний зонд NR12S [59] став вже фактично класичним інструментом для досліджень біомембран. Він інкорпорується спонтанно в зовнішній моношар, залишаються там відносно довгий час та відповідають на структурні зміни в везикулах за різних температур чи складу та в клітинах за апоптозу. Ця відповідь може бути задетектованою за допомогою спектрофлуориметрії, мікроскопії та протокової цитометрії [59,60] .

Подібно до F2N12S [60], Nile Red був модифікований із гідрокарбоновим ланцюгом та сульфатною групою для отримання NR12S. Використовуючи унікальну властивість NR12S "вимикатися" за присутності йонів дітіоніту, була показана властивість зонду залишатися в зовнішньому моношарі ліпідних мембран із незначним фліп-флопом впродовж наших експериментальних спостережень [59, 61].

Чутливість зонду до йонів дітіоніту була використана в цих дослідженнях для селективного визначення властивостей кожного з моношарів великих та малих везикул.

LUV та SUV були забарвлені із додаванням стокового розчину зонду NR12S в DMSO до 1 мл везикул до кінцевої концентрації 0.2 мкМ (<0.25% DMSO від об'єму). Оскільки кінетика зв'язування барвників із ліпосомами була швидкою, то експерименти проводилися через декілька хвилин після додавання барвника. В експериментах використовувався 20 мМ фосфатний буфер з pH 7.4. Концентрація ліпідів була 200 мкМ.

Спектри флуоресценції записувалися за допомогою спектрофлуориметру PTI Quanta Master40 із збудженням 520 нм за кімнатної температури. Всі спектри нормалізувалися відповідно суспензії клітин без барвника. Для статистичного аналізу дані були розраховані як співвідношення "зеленого"/"червоного" (560/600 нм) ліній інтенсивності за допомогою програмного забезпечення OriginPro software.

3.3. Експеримент по визначенню впливу кривизни поверхні мембрани на впорядкування ліпідів

На перший етап виконання проєкту ми запланували дослідження впливу кривизни кожного з моношарів мембрани везикул різного розміру та довжини ацильних ланцюгів, які входять до його складу, на впорядкування цих моношарів.

Для виконання поставленої задачі були створені великі і малі моноламелярні везикули на базі дімірістоілфосфатиділхоліну, діпальмітоїлфосфатиділхоліну та дістереоїлфосфатиділхоліну за допомогою екструдера та ультразвуку, відповідно. Розмір великих та малих везикул визначався за допомогою лазерної кореляційної спектроскопії та складав 120±20 нм та 40±10 нм, відповідно.

Для визначення властивостей моношарів був застосований зонд NR12S, який є чутливим до свого ліпідного мікрооточення і своєю флуоресцентною відповіддю засвідчує про наявність більш чи менш впорядкованої організації ліпідів. В цьому

плані референтними значеннями є сигнал рідинно-впорядкованої фази у складі сфінгомієліну з холестеролом та рідинно-невпорядкованої фази, яка складається з фосфоліпідів з ненасиченими ацильними ланцюгами, наприклад, ді-олеоїлфосфатиділхоліну.

Оскільки зонд NR12S має спеціальний заряджений сульфідний якір, який його тримає на зовнішньому моношарі, то початковим завданням було отримати везикули, які би містили його на внутрішньому моношарі.

Найпростішим рішенням цього було утворення везикул, які початково містять в своєму складі цей зонд, а потім «вимкнути» його сигнал у зовнішньому моношарі за допомогою дітіоніту натрію. Таким чином, для кожного ліпідного складу і розміру везикул було три типи даних: забарвлений зовнішній моношар, забарвлений внутрішній моношар та забарвлені обидва моношари (Рис. 3.1).

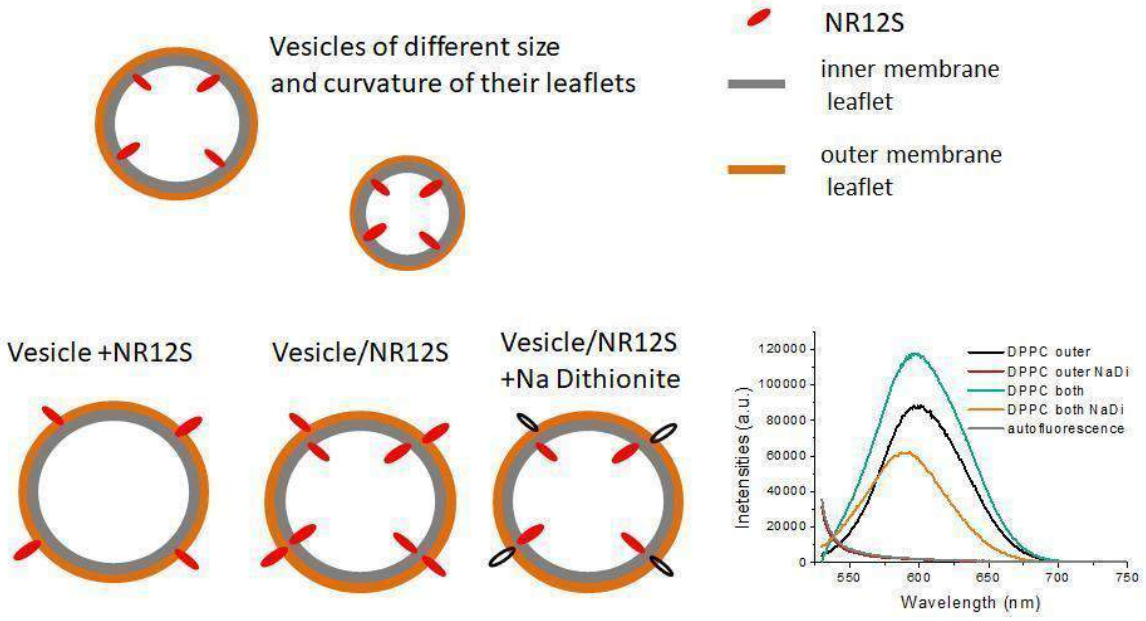


Рисунок 3.1 Загальна схема експерименту та спектри флуоресценції зонду.

NR12S в великих моноламелярних везикулах в присутності дітіоніту натрію та без. Моделі везикул (знизу) ілюструють способи забарвлення: забарвлений зовнішній моношар при звичайному додаванні зонду; везикули створені в присутності зонду, який забарвлює обидва моношари; везикули створені в присутності зонду та інкубовані з дітіонітом натрію, який знебарвлює зовнішній

моношар. Спектри флуоресценції зонду NR12S в великих везикулах, які складаються з ді-пальмітоїлфосфатиділхоліну. Спектри відображають сигнал зонду NR12S в зовнішньому моношарі везикул з додаванням дітіоніту натрію (відповідає автофлуоресценції) та без (сигнал із зовнішнього моношару); в обох моношарах з додаванням дітіоніту натрію (сигнал з внутрішнього моношару) та без (сигнал з обох моношарів). Збудження відбувається за 520 нм за температури 45°С (вище температури фазового переходу для цього фосфоліпіду).

На прикладі ді-стереоїлфосфатиділхоліну (Рис. 3.2 ліворуч) за температури 55°С (вище температури фазового переходу для цього фосфоліпіду) показана чітка відмінність між впорядкуванням зовнішнього і внутрішнього моношарів, при цьому більші значення впорядкування характерні для внутрішнього моношару, де фосфоліпідні «голови» упаковані максимально щільно за рахунок від'ємної кривизни. Цей феномен спостерігається як в великих моноламелярних везикулах (Рис. 3.2, ліворуч зверху) з ді-стереоїлфосфатиділхоліну, так і в малих (Рис. 3.2, ліворуч знизу). Варто зауважити, що для рідинно-невпорядкованої фази характерним є більша впорядкованість у внутрішньому моношарі малих моноламелярних везикул у порівнянні з внутрішнім моношаром великих везикул (Рис. 3.2, праворуч зверху). Однак, попри чітку відмінність між моношарами в кожному типі везикул, ефекту, пов'язаного із відмінністю між внутрішнім моношаром великих і малих везикул, не спостерігається при додаванні холестеролу в їх обидва типи (Рис. 3.2, праворуч знизу) і формуванні рідинно-впорядкованої фази.

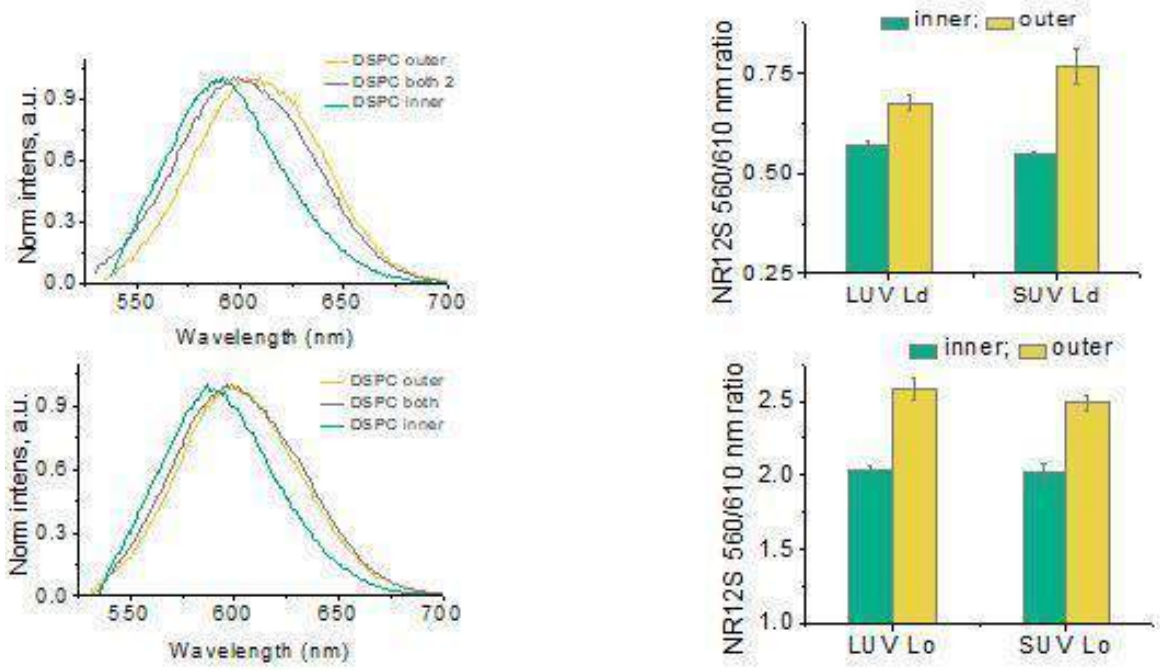


Рисунок 3.2 Спектри флуоресценції зонду NR12S в великих (ліворуч, зверху) та малих (ліворуч, знизу) моноламелярних везикулах, які складалися з ді-стереоїлфосфатиділхоліну за температури 55ºС (вище температури фазового переходу для цього фосфоліпіду). Квантифіковані значення ратіометрії (співвідношення інтенсивностей 560/610нм) сигналу зонду NR12S для великих (LUV) та малих (SUV) везикул, які складалися з ді-стереоїлфосфатиділхоліну за температури 55ºС без домішки холестеролу (рідинно-невпорядкована фаза, праворуч зверху) та за температури 25ºС з холестеролом (рідинно-впорядкована фаза, праворуч зверху). Збудження відбувалося за 520 нм.

Варто наголосити, що всі везикули безвідносно розміру чи складу показали чітку різницю між впорядкуванням зовнішнього і внутрішнього моношарів (Рис. 3.3, ліворуч зверху і знизу). Також, безвідносно до розміру та складу везикул внутрішній моношар малих моноламелярних везикул є більш впорядкованим у порівнянні з великими (Рис. 16, праворуч).

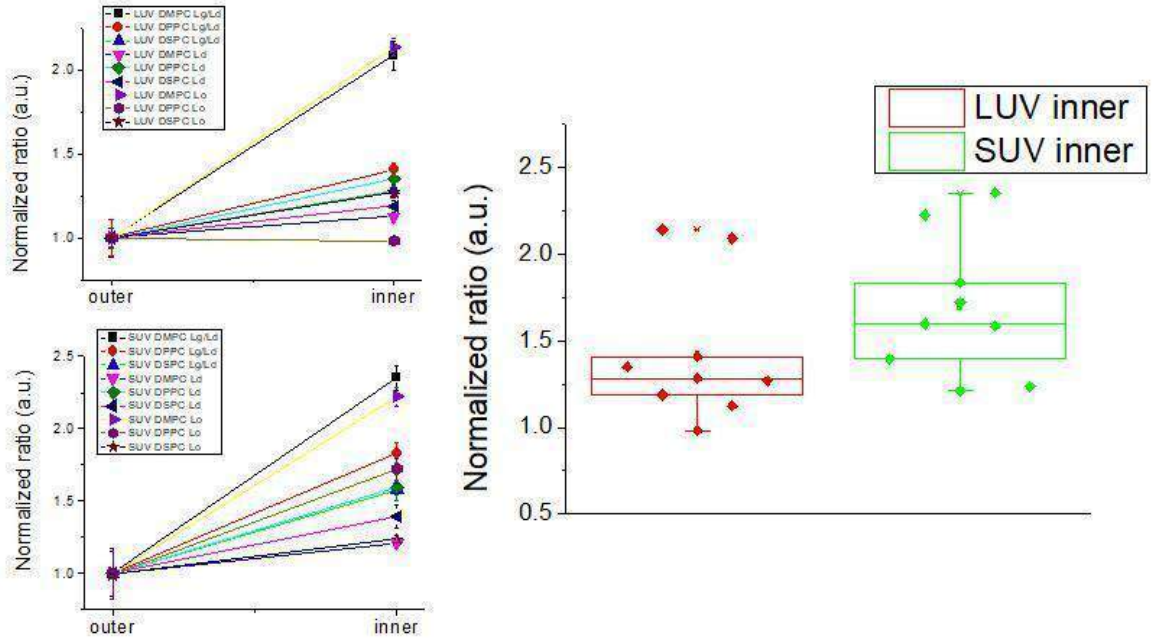


Рисунок 3.3 Нормалізовані значення квантифікованої ратіометрії (співвідношення інтенсивностей 560/610нм) сигналу зонду NR12S для великих (LUV, зверху) та малих (SUV, знизу) везикул, які складалися з ді-мірістоїлфосфатиділхоліну, ді-пальмітоїлфосфатиділхоліну, ді-стереоїлфосфатиділхоліну за температури вище та нижче фазового переходу без домішки холестеролу (рідинно-невпорядкована фаза та суміш рідинно-невпорядкованої та гелеподібної фази, відповідно) та за температури 25°C з холестеролом (рідинно-впорядкована фаза). Порівняння впорядкування внутрішнього моношару між великими та малими моноламелярними везикулами для всіх наведених складів та ліпідних фаз.

Щоб підтвердити концепцію впливу зміни кривизни мембрани на впорядкованість моношарів, ми порівняли залежність впорядкованості від кривизни мембрани в везикулах природного походження. Для цього були виділені гігантські везикули з плазматичної мембрани з клітинної лінії CHO. Для порівняння вони були піддані впливу ультразвуку для отримання малих моноламелярних везикул. Оскільки ці гігантські везикули зберігають склад та асиметрію плазматичної мембрани клітин, а після ультразвукового впливу моношари перемішуються, то визначення властивостей кожного окремого моношару окремо призведе до хибних

висновків. Саме тому для порівняння властивостей гігантських везикул з плазматичної мембрани та їх похідних малих моноламелярних везикул був обраний зонд на основі пірену (PA) без селективності до моношарів. Щоб нівелювати концентраційний ефект та навіть незначний ефект від зміни співвідношення барвника до ліпідів, спочатку записувався сигнал зонду PA в гігантських везикулах з плазматичної мембрани, а потім, після ультразвукового впливу, сигнал вимірювався повторно. Показано, що озвучені везикули, які мають на порядок менший діаметр, також мають більшу впорядкованість в порівнянні з гігантськими везикулами (Рис. 3.4).

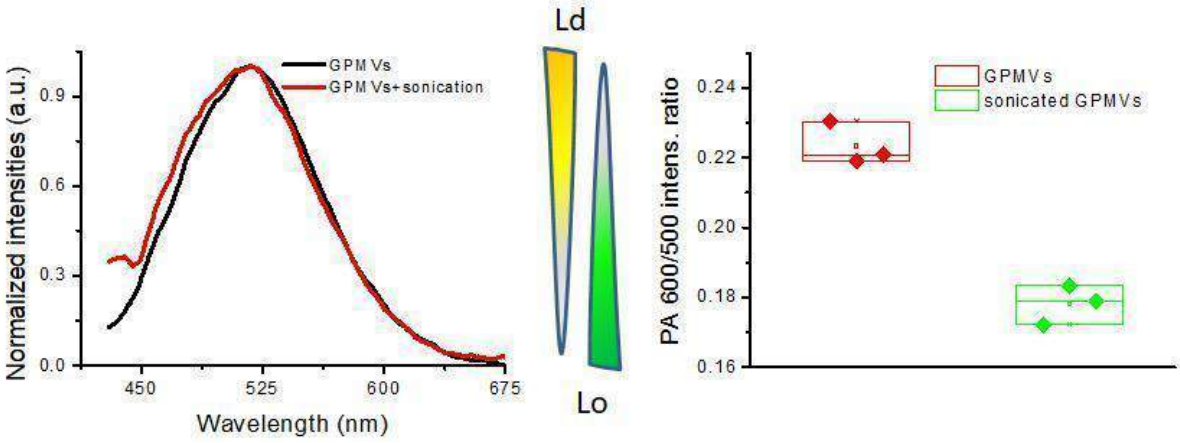


Рисунок 3.4 Спектри флуоресценції зонду PA в гігантських везикулах з плазматичної мембрани клітинної лінії CHO (GPMVs) та їх відповідники піддані впливу ультразвуку для отримання малих моноламелярних везикул (GMPVs+sonication). Квантифіковані значення ратіометрії зонду PA (співвідношення інтенсивностей 600/500нм). Збудження відбувалося за 405 нм.

Таким чином, ми показали, що властивості моношару везикул не залежать від їх складу, але залежать від кривизни поверхні кожного з моношарів. Підтвердження цієї гіпотези в тому числі на везикулах природного походження свідчить про те, що подібний механізм може бути задіяний для «вимкнення» (або зниження) активності механочутливих мембранних протеїнів. Не виключено, що подібна регуляція властивостей мембран має місце при взаємодії вірусу (об’єкт з великою кривизною поверхні) з плазматичною мембраною клітин (об’єкт з, фактично, пласкою

поверхнею) і на характер такої взаємодії впливатимуть амфіфільні лікарські препарати, які потенційно здатні змінювати патерни поведінки мембранних рецепторів, транспортерів, тощо. Подальші дослідження будуть спрямовані на з'ясуванні ролі препаратів ремдезивіру та тікагрелору у формуванні властивостей мембран везикул та клітин.

3.4. Визначення складу модельної мембрани для експериментів in vitro

Для створення експериментальних моделей вірусної мембрани та мембрани клітин легеневого ендотелію ми використовуємо стратегію формування везикул різного фосфоліпідного складу.

Згідно з нашим попереднім досвідом, літературними даними та розрахунками [55, 62-64] для створення везикулярних структур ми пропонуємо модель з такими фосфоліпідами, які мають найбільшу присутність в мембранах:

1.DOPC, 2. DOPE, 3. DOPS, 4. SM

Окрім фосфоліпідів, до складу всіх моделей входить ліпід стероїдної природи холестерол, який є складовим клітинної мембрани. За допомогою цих фосфоліпідів можна створити композиції в тому числі з некомпенсованим зарядом на поверхні (Рис. 3.5).

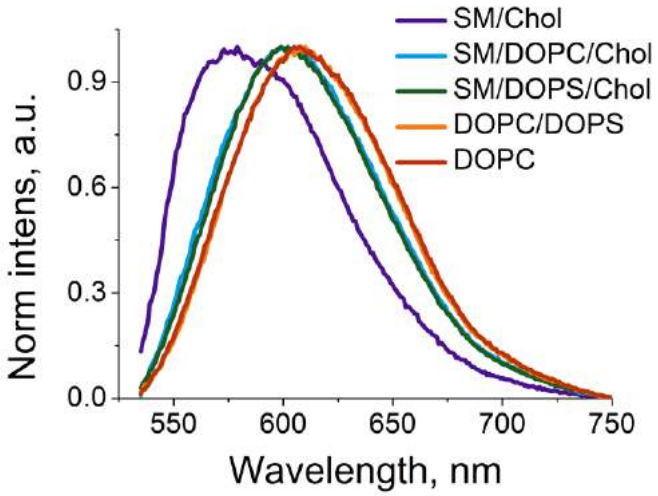


Рисунок 3.5 Спектри флуоресценції зонду NR12S у великих моноламелярних везикулах, одержаних шляхом екструзії. В усіх випадках загальна концентрація

везикул була 200мкМ, а холестерол складав 1/3 від загального складу кожного зі зразків. Збудження флуоресценції відбувалось за 520нм

Протокол отримання везикулярних структур відповідає описаним у розділі 3.2 для великих та малих моноламелярних бішарів. Як було описано вище, в залежності від методу, ці методи дозволяють отримувати везикули різного розміру у відносно контрольованих межах. Варто наголосити, що отримання везикул за допомогою екструдера дозволяє отримати структури більш стабільного розміру, які менше агрегують в порівнянні з малими везикулами, створеними за допомогою ультразвуку.

Варто наголосити, що у проведенні флуоресцентного аналізу взаємодії терапевтичних речовин з мембраною дослідження будуть в першу чергу фокусуватися на поведінці структурної організації ліпідів зовнішнього моношару везикул. Таким чином, створення асиметричних везикул, які відповідають структурі вірусу, плазматичної мембрани чи ендоплазматичного ретикулуму клітин не є критичним. З іншої сторони, оскільки ІЧ спектроскопія не дає можливості фокусуватися на поокремих моношарах, то таким чином можна досліджувати везикули з повним набором фосфоліпідів і без урахування асиметрії. В цьому контексті, у якості об’єкта з природнім складом ліпідів та збереженою асиметрією на подальших етапах виконання проєкту будуть використовуватися нервові терміналі з контролем структурної організації ліпідів мембрани та функціонального стану транспортерів нейромедіаторів.

3.5. Висновки до розділу 3

Створено модельну мембрану in vitro та визначено вплив кривизни поверхні на впорядкування ліпідів.

РОЗДІЛ 4. ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ ТІКАГРЕЛОРУ ТА РЕМДЕСИВІРУ НА СТРУКТУРНІ ПАРАМЕТРИ МЕМБРАН *IN SILICO*

4.1. Формулювання завдання

Ціль завдання – визначити ліпідний склад модельної мембрани, протокол молекулярної динаміки для визначення впливу препаратів на структурні параметри мембран методами повноатомної молекулярної динаміки *in silico*.

4.2. Визначення ліпідного складу модельної мембрани

В ході виконання роботи було створено моделі мембран клітин легеневого ендотелію людини та мембран вірусних частинок респіраторних мембрановмісних вірусів. Відомо, що мембрановмісні віруси, зокрема коронавіруси, відбруньковуються переважно від мембрани ендоплазматичного ретикулуму, тому склад їхньої мембранної оболонки можна вважати ідентичним до складу мембрани ЕПР. На жаль, точний ліпідний склад мембран ЕПР для клітин легеневого епітелію невідомий. Для його апроксимації було використано склад плазматичної мембрани клітин легеневого епітелію людини, який модифікувався згідно з загальними відмінностями складу мембран клітинних органел [65].

Було проведено огляд літератури щодо кількісної ліпідоміки різних типів клітин легень. Не зважаючи на велику кількість таких робіт, не всі з них послідовно повідомляють про молярну частку ліпідів у плазматичній мембрані, а обмежуються лише відносним вмістом ліпідів у кількох зразках різного типу. Деякі автори працюють із зразками цілих тканин легень, тоді як інші концентруються лише на поверхнево-активній речовині легеневого сурфактанту. Дослідження, які не повідомляють про кількісний склад ліпідів, а лише показують відносну різницю між типами клітин або експериментальними та контрольними групами, не несуть для нас користі та були відкинуті.

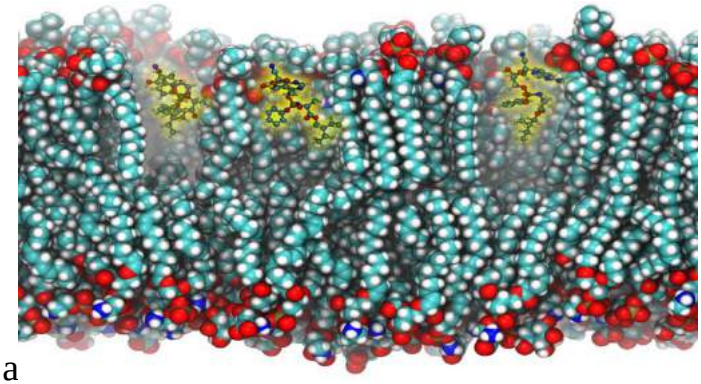
Оскільки у мембрані ЕПР практично немає сфінгомієлінів та церамідів, то ці типи ліпідів було відкинуто при переході до моделі мембрани ЕПР. Молярні фракції ліпідів та холестеролу було перенормовано відповідно до «ідеального» склад

мембрани EP (PC: 55%, PE: 20%, PS: 5%, PI: 10%, CHOL: 10%, [65]). Відносний розподіл ліпідних хвостів всередині класів ліпідів було при цьому збережено. Композицію було повторно зведено до 64 ліпідів на моношар шляхом округлення. В результаті було отримано композицію з 15 типів ліпідів наведену у таблиці 4.1

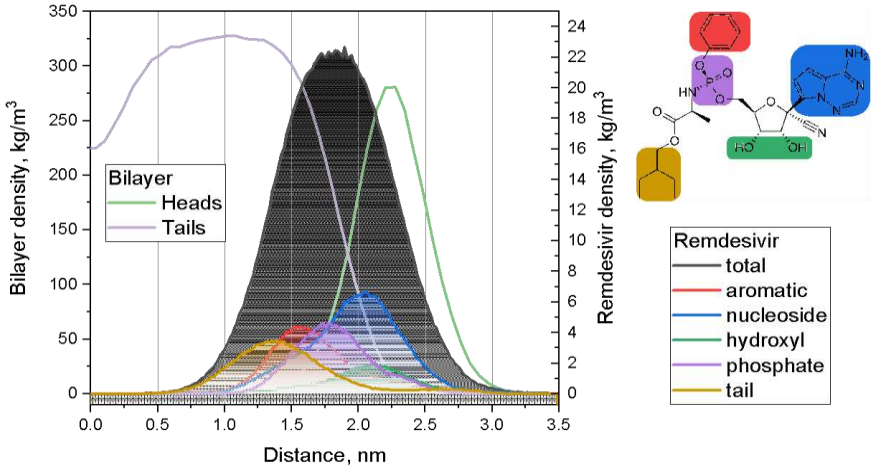
Таблиця 4.1 - Ліпідний склад модельного бішару в розрахунку на 64 ліпіди в кожному моношарі. Скорочені назви ліпідів відповідають нотації прийнятій у CHARMM GUI.

Скорочення	Хвости	Повна назва	Зовніш-ній моношар	Внут-рішній моношар
DPPC	16:0-16:0	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	9	2
PLPC	16:0-18:2	1-Palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	6	1
POPC	16:0-18:1	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	20	4
DOPC	18:1-18:1	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	10	2
SOPC	18:0-18:1	1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	8	2
SAPC	18:0-20:4	1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	5	1
POPI	16:0-18:1	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoinositol		5
SAPI	18:0-20:4	1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoinositol		7
DOPE	18:1-18:1	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine		4
SOPE	18:0-18:1	1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine		4
PLA20	18:0-20:4	Stearoyl-arachidonoyl-phosphatidylethanolamine plasmalogen		12

SAPE	18:0-20:4	1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine		6
SOPS	18:0-18:1	1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine		4
DOPS	18:1-18:1	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine		2
SAPS	18:0-20:4	1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3--phospho-L-serine		2



а



б

Рисунок 4.1 (а) Положення та орієнтація молекул ремдесивіру в модельній мембрані. Знімок траєкторії молекулярної динаміки після 200 нс. Ліпіди показані у вигляді Ван дер Ваальсових поверхонь, молекули ремдесивіру показано у вигляді кульок і паличок і підсвічені для наочності. Ліпіди, які перекривають молекули ремдесивіру, видалено. На малюнку показана центральна бішарова частина пласкої

модельної біцели, яка використовується для аналізу. (б**)** Розподіли густини голівок та хвостів ліпідів (ліва вісь) та різних хімічних груп в молекулі ремдесивіру (права вісь) колір яких відповідає кольору на схемі молекули. Показано тільки зовнішній моношар мембрани.

4.3. Висновки до розділу 4

1. Як ремдесивір так і тікагрелор спонтанно вбудовувалися у мембрану протягом перших 10-20 нс і залишалися інтеркальованим між ліпідами зовнішнього моношару мембрани протягом всієї симуляції. Не було зафіксовано натяків на агрегацію чи димеризацію лігандів під час їх латеральної дифузії. Типове положення та орієнтація молекули ремдесивіру показано на рисунок 4.1 а.
2. Видно, що гідрофільні групи ремдесивіру орієнтовано до водної фази, а гідрофобні – до центру мембрани (розподіл густини голівок та хвостів ліпідів та різних хімічних груп молекули ремдесивіру представлено на рисунку 4.1 б).
3. В цілому, ремдесивір вбудовується досить глибоко у мембрану на середній відстані ~1.7 нм від її центру. Молекули ремдесивіру сильно дифундують як латерально так і нормально під час симуляції, але вони ніколи не виходять з мембрани та не змінюють свою відносну орієнтацію.

РОЗДІЛ 5. ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ ТІКАГРЕЛОРУ ТА РЕМДЕСИВІРУ НА ДИНАМІЧНІ ПАРАМЕТРИ МЕМБРАН *IN SILICO*

5.1. Формулювання завдання

Ціль завдання – проаналізувати ліпідне оточення вбудованих молекул препаратів, проаналізувати кількісну характеристику загальної фазової впорядкованості мембрани, розрахувати криві параметру порядку послідовних С-С зв'язків ліпідних хвостів для всіх типів ліпідів, визначити вплив кривизни мембрани, порівнюючи зміни параметру порядку для одного і того ж ліганду у пласкій та викривленій мембранах.

5.2. Сортування ліпідів навколо молекул ремдесивіру та тікагрелору

Було детально проаналізовано ліпідне оточення вбудованих молекул ремдесивіру та тікагрелору. Було розраховано ліпідний склад першої координаційної сфери молекул лігандів (відстань між будь-якими атомами ліганду та ліпіда не більше 0.3 нм). Далі було розраховано відносне збагачення цього шару ліпідами кожного типу у відсотках від загально складу відповідного моно шару мембрани.

На рисунку 5.1 показано результати для пласкої мембрани, а на рисунку 5.2 - для викривленої. Видно, що зміни для різних ліпідів та різної кривизни виглядають цілком хаотично і в них немає можливості виділити якісь закономірності

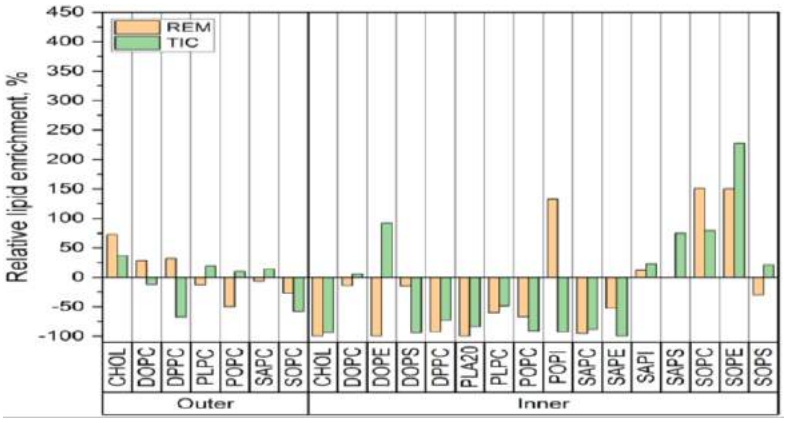


Рисунок 5.1 Збагачення ліпідами околу молекул ремдесивіру та тікагрелору у пласкій мембрані.

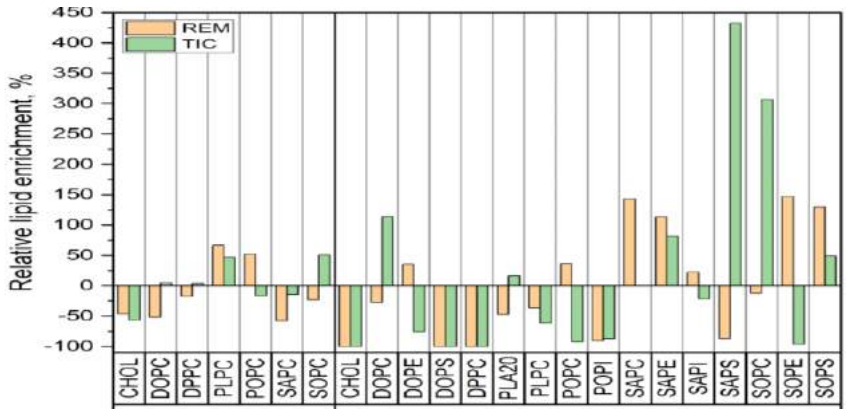


Рисунок 5.2 Збагачення ліпідами околу молекул ремдесивіру та тікагрелору у викривленій мембрані.

Наступним кроком було проаналізовано частку двогранних кутів ліпідних хвостів, що перебувають у транс-орієнтації. Ці виміри є кількісною характеристикою загальної фазової впорядкованості мембрани (рисунки 5.3-5.4).У внутрішньому моношарі, ліпіди якого контактують з лігандами лише кінцями своїх хвостів, що інтеркалюють між ліпідами зовнішнього моношару, зміни є хаотичними та різно направленими як у пласкій, так і у викривленій мембранах. Натомість, у зовнішньому моношарі, в якому безпосередньо знаходяться молекули лігандів, спостерігається більш систематична картина. Для пласкої мембрани зміна частки двогранних кутів у транс-орієнтації змінюється дуже слабко в межах 1%. Але у викривленій мембрані ці зміни більше за 2% та систематичні у бік зменшення впорядкованості для всіх типів ліпідів.

З цього можна зробити висновок що обидва ліганди дещо зменшують загальну фазову впорядкованість ліпідів безпосередньо навколо них. Ці зміни, в цілому, досить незначні, але більші у викривленій мембрані.

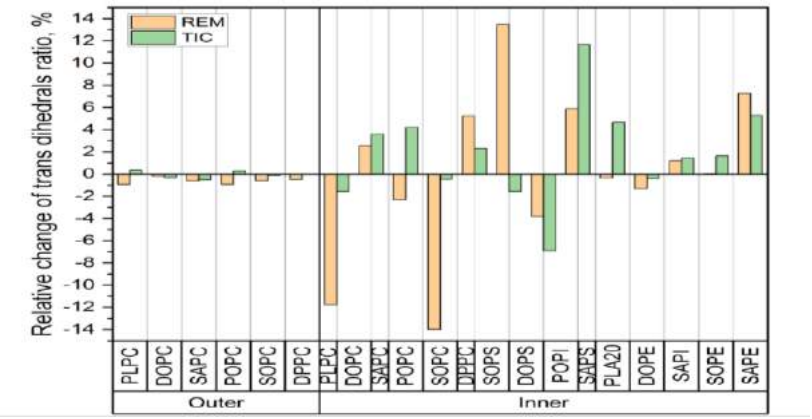


Рисунок 5.3 Зміна частки двогранних кутів ліпідних хвостів у транс-конформації в околі молекул ремдесивіру у пласкій мембрані.

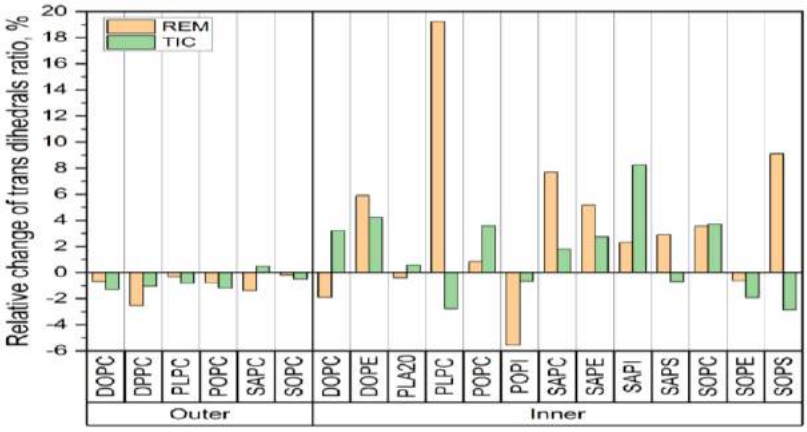


Рисунок 5.4 Зміна частки двограних кутів ліпідних хвостів у транс-конформації в околі молекул ремдесивіру у викривленій мембрані.

Для більш точного врахування змін впорядкованості та упаковки ліпідних хвостів було використано наступний метод. Для всіх типів ліпідів було розраховано криві параметру порядку послідовних С-С зв'язків ліпідних хвостів (для обох хвостів молекули окремо). Це було зроблено окремо для ліпідів з першої координаційної сфери лігандів («близькі» ліпіди, "near") та для ліпідів поза нею («далекі» ліпіди, "far") у кожному моношарі. Було розраховано різницю між отриманими кривими для кожного ліпіда кожної групи з відповідними кривими для контрольної системи без лігандів (незалежно для пласкої та викривленої систем). Різницю було представлено як відносну зміну щодо контролю усередненну по всім С-С зв`язкам обох ліпідних хвостів:

$$\Delta P_{l,m,g} = \sum_{t=1,2} \sum_{c=2}^{N_{l,t}-1} \frac{P_{c,l,t,m,g} - P^{ref}_{c,l,t,m}}{P^{ref}_{c,l,t,m}}$$

Де $P_{c,l,t,m,g}$ – параметр порядку для С-С зв'язку між атомами c-1 та c+1 у хвості номер t ліпіду типу l, що знаходиться у моношарі m та зоні g («близька» чи «далека» зона). $P^{ref}_{c,l,t,m}$- відповідний параметр порядку для контрольної системи без лігандів. $N_{l,t}$ – кількість атомів карбону у хвості номер t ліпіду типу l.

Для пласкої мембрани (рис. 5.5) спостерігається помітне зменшення параметру порядку (до 20%) для всіх типів ліпідів у близькій зоні зовнішнього моношару. Для далекої зони зовнішнього моношару навпаки помітне невелике збільшення параметру порядку для більшості типів ліпідів (до 7-8%). Зміни у далекій зоні внутрішнього моношару хаотичні. Натомість у близькій зоні внутрішнього моношару для всіх типів ліпідів спостерігається дуже сильне збільшення параметру порядку (до 60%).

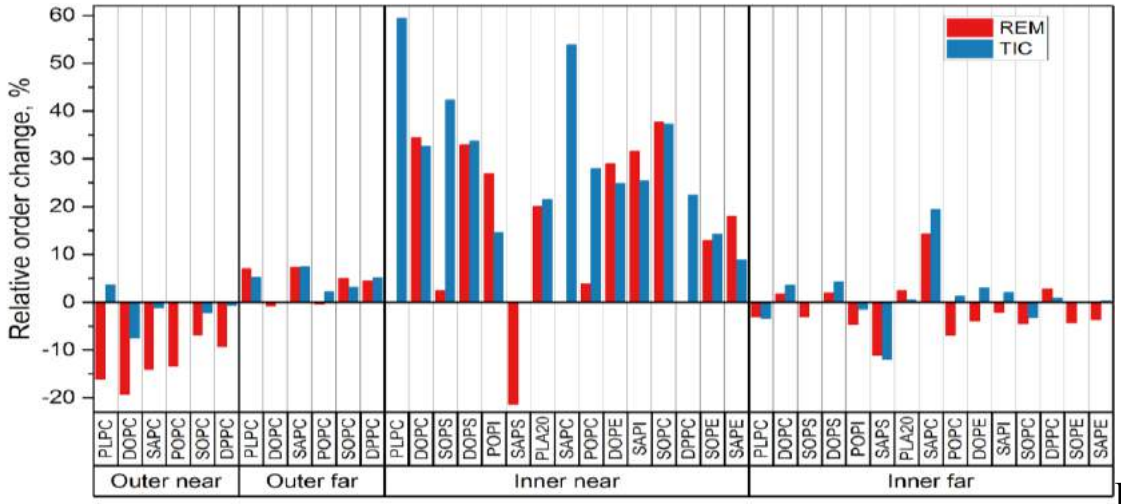


Рисунок 5.5 Відносна зміна середнього параметру порядку ліпідних хвостів в різних частинах пласкої мембрани під дією ремдесивіру та тікагрелору.

