

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»

Факультет природничих наук
Кафедра біології

Кваліфікаційна робота
освітній ступінь - бакалавр

**на тему «ВПЛИВ МОДУЛЯТОРІВ СІГМА-РЕЦЕПТОРІВ НА
ПОТЕНЦІАЛ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ТА АЦИДИФІКАЦІЮ
СИНАПТИЧНИХ ВЕЗИКУЛ НЕРВОВИХ ТЕРМІНАЛЕЙ КОРИ
ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ»**

Виконала: студентка 4-го року навчання
спеціальність 091 – біологія

Грицаєнко Валерія Віталіївна

Керівники: Позднякова Н. Г., кандидат
біологічних наук, ст. наук. спів. Інституту
біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України;

Єфіменко Т. С., кандидат біологічних наук, ст.
викладач кафедри біології НаУКМА

Рецензент: Чернишенко В. О., кандидат
біологічних наук, ст. наук. спів. Інституту
біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України

Кваліфікаційну роботу захищено з оцінкою ____

Секретар ЕК _____
Пасічник Т.В.

«____» червня 2020 року

Київ – 2020

ЗМІСТ

ВСТУП.....	3
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	5
1.1. Роль сігма-рецепторів у функціонуванні нервової системи	5
1.1.1. Загальна характеристика сігма-рецепторів.....	6
1.1.1.1. Молекулярна біологія та функції сігма-рецепторів 1 підтипу.....	8
1.1.1.2. Молекулярна біологія та функції сігма-рецепторів 2 підтипу.....	9
1.1.2. Основні модулятори сігма-1 рецепторів.....	10
1.1.3. Механізм функціонування сігма-1 рецепторів.....	11
1.1.3.1. Модуляція активності потенціал-залежних Ca^{2+} -іонних каналів.....	11
1.1.3.2. Модуляція активності потенціал-залежних Na^{+} -іонних каналів.....	12
1.1.3.3. Модуляція активності потенціал-залежних K^{+} -іонних каналів.....	13
1.1.3.4. Модуляція активності ліганд-залежних іонних каналів.....	14
1.1.4. Роль сігма-рецепторів у процесах нейропротекції.....	15
1.1.4.1. Ексайтотоксичність глутамату.....	16
1.1.4.2. Порушення кальцієвого сигналювання.....	18
1.1.4.3. Порушення функціонування ендоплазматичного ретикулула.....	18
1.1.4.4. Нейрозапалення	20
1.1.4.5. Астрогліоз	21
1.1.5. Роль сігма-рецепторів у процесах нейровідновлення.....	21
1.1.5.1 Підвищення експресії або активності фактору росту.....	21
1.1.5.2. Зміни морфології нейронів.....	22
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	23
2.1. Об'єкт дослідження.....	23
2.2. Матеріали, реактиви та обладнання	25
2.3. Методи дослідження	25
2.3.1. Виділення ізольованих нервових терміналей кори головного мозку щурів. ..	25
2.3.2. Визначення концентрації білка у суспензії синапсом.....	26
2.3.3. Оцінка потенціалу плазматичної мембрани нервових терміналей.....	29
2.3.4. Оцінка ацидифікації синаптичних везикул нервових терміналей.....	29
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	31
3.1. Оцінка впливу антагоністів сігма-1 рецепторів – NE-100 та BD-1047, на потенціал плазматичної мембрани нервових терміналей	31
3.1.1. Результати оцінки впливу BD-1047 на потенціал плазматичної мембрани.	31
3.1.2. Результати оцінки впливу NE-100 на потенціал плазматичної мембрани.	33
3.2. Оцінка впливу антагоністів сігма-1 рецепторів – NE-100 та BD-1047, на ацидифікацію синаптичних везикул.....	34
3.1.2. Результати оцінки впливу BD-1047 на ацидифікацію синаптичних везикул.	34
3.1.2. Результати оцінки впливу NE-100 на ацидифікацію синаптичних везикул. ..	36
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	38
ВИСНОВКИ.....	41
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	42
ДОДАТОК А	49

ВСТУП

Нейродегенеративні захворювання, а саме хвороба Альцгеймера (AD), хвороба Паркінсона (PD), хвороба Хантінгтона (HD), бічний аміотрофічний склероз (ALS) та інсульт, характеризуються функціональною і структурною втратою нейронів. Вони є основною причиною високого рівня захворюваності та смертності серед осіб похилого віку. За даними Всесвітнього звіту про захворювання Альцгеймера станом на 2015 рік у всьому світі налічувалось близько 46,8 мільйонів людей з деменцією. За прогнозами цей показник збільшуватиметься вдвічі кожні 20 років, досягнувши 74,7 мільйонів у 2030 році та 131,5 мільйонів у 2050 році. Хоча сучасні методи лікування нейродегенеративних захворювань здатні тимчасово полегшити деякі симптоми та покращити якість життя, вони, як правило, є неефективними для уповільнення або цілковитої зупинки прогресування захворювання [21,47].

Усе більше даних підтверджують позитивний вплив модуляторів сігма-рецепторів на когнітивні функції. Ці рецептори регулюють функціонування ряду іонних каналів, зокрема потенціал-залежних Ca^{2+} , Na^{+} та K^{+} -іонних каналів, залучених до генерування та проведення потенціалу дії. Таким чином, сігма-рецептори мають здатність впливати на збудливість нейронів. До того ж вони модулюють активність іонотропних рецепторів глутамату (NMDAR), які залучені до процесів синаптичної пластичності, навчання та пам'яті [1-7,9, 47].

Як наслідок, сігма-рецептори стали потенційними мішенями нових терапевтичних засобів для лікування нейродегенеративних захворювань. Загалом, вони залучені до різних нейрональних процесів, у тому числі регуляції виживання та функцій нейронів, кальцієвого сигналювання, вивільнення нейромедіаторів, запалення та синаптогенезу. Їх ліганди безпосередньо або опосередковано модулюють ексайтотоксичність,

порушення функціонування мітохондрій та ендоплазматичного ретикулуму, а також астрогліоз. Однак молекулярні механізми таких ефектів є недостатньо вивченими [7,8,22,47].

Таким чином, мета кваліфікаційної роботи полягає у встановленні впливу антагоністів сігма-рецепторів на потенціал плазматичної мембрани та ацидифікацію синаптичних везикул в нервових терміналях кори головного мозку щурів. Відповідно до мети сформульовано наступні завдання:

1. Оцінити потенціал плазматичної мембрани нервових терміналей кори головного мозку щурів за дії антагоністів сігма-1 рецепторів – NE-100 та BD-1047.
2. Оцінити ступінь ацидифікації синаптичних везикул кори головного мозку щурів за дії антагоністів сігма-1 рецепторів – NE-100 та BD-1047.
3. На основі експериментальних даних проаналізувати вплив антагоністів сігма-1 рецепторів на функціонування нервових терміналей кори головного мозку щурів.

Реалізація зазначених мети та завдань була здійснена в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна, відділ нейрохімії.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Роль сігма-рецепторів у функціонуванні нервової системи

Процес передавання інформації у нервовій системі передбачає складні зміни активності нервових клітин – нейронів. Електричні сигнали в головному мозку постійно зазнають впливу збудливого (глутамат) та гальмівного (γ -аміномасляна кислота) нейромедіаторів. Це, у свою чергу, зумовлює виникнення збуджуючих та гальмуючих постсинаптичних потенціалів, які породжують потенціал дії. Потенціал дії надходить від сомато-дендритної ділянки вздовж аксона до його пресинаптичного відділу, де здійснюється вивільнення нейромедіаторів. Останні забезпечують хімічне передавання інформації шляхом зв'язування зі специфічними постсинаптичними рецепторами, розташованими на постсинаптичній мембрані сусідніх нейронів [3].

За останні два десятиліття показано, що сігма-рецептори (рис. 1.1) впливають на кожну стадію процесу передавання інформації як у центральній (ЦНС), так і в периферичній нервовій системі (ПНС) [3].



Рис. 1.1. Вестерн-блот сігма-1 рецептора нервових терміналей кори головного мозку щурів. Адаптовано з [2].

1.1.1. Загальна характеристика сігма-рецепторів. Термін “сігма-рецептор” виник у 1976 році внаслідок фармакологічного дослідження, що постулювало існування трьох типів опіоїдних рецепторів – μ , κ та σ . Вони були виділені на основі психоміметичних ефектів, спричинених кількома опіоїдними сполуками: морфін, кетациклозацин та SKF-10047, відповідно [1,2,6,47-49,50].

Проте у 1982 році при дослідженні сігма-опіоїдних рецепторів було ідентифіковано сайт зв'язування лігандів, а саме N-алілнорметазоцину та SKF-10047, який виявився нечутливий до налоксону. Таким чином було встановлено, що цей ідентифікований сайт зв'язування не належить опіоїдним рецепторам, оскільки вони характеризуються чутливістю до налоксону. За результатами цього дослідження назву “сігма-опіоїдний рецептор” було змінено на “сігма-рецептор” та класифіковано його як неопіоїдний [1,2,6,50].

З урахуванням селективності лігандів виявлено, що сігма-рецептори представлені двома підтипами: сігма-1 (S1R) та сігма-2 (S2R). Згодом ідентифіковано сігма-рецептор 3 підтипу (S3R), який є досі недостатньо дослідженим. Сігма-3 рецептори є пов'язаними з конверсією тирозину в дофамін та активацією протеїнкінази C. Агоністи цих рецепторів збільшують швидкість синтезу дофаміну. Крім того, існує гіпотеза, що сігма-3 рецептори мають властивості рецепторів гістаміну (H1R). Незалежно від цих даних, молекулярна біологія сігма-3 рецепторів є не чітко визначеною. До сьогоденішнього дня ведуться дискусії щодо питання, чи є сігма-3 рецептори окремим підтипом чи, скоріше, варіантом сігма-1 чи сігма-2 рецепторів [1,2,6,50].

Загалом, сігма-рецептори локалізовані у спинному та всіх відділах головного мозку, особливо гіпокампі, мигдалеподібному тілі, червоних ядрах, чорній субстанції та лобовій частці, де вони зосереджені переважно у плазматичній мембрані та мембрані ендоплазматичного ретикулума нейронів і гліальних клітин, а саме олігодендроцитів (рис. 1.2) [1,2,6,50].

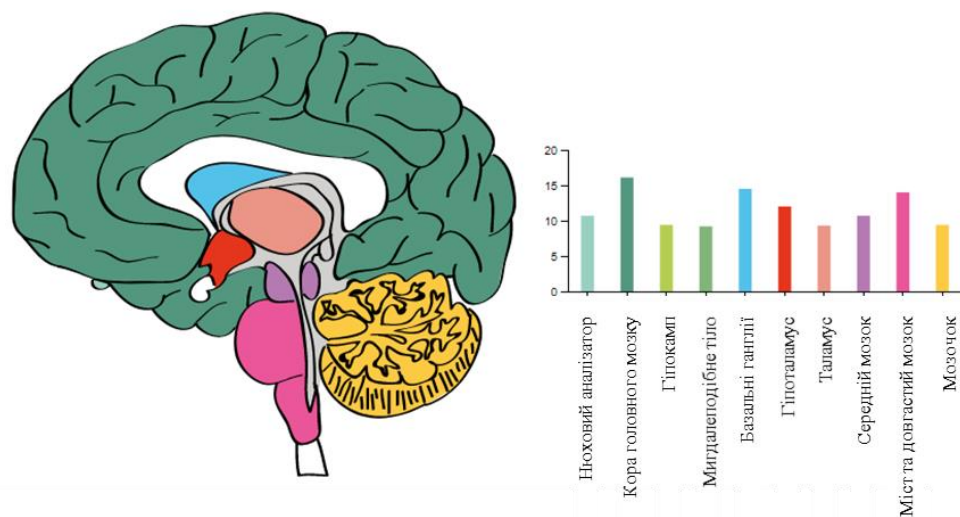


Рис. 1.2. Показники експресії РНК та кількості сігма-1 рецепторів у різних ділянках головного мозку людини. Адаптовано з [56].