Для викривленої мембрани (рис. 5.6) картина в цілому схожа, але має суттєві відмінності. Зменшення параметру порядку у близькій зоні зовнішнього моношару значно більше (до 35%). Для далекої зони зовнішнього моношару збільшення параметру порядку для більшості типів ліпідів теж більше (до 12%). Зміни у близькій зоні внутрішнього моношару стають різно направленими для різних

лігандів. Для ремдесивіру упорядкування переважно збільшується, а для тікагрелору стає залежним від типу ліпіду.

Надалі ми визначили вплив кривизни мембрани, порівнюючи зміни параметру порядку для одного і того ж ліганду у пласкій та викривленій мембранах.

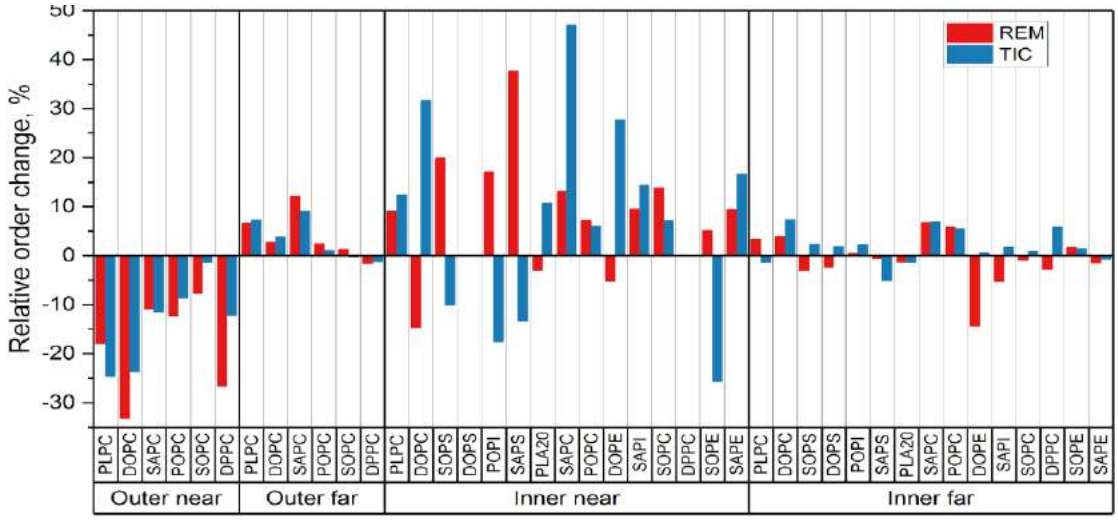


Рисунок 5.6 Відносна зміна середнього параметру порядку ліпідних хвостів в різних частинах викривленої мембрани під дією ремдесивіру та тікагрелору.

На рис. 5.7 показано результати для ремдесивіру. У близькій зоні зовнішнього моношару параметр порядку сильніше спадає зі збільшенням кривизни тільки для ліпідів DOPC та DPPC. У близькій зоні внутрішнього моношару для більшості ліпідів кривизна навпаки зменшує зміни відносно контролю чи навіть змінює їх знак.

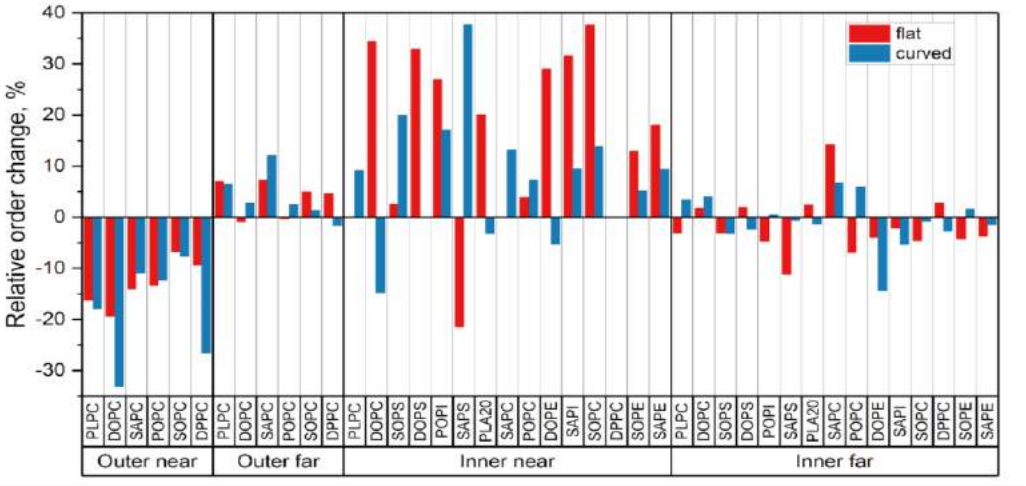


Рисунок 5.7 Відносна зміна середнього параметру порядку ліпідних хвостів під дією ремдесивіру в різних частинах пласкої та викривленої мембран.

На рис. 5.8 показано результати для тікагрелору. У близькій зоні зовнішнього моношару поведінка відмінна від тієї, що спостерігалася для ремдесивіру: параметр порядку сильніше спадає зі збільшенням кривизни для всіх ліпідів. У близькій зоні внутрішнього моношару для більшості ліпідів кривизна навпаки зменшує зміни відносно контролю чи навіть змінює їх знак так само як для ремдесивіру.

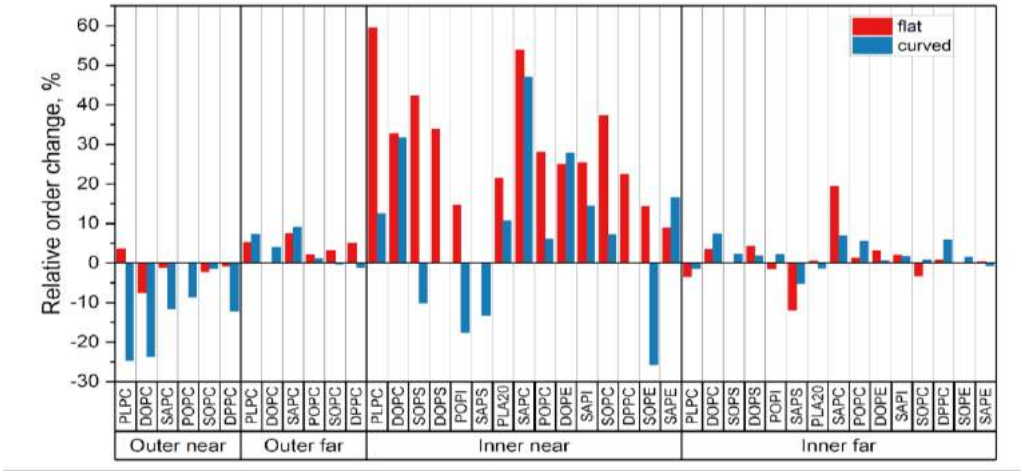


Рисунок 5.8 Відносна зміна середнього параметру порядку ліпідних хвостів під дією тікагрелору в різних частинах пласкої та викривленої мембран.

5.3. Висновки до розділу 5

З проведеного аналізу можна зробити наступні висновки:

1. Ремдесивір та тікагрелор спонтанно вбудовуються у зовнішній моношар мембрани, що має ліпідний склад близький до ендоплазматичного ретикулуму епітеліальних клітин легень.
2. Обидва ліганди *зменшують* параметр порядку ліпідних хвостів зовнішнього моношару, що безпосередньо контактують з ними. Цей ефект у пласкій мембрані більший для ремдесивіру ніж для тікагрелору. Цей ефект стає сильнішим у викривленій мембрані, особливо для тікагрелору.

3. Обидва ліганди дещо *збільшують* параметр порядку ліпідних хвостів зовнішнього моношару, що *не* контактують з ними. Цей ефект більший для ремдесивіру ніж для тікагрелору.
4. Спостерігається сильний ефект крос-шарової взаємодії: молекули лігандів, інтеркальовані у зовнішній моношар, сильно *збільшують* впорядкованість ліпідних хвостів внутрішнього моношару, що безпосередньо контактують з ними. Цей ефект стає слабшим у викривленій мембрані.

РОЗДІЛ 6. ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ ТІКАГРЕЛОРУ ТА РЕМДЕСИВІРУ НА СТРУКТУРНІ ПАРАМЕТРИ МЕМБРАН ВЕЗИКУЛ ТА СИНАПТОСОМ *IN VITRO* ЗА ДОПОМОГОЮ ІЧ СПЕКТРОСКОПІЇ

6.1. Формулювання завдання

Ціль завдання – визначити вплив препаратів на синаптосоми та на ліпідну загальну фракцію, виділену з синаптосом, а також на штучні міметики мембран різного фосфоліпідного складу методами Фур'є-перетворюючої інфрачервоної (Fourier transform infrared spectroscopy- FTIR) спектроскопії в моді на пропускання та порушеного повного внутрішнього відбивання (FTIR-ATR- attenuated total reflection).

6.2. Характеристика використаних препаратів

6.2.1. Характеризація ремдесивіру

В дослідженнях використовували ремдесивір фірми InvivoGen (США). Препарат є нуклеозидним аналогом з радикалом у 5’- положенні пентози (рис. 6.1)

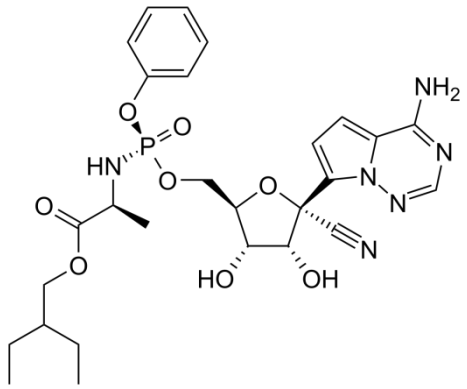
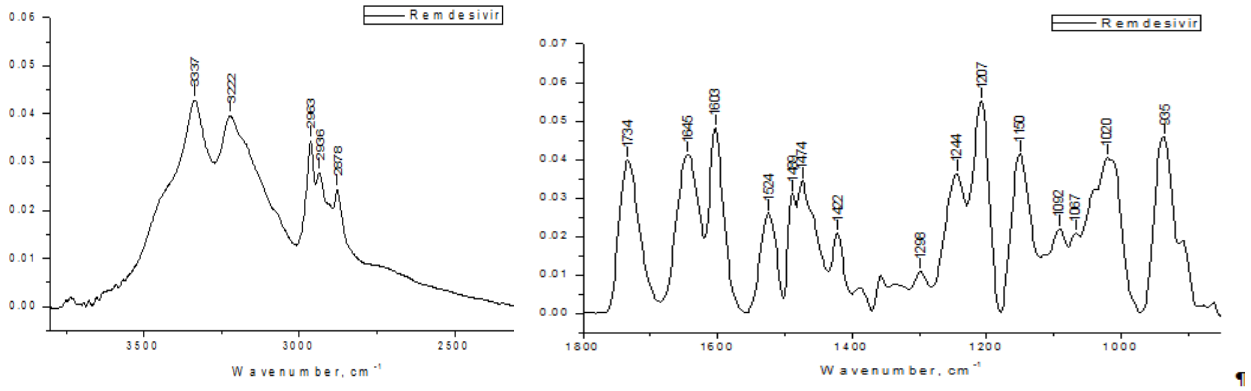


Рисунок 6.1 Структурна формула ремдесивіру.

Спочатку нами були зареєстровані та проаналізовані ІЧ (Рис. 6.2) та Раман (Рисунок 6.2, Таблиця 6.1) спектри порошку ремдесивіру. Цей препарат практично нерозчинний у воді, максимально можлива концентрація ремдесивіру у воді складає 0,028 мг/мл, краще розчинний у ДМСО (диметил сульфоксид) Для біологічних

експериментів використовується розчин ремдесивіру у ДМСО. Однак для реєстрації ІЧ спектрів цей розчинник використовувати не можна, оскільки ДМСО має смуги поглинання, що перекриваються з важливими для спектрального аналізу областями поглинання Амід I, Амід II, та поглинання фосфатних груп ліпідів та нуклеїнових кислот. З клітин було видалено потрійним центрифугуванням.



а б

Рисунок 6.2. FTIR спектр ремдесивіру на приставці ППВВ в областях (а) 3800-2400 $см^{-1}$ та (б) 1800-800 $см^{-1}$

Оскільки ремдесивір структурно подібний до аденіну, ми зробили порівняльний аналіз смуг поглинання аденіну та ремдесивіру, що представлено в таблиці 6.1.

Таблиця 6.1 - Положення смуг в ІЧ спектр ремдесивіру у порівнянні з аденіном та віднесення коливань.

Аденін, $см^{-1}$	Ремдесивір, $см^{-1}$	[67, 68]
938	950	N-C=N валентні
1018	1007	C-N-C, C- O валентні
1122	1076	C-PO_2-, C-O рибози . C-N=C
	1137	C-OH
1155	1147, 1173	C-O валентні, CH деф
	1193	Рибоза

1248	1222, 1241, 1263	вал. асим. PO_2-
	1276, 1282, 1293	N-H_2
1305, 1329	1301,1320	кільце пурину
1363, 1415	1408, 1420	CH_3 деформаційні
1447 1457 1466	1436, 1499	CH_2 деформаційні
1506		деф коливання кільця
	1521	C=N, C=C
1597	1638	N-H, C=N, кільце adenine
1664		вал.C=C, C=O, деф. N-H
2768		обертон пурину
2933		валентні CH_2
3064		кільцеві CH_2
3280		валентні NH
3354, 3397		валентні OH

Для подальших досліджень взаємодії ремдесивіру з досліджуваними об'єктами було обрано концентрації, що наближено відповідають концентраціям, використовуваним у реальній медичній практиці [69], а саме 0.028 мг/мл.

6.2.2 Характеризація тікагрелору

Тікагрелор - це тромболітичний препарат, що є похідним нуклеозидних аналогів. Його структурна формула представлена на рис. 6.3.

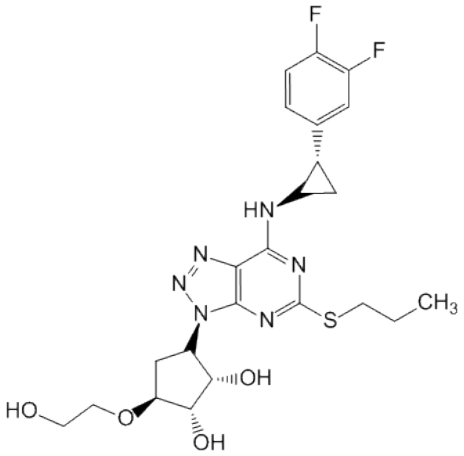


Рисунок 6.3 Структурна формула тікагрелору

Тікагрелор теж погано розчинний у воді, як і ремдесивір, тому ми випробували кілька різних розчинників для того, щоб обрати оптимальні умови експерименту. Спочатку були зареєстровані та проаналізовані ІЧ спектри порошку тікагрелору, частково розчиненого в спирті (рис. 6.4).

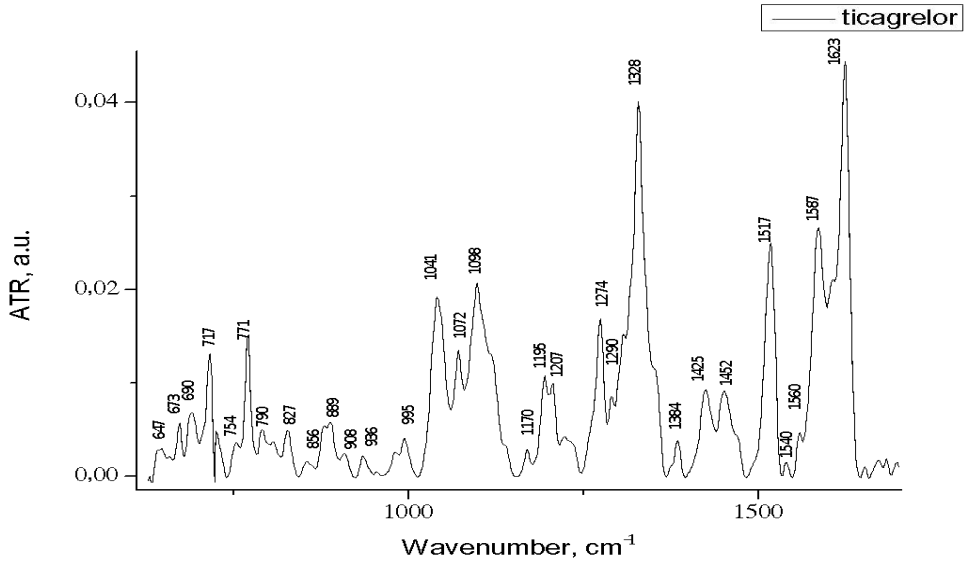


Рисунок 6.4 FTIR-ATR Спектр порошку тікагрелору

Для подальших досліджень взаємодії тікагрелору з досліджуваними об'єктами було обрано концентрації, що наближено відповідають концентраціям, використовуваним у реальній медичній практиці. Тікагрелор та його метаболіт AR-C124910 проявили бактерицидну активність проти всіх досліджуваних грампозитивних штамів, включаючи GISA, MRSE, MRSA і VRE. Мінімальні

бактерицидні концентрації становили 20 мкг/мл проти MSSA, GISA, MRSA і VRE; 30 мкг/мл проти MRSE; 40 мкг/мл проти *E. faecalis* і *S. agalactiae*. Водночас тікагрелор не продемонстрував бактерицидної активності проти грамнегативних штамів [70]. Нами було запропоновано використовувати в різних експериментах концентрації в межах 2- 200 мкг/мл.

6.3. FTIR спектральні дослідження впливу ремдесивіру та тікагрелору на синаптосоми

ІЧ спектри поглинання синаптосом мають характерний для клітин вигляд, за виключенням області СН валентних коливань- 2700-3000 $см^{-1}$ та смуги 1740 $см^{-1}$. Ці смуги значно інтенсивніше ніж зазвичай в клітинах. В області 3800-3000 $см^{-1}$ основний внесок в поглинання дає сумарна білкова фракція з максимумом в області 3291 $см^{-1}$, що відносимо до водневозв'язаних NH – (Амід А). Ця смуга не є конформаційно чутливою, однак є чутливою до довжини та енергії водневих зав'язків та зсувається в високочастотну область при їх ослабленні. Смуга Амід В на 3067 $см^{-1}$ також є результатом поглинання валентних NH молекулярних груп білка з характерним проявом Фермі-резонансу між валентними NH та першим обертоном смуги Амід II.

Смугу на 3012 $см^{-1}$ можемо віднести до кільцевих СН фосфоліпідів, білків та ДНК з переважним внеском від білка. В спектрі присутні досить інтенсивні характеристичні смуги валентних коливань CH_2 (2920, 2850 $см^{-1}$), CH_3 (2956, 2886 $см^{-1}$) молекулярних груп, що в основному відносяться до ліпідної фракції. Добре відрізнити внески компонент клітини можна за рахунок КАРС спектроскопії- ДНК дає внесок на 2954 $см^{-1}$, ліпіди на 2850 $см^{-1}$ а білки 2910 $см^{-1}$, нерезонансний фон- 2970 $см^{-1}$. Це нами було зроблено окремо в роботі з КАРС молекули ДНК та в додаткових експериментах з КАРС спектроскопії в Датьскому технічному університеті і використано при віднесенні коливань синаптосом [115].

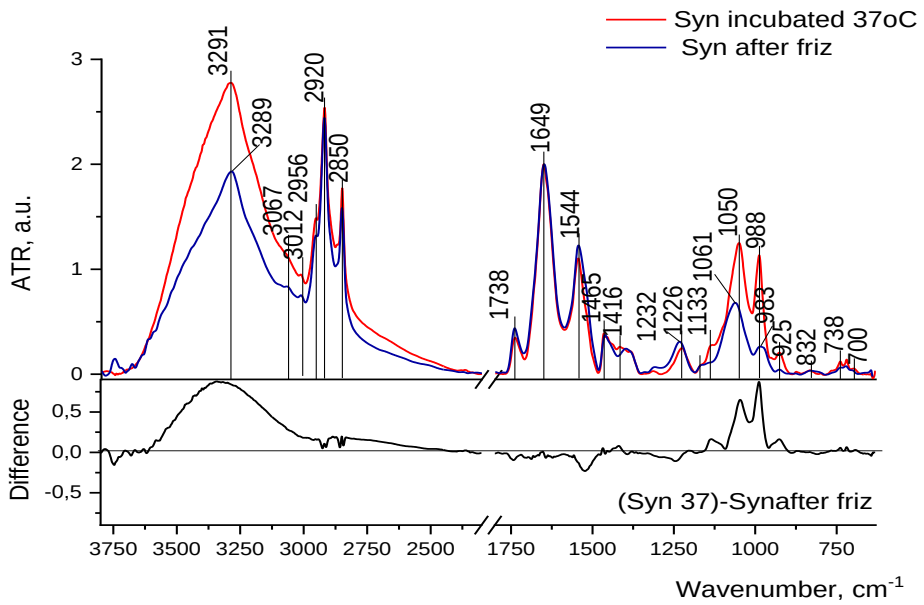


Рисунок 6.5 FTIR-ATR спектри щойно видалених синаптосом, які попередньо інкубували протягом 5 хв на водяній бані при 37°C для активації (верхня крива) та спектри синаптосом, що зберігались при -21°C 9 нижня крива).

Спочатку було визначено спектроскопічні маркери синаптосом, що зберігають функціональну активність, та таких, що втратили активність [112, 113]. Для цього ми зареєстрували FTIR-ATR спектри щойно видалених синаптосом, які попередньо інкубували протягом 5 хв на водяній бані при 37°C для активації (рис. 6.5). Для порівняння було взято синаптосоми, що зберігались при -21°C. Було встановлено наступні спектральні маркери функціонально активних та інертних синаптосом:

1) Наявність асиметрії смуги Амід А (3291 $см^{-1}$) за рахунок плеча в області 3400 $см^{-1}$, що відповідає воднево пов`язаним ОН молекулярним групам. спостерігається в активних синаптосомах. В неактивних - смуга Амід А симетрична, вклад високочастотного плеча ОН менший або відсутній.
2) Інтенсивність смуг валентних СН коливань в області 3000-2800 $см^{-1}$ менша або порівняна з смугою Амід А. В неактивних синаптосомах інтенсивність цих коливань перевищує Амід А.

3) Положення смуги асиметричних коливань PO_2- знаходиться в області 1226 $см^{-1}$, що відповідає певному конформаційному стану фосфатних груп ліпідів та ДНК. В неактивних – ця смуга зсунута у високочастотну область на 6 $см^{-1}$ до 1232 $см^{-1}$
4) Смуга С-О в області 988 $см^{-1}$ порівняна за інтенсивністю зі смугою симетричних коливань PO_2-. В неактивних С-О виступає як плече.

Всі ці особливості мають в своїй основі зміни у водневому зв'язуванні. А саме, в інертних синаптосомах спектри вказують на посилення водневого зв'язування та зменшення вкладу слабких водневих зв'язків, що дає змогу зробити висновок про утворення більш щільної упаковки в структурі [113].

В області поглинання Амід I (1649 $см^{-1}$) та Амід II (1544 $см^{-1}$) практично немає змін, хоча можна зафіксувати незначні їх розбіжності на 0,5 $см^{-1}$. Було зареєстровано також зростання інтенсивності на 1740 $см^{-1}$ у неактивних синаптосом і зсув на 2 $см^{-1}$ з 1738 $см^{-1}$ до 1740 $см^{-1}$ для водневоповязаного С=О в карбоксильній групі, що може бути зумовлено вкладом С=О фосфоліпідів. Звичайно поведінка фосфатів може бути пов'язана з неоднаковою кількістю води в зразках- у зразку взятому з морозильника кількість води значно менша ніж у активної синаптосоми.

Суспензію синаптосом у фосфатному буфері розділили на дві проби, до однієї додали ремдесивір з розрахунку 0,028 мг/мл концентрації ремдесивіру. Нанесли на підложки CaF_2 та висушили при 25°С. Спектри представлені на рис. 6.6 В зразках синаптосом було зареєстровано смугу 1053 $см^{-1}$ і плече на 989 $см^{-1}$. Вклад в цю смугу дають в основному ліпіди (їх фосфатні групи) а також нуклеїнові кислоти, та ін. молекули, що мають групу PO_2^-. Основні спектральні зміни, зумовлені впливом ремдесивіру, фіксуються в області поглинання молекулярних груп PO_2^- та ОН. В області валентних коливань СН – фіксуємо незначне зростання вкладу, пов'язане зі зростанням вкладу ОН, в деформаційних СН (1466, 1398 $см^{-1}$) – зміни відсутні [119].

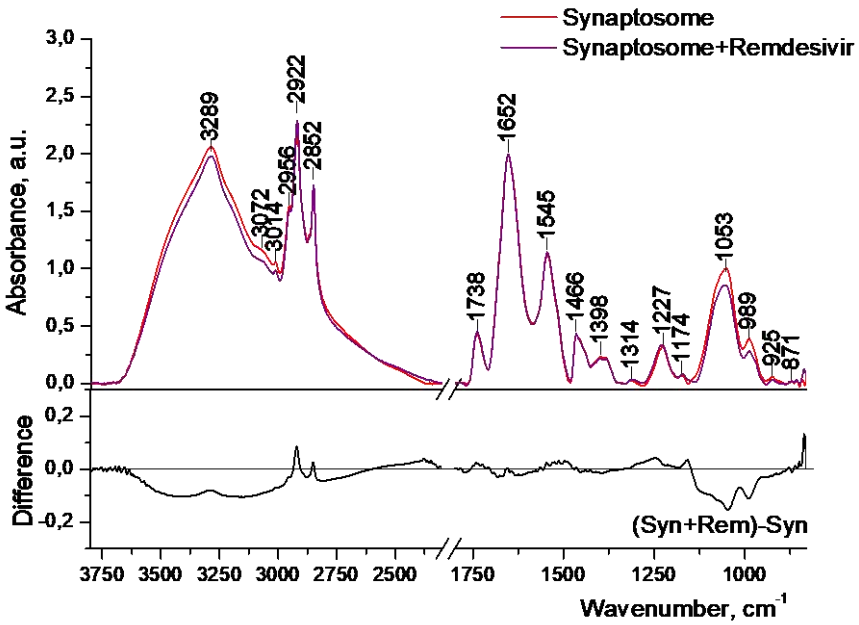


Рисунок 6.6 FTIR-спектри щойно виділених синаптосом, які були нанесені на підложки CaF_2 та висушені при 25°C. FTIR-спектри синаптосом з ремдесивіром, зразки приготовлені аналогічно .

Спектри синаптосом мають характерний для клітин вигляд, а саме фіксуємо смуги Амід А на 3292 $см^{-1}$, Амід І на 1650 $см^{-1}$ та Амід ІІ на 1543 $см^{-1}$. Характерною є також область валентних коливань СН 2855, 2922, 2871, 2852 $см^{-1}$. При взаємодії з тікагрелором (рис. 6.7) в цих областях не зафіксовано частотних зсувів та перерозподілу вкладів смуг поглинання.

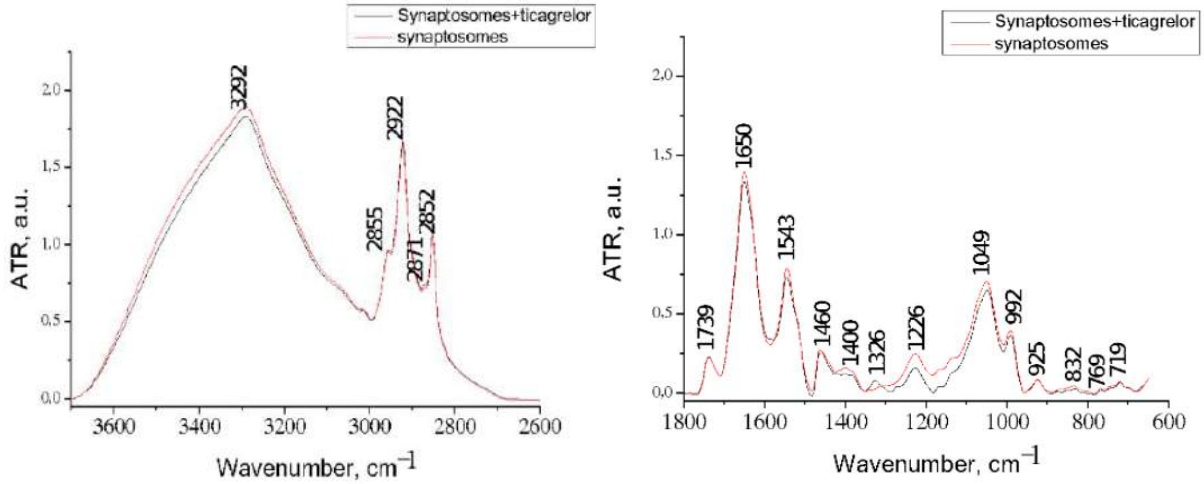


Рисунок 6.7 FTIR-ATR спектри щойно видалених синаптосом, які попередньо інкубували з тікагрелором протягом 15 хв.

Основна спектральна особливістю, що є наслідком дії тікагрелору – це зменшення інтенсивності смуги PO_2^- на 1226 см$^{-1}$ без зміни її положення. Вклад в поглинання в цій області в основному дають саме фосфоліпіди мембрани, а також нуклеїнові кислоти. Інша особливість - поява смуги на 1326 см$^{-1}$, що можна з високою ймовірністю віднести до тікагрелору [119]. Смуга в області 1328 см$^{-1}$ є однією з самих інтенсивних в спектрі порошку тікагрелору, до того ж вона відсутня в контрольному зразку синаптосом (без дії препарату).

6.4. Вплив ремдесивіру на загальну ліпідну фракцію, виділену з синаптосом

Фосфоліпіди- загальна фракція була виділена з синаптосом та спектри були зареєстровані та проаналізовані. Більшість маркерних смуг фосфоліпідів практично не змінили своє положення, але дещо зменшили свою інтенсивність, що може свідчити про їх взаємодії з оточенням.

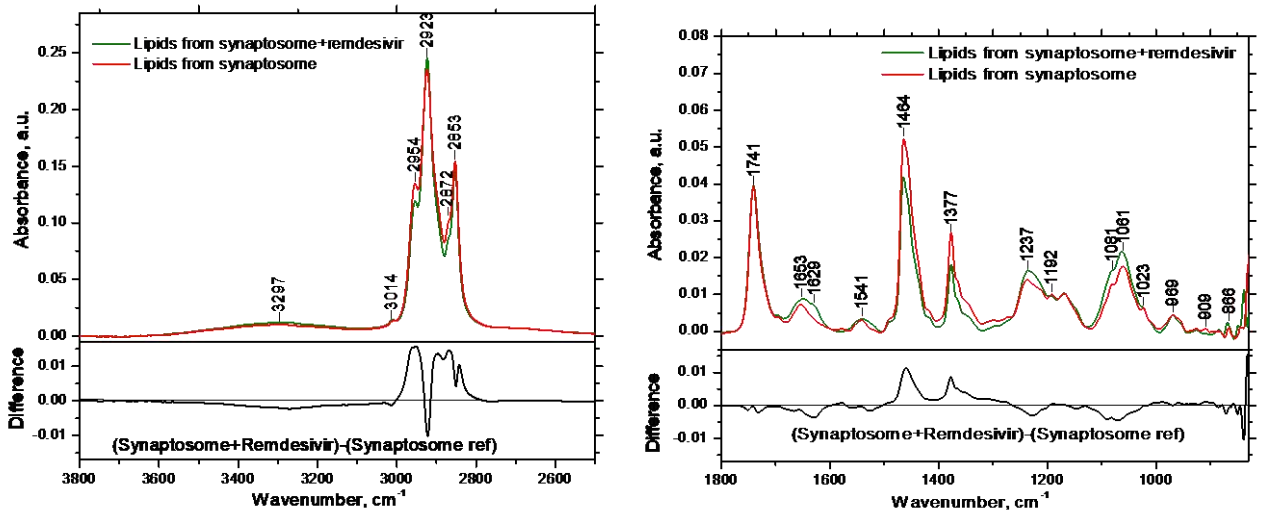


Рисунок 6.8 Спектри FTIR сумарної фракції ліпідів, виділених із синаптосом до (червона лінія) та після (чорна лінія) інкубації з ремдесивіром, отримані в межах 3800-2500 см$^{-1}$ (a) та 1800-1000 см$^{-1}$(b).

Збільшилась інтенсивність в області поглинання молекулярних груп PO_2- (фосфодіефірні зв'язки), що свідчить про посилення водневого зв'язування, але положення практично не змінилось, що підтверджує незначні зміни, індуковані перерозподілом водневих зв'язків. Перерозподіл інтенсивностей смуг валентних CH_2 та CH_3 коливань відрізняється від того що був у синаптосомах, так коливання 2923 $см^{-1}$ (асиметричне CH_2) інтенсивніше в синаптосомах з ремдизивіром, а всі інші інтенсивніші в контрольному зразку. Це може бути як результатом того, що частина молекули ремдизивіру залишилась в мембрані, або приєдналась ковалентно до якоїсь з молекул ліпідної фракції, або при інтерпретації спектральних змін в синаптосомах ми не врахували вагомий внесок валентних коливань від ДНК мітохондрій після інкубації з ремдесивіром.

6.5. Визначення впливу ремдесивіру на мембранні міметики (ліпосоми) методом ІЧ спектроскопії.

Як модельну ліпідну систему для дослідження взаємодій противірусного препарату з клітинними мембранами у нашому дослідженні було обрано малі уніламелярні везикули (від. англ. Small unilamellar vesicles, SUV), які можна отримати за допомогою як традиційних методів так і методу, розробленому у відділі [114,118]. Ці системи були отримані за допомогою обробки суспензії ліпідів за наступним протоколом:

1. Ліпіди дипальмітоїлфосфатидилхолін, сфінгомієлін, холестерол у пропорції 1:1:0,7 відповідно, були розчинені в хлороформі і висушені до утворення ліпідних плівок.
2. Потім з отриманих плівок готувалась суспензія у фосфатному буфері (pH 7,5) концентрацією 4 мМ. Результатом відшарування ліпідів від поверхні є утворення мультиламелярних везикул, утворення яких можна ідентифікувати за помутнінням розчину .

3. Після цього суспензії оброблялись ультразвуком за допомогою ультразвукового диспергатора. Після обробки ультразвуком суміш заморожували рідким азотом з наступною поступовою розморозкою при кімнатній температурі.
4. Таким чином було проведено 5 циклів. Під час процесу озвучування розчин ставав практично прозорим та набував опалесцентного забарвлення, що свідчило про утворення малих моноламелярних везикул.

В кожному експерименті за допомогою описаного вище методу готувалось по три зразки: перший - контрольний зразок чистих везикул, другий - зразок з вбудованим в мембрану ремдесивіром, тобто ремдесивір вносився у момент розчинення суміші ліпідів в фосфатному буфері і модельні ліпосоми готувались безпосередньо з препаратом. Третім готувався зразок чистих ліпосом, після отримання яких додавали ремдесивір і вже готові везикули інкубувались з препаратом протягом кількох годин. Таким способом отримали зразок з осадженим на поверхню мембрани препаратом.

ІЧ спектри (рис. 6.9) мають характерний для ліпідної фракції вигляд

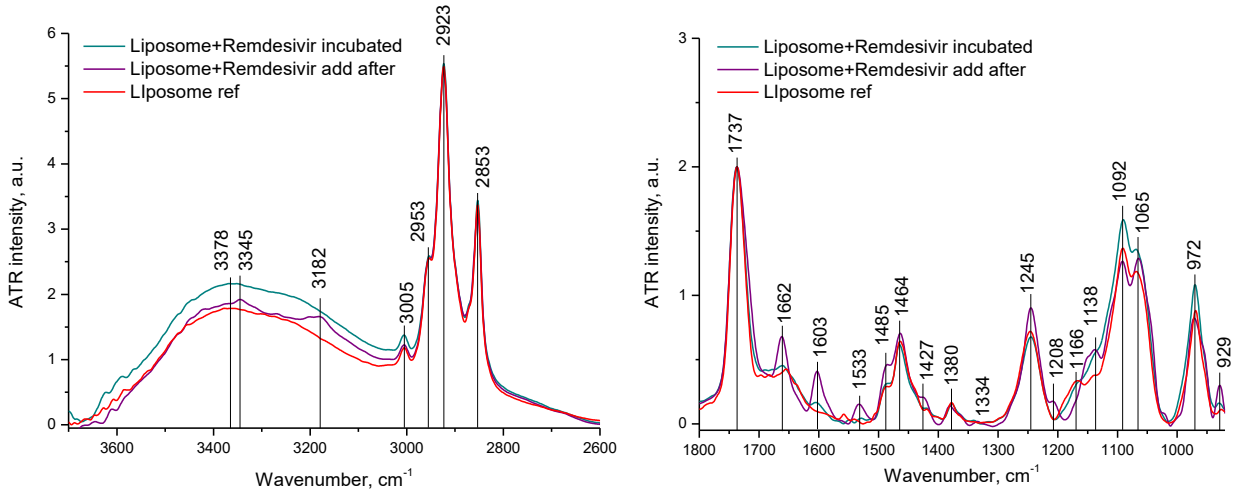


Рисунок 6.9 ІЧ спектри модельних ліпосом *DOPC+ CL+ CHOL*

Іншою модельною системою були трикомпонентні малі уніламелірні ліпосоми, що в своєму складі мали DOPC, SM, CHOL.

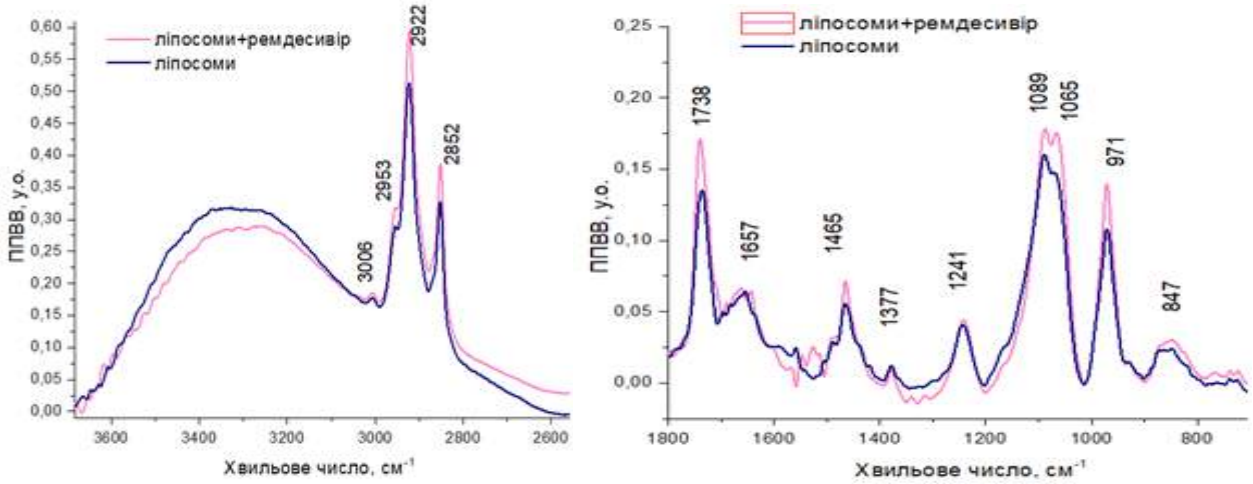


Рисунок 6.10 ІЧ Спектри модельних ліпосом DOPC+SM+CHOL

На спектрі (рис. 6.10) ми спостерігаємо класичні для фосфоліпідів смуги фосфатів на частотах 972 $см^{-1}$, симетричні валентні коливання фосфату I на частоті 1092 $см^{-1}$, асиметричні валентні коливання на частоті 1245 $см^{-1}$, що належить фосфату II , також на спектрах спостерігаємо коливання CH_2 на частотах 2923 $см^{-1}$, 2853 $см^{-1}$, 1464 $см^{-1}$ що відносимо до мембранних ліпідів, C=C коливання знаходяться на смугах 1533 $см^{-1}$, 1603 $см^{-1}$, 1662 $см^{-1}$ також вказують на ліпідну фракцію мембран, окрім цього пік на частоті 2953 $см^{-1}$ свідчить про наявність CH_3 коливань, що належать ланцюгам фосфоліпідів, а пік на частоті 2853 $см^{-1}$ належить симетричним коливанням CH_2 метиленової групи ланцюгів фосфоліпідів.