Окрім того, ці рецептори наявні в інших органах та системах органів: печінка, підшлункова залоза, легені, наднирники, статеві органи, ендокринна та імунна системи (рис. 1.3) [1,2,6,50].



Рис. 1.3. Показники експресії РНК та кількості сігма-1 рецепторів у різних тканинах людини. Адаптовано з [56].

1.1.1.1. Молекулярна біологія та функції сігма-рецепторів 1 підтипу.

Сігма-1 рецептор – це поліпептид молекулярної маси 25кДа, що є продуктом гена *SIGMAR1* або *OPRS1*, розташованого на 9 хромосомі, локус p13, у людини [1,3,6,9,47-49,50].

S1R локалізований у мембрані ендоплазматичного ретикулума, а саме у тій ділянці, що звернена до мітохондрії. Ця спеціалізована ділянка мембрани ендоплазматичного ретикулума називається мітохондрія-асоційована мембрана (МАМ). У ній сігма-1 рецептор локалізується у керамід- та холестерин-збагачених мікродоменах, де він зв'язаний з ВіР – шапероном ендоплазматичного ретикулуму. Локалізація S1R має динамічний характер. Це обумовлено здатністю рецептора транслокувати з МАМ в інші ділянки клітини: до цитоплазматичної мембрани та ядра [1,3,5,6,8,9,47-49,50].

Сігма-1 рецептор складається з 223 амінокислот та має одну трансмембранну ділянку (TM1) і два стероїд-зв'язуючі домени (SBDL). Ці домени формують "кишеню", яка є місцем зв'язування різних природних та синтетичних сполук – сігма-лігандів, або модуляторів. На N-кінці поліпептид містить сигнальну ділянку з 22 амінокислот для зв'язування з ендоплазматичним ретикулумом, тоді як на С-кінці – дві короткі гідрофобні послідовності для зв'язування стероїдних сполук (рис. 1.4) [1,3,6,8,9,47-49,50].

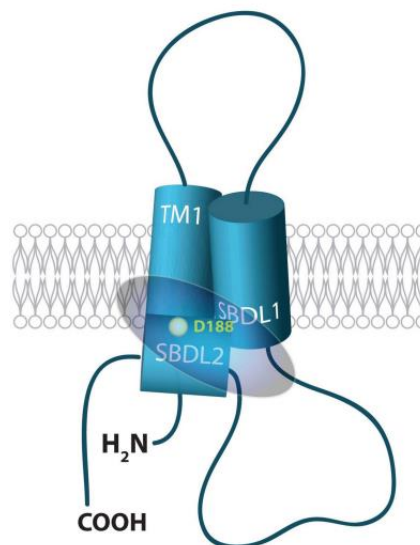


Рис. 1.4. Структура сігма-1 рецепторів. Адаптовано з [8].

Добре відомо, що сіigma-1 рецептор здатен утворювати олігомерну структуру. Для олігомеризації необхідний мотив GXXXG, що входить до структури S1R. Відповідно до набуття цим рецептором різних олігомерних станів, різноманітні сіigma-ліганди мають унікальні клітинні ефекти. На основі цього слід припустити, що олігомерні стани сіigma-1 рецепторів впливають на його здатність зв'язувати цільові білки, у тому числі іонні канали різних родин та ВіР. Ця гіпотеза набуває перших підтверджень. Нещодавно проведений кореляційний експеримент показав наступне: такий антагоніст сіigma-1 рецепторів, як галоперидол, сприяючи олігомеризації рецептора, знижує його взаємодію з ВіР. Тоді як агоніст – (+)-пентазоцин має протилежний ефект [1,3,6,8,9,47-49,50].

Цей тип сіigma-рецепторів регулює низку нейромедіаторних систем: глутаматергічну (Glu), дофамінергічну (DA), серотонінергічну (5HT), норадренергічну (NE) та холенергічну (Ch), а також модулює активність іонних каналів різних родин та рецептора інозитол-3-фосфату. До того ж, сіigma-1 рецептори беруть участь у процесах генерації активних форм кисню (ROS), які продукуються NADPH-оксидазою. Його активація гальмує утворення ROS у клітинах. Проте суперечливі результати щодо впливу сіigma-лігандів на утворення активних форм кисню потребують більш детального вивчення. Рівень реактивних форм кисню підвищується в клітинах Мюллера сітківки за зниженої кількості S1R. На противагу цьому, у мітохондріях спинного і головного мозку, агоністи сіigma-1 рецептора зумовлюють збільшення кількості ROS. Окрім того, S1R залучений до таких клітинних процесів, як компартменталізація ліпідів у ендоплазматичному ретикулумі, синтез ліпідів, обмін речовин, регуляція клітинного циклу, нейрогенез, клітинна диференціація та мієлінізація аксонів нервових клітин [1,3,4,6,47-49,50].

1.1.1.2. Молекулярна біологія та функції сіigma-рецепторів 2 підтипу.

Сіigma-2 рецептор вперше описаний для клітинної лінії феохромоцитомі–PC12. Це поліпептид молекулярною масою від 18 до 21 кДа, серед

селективних лігандів якого високою спорідненістю володіє N-[2-(3,4-дихлорфеніл)-етил]-N-метил-2-(1-піролідиніл)-етиламін(BD1008) та ібогаїн. Незважаючи на значні зусилля, ген сігма-2 рецепторів залишається досі невідомим. Тому існують припущення, що цей рецептор є наслідком альтернативного сплайсингу гена сігма-1 рецептора [1,5,49].

Окрім модуляції концентрації Ca^{2+} , ці рецептори беруть участь в інгібуванні тонічних K^+ -каналів, посиленні реакції нейронів на N-метил-D-аспартат у ділянці CA3 гіпокампу щурів, активації p53- і каспаза-незалежного шляхів апоптозу, диференціації стовбурових клітин та регуляції моторних функцій. Механізм, за допомогою якого сігма-2 рецептори беруть участь в індукції апоптозу, є опосередкованим модуляцією внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} [1,5,49].

1.1.2. Основні модулятори сігма-1 рецепторів. На сьогоднішній день синтезовано та описано численну кількість лігандів сігма-рецепторів. Деякі з них є доволі поширеними та легкодоступними препаратами, наприклад декстрометорфан. Він входить до складу ліків проти кашлю [1,3,6,11].

Лігандами до цих рецепторів виступають різноманітні класи психотропних препаратів – антипсихотичні, наприклад галоперидол з найвищою спорідненістю до рецептора; селективні інгібітори зворотного захоплення серотоніну (SSRI) і трициклічні антидепресанти (TCA). До інших класів сполук, що зв'язуються з S1R, належать: морфінани (наприклад, DEX), гуанідини (DTG), фенотіазини (хлорпромазин), інгібітори моноамінооксидази (клоргілін), інгібітори цитохрому P450 (проадифен), протисудомні засоби (фенітоїн), наркотичні засоби (кокаїн), поліаміни (іфенпроділ) та деякі стероїди (прогестерон та тестостерон). S1R мають спорідненість до ряду специфічних стереоізомерів деяких препаратів, зокрема (+)-пентазоцину та (+)-циклазоцину [1,3,5,6,11,50].

При цьому існує тонка доза-залежна межа між агоністами та антагоністами, короткий перелік яких наведено у додатку А [1,3,5,6,11,50].

1.1.3. Механізм функціонування сігма-1 рецепторів. Один з механізмів функціонування сігма-1 рецепторів полягає у модуляції активності іонних каналів різних родин. У свою чергу, критичними для формування потенціалу дії, і відповідно, для реалізації синаптичної збудливості, є потенціал-залежні іонні канали, а саме натрієві (Na^+), кальцієві (Ca^{2+}) та калієві (K^+), а також ліганд-залежні іонні канали (рис. 1.5) [1-7,9].

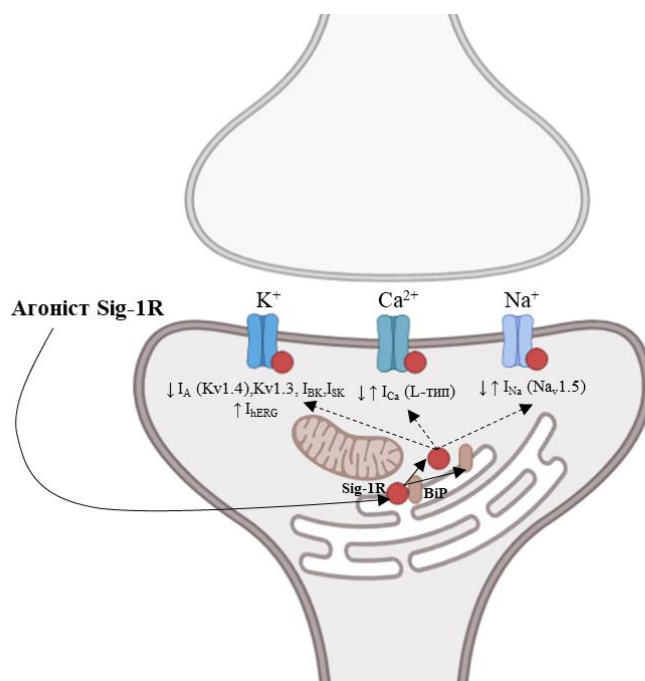


Рис. 1.5. Взаємодія сігма-1 рецептора з різними іонними каналами постсинаптичної мембрани нервової терміналі. Адаптовано з [3].

1.1.3.1. Модуляція активності потенціал-залежних Ca^{2+} -іонних каналів. Кальцій є іоном, який контролює більшість нейронних функцій як прямо, так і опосередковано. Зокрема, потенціал-залежні Ca^{2+} -іонні канали контролюють надходження кальцію з позаклітинних у внутрішньоклітинні ділянки. Це має критичне значення для вивільнення нейромедіаторів та реалізації синаптичного передавання інформації. Кальцій також може виступати вторинним посередником для специфічних внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, що відповідають за зміни функцій нейронів [1-7,9].

На сьогоднішній день продемонстровано, що безпосередня дія сігма-1 рецепторів на потенціал-залежні Ca^{2+} -іонні канали має місце в нервовій системі. Наприклад, у культивованих гангліях сітківки агоніст S1R –

SKF10047, безпосередньо інгібує потік Ca^{2+} . Цей ефект елімінується антагоністом S1R – BD-1047 [1-7,9].

Активація сігма-1 рецепторів ендogenous нейростероїдом – прегненолонсульфатом (PREGS), сприяє незалежній від активації іонотропного рецептору глутамату (NMDAR) формі довготривалого потенціювання у зразках з CA1 ділянки гіпокампу. У той же час, антагоніст S1R – BD-1047, перешкоджає активації Ca^{2+} -каналу L-типу та імітує ефект німодипіну, специфічного блокатора цих іонних каналів. Досі не встановлено, чи в цій моделі сігма-1 рецептор діє безпосередньо на канали Ca^{2+} -каналу L-типу для індукування тривалого потенціювання [1-7,9].

З іншого боку сігма-1 рецептори здатні впливати на активність потенціал-залежних Ca^{2+} -іонних каналів опосередковано. Кілька літературних джерел вказують, що ліганди сігма-1 рецепторів потенційно збільшують концентрацію цитозольного Ca^{2+} через індукцію брадикініном. Однак, скоріше за все, у цьому бере участь рецептор NMDA, оскільки така взаємодія пояснює дію лігандів сігма-1 рецепторів на процеси, опосередковані NMDAR [1-7,9].

Отже, S1R модулює активацію потенціал-залежних Ca^{2+} -іонних каналів як прямо, так і опосередковано, проявляючи як збуджувальні, так і гальмівні ефекти залежно від ділянки мозку. Це підкреслює складність та різноманітність функції S1R [1-7,9].

1.1.3.2. Модуляція активності потенціал-залежних Na^{+} -іонних каналів. За останні кілька років встановлено, що сігма-1 рецептори інгібують потенціал-залежні Na^{+} -іонні канали як безпосередньо, так і опосередковано.

У результаті одного з досліджень, проведеного на препараті префронтальної кори, показано, що активація S1R нейростероїдом – дегідроепіандростеронсульфатом (DHEAS), інгібує потік Na^{+} . Такий ефект виникає через активацію G-білка та протеїнкінази C [1-7,9].

За останні два роки з'ясовано, що сіigma-1 рецептори також можуть модулювати потік Na^+ шляхом прямої взаємодії. Активація S1R у міоцитах серця миші та таких клітинних лініях, як ембріональні клітини нирки людини (HEK 293), завдяки SKF-10047, (+)-пентазоцину або N,N-диметлтриптаміну (DMT) інгібує Nav1.5-опосередковані струми. Цей процес відбувається без участі АТФ або ГТФ. Можна припустити, що інгібіторна дія сіigma-1 рецепторів не залежить від G-білків і протеїнкіназ, і, ймовірно, є результатом прямої взаємодії з Nav1.5 [1-7,9].

Отже, вплив S1R на потік іонів Na^+ , як показано на теперішній час, є гальмівним [1-7,9].

1.1.3.3. Модуляція активності потенціал-залежних K^+ -іонних каналів. Сіigma-1 рецептори мають інгібуючий вплив на різні родини K^+ -іонних каналів як у ненеуронних, так і в нейронних клітинах. Взаємодія між S1R та зазначеним іонним каналом може бути як безпосередньою, так і опосередкованою [1-7,9].

Аналогічно ефекту на потенціал-залежні Na^+ -іонні канали, активація сіigma-1 рецептора зумовлює зменшення активності потенціал-залежних K^+ -іонних каналів при збудженні та затримки реполяризації нейрона. Також ці рецептори негативно впливають на відновлення K^+ -іонних каналів після інактивації. Але, на відміну від його впливу на Na^+ -іонні канали, активація S1R змінює кінетику, що призводить до підвищення збудливості клітин [1-7,9].

Інгібуючий вплив сіigma-ліганду – (+)-пентазоцину, елімінується у присутності холерного токсину, $\text{GTP}\gamma\text{S}$ або $\text{GDP}\beta\text{S}$. Це свідчить про залучення рецептору, пов'язаного з G-білком. Таким чином, сіigma-ліганди або впливають безпосередньо на зв'язок S1R/потенціал-залежний K^+ -іонний канал, або активують процес інтеграції комплексу з S1R, потенціал-залежний K^+ -іонний канал та рецептор, пов'язаний з G-білком. Остання гіпотеза підкріплена нещодавніми дослідженнями, що демонструють наступне: сіigma-1 рецептор здатен модулювати G-білок спряжені рецептори у головному

мозку, а саме опіюїдні й мускаринові рецептори ацетилхоліну, та утворювати комплекс із рецепторами дофаміну D1 та D2 [1-7,9].

Дослідження на препаратах заднього відділу гіпофіза *Xenopus* показали, що S1R пригнічує потік K^+ через потенціал-залежні K^+ -іонні канали субодиниці A, член 4 – Kv1.4, шляхом прямої «білок-білкової» взаємодії. Цікаво, що залежно від відсутності або наявності ліганду, сігма-1 рецептор по-різному проявляє інгібуючі властивості. Це вказує на те, що S1R може діяти як регульована лігандом допоміжна субодиниця K^+ -іонного каналу [1-7,9].

У ембріональних клітинах нирки людини (HEK) сігма-1 рецептор спів-імунопреципітує з K^+ -іонним каналом – hERG, який регулює реполяризацію серця. При цьому така взаємодія призводить до посилення потоку K^+ . Цей ефект зумовлений регуляцією формування і забезпечення стабільності субодиниць зазначеного іонного каналу [1-7,9].

Також можливою є незалежна від ліганду модуляція функції K^+ -іонних каналів. Зокрема, ко-експресія в ооцитах *Xenopus* S1R і Kv1.3, що характерно для Т-лімфоцитів та клітин мозочку, призводить до гальмування потоку калієвих іонів шляхом прискорення інактивації каналу [1-7,9].

Отже, сігма-1 рецептор двосторонньо модулює потік K^+ шляхом опосередкованої або безпосередньої «білок-білкової» взаємодії. Можна припустити, що S1R виступає в якості допоміжної субодиниці для потенціал-залежних K^+ -іонних каналів [1-7,9].

1.1.3.4. Модуляція активності ліганд-залежних іонних каналів.

Сігма-1 рецептори забезпечують двосторонню модуляцію активності іонотропного рецептору глутамату (NMDAR). Це явище було виявлено як у ЦНС, так і в ПНС, у тому числі й в ділянці CA3 дорзального гіпокампу щурів, культивованих нейронних клітинах телецефалону плоду щурів, пірамідальних клітин медіальної префронтальної кори та спинного мозку. Модуляція активації рецептора AMPA (AMPA) є менш ефективною [1-7,9,11].

Агоністи S1R, а саме (+)-пентазоцин, DTG та SR-31742A, індукують двофазну модуляторну дію на NMDAR, де низька доза є активуючою, а висока – інгібіторною. Це призводить до двонаправленої модуляції на викликане передавання збудження [1-7,9,11].

Дослідження, проведені на культивованих пірамідальних нейронах із ділянки CA1 гіпокампу, показали, що ендogenous нейростероїд – прегненолонсульфат (PREGS), збільшує частоту збудливого постсинаптичного потенціалу. Такий ефект також ініціюється агоністами S1R – (+)-пентазоцин та DHEAS, і блокується антагоністами – галоперидол і BD-1063. Механізм такої ролі сіigma-1 рецепторів залишається досі нез'ясованим. На сьогоднішній день, є припущення щодо залучення процесу фосфорилування NMDAR. Крім того, S1R може регулювати рівень синтезу мРНК AMPAR і NMDAR та рівень синтезу відповідних білків [1-7,9,11].

Щодо зв'язку між S1R і рецепторами γ -аміномасляної кислоти (GABA_AR) відомо доволі мало. Кілька досліджень, опублікованих на цю тему, показали зменшення потенціалів, опосередкованих GABA_AR, за рахунок S1R-залежного пресинаптичного механізму [1].

Отже, вплив сіigma-1 рецепторів на AMPAR є менш ефективним порівняно з NMDAR, а зміни передавання збудження, ймовірно, виникають насамперед від модуляції NMDAR-опосередкованих струмів. Щодо ролі сіigma-1 рецепторів у модуляції активності GABA_AR залишається багато питань [1-7,9,11].

1.1.4. Роль сіigma-рецепторів у процесах нейропротекції. На основі експериментальних даних підтверджено сприятливий вплив антагоністів сіigma-1 рецепторів на активацію нейропротекторних механізмів. Однак чіткі механізми цього ефекту є нез'ясованими. До прикладу, такий антагоніст сіigma-1 рецепторів, як галоперидол, зменшує обсяг інфарктів у моделі ішемічного інсульту щурів (MCAO). При *in vitro* порівнянні восьми інших бутирофенонових сполук за умов окислювального стресу, викликаного глутаматом, виявлено значну позитивну кореляцію між протекційними

властивостями галоперидолу, а саме наномолярною та мікромоллярною концентрацією, необхідною для підвищення виживання клітин, та спорідненістю до сігма-1 рецепторів. Однак галоперидол також має подібну наномолярну спорідненість до інших мішеней, зокрема дофамінових, серотонінових (5-HT) та альфа-адренергічних рецепторів. Більш селективні антагоністи зменшують нейротоксичність, спричинену метамфетаміном (МЕТН), та полегшують нейропатичний біль [23,24,47,49,50].

Хоча нейродегенеративні захворювання є неоднорідною групою захворювань з чіткими клінічними проявами та різноманітною етіологією, нові дані свідчать про те, що вони обумовлені такими патогенними механізмами, як ексайтотоксичність, порушення кальцієвого сигналювання, порушення функціонування мітохондрій та ендоплазматичного ретикулума, запалення, а в деяких випадках і астрогліоз [25,26,28,47,49,50].

1.1.4.1. Ексайтотоксичність глутамату. Ексайтотоксичність виникає за умов стійкої активації рецепторів N-метил-D-аспартату (NMDA) високим вмістом глутамату. Це, у свою чергу, збільшує надходження Ca^{2+} до цитоплазми, який запускає механізм запрограмованої загибелі клітин шляхом активацію кальпаїнів, протеаз, протеїнкіназ та синтаз оксиду азоту (NOS). Ексайтотоксичність спостерігається при нейродегенеративних захворюваннях [27, 29,47,49,50].

Сігма-ліганди впливають на процес вивільнення глутамату та модулюють активність відповідних рецепторів, виконуючи нейропротекторну роль в гангліозних клітинах сітківки (RGC), первинних культурах нейронів та моделях ішемічного інсульту. Механізми, за допомогою яких вони регулюють вивільнення ексайтотоксичного глутамату, є недостатньо вивченими. Однак на сьогодні увага зосереджена на декількох [30,31,47,49,50].

В умовах хронічного стресу моделі депресії активація сігма-1 рецепторів збільшує вивільнення глутамату за рахунок пресинаптичного підвищення потоку Ca^{2+} у цитоплазму з ендоплазматичного ретикулума. Агоністи сігма-1

рецепторів інгібують вивільнення глутамату шляхом блокування K^+ -каналів в кортикальних нервових терміналях. Крім того, вони зумовлюють зменшення надходження Ca^{2+} через пресинаптичні потенціал-залежні Ca^{2+} -канали і інгібування сигнального каскаду за участі протеїнкінази C (PKC) [32,47,49,50].

Активність S1R рецепторів пов'язана зі стимуляцією рецепторів NMDA, як безпосередньо, шляхом взаємодії з конкретними субодиницями цього рецептора, так і опосередковано, через модуляцію інших іонних каналів. Вони зв'язуються з цитозольною C-термінальною ділянкою субодиниці NR1 рецептора NMDA. За іншими даними активація сігма-1 рецепторів викликає фосфорилування субодиниць NR1 в спінальних нейронах шляхом модуляції активності альфа- і епсилон ізоформи протеїнкінази C [33,47,49,50].

Активація сігма-1 рецепторів також може впливати на взаємодію інших білків з рецепторами NMDA для забезпечення нейропротекторних механізмів. Наприклад, агоністи посилюють взаємодію нуклеотид-зв'язуючого білка гістидинової тріади 1 (HINT1) з рецепторами, пов'язаними з G-білками (GPCR), стимулюючи їх взаємодію з рецепторами NMDA. Також вони виконують нейропротекторну роль шляхом підвищення рівня нейротрофічного фактора мозку (BDNF) у моделі судинної деменції ішемії/реперфузії. Це підвищення опосередковане шляхом комплексу NR2A-SAMKIV (субодиниця рецептору глутамату епсилон 1-кальцій/кальмодулін-залежна протеїнкіназа типу IV)-TORC1 [34,47,49,50].

На додаток до рецепторів NMDA, S1R регулюють (прямо чи опосередковано) інші глутаматергічні мішені, зокрема каїнатні та альфа-аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонові (AMPA) рецептори. Наприклад, агоністи знижують нейротоксичність, спричинену активацією каїнатних рецепторів гіпокампа, шляхом зменшення експресії *c-fos*, *c-jun* та гена активаторного білок-1 (AP)-1. Також вони зменшують експресію гена рецепторів AMPA в культивованих кортикальних нейронах, ймовірно, за рахунок зниження активності MAPK/ERK сигнального шляху [47,49,50].

1.1.4.2. Порушення кальцієвого сигналювання. Високе та стійке вивільнення Ca^{2+} може призводити до розвитку нейротоксичності та загибелі клітин. Окрім надходження Ca^{2+} через рецептори NMDA, є кілька додаткових шляхів, за участі яких рівень іонів може бути підвищений до токсичного для нейронів: вивільнення із ендоплазматичного ретикулума та мітохондрій за участі потенціал-залежних Ca^{2+} -каналів, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -помпи та кислото-чутливих іонних каналів (ASIC) [29,47,49,50].