Таблиця 6.2 - Віднесення коливань мембранних міметиків (ліпосом) різного складу

DOPC+ CL+ CHOL	***DOPC+ SM+ CHOL***	**Віднесення коливань**
3378		O-H валентні
3345		O-H валентні
3182		N-H валентні
3005	3006	C-H кільцеві [71]
2953	2953	CH3 асиметричні
2923	2922	CH2 валентні асиметричні

2853	2852	CH_2 ліпідів симетричні CH_2 метиленових хвостів [72]
1737	1738	C=O валентні[73]
1662	1657	валентні (C=C) cis ліпіди, жирні кислоти
1603		C=O валентні (ліпіди)
1533		C=N, C=C валентні
1485		C-H_2 деформаційні
1464	1465	CH_2 ацильних ланцюгів ліпідів [72]
1427		CH2 деформаційні
1380	1380	CH_3; деформаційні C-H та N-H коливання [73]
1334		CH3 деформаційні
1245	1241	асим. PO_2^- (Фосфат II)
1208		PO2 асиметричні (фосфат 2)
1166		валентні (CC), деформаційні(COH), валентні (CO) C-OH
1138		C-OH
1092	1089	сим. PO_2^- (Фосфат I)
1065		
972	971	PO_4 [72]
929		

6.6. Висновки до розділу 6

1. Вплив ремдесивіру на синаптосоми може бути описаний в термінах вбудовування в мембрану при взаємодії з активними синаптосомами, при чому вплив відбувається на фосфатні групи та водневі зв'язки. У випадку неактивних стнаптосом взаємодія з ремдесивіром йде по різних компонентах, які вже не

утворюють функціонуючу клітину і спектральні зміни більші. Запропоновано оцінювати вплив ремдесивіру на синаптосоми за площею під спектральною огинаючою в діапазоні 3800-600 $см^{-1}$ за її різницевими даними.

2. Загальна фракція ліпідів, виділених з синаптосом, що були попередньо інкубовані з ремдезивіром показала аналогічні спектральні особливості, що і синаптосоми, а саме вплив на область водневих зв'язків та фосфатні групи, за винятком області СН валентних коливань. Це потребує додаткових досліджень мітохондрій та інших компонент синаптосом.
3. Зміни у спектрах модельної трьохкомпонентної системи ліпідів під впливом ремлесивіра практично подібні до тих, що ми бачили в синаптосомах, що говорить про реалістичне моделювання ліпідної фракції.
4. За спектроскопічними ознаками тікагрелор більше змінює стан синаптосом та її мембрани. Причиною можуть бути різні кількості препаратів у цих випадках, хоча ми виходимо з однакових. Розчинність цих препаратів різна і це може бути фактором, який важко врахувати в експерименті у випадку практично нерозчинного ремдезивіру.
5. Для функціонально активних синаптосом при взаємодії з тікагрелором можемо стверджувати про зміну водневого зв'язування в водневоповязаних групах і у фосфатних групах. Характер спектральних змін полягає як у частотних зсувах, так у зміні вкладів смуг по інтенсивності.
6. Вперше проаналізовані ІЧ спектри препаратів- ремдезивіра та тікагрелора, що є нуклеозидними аналогами та мають цілу низку коливальних смуг, які близькі за положенням та віднесенням.

РОЗДІЛ 7. ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ ТІКАГРЕЛОРУ ТА РЕМДЕСИВІРУ НА СТРУКТУРНІ ПАРАМЕТРИ МЕМБРАН ВЕЗИКУЛ ТА СИНАПТОСОМ *IN VITRO* ЗА ДОПОМОГОЮ РАМАН СПЕКТРОСКОПІЇ

7.1. Формулювання завдання

Ціль завдання – визначити вплив препаратів на синаптосоми та на штучні міметики мембран різного складу методами Раманівської спектроскопії.

7.2. Аналіз Раман спектрів ремдесивіру та тікагрелору

Вимірювання спектрів комбінаційного розсіювання проводились для порошку ремдесивіру, розчинів ремдесивіру в етанолі та в розчиннику ДМСО. На рис. 7.1 представлено спектри комбінаційного розсіювання порошку ремдесивіру, одержані на спектрометрі miniRamanPro фірми Lightnowo, а на рис. 7.2 спектр, записаний на раманівському мікроскопі.

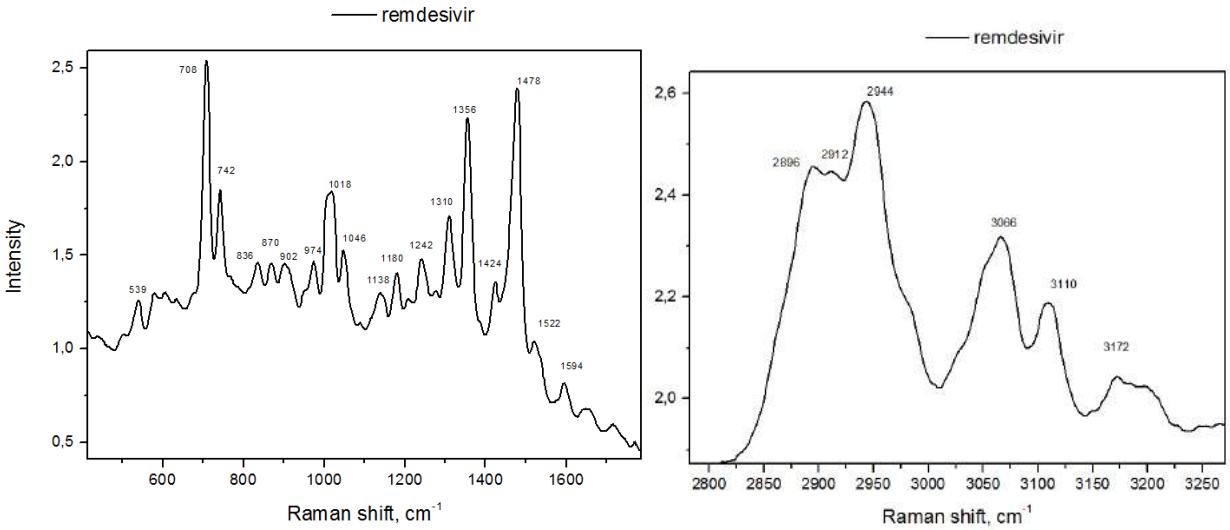


Рисунок 7.1 Спектри комбінаційного розсіювання порошку ремдесивіру записані на приладі miniRamanPro.

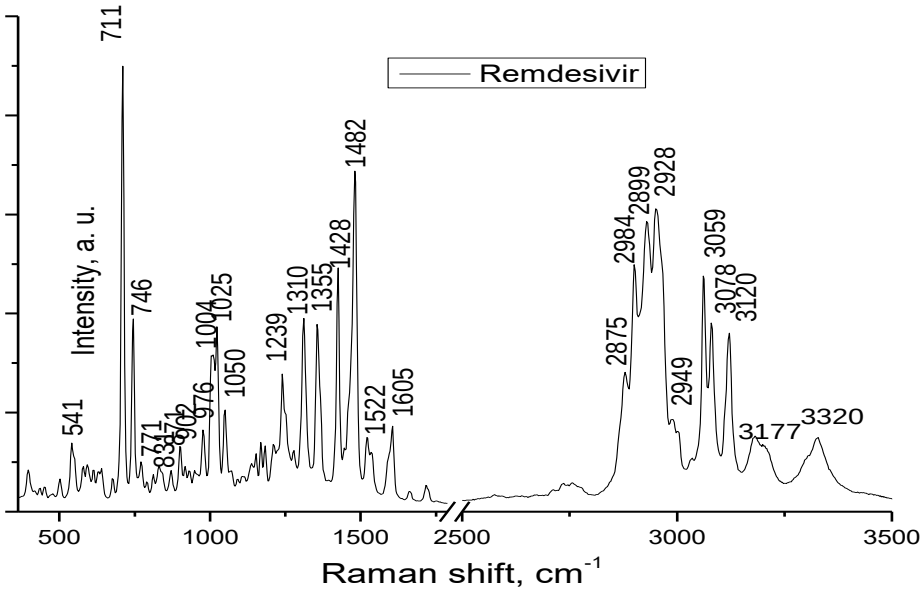


Рисунок 7.2 Спектри комбінаційного розсіювання порошку ремдесивіру отриманому на раманівському мікроскопі.

Міні-Раман може бути використаний для експрес-аналізу якості порошків високовартісних ліків з високою ефективністю.

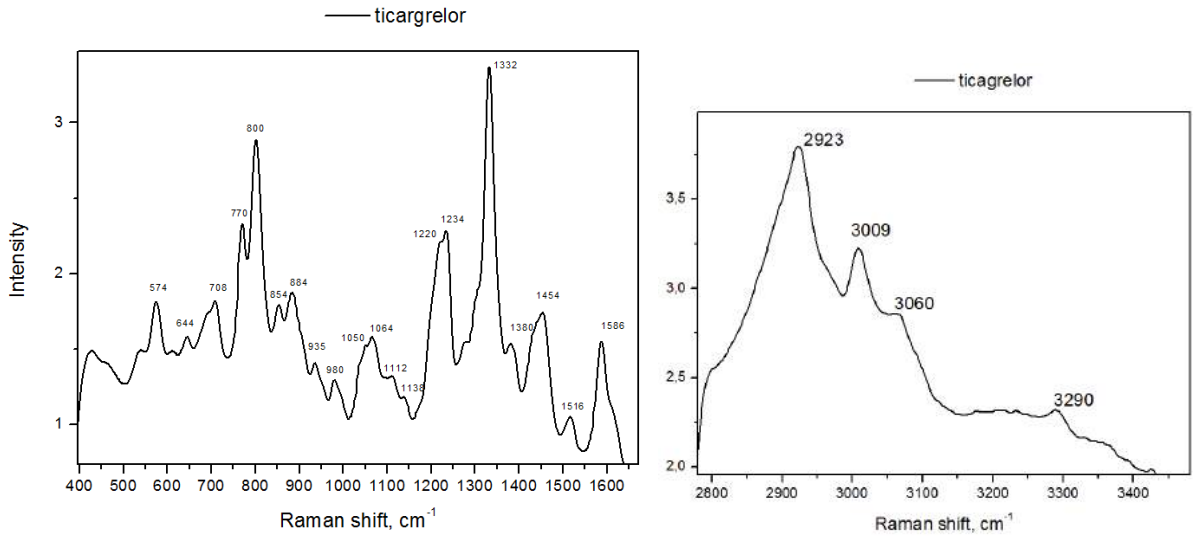


Рисунок 7.3 Спектри комбінаційного розсіювання порошку тікагрілору записані на приладі miniRamanPro.

Окрім препаратів у вигляді порошків готувались зразки ремдесивіру 2 типів: розчинені в етанолі та розчинені в органічному розчиннику ДМСО. Оскільки препарат практично нерозчинний у воді, згідно протоколів лікування і протоколів досліджень лікарський препарат прийнято розчиняти в ДМСО. Оскільки останній не

є зовсім інертним розчинником, то проводилось також окреме дослідження саме ДМСО, для відокремлення внесків ремдесивіру і ДМСО. З цією ж метою було проведено дослідження ремдесивіру у вигляді розчину в етиловому спирті. Оскільки ремдесивір проявляє більшу розчинність в етаноловому спирті ніж у воді і, окрім цього, розбавлені спиртові розчини не є агресивними до біологічних об'єктів.

Раман спектри розчину ремдесивіру в етанолі представлено на рис. 7.4. Виміри проводились на раманівському мікроскопі, що описаний вище. На рис. 40. представлено спектр комбінаційного розсіювання ремдесивіру в області 1100-3200 $см^{-1}$.

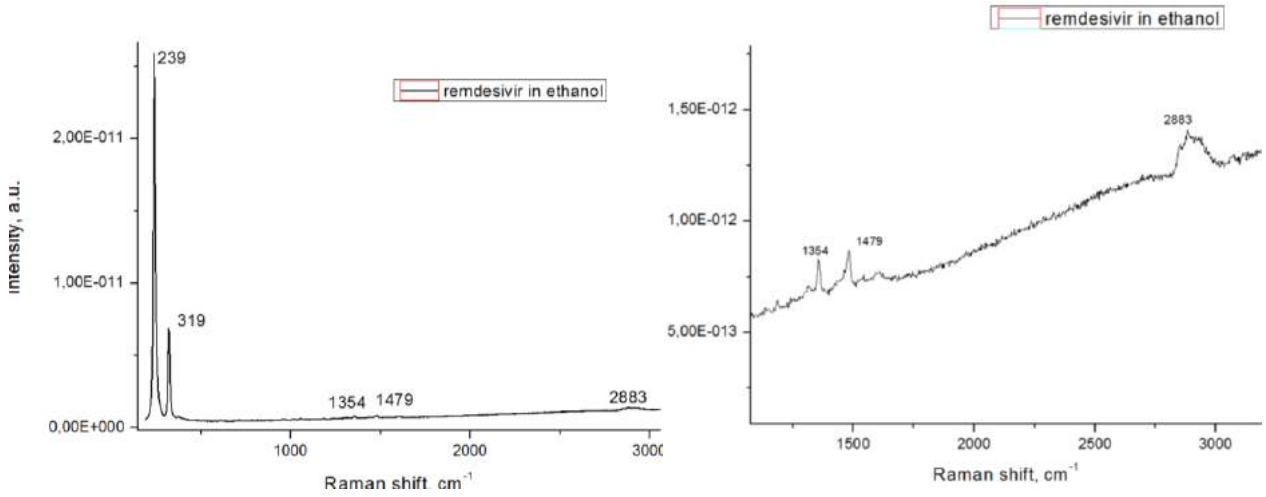


Рисунок 7.4 Спектри комбінаційного розсіяння ремдесивіру в етанолі та нанесені на підкладинку з CaF_2

Вимірювались спектри комбінаційного розсіювання ремдесивіру в розчиннику ДМСО. Результати представлено на рис. 7.5 і в таблиці 7.1

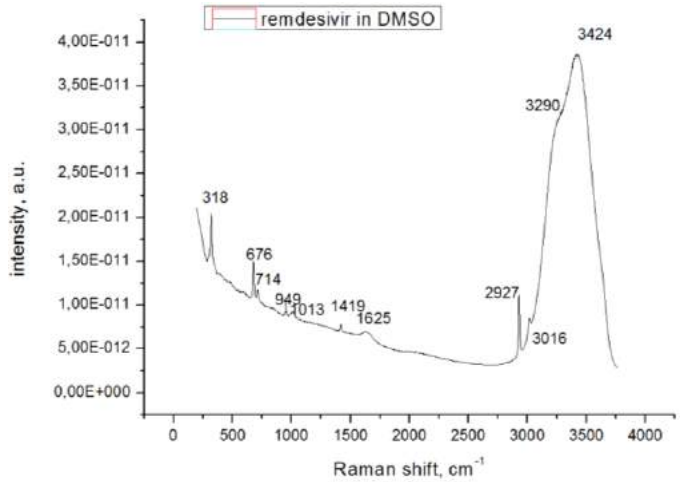


Рисунок 7.5 Спектр комбінаційного розсіювання ремдесивіру в розчиннику ДМСО

Таблиця 7.1 - Коливальні моди ремдесивіру в ДМСО, чистого ДМСО та їх віднесення

Ремдесивір		ДМСО	Віднесення коливань [74]
318		305,382	C-S-C симетричні
		332	C-S-C антисиметричні
676	Ring in the DNA bases	670	C-S симетричні
714	Adenine	699	C-S, антисиметричні
949		952	CH3 деф.
1013		1041	S=O
		1310	C-H симетрична деф.
1419	C=C,Adenine	1419	CH3 вироджена деф.
1625			
		2806	2ν4
2927	sym. CH3	2914	C-H сим. розтягування
3016			
3290			
3424	OH		

На рис. 7.6 представлено Раман спектр ДМСО, що співпадає з довідковими даними. Ці дані дозволили відокремити смуги розчинника від смуг препарату, і переконатись у їх відсутності у очищених препаратах синаптосом.

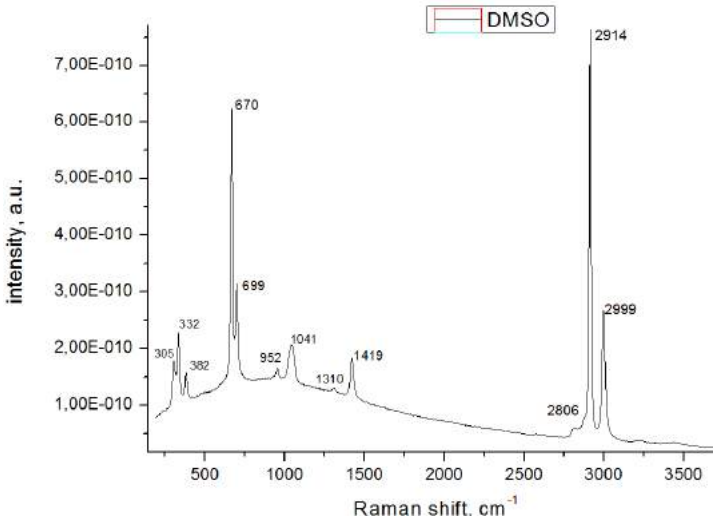


Рисунок 7.6 Спектр комбінаційного розсіювання ДМСО. [74].

7.3. Аналіз Раман спектрів активних і неактивних синаптосом до та після дії ремдесивіру

Проводились два типи дослідження: дослідження активних і неактивних синаптосом, інкубованих на водяній бані протягом 5 хв при 37 °С, а також синаптосом, інкубованих з ремдесивіром [111, 112]. Результати представлені на рис. 7.7, 7.8 і представлені у таблиці 7.2 .

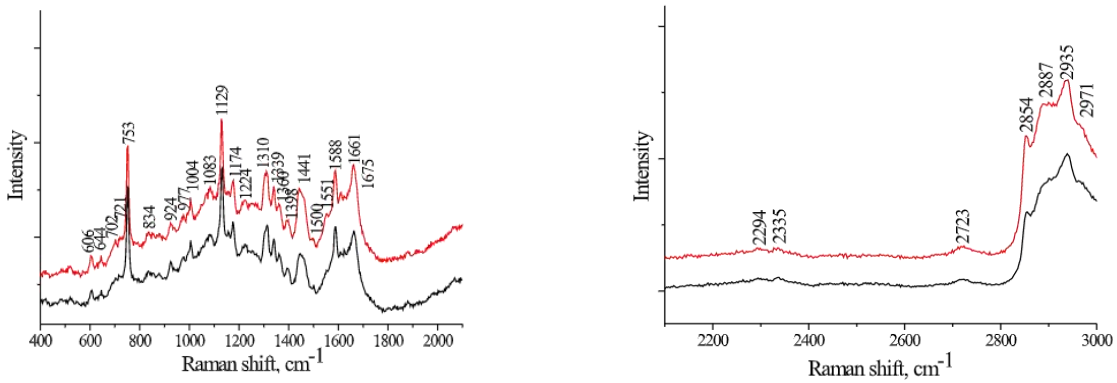


Рисунок 7.7 Раман спектр функціонально активних синаптосом . Чорна крива- синаптосоми, червона крива- синаптосоми, інкубовані з ремдесивіром.

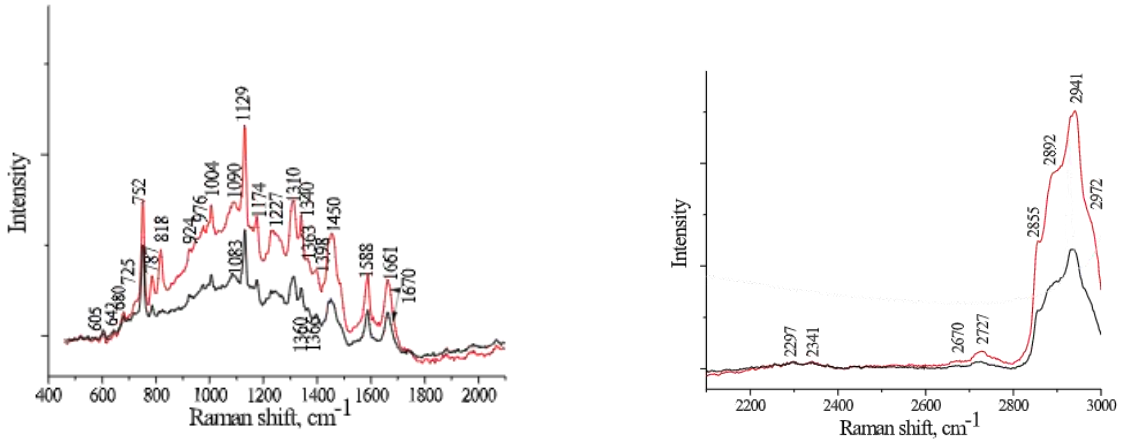


Рисунок 7.8 Раман спектр функціонально неактивних синаптосом. Чорна крива (нижня)- синаптосоми, червона крива- синаптосоми, інкубовані з ремдесивіром.

Таблиця 7.2 - Положення та віднесення смуг в Раман спектрах активних і неактивних синаптосом і синаптосом, інкубованих з ремдесивіром.

Активні синаптосоми		Неактивні синаптосоми		Віднесення коливань
чисті, $см^{-1}$	з ремдеси-віром, $см^{-1}$	чисті, $см^{-1}$	з ремдеси-віром, $см^{-1}$	
606	606	605	605	607 – гліцерол [75]
644	644	642	642	640-тирозин[76] 643- С-С мода скручування тирозину [75]
702	702	680	680	682 – G [77] 678 – дихальні моди кільця в основах ДНК)/С-20 - ендо-анти [75] 702- холестерол, ефір холестерину [75]
721	721	725	720	720 - аденін [76] 720 – ДНК [75] 725 - А (кільцева дихальна мода основ ДНК/РНК) [75]
753	753	752	752	751- Т[77]

				752-ν15 (порфиринова дихальна мода, найбільш інформативна про стан еритроцитів і пряме вимірювання гемових груп гемоглобіну) ДНК [75]
		787	787	785- Цитозин, урацил [76] 786 – С,Т,ДНК: О-Р-О [77] 787 - Можна вважати мірою відносної кількості нуклеїнових кислот, присутніх у фосфатидилсерині [75]
		818	-	817 - С-С (відноситься до колагену) [75]
834	834			831 – ДНК: RP, Тир [75]
924	924	924	924	
977	977	976	976	
1004	1004	1004	1004	1004- Фенілаланін [76, 77]
1083	1083	1090	1083	1085 - С—О [76] 1083 - С-N мода я білків (і ліпідів) [75] 1090- Симетричні коливання фосфату [75]
1129	1129	1129	1129	1129 - С—N і С—С [76] 1129- ν(С-С) скелет ацилового хребта в ліпідах (трансконформація) [75]
1174	1174	1174	1174	1176 – Т, G [77] 1174- Тирозин, фенілаланін, С-Н (білок) [75]
1224	1224	1227	1227	1224- амід III (b -структура) [75]

1310	1310	1310	1310	1307– A, G, p:CH деф [77] 1309- CH3/CH2 мода деформаційна та/або колагенів та ліпідів [75]
1339	1339	1340	1340	1339 – A, G, p:CH деф [77] 1339 - C-C коливання кільця фенілу і коливання C3-C3 та C5-O5 або CH у площині кільця 3 1340 - мода нуклеїнової кислоти [75], моди нуклеїнової кислоти, що вказують на вміст нуклеїнової кислоти в тканинах [75]
1360	1360		1360	1360 – триптофан [75]
		1363	1366	1363 - гуанін (N7, B,Z-маркер) [75] 1365 – триптофан [75]
1398	1398	1398	1398	1398 – C=O , CH2 деформації [75]
1441	1441			1440–1460 - CH_2 деф [76] 1450- p:CH деф [77] 1441 - CH2 ножиці & CH3 згинання в білках, Холестерол та його складні ефіри, C-H мода ліпідів [75]
		1450	1450	1450- CH2 коливання (білки), C-H деф. (CH функціональні групи ліпідів, бічні ланцюги амінокислот білків і вуглеводів) [75]
1500	1500			1499 – C=C деформація бензольного кільця [75]
1551	1551			1552 – ν(C=C), триптофан(білок), ν(C=C), порфирин [75]
1588	1588	1588	1588	1588 - Фенілаланін, гідроксипролін [75], ДНК

1661	1661	1661	1661	1650–1680 - Амід I [76, 77] 1660 - Амід I коливальна мода структ. білків, ліпідів[75]
	1675	1670	1670	1670 - Амід I (антипаралельна b-структура) [75], ліпіди
2294	2294	2297	2297	2300 - область OH-NH-CH коливань розтягування [75]
		2670	2670	2550-2580 – ν(S-H) (амінокислота метіонін) [75]
2723	2723	2727	2727	2700-3500 -коливання CH, NH, і OH груп [75]
2854	2854	2855	2855	2853-2881 - CH2 сим. ліпідів і білків [75]
2887	2887			2886 - Фермі резонанс CH_2. [75]
		2892	2892	2893 - CH3 сим. [75]
2935	2935	2941	2941	2935 - CH3 асим. смуги [75] 2940 - C-H коливання в ліпідах і білках νas CH2, жирні кислоти
2971	2971	2971	2971	2971 - Асиметричне CH3 [75]

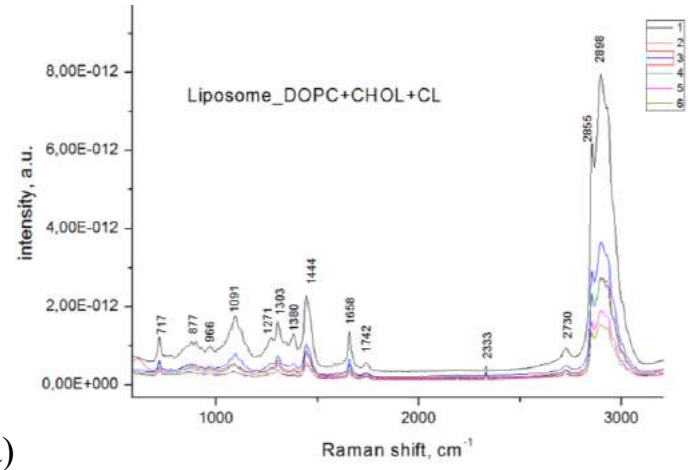
Раманівські спектри синаптосом мають вигляд відмінний від спектрів клітин. По-перше, значний внесок дають мітохондрії (30%) та їх складові у вигляді порфиринів, що відображається в наявності ліній характерних для мітохондрій- див. таблицю, по-друге значний внесок ДНК та пептидів, по- третє суттєвий люмінесцентний фон від білків [113]. Дія препаратів, як ремдезивіту так і тікагрелору (нижче) подавляла цей люмінесцентний фон . Це говорить про те, що препарат взаємодіє з синаптосомою. Для детального аналізу картини взаємодії треба синаптосоми розкладати на складові і виділяти різні її фракції, як це ми зробили з ліпідами. Синаптосоми є дуже складною моделлю для коливальної спектроскопії та ще неоднорідною по своєму складу, тому інфрачервоні спектри, в яких

отримується усереднена інформація по кількох десятках і більше синаптосом дають більш точну інформацію ніж Раманівські спектри хоча б і усереднені по сотням точок [113, 121].

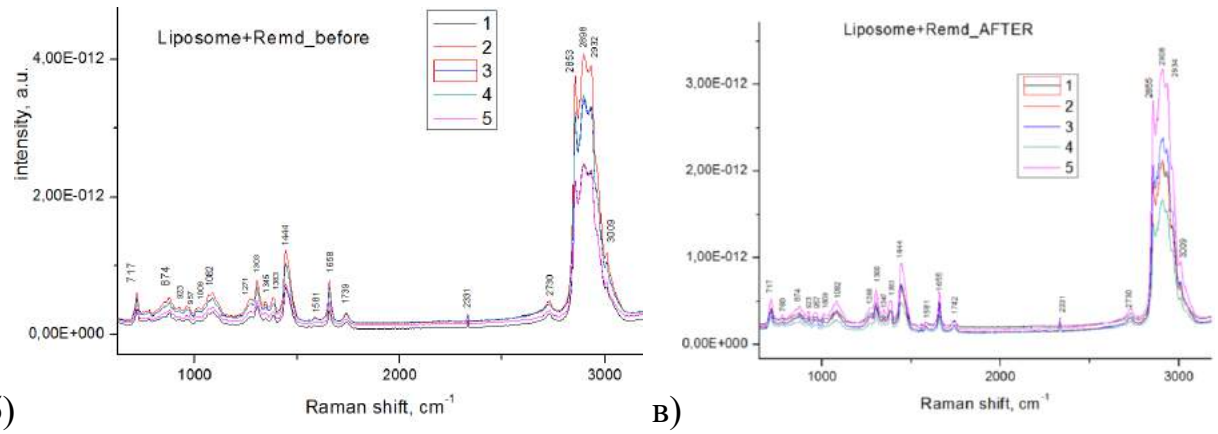
7.4. Аналіз впливу ремдесивіру на мембранні міметики (ліпосоми) методом спектроскопії комбінаційного розсіювання

Було проведено дослідження отриманих мембранних міметиків у вигляді везикул за допомогою Раманівської спектроскопії. Ліпосоми готувались за описаною вище методикою, наносились на підложки CaF_2 по 20 мікролітрів та висушувались за кімнатної температури.

Зміни в раманівських спектрах ліпосом (рис. 7.9) при різних режимах вбудовування препарату, на відміну від ІЧ спектрів, не дають можливості зробити висновки про зміни в структурі самих ліпосом. Спостерігаємо незначні зміни в структурі валентних коливань CH_2 як у високочастотній області, так і деформаційних CH_2 в низькочастотній області. Перерозподіл інтенсивностей CH_2 коливань свідчить про дію препарату, при цьому структура ліпосом не змінюється.



а)



б) в)

Рисунок 7.9 Раман спектри ліпосом, отримані за двома різними протоколами в області 500-3200 см-1. а) контрольні ліпосоми, б) ліпосоми, інкубовані з ремдесивіром, в) ліпосоми, в які ремдесивір додавався після їх утворення

Картування спектрів було зроблено з використанням спектрометра комбінаційного розсіювання, оснащеного мікроскопом. Це дало нам змогу знімати спектр окремої синаптичної терміналі. Результати представлено на рис. 7.10.

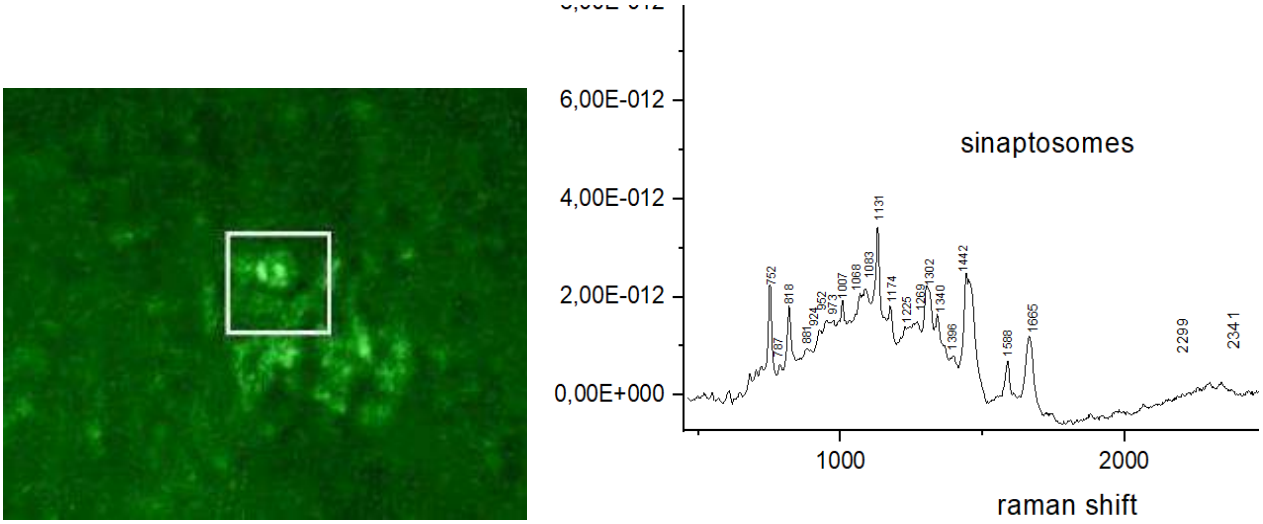
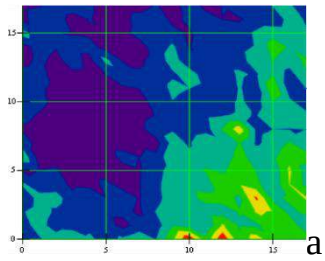


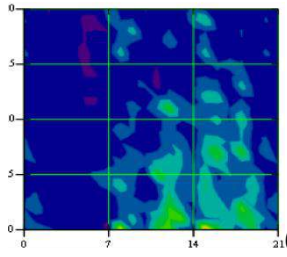
Рисунок 7.10 Оптичне зображення синаптосом та виділена область, з якої реєструвався спектр комбінаційного розсіювання.

Використовуючи програму MathCad 14, за певними маркерними смугами було проведено картування спектрів (Рис. 7.11). Будувалась піксельна картинка, де кольорами визначені інтенсивності з синього (мала інтенсивність) до червоного

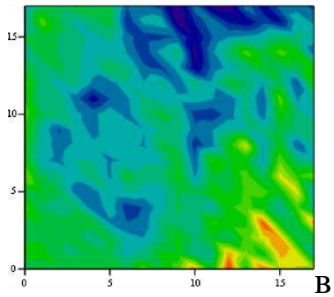
(велика інтенсивність). Чим яскравіше, тим вища інтенсивність даної точки. Це необхідно нам для візуалізації змін в відокремлених синаптичних терміналях, індукованих ремдесивіром.

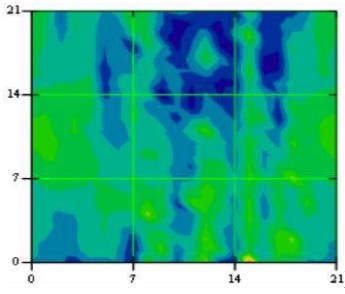
750 см$^{-1}$, Порфірин, триптофан


а

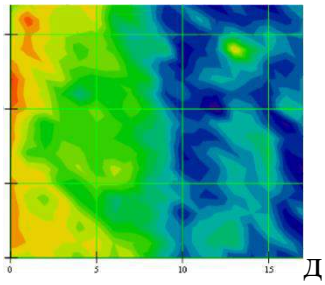

б

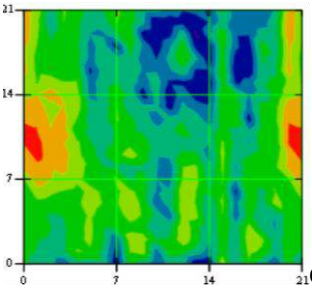
1004 см$^{-1}$, Фенілаланін


в

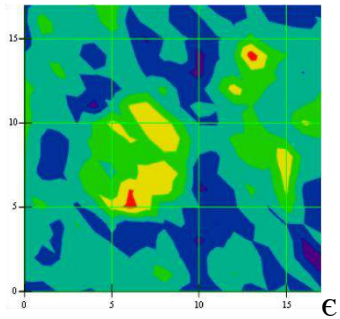

г

1662 см$^{-1}$, Амід I, ДНК


д


е

2939 см$^{-1}$, CH_2 Ліпіди, жирні кислоти


є

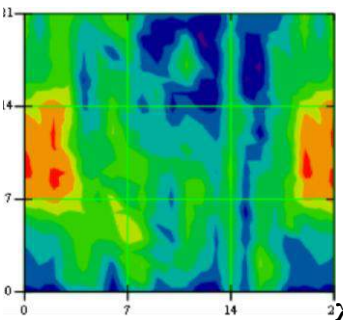

ж

Рисунок 7.11 Картування зображень синаптосом за певними коливальними модами

Картування спектрів відбувалось шляхом побудови матриць з фіксованим першим стовпцем, що відповідав спектральним частотам. Кожен наступний стовпчик відповідав спектру в одній вибраній точці.

В лівому стовпчику представлені картинки відокремлених нейронних терміналей на довжинах хвиль відповідних компонент та молекулярних груп клітин, а в стовпчику справа представлені зображення синаптосом після інкубації з ремдесивіром.

На даному етапі порівнювати між собою можна тільки картинки, що належать одному стовпчику, бо вони зняті в одній точці зразка. Оскільки синаптосоми інкубовані з ремдесивіром були зняті через кілька годин і так як синаптосоми не були зафіксовані, то відбувся зсув. Порівнювати між собою можна рисунки 47а та рисунки 47в, оскільки ці рисунки відповідають амінокислотам і пептидним групам, а також рисунки 47д та рисунки 47є, бо групи CH_2 та CH_3 у значній кількості входять в ліпіди і в ДНК, відповідно, що буде добре відображатися при картуванні.

Судячи з меппінгу, у зразках після дії ремдесивіру синаптосоми мають дещо змінений вигляд, і тому картинки досить розмиті. Причиною може бути як зміна стану синаптосом при дії лазерного випромінювання впродовж декількох годин, так і дія препарату та особливо розчинника.

У подальшій роботі цей експеримент буде модифікований або перенесений в КАРС. Буде спроба зробити це в реальному часі, щоб зафіксувати дію ремдесивіру на одиничну синаптосому. Але сам по собі цей експеримент не є тривіальним, бо по-перше треба ізолювати окрему синаптосому та її зафіксувати, щоб вона не рухалась в зразку. По причині її малих розмірів (1-2 мкм) це зробити важко.

Отже, було запропоновано методику, відповідно до якої в подальшому буде візуалізуватись кінетика змін у синаптосомі під дією противірусного препарату.

7.5 Аналіз впливу тікагрелору на синаптосоми методом спектроскопії комбінаційного розсіювання

Реєстрація спектрів була зроблена для неактивних синаптосом, інкубованих на водяній бані протягом 5 хв при 37 °C з тікагрелором. Результати представлені на Рисунку 7.12

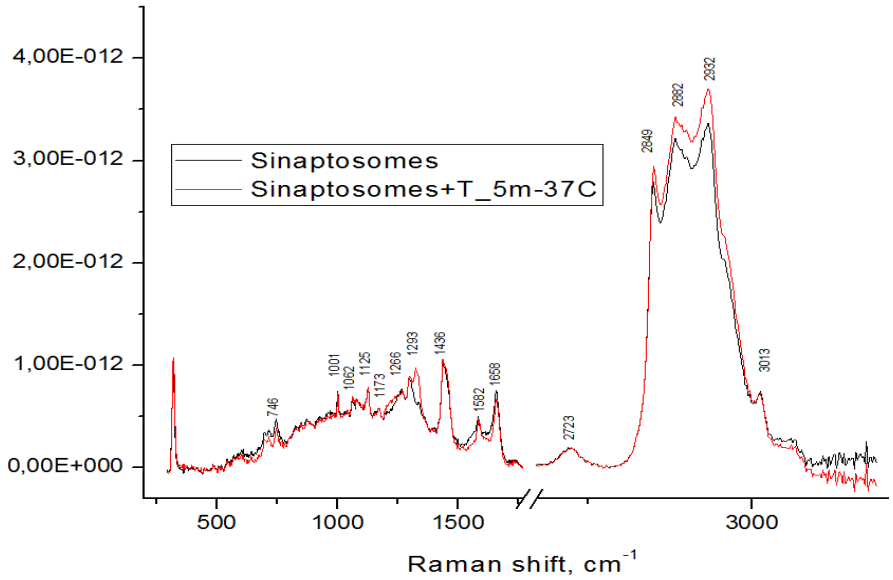


Рисунок 7.12 Раман спектр функціонально активних синаптосом. Чорна (нижня) крива- синаптосоми, червона крива- синаптосоми, інкубовані з тікагрелором.

Спектри комбінаційного розсіювання синаптосом з тікагрелором практично не відрізняються від Раман спектрів вихідних синаптосом, окрім смуги Амід I та зменшення люмінесцентного фону в спектрах синаптосом з тикагрелором. Причиною змін в області Амід I можуть бути різні місця локалізації точок, від яких записувались спектри, а не вплив препарату. В цю область дають внесок додатково ліпіди- 1672 $см^{-1}$ і якщо їх внесок був збільшеним, то і максимум лінії міг зміститися в високочастотну область[119].

7.6. Висновки до розділу 7

1. В спектр комбінаційного розсіювання синаптосом дають значний внесок мітохондрії та її компоненти, які разом з іншими білками та пептидами зумовлюють значний люмінесцентний фон при збудженні зеленим лазером.
2. Іншою особливістю спектрів синаптосом є значна кількість досить вузьких і добре розділених ліній в спектрі, що можна віднести до біомолекул незначних

розмірів - пептидів, амінокислот та структурних основ ДНК. За складом, спектр синаптосом можна порівнювати зі спектрами клітин.

3. При дії препаратів як ремдесивіру так і тікагрелору відбувається гасіння люмінесцентного фону- різне в різних точках зразка та перебудова в області валентних CH_2 та CH_3 коливань, що є свідченням взаємодії препаратів з мембраною синаптосом про що доводять подібні спектральні особливості в спектрах модельних ліпосом- а саме, перебудова в області валентних CH_2 та CH_3 коливань.
4. Зареєстровані Раман спектри ремдесивіру та тікагрелору та проаналізовані їх інтенсивності та положення частот за допомогою двох раманівських приладів (для ремдесивіру), що дали хороше співпадіння. Дані можна відправити в бібліотеку спектрів лікарських препаратів, на сьогодні вони там відсутні.

РОЗДІЛ 8. ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ ТІКАГРЕЛОРУ ТА РЕМДЕСИВІРУ НА СТРУКТУРНІ ПАРАМЕТРИ МЕМБРАН ВЕЗИКУЛ *IN VITRO* ЗА ДОПОМОГОЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЇ СПЕКТРОСКОПІЇ

8.1. Формулювання завдання

Ціль завдання – за допомогою флуоресцентної спектроскопії визначити вплив ремдесивіру та тікагрелору на ліпідний бішар, його структурні параметри, такі, як упорядкованість мембрани.

8.2. Моделювання вбудовування препаратів у мембрану

Вбудовування та агрегацію препарату було досліджено шляхом розміщення трьох молекул препарату безпосередньо над поверхнею модельної мембрани. Було використано напів-гармонічні потенціали, що не давали молекулам препарату віддалятися більш ніж на 3.5 нм від центру бішару у напрямі Z та більш ніж на 4 нм у кожен бік у напрямі X.

Після ~50 нс симуляції спостерігалася наступна поведінка. У випадку ремдесивіру всі три молекули препарату агрегували у водному середовищі, а одна з них частково вбудовувалася у мембрану (Рис. 8.1).

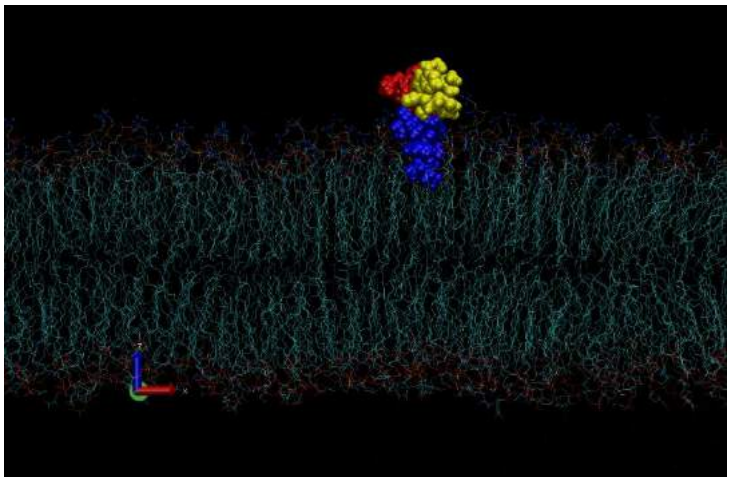


Рисунок 8.1 Вбудовування ремдесивіру у модельну мембрану. Індивідуальні молекули ремдесивіру показано різними кольорами у вигляді молекулярної поверхні.

У випадку тикагрелору агрегація була менш вираженою і носила оборотній тимчасовий характер. У фінальній конфігурації одна з молекул повністю вбудувалася у мембрану, тоді як дві інші сформували агрегат на її поверхні (Рис. 8.2).

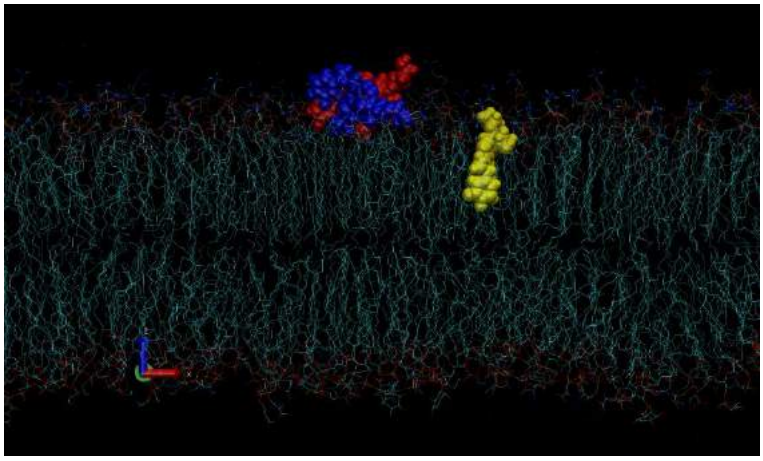


Рисунок 8.2 Вбудовування тікагрелору у модельну мембрану. Індивідуальні молекули тікагрелору показано різними кольорами у вигляді молекулярної поверхні.

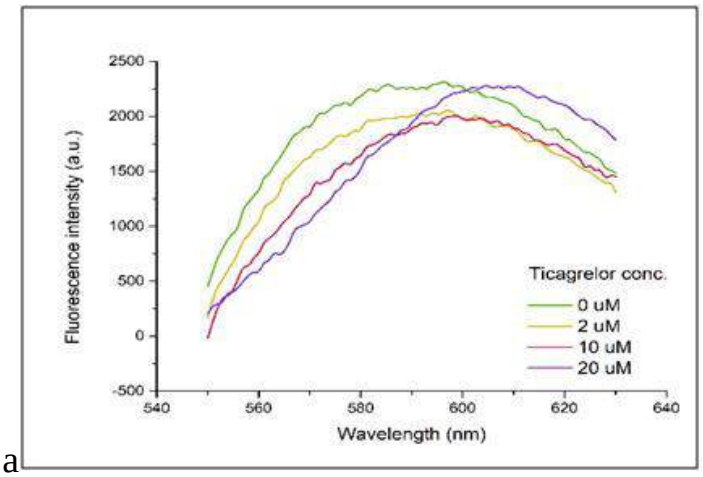
Таким чином, показано, що молекули обох препаратів мають здатність до спонтанного вбудовування у мембрану згідно з амфіфільною будовою їх молекул та здатність до агрегації у водному середовищі, що відбувається паралельно з процесом взаємодії з мембраною.

8.3. Визначення впливу тікагрелору та ремдесивіру на структурні параметри мембран везикул *in vitro*

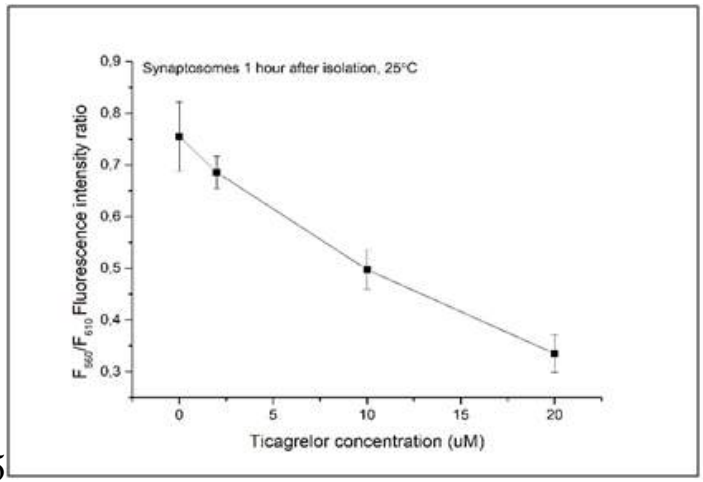
Флуориметричне дослідження упорядкованості мембран виконувалось із зондом NR12S, що маючи сильну афінність до зовнішнього ліпідного шару мембран, демонструє чутливість до зміни гідратованості та полярності ліпідного оточення, в якому він перебуває. Використаний метод є надійним інструментом у дослідженні змін упорядкованості або розупорядкованості ліпідного мікрооточення мембран як за нормальних умов, так і за умов впливу досліджуваних препаратів на об’єкт.

В дослідженні використовувався препарат ізольованих синаптосоми мозку щурів. Флуориметрія із зондом NR12S проводилась впродовж 1 години з моменту отримання препарату синаптосом, а також після 24 годин після отримання. Препарат тікагрелор досліджувався у діапазоні концентрацій від 2 до 20 мкМ. Препарат ремдесивір досліджувався у діапазоні концентрацій від 2 до 100 мкМ. Інкубація синаптосом із досліджуваними препаратами тривала 30 хв. Флуориметрія проводилась з допомогою флуориметра PTI Quanta master.

Виявлено, що тікагрелор спричиняє розупорядкування зовнішнього ліпідного шару мембрани синаптосом (Рис. 8.3 а, б). У діапазоні концентрацій 2 – 20 мкМ спостерігається лінійна залежність впливу препарату.



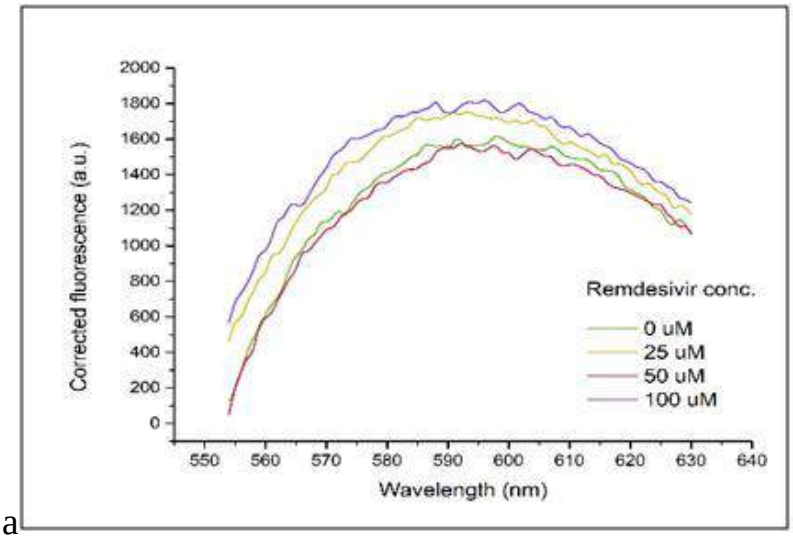
а



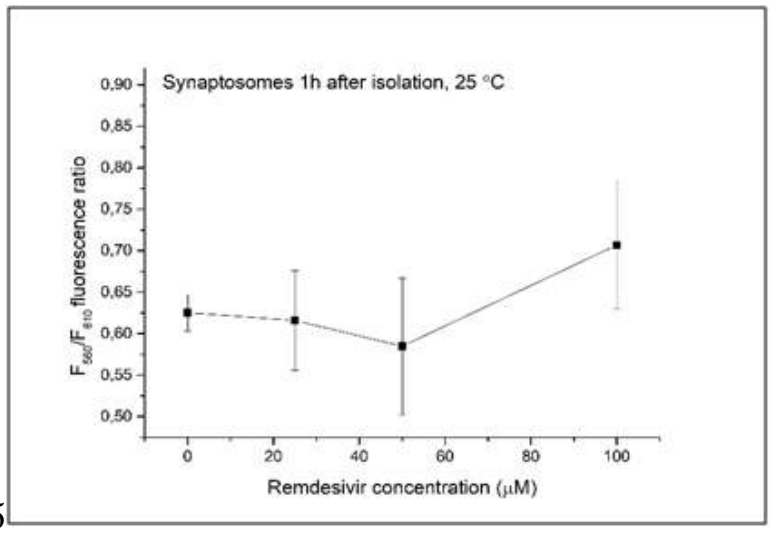
б

Рисунок 8.3 а) – Спектри флуоресценції зонду NR12S у мембранах синаптосом за різних концентрацій тікагрелору; б) – Зміни показника упорядкованості ліпідного оточення мембран у відповідь на різні концентрації тікагрелору.

Вплив ремдесивіру на упорядкованість зовнішнього ліпідного шару мембрани синаптосом не простежувався на препаратах синаптосом впродовж 1 години після отримання (Рис. 8.4 a, b)



а

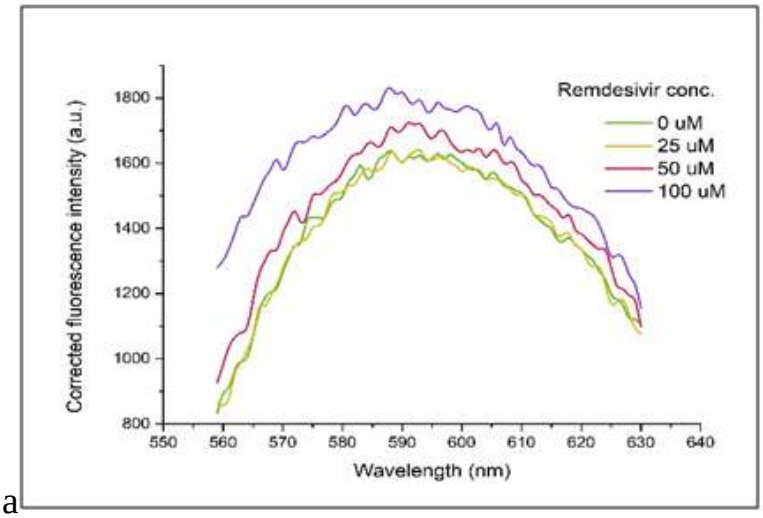


б

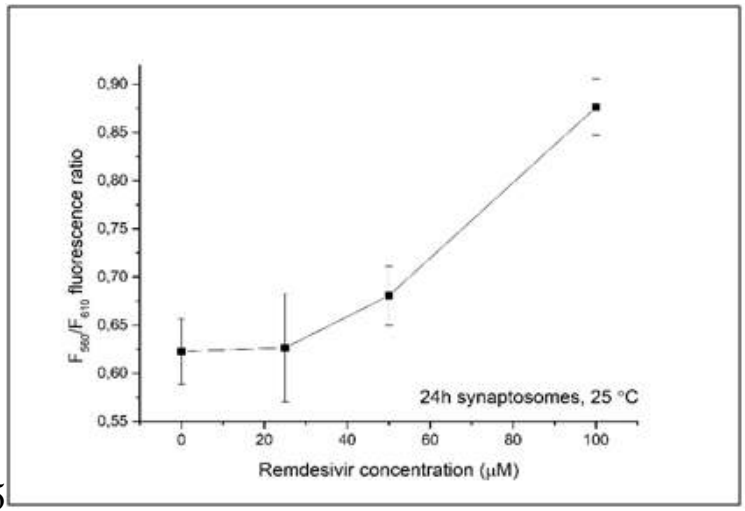
Рисунок 8.4 а) – Спектри флуоресценції зонду NR12S у мембранах синаптосом за різних концентрацій ремдесивіру; б) – Зміни показника упорядкованості ліпідного

оточення мембран синаптоосм у відповідь на різні концентрації ремдесивіру. Отримано на синаптосомах після 1 години після виділення.

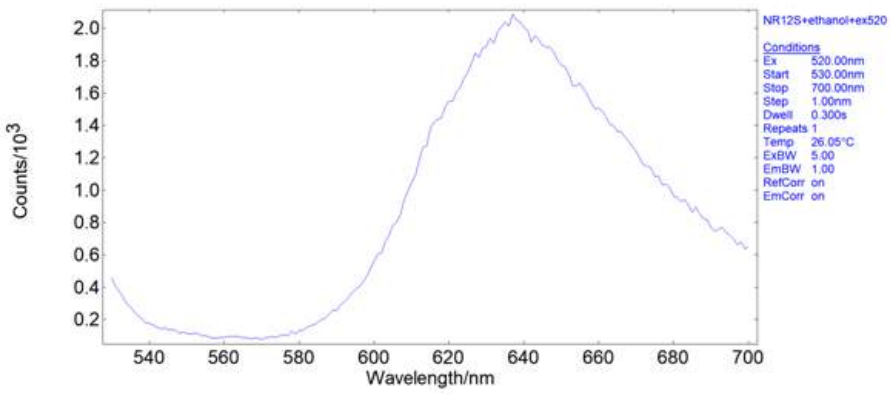
На препаратах синаптосом після 24 години після отримання, ремдесивір спричиняв збільшення упорядкованості зовнішнього ліпідного шару мембрани синаптосом (Рис. 8.5 а, б). У діапазоні концентрацій 25 – 100 мкМ спостерігається лінійна залежність впливу препарату.



а



б



в

Рисунок 8.5 а) – Спектри флуоресценції зонду NR12S у мембранах синаптосом за різних концентрацій ремдесивіру; б) – Зміни показника упорядкованості ліпідного оточення мембран синаптосом у відповідь на різні концентрації ремдесивіру. Отримано на синаптосомах після 24 годин після виділення; в)- Спектр флуоресценції чистого зонду NR12S, *отримано за допомогою приладу Edinburg Instruments FS5, придбаного за кошти проекту.*

Таким чином, з використанням флуоресцентного зонду NR12S показано, що тікагрелор (2 – 20 мкМ) спричинював розупорядкування зовнішнього ліпідного шару мембрани нервових терміналей головного мозку, що свідчить про мембранотропний ефект цього препарату.

Вплив ремдесивіру (25 – 100 мкМ) на упорядкованість зовнішнього ліпідного шару нервових терміналей головного мозку був складним та залежав від їх функціонального стану. Ремдесивір не викликав змін упорядкованості зовнішнього ліпідного шару мембрани функціонально активних нервових терміналей, що може бути пов’язано з їх здатністю метаболізувати молекулу ремдесівіру до мембрано інертного проміжного метаболіту. Навпаки, ремдесивір спричиняв збільшення упорядкованості зовнішнього ліпідного шару мембрани функціонально неактивних нервових терміналей, що свідчить про мембранотропний ефект власно молекули ремдесивіру.

8.4. Висновки до розділу 8

1. Препарат тікагрелор у діапазоні концентрацій 2 – 20 мкМ спричиняв розупорядкування зовнішнього ліпідного шару мембрани нервових терміналей головного мозку, що показано з використанням флуоресцентного зонду NR12S та свідчить про мембранотропний ефект молекули тікагрелору.
2. Ремдесивір у діапазоні концентрацій 25 – 100 мкМ не викликав змін упорядкованості зовнішнього ліпідного шару мембрани функціонально

активних нервових терміналей, що може бути пов’язане з їх здатністю метаболізувати молекулу ремдесивіру до мембрано інертного проміжного метаболіту. Навпаки, ремдесивір спричиняв збільшення упорядкованості зовнішнього ліпідного шару мембрани функціонально неактивних нервових терміналей, що свідчить про мембранотропний ефект молекули ремдесивіру.

РОЗДІЛ 9. ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ ТІКАГРЕЛОРУ ТА РЕМДЕСИВІРУ НА СТРУКТУРУ, АГРЕГАЦІЮ ТА ЗЛИТТЯ МЕМБРАН ВЕЗИКУЛ ТА СИНАПТОСОМ IN VITRO ЗА ДОПОМОГОЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЇ СПЕКТРОСКОПІЇ

9.1. Формулювання завдання

Ціль завдання – методами флуоресцентної спектроскопії визначити вплив ремдесивіру та тікагрелору на процеси злиття та агрегації мембран везикул синаптосом.

9.2. Визначення впливу тікагрелору та ремдесивіру на структуру, агрегацію та злиття мембран везикул та синаптосом in vitro

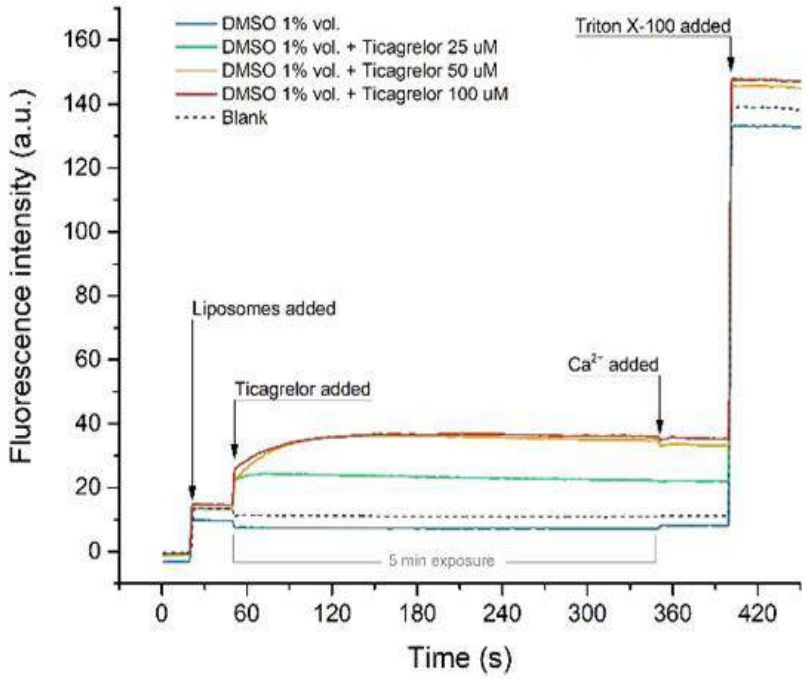
Багато патогенних вірусів людини мають ліпідну оболонку та інфікують клітини-мішені шляхом злиття ліпідного бішару вірусної оболонки з клітинною мембраною господаря. Варто зазначити, що злиття вірусних та клітинних мембран - загальна риса вірусів, що мають оболонку. Подібно до інших оболонкових вірусів, зараження SARS-CoV-2 йде шляхом його проникнення в клітини за допомогою злиття мембран вірусної частинки і плазматичної мембрани клітини [78,79]. Здатність оболонкових вірусів перетинати ліпідні бішарові мембрани клітин під час входу та виходу вірусу без порушення цілісності мембрани підвищує ефективність поширення вірусу [80].

Тригери для зміни фузогенного конформаційного стану під час взаємодії з клітиною-мішенню різняться у різних вірусів. Оболонкові віруси використовують специфічні протеїни злиття, щоб викликати злиття вірусної та клітинної мембран. S-глікопротеїн – це протеїн злиття вірусу SARS-CoV, а відповідає за процес злиття домен S2 цього протеїну. Ліпіди здатні модулювати злиття мембран між собою та опосередковане вірусними протеїнами злиття. Вони сприяють злиттю мембран завдяки своїм фізичним, хімічним і механічним властивостям, включаючи контроль кривизни мембран, що впливає на процес злиття.

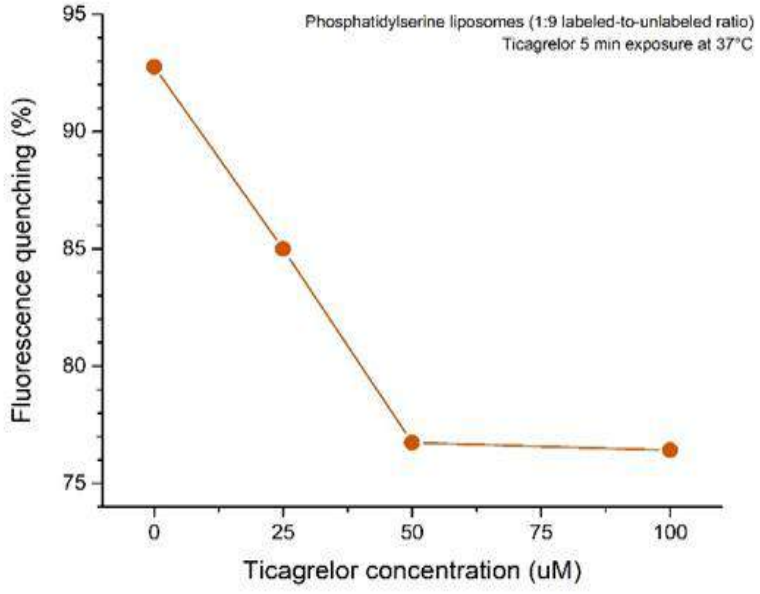
Злиття та агрегація мембран везикул досліджувалась із використанням флуоресцентного зонду октадецилродаміну (R18). Досліджувані везикули розділяли

на дві частини за об’ємом суспензії у пропорції 9:1. Менша частина мітилась зондом R18 у молярному співвідношенні 10% до загальної кількості ліпідів везикул. Дане співвідношення зонду та ліпідів забезпечує понад 90% гасіння флуоресценції зонду. Мічені та немічені везикули змішувались із подальшим додаванням досліджуваного препарату. Збільшення флуоресценції суміші свідчить про процеси злиття або агрегації везикул. Досліджувались везикули двох композиції: отриманих з фосфатидилсерину (PS) та з фосфатидилхоліну (DOPC), які відповідно мають негативний та позитивний сумарний заряд поверхні. Як контроль злиття везикул використовували розчин хлориду кальцію (кінцева концентрація 280 мкМ). Максимально можливий рівень флуоресценції зонду у зразках отримували після додавання детергенту Тритону Х-100 (кінцева концентрація 1% за об’ємом). Флуориметрія проводилась за температури 37 С. Розмір везикул визначали методом лазерної кореляційної спектроскопії та він складав~ 60 нм.

Тікагрелор у діапазоні концентрацій 25 – 100 мкМ індукував злиття везикул з фосфатидилсерину (PS). Лінійна концентраційна залежність спостерігається у діапазоні 25 – 50 мкМ. Збільшення концентрації тікагрелору до 100 мкМ не спричиняє збільшення рівня злиття везикул у порівнянні із концентрацією 50 мкМ (Рисунок 9.1 a, b).



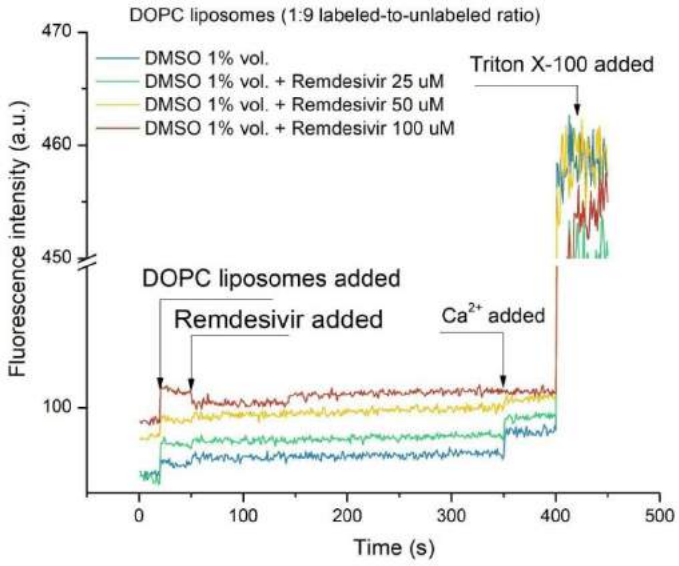
а



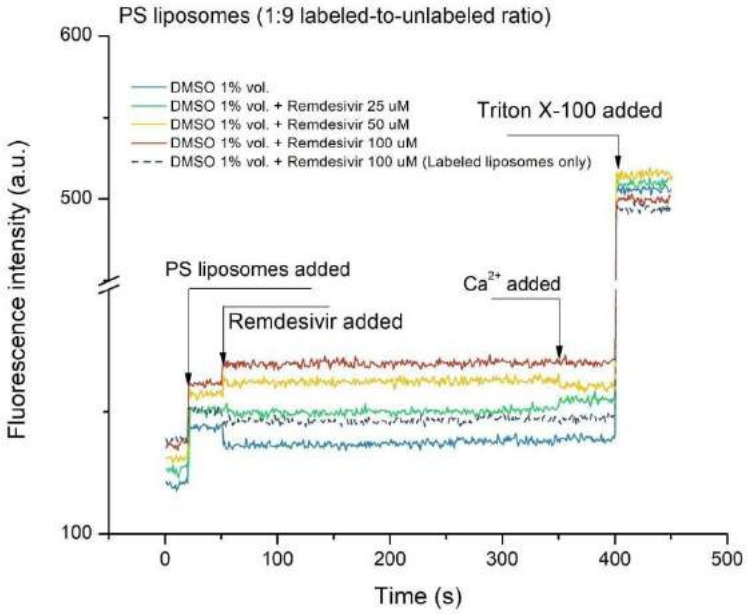
б

Рисунок 9.1 а) - Кінетика зміни флуоресценції зонду R18 у везикулах за додавання різної кількості препарату тікагрелору; б) – залежність зміни флуоресценції зонду R18 як прояву процесів злиття/агрегації везикул від концентрації тікагрелору.

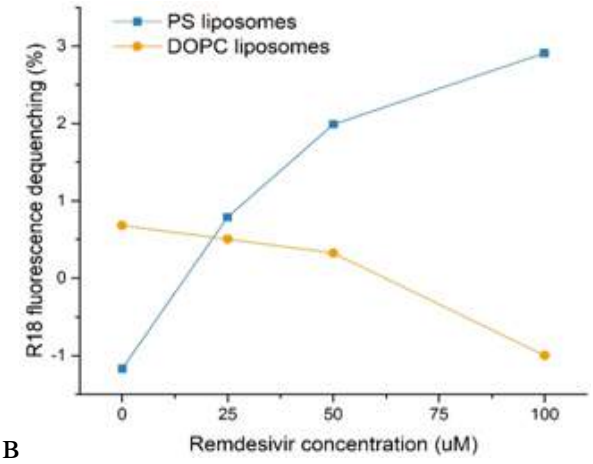
Ремдесивір у діапазоні концентрацій 25 – 100 мкМ індукував злиття везикул з фосфатидилсерину (PS). Додавання препарату ремдесивіру до везикул DOPC не індукувало їх злиття (Рис. 9.2 а, б).


DOPC liposomes (1:9 labeled-to-unlabeled ratio)
DMSO 1% vol.
DMSO 1% vol. + Remdesivir 25 uM
DMSO 1% vol. + Remdesivir 50 uM
DMSO 1% vol. + Remdesivir 100 uM
Triton X-100 added
DOPC liposomes added
Remdesivir added
Ca2+ added
Fluorescence intensity (a.u.)
Time (s)

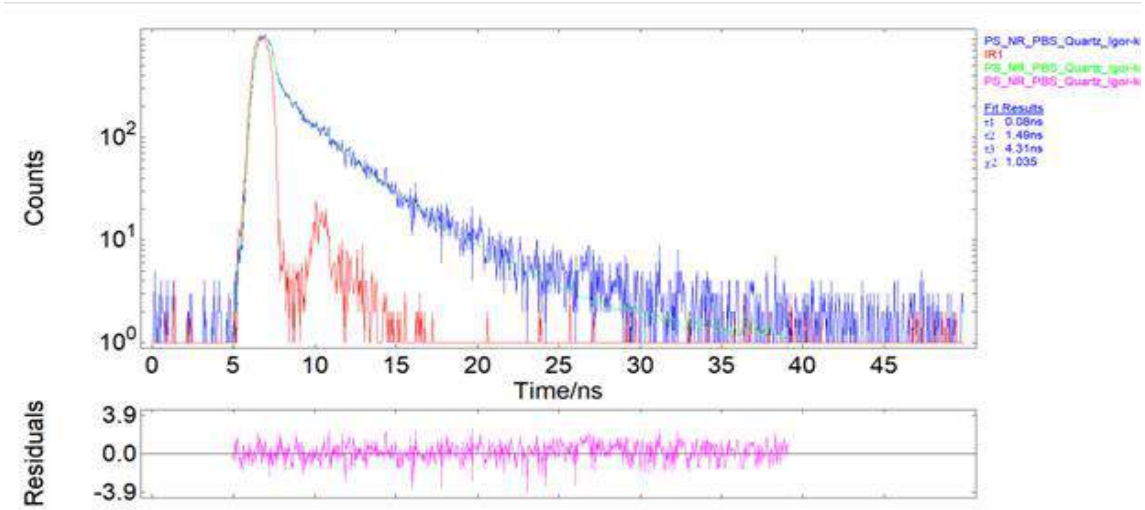
а


PS liposomes (1:9 labeled-to-unlabeled ratio)
DMSO 1% vol.
DMSO 1% vol. + Remdesivir 25 uM
DMSO 1% vol. + Remdesivir 50 uM
DMSO 1% vol. + Remdesivir 100 uM
DMSO 1% vol. + Remdesivir 100 uM (Labeled liposomes only)
Triton X-100 added
PS liposomes added
Ca2+ added
Remdesivir added
Fluorescence intensity (a.u.)
Time (s)

б


PS liposomes
DOPC liposomes
R18 fluorescence dequenching (%)
Remdesivir concentration (uM)

в



г

Рисунок 9.2 а) - Кінетика зміни флуоресценції зонду R18 у везикулах DOPC за додавання різної кількості ремдесивіру; б) - Кінетика зміни флуоресценції зонду R18 у везикулах PS за додавання різної кількості ремдесивіру; в) – Порівняння залежностей зміни флуоресценції зонду R18 як прояву процесів злиття/агрегації везикул DOPC та PS від концентрації ремдесивіру; г)- для порівняння також наведена кінетика зміни флуоресценції іншого зонду NR12S на везикулах PS , *отримано за допомогою приладу Edinburg Instruments FS5, придбаного за кошти проекту.*

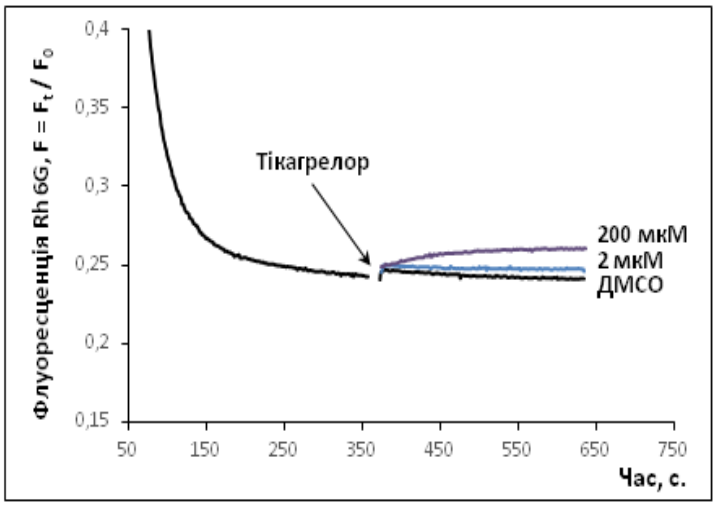
Експериментальні дані, отримані з використанням флуоресцентних зондів для реєстрації ліпідного порядку мембран та злиття мембран були верифіковані за допомогою потенціал-чутливого флуоресцентного зонда на мембранах нервових терміналей головного мозку щурів. Постає питання чи відображаються зміни ліпідного порядку мембрани та злиття мембран на важливому функціональному параметрі синаптичної нейропередачі, а саме поляризації мембрани. Поляризація плазматичної мембрани нервових закінчень є одним з ключових параметрів, від якого залежить синаптична передача, а саме – її короткочасні зміни призводять до генерації нервового імпульсу. Деполяризація мембрани призводить до модуляції роботи потенціал-залежних іонних каналів, натрій-залежних транспортерів, що може викликати зміни у вивільненні нейромедіаторів шляхом екзоцитозу та

порушення процесу синаптичної передачі в цілому. Отже, поляризація мембрани нервових закінчень є одним з основних параметрів, що визначає нормальне транспортер опосередковане поглинання і позаклітинний рівень нейромедіаторів. Як добре відомо на теперішній час, електрохімічний градієнт Na+/K+ є рушійною силою для транспортеропосередкованого накопичення ГАМК та глутамату (а Cl- рушійною силою для транспортерів ГАМК) [81,110].

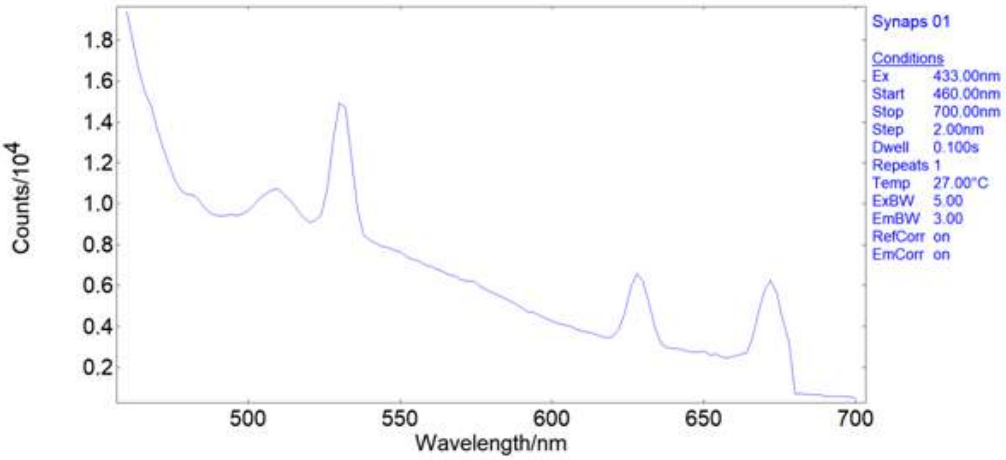
Поляризацію ізольованих нервових закінчень вимірювали з використанням флуоресцентного потенціал-чутливого зонду родаміну 6G. Завдяки тому, що цей зонд є ліпофільним та катіонним, він легко проходить крізь цитоплазматичний бар'єр і зосереджується в примембранному просторі клітини, згідно величини його мембранного потенціалу. За цих умов спостерігається гасіння флуоресценції зонду за рахунок часткового зв'язування з від'ємно зарядженим матриксом синаптосом Флуоресцентні виміри проводились на спектрофлуориметрі Hitachi MPF-4 при довжині хвилі збудження – 528 нм та емісії – 551 нм (ширина щілин – 5 нм). В кювету з магнітною мішалкою до суспензії синаптосом (кінцева концентрація протеїну – 0,15 мг/мл) додавали родамін 6G (кінцева концентрація – 0,5 мкМ) та реєстрували зміну інтенсивності флуоресценції зонду до досягнення стаціонарного рівня (Ft), який встановлювався за 3 хв і брався за 100% для подальших розрахунків. Потім в кювету додавали досліджувані сполуки та реєстрували кінетику вивільнення зонду та новий стаціонарний рівень його флуоресценції. Кількісну оцінку мембранного потенціалу давали, розраховуючи так званий індекс мембранного потенціалу F= Ft/F0, де Ft та F0 – інтенсивності флуоресценції зонду за присутності та за відсутності синаптосом.

Досліджувані сполуки необхідно було розчиняти в диметилсульфоксиді (ДМСО), який здатен сам спричиняти незначну деполяризацію мембрани. Підвищення флуоресцентного сигналу за присутності ДМСО складало від 1,8 до 3,3 % (Рис. 56). Тому ДМСО додавали до синаптосом як контроль в паралельних експериментах.

Як показано на рис. 9.3, при додаванні тікагрелору у концентрації 2 мкМ не спостерігалось підвищення флуоресцентного сигналу, що свідчило про відсутність деполяризації плазматичної мембрани нервових терміналей за дії препарату. Збільшення концентрацій тікагрелору до 200 мкМ спричинювало незначну деполяризацію плазматичної мембрани, яка, однак, не перевищувала мембранної деполяризації, викликаної ДМСО (Рис. 9.3).



а



б

Рисунок 9.3 а)- Поляризація мембрани нервових терміналей після додавання тікагрелору в концентраціях 2 і 200 мкМ. Суспензію синаптосом урівноважували потенційно чутливим зондом родаміном 6G (0,5 мкМ); Після досягнення стабільного рівня флуоресценції зонда до синаптосом додавали ДМСО або тікагрелор до кінцевої концентрації 2 - 200 мкМ (позначено стрілкою). б)- наведено

спектр автофлуоресценції синаптосом, *отримано за допомогою приладу Edinburg Instruments FS5, придбаного за кошти проекту.*

Як показано на рис. 9.4, ремдесивір у концентрації 1 мкМ і 10 мкМ спричиняв незначну деполяризацію плазматичної мембрани нервових терміналей, що не перевищувала мембранної деполяризації, викликаної ДМСО. Збільшення концентрації до 100 мкМ викликало значне підвищення флуоресцентного сигналу, що свідчило про деполяризацію плазматичної мембрани нервових терміналей. (Рис. 9.4).