Агоністи сігма-1 рецепторів регулюють внутрішньоклітинний рівень Ca^{2+} та запобігають підвищенню експресії проапоптотичних генів. Такі молекулярні ефекти відповідають поліпшенням пам'яті у тваринних моделях. У мітохондріальній мембрані сігма-1 рецептори відіграють важливу роль у регуляції рівнів Ca^{2+} за участі інозитолтрифосфатних рецепторів та підтриманні внутрішньоклітинного Ca^{2+} гомеостазу. Окрім того, сігма-1 рецептори змінюють стан іонних каналів плазматичної мембрани, впливаючи тим самим на поглинання зовнішньоклітинного Ca^{2+} . Їх агоністи опосередковано збільшують рівень внутрішньоклітинного Ca^{2+} за рахунок активації ASIC-1а під час індукованої інсультом ішемії [35,36,47,49,50].

1.1.4.3. Порушення функціонування ендоплазматичного ретикулума. Одним із результатів порушення функціонування ендоплазматичного ретикулума (ЕР) є накопичення білків з неправильним згортанням. Це активує відповідь на незгорнуті білки (UPR), яка відбувається за участі трьох основних сигнальних шляхів: протеїнкінази PERK, інозитол-залежного ферменту 1 альфа – $\text{IRE1}\alpha$, і активуючого фактору транскрипції 6 – ATF6 (рис. 1.6) [47,49,50].

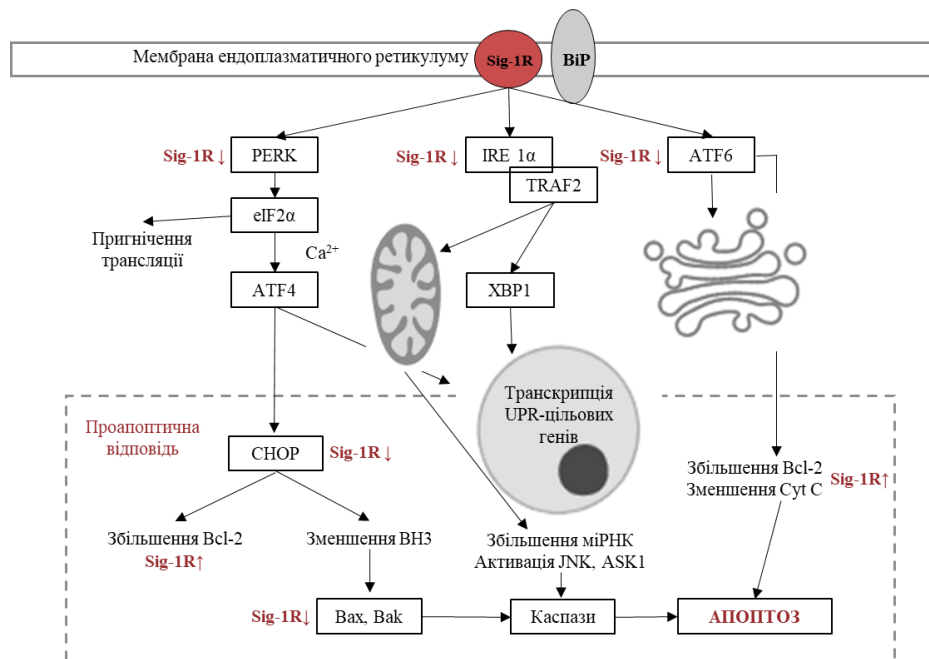


Рис. 1.6. Роль сігма-1 рецептора у відповіді на нерозгорнуті білки (UPR): eIF2 α – еукаріотичний фактор ініціації трансляції 2 α ; XBP1 – X-box-зв'язуючий білок 1; TRAF2 – TNF-асоційований фактор 2; ATF4 – активуючий фактор транскрипції 4; CHOP – c/EBF гомологічний білок; Bcl-2 – В-клітинна лімфома 2; Вах – Bcl-2-подібний білок 2; Бах – Bcl-2-подібний антагоніст/кіллер; JNK – С-кінцева кінцева амінокіназа; ASK1 – кіназа, що регулює апоптичний сигнал. Адаптовано з [50].

Сігма-1 рецептори беруть участь у деградації таких білків. При наявності тапсигаргіну (інгібітор Ca^{2+} -каналів), або тунікаміцину (інгібітор GPT (UDPN-ацетилглюкозамін-доліхофосфат-N-ацетилглюкозамін-1-фосфат-трансферази)), які часто використовуються для моделювання стресу ендоплазматичного ретикулума та індукції UPR в моделях клітинної культури, експресія гена сігма-1 рецепторів регулюється у відповідь на активацію шляху PERK, а конкретніше, ATF4. Така регуляція експресії виявлена в клітинній лінії людської ембріональної нирки (HEK293) та мишачої нейробластоми (Neuro2a), де відбувається пригнічення проапоптичних сигналів. Відповідно до цього, надмірна експресія гена сігма-1 рецепторів знижує активацію PERK та ATF6, збільшуючи виживаність клітин яєчників китайського хом'яка (CHO), тоді як їх відсутність

дестабілізує конформацію IRE1, знижуючи виживання клітин після введення тапсигаргіну [35,37,47,49,50].

1.1.4.4. Нейрозапалення. У процес нейрозапалення залучена мікроглія, яку складають макрофаги центральної нервової системи. Останні класифікуються на M1 та M2 подібно до периферичних макрофагів. M1 тип мікроглії є прозапальним і, як правило, асоціюється з ураженням ЦНС, тоді як M2 – протизапальним і пов'язаним з відновленням та ростом нейронів [28,47,49,50].

Сігма-1 рецептори, знайдені також в клітинах мікроглії, регулюють їх активацію, зумовлюючи зниження нейрозапалення. Нейротоксична доза METHN активує M1 тип мікроглії в стріатумі миші, що супроводжується збільшенням маркерів відповідних макрофагів – CD68 та алотрансплантанта запального фактора 1 (IBA-1) без збільшення маркерів M2 типу макрофагів маркера – CD163 [38,47,49,50].

Сігма-ліганд SN79 інгібує збільшення CD68 та IBA-1. Це вказує на запобігання активації METHN-індукованої M1-мікрогліальної реакції. З цим також пов'язано зменшення IL-6 та онкостатину M, що зумовлено захистом від нейрозапалення. Такий агоніст сігма-рецепторів, як SKF83959, перешкоджає активації M1-мікроглії та зменшенню прозапальних цитокінів, а саме фактору некрозу пухлини альфа, IL-1 бета та індукованої NOS. Агоністи DTG та афобазол призводять до пригнічення активації і міграції мікрогліальних клітин та вивільнення запальних цитокінів у відповідь на ліпополісахарид, АТФ, уридинтрифосфат та моноцитарний хемоаттрактантний білок-1. У *in vivo* моделі травматичного ураження мозку ще один агоніст PRE084 призводив до зниження експресії гена, продуктом якого є IBA-1. Сігма-ліганди також покращують виживання мікрогліальних клітин протягом і, щонайменше, 24 години після ішемії. Ці дані говорять про те, що S1R здатні модифікувати активність мікроглії для посилення нейропротекторних процесів, послаблюючи при цьому запальну реакцію [38,47,49,50].

1.1.4.5. Астрогліоз. Астрогліоз характеризується активацією астроцитів у межах центральної нервової системи. Це, у свою чергу, призводить до міграції астроцитів до ділянок ураження та, у деяких випадках, до утворення гліальних рубців. Вони є необхідними для захисту навколишніх тканин від пошкодження. Однак гліальні рубці перешкоджають відновленню і, тим самим, гальмують здатність нейронних шляхів до регенерації [40,47,49,50].

S1R містяться в астроцитах, а їх активність сприяє відновленню після пошкодження ЦНС. Наприклад, після експериментального інсульту в астроцитах було виявлено збільшення експресії гена сігма-1 рецепторів на 30%, а лікування агоністом сприяло відновленню сенсомоторної функції без зменшення розміру змертвілої ділянки. Однак за іншими літературними даними сігма-ліганди здатні і знижувати активність астроцитів. Агоніст DTG знижує активацію астроцитів через 24 години після інсульту, а PRE084 зменшує астрогліоз та стрес ендоплазматичного ретикулума у доклінічних моделях ALS та PD [39,47,49,50].

1.1.5. Роль сігма-рецепторів у процесах нейровідновлення. Агоністи сігма-1 рецепторів стимулюють нейровідновлювальні процеси після пошкодження ЦНС. Це досягається шляхом покращення структурної та функціональної цілісності клітин або стимулювання надходження нових клітин до пошкодженої ділянки. Наприклад, у моделі PD лікування агоністом сігма-1 рецептора PRE084 протягом п'яти тижнів запобігає розвитку як гістологічного, так і функціонального розладів [39,47,49,50].

1.1.5.1 Підвищення експресії або активності фактору росту. Нейротрофіни та фактори росту відіграють невід'ємну роль у розвитку, підтримці та пластичності нервової системи. Їх аберантні рівні пов'язані з розладами ЦНС, у тому числі нейродегенеративними захворюваннями [41,47,49,50].

Нейротрофічний фактор гліальних клітин (GDNF), як відомо, залучений до відновлення нейронів після ураження ЦНС. При цьому активація сігма-1 рецепторів стимулює ці механізми. У моделі розриву спинномозкових

нервових корінців щоденне введення PRE084 збільшує виживання моторних нейронів на 21 день. Таке відновлення супроводжується раннім збільшенням експресії гена, продуктом якого є GDNF, в астроцитах. Це дозволяє припустити, що активація S1R у гліальних клітинах призводить до вивільнення трофічних факторів, що сприяють виживанню клітин. Оскільки за цих умов збільшується кількість фосфорильованої ERK1/2 та протеїнкінази B, ймовірно, вони залучені до процесів такого відновлення [39,42,47,49,50].

1.1.5.2. Зміни морфології нейронів. При багатьох нейродегенеративних захворюваннях спостерігається аберантна морфологія нейронів, а саме дендритів та аксонів. Це значно погіршує цілісність нейронної мережі. Враховуючи, що сігма-1 рецептори знайдені у конусі росту нейронів, його агоністи сприяють росту клітин нервової системи за участі нейротрофічних факторів. Встановлено, що зниження експресії гена S1R негативно впливає на формування дендритами синапсів та подовження аксонів *in vitro* [44,47,49,50].

У нейронах гіпокампа за відсутності сігма-1 рецепторів спостерігається зменшення формування дендритних шипиків та маркерів функціональних синапсів. Разом з цим зменшується кількість активних форм GTP-зв'язуючого Ras1 та інтактного TIAM1. Це, скоріше за все, вказує на залучення відповідного сигнального шляху у зменшення кількості дендритних синапсів [45,47,49,50].

Також відсутність S1R впливає на морфологію аксонів. При цьому спостерігається повільна швидкість деградації p35. Останній є основним активатором циклін-залежної кінази 5 (cdk5), яка відіграє важливу роль у динаміці цитоскелетних мікротрубочок та нейрофіламентів. Вплив сігма-1 рецепторів на p35 є опосередкованим. Зокрема, показано, що мірістат зв'язується з S1R, в результаті чого збільшується фосфорилування актину та мірістоїлювання p35. Ця модифікація p35 збільшує його сприйнятливості до деградації, що, у кінцевому рахунку зумовлює подовження аксонів [46,50].

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкт дослідження

Об'єктом дослідження були нервові терміналі, або синаптосоми, кори головного мозку білих щурів-самців лінії Wistar. Лабораторних тварин утримували на стандартному раціоні віварію.

Відділення нервових терміналей від пресинаптичної мембрани разом з постсинаптичним потовщенням призводять до пошкодження мембрани. Усі наявні докази вказують на те, що пошкоджена мембрана швидко відновлюється, внаслідок чого утворюється суцільна замкнута структура – синаптосома (рис. 2.1) [13,14].