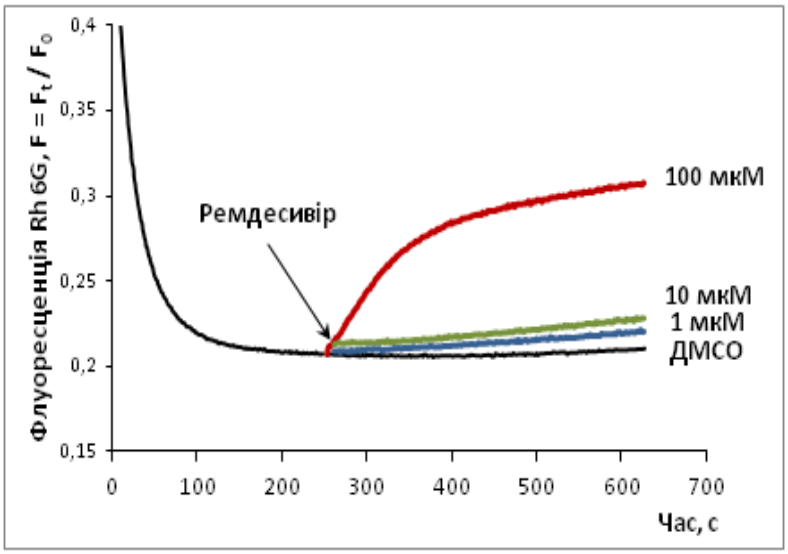


Рисунок 9.4. Деполяризація плазматичної мембрани нервових терміналей після додавання ремдесивіру в концентраціях 1, 10, 100 мкМ. Суспензію синаптосом урівноважували потенційно чутливим зондом родаміном 6G (0,5 мкМ); Після досягнення стабільного рівня флуоресценції зонда до синаптосом додавали ДМСО або ремдесивір до кінцевої концентрації 1 - 100 мкМ (позначено стрілкою).

Вище було показано, що тігагрелор та ремдесівір індукують злиття штучних мембран, і ці здатності досліджуваних сполук можуть суттєво відобразитися на ефективності процесу екзоцитозу у нервових терміналях. Крім того, наповнення синаптичних везикул нейромедіаторами та ефективність вивільнення нейромедіаторів шляхом екзоцитозу залежать також від протонного градієнта

везикул, який є рушійною силою накопичення нейромедіаторів через везикулярні транспортери [116].

Для визначення протонного градієнта синаптичних везикул у нервових терміналях використовувався pH-чутливий флуоресцентний зонд акридиновий оранжевий (Molecular Probes, США), який селективно накопичується у компартментах з кислими значенням pH [82]. Акридиновий оранжевий – це ліпофільний амін, непротонована форма якого здатна вільно проникати крізь мембрану. Після протонування в кислому просторі органел, що мають всередині позитивний мембранний потенціал, барвник втрачає здатність до проникності через мембрану. В нервових терміналях до таких структур відносяться синаптичні везикули, всередині яких pH = 5, що значно нижче за pH цитозолю. Інтенсивність флуоресценції акридинового оранжевого, акумульованого у везикулах, відображає рівень протоного градієнту у них, і таким чином здатність везикул до накопичення та вивільнення нейромедіаторів шляхом екзоцитозу. Додавання до суспензії синаптосом АО (5 мкМ) супроводжувалося гасінням флуоресценції зонду внаслідок його накопичення всередині синаптичних везикул. Стабільний рівень флуоресценції встановлювався за 5 хв. і приймався за 100% для подальших розрахунків.

Так само, як і в експериментах з використанням родаміну 6G, додавання ДМСО призводило до незначного підвищення інтенсивності флуоресцентного сигналу АО, на 1,5 - 2 % (Рис. 9.4). Як показано на рис. 9.4 додавання тікагрелору за концентрації 2 мкМ спричиняло незначне підвищення флуоресцентного сигналу у порівнянні з дією ДМСО – на 3%, що свідчило про його несуттєвий вплив щодо дисипації протонного градієнту синаптичних везикул у цій концентрації (Рис. 9.3). Підвищення концентрації тікагрелору до 20 мкМ супроводжувалось значним посиленням інтенсивності флуоресцентного сигналу АО, а отже і суттєвої дисипації протонного градієнту синаптичних везикул. Таким чином, тікагрелор за концентрації 20 мкМ викликав дисипацію протонного градієнту синаптичних везикул (Рис. 9.5)

Додавання до синаптосом тікагрелору за концентрації 2 мкМ не впливало на їх відповідь на калієву деполяризацію (внесення 35 мМ KCl), тобто на їх здатність до вивільнення нейромедіаторів шляхом екзоцитозу. Після інкубування синаптосом з тікагрелором за концентрації 20 мкМ спостерігалось зменшення спайку флуоресценції у відповідь на калієву деполяризацію плазматичної мембрани синаптосом (Рис. 9.5), що відображало зменшення екзоцитозу синаптичних везикул під впливом тікагрелору.

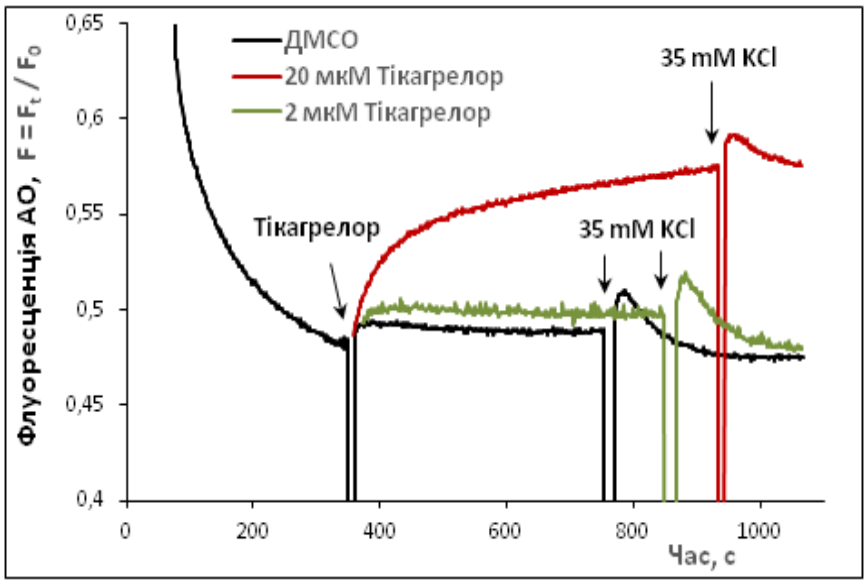


Рисунок 9.5 Протонний градієнт синаптичних везикул після додавання тікагрелору в концентраціях 2 і 20 мкМ. Синаптосомальна суспензія була врівноважена 5 мкМ акридиновим оранжевим (АО). Після досягнення стабільного рівня флуоресценції зонду (який приймався за 100%), до синаптосом додавали ДМСО або тікагрелор в концентраціях 2 і 20 мкМ (позначено стрілкою).

Ремдесивір за концентрацій 1 - 100 мкМ підвищував інтенсивність флуоресцентного сигналу (Рис. 9.6). Це свідчило про вивільнення зонду з синаптичних везикул внаслідок дисипації їх протонного градієнту під впливом ремдесивіру. Подальша деполяризація мембрани синаптосом, оброблених ремдесивіром, з використанням 35 мМ KCl призводила до зменшення спайку

флуоресценції (Рис. 9.6), що відображало зменшення екзоцитозу синаптичних везикул під впливом ремдесивіру [116].

а

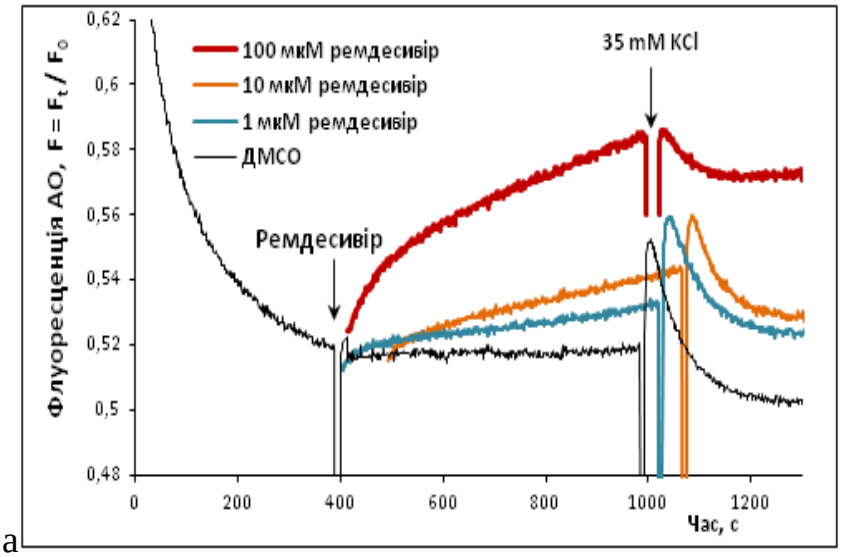


Рисунок 9.6 Закислення синаптичних везикул після додавання ремдесивіру в концентраціях 1, 10, 100 мкМ. Синаптосомальна суспензія була врівноважена 5 мкМ акридиновим оранжевим (АО). Після досягнення стабільного рівня флуоресценції зонду (який приймався за 100%), до синаптосом додавали ДМСО або ремдезивір в концентраціях 1, 10, 100 мкМ (позначено стрілкою).

Таким чином, тікагрелор (25 – 100 мкМ) індукував злиття липосом з фосфатидилсерину, що доведено з використанням чутливого до злиття мембран флуоресцентного зонду октадецилродаміну (R18). Тікагрелор (2 – 200 мкМ) не деполяризував плазматичну мембрану нервових закінчень, що доведено за допомогою флуоресцентного потенціал-чутливого зонду родаміну 6G. Тікагрелор за концентрації 20 мкМ викликав суттєву дисипацію протонного градієнту синаптичних везикул, що доведено за допомогою pH-чутливого флуоресцентного зонду акридинового оранжевого. Подальша деполяризація мембрани нервових терміналей призводила до зменшення процесу різкого зростання та наступного

падіння флуоресценції, що відображало зменшення екзоцитозу синаптичних везикул під впливом тікагрелору.

Ремдесивір (25 – 100 мкМ) індукував злиття везикул фосфатидилсерину, що доведено з використанням зонду R18. Ремдесивір (1 – 100 мкМ) викликав значну деполяризацію плазматичної мембрани нервових закінчень, що доведено за допомогою зонду родаміну 6G. Ремдесивір (1 - 100 мкМ) викликав дисипацію протонного градієнту синаптичних везикул, що доведено за допомогою флуоресцентного зонду акридинового оранжевого. Подальша деполяризація мембрани нервових терміналей призводила до зменшення змін в поведінці флуоресценції, що відображало зменшення екзоцитозу синаптичних везикул під впливом ремдесивіру.

9.3. Висновки до розділу 9

1. Ремдесивір у діапазоні концентрацій 25 – 100 мкМ індукував злиття везикул фосфатидилсерину, що доведено з використанням чутливого до злиття мембран флуоресцентного зонду R18.
2. Ремдесивір у діапазоні концентрацій 1 – 100 мкМ викликав значну деполяризацію плазматичної мембрани нервових закінчень, що доведено за допомогою флуоресцентного потенціал-чутливого зонду родаміну 6 G.
3. Ремдесивір за концентрацій 1 - 100 мкМ викликав дисипацію протонного градієнту синаптичних везикул, що доведено за допомогою pH-чутливого флуоресцентного зонду акридинового оранжевого. Подальша деполяризація мембрани нервових терміналей призводила до зменшення змін в флуоресценції, що відображало зменшення екзоцитозу синаптичних везикул під впливом ремдесивіру.
4. Тікагрелор у діапазоні концентрацій 25 – 100 мкМ індукував злиття ліпосом з фосфатидилсерину, що доведено з використанням чутливого до злиття мембран флуоресцентного зонду октадецилродаміну (R18).

5. Тікагрелор у діапазоні концентрацій 2 – 200 мкМ не деполяризував плазматичну мембрану нервових закінчень, що доведено за допомогою флуоресцентного потенціал-чутливого зонду родаміну 6 G.
6. Тікагрелор за концентрації 20 мкМ викликав суттєву дисипацію протонного градієнту синаптичних везикул, що доведено за допомогою pH-чутливого флуоресцентного зонду акридинового оранжевого. Подальша деполяризація мембрани нервових терміналей призводила до зменшення змін у флуоресценції, що відображало зменшення екзоцитозу синаптичних везикул під впливом тікагрелору.

РОЗДІЛ 10. ВИЗНАЧИТИ ВПЛИВ ХОЛЕСТЕРОЛУ ТА ГІПЕР-/ГІПОТЕРМІЇ НА ВЗАЄМОДІЮ ПРЕПАРАТІВ ІЗ ЛІПІДНОЮ МЕМБРАНОЮ НЕРВОВИХ ТЕРМІНАЛІВ ТА МОДЕЛЬНИХ БІШАРІВ

10.1. Формулювання завдання.

Отримати дані щодо зміни структурних параметрів модельних мембран до та після вбудовування препаратів з контролем вмісту холестеролу та температури in vitro. Порівняльний аналіз щодо зміни структурної організації між моделями мембран різної кривизни поверхні, зокрема, малих штучних мембран та синаптосом.

10.2. Синаптосоми як модельні системи.

Синаптосоми є однією з найбільш широко використовуваних модельних систем для дослідження функцій та молекулярних механізмів роботи нервових терміналів. Синаптосоми – це відокремлені від відростків нервових клітин (аксонів) нервові закінчення (аксонні або нервові терміналії), що утворюються в результаті гомогенізації нервової тканини [83]. При механічній гомогенізації в ізотонічній сахарозі нервові терміналії відриваються шляхом зсуву плазматичних мембран поблизу місця з’єднання аксона та нервового закінчення з подальшим ущільненням та замиканням мембрани. Таким чином утворюється замкнена субклітинна структура, що містись в середині синаптичні везикули з нейромедіаторами, йонні канали, може містити мітохондрії, інші органели в залежності від методу виділення. Оскільки різні клітинні компоненти мають різну густину, то при центрифугуванні в сахарозі гомогенату нервової тканини відбувається фракціонування та можна виділити область, що містить синаптосоми. Різні процедури виділення забезпечують різні ступені однорідності та активності синаптосом, а також чистоти отриманих препаратів. Основні забруднювачі синаптосом, які залишаються після фракціонування, включають нейронні та гліальні плазматичні мембрани, прикріплені постсинаптичні мембрани, мієлін [84].

Для виділення синаптосом використовують різні методи, зокрема диференціальне або градієнтне центрифугування в сахарозі, в полісахариді Ficoll, а також в колоїдному розчині оксиду кремнію (Percoll) [84].

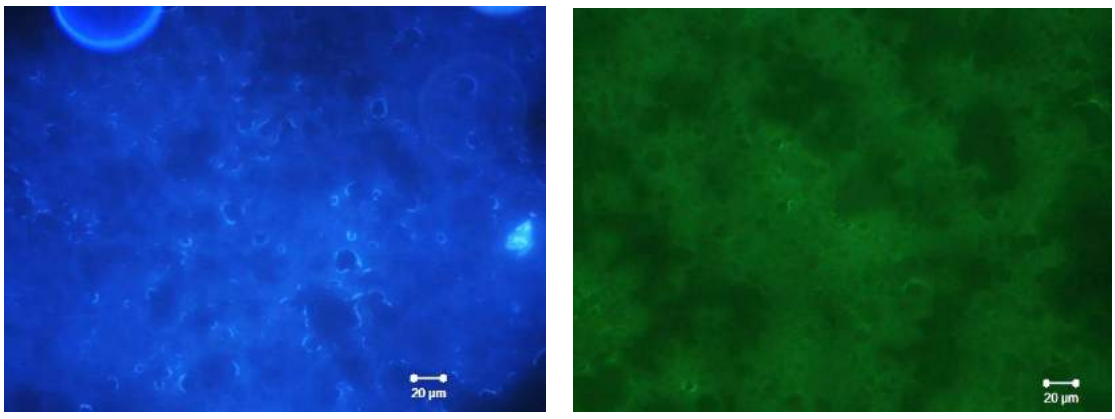
Синаптосоми виділяли за методом Котмана [85] із незначними модифікаціями. У декапітованих тварин брали великі півкулі головного мозку, відокремлюючи стовбурову частину та мозочок. Для отримання фракції синаптосом готували 20% гомогенат, використовуючи скляний гомогенізатор Поттера (зазор 0,2 мм). Середовище виділення містило 0,32 М сахарози, 5 мМ HEPES-NaOH pH 7,4, 0,2 мМ EDTA. Гомогенат центрифугували при 2,500g 5 хв для відокремлення ядер, кровоносних судин, зруйнованих нервових клітин. Надосадову фракцію центрифугували при 15000 g протягом 12 хв, осаджуючи фракцію неочищених синаптосом – Р2-фракцію. Для одержання очищеної фракції синаптосом попередньо одержаний осад ресуспендували у середовищі виділення та наносили на градієнт фіколлу, який містив 13%, 6%, 4% фіколл, приготований на середовищі виділення, і центрифугували при 70,000 g 45 хв на бакет-роторі. Фракцію синаптосом, що отримували в інтерфазі між 13% і 6% розчинами фіколлу, збирали, розводили середовищем виділення 1:4 та центрифугували при 15000 g 20 хв. Одержаний осад суспендували в стандартному сольовому розчині, який містив (в мМ): NaCl, 126; KCl, 5; CaCl2, 2; MgCl2, 1,4; NaH2PO4, 1,0; HEPES-NaOH, 20, pH 7,4; D-glucose, 10. Всі операції проводили при 0-4 °С. Всі розчини, які використовували в операціях виділення синаптосом та подальшого дослідження процесів транспорту нейромедіаторів постійно насичували киснем. Концентрацію протеїну визначали за методом Ларсона [86].

ATR-IR спеткри синаптосом були зареєстровані на спектрометрі INVENIO-R Bruker з використання приставки Bio-ATR, що була придбана за кошти проекту. Всі спектри були зареєстровані в області 650-3800 cm^{-1}, їм проведена корекція базової лінії та нормалізація на смугу 1650 cm^{-1} (Амід 1). З метою встановлення спектральних маркерів синаптосом таких, що втратили функціональну актвність та активних синаптосом, були проаналізовані FTIR-ATR спекти щойно виділених

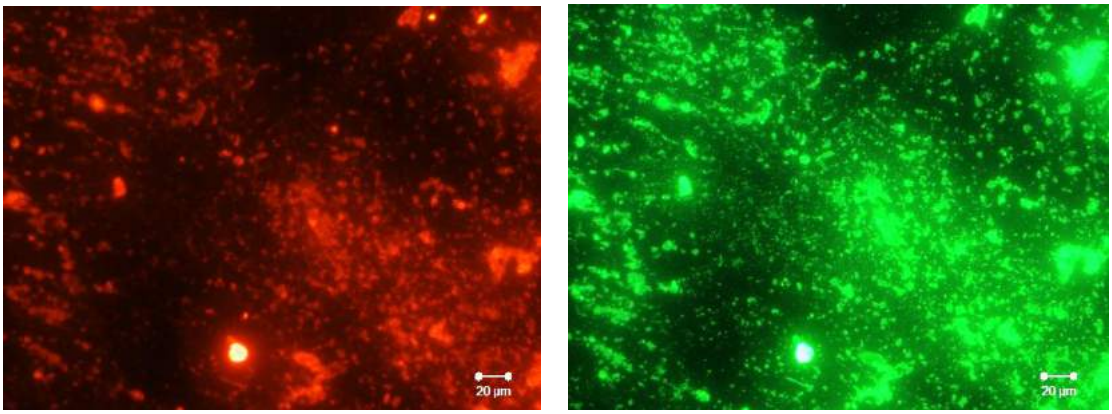
синаптосом, після інкубації впродовж 15 хвилин на водяній бані при температурі 37 градусів. Для порівняння, були проаналізовані спектри синаптосом, що зберігалися в холодильнику при температурі -20°C та втратили свою функціональну активність. За допомогою термошейкера синаптосоми інкубували при температурі 42 °C та 22 °C [120].

10.3. Візуалізація синаптосом методом конфокальної мікроскопії

Ми використовували конфокальну мікроскопію для візуалізації синаптосом. У наших попередніх статтях [87] було показано покращення контрасту зображень за допомогою підкладки, покритої наноструктурованим золотом. Тому ми використовували золоті підложки для візуалізації синаптосом. Зображення записували на конфокальному мікроскопі LCM 510 (Carl Zeiss, Germany) зі збудженням ультрафіолетовою лампом з використанням фільтрів FSet10wf, FSet20wf та FSet01wf. Об'єктив LD Plan-Neofluar 40x/0.6 Korr. Для кращого контрасту синаптосоми фарбували акридиновим оранжевим і наносили на золоті підложки. (Рис. 10.1 в, г). Результати порівнювали із зразками, нанесеними на скляні підкладки без фарбування (рис. 10.1 а, б). На знімках зображені об'єкти розміром близько 0,5-2 мкм, які можна віднести до синаптосом, і їх агрегати. Ці результати добре співвідносяться з літературними даними [88-90].



а б



в г

Рисунок 10.1 Конфокальні зображення синаптосом. Без фарбування на склі.
а – УФ збудження з Fset01wf синім фільтром, б – УФ збудження з Fset10wf зеленим фільтром.
Конфокальні зображення синаптосом, пофарбованих акридиновим оранжевим на золотій підложці (в – УФ збудження з Fset20wf червоним фільтром, г – УФ збудження з Fset10wf зеленим фільтром. Мітка 20 µм.

10.4. Область OH-NH-CH валентних коливань

Спектр синаптосом подібний до спектру клітини (рисунок 10.2-10.3). У діапазоні 3000-3400 $см^{-1}$ основний внесок у поглинання дає загальна білкова фракція з максимумом 3287 $см^{-1}$, що відноситься до коливань водневопов'язаних молекулярної групи NH - (смуга амід А). Ця смуга не є конформаційно чутливою, але чутлива до довжини та енергії водневих зв'язків і зміщується в область високої частоти в міру їх ослаблення. У нашому випадку зміна півширини чітко слідує за збільшенням інтенсивності смуги Аміду А з підвищенням температури. Це може свідчити про збільшення внеску слабких водневих зв'язків як плеча від високочастотної області без зміни частотного положення Amid1. Напівширина смуги OH-NH-CH становить, відповідно, для активних синаптосом (37°C) = 367, після інкубації при 22°C = 509, при 42°C = 392 і після заморожування при -20° C = 349 (Рисунок 62). Смуга Амід В на 3066 $см^{-1}$ також є результатом поглинання валентних коливань молекулярних груп NH білка з характерним резонансом Фермі між валентними NH і першим обертоном смуги Амід II, включаючи також NH [91-

92]. Смуга 3013 см$^{-1}$ може бути віднесена до кільцевих молекулярних груп CH_2 і CH_3 фосфоліпідів, білків і ДНК з переважним внеском білків.

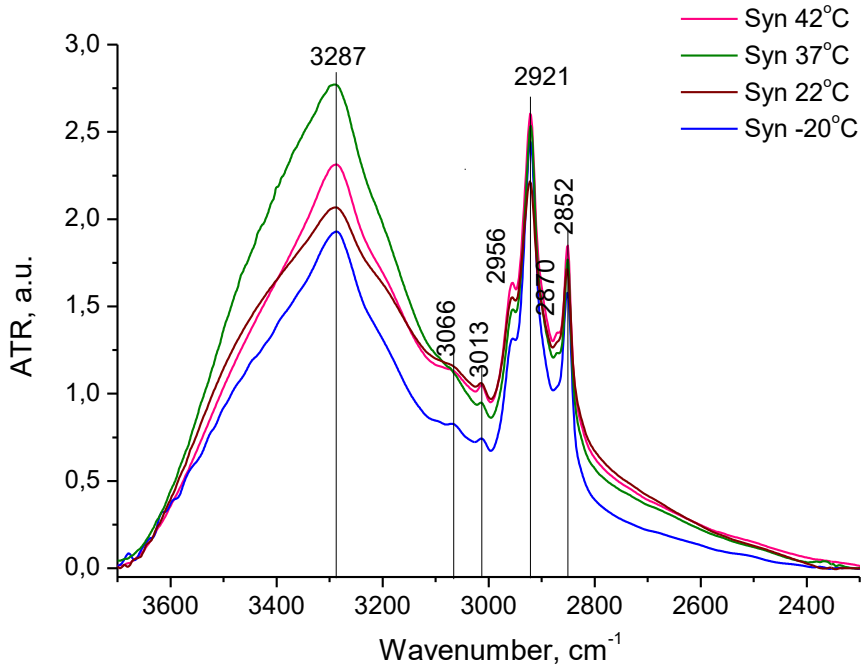


Рисунок 10.2 FTIR-ATR спектри синаптосом при різній температурі інкубації в області 2400- 3700 см$^{-1}$

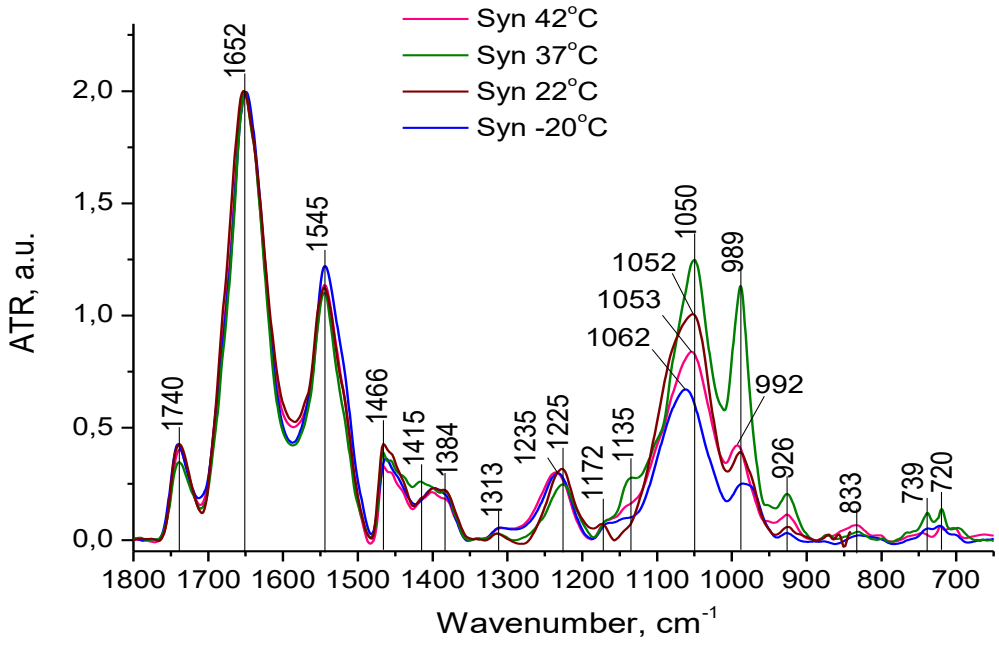


Рисунок 10.3 FTIR-ATR спектри синаптосом при різній температурі інкубації в області 1800 - 650 $см^{-1}$

У спектрі є досить інтенсивні характерні смуги валентних коливань CH_2 (2921, 2852 $см^{-1}$), CH_3 (2956, 2870 $см^{-1}$) молекулярних груп, які в основному належать до ліпідної фракції [92], а саме ліпідних хвостів. Зсувів частоти в положеннях цих смуг CH не спостерігається, але змінена інтегральна інтенсивність по відношенню до всієї смуги з максимумом 3287 $см^{-1}$ (Amid A). Відносна сумарна інтегральна інтенсивність смуги CH/Амід А становить (37°C) =0,19, після інкубації при 22°C = 0,22, при 42°C = 0,22 та після заморожування при -20°C = 0,79. Отже, можна спостерігати більш ніж у чотири рази зменшення внеску CH із підвищенням температури інкубації. Цей параметр може бути одним із маркерів активності синаптосом (рисунок 10.2).

10.5. Область Амід I та Амід II

В області смуг Амід I та Амід II (рисунок 10.2) спектральні зміни практично не спостерігаються, що свідчить про стабільність конформаційного стану білків, що входять до складу досліджуваних синаптосом, навіть при температурі 42°. С. Це означає, що вплив температурних режимів, які ми використовували в експерименті, не викликає конформаційних змін у білковій фракції. Можна відзначити лише незначне збільшення інтенсивності смуги Амід II у разі заморожування. Але основні зміни ми спостерігаємо в області молекулярних груп PO_2^- асиметричних коливань в області 1225-1235 $см^{-1}$ і симетричних коливань в області 1050-1062 $см^{-1}$ [72, 93].

Положення смуги асиметричних коливань PO_2^- функціонально активної синаптосоми становить близько 1225 $см^{-1}$, що відповідає певному конформаційному стану фосфатних груп ліпідів і ДНК. У функціонально неактивних синаптосомах ця смуга зміщена в область високих частот на 10 $см^{-1}$, а саме на 1235 $см^{-1}$. Так само високочастотний зсув спостерігається для асиметричних коливань молекулярних груп PO_2^- від 1050 $см^{-1}$ (при температурі 37°C) до 1062 $см^{-1}$ для зразка синаптосоми

після заморожування при -20°С. Такі особливості можуть свідчити про ослаблення водневих зв'язків у разі термічної обробки, відмінної від 37°С.

Ще одна дуже характерна ознака для синаптосом після заморожування при 37°С (які ми розглядаємо як повністю функціонально активні) – сильна смуга валентних коливань С-О на ділянці 989 $см^{-1}$. Смуга С-О в області 989 $см^{-1}$ по інтенсивності порівнянна зі смугою симетричного коливання PO_2^- (рисунок 62). В інших зразках ця смуга має форму плеча. Всі ці особливості грунтуються на зміні водневих зв'язків.

10.6. Визначення впливу холестеролу на взаємодію препаратів із ліпідною мембраною модельних мембранних міметиків

Не зважаючи на те, що основною мішенню для лікарських засобів є білки та нуклеїнові кислоти, а отже клітинне ядро, на шляху до нього препарати повинні пройти (чи не пройти) через клітинну мембрану, що являє собою багатокомпонентну структуру. Виходячи з мозаїчної моделі клітинної мембрани, можна уявити собі клітинну мембрану як фосфоліпідний матрикс та мембранні білки, що розподілені випадковим чином.

Однак, як показали більш сучасні дослідження, клітинна мембрана – це повністю динамічна, жива система, що активно взаємодіє та реагує на дію екзогенних та ендогенних факторів. Сучасні уявлення про структуру ліпідної мембрани ґрунтуються на теорії утворення ліпідних мікродоменів на поверхні мембрани, збагачених холестеролом і сфінголіпідами (lipid rafts) [94, 95]. Такі утворення характеризуються більш високою густиною та впорядкованістю структури (квазі- кристалічні утворення). Ці жорсткі мікродомени розподіляються у «морі» більш динамічних та менш концетрованих гліцерофосфоліпідів з ненасиченими ациловими ланцюгами. Їх фізико-хімічні характеристики визначаються такими параметрами як температура, наявність стеринів, кривизна, насиченість та довжина ланцюгів жирних кислот.

Незважаючи на те, що механізм генерації та підтримання ліпідних мікродоменів у плазматичних мембранах клітин ссавців та бактерій все ще є

суперечливим та може вважатися інтуїтивним, існує зовсім інший механізм зниження сприйнятливості до антибіотиків та препаратів, відомих як «ліпідна кластеризація» (a lipid clustering). Відповідно до цього механізму полікатіонні антибіотики будуть кластеризуватися разом з аніонними ліпідами та відокремлювати аніонні фосфоліпіди (фосфатидилгліцерол (PG) та кардіоліпін (CL)) від цвіттерионного фосфатиділетаноламіну (PE). Такий латеральний поділ фаз ставить під загрозу бар'єр проникності і робить бактерії менш сприйнятливими до дії катіонних антибіотиків, тоді як в бактеріальній мембрані містяться переважно негативно заряджені ліпіди [96,97].

Дослідження дії мембранотропних агентів можна провести на різних рівнях структурної організацій модельних ліпідних систем - мембранних міметиків. Міметики - штучні наноматеріали, що імітують властивості біоматеріалів, або створені на основі принципів, реалізованих в живій природі. Відомі на сьогодні біоміметічні гідрогелі, біоміметічні міцели, біоміметічні ліпосоми, та ін.

В даній роботі ми створюємо біоміметичні моделі мембрани вірусу Sars-Cov-2 та мембрани клітин легеневого епітелію людини.

З метою визначення впливу холестеролу на взаємодію препаратів із ліпідною мембраною модельних мембранних міметиків, були досліджені системи з різною концентрацією холестеролу, а саме сфінгомієлін50% + холестерол50%, сфінгомієлін 70% + холестерол30% та сфінгомієлін 90% + холестерол10%. Окрім цього, до цих систем додавли в першому випадку фосфоліпід DOPC, та в другому випадку ремдесивір, та слідкували за структурними та конформаційними перебудовами в модельних ліпідних системах. Модельні ліпосоми були отримані за допомогою стандартної процедури, що включає приготування стокових розчинів ліпідів в хлороформі, змішування їх у відповідних пропорціях, висушування хлороформу з подальшим ресуспензуванням ліпідів у фосфатному буфері, а також ультразвукову обробку з почерговими циклами заморожування в рідкому азоті та розморожування.

Спектри ATR-IR були зареєстровані на спектрометрі INVENIO-R (Bruker) за допомогою приставки BioATRII (придбана за кошти проекту). Всі зареєстрованим

спектрам була проведена корекція базової лінії на нормування на смугу в області 1644 $см^{-1}$ (C=O).

Проаналізувавши спектри експериментальних зразків можна зробити висновок, що найбільші відмінності в структурі модельних систем в залежності від вмісту холестеролу стосуються фосфатних груп та деформаційних коливань CH. Маркерні області для ліпідних рафтів можна визначити наступні: 1670-1640 (C=O), 1570-1520 (C-NH_3+), область 1400-1364 (CH2 деформаційні коливання). Для формування впорядкованих структур визначальними характеристичними піками є 1400, 1644 і пік 1548 [123]. Основна гіпотеза згідно літератури та нашого припущення полягає в тому, що ремдесивір впливає на ті місця мембрани, де є порядок, а саме там, де утворюються ліпідні рафти, тому при додаванні ремдесивіру до ліпідної суміші структура гелю, як у випадку без ремдесивіру, не змінюється. Тобто ремдесивір здатний порушувати структуру ліпідних рафтів, які накопичують рецептори до білка С коронавірусу, що в свою чергу перешкоджає проникненню вірусу в здорові клітини[123,117].

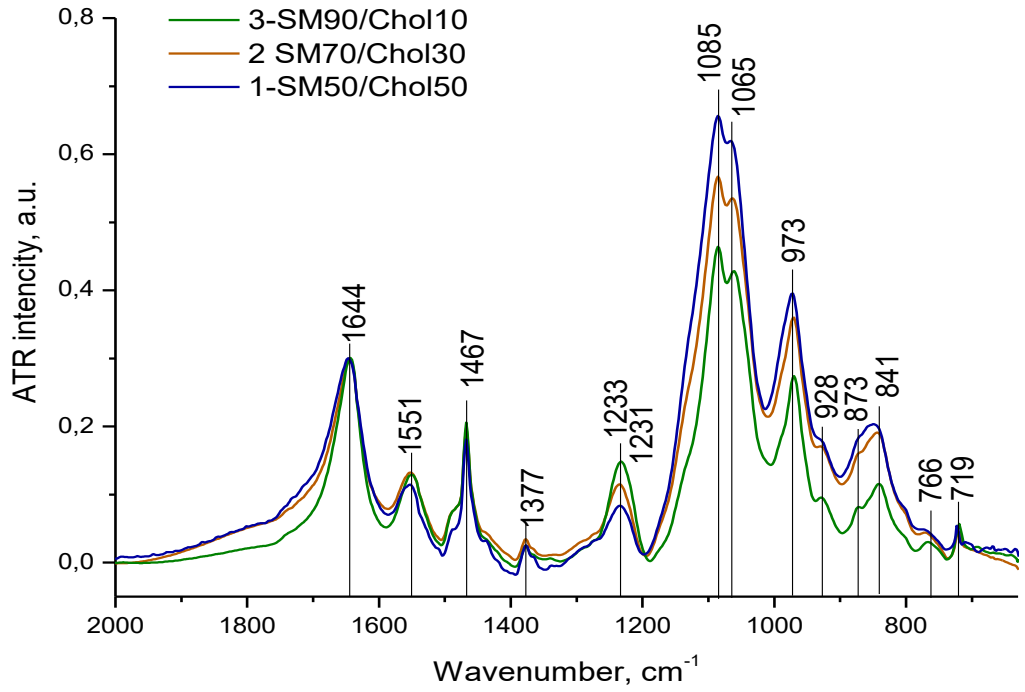


Рисунок 10.4 ATR-IR спектри ліпосом сфінгомієлін90%+холестерол10%, сфінгомієлін70%+холестерол30%, сфінгомієлін50%+холестерол50%

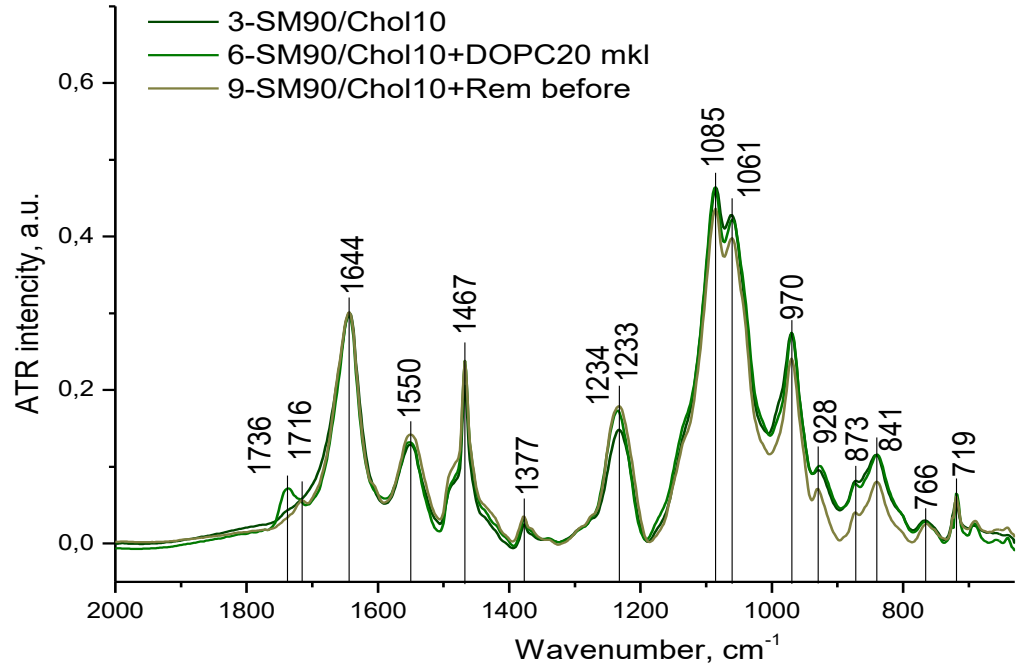


Рисунок 10.5 ATR-IR спектри ліпосом сфінгомієлін90%+холестерол10%, сфінгомієлін90%+холестерол10%+DOPC, сфінгомієлін90%+холестерол10%+ ремдесивір

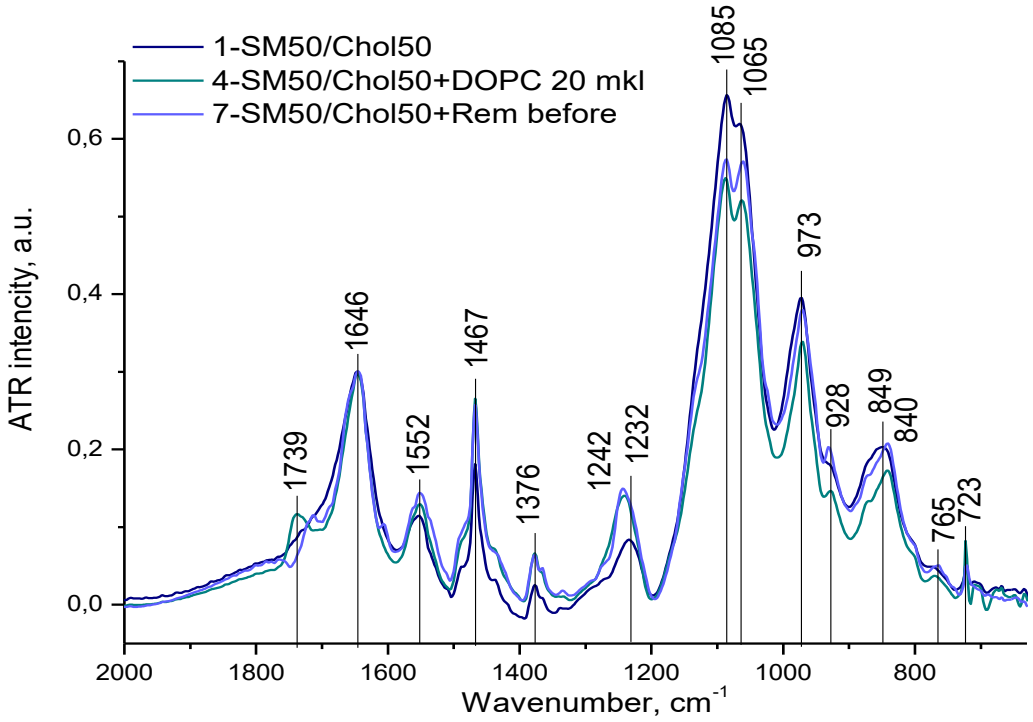


Рисунок 10.6 ATR-IR спектри ліпосом сфінгомієлін50%+холестерол50%, сфінгомієлін50%+холестерол50%+DOPC, сфінгомієлін50%+холестерол50%+ ремдесивір

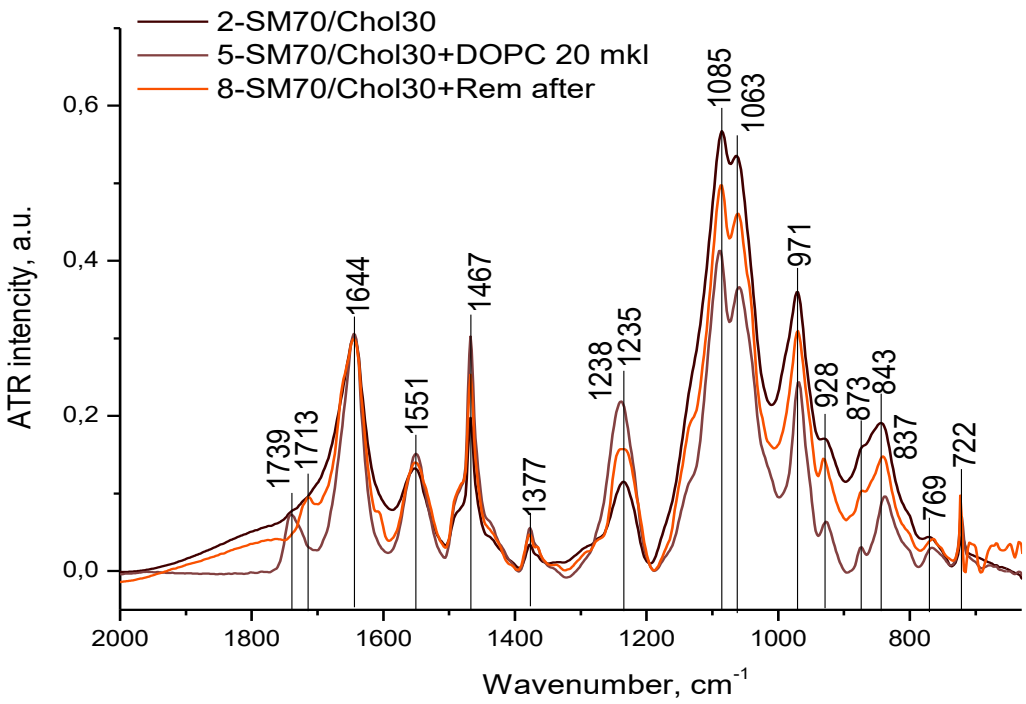
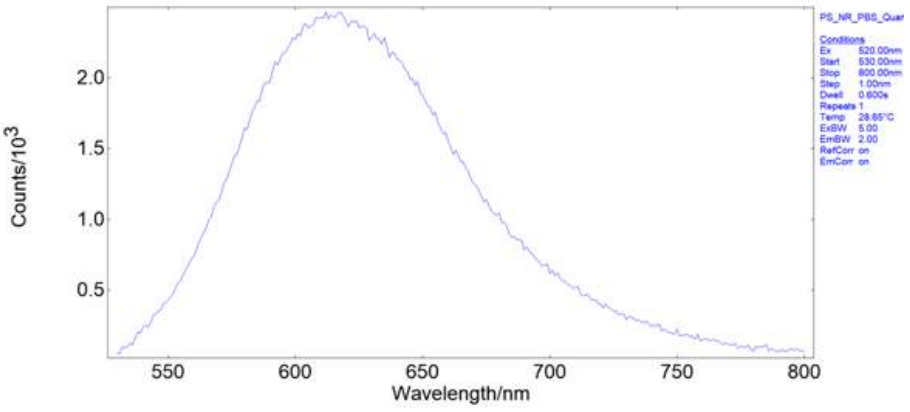
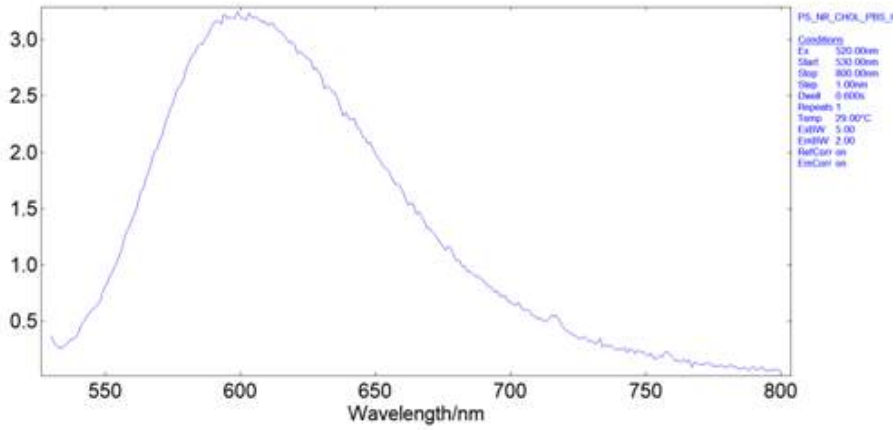


Рисунок 10.7 ATR-IR спектри ліпосом сфінгомієлін70%+холестерол30%, сфінгомієлін70%+холестерол30%+DOPC, сфінгомієлін70%+холестерол30%+ ремдесивір

Дані флуоресценції (рисунок 10.8) показують зміну положення характеристичних маркерів в залежності від зміни складу модельної системи.