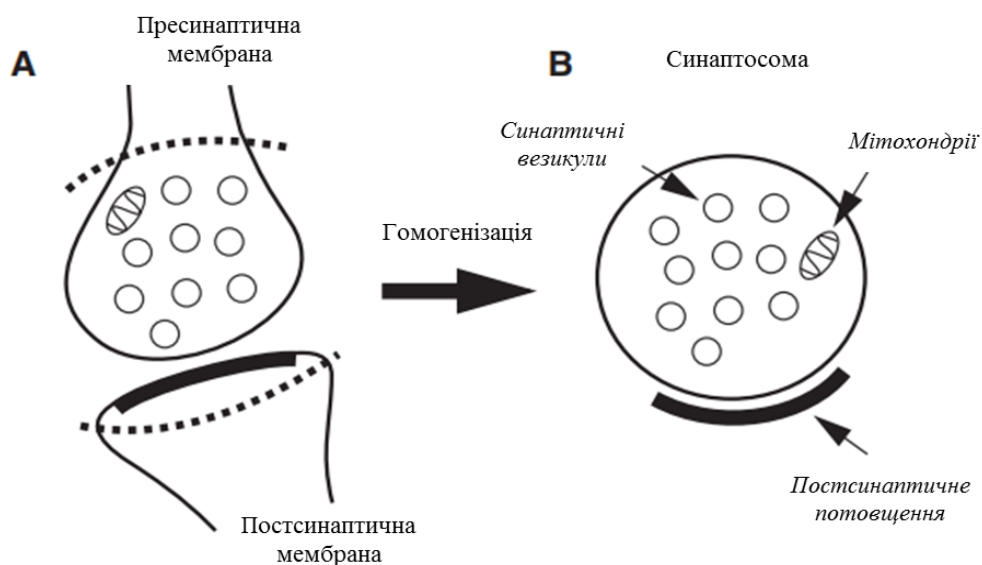


Рис. 2.1. Формування синаптосом. Адаптовано з [14].

Ця ізольована структура містить такі цитоплазматичні компоненти, як лактатдегідрогеназа, нуклеотиди, неорганічні іони, ацетилхолін і амінокислоти, відповідно до інтактних синапсів. Більш того, синаптосоми здатні до інтенсивного процесу дихання та широкого спектру біосинтетичних реакцій за умов перебування у відповідному середовищі, що зумовлює

підтримання життєздатності синапсом – буферному розчині Кребс-Рінгера. Вони здатні продукувати лактат і амінокислоти, генерувати АТФ та фосфокреатин, накопичувати K^+ та вивільняти Na^+ проти градієнта концентрації. Таким чином, є абсолютно виправданою думка, що синапсоми – автономна модель синапсів [13,14].

Дослідження ультраструктури синапсом, діаметр яких становить приблизно мікромметр, показує, що вони містять велику кількість малих або одну велику синаптичну везикулу і, зазвичай, одну або кілька мітохондрій, які відіграють значну роль у метаболізмі синапсом та займають більшу її частину. Постсинаптичне потовщення, 50-60 нм, може бути наявне не у всіх синапсом, що значно впливає на різноманітність розмірів синапсом. Нещодавно завдяки морфологічному порівнянню синапсом і нервових закінчень *in situ* було виявлено, що відмінності між ними є мінімальними (рис. 2.2) [13,14].

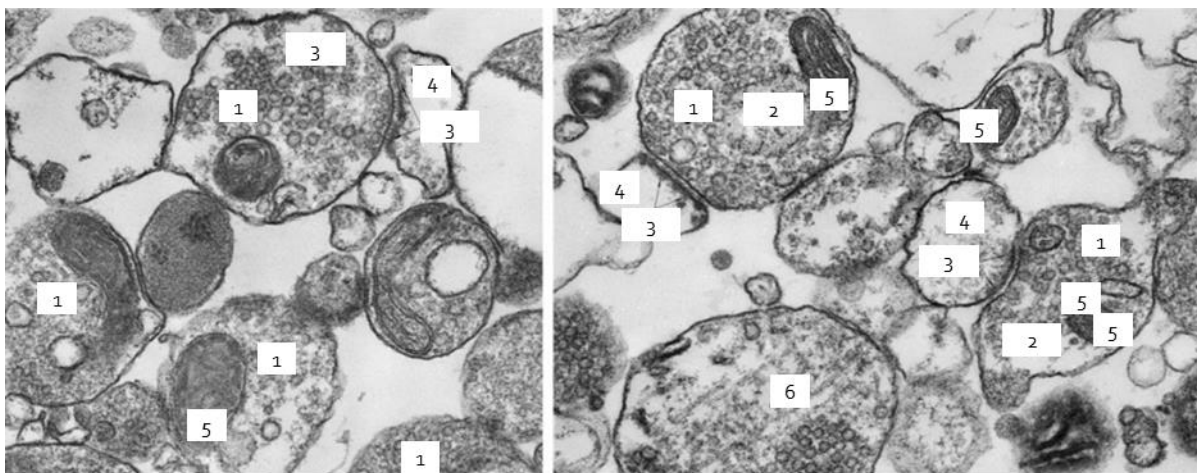


Рисунок 2.2. Електронна мікрофотографія ультраструктури синапсом:
1 – синаптичні везикули; 2 – пресинаптична мембрана; 3 – постсинаптичне потовщення; 4 – дендритні шипики; 5 – мітохондрія; 6 – мікротрубочки.
Адаптовано з [53].

Усі експерименти виконано відповідно до «Правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин», затверджених Комісією з догляду, утримання й використання експериментальних тварин Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (Протокол №1 від 02/09-2019).

2.2. Матеріали, реактиви та обладнання

У роботі було використано наступні матеріали, реактиви та обладнання:

1. Реактиви: HEPES-NaOH (4-(2-гідроксиетил)-1-піперазинетансульфонові кислота-NaOH), «Fluka» (х. ч., Швейцарія); EDTA (етилендіамінтетраоцтова кислота), «Calbiochem» (х. ч., США); сахароза, NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, NaH₂PO₄·2H₂O, D-глюкоза, ДТТ (дитіотрейтол), Na₂CO₃, NaOH, CuSO₄, бичачий сироватковий альбумін, «SIGMA» (х. ч., США); родамін 6G та акридиновий оранжевий, «MolecularProbes» (х. ч., США), реактив Фоліна-Чокальтеу, ТзОВ «Сфера сім» (ч. д. а., Україна).

2. Розчини: середовище для виділення (0,32 М сахарози, 0,2 мМ EDTA та 5 мМ HEPES-NaOH, pH 7,4); буферний розчин Кребс-Рінгера (126 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ CaCl₂, 1,4 мМ MgCl₂, 1 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ D-глюкоза та 20 мМ HEPES, pH 7,4); реактив А (2% розчин карбонату натрію в 0,1 М розчині гідроксиду натрію); реактив В (0,5% розчин сульфату міді в 1% розчині тартрату натрію виннокислому).

3. Обладнання: центрифуга Digicen 20R («Alvarez Redondo, S.A.», Іспанія); центрифуга K-23D («MTW», Німеччина); мішалка вихрового типу – «Vortex» («Deltalab», Іспанія); спектрофотометр СФ-26 (ОАО "ЛОМО", СРСР); спектрофлуориметр MPF-4 («Hitachi», Японія); автоматичні дозатори BIONITProline, об'ємом 1-5 мл і 5-50 мкл («BIONIT», Фінляндія); скляний гомогенізатор Поттера, 30 мл («KARTELL», Італія).

2.3. Методи дослідження

2.3.1. Виділення ізольованих нервових терміналей кори головного мозку щурів. Синаптосоми виділяли за методом Котмана [15] із незначними модифікаціями [16]. Великі півкулі кори головного мозку отримували з

декапітованих тварин шляхом відокремлення стовбурової частини та мозочку.

Згідно з результатами попередніх експериментів, що були проведені на очищених та неочищених фракціях синапсом, у процесах, які спостерігались в обох препаратах, прослідковувались однакові закономірності [16].

Для отримання неочищеної фракції синапсом тканину кори головного мозку повільно гомогенізували з використанням скляного гомогенізатора Поттера (зазор 0,2 мм) у середовищі для виділення.

Далі отриманий гомогенат центрифугували при 2500 g протягом 5 хвилин для відокремлення ядер, кровоносних судин та зруйнованих нервових клітин ($t=0^{\circ}\text{C}$). Надосадову фракцію знову центрифугували при 15000 g протягом 15 хвилин, осаджуючи фракцію неочищених синапсом ($t=0^{\circ}\text{C}$).

Одержаний осад ресуспендували в стандартному буферному розчині Кребс-Рінгера.

Всі вищезазначені етапи проводились на льоду за температури $-0-4^{\circ}\text{C}$.

2.3.2. Визначення концентрації білка у суспензії синапсом.

Визначення концентрації білка у суспензії синапсом проводили за метод Лоурі у модифікації Ларсона [5].

Метод Лоурі поєднує у собі дві реакції – біуретову та реакцію відновлення реактиву Фоліна [54,55].

1) У основі біуретової реакції лежить здатність амінокислот, які містять не менше двох пептидних зв'язків, наприклад аспарагін, утворювати комплекси з атомами міді сульфату міді (II) у лужному середовищі. Внаслідок протікання реакції досліджуваній білковий розчин набуває синьо-фіолетового забарвлення [54,55].

Уперше біуретова реакція була проведена з біуретом, який одержували шляхом нагрівання сечовини до 180°C . При цьому біурет не є амінокислотою, але містить два пептидні зв'язки. До основних етапів біуретової реакції належать (рис. 2.3) [54,55]:

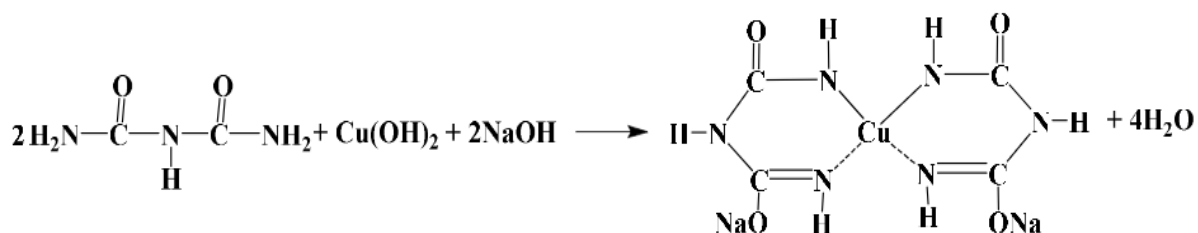


Рисунок 2.3. Реакція утворення комплексу біурету з міддю. Адаптовано з [55].

1. Перехід біурету з кето- до енольної форми у лужному середовищі, внаслідок чого відбувається дисоціація енольних ОН-груп й на атомі оксигену формується негативний заряд.

2. Отримання гідроксиду міді (II) при взаємодії сульфату міді (II) з гідроксидом натрію.

3. Утворення забарвленого комплексу з координаційними зв'язками, сформованими за рахунок електронних пар атомів азоту імінних груп, при взаємодії біурету з гідроксидом міді (II). При цьому Cu^{2+} переходить до Cu^+ у складі комплексу [54,55].

2) Реакція відновлення реактиву Фоліна полягає у відновленні білками, що містять такі амінокислоти як триптофан та тирозин, за рахунок наявності іонів Cu^+ суміші фосфатновольфрамкової та фосфатномolibденової кислот – реактиву Фоліна. Внаслідок цього утворюються оксиди $\text{WO}_2 \cdot n\text{WO}_3$ та/або $\text{MoO}_2 \cdot n\text{MoO}_3$ синього забарвлення [54,55].

До контрольного зразка додавали 10 мкм буферного розчину Кребс-Рінгера, а до досліджуваних – суспензії синапсом. Після чого їх об'єм доводили до 300 мкм NaCl та додавали 3 мл реактиву Лоурі. Реактив Лоурі готували заздалегідь змішуванням реактиву А та реактиву В у співвідношенні 1:20. Далі до контрольного зразка додавали 300 мкм реактиву Фоліна, в кожному наступному – через 15 секунд. Реактив Фоліна заздалегідь розводили бідистильованою водою у співвідношенні 1:0,7. Через 3 хвилини у перший та кожен наступний зразок через 15 секунд вносили 300 мкм ДТТ.

Одержані розчини перемішували за допомогою мішалки вихрового типу «Vortex».

Оптичну густину білових розчинів визначали на спектрофотометрі за довжини хвилі 740 нм. Концентрацію білка у досліджуваних білкових зразках визначали за допомогою попередньо побудованого калібрувального графіку за стандартними розчинами з відомою концентрацією білка: бичачий сироватковий альбумін – 0,7 мг/мл (рис. 2.2).