а



б

Рисунок 10.8 Спектри флуоресценції зонду NR12S на ліпосомах PS (а) та PS+CHOL (б). (Дані зареєстровані на спектрометрі Edinburg instruments FS-5, що був придбаний за кошти проекту).

10.7. Висновки до розділу 10.

1. Спектральні маркери синаптосом виявлено в області 650-3700 $см^{-1}$. Синаптосоми є цілісними субклітинними структурами розміром 0,5-2 мкм, візуалізовані за допомогою конфокальної мікроскопії, що корелює з даними літератури.

2. Показано, що як за умови інкубації при низьких температурах (замерзання при -20 °С), так і високих (+42 °С) не зареєстровано конформаційних змін у білковій фракції синаптосом, що може свідчити про збереження їх функціональної активності.

3. Зафіксовані спектральні зміни в області смуг PO_2^- та водневих зв'язків можуть стосуватися змін структури ліпідної мембрани в досліджуваних зразках.

РОЗДІЛ 11. ОЦІНКА МОЖЛИВОСТІ СЕЛЕКТИВНОГО ВПЛИВУ НА ВІРУСНІ МЕМБРАНИ ЗА ДОПОМОГОЮ МЕМБРАНОТРОПНИХ ЛІКІВ НА ОСНОВІ ФІЗИЧНИХ ВІДМІННОСТЕЙ ВІРУСНИХ ТА КЛІТИННИХ МЕМБРАН.

На основі отриманих результатів можна зробити висновок, що принципово можливо досягти селективності у взаємодії мембранотропних ліків з вірусними мембранами на основі їх фізичних відмінностей від клітинних мембран, однак така селективність вимагає особливого напрямленого дизайну молекул лікарських препаратів. Враховуючи те, що ліпідний склад вірусних мембран повторює склад внутрішніх мембран інфікованих клітин, селективними таргетами можуть бути відмінності у складі плазматичної мембрани та мембран органел. Досягнення селективністі на основі кривизни мембрани є малоймовірним оскільки її вплив на базові фізичні властивості значно менший ніж вплив різниці у ліпідному складі і не відрізняється достатньо суттєво у вірусних оболонок та мембран клітинних органел, що детально розглянуто в роботі [122].

11.1. Висновки до розділу

Селективність впливу на вірусну мембрану зосереджена в її складі, що повторю склад плазматичної мембрани клітини та її органел і не залежить від кривизни мембрани..

РОЗДІЛ 12. РОЗРОБКА РЕКОМЕНДАЦІЙ ЩОДО ДИЗАЙНУ НОВИХ ПРЕПАРАТІВ, ЯКІ МАТИМУТЬ БІЛЬШИЙ ВПЛИВ НА ВІРУСНІ МЕМБРАНИ.

Сучасна фармацевтика виробляє все більшу кількість гідрофобних та амфіфільних препаратів, які в основному націлені на конкретні білки в клітинах. Більшість з них є токсичними для пацієнтів, якщо їх застосовувати у більш високій дозі, ніж вимагає FDA. Через погану розчинність у воді такі препарати мають сильну спорідненість до агрегатів ліпідів, таких як клітинні мембрани, ліпопротеїни крові, бактеріальні оболонки тощо. Для пацієнтів ця спорідненість зазвичай визнається нешкідливим побічним ефектом, тому досліджень взаємодії поширених препаратів із мембранами та ліпідними агрегатами мало.

Гідрофобні та амфіфільні препарати, які синтезуються та використовуються як корисні та безпечні, можуть викликати побічні та небезпечні ефекти через специфічні фізико-хімічні взаємодії з мембранами клітин, бактерій чи грибів.

Для запобігання, контролю та уникнення таких побічних ефектів успішним рішенням є глибоке вивчення фізико-хімічних та біологічних параметрів, що контролюють перші контакти лікарських засобів з мембранами, та подальших механізмів накопичення, взаємодії та модифікації структури мембрани та властивості лікарських препаратів. Ці розуміння дозволять вченим та державним органам оцінити, чи потрібні нові протоколи випробувань та норми щодо ліків.

Аналоги нуклеотидів як антивірусні препарати на основі малих молекул досліджуються протягом багатьох років і становлять основу лікування вірусних інфекцій, включаючи ВІЛ, вірус гепатиту В та герпесвірусні інфекції. У минулі роки, аналоги нуклеозидів/нуклеотидів все частіше визнавали потенційними противірусними засобами націлені на інші віруси з позитивним ланцюгом РНК. За останні роки суттєві фармакологічні досягнення в розробці нуклеозидних аналогів були зроблені на основі дослідження зв'язку структури та активності, які покращили

фармакокінетику, противірусну активність і селективність. Аналоги нуклеозидів вимагають внутрішньоклітинної активації , а саме фосфорилювання, щоб стати їх активними метаболітами.

Одним з найважливіших етапів і досягнень стало додавання монофосфатного залишку до нуклеозиду для створення про-ліків, що значно покращило внутрішньоклітинну доставку та активацію. Саме такий підхід був використаний для оптимізації попередників ремдезивіру під назвою GS-441524.

Вихідна молекула ремдезивіру, GS-441524, була отримана з близько 1000 різноманітних аналогів нуклеозидів і нуклеозидфосфонатів, що були зібрані протягом багатьох років противірусних досліджень на основі їх потенційної здатності впливати на нові РНК-віруси, такі як SARS-CoV та MERS-CoV коронавірусів. Ці зусилля врешті привели до ідентифікації GS-5734, як найбільш перспективного, пізніше перейменований в ремдесивір. Він мав широкий противірусний спектр, в т.ч. EBOV, вірус Марбурга, респіраторно-синцитіальний вірус (RSV), HCV та інших вірусів. Сприятливі результати in vitro стимулювали подальші дослідження.

Розроблені в цій роботі модельні мембранні системи можуть надалі використовуватися для оцінки впливу новітніх противірусних препаратів на мембрани вірусів з різним ліпідним складом. Запропоновано зосередити пошук нових противірусних препаратів в напрямку саме аденозинових похідних, а не інших нуклеозидних аналогів. При розрахунку терапевтичних доз препаратів потрібно враховувати нейротропні ефекти.

12.1. Висновки до розділу

Модельні мембранні системи, що розроблені в цьому проєкті, можуть надалі використовуватися для оцінки впливу нових противірусних та тромболітичних препаратів на мембрани вірусів та клітини з різним ліпідним складом.

Запропоновано звернути серйозну увагу на розробку нових противірусних препаратів в напрямку саме аденозинових похідних, а не інших нуклеозидних аналогів, з наголосом на врахуванні нейтропних ефектів при розрахунках терапевтичних доз препаратів.

РОЗДІЛ 13. ВИЗНАЧИТИ ВПЛИВ МЕМБРАНОТРОПНИХ ПРЕПАРАТІВ НА ПОРОУТВОРЕННЯ У ПЛАСКІЙ БІШАРОВІЙ МЕМБРАНІ.

13.1. Формулювання завдання.

Визначити вплив мембранотропних препаратів на пороутворення у пласкій бішаровій мембрані.

13.2 Вплив ремдесивіру та тікагрелору на мембранну активність методом бішарових ліпідних мембран (БЛМ), що містять холестерол

Дія ремдесивіру та тікагрелору була досліджена на БЛМ [98], що вміщувала фосфатидилхолін та холестерин у ваговому співвідношенні (2:1). Ремдесивір або тікагрелор додавали у водний розчин 100 мМ KCl з одного боку (цис-сторона) БЛМ. Загальна концентрація ліпідів в суміші становила 20 мг/мл при співвідношенні стерол/фосфоліпід 1:2 по вазі. Селективність модифікованої ремдесивіром БЛМ вимірювали у 10-кратному градієнті концентрації хлориду калію (100 мМ хлорид металу з боку прикладання потенціалу і 10 мМ хлорид того ж металу з протилежного боку мембрани) при pH 7,4 з обох боків БЛМ.

Додавання 100 мкМ ремдесивіру у комірку з мембраною, яка вміщувала ФХ/холестерол у ваговому співвідношенні 2:1, призводило до появи стрибкоподібних зростань трансмембранного струму, що свідчить про утворення наскрізних отворів пор (Рис. 13.1). Причому, також спостерігались швидкі зменшення струму на величини попередніх зростань, що свідчить про тимчасове закриття утворених в мембрані наскрізних отворів поодиноких пор (Рис. 13.1). Найвірогідніша провідність поодинокої пори, утвореної ремдесивіром в БЛМ знаходилась у межах від ~10 пікрСм до ~360 пікоСм при мембранному потенціалі +100 мВ (Рис. 13.1, вставка). Схожий розподіл провідностей поодиноких пор препарату в БЛМ також спостерігався при негативному потенціалі -100 мВ, прикладеному з того ж боку мембрани за винятком появи більших за розміром збільшень трансмембранного струму (Рис. 13.1).

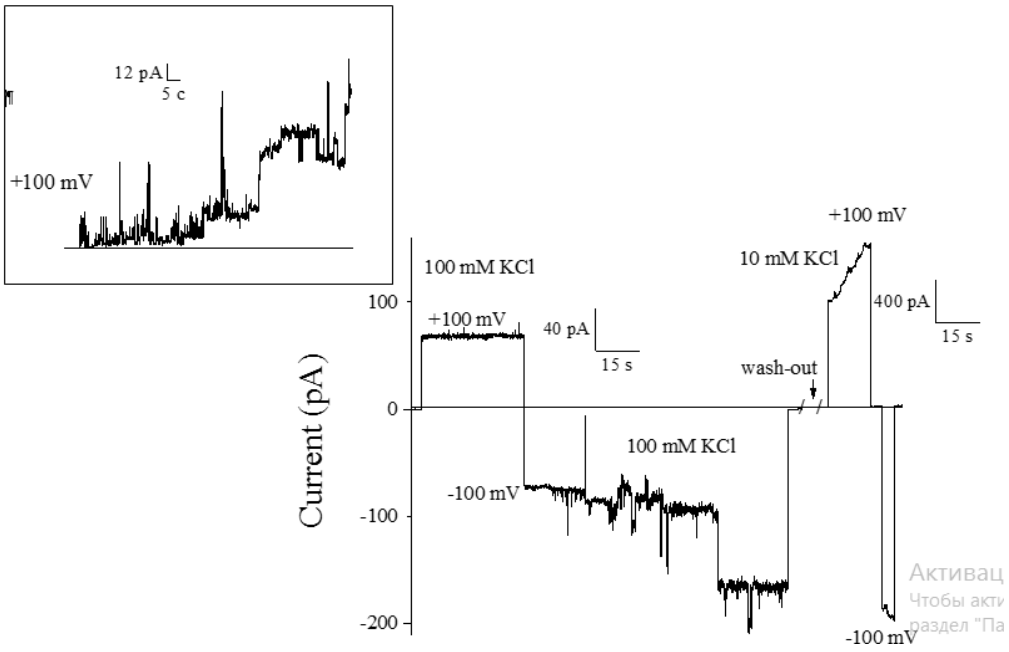


Рисунок 13.1 Запис залежностей трансмембранних струмів від часу порами ремдесивіру у БЛМ із ФХ/холестерину (співвідношення по вазі 2:1) та провідностей поодиноких пор. Ремдесивір додавали з цис-боку у кінцевій концентрації 100 мікроМ. БЛМ обмивалась розчином 100 мМ KCl (pH 7.4). Мембранний потенціал +100 мВ (струм показаний над нульовою лінією) та -100 мВ (див. нижче лінії нуля) прикладений з боку, протилежному боку додавання препарату. Відкриття поодиноких пор – стрибко-подібні зростання зверху униз при -100 мВ. Щільною лінією позначено нульовий струм. Для позбавлення від ємнісного ефекту мембрани запис струму проводили за 1–2 с після прикладення напруги. Селективність визначали шляхом вимірювання потенціалу реверсії після заміни симетричного розчину 100 мМ KCl (pH 7.4) на 10 мМ KCl (pH 7.4) з боку додавання препарату (цис-сторона). Запис припиняли на час перфузії, після чого відновлювали для визначення зміни потенціалу нульового струму. Вставка: Відкриття пор показано як зміна струму знизу уверх при +100 мВ у симетричному розчині 100 мМ KCl (pH 7.4). Щільною лінією позначено нульовий струм.

Утворення трансмембранних пор ремдесивіром в БЛМ при позитивних і негативних потенціалах свідчить про те, що значення мембранного потенціалу не є абсолютно необхідною умовою цього процесу, хоча прикладання позитивного

потенціалу (+100 мВ) з боку додавання ремдесивіру зменшувало час, необхідний для утворення пор та збільшувало швидкість цього процесу порівняно з негативним потенціалом (-100 мВ) (Рис. 13.1, 13.2). Тому, полегшення процесу пора-утворення препаратом цілком відповідає фізіологічним умовам за яких позитивний потенціал спокою назовні потенційних клітин-мішеней активує вбудовування молекул ремдесивіру із водно-сольового розчину з того ж боку клітини завдяки присутності у молекулі препарату чисельних позитивно заряджених груп, що вміщують азот.

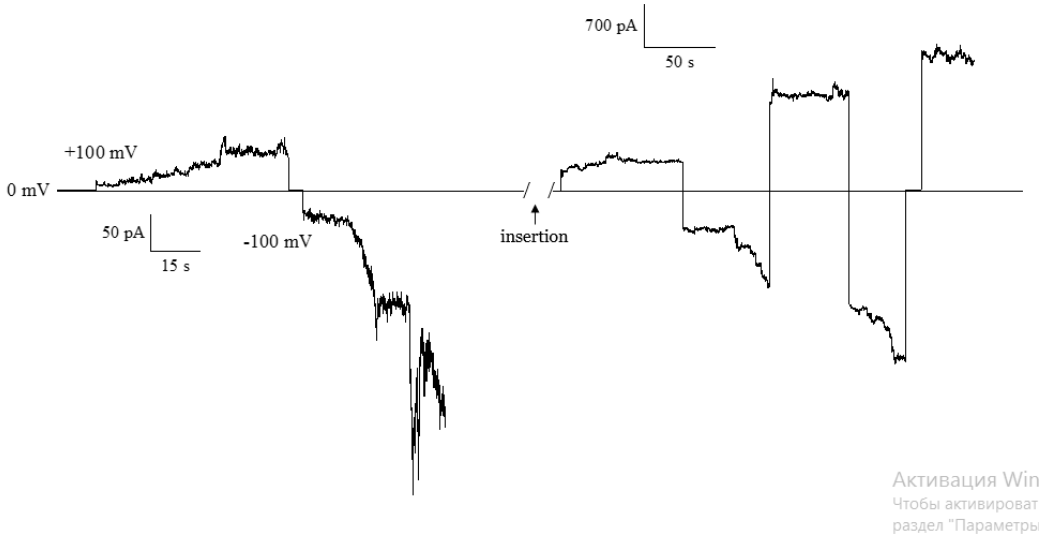


Рисунок 13.2 Запис трансмембранного струму, який демонструє залежність пора-утворення ремдесивіру в БЛМ із ФХ/холестеролу (вагове співвідношення 2:1) від знаку мембранного потенціалу. Ремдесивір додавали у кінцевій концентрації 100 мікроМ. БЛМ знаходилась у розчині 100 мМ KCl (pH 7.4). Струми спостерігали при потенціалі +100 mV (над нульовою лінією) та -100 мВ (під нульовою лінією), прикладеному з боку, протилежному боку додавання ремдесивіру. Щільною лінією позначено нульовий струм. Запис припиняли на час інтенсивного вбудовування та поновлювали для визначення потенціалозалежності струму, який зростав стабільно.

Зростаюча кількість стабільних, майже постійно відкритих пор утворювала сумарний сталий струм багатьма наскрізними порами в мембрані (Рис. 13.2). Зростання трансмембранного струму порами препарату також зупиняла перфузія розчином без ремдесивіру, що свідчить на користь незворотного зв’язування

молекул ремдесивіру з стерол-вмісним майже електрично-нейтральним фосфоліпідним бішаром. Результат прикладення градієнту напруги на значення провідностей поодиноких пор та сталий струм модифікованою препаратом БЛМ досліджували шляхом переключення потенціалу в межах ±100 мВ (Рис. 13.1, 13.2). Сталий макроскопічний струм, індукований ремдесивіром у холестерол-вмісній фосфоліпідній мембрані не виявив значної залежності від знаку мембранного потенціалу (коефіцієнт асиметричності 0.9 (Рис. 13.1). Лінійна вольт-амперна залежність при позитивних та негативних потенціалах, прикладених з боку, протилежного тому, з якого додавали ремдесивір також свідчить про те, що при потенціалах вдвічі менших (±50 мВ) провідність поодиноких пор та сумарний сталий струм також зменшиться удвічі.

Потенціал Нернста, визначений в умовах 10-кратного градієнту KCl з різних боків ФХ/холестеринової мембрани становив 0 mV (Рис. 13.1), що свідчить про відсутність вибірковості пор, утворених ремдесивіром до катіонів або аніонів [99].

Лінійна вольт-амперна характеристика та відсутність іонної селективності, визначені для сталого струму модифікованою ремдесивіром БЛМ свідчить про відсутність переваги вхідного над вихідним струму іонів порами препарату у плазматичній мембрані чутливих клітин в умовах, коли препарат знаходиться з зовнішньо-клітинного боку.

Перевірка мембранної дії тікагрелору не виявила великих змін провідності БЛМ при концентраціях 0,5-5 нМ препарату в комірці з БЛМ (Рис. 13.3), що свідчить на користь відсутності значних фізіологічно-важливих побічних ефектів цього препарату, пов’язаних з впливом на мембрани клітин пацієнтів.

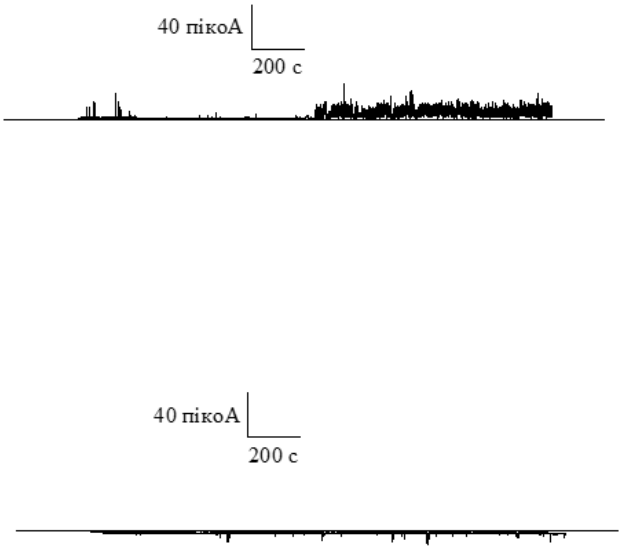


Рисунок 13.3. Відсутність значного впливу тікагрелору на провідність БЛМ (ФХ/холестерин) (2:1) при потенціалах ± 50 мВ. Концентрація тікагрелору у комірці 5 нМ. Зверху – запис трансмембранного струму при позитивному потенціалі. Знизу – запис трансмембранного струму при негативному потенціалі. Потенціал прикладено з сторони БЛМ, протилежному стороні додавання препарату.

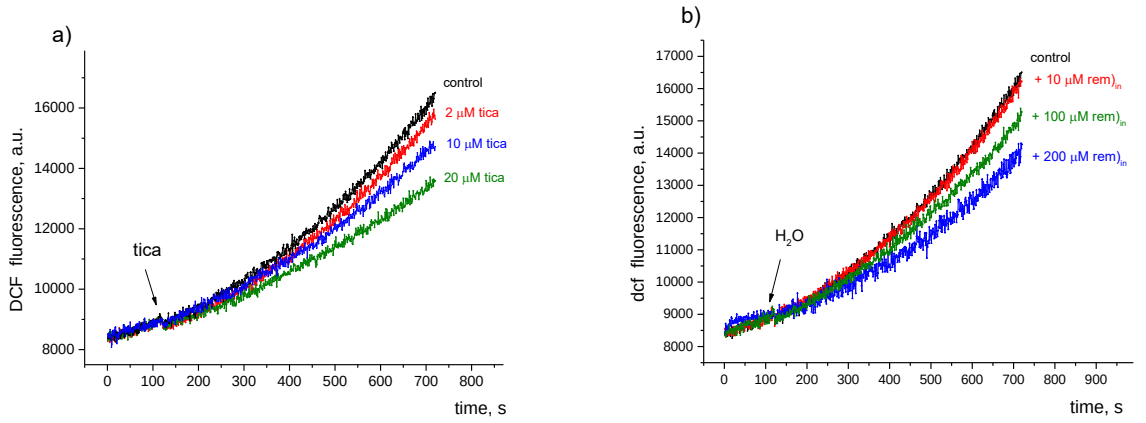
Хоча, ремдесивір прикладали до ліпідного бішару у концентраціях ~ в 25-100-разів вище за таку, що існує в плазмі [100], одержані результати дозволяють вважати цей ремдесивір цитотоксичним через можливе утворення неселективних та непотенціалозалежних пор у плазматичній мембрані споріднених потенційних клітин-мішеней. Виток іонів та інших життєво-важливих складових клітини порами ремдесивіру може призводити до дисипації електрохімічного градієнту плазматичної мембрани або навіть руйнування чутливої до препарату клітини. Унаслідок цього можуть виникати такі ефекти сторонньої дії як низький вміст еритроцитів або тромбоцитоз, що призводить до утруднення дихання та ускладнень, пов’язаних з погіршенням функцій різних органів пацієнтів [101].

Таким чином, показано, ремдесивір спроможний збільшувати провідність БЛМ шляхом утворення відносно стабільних потенціалозалежних неіоноселективних пор у кінцевій концентрації в комірці з БЛМ 100 мкМ.

Прикладання позитивного потенціалу (+100 мВ) з боку додавання препарату полегшувало процес взаємодії з ліпідним бішаром в середовищі з 100 мМ KCl (pH 7.4), порівняно з негативним потенціалам (-100 мВ) та меншими за значенням позитивними або негативними потенціалами +50 мВ та -50 мВ. Провідність пор, утворених ремдесивіром знаходилась у межах між ~ 10 пікоСм та 650 пікоСм, що дозволяє вважати можливим процес утворення кластерів найменшою із визначених іонопровідних структур з провідністю 10 пікоСм та/або присутність значно більших за розміром часточок препарату також спроможних до пора-утворення в БЛМ. Відсутність будь-якої вибірковості до катіонів або аніонів, а також суттєвої потенціалозалежності сумарного сталого струму порами ремдесивіру в БЛМ дозволяє вважати майже однаковим внесок вхідного та вихідного струмів модифікованою препаратом мембраною за фізіологічних умов, коли ремдесивір знаходиться із зовнішнього боку клітини. Одержані результати дозволяють заключити, що утворення наскрізних пор у мембранах клітин може бути одним із різновидів токсичної дії ремдесивіру, спроможних спричиняти побічні ефекти у хворих. Перевірка мембранної дії тікагрелору не виявила значних змін провідності БЛМ при концентраціях 0,5-5 нМ препарату в комірці з БЛМ.

13.3 Спонтанна генерація активних форм кисню (АФК) в нервових терміналях за присутності ремдесивіру та тікагрелору

Щоб з’ясувати як ремдесивір та тікагрелор впливали на окислювально-відновний стан нервових терміналей, проводився моніторинг генерації АФК з використанням флуоресцентного барвника 2', 7'-дихлордигідрофлуоресцеїнадіацетату (H2-DCFDA). На рисунку 13.4 показано спонтанне утворення АФК у синаптосомальній суспензії у контролі та за присутності ремдесивіру та тікагрелору у різних концентраціях. Спонтанне генерування АФК послаблювалось за присутності ремдесивіру та тікагрелору залежно від дози, що було продемонстровано зменшенням інтенсивності флуоресценції зонду DCF.



а б

Рисунок 13.4 Дозозалежний вплив тікагрелору (а) та ремдезивіру (б) на спонтанне генерування АФК в нервових закінченнях. а) тікагрелор (tica) додавали до синаптосом, попередньо завантажених H2-DCFDA (5 мкМ) через 2 хв реєстрації АФК; б) синаптосоми попередньо інкубували з різними концентраціями ремдезивіру (rem) та H2-DCFDA (5 мкМ), а потім додавали воду.

13.5. Висновки до розділу

1. Показано, що ремдесивір спроможний збільшувати провідність БЛМ шляхом утворення стабільних потенціалозалежних неіоноселективних пор в БЛМ. Провідність пор, утворених ремдесивіром знаходилась у межах між ~ 10 пСм та 650 пСм, що дозволяє передбачити процес утворення кластерів.

2. Перевірка мембраннотропної дії тікагрелору не виявила значних змін провідності БЛМ при концентраціях 0,5-5 нМ.

3. Показано, що ремдесивір та тікагрелор дозо-залежно знижували спонтанну, H_2O_2 –стимульовану та каїнат-стимульовану генерацію АФК у нервових терміналях

РОЗДІЛ 14. ДОСЛІДИТИ ДІЮ ПРЕПАРАТІВ НА КЛЮЧОВІ ХАРАКТЕРИСТИКИ СИНАПТИЧНОЇ ПЕРЕДАЧІ У НЕРВОВИХ ТЕРМІНАЛЯХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ: НАКОПИЧЕННЯ ТА ВИВІЛЬНЕННЯ ГЛУТАМАТУ ТА ГАМК, ЄКЗОЦИТОЗ, МЕМБРАННІЙ ПОТЕНЦІАЛ, АЦИДІФІКАЦИЮ СИНАПТИЧНИХ ВЕЗИКУЛ, СПОНТАННУ ТА СТИМУЛЬОВАНУ ГЕНЕРАЦІЮ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ.

14.1. Формулювання завдання.

Дослідити дію препаратів на ключові характеристики синаптичної передачі у нервових терміналях головного мозку щурів: накопичення та вивільнення глутамату та ГАМК, єкзоцитоз, мембранній потенціал, ацидіфікацію синаптичних везикул, спонтанну та стимульовану генерацію активних форм кисню.

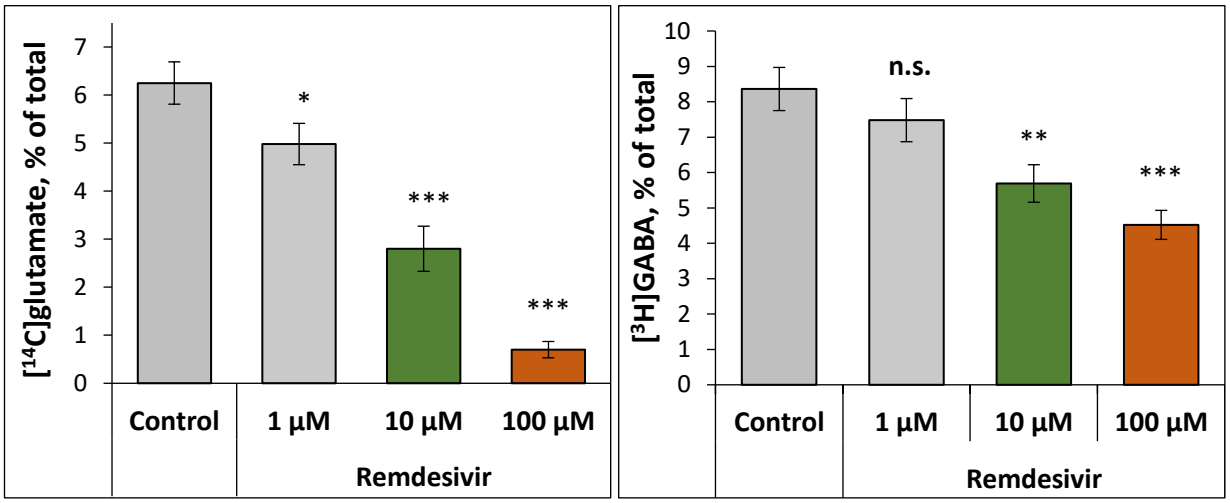
14.2 Вивільнення L-[^{14}C] глутамату та [^{3}H] ГАМК з нервових закінчень за дії ремдесивіру

KCl (35 мМ) - індуковане Ca^{2+}-залежне вивільнення L-[^{14}C] глутамату з нервових закінчень шляхом екзоцитозу було зменшено ремдесивіром залежно від дози (Рис. 67 а). Значення вивільнення становило 6,25 ± 0,44 % загальної мітки синаптосом у контролі, 4,98 ± 0,43 % загальної мітки синаптосом за присутності ремдесивіру у концентрації 1 мкМ [$F(1,22) = 4,67$; $p < 0,05$; $n=12$], 2,80 ± 0,47 % загальної мітки синаптосом за присутності ремдесивіру у концентрації 10 мкМ [$F(1,22) = 18,02$; $p < 0,001$; $n=12$], 0,70 ± 0,17 % загальної мітки синаптосом за присутності ремдесивіру у концентрації 100 мкМ [$F(1,22) = 63,49$; $p < 0,001$; $n=12$].

Ca^{2+}-залежне вивільнення [^{3}H] ГАМК з нервових закінчень щляхом екзоцитозу стимулювалося KCl (15 мМ) і вимірювалося під час блокування опосередкованого транспортером поглинання ГАМК NO-711 (30 мкМ). 1 мкМ ремдесивіру не змінював вивільнення [^{3}H] ГАМК з нервових закінчень шляхом екзоцитозу, тоді як 10 мкМ ремдесивір і вищі його концентрації знижували це вивільнення. Як показано на рисунку 14.1 б, вивільнення становило 8,36 ± 0,61 % загальної мітки синаптосом у контролі, 7,48 ± 0,63 % загальної мітки синаптосом за присутності ремдесивіру у

концентрації 1мкМ [F(1,22) = 1,14; p = 0,3; n=12], 5,69 ± 0,53 % загальної мітки синаптосом за присутності ремдесивіру в концентрації 10 мкМ [F(1,22) = 11,91; p < 0,01; n=12] та 4,52 ± 0,41 % загальної мітки синаптосом за присутності ремдесивіру у концентрації 100 мкМ [F(1,22) = 29,65; p < 0,001; n=12].

Таким чином, ремдесивір у концентрації 1 мкМ не мав суттєвого впливу на вивільнення [^{3}H] ГАМК шляхом екзоцитозу, але впливав на вивільнення L-[^{14}C] глутамату з нервових терміналей шляхом екзоцитозу. Збільшення концентрації препарату до 10 мкМ та 100 мкМ викликало значне дозозалежне зниження цього параметра для обох нейромедіаторів.

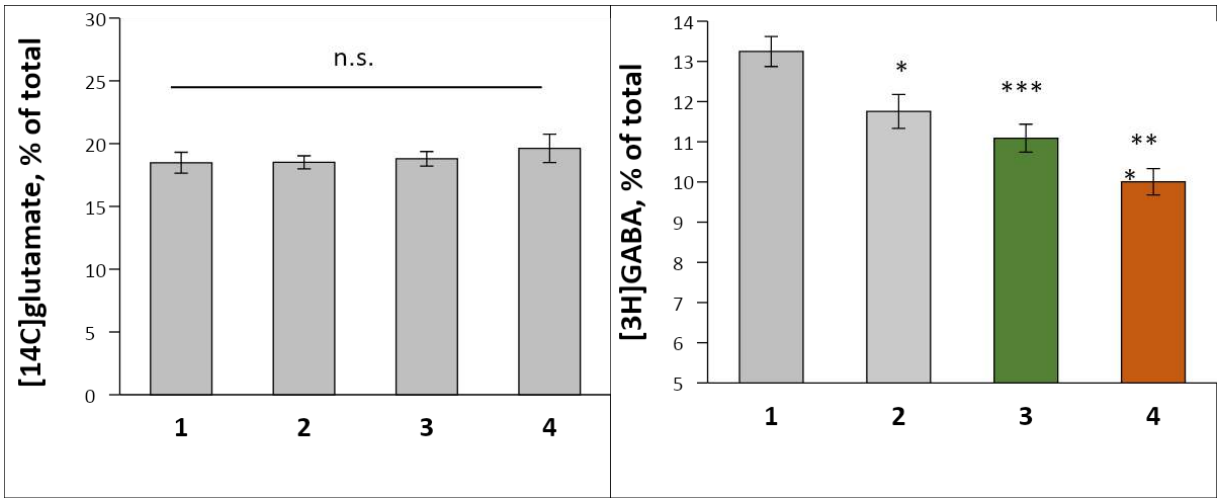


а б

Рисунок 14.1 а, б – викликане деполяризацією Ca^{2+}-залежне вивільнення L-[^{14}C] глутамату (а) і [^{3}H] ГАМК (б) з нервових закінчень шляхом екзоцитозу у контролі та за присутності ремдесивіру в концентраціях 1, 10, 100 мкМ. Даними є середнє значення ± SEM. н.с., суттєвих відмінностей немає; *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001, порівняно з контролем; n = 12.

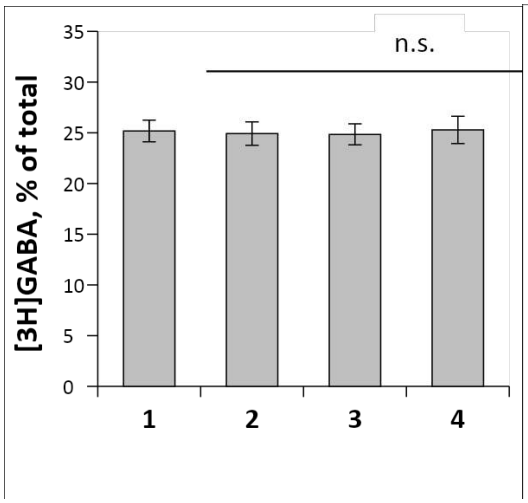
14.3 Позаклітинний рівень L-[^{14}C] глутамату і [^{3}H] ГАМК, а також тонічне витікання [^{3}H] ГАМК з нервових закінчень за дії ремдесивіру

Як показано на рисунку 14.2 а, позаклітинний рівень L-[^{14}C] глутамату не змінювався за присутності ремдесивіру у концентраціях 1, 10, 100 мкМ, що дорівнювало 18,48 ± 0,83 % загальної мітки синаптосом у контролі, 18,51 ± 0,52 % загальної мітки синаптосом за присутності ремдесивіру в концентрації 1 мкМ [F(1,22) = 0,001; p = 0,97; n=12], 18,79 ± 0,58 % загальної мітки синаптосом за присутності ремдесивіру в концентрації 10 мкМ [F(1,22) = 0,1; p = 0,75; n=12], 19,62 ± 1,13 % загальної мітки синаптосом за присутності ремдесивіру в концентрації 100 мкМ [F(1,22) = 0,69; p = 0,41; n=12].

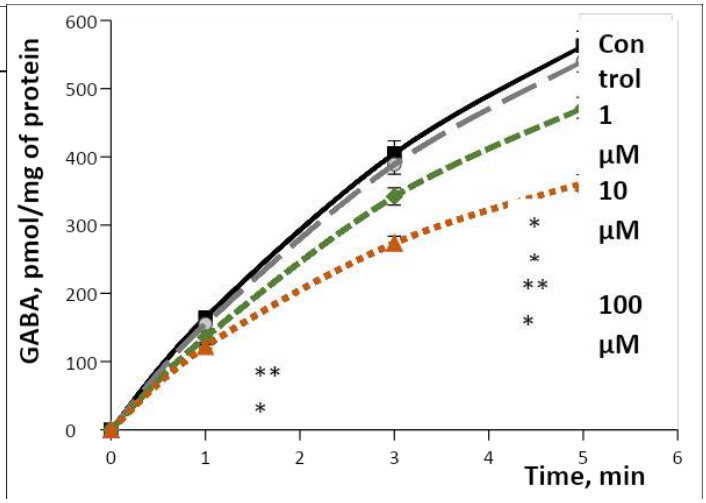


а

б



в



г

Рисунок 14.2 **а, б, в – позаклітинний рівень L–**[^{14}C] глутамату (а) і [^{3}H] ГАМК (б) у препаратах нервових закінчень; тонічне витікання [^{3}H] ГАМК з нервових закінчень під час блокування транспортерів ГАМК NO-711 (30 мкМ) (в) у контролі та за присутності ремдесивіру в концентраціях 1, 10, 100 мкМ. Даними є середнє значення ± SEM. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$; н.с., суттєвих відмінностей у порівнянні з контролем немає; $n = 12$.