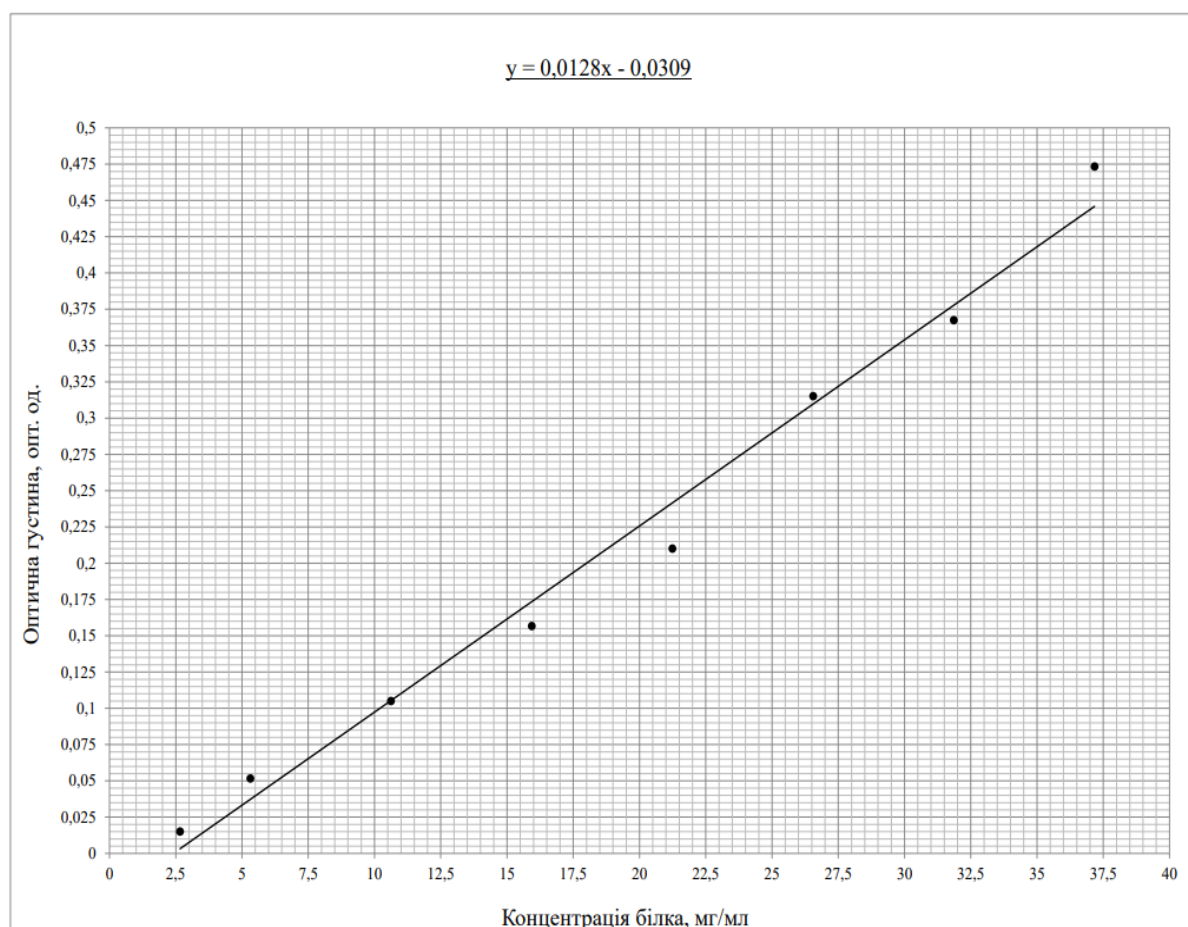


Рис. 2.2. Калібрувальний графік для визначення концентрації білка у досліджуваному розчині за методом Лоурі у модифікації Ларсона.

На осі ординат відкладали значення оптичної густини досліджуваного зразка, за яким, по осі абсцис, знаходили відповідні значення вмісту білка у зразку. Цей етап є необхідним для розведення суспензії синаптосом буферним розчином Кребс-Рінгера до кінцевої концентрації, значення якої залежить від подальших етапів.

2.3.3. Оцінка потенціалу плазматичної мембрани нервових терміналей. Для оцінки потенціалу плазматичної мембрани ізольованих нервових терміналей кори головного мозку щурів використовували флуоресцентний потенціал-чутливий зонд – родамін 6G. Цей зонд є ліпофільним та катіонним, через що він легко проходить крізь цитоплазматичний бар'єр і зосереджується в примембранному просторі синапсом, згідно величини її мембранного потенціалу. За цих умов спостерігається гасіння флуоресценції зонду за рахунок часткового зв'язування з від'ємно зарядженим матриксом синапсом [20].

Флуоресцентні виміри проводили на спектрофлуориметрі за довжини хвилі збудження – 528 нм, та емісії – 551 нм (спектральна ширина щілин – 5 нм). Перед додаванням флуоресцентного зонду синапсами преінкубували при 37 °C протягом 5 хвилин.

У кювету з магнітною мішалкою вносили буферний розчин Кребс-Рінгера та родамін 6G (кінцева концентрація 0,5 мкМ). Далі додавали суспензію синапсом (кінцева концентрація білка – 0,5 мг/мл) та реєстрували зміну інтенсивності флуоресценції зонду до досягнення стаціонарного значення (F_0).

Потім у кювету додавали досліджувані сполуки – NE-100 та BD-1047 (кінцева концентрація – 10 мкМ, 50 мкМ та 100 мкМ) та реєстрували кінетику вивільнення зонду і новий стаціонарний рівень його флуоресценції (F_t). Останній крок – внесення KCl (кінцева концентрація – 35 мМ).

Кількісну оцінку мембранного потенціалу отримали з обчислення так званого індексу мембранного потенціалу згідно формули (2.1):

$$Fp = \frac{F_t}{F_0}, \quad (2.1)$$

де F_t та F_0 – інтенсивності флуоресценції зонду за наявності та за відсутності досліджуваних сполук [19].

2.3.4. Оцінка рівня ацидифікації синаптичних везикул нервових терміналей. Для оцінки ацидифікації синаптичних везикул використали рН-

чутливий флуоресцентний зонд акридиновий оранжевий (АО). Акридиновий оранжевий – це ліпофільний амін, непротонована форма якого здатна вільно проникати крізь плазматичну мембрану синаптосом та мембрану синаптичних везикул. Після протонування в кислому середовищі органел, що мають всередині позитивний мембранний потенціал, барвник втрачає здатність до проникнення через мембрану. У нервових терміналях до таких структур відносяться синаптичні везикули, значення рН в яких дорівнює 5, що значно нижче за рН цитоплазми. Інтенсивність флуоресценції акридинового оранжевого, акумульованого у синаптичних везикулах, відображає рівень їх закислення, і таким чином здатність до накопичення нейромедіатора [18].

Зміни інтенсивності флуоресценції реєстрували на спектрофлуориметрі за довжини хвилі збудження – 490 нм, та емісії – 530 нм (ширина щілин по 5 нм). Перед додаванням флуоресцентного зонду синаптосоми преінкубували при 37°C протягом 5 хвилин.

У кювету з магнітною мішалкою вносили буферний розчин Кребс-Рінгера та акридиновий оранжевий (кінцева концентрація 5 мкМ). Далі додавали суспензію синаптосом (кінцева концентрація білка – 0,2 мг/мл) та реєстрували зміну інтенсивності флуоресценції зонду до досягнення стаціонарного значення (F_0).

Потім у кювету додавали досліджувані сполуки – NE-100 та BD-1047 (кінцева концентрація – 10 мкМ, 50 мкМ та 100 мкМ) та реєстрували кінетику вивільнення зонду та новий стаціонарний рівень його флуоресценції (F_t). Останній крок – внесення KCl (кінцева концентрація – 35 мМ).

Оцінку ацидифікації синаптичних везикул в синаптосомах визначали за інтенсивністю флуоресценції акридинового оранжевого згідно формули (2.2):

$$Fa = \frac{F_t}{F_0}, \quad (2.2)$$

де F_t та F_0 – інтенсивності флуоресценції зонду за наявності та за відсутності досліджуваних сполук [19].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Оцінка впливу антагоністів сіigma-1 рецепторів – NE-100 та BD-1047, на потенціал плазматичної мембрани нервових терміналей

Мембранний потенціал плазматичної мембрани нервових терміналей є одним з ключових параметрів забезпечення синаптичної передачі: короточасні зміни мембранного потенціалу зумовлюють генерацію нервового імпульсу. При деполяризації відбувається активація Na^+ , K^+ та Ca^{2+} -потенціал-залежних іонних каналів і, як наслідок, вивільнення пулу нейромедіатора шляхом Ca^{2+} -залежного екзоцитозу. До того ж зміни мембранного потенціалу забезпечують транспортер-опосередковане поглинання нейромедіаторів, та їх позаклітинний рівень. Так як сіigma-1 рецептори здатні регулювати активність вищезазначених іонних каналів, та відповідно, модулювати процес вивільнення нейромедіаторів, одним із етапів дослідження стало вивчення впливу таких антагоністів сіigma-1 рецепторів, як NE-100 та BD-1047, на мембранний потенціал нервових терміналей кори головного мозку щурів.

3.1.1. Результати оцінки впливу BD-1047 на потенціал плазматичної мембрани. Найперше для оцінки впливу антагоніста сіigma-1 рецепторів – BD-1047, на потенціал плазматичної мембрани синапсом було перевірено його здатність впливати на спектр емісії родамін у 6G за максимальної кінцевої концентрації 200 мкМ. У результаті проведених досліджень жодних змін в спектрі емісії родамін у 6G у відповідь на додавання BD-1047 не було виявлено. Спектр емісії залишився незмінним: довжина хвилі емісії дорівнювала 551 нм за максимальної інтенсивності сигналу (рис. 3.1).

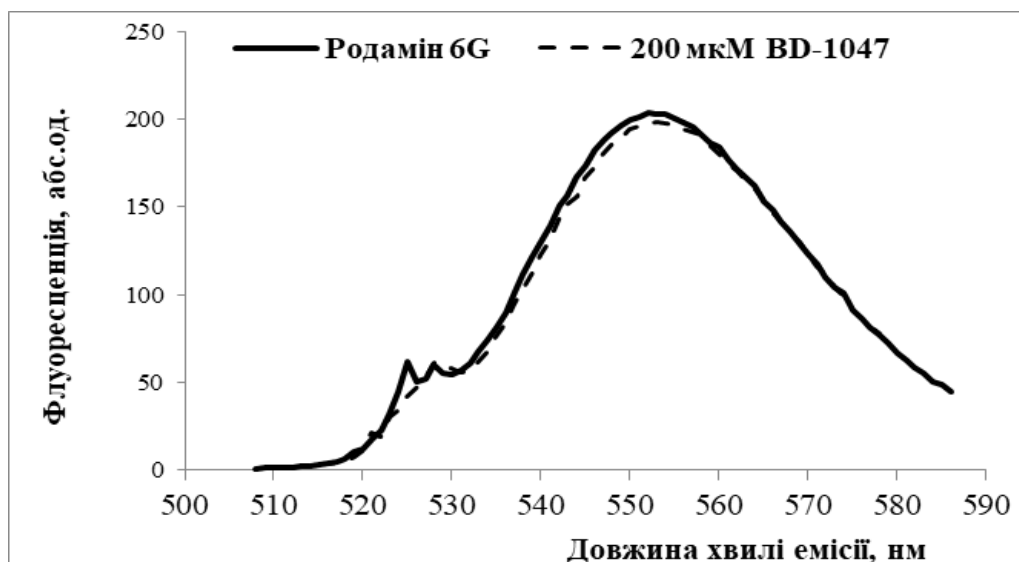


Рис. 3.1. Спектр емісії родаміну 6G за умов додавання 200 мкМ антагоніста сігма-1 рецепторів – BD-1047.