г – Початкова швидкість опосередкованого транспортером накопичення та акумуляції [^{3}H] ГАМК нервовими закінченнями в присутності ремдесивіру в концентраціях 1, 10, 100 мкМ. Даними є середнє значення ± SEM. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ порівняно з контролем; $n = 12$.

Як показано на рисунку 68 б, позаклітинний рівень [^{3}H] ГАМК становив 13,25 ± 0,37 % загальної мітки синаптосом у контролі, 11,76 ± 0,42 % загальної мітки синаптосом за присутності ремдесивіру в концентрації 1 мкМ [$F(1,22) = 7,62$; $p < 0,05$; n=12], 11,09 ± 0,35 % загальної мітки синаптосом за присутності ремдесивіру в концентрації 10 мкМ [$F(1,22) = 19,52$; $p < 0,001$; n=12], 10,01 ± 0,33 % загальної мітки синаптосом за присутності ремдесивіру в концентрації 100 мкМ [$F(1,22) = 46,45$; $p < 0,001$; n=12].

Тонічне витікання [^{3}H] ГАМК з нервових терміналей було зареєстровано під час одночасної блокади транспортерів ГАМК NO-711 (30 мкМ) і виражалося як позаклітинний рівень [^{3}H] ГАМК, підвищений цим блокатором. Жодних змін тонічного вивільнення [^{3}H] ГАМК між контролем і синаптосомами за наявності ремдесивіру в концентраціях 1, 10, 100 мкМ не було показано (рис. 14.2 в). Підвищений за дії NO-711 позаклітинний рівень [^{3}H] ГАМК в препаратах синаптосом становив 25,18 ± 1,06 % загальної мітки синаптосом у контролі та 24,93 ± 1,15 % загальної мітки синаптосом за присутності ремдесивіру у концентрації 1 мкМ [$F (1,22) = 0,03$; $p = 0,87$; n=12], 24,85 ± 1,03 % загальної мітки синаптосом за присутності ремдесивіру у концентрації 10 мкМ [$F(1,22) = 0,06$; $p = 0,81$; n=12],

25,29 ± 1,35 % загальної мітки синаптосом за присутності ремдесивіру у концентрації 100 мкМ [F(1,22) = 0,005; p = 0,95; n=12].

Таким чином, ремдесивір у концентраціях 1, 10, 100 мкМ не змінював позаклітинний рівень L-[^{14}C] глутамату в препаратах нервових терміналей, але знижував цей рівень для [^{3}H] ГАМК. Тонічне витікання [^{3}H] ГАМК з нервових закінчень не змінювалось, що свідчить про відсутність індукованих ремдесивіром змін у проникності мембрани для цього нейромедіатора.

14.4 Опосередковане транспортером накопичення L-[^{14}C] глутамату та [^{3}H] ГАМК нервовими закінченнями за дії ремдесивіру

Як показано в таблиці 14.1, ремдесивір не змінював початкову швидкість накопичення та акумуляцію L-[^{14}C] глутамату протягом 10 хв нервовими закінченнями.

Таблиця 14.1 - Накопичення L-[^{14}C] глутамату нервовими закінченнями за присутності ремдесивіру н.с., суттєвих відмінностей у порівнянні з відповідним контролем немає; n = 12.

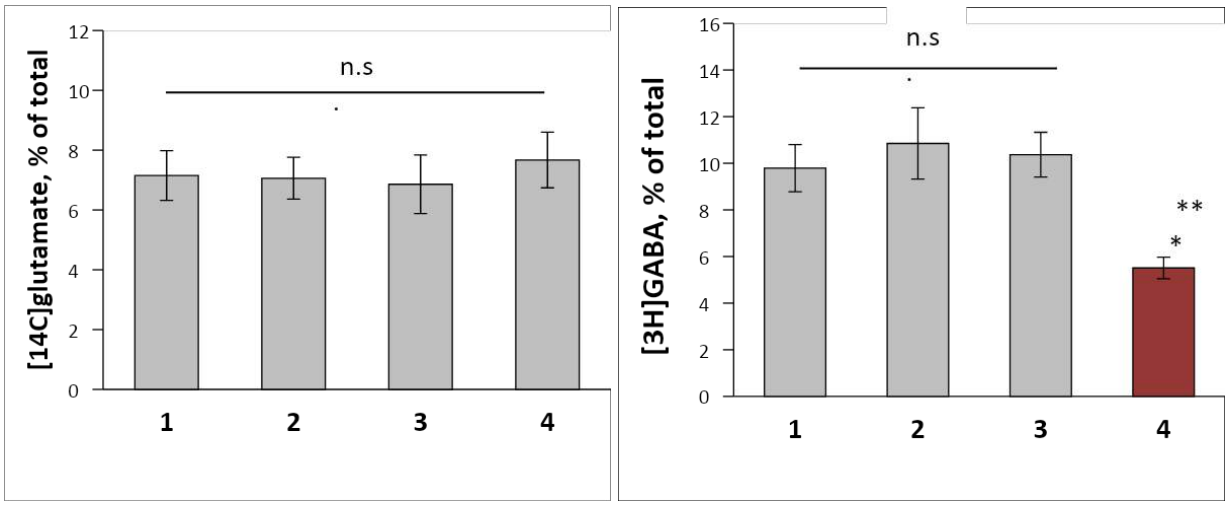
	Початкова швидкість накопичення L-[^{14}C] глутамату нервовими терміналями (нмоль/хв/мг протеїну)	*p*-значення	Акумуляція L-[^{14}C] глутамату нервовими терміналями за 10 хв. (нмоль /мг протеїну)	*p*-значення
Контроль	2.52 ± 0.13		9.97 ± 0.16	
Ремдесивір 1 мкМ	2.84 ± 0.19	p = 0.15 н.с.	10.40 ± 0.26	p = 0.17 н.с.
Ремдесивір 10 мкМ	2.71 ± 0.12	p = 0.25 н.с.	10.43 ± 0.24	p = 0.12 н.с.
Ремдесивір 100 µМ	2.41 ± 0.07	p = 0.46 н.с.	9.79 ± 0.09	p = 0.32 н.с.

Початкова швидкість накопичення [^{3}H] ГАМК нервовими закінченнями дорівнювала 164,27 ± 9,54 пмоль/хв/мг білка в контролі, 159,02 ± 6,79 пмоль/хв/мг білка за присутності ремдесивіру у концентрації 1 мкМ [F(1,22) = 0,22; p = 0,64; n = 12], 135,50 ± 7,97 пмоль/хв/мг білка за присутності ремдесивіру у концентрації 10 мкМ [F(1,22) = 5,83; p < 0,05; n = 12], і 121,99 ± 3,01 пмоль/хв/мг білка за присутності ремдесивіру у концентрації 100 мкМ [F(1,22) = 19,51; p < 0,001; n = 12]. Накопичення [^{3}H] ГАМК нервовими закінченнями протягом 5 хв становило 563,13 ± 20,92 пмоль/мг білка в контролі, 540,49 ± 15,84 пмоль/мг білка за присутності ремдесивіру у концентрації 1 мкМ [F ,22) = 0,81; p = 0,38; n = 12], 471,84 ± 15,36 пмоль/мг білка за присутності ремдесивіру у концентрації 10 мкМ [F(1,22) = 13,50; p < 0,01; n=12] і 361,80 ± 12,24 пмоль/мг білка за присутності ремдесивіру у концентрації 100 мкМ [F(1,22) = 75,26; p < 0,001; n=12] (рис. 14.2 г).

Таким чином, ремдесивір не впливав на накопичення L-[^{14}C] глутамату, тоді як він знижував накопичення [^{3}H] ГАМК залежно від дози, починаючи з концентрації 10 мкМ, таким чином демонструючи різноманітний вплив на поглинання збудливих і гальмівних нейромедіаторів.

14.5 Опосередковане транспортером стимульоване деполяризацією вивільнення L-[^{14}C] глутамату та [^{3}H] ГАМК з нервових закінчень за дії ремдесивіру

Ремдесивір у концентраціях 1, 10, 100 мкМ не впливав на Ca^{2+}-незалежне транспортер-опосередковане синаптосомальне вивільнення L-[^{14}C] глутамату, стимульоване 35 мМ KCl, що становило 7,15 ± 0,83 % загальної мітки синаптосом у контрольній групі, 7,06 ± 0,7 % загальної мітки синаптосом за присутності ремдесивіру у концентрації 1 мкМ [F(1,22) = 0,007; p = 0,93; n=12], 6,86 ± 0,98 % загальної мітки синаптосом за присутності ремдесивіру у концентрації 10 мкМ [F(1,22) = 0,05; p = 0,82; n=12] та 7,67 ± 0,93 % загальної мітки синаптосом за присутності ремдесивіру у концентрації 100 мкМ [F(1,22) = 0,19; p = 0,66; n=12] (рис. 14.3 а).



а б

Рисунок 14.3 а, б – опосередковане транспортером вивільнення L–[^{14}C] глутамату (а) і [^{3}H] ГАМК (б) з нервових закінчень, стимульоване деполяризацією мембрани за допомогою 35 мМ KCl у середовищі без Ca^{2+} за присутності ремдесивіру в концентраціях з 1, 10, 100 мкМ. Даними є середнє значення ± SEM. н.с., суттєвих відмінностей немає; ***, p < 0,001, порівняно з контролем; n = 12.

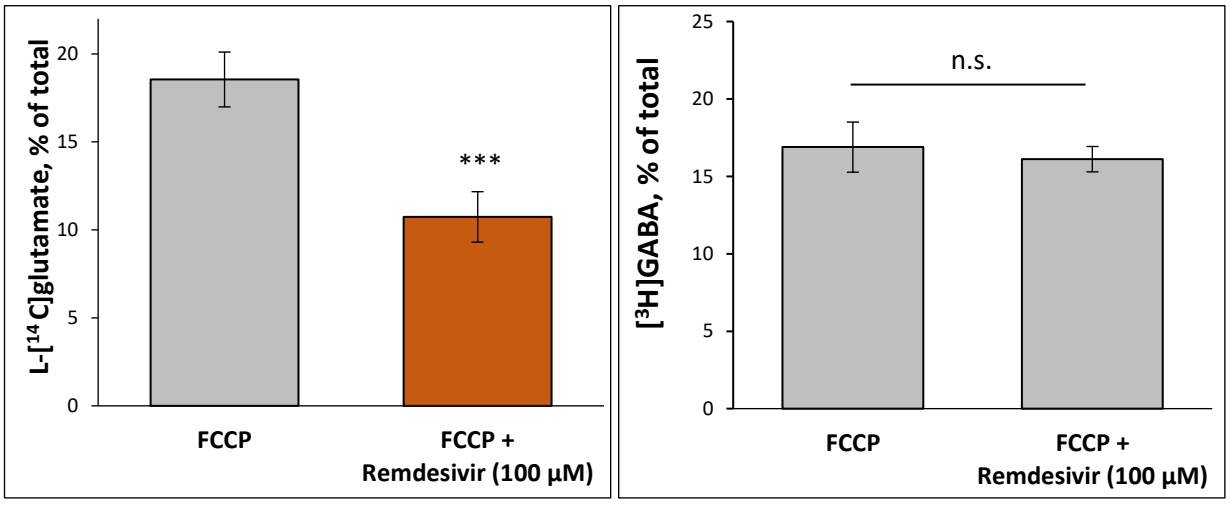
Ремдесивір у концентраціях 1 мкМ і 10 мкМ не впливав на Ca^{2+}-незалежне транспортер-опосередковане синаптосомне вивільнення [^{3}H] ГАМК, стимульоване 35 мМ KCl, що становило 9,79 ± 1,01% загальної мітки синаптосом у контролі, 10,85 ± 1% від загальної кількості мітки синаптосом за присутності ремдесивіру у концентрації 1 мкМ [F(1,22) = 0,36; p = 0,55; n=12], 10,37 ± 0,96 % загальної мітки синаптосом за присутності ремдесивіру у концентрації 10 мкМ [F(1,22) = 0,18; p = 0,67; n=12]. Тоді як ремдесивір у концентрації 100 мкМ знижував опосередковане транспортером вивільнення [^{3}H] ГАМК, що дорівнювало 5,51 ± 0,46 % загальної мітки синаптосом [F(1,22) = 14,95; p < 0,001; n=12] (рис. 14.3 б).

Таким чином, ремдесивір не змінював вивільнення L-[^{14}C] глутамату через реверсування глутаматного транспортера, але зменшував транспортер-опосередковане вивільнення [^{3}H] ГАМК, починаючи з концентрації 100 мкМ.

14.6 Вивільнення L-[^{14}C] глутамату та [^{3}H] ГАМК з нервових закінчень, опосередковане транспортером, стимульоване розсіюванням протонного градієнта синаптичних везикул за дії ремдесивіру

Класичний протонофор карбонілціанід р-трифторметоксифенілгідразон (FCCP) використовувався для розсіювання протонного градієнта синаптичних везикул, стимулюючи тим самим вивільнення везикулярного L-[^{14}C] глутамату і [^{3}H] ГАМК в цитозоль, а потім через відповідні транспортери у позаклітинний простір.

Ремдесивір у концентрації 100 мкМ знижував стимульоване FCCP вивільнення L-[^{14}C] глутамату з нервових терміналей, що становило 18,55 ± 1,56% загальної мітки синаптосом у контролі та 10,74 ± 1,43% загальної мітки синаптосом за присутності ремдесивіру у концентрації 100 мкМ [$F(1,22) = 14,88$; $p < 0,001$; $n = 12$] (рис. 14.4 а). Ремдесивір у концентрації 100 мкМ не змінював FCCP-стимульованого вивільнення [^{3}H] ГАМК з нервових закінчень. Вивільнення [^{3}H] ГАМК становило 16,89 ± 1,62% загальної мітки синаптосом у контролі та 16,11 ± 0,82% загальної мітки синаптосом за присутності ремдесивіру [$F(1,22) = 0,2$; $p = 0,66$; $n = 12$] (рис.14.4 б).



а б

Рисунок 14.4 а, б – FCCP–індуковане транспортер–опосередковане вивільнення L–[^{14}C] глутамату (а) і [^{3}H] ГАМК (б) з нервових закінчень за присутності ремдесивіру (100 мкМ). Даними є середнє значення ± SEM. п.с., суттєвих відмінностей немає; ***, $p < 0,001$, порівняно з контролем; $n = 12$.

Наведені у цьому підрозділі дані включені до статті [116], яка знаходиться на рецензуванні, підтверджуючі документи додаються у розділі публікації.

14.7 Дія препарату тікагрелор на ключові характеристики синаптичної передачі у нервових терміналях головного мозку щурів: накопичення та вивільнення глутамату та ГАМК, єкзоцитоз.

Після навантаження синаптосом [^{3}H]ГАМК та відмивання неакумульованої мітки, синаптосоми інкубували протягом 10 хв. при 37^{o}C за присутності тікагрелора у концентрації 2 чи 20 мкМ. Тонічне нестимульоване вивільнення визначали за умов блокування транспортерів ГАМК високоселективним інгібітором NO-711 (30 мкМ).

Позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у препараті синаптосом знижувався під впливом тікагрелора за умов прединкубації в обох досліджуваних концентраціях – 2 та 20 мкМ (Рис. 14.5). Так, в контролі позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК складав 13,31 ± 0,37 % від загальної кількості накопиченої мітки, за присутності тікагрелора в концентрації 2 мкМ 11,17 ± 0,39 % [$F_{(1,22)} = 17,44$; $p < 0,001$, $n=12$], за присутності тікагрелора в концентрації 20 мкМ 10,61 ± 0,43 % [$F_{(1,22)} = 24,90$; $p < 0,001$, $n=12$]

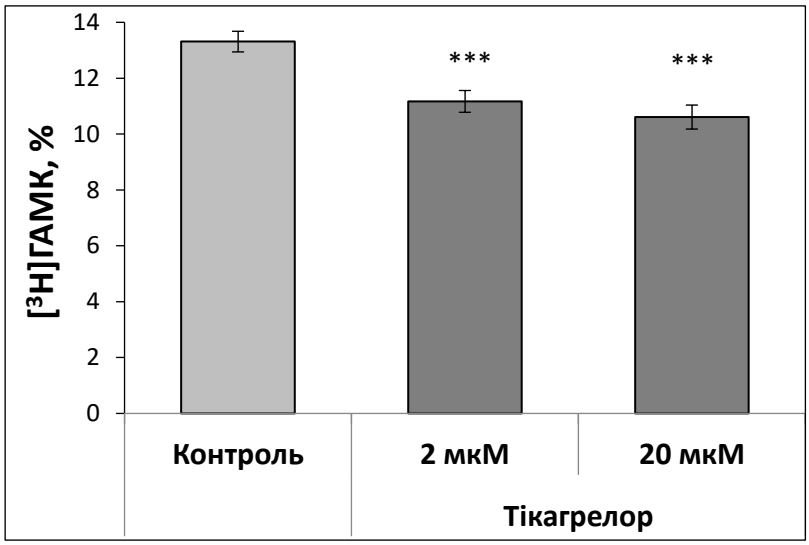


Рисунок 14.5 Позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у препараті нервових терміналей за дії тікагрелора в концентраціях 2 і 20 мкМ. Дані представлені як середнє значення ± SEM. *** $p < 0,001$ порівняно з контролем; $n = 12$.

Було продемонстровано, що тонічне нестимульоване вивільнення [^{3}H]ГАМК з синаптосом не змінювалось під впливом тікагрелора за концентрації 2 і 20 мкМ (Рис. 14.6). Так, в контролі тонічне вивільнення складало 25,18 ± 1,06 % від загальної кількості накопиченої мітки, за присутності тікагрелора в концентрації 2 мкМ - 24,48 ± 1,07 % від загальної кількості накопиченої мітки [$F_{(1,22)} = 0,24$; $p = 0,63$, n=12], за присутності тікагрелора в концентрації 20 мкМ - 24,75 ± 1,22 % від загальної кількості накопиченої мітки [$F_{(1,22)} = 0,07$; $p = 0,78$, n=12]

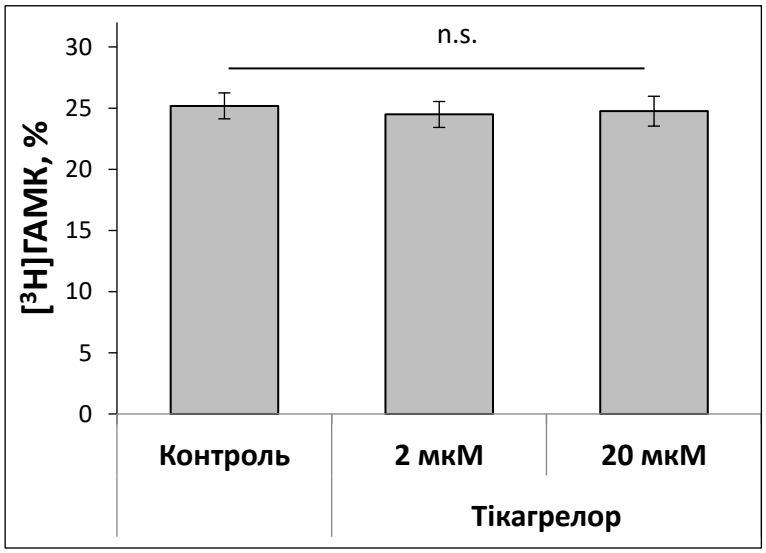


Рисунок 14.6. Вплив тікагрелора на тонічне нестимульоване вивільнення [^{3}H]ГАМК синаптосомами після попередньої інкубації в концентраціях 2 і 20 мкМ. Дані

представлені як середнє значення ± SEM. n.s., статистична значущість відсутня порівняно з контролем; n = 12.

Виявлено, що тікагрелор за умов прединкубації з синаптосомами за концентрації 2 мкМ не впливав на вивільнення [^{3}H]ГАМК з синаптосом шляхом екзоцитозу, однак підвищення його концентрації до 20 мкМ спричиняло зниження екзоцитозу на 40% (Рис. 14.7). В контролі вивільнення [^{3}H]ГАМК з синаптосом шляхом екзоцитозу дорівнювало 9,17 ± 0,86 % від загальної кількості накопиченої мітки, за присутності тікагрелора в концентрації 2 мкМ - 8,99 ± 0,69 % від загальної кількості накопиченої мітки [$F_{(1,22)}$ = 0,03; p = 0,86 , n=12], за присутності тікагрелора в концентрації 20 мкМ - 5,48 ± 0,51 % від загальної кількості накопиченої мітки [$F_{(1,22)}$ = 16,20; p < 0,001, n = 12].

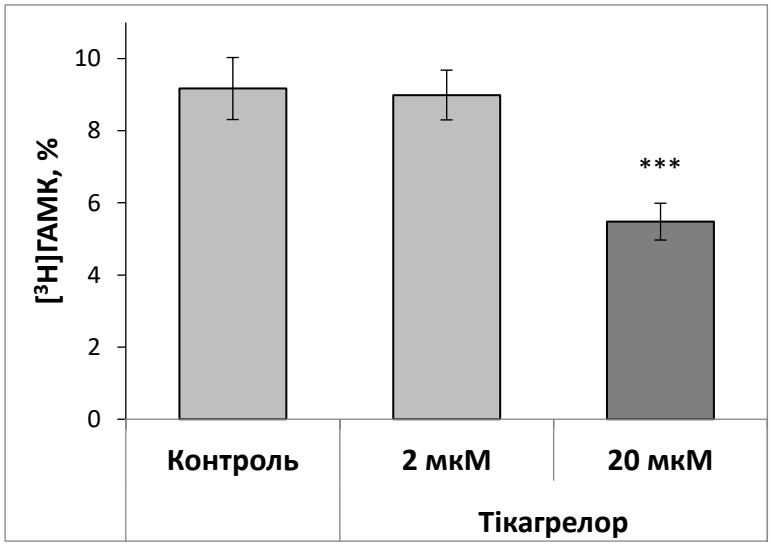


Рисунок 14.7 Вплив тікагрелора на вивільнення [^{3}H]ГАМК з синаптосом шляхом екзоцитозу після попередньої інкубації в концентраціях 2 і 20 мкМ. Дані представлені як середнє значення ± SEM. *** p < 0,001 порівняно з контролем; n = 12.

Як наведено у Таблиці 14.2, тікагрелор не впливав на початкову швидкість транспортер-опосередкованого накопичення та акумуляції [^{3}H]ГАМК за 5 хвилин у нервових терміналях.

Таблиця 14.2 - Початкова швидкість транспортер-опосередкованого накопичення та акумуляції [^{3}H]ГАМК за 5 хвилин у нервових терміналях за дії тікагрелора. Дані представлені як середнє значення ± SEM. n.s., статистична значущість відсутня порівняно з відповідним контролем; n = 8.

	Початкова швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК нервовими терміналями (пмоль/хв/мг протеїну)	Значення *p*	Акумуляція [^{3}H]ГАМК за 5 хвилин нервовими терміналями (пмоль/ мг протеїну)	Значення *p*
Контроль	160,71 ± 4,03		521,08 ± 16,35	
Тікагрелор 2 мкМ	149,47 ± 4,58	p = 0,068 n.s.	492,07 ± 42,52	p = 0,50 n.s.
Тікагрелор 20 мкМ	151,22 ± 3,30	p = 0,07 n.s.	508,68 ± 16,55	p = 0.58 n.s.

Як наведено у Таблиці 14.3, тікагрелор не впливав на транспортер-опосередковане вивільнення [^{3}H]ГАМК з нервових терміналей.

Таблиця 14.3 - Транспортер-опосередковане вивільнення [^{3}H]ГАМК з нервових терміналей за дії тікагрелора. Дані представлені як середнє значення ± SEM. n.s., статистична значущість відсутня порівняно з контролем; n =8.

	Транспортер-опосередковане вивільнення [^{3}H]ГАМК (% від загальної акумульованої синаптосомами радіоактивної мітки)	Значення *p*
Контроль	6,11 ± 0,33	
Тікагрелор 2 мкМ	7,13 ± 0,43	p = 0,06; n.s.
Тікагрелор 20 мкМ	4,75 ± 1,2	p = 0,26; n.s.

Як наведено у Таблиці 14.4, тікагрелор не впливав на позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату у препаратах нервових терміналей.

Таблиця 14.4 Позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату у препаратах нервових терміналей за дії тікагрелора. Дані представлені як середнє значення ± SEM. n.s., статистична значущість відсутня порівняно з контролем; n = 12.

	Позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату у нервових терміналях (% від загальної акумульованої синаптосомами радіоактивної мітки)	Значення p
Контроль	17,74 ± 0,56	
Тікагрелор 2 мкМ	18,99 ± 0,62	p = 0,13; n.s.
Тікагрелор 20 мкМ	17,03 ± 0,78	p = 0,45; n.s.

Дані, наведені у Таблиці 14.5 свідчать, що тікагрелор не впливав на початкову швидкість транспортер-опосередкованого накопичення та акумуляцію L-[^{14}C]глутамату за 10 хвилин у нервових терміналях.

Таблиця 14.5 Початкова швидкість транспортер-опосередкованого накопичення та акумуляція L-[^{14}C]глутамату за 10 хвилин у нервових терміналях за дії тікагрелора. Дані представлені як середнє значення ± SEM. n.s., статистична значущість відсутня порівняно з відповідним контролем; n = 12.

	Початкова швидкість накопичення L-[^{14}C]глутамату нервовими терміналями (нмоль/хв/мг протеїну)	Значення p	Акумуляція L-[^{14}C]глутамату за 10 хвилин нервовими терміналями (нмоль/ мг протеїну)	Значення p
Контроль	2,63 ± 0,13		9,88 ± 0,15	

Тікагрелор 2 мкМ	2,68 ± 0,07	p = 0,75 n.s.	9,95 ± 0,16	p = 0,74 n.s.
Тікагрелор 20 мкМ	2,71 ± 0,05	p = 0,58 n.s.	10,17 ±0,10	p = 0,11 n.s.

Як показано на рис. 14.8, тікагрелор за умов попередньої інкубації з синаптосомами за концентрації 2 мкМ суттєво не впливав на транспортер-опосередковане вивільнення L-[^{14}C]глутамату з синаптосом, яке складало в контролі 11,90 ± 0,69 % від загальної кількості накопиченої мітки, а за присутності тікагрелора в концентрації 2 мкМ 10,07 ± 0,84 % [$F_{(1,22)}$ = 3,30; p = 0,08, n=12].

Підвищення концентрації тікагрелора до 20 мкМ призводило до зниження транспортер-опосередковане вивільнення L-[^{14}C]глутамату з синаптосом, яке складало 7,81 ± 0,78 % [$F_{(1,22)}$ = 16,71; p < 0,001, n=12].

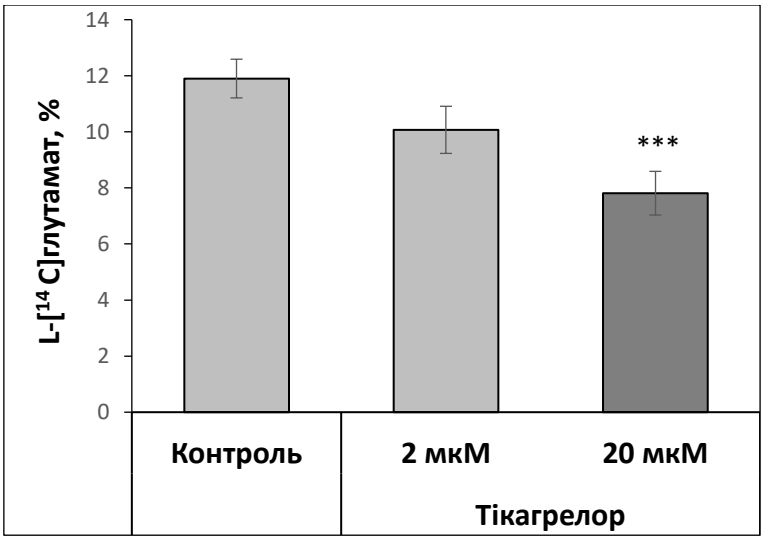


Рисунок 14.8 Вплив тікагрелора на транспортер-опосередковане вивільнення L-[^{14}C]глутамату з синаптосом після попередньої інкубації в концентраціях 2 і 20 мкМ. Дані представлені як середнє значення ± SEM. *** p < 0,001 порівняно з контролем; n = 12.

Було показано, що тікагрелор за умов прединкубації з синаптосомами як за концентрації 2 мкМ, так і після її підвищення до 20 мкМ, не впливав на вивільнення L-[^{14}C]глутамату з синаптосом шляхом екзоцитозу (Рис. 14.9). Так, в контролі вивільнення L-[^{14}C]глутамату з синаптосом шляхом екзоцитозу складало 8,24 ± 0,84 %

від загальної кількості накопиченої мітки, за присутності тікагрелора в концентрації 2 мкМ - 8,14 ± 0,94 % від загальної кількості накопиченої мітки [$F_{(1,22)}$ = 0,006; p = 0,93, n=12], за присутності тікагрелора в концентрації 20 мкМ - 6,97 ± 0,52 % від загальної кількості накопиченої мітки [$F_{(1,22)}$ = 1,78; p = 0,19, n = 12].

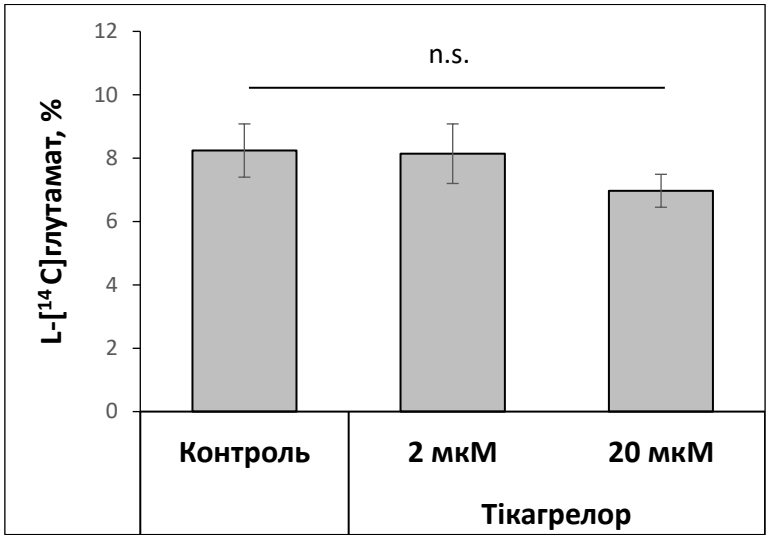


Рисунок 14.9 Вплив тікагрелора на вивільнення L-[^{14}C]глутамату з синаптосом шляхом екзоцитозу після попередньої інкубації в концентраціях 2 і 20 мкМ. Дані представлені як середнє значення ± SEM. n.s., статистична значущість відсутня порівняно з контролем; n = 12.

Експериментальні дані щодо дії тікагрелору на мембранний потенціал та ацидифікацію нервових терміналей наведені у Розділі 13.

Це дослідження є першим повідомленням про взаємодію ремдесивіру та тікагрелору з пласким ліпідним бішаром. Вірусні оболонки складаються з білків і ліпідних компонентів, отриманих з мембран клітин-хазяїв [102]. Тому можна припустити, що ремдесивір може вбудовуватися у оболонки вірусу так само, як він вбудовується в мембрани клітин-хазяїв. Вірус не здатний метаболізувати ремдесивір, тому останній може накопичуватися в ліпідному бішарі вірусної оболонки. Можна припустити, що препарат може навіть порушити правильне функціонування білків оболонки, зокрема S-глікопротеїну SARS-CoV-2, відповідального за злиття оболонки вірусу та мембрани клітини-хазяїна [103] і впливати на лиття мембрани, що має вирішальне значення для життєвого циклу

вірусу. Хоча наші результати не дозволяють оцінити такий прямий вплив ремдесивіру на вірусні мембрани, це свідчить про те, що активність ремдесивіру, спрямована на оболонку вірусу, потребує подальшого детального дослідження. Тікагрелор, на відміну від ремдесивіру, не строював іон провідні структури у БЛМ.

Іншим важливим результатом цього дослідження є спричинене ремдесивіром зниження вивільнення шляхом екзоцитозу збуджуючих і гальмівних нейромедіаторів із нервових закінчень, яке було дозозалежним і більш значним у експериментах з L-[^{14}C] глутаматом, ніж у [^{3}H] ГАМК. Порушення позаклітинного рівня L-[^{14}C] глутамату не було причиною порушення екзоцитозу, оскільки ремдесивір не впливав на цей параметр. Ремдесивір по-різному діяв на глутамат- і ГАМК-ергічні нервові закінчення, знижуючи позаклітинний рівень [^{3}H] ГАМК, таким чином отримавши здатність пом’якшувати синаптичне гальмування. Важливо, що незмінне тонічне вивільнення [^{3}H] ГАМК з нервових закінчень, виміряне під час блокування функціонування транспортера ГАМК, показав незмінну пасивну проникність мембрани для нейромедіатора за присутності ремдесивіру. Дані щодо накопичення L-[^{14}C] глутамату узгоджувалися з даними щодо його позаклітинного рівня в приводу відсутності впливу ремдесивіру на обидва параметри. Ремдесивір знижував накопичення [^{3}H] ГАМК залежно від дози, починаючи з концентрації 10 мкМ, демонструючи, таким чином, різний вплив на процес накопичення збудливих і гальмівних нейромедіаторів. Можна виявити деяку невідповідність між позаклітинним рівнем і накопиченням в експериментах з [^{3}H] ГАМК, а саме ремдесивір діяв односпрямовано на ці параметри, тоді як, як зазвичай, ці параметри демонстрували протилежно спрямовані зміни в різних дослідженнях, напр. модель гіпоксії, вплив нейротоксичних і мембранних активних речовин і наночастинок [100-103]. Транспортер-опосередковане вивільнення L-[^{14}C] глутамату не змінювалося за присутності ремдесивіру, і таким чином узгоджується з вищезгаданими даними щодо позаклітинного рівню глутамату та даними щодо його накопичення. Тоді як ремдесивір по-різному впливав на цей параметр в ГАМК-ергічних нервових закінченнях і знижував опосередковане транспортером

вивільнення [^{3}H] ГАМК, починаючи з концентрації 100 мкМ. Ці дані можна пояснити зниженням поверхневої експресії транспортерів ГАМК через порушення субстрат-залежної регуляції функціонування транспортера ГАМК через протеїнкіназа С-залежний механізм у присутності ремдесивіру. У цьому контексті зменшена кількість або змінений розподіл підтипів функціонально активних транспортерів ГАМК може призвести до зниження швидкості накопичення, зменшення цитозольного пулу нейромедіатора і, таким чином, до ослаблення опосередкованого транспортером вивільнення, позаклітинного рівня та транспортування нейромедіатора через плазматичну мембрану.

Ці ефекти ремдесивіру можуть бути пов’язані з його здатністю утворювати активний нуклеозидтрифосфат [104], який може замінити молекулу АТФ в синаптичних процесах, що залежать від гідролізу АТФ, і передачу сигналів рецепторів, пов’язаних з АТФ, екзоцитоз, функціонування Na- K АТФази, V-АТФази, рецептори P2X7, тощо. Зокрема, здатність ремдесивіру взаємодіяти з V-АТФазою була передбачена при моделюванні [105], що, у свою чергу, може призвести до зниження підкислення синаптичних везикул і зниження кількості везикулярного нейромедіатора. Крім того, підвищений позаклітинний рівень АТФ, викликаний інфекцією SARS-CoV-2, може викликати гіперактивацію рецепторів P2X7, які є АТФ-керованими іонними каналами, широко експресованими в центральній нервовій системі [106]. Зокрема, активація рецептора P2X7, викликана вірусною інфекцією, призвела до змін у формуванні активних форм кисню, збільшення концентрації Ca^{2+} та вивільнення глутамату [107]. У свою чергу, глутамат активує NMDA-рецептори, експресовані в нервових закінченнях і більше вивільнення глутамату, викликаючи масове вивільнення нейромедіаторів, що посилює ексайтотоксичність і загибель клітин [108]. Можна припустити, що нуклеозидтрифосфат, синтезований з ремдесивіру, може запобігти гіперактивації рецепторів P2X7, спричиненої SARS-CoV-2, але це припущення вимагає додаткового дослідження.

Беручи до уваги результати щодо транспортування L-[^{14}C] глутамату, можна заключити, що ремдесивір не провокував розвиток ексайтотоксичності. Однак зниження позаклітинного рівня [^{3}H] ГАМК може призвести до ослаблення синаптичного гальмування та дисбалансу збуджуючих і гальмівних сигналів.

Флуориметричні результати з використанням pH-чутливого барвника підтверджені експериментами з радіоактивно міченими нейромедіаторами, які показують зниження екзоцитозу, однією з причин якого може бути розсіяний градієнт pH через мембрану синаптичної везикули, який є рушійною силою накопичення везикулярних нейромедіаторів і, таким чином, заповнення синаптичних везикул нейромедіаторами. Слід зазначити, що флуориметричні дослідження продемонстрували кумулятивну реакцію всіх типів нервових закінчень на введення ремдесивіру. Крім того, можна припустити, що ремдесивір також може розсіювати градієнт pH інших внутрішньоклітинних кислих компартментів, наприклад, ендосомально-лізосомної системи, що бере участь у транспортуванні вірусу. Це може являти собою додаткові механізми спрямованої на вірус дії ремдесивіру не лише як інгібітору РНК-полімерази, а й як модулятора внутрішньоклітинного транспорту вірусу. Крім того, порушення процесу екзоцитозу може уповільнювати передачу вірусу.

У сукупності наші нейрологічні дані вперше продемонстрували, що ремдесивір, починаючи з концентрації 1 мкМ, знижував спричинене деполяризацією вивільнення L-[^{14}C] глутамату та [^{3}H] ГАМК шляхом екзоцитозу залежно від дози. Ремдесивір у концентраціях 1 - 100 мкМ не змінював позаклітинний рівень L-[^{14}C] глутамату в препаратах нервових терміналей, але знижував цей рівень для [^{3}H] ГАМК. Ремдесивір не впливав на накопичення L-[^{14}C] глутамату, тоді як він знижував накопичення [^{3}H] ГАМК залежно від дози, починаючи з концентрації 10 мкМ, таким чином демонструючи різноманітний вплив на транспортування збудливих і гальмівних нейромедіаторів. Тонічне вивільнення [^{3}H] ГАМК з нервових закінчень, виміряне в присутності інгібітору транспортера ГАМК NO-711, не змінювалося препаратом, тим самим показуючи незмінну проникність мембрани

для цього нейромедіатора. Препарат не змінював вивільнення L-[^{14}C] глутамату через реверсування транспортера глутамату, але зменшував опосередковане транспортером вивільнення [^{3}H] ГАМК в концентрації 100 мкМ. Вивільнення L-[^{14}C] глутамату, індуковане протонофором FCCP, зменшувалось за присутності ремдесивіру, але вивільнення [^{3}H] ГАМК залишилось незмінним за цих умов. Флуориметричні дослідження з використанням pH-чутливого барвника акридинового оранжевого підтвердили спричинене ремдесивіром порушення екзоцитозу та виявили зниження підкислення синаптичних везикул.

Особливу увагу слід звернути на той факт, що ремдесивір і його метаболіти можуть накопичуватися в мозку без зміни їх концентрації протягом 7 днів після введення [104]. Зрозуміло, що під час противірусної терапії необхідно точно контролювати концентрацію ремдесивіру, оскільки дія препарату може супроводжуватися порушенням регуляції синаптичної нейротрансмісії. Справді, літературні дані описують придатні для використання концентрації ремдесивіру в діапазонах концентрацій, подібних до цього дослідження. Під час лікування пацієнтів доза ремдесивіру становила 200 мг внутрішньовенно на 1 добу і 100 мг внутрішньовенно на 2-10 доби [109]. У дослідженнях in vitro утворення активного нуклеозидтрифосфату в макрофагах, отриманих з моноцитів людини, аналізували після 72-годинної інкубації з 1 мкМ ремдесивіру [104]. Ремдесивір пригнічував гостру реплікацію вірусу Ебола в клітинах людини, включаючи первинні макрофаги та ендотеліальні клітини людини, із значеннями половини максимальної ефективної концентрації (EC50) від 0,06 до 0,14 мкМ.