При додаванні BD-1047 до суспензії синаптосом у кінцевій концентрації 10 мкМ суттєвих змін інтенсивності флуоресцентного сигналу не було зареєстровано. Однак підвищення його концентрації до 50 та 100 мкМ призводило до незначного зростання флуоресцентного сигналу. Це свідчить про слабку деполяризацію плазматичної мембрани синаптосом. При цьому вони не втрачали здатності до відповіді на калієву деполяризацію (рис. 3.2).

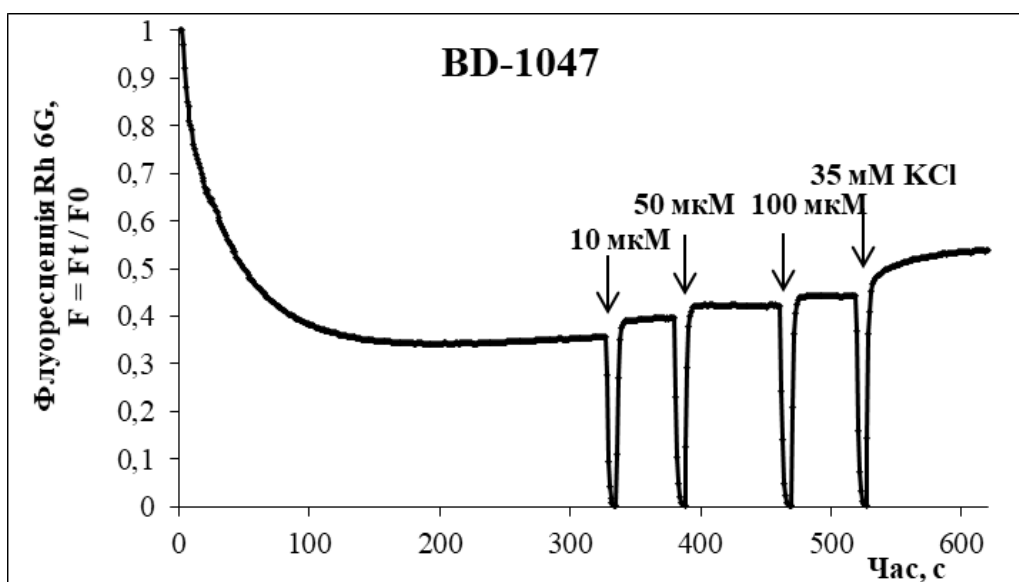


Рис. 3.2. Вплив антагоніста сігма-1 рецепторів – BD-1047, на потенціал плазматичної мембрани синаптосом.

3.1.2. Результати оцінки впливу NE-100 на потенціал плазматичної мембрани. Наступна серія досліджень була проведена з іншим антагоністом сігма-1 рецепторів – NE-100. У ході перевірки його здатності впливати на спектр емісії родаміну 6G за максимальної кінцевої концентрації 200 мкМ не було виявлено жодних змін (рис. 3.3).

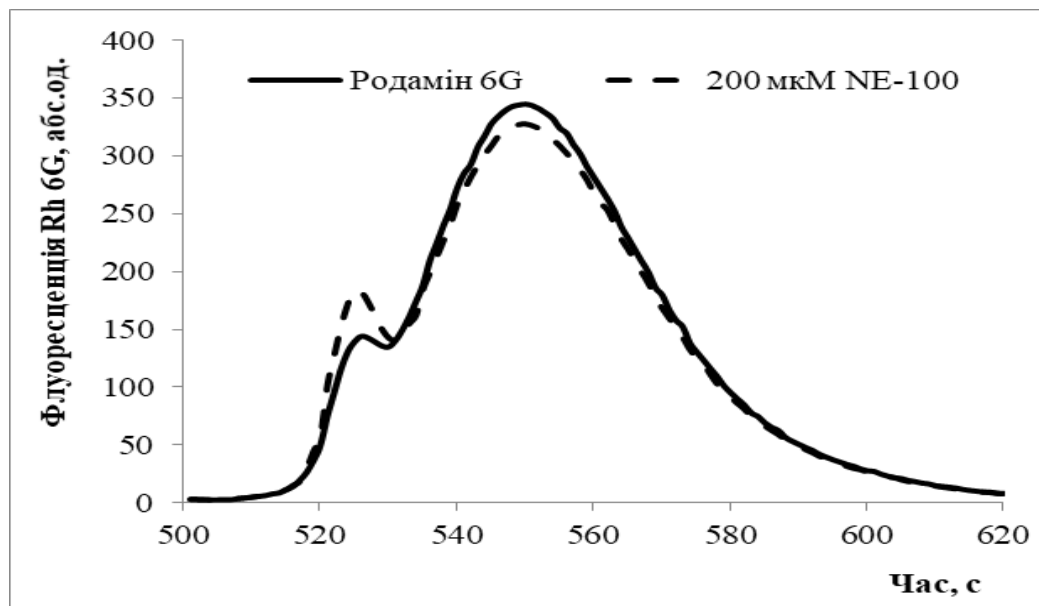


Рис. 3.3. Спектр емісії родаміну 6G за умов додавання 200 мкМ антагоніста сігма-1 рецепторів – NE-100.

При додаванні NE-100 до суспензії синапсом у кінцевій концентрації 10 мкМ суттєвого впливу на інтенсивність флуоресцентного сигналу не виявлено. Однак з підвищенням концентрації до 50 та 100 мкМ відбувалось незначне зростання сигналу, що свідчило про слабку деполяризацію плазматичної мембрани нервових терміналей. Синаптосоми не втрачали здатності до відповіді на калієву деполяризацію (рис. 3.4).

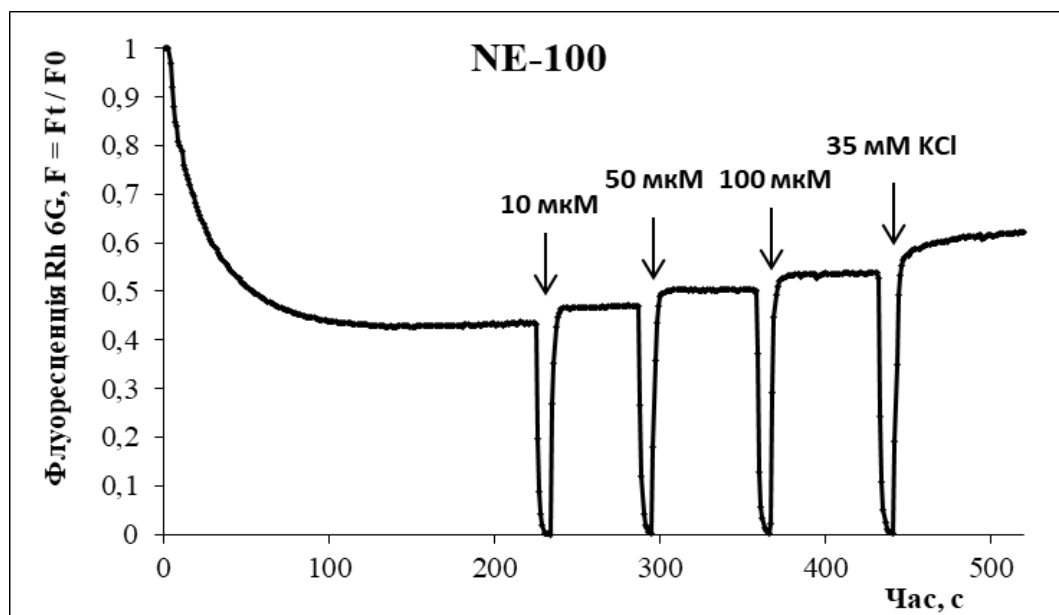


Рис. 3.4. Вплив антагоніста сігма-1 рецепторів – NE-100 на потенціал плазматичної мембрани синаптосом.

За результатами досліджень можна стверджувати, що антагоністи сігма-1 рецепторів – BD-1047 та NE-100, дозо-залежно, за кінцевих концентрацій від 50,0 мкМ, деполяризують плазматичну мембрану нервових терміналей кори головного мозку щурів.

3.2. Оцінка впливу антагоністів сігма-1 рецепторів – NE-100 та BD-1047 на ацидифікацію синаптичних везикул. У синаптичні везикули нейромедіатори надходять за рахунок активності мембранних транспортерів, що використовують електрохімічний градієнт, створений АТФазою, а саме H^+ -АТФ-азою. Вона забезпечує транспортування протонів у порожнину синаптичних везикул, формуючи таким чином градієнт рН. Цей протонний градієнт забезпечує надходження до синаптичних везикул нейромедіатора. Враховуючи, здатність сігма-1 рецепторів регулювати низку нейромедіаторних систем, другим етапом досліджень стало вивчення впливів таких антагоністів сігма-1 рецепторів, як NE-100 та BD-1047, на ацидифікацію синаптичних везикул нервових терміналей кори головного мозку щурів.

3.1.2. Результати оцінки впливу BD-1047 на ацидифікацію синаптичних везикул. При внесенні BD-1047 у суспензію синаптосом за

кінцевої концентрації 200 мкМ змін спектру емісії акридинового оранжевого не виявлено. Довжина хвилі емісії дорівнювала 530 нм за максимальної інтенсивності флуоресцентного сигналу (рис. 3.5).

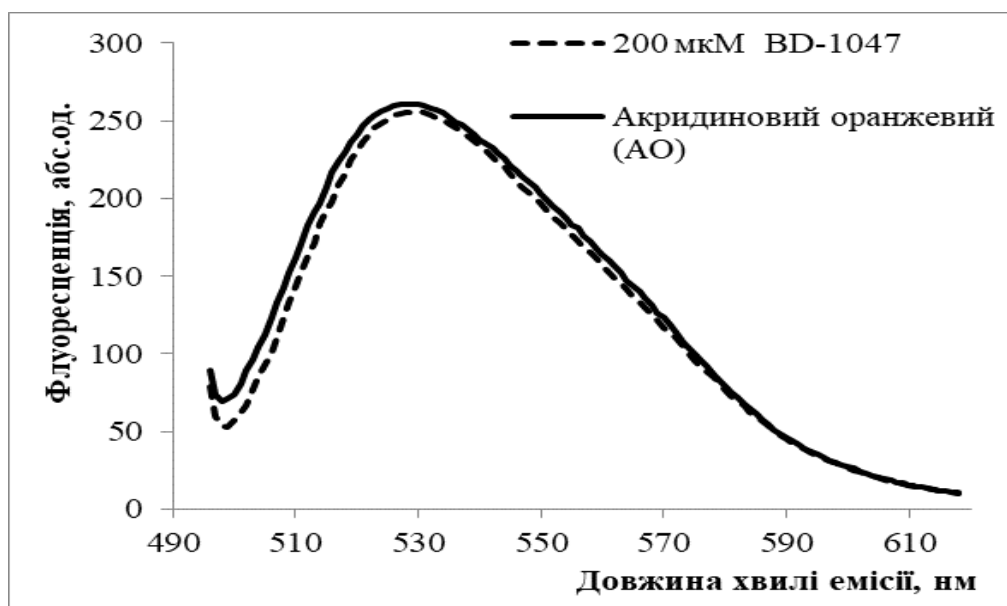


Рис. 3.5. Спектр емісії акридинового оранжевого за умов додавання 200 мкМ антагоніста сігма-1 рецепторів – BD-1047.

Додавання акридинового оранжевого супроводжувалось гасінням флуоресценції зонду, внаслідок його накопичення всередині синаптичних везикул. Стабільний рівень флуоресценції спостерігався за 5 хвилин.

При додаванні BD-1047 до попередньо врівноваженої АО суспензії синапсом за концентрації 10 мкМ суттєвих змін інтенсивності флуоресцентного сигналу не відбувалось. Проте підвищення концентрації антагоніста до 50 та 100 мкМ супроводжувалось зростанням сигналу. Це свідчить про зниження ступеня ацидифікації синаптичних везикул, і, таким чином, зміну протонного градієнту під впливом BD-1047.

Після цього до синаптосомальної суспензії додавали KCl та спостерігали зниження флуоресцентного сигналу. Це свідчило про те, що синаптосоми не реагували на калієву деполяризацію. Таким чином, вивільнення нейромедіатора шляхом екзоцитозу зменшувалось (рис. 3.6).