Таким чином, вперше показані прямі мембранотропні та нейротропні ефекти ремдесивіру. Ремдесивір здатний накопичуватися в клітинних мембранах і впливає на взаємодію ліпідів. Препарат зменшував вивільнення L-[^{14}C] глутамату та [^{3}H]ГАМК з нервових закінчень, не провокував розвиток ексайтотоксичності та не змінював пасивну проникність мембрани для нейромедіаторів. Зниження позаклітинного рівня [^{3}H] ГАМК після введення препарату може послабити синаптичне гальмування та змінити баланс збудливих та гальмівних сигналів.

Препарат зменшував закислення синаптичних везикул, що може бути однією з причин зниження екзоцитозу.

Очікується, що ремдесивір накопичується в ліпідній оболонці вірусу і, можливо, змінює його фізичні властивості. Можливий вплив цих змін на білок злиття S-глікопротеїн SARS-CoV-2 і швидкість злиття мембран вірусу з клітинами-хазяїнами заслуговують детального дослідження.

Оскільки ремдесивір та його активний метаболіт можуть накопичуватися в мозку, дозування ремдесивіру під час противірусної терапії слід ретельно контролювати через можливу небажану модуляцію збудливої та гальмівної синаптичної нейротрансмісії.

14.8. Висновки до розділу

1.Вперше показані прямі мембранотропні та нейротропні ефекти ремдесивіру. Препарат зменшував вивільнення L-[14C] глутамату та [3H]ГАМК з нервових закінчень, не провокував розвиток токсичності та не змінював пасивну проникність мембрани для нейромедіаторів.

2.Вперше показано, що позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у препараті синаптосом знижувався під впливом тікагрелора за умов прединкубації в концентраціях 2 та 20 мкМ. Тонічне нестимульоване вивільнення [^{3}H]ГАМК з синаптосом не змінювалось під впливом тікагрелора за концентрації 2 і 20 мкМ.

3.Вперше виявлено, що тікагрелор за умов прединкубації з синаптосомами за концентрації 2 мкМ не впливав на вивільнення [^{3}H]ГАМК з синаптосом шляхом екзоцитозу, однак підвищення його концентрації до 20 мкМ спричиняло зниження екзоцитозу на 40%.

4.Тікагрелор не впливав на початкову швидкість транспортер-опосередкованого накопичення та акумуляції [^{3}H]ГАМК за 5 хвилин, на транспортер-опосередковане вивільнення [^{3}H]ГАМК, на позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату, на початкову швидкість транспортер-опосередкованого накопичення

та акумуляцію L-[^{14}C]глутамату за 10 хвилин та на вивільнення L-[^{14}C]глутамату з нервових терміналей шляхом екзоцитозу.

5.Тікагрелор знижував транспортер-опосередковане вивільнення L-[^{14}C]глутамату з синаптосом.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено моделі вірусної мембрани SARS-CoV-2 та епітелію легенів *in silico*, а також ліпосомальні моделі мембран *in vitro.*
2. Показано, що ремдесивір та тікагрелор спонтанно вбудовуються у зовнішній моношар біологічної мембрани. Препарати проходять через мембрану синаптосом, найбільше це відчувають фосфатні молекулярні групи PO_2- та ОН зв’язки, СН зв'язки реагують слабше.
3. Ремдесивір та тікагрелор гасять люмінесценцію синаптосом і практично не впливають на спектроскопічні особливості синаптосом, в той же час ІЧ спектри синаптосом, інкубовані з ремдесивіром та тікагрелором відчувають проходження препаратів по змінах в структурі ліпідного шару синаптосом, причому ці зміни більші в неактивних синаптосомах.
4. Вперше на основі отриманих спектральних даних виявлені нові спектральні маркери- ІЧ та Раман синаптосом, ремдезивіру та тікагрелору а також їх взаємодії.
5. Згідно з даними МД обидва препарати зменшують параметр порядку ліпідних хвостів зовнішнього моношару мембрани у безпосередній близькості до молекул ліганду і дещо збільшують його на більших відстанях.
6. В експериментах з флуоресцентної спектроскопії спостерігалося зменшення впорядкованості мембрани для тікагрелору в концентраціях, починаючи з 2 мкМ. Ремдесивір у концентраціях включно до 100 мкМ не впливав на впорядкованість мембрани, а у концентрації більше 100 мкМ - збільшував її. Обидва препарати і ремдесивір і тікагрелор, індукують злиття модельних ліпосом.
7. Ремдесивір збільшував провідність БЛМ шляхом утворення стабільних потенціалозалежних неіоноселективних пор в БЛМ.
8. Вперше показані прямі мембранотропні та нейротропні ефекти ремдесивіру. Препарат зменшував вивільнення L-[14C] глутамату та [3H]ГАМК з нервових закінчень, не провокував розвиток токсичності та не змінював пасивну проникність мембрани для нейромедіаторів.

9. Вперше виявлено, що тікагрелор за концентрації 2 мкМ не впливав на вивільнення [^{3}H]ГАМК з синаптосом шляхом екзоцитозу, однак підвищення його концентрації до 20 мкМ спричинило зниження екзоцитозу на 40%.
10. Тікагрелор знижував транспортер-опосередковане вивільнення L-[^{14}C]глутамату з синаптосом.
11. Вперше показано, що ремдесивір та тікагрелор дозо-залежно знижували спонтанну, H_2O_2 –стимульовану та каїнат-стимульовану генерацію АФК у нервових терміналях.
12. Результати Проєкту опубліковані у 4-х статтях (Journal of Chemical Theory and Computation, FlatChem, European Neuropsychopharmacology, Пріоритетні напрями та вектори розвитку світової науки»), дві роботи знаходяться на рецензії (Molecular Crystals and Liquid Crystals, Experimental Neurology) та 9-х тезах міжнародних конференцій:

РЕКОМЕНДАЦІЇ

Запропоновані нами моделі вірусної мембрани SARS-CoV-2 та епітелію легенів *in silico*, а також модельні мембрани *in vitro* є важливим для використання в подальших наукових дослідженнях та розробках мембранотропних та інших ліків.Запропоновано зосередити пошук нових противірусних препаратів в напрямку саме аденозинових похідних. При розрахунку терапевтичних доз препарату ремдезивіру для антивірусної терапії важливо враховувати його накопичення в головному мозку і можливі нейротропні ефекти.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Altered conformation of α-synuclein drives dysfunction of synaptic vesicles in a synaptosomal model of Parkinson's disease / L. Fonseca-Ornelas, T. Viennet, M. Rovere [et al.] // Cell Reports. - 2021. - Vol. 36, Issue 1. - P. 109333
2. Ajito K., & Torimitsu, K. Laser trapping and Raman spectroscopy of single cellular organelles in the nanometer range /K. Ajito, K. Torimitsu // Lab on a Chip. - 2002. - Vol. 2, Issue 1. -P. 11-14.
3. Ajito K. Detection of glutamate in optically trapped single nerve terminals by Raman spectroscopy / K. Ajito, C. Han, K. Torimitsu // Analytical chemistry. - 2004. - Vol. 76, Issue 9. -P. 2506-2510.
4. ATR-IR and EPR spectroscopy for following the membrane restoration of isolated cortical synaptosomes in aluminium-induced Alzheimer's disease–Like rat model / G. A. R. Ahmed, S. K. Khalil, W. El Hotaby [et al.] // Chemistry and Physics of Lipids. - 2020.- Vol. 231. - P. 104931.
5. Simons K. Functional rafts in cell membranes/ Simons K. and E. Ikonen // Nature. — 1997. — Vol.387, Iss.6633. —P. 569.
6. Lingwood D. Lipid rafts as a membrane-organizing principle/ D. Lingwood, K. Simons // Science. — 2010.—Vol. 327, Iss.5961. — P. 46-50. – DOI: 10.1126/science.1174621.
7. Integrated analyses of single-cell atlases reveal age, gender, and smoking status associations with cell type-specific expression of mediators of SARS-CoV-2 viral entry and highlights inflammatory programs in putative target cells / Christoph Muus, Malte D. Luecken, Gokcen Eraslan [et al.] // bioRxiv preprint. – https: doi.org/10.1101/2020.04.19.049254.
8. Dual benefit of combined neuroprotection: Cholesterol depletion restores membrane microviscosity but not lipid order and enhances neuroprotective action of hypothermia in rat cortex nerve terminals / A. Pastukhov, N. Krisanova, K. P yrshev, T. Borisova // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes. – 2020. Vol. 1862, Iss. 9. – P. 183362. – https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183362.

9. The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus / S. Stertz, M. Reichelt, M. Spiegel [et al.] // Virology. –2007. –Vol. 361, Iss. 2. –P. 304–315.– DOI:10.1016/j.virol.2006.11.027 – ISSN: 1743-422X.
10. van Meer G. and de Kroon A. I. P. M. Lipid map of the mammalian cell / Gerrit van Meer, Anton I. P. M. de Kroon // Journal of Cell Science. – 2011. –Vol. 124, №1. – P. 5-8. – DOI:10.1242/jcs.071233.
11. Lipid Involvement in Viral Infections: Present and Future Perspectives for the Design of Antiviral Strategies. / M. A. Martín-Acebes, Á. Vázquez-Calvo, F. Caridi [et al.] // Lipid metabolism / [Editors: Rodrigo Valenzuela.] –Publisher: InTech, 2013. – P. 291-322. –DOI:10.5772/51068.
12. Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidylserine: is phosphatidylserine a VSV-binding site? / R. Schlegel, T.S. Tralka, M.C. Willingham, I. Pastan // Cell. –1983. – Vol. 32, Iss. 2. – P. 639-646. – https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90483-X.
13. Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization / H. Matsuo, J. Chevallier, N. Mayran [et al.] // Science. –2004. –Vol. 303, Iss. 5657 – P. 531-534. DOI: 10.1126/science.1092425.
14. Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids / I. Le Blanc, P.P. Luyet, V. Pons [et al.] // Nat. Cell Biol. -2005. –Vol. 7. –P. 653-664. – DOI: 10.1038/ncb1269.
15. N-glycolyl GM1 ganglioside as a receptor for simian virus 40. / M.A. Campanero-Rhodes, A. Smith, W. Chai [et al.] // J. Virol. –2007. –Vol. 81, Iss. 23. –P. 12846-12858. – DOI: 10.1128/JVI.01311-07.
16. Anderson H.A. Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae / H.A. Anderson, Y. Chen, L.C. Norkin // Mol. Biol. Cell. –1996. –Vol. 7, Iss.11. –P. 1825-1834. – DOI: 10.1091/mbc.7.11.1825.
17. Dengue virus ensures its fusion in late endosomes using compartment-specific lipids / Zaitseva E, Yang ST, Melikov K [et al.] // PLoS Pathog. – 2010. –Vol. 6, Iss.10. – P. e1001131. – https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001131.

18. Mercer J., Helenius A. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells / J. Mercer, A. Helenius // Science. –2008. –Vol. 320, Iss. 5875. – P. 531-535. – DOI: 10.1126/science.1155164.
19. Importance of cholesterol-rich membrane microdomains in the interaction of the S protein of SARS-coronavirus with the cellular receptor angiotensin-converting enzyme 2. / Joerg Glende, Christel Schwegmann-Wessels, Marwan Al-Falah [et al.] // Virology. – 2008. – Vol. 381, Iss. 2. – P. 215-221. – DOI: 10.1016/j.virol.2008.08.026.
20. Structural and morphological investigations of the formation of quasi-crystalline phases of 1, 2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DMPG) / P. Garidel, W. Richter, G. Rapp, A. Blume // Physical Chemistry Chemical Physics. – 2001. – Vol. 3, Iss.8. P. 1504-1513. – https://doi.org/10.1039/B009881G.
21. Blume A. Properties of lipid vesicles: FT-IR spectroscopy and fluorescence probe studies / A. Blume // Current opinion in colloid & interface science. – 1996. –Vol. 1, Iss. 1. –P. 64-77. – https://doi.org/10.1016/S1359-0294(96)80046-X.
22. Infrared Spectroscopy of Biomolecules / Edited by Henry H. Mantsch, Dennis Chapman. – Wiley-Liss New York, 1996. – 359. – ISBN 0-471-02184-9.
23. Grandbois M. Monitoring of phospholipid monolayer hydrolysis by phospholipase A2 by use of polarization-modulated Fourier transform infrared spectroscopy / M. Grandbois, B. Desbat, C. Salesse // Biophysical chemistry. – 2000. Vol. 88, Iss. 1-3. –P. 127-135. – DOI: 10.1016/s0301-4622(00)00204-0.
24. Infrared Spectroscopy of Membrane Lipids / Allison Derenne, Thomas Claessens, Caroline Conus, Erik Goormaghtigh // Encyclopedia of Biophysics / [Editor: Gordon C.K. Roberts] – Publisher: Springer, Berlin, Heidelberg, 2013. - P. 1076-1081. – Online ISBN978-3-642-16712-6.
25. Label-free infrared spectroscopy and imaging of single phospholipid bilayers with nanoscale resolution / Adrian Cernescu, Michał Szuwarzyński, Urszula Kwolek [et al.] // Analytical chemistry. – 2018. – Vol. 90, Iss. 17. – P. 10179-10186. – https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00485.

26. Effect of 25-hydroxycholesterol in viral membrane fusion: Insights on HIV inhibition / Bárbara Gomesa , Sónia Gonçalvesa , Anibal Disalvo [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 2018. –Vol. 1860, Iss. 5. – P. 1171-1178. – https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.02.001.
27. Scheibe C., Hauser K. Orientation of lipids in solid supported lipid bilayers studied by polarized ATR-FTIR spectroscopy/ Christian Scheibe, Karin Hauser// Biomedical Spectroscopy and Imaging. – 2018. –Vol. 7, № 1-2. – P. 17-24. — DOI: 10.3233/BSI-18017.3
28. Casares D. Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues/ D. Casares, P.V. Escribá, C.A. Rosselló // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – Vol. 20, Iss. 9. – P. 2167. –DOI: 10.3390/ijms20092167.
29. Subcellular organelle lipidomics in TLR-4-activated macrophages / A.Y. Andreyev, E. Fahy, Z. Guan [et al.] // J. Lipid Res. – 2010. –Vol.51, Iss. 9. – P. 2785–2797. – DOI: 10.1194/jlr.M008748.
30. Biochemical and Morphological Changes in Endothelial Cells in Response to Hypoxic Interstitial Edema / L. Botto, B. Egidio, D. Rossella // Respiratory Research. – 2006. – Vol. 7, Iss. 1. –P. 7. –DOI: 10.1186/1465-9921-7-7.
31. Cell Type-Resolved Human Lung Lipidome Reveals Cellular Cooperation in Lung Function | Scientific Reports / J.E. Kyle, G.Clair, G. Bandyopadhyay [et al.] // Scientific Reports. –2018. –Vol. 8. –P. 13455. – https://doi.org/10.1038/s41598-018-31640-x.
32. Characterization of the Lipidomic Profile of Human Coronavirus-Infected Cells: Implications for Lipid Metabolism Remodeling upon Coronavirus Replication / Bingpeng Yan, Hin Chu, Dong Yang // Viruses. – 2019. –Vol. 11, Iss. 1. – P. 73. – DOI: 10.3390/v11010073.
33. Lipid Analysis of Airway Epithelial Cells for Studying Respiratory Diseases / N. Zehethofer, S. Bermbach, S. Hagner [et al.] //Chromatographia. –2015. –Vol. 78, Iss. 5–6. –P. 403–13. – DOI: 10.1007/s10337-014-2787-5 .

34. Lipidomic Characterization and Localization of Phospholipids in the Human Lung / Z. Berry, A. Karin , R.C. Murphy, B. Kosmider, R.J. Mason // Journal of Lipid Research. – 2017, — Vol. 58, Iss. 5. – P. 926–933. – DOI: 10.1194/jlr.M074955.
35. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM / S. Jo, T. Kim, V. G. Iyer, W. Im // Journal of Computational Chemistry. - 2008. - Vol. 29, Issue 11. - P. 1859-1865. DOI: 10.1002/jcc.20945
36. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field / J. Lee, X. Cheng, J. M. Swail [et al.]. // Journal of Chemical Theory and Computation. - 2016. - Vol. 12, Issue 1. - P. 405-413. https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935
37. NWChem: A comprehensive and scalable open-source solution for large scale molecular simulations / M. Valiev, E. J. Bylaska, N. Govind [et al.]. // Computer Physics Communications. - 2010. - Vol. 181, Issue 9. - P. 1477-1489. https://doi.org/10.1016/j.cpc.2010.04.018
38. Yesylevskyy S. O. Determination of the shape and curvature of nonplanar lipid bilayers that are bent in a single plane in molecular dynamics simulations / S. O. Yesylevskyy, S. Kraszewski, C. Ramseyer. // Journal of Molecular Modeling. – 2014. – Vol. 20, Issue 4. – P. 2176. DOI: 10.1007/s00894-014-2176-x.
39. Yesylevskyy S. Determination of mean and Gaussian curvatures of highly curved asymmetric lipid bilayers: the case study of the influence of cholesterol on the membrane shape / S. Yesylevskyy, C. Ramseyer. // Physical Chemistry Chemical Physics. - 2014. - Vol. 16, Issue 32. - P. 17052-17061. https://doi.org/10.1039/C4CP01544D
40. Yesylevskyy S. O. The influence of curvature on the properties of the plasma membrane. Insights from atomistic molecular dynamics simulations /S. O. Yesylevskyy, T. Rivel, C. Ramseyer. // Scientific Reports. - 2017. - Vol. 7, Issue 1. - P. 16078. https://doi.org/10.1038/s41598-017-16450-x
41. Rivel T. Permeation of cisplatin through the membranes of normal and cancer cells: a molecular dynamics study [Електронний ресурс] /T. Rivel, C. Ramseyer, S. O.

Yesylevskyy// bioRxiv: 375980.- 2018.– Режим доступу до ресурсу: doi: https://doi.org/10.1101/375980.

42. Rivel T. The asymmetry of plasma membranes and their cholesterol content influence the uptake of cisplatin / T. Rivel, C. Ramseyer, S. O. Yesylevskyy // Scientific Reports. - 2019. - Vol. 9, Issue 1. - P. 5627: 1-14. https://doi.org/10.1038/s41598-019-41903-w
43. Yesylevskyy S. Curvature increases permeability of the plasma membrane for ions, water and the anti-cancer drugs cisplatin and gemcitabine / S.Yesylevskyy, T. Rivel, C. Ramseyer // Scientific Reports. - 2019. - Vol. 9, Issue 1. - P. 17214. https://doi.org/10.1038/s41598-019-53952-2
44. Membrane Environment Modulates Ligand-Binding Propensity of P2Y12 Receptor / F. Haghighi, S. Yesylevskyy, S. Davani, C. Ramseyer // Pharmaceutics. - 2021. - Vol. 13(4). - P.524. doi: 10.3390/pharmaceutics13040524.
45. Hess B. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation / B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel, E. Lindahl // Journal of Chemical Theory and Computation. - 2008. -Vol. 4, Issue 3. - P. 435-447. https://doi.org/10.1021/ct700301q.
46. PLUMED 2: New feathers for an old bird / G. A. Tribello, M. Bonomi, D. Branduardi [et al.] // Computer Physics Communications. - 2014. - Vol. 185, Issue 2. - P. 604-613. DOI: 10.1016/j.cpc.2013.09.018
47. Promoting transparency and reproducibility in enhanced molecular simulations / M. Bonomi, G. Bussi, C. Camilloni [et al.]. // Nature Methods. - 2019. - Vol. 16, Issue 8. - P. 670-673.
48. Huang J. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data /J. Huang, A. D. MacKerell // Journal of Computational Chemistry. - 2013. - Vol. 34, Issue 25. - P. 2135-2145. DOI: 10.1002/jcc.23354.
49. Molecular dynamics with coupling to an external bath / H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Cunsteren [et al.] // The Journal of Chemical Physics. - 1984. - Vol. 81, Issue 8. - P. 3684-3690. https://doi.org/10.1063/1.448118

50. Cherniavskyi Y. K. Interaction of C60 fullerenes with asymmetric and curved lipid membranes: a molecular dynamics study / Y. K.Cherniavskyi, C. Ramseyer, S. O. Yesylevskyy // Physical Chemistry Chemical Physics. - 2016. - Vol. 18, Issue 1. - P. 278-284. https://doi.org/10.1039/C5CP05838D
51. Páll S. A flexible algorithm for calculating pair interactions on SIMD architectures / S. Páll, B. Hess // Computer Physics Communications. - 2013. - Vol. 184, Issue 12. - P. 2641-2650. https://doi.org/10.1016/j.cpc.2013.06.003
52. GROMACS: Fast, Flexible and Free /D. Van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess [et al.] // J. Comp. Chem. - 2005. - Vol. 26, Issue 16. - P. 1701–1718. doi: 10.1002/jcc.20291.
53. Bussi G. Canonical sampling through velocity rescaling / G. Bussi, D. Donadio, M. Parrinello // The Journal of Chemical Physics. - 2007. - Vol. 126, Issue 1. - P. 014101.doi: 10.1063/1.2408420.
54. Yesylevskyy S. O. Pteros: Fast and easy to use open-source C++ library for molecular analysis /S. O. Yesylevskyy // Journal of Computational Chemistry. - 2012. - Vol. 33, Issue 19. - P. 1632-1636.
55. Apoptosis and eryptosis: Striking differences on biomembrane level / K.A. Pyrshev, A.S. Klymchenko, G. Csúcs, A.P. Demchenko // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes. – 2018. – Vol. 1860, Iss. 6. – P. 1362-1371. – https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.03.019.
56. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential / M.J. Hope, M.B. Bally, G. Webb, P.R. Cullis // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes. – 1985. – Vol. 812, Iss. 1. – P. 55-65. – DOI: 10.1016/0005-2736(85)90521-8.
57. Skinkle A.D. Cell-derived plasma membrane vesicles are permeable to hydrophilic macromolecules / A.D. Skinkle, K.R. Levental, I. Levental // Biophysical journal. – 2020. –Vol. 118, Iss. 6. –P. 1292-1300. – https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.12.040.

58. Bright and photostable push-pull pyrene dye visualizes lipid order variation between plasma and intracellular membranes / Y. Niko, P. Didier, Y. Mely [et al.] // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6. –P. 18870: 1-9. – DOI: 10.1038/srep18870.
59. Switchable Nile Red-based probe for cholesterol and lipid order at the outer leaflet of biomembranes / O.A. Kucherak, S. Oncul, Z. Darwich [et al.] // Journal of American Chemical Society. – 2010. –Vol. 132, Is. 13. P. 4907-4916. – https://doi.org/10.1021/ja100351w.
60. Fluorescent biomembrane probe for ratiometric detection of apoptosis / V.V. Shynkar, A.S. Klymchenko, C. Kunzelmann // Journal of American Chemical Society. – 2007. –Vol. 129, Iss. 7. – P. 2187-2193. – DOI: 10.1021/ja068008h.
61. Imaging lipid order changes in endosome membranes of live cells by using a Nile Red-based membrane probe / Z. Darwich, A.S. Klymchenko, D. Dujardin, Y. Mély // RSC Advances. – 2014. –Vol. 4, Iss. 17. – P. 8481-8488. – https://doi.org/10.1039/C3RA47181K.
62. Casares D. Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues/ D. Casares, P.V. Escribá, C.A. Rosselló // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – Vol. 20, Iss. 9. – P. 2167. –DOI: 10.3390/ijms20092167.
63. Lipid Analysis of Airway Epithelial Cells for Studying Respiratory Diseases / Nicole Zehethofer, Saskia Bermbach, Stefanie Hagner [et al.] //Chromatographia. –2015. – Vol. 78, Iss. 5–6. –P. 403–13. – DOI: 10.1007/s10337-014-2787-5 .
64. Lorent, J., et al., Plasma membranes are asymmetric in lipid unsaturation, packing and protein shape / J. H. Lorent, K. R. Levental, L. Ganesan [et al.] // Nature Chemical Biology. - 2020. –Vol. 16, Iss. 6. P. 644-652.
65. van Meer G. Membrane lipids: where they are and how they behave / G. van Meer, D. R. Voelker, G. W. Feigenson. // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2008. – Vol. 9. – P. 112–124.

66. Yesylevskyy S. O. Pteros 2.0: Evolution of the fast parallel molecular analysis library for C++ and python / S. O. Yesylevskyy // Journal of Computational Chemistry. - 2015. - Vol. 36, Issue 19. - P. 1480-1488.
67. Mathlouthi M. FTIR and laser-Raman spectra of adenine and adenosine /M. Mathlouthi, A. M. Seuvre, J. L. Koenig // Carbohydrate research. - 1984. - Vol. 131, Issue 1. - P. 1-15.
68. Репницька О. П. Структурні особливості нуклеїнових кислот з опромінених та пухлинних тканин : дис. канд. фіз.-мат. наук : 03.00.02 / Репницька Олена Петрівна. – Харків, 2002. – 166 с.
69. Remdesivir inhibits SARS-CoV-2 in human lung cells and chimeric SARS-CoV expressing the SARS-CoV-2 RNA polymerase in mice / A. J. Pruijssers, A. S. George, A. Schäfer [et al.] // Cell Reports. - 2020. - Vol. 32, Issue 3. - P. 107940. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.107940.
70. Antibacterial Activity of Ticagrelor in Conventional Antiplatelet Dosages Against Antibiotic-Resistant Gram-Positive Bacteria / P. Lancellotti, L. Musumeci, N. Jacques [et al.] // JAMA Cardiol. - 2019. - Vol. 4, № 6. - P. 596–599. DOI: 10.1001/jamacardio.2019.1189
71. Surface enhanced IR absorption of nucleic acids from tumor cells: FTIR reflectance study / G.I. Dovbeshko, V.I. Chegel, N.Y. Gridina [et al.] // Biopolymer (Biospectroscopy). - 2002. - Vol. 67. - P. 470–486.
72. Movasaghi Z. : Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues / Z. Movasaghi , Sh. Rehman, Dr. I. ur Rehman, Applied Spectroscopy Reviews. - 2008. - Vol. 43, Issue 2. - P. 134-179 .
73. Dovbeshko G.I. FTIR spectroscopy studies of nucleic acid damage / G.I. Dovbeshko, N.Y. Gridina, E.B. Kruglova, O.P. Pashchuk // Talanta. - 1997. -Vol. 53. - P. 233–246.
74. Selvarajan A. Raman spectrum of dimethyl sulfoxide (DMSO) and the influence of solvents / A. Selvarajan // Proc. Indian Acad. Sci.. - 1966. - Vol. 64. - P. 44–50. https://doi.org/10.1007/BF03049330

75. Movasaghi Z. Raman Spectroscopy of Biological Tissues / Z. Movasaghi, S. Rehman, I. U. Rehman // Applied Spectroscopy Reviews. – 2007. - Vol. 42. – P. 493–541. DOI: 10.1080/05704920701551530
76. Application of Mid-infrared and Raman Spectroscopy to the Study of Bacteria / X.Lu, H. M. Al-Qadiri, M. Lin, B. A. Rasco. // Food Bioprocess Technol. – 2011. - Vol. 4, №6. - P. 919-935. DOI: 10.1007/s11947-011-0516-8
77. Studying single living cells and chromosomes by confocal Raman microscopy/ G.J. Puppels, F.F.M. de Mul, C. Otto [et al.] // Nature. – 1990. – vol. 374. – p. 301-303. DOI: 10.1038/347301a0
78. Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development / T. Tang, M. Bidon, J. Jaimes [et al.] // Antiviral Res.– 2020.– Vol. 178.– P. 104792
79. Membrane fusion and fission: Enveloped viruses / A. Falanga, M. Cantisani, C. Pedone, S. Galdiero // Protein & Peptide Letters.– 2009.– Vol. 16.– P. 751–759
80. Teissier É. Lipids as modulators of membrane fusion mediated by viral fusion proteins / É. Teissier, E.–I.·Pécheur // Eur Biophys J.– 2007.– Vol. 36.– P. 887–899
81. Danbolt N.C. Glutamate uptake/ N.C. Danbolt // Prog. Neurobiol. - 2001. - Vol.65. - P. 1–105.
82. Zoccarato F. The pH-sensitive dye acridine orange as a tool to monitor exocytosis/endocytosis in synaptosomes / F. Zoccarato, L. Cavallini, A. Alexandre // J. Neurochem. – 1999. – Vol. 72. – P.625-633.
83. Composition of isolated synaptic boutons reveals the amounts of vesicle trafficking proteins / B.G. Wilhelm, S. Mandad, S. Truckenbrodt [et al.] // Science. - 2014. - 344(6187). - P. 1023–1028. doi:10.1126/science.1252884

84. Dunkley P.R. Synaptosome Preparations: Which Procedure Should I Use? / P.R. Dunkley, P.J. Robinson // Synaptosomes. - 2018. - P. 27–53. doi:10.1007/978-1-4939-8739-9_3
85. Cotman C.W. Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions / C.W. Cotman // Methods Enzymol. —1974.—31.— P. 445—452.
86. Larson E. (1986). Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination / E. Larson, B. Howlett, A. Jagendorf // Anal Biochem. - 1986, - Vol. 155(2). - P. :243-248. doi: 10.1016/0003-2697(86)90432-x.
87. Surface enhanced imaging and IR spectroscopy of the biological cells on the nanostructured gold film / G.I. Dovbeshko, O.P. Gnatyuk, S.O. Karakhim [et al.] // Semiconductor physics, quantum electronics & optoelectronics. - 2017. - Vol. 20, № 2. - P. 159-167.
88. Comparative synaptosome imaging: a semi-quantitative method to obtain copy numbers for synaptic and neuronal proteins / K.N. Richter, H. Wildhagen, M.S. Helm [et al.] // Scientific Reports. - 2018. - Vol. 8(1). - P. 14838: 1-16. doi:10.1038/s41598-018-33130-6
89. Flow cytometry analysis of synaptosomes from post-mortem human brain reveals changes specific to Lewy body and Alzheimer's disease / N.O. Postupna, C.D. Keene, C. Latimer [et al.] //Laboratory Investigation. - 2014. - Vol. 94(10). - P. 1161–1172. doi:10.1038/labinvest.2014.103
90. Proteomic Characterization of Synaptosomes from Human Substantia Nigra Indicates Altered Mitochondrial Translation in Parkinsonâ Disease / S. Plum, B. Eggers, S. Helling [et al.] // Cells. - 2020. - Vol. 9(12). - P. 2580. doi:10.3390/cells9122580
91. Goormaghtigh E. Determination of Soluble and Membrane Protein Structure by Fourier Transform Infrared Spectroscopy / E. Goormaghtigh, V. Cabiaux, J.-M. Ruysschaert //Subcell. Biochem. - 1994. - Vol. 23. - P. 405–450.
92. Parker F.S. Biochemical Applications of Infrared and Raman Spectroscopy / F.S. Parker. - New York: Plenum Press., 1983. - 528 p.

93. FTIR studies of phospholipid membranes containing monoacetylenic acyl chains / P. Wolfangel, R. Lehnert, H.H. Meyer, K. Müller // Physical Chemistry Chemical Physics. - 1999. - Vol. 1(20). - P. 4833–4841. doi:10.1039/a905605j
94. Simons K. Functional rafts in cell membranes / K. Simons, E. Ikonen // Nature. - 1997. - Vol. 387(6633). - P. 569.
95. Lingwood D. Lipid rafts as a membrane-organizing principle / D. Lingwood, K. Simons // Science. - 2010. - Vol. 327(5961). - P. 46-50.
96. Lipid segregation explains selective toxicity of a series of fragments derived from the human cathelicidin LL-37 / R.F. Epand, G. Wang, B. Berno, R.M. Epand // Antimicrobial agents and chemotherapy. - 2009. - Vol. 53(9). P. 3705-3714. doi: 10.1128/AAC.00321-09.
97. Daptomycin-resistant Enterococcus faecalis diverts the antibiotic molecule from the division septum and remodels cell membrane phospholipids / T.T. Tran, D. Panesso, N.N. Mishra [et al.] // MBio, 2013. 4(4): p. e00281-13. doi: 10.1128/mBio.00281-13.
98. Reconstitution of Cell Membrane Structure in vitro and its Transformation into an Excitable System / P. Mueller, D.O. Rudin, H.T. Tien, W.C. Wescott // Nature. - 1962. - V.194. - P. 979-980.
99. Shamoo A.E. Isolation of ionophores from ion transport systems and their role in energy transduction / A.E. Shamoo, D.A. Goldstein // Biochim. Biophys. Acta, - 1977. - V.472. - P. 13-53.
100. Duxin Sun. Remdesivir for Treatment of COVID-19: Combination of Pulmonary and IV Administration May Offer Aditional Benefit / Duxin Sun // AAPS J. - 2020. - V. 22, No4. - P. 77.
101. Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial / Y. Wang, D. Zhang, G. Du [et al.] // Lancet. – 2020. - V. 395. - P. 1569–1578.

102. Millet J.K. Physiological and molecular triggers for SARS-CoV membrane fusion and entry into host cells / J.K. Millet, G.R. Whittaker // Virology. - 2018. - V. 517. - P. 3– 8. https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.12.015
103. Importance of cholesterol-rich membrane microdomains in the interaction of the S protein of SARS-coronavirus with the cellular receptor angiotensin-converting enzyme 2. / J. Glende, C. Schwegmann-Wessels , M. Al-Falah [et al.] // Virology. - 2008. - V. 381. - P.215–221.
104. Therapeutic efficacy of the small molecule GS-5734 against Ebola virus in rhesus monkeys / T.K. Warren, R. Jordan, M.K. Lo [et al.] // Nature. - 2016. - V. 531. - P.381–385. https://doi.org/10.1038/nature17180
105. Repurposing of chloroquine and some clinically approved antiviral drugs as effective therapeutics to prevent cellular entry and replication of coronavirus / A.O. Adeoye, B.J. Oso, I.F. Olaoye [et al.] // J Biomol Struct Dyn. - 2021. - V. 39, No 10. – P. 3469-3479. https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1765876
106. Sluyter R. The P2X7 receptor. In: Advances in Experimental Medicine andBiology // Springer New York LLC. - 2017. - P. 17–53
107. The P2X7 receptor: A main player in inflammation / E. Adinolfi, A.L. Giuliani, E. De Marchi [et al.] // Biochem. Pharmacol. - 2018. - V. 151. - P.234–244. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.12.021
108. Hyperactivation of P2X7 receptors as a culprit of COVID-19 neuropathology / D.E. Ribeiro, Á. Oliveira-Giacomelli, T. Glaser [et al.] // Mol. Psychiatry. - 2020. - V. 26. - P. 1044–1059. https://doi.org/10.1038/s41380-020-00965-3
109. Remdesivir use in the coronavirus disease 2019 pandemic: A mini-review / C.J. Yang, Y.J. Wei, H.L. Chang [et al.] // J. Microbiol. Immunol. Infect. - 2021. - V. 54.- P. 27–36. https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.09.002

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ, НАВЧАЛЬНО-МЕТОДИЧНИХ ПРАЦЬ, ВИДАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДОСЛІДЖЕННЯ

110. GABAA receptor agonist cinazepam and its active metabolite 3-hydroxyphenazepam act differently at the presynaptic site / [T. Borisova, N. Pozdnyakova, M. Dudarenkova et al.] // European Neuropsychopharmacology. – 2021. – vol. 45. –P. 39-51. https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2021.03.013
111. G.I. Dovbeshko, S.O. Yesylevskyy, U.K. Afonina, O.P. Gnatyuk, O.P.Stanovyi, N. Krisanova, N. Pozdnyakova, A. Pastukhov, K.O. Pyrshev, T.O. Borisova, M.V. Bogdanov Spectroscopic signatures of real and mimetic membranes as diagnostic markers for the interaction of anti-viral drug Remdesivir with the cell membranes XXV Galyna Puchkovska International School Seminar "Spectroscopy of Molecules and Crystals" (XXV ISSSMC). Kyiv, Ukraine, September 21-24, 2021. p. 18
112. Spectral characteristics of isolated presynaptic nerve terminals / [U. Afonina, O. Stanovyi, G. Dovbeshko et al.] // XVII International scientific conference for students and PhD students ‘Youth and progress of biology’: International scientific conference, Lviv, Ukraine, 19–21 April 2021 – Lviv, 2021. – P. 30.
113. O. Gnatyuk, G. Dovbeshko, U. Afonina, N. Krisanova, N. Pozdnyakova, T. Borisova Spectroscopic signature of remdesivir and its interaction with synaptosome XXV Galyna Puchkovska International School Seminar "Spectroscopy of Molecules and Crystals" (XXV ISSSMC). Kyiv, Ukraine, September 21-24, 2021. p. 96
114. Barabash Yu.M., Olenchuk M.V. A technique liposomal forms preparation as carriers of water-soluble and water-insoluble drugs 7th International Conference NANOBIOPHYSICS:Fundamental and Applied Aspects, 4 –8 October 2021, Kharkiv, Ukraine. p.27
115. Coherent anti-stokes Raman scattering spectroscopy (CARS) and imaging of DNA on graphene layers and glass covers / [G. Dovbeshko, O. Gnatyuk, A. Dementjev et al.] // FlatChem.- 2021.- Vol.27. – p. 100243. https://doi.org/10.1016/j.flatc.2021.100243
116. Krisanova N., Pozdnyakova N., Pastukhov A., Dudarenko M., Gnatyuk O., Afonina U., Pyrshev K., Dovbeshko G., Yesylevskyy S., Borisova T. Anti-SARS-CoV-2 drug

remdesivir influences excitatory and inhibitory neurotransmission in cortex nerve terminals. Experimental Neurology (EXNR-21-765), [under review]

117. U.K. Afonina, O.P. Gnatyuk, K.A .Pyrshev, G.I. Dovbeshko REMDESIVIR DOES INHIBIT THE FORMATION OF LIPID RAFTS 7th International Conference NANOBIOPHYSICS:Fundamental and Applied Aspects, 4 – 8 October 2021 , Kharkiv, Ukraine.p.25
118. Barabash Yu.M Identification of Hidden Parameters of Conformational States During Photoexcitation of Protein Macromolecules XXV Galyna Puchkovska International School Seminar "Spectroscopy of Molecules and Crystals" (XXV ISSSMC). Kyiv, Ukraine, September 21-24, 2021. p. 176
119. G.I. Dovbeshko, S.O. Yesylevskyy, U.K. Afonina, O.P. Gnatyuk , M.V. Olenchuk, Krisanova N., Pozdnyakova N., Pastukhov A., Pyrshev K., Borisova T., Bogdanov M. THE EFFECT OF TICAGRELOR ON THE STRUCTURAL PROPERTIES OF SYNAPTOSOMES : IR SPECTROSCOPY STUDIES XIV Міжнародна конференція по біоніці і прикладній біофізиці, Київ, Україна, 4-5 листопада 2021 року, p. 18
120. G.I. Dovbeshko, S.O. Yesylevskyy, U.K. Afonina, O.P. Gnatyuk , M.V. Olenchuk, Krisanova N., Pozdnyakova N., Pastukhov A., Pyrshev K., Borisova T., Bogdanov M.THE EFFECT OF LOW TEMPERATURES ON THE STRUCTURAL PROPERTIES OF SYNAPTOSOMES : FTIR SPECTROSCOPY DATA XIV Міжнародна конференція по біоніці і прикладній біофізиці, Київ, Україна, 4-5 листопада 2021 року, p. 22
121. O.P. Gnatyuk , U.K. Afonina, N. Krisanova, N. Pozdnyakova, T.O. Borisova, S.O. Karakhim and G.I. Dovbeshko Spectroscopic signatures of synaptosomes: ATR-IR spectroscopy data. *Molecular Crystals and Liquid Crystals* [under review]
122. Yesylevskyy S., Khandelia H. EnCurv: Simple Technique of Maintaining Global Membrane Curvature in Molecular Dynamics Simulations //*Journal of Chemical Theory and Computation*. – 2021. – Т. 17. – №. 2. – С. 1181-1193. https://doi.org/10.1021/acs.jctc.0c00800

123. Afonina Uliana, Dovbeshko Galina. FTIR- ATR SPECTROSCOPY FOR STUDYING LIPID RAFTS TARGETING BY ANTIVIRAL DRUG REMDESIVIR II Міжнародна студентська наукова конференція «Пріоритетні напрями та вектори розвитку світової науки».- 2021.- Т.2. p. 78-81. DOI https://doi.org/10.36074/liga-inter-19.11.2021
124. Yesylevskyy S., Khandelia H. MAINTAINING GLOBAL MEMBRANE CURVATURE IN MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS USING ENCURV TECHNIQUE // 7th International Conference NANOBIOPHYSICS:Fundamental and Applied Aspects, 4 –8 October 2021, Kharkiv, Ukraine. p.106