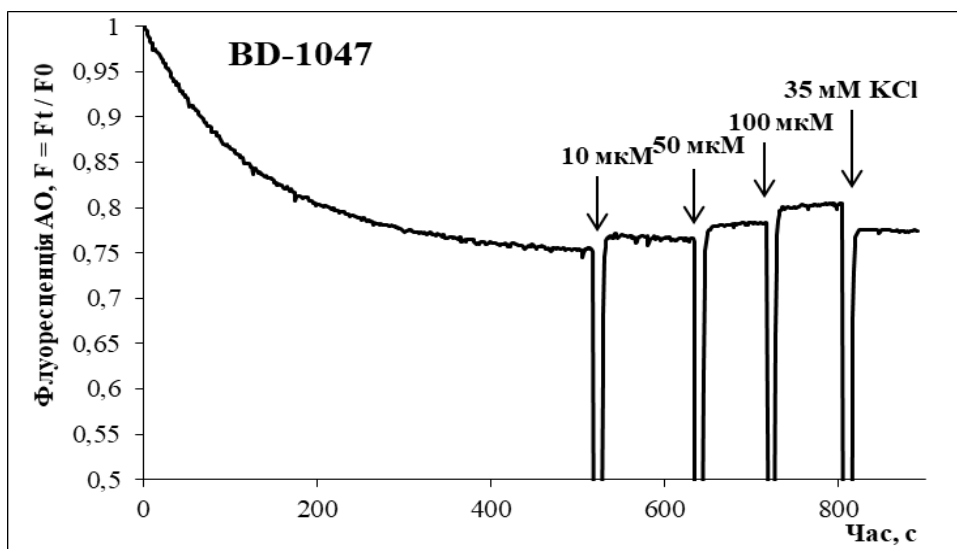


Рис. 3.6. Вплив антагоніста сігма-1 рецепторів – BD-1047 на ацидифікацію синаптичних везикул.

3.1.2. Результати оцінки впливу NE-100 на ацидифікацію синаптичних везикул. Найперше для оцінки впливу антагоніста сігма-1 рецепторів – NE-100, на ацидифікацію синаптичних везикул було перевірено його здатність впливати на спектр емісії акридинового оранжевого за кінцевої концентрації 200 мкМ. У результаті – жодних змін у спектрі емісії акридинового оранжевого не виявлено. Довжина хвилі емісії дорівнювала 530 нм при максимальній інтенсивності сигналу. Інтенсивність флуоресцентного сигналу також не зазнавала змін (рис. 3.7).

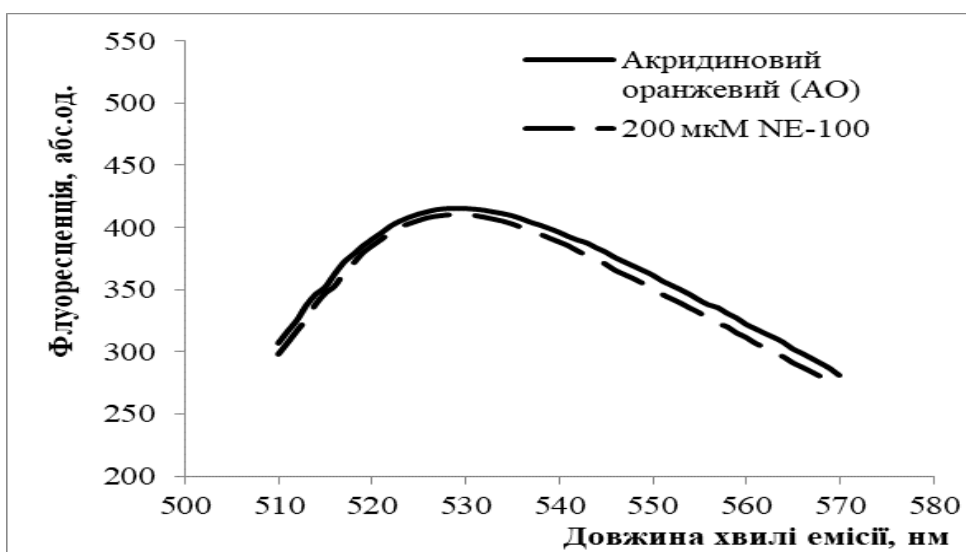


Рис. 3.7. Спектр емісії акридинового оранжевого за умов додавання 200 мкМ антагоніста сігма-1 рецепторів – NE-100.

Внесення NE-100 у концентрації 10 мкМ до суспензії синаптосом, попередньо врівноваженої АО, суттєво не впливало на інтенсивність флуоресцентного сигналу. Однак подальше збільшення концентрації антагоніста до 50 мкМ призводило до незначного зростання сигналу, а до 100 мкМ викликало значне підвищення сигналу. Це свідчить про вивільнення зонду з синаптичних везикул, як наслідок зниження їх ацидифікації. Синаптосоми втрачали здатність до відповіді на калієву деполяризацію, про що свідчило зниження флуоресцентного сигналу АО після додавання KCl до синаптосомальної суспензії (рис. 3.8).

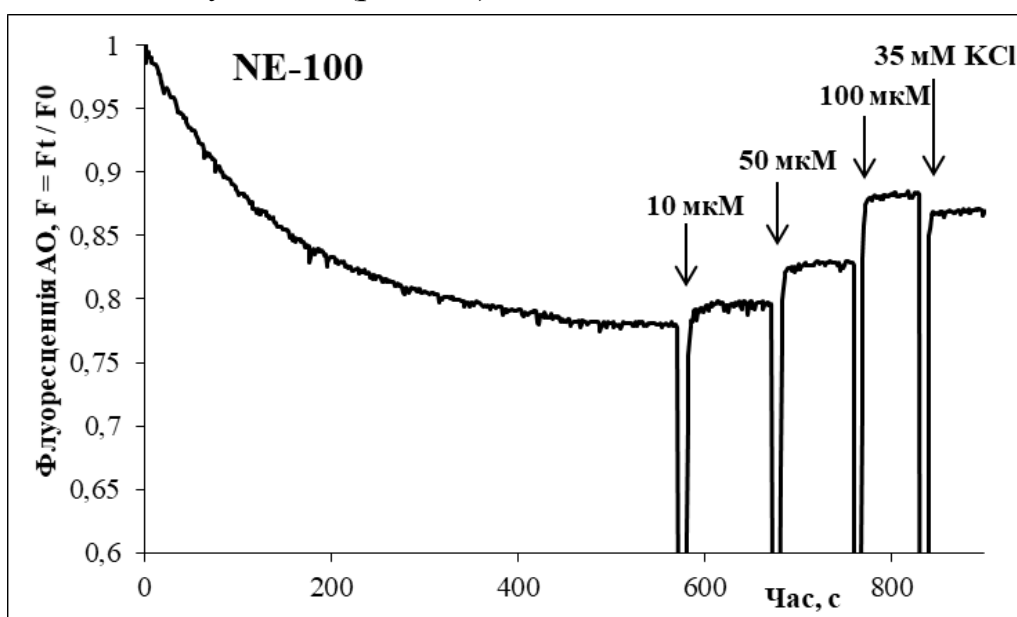


Рис. 3.8. Вплив антагоніста сіigma-1 рецепторів – NE-100 на ацидифікацію синаптичних везикул.

Таким чином, антагоністи сіigma-1 рецепторів – BD-1047 і NE-100, дозозалежно, за кінцевих концентрацій від 50,0 мкМ, знижують ацидифікацію синаптичних везикул у нервових терміналях кори головного мозку щурів.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Сігма-1 рецептори, широко розповсюджені у нервовій системі, беруть участь у процесах збудливості нейронів, навчанні, пам'яті, та нейродегенеративних розладах. Ряд досліджень продемонстрував нейропротекторні та нейровідновлювальні ефекти активації цих рецепторів. Однак механізми, що їх забезпечують, залишаються нез'ясованими.

Для дослідження впливу модуляторів сігма-1 рецепторів на потенціал плазматичної мембрани та ацидифікацію синаптичних везикул було використано ізольовані нервові термінали (синаптосоми) кори головного мозку щурів. Вони являють собою ефективну модельну систему завдяки здатності до зміни потенціалу плазматичної мембрани, накопичення, зберігання та вивільнення нейромедіаторів. До того ж такі препарати позбавлені функціональних елементів гліальних та нервових клітин, які можуть впливати на інтерпретацію результатів.

Серед антагоністів було обрано селективні ліганди BD-1047 та NE-100. BD-1047 – N'-(2-[3,4-дихлорфеніл]етил)-N,N,N'-триметилетан-1,2-діамін, належить до фенілетилендіамінів з модифікованим піролідіновим кільцем. Коефіцієнт його спорідненості до сігма-1 рецепторів складає 0,93 нМ. NE-100 – (N, N-дипропіл-2-[4-метокси-3-(2-феніл)етокси]феніл]-етиламін моногідрохлорид), належить до нових модуляторів сігма-1 рецепторів зі спорідненістю $K_i=1,03$ нМ.

Перша серія досліджень полягала у визначенні впливу цих антагоністів на потенціал плазматичної мембрани нервових терміналей.

За фізіологічного стану спокою плазматична мембрана є електрично поляризованою, і різницю потенціалів між зовнішньою та внутрішньою поверхнями називають мембранним потенціалом спокою. Його існування зумовлене нерівномірною концентрацією іонів K^+ та Na^+ у поза- та внутрішньоклітинному середовищі. До того ж сама по собі мембрана

відрізняється проникністю для цих іонів. У стані фізіологічного спокою потік калію спрямований з клітини. При цьому іон затримується на зовнішній поверхні, формуючи її позитивний заряд. Великі аніони не здатні покидати клітину, і накопичуються біля внутрішньої поверхні цитоплазматичної мембрани. Паралельно з тим до клітини спрямовий натрієвий потік. Так виникає трансмембранна різниця потенціалів, або МПС. Для врівноваження цієї системи необхідною є натрій-калієва помпа, яка, використовуючи енергію АТФ, забезпечує транспортування з клітини трьох іонів Na^+ та – до клітини двох іонів K^+ [51].

Під час збудження нейронів виникає потенціал дії – швидке коливання МПС, який складається з таких етапів:

1. Збільшення провідності мембрани у відповідь на подразнення для Na^+ , який надходить до клітини, викликаючи деполяризацію – зниження внутрішнього негативного заряду;
2. Досягнення критичного рівня деполяризації та лавиноподібний потік Na^+ , який не може перевищити рівноважний потенціал Na^+ ;
3. Повільне зростання калієвої провідності, що зумовлює фазу реполяризації;
4. Зменшення натрієвої провідності (натрієва інактивація) [51].

За результатами першої серії досліджень встановлено, що антагоністи сігма-1 рецепторів дозо-залежно викликають незначну деполяризацію плазматичної мембрани. Деполяризація є одним з аспектів синаптичної передачі, який забезпечує стимульоване вивільнення нейромедіатора з синаптичних везикул шляхом їх злиття з плазматичною мембраною. Такий ефект може бути зумовлений або активацією натрієвих каналів, або інгібуванням калієвих. Враховуючи літературні дані щодо того, що сігма-1 рецептор інактивує натрієві канали, ймовірно, антагоністи сігма-1 рецепторів призводять до інактивації калієвих каналів [52].

Друга серія досліджень полягала у визначенні впливу антагоністів на ацидифікацію синаптичних везикул.

Синаптичні везикули – гетерогенні внутрішньоклітинні структури, які забезпечують накопичення, зберігання та вивільнення нейромедіатора. Синаптичні везикули утворюються у тілі нервової клітини за участі ендоплазматичного ретикулума та цистерн апарату Гольджі, після чого транспортуються до аксону нервової клітини. Накопичення нейромедіаторів у синаптичних везикулах здійснюється за участі везикулярних транспортерів, які використовують протонний градієнт, сформований H^+ -АТФазою.

У ході другої серії досліджень було визначено, що антагоністи сіigma-1 рецепторів дозо-залежно зменшують ацидифікацію синаптичних везикул. Це, у свою чергу, призводить до зниження концентрації нейромедіатора у синаптичних везикулах та, відповідно, зменшення або блокування проведення як збуджувального, так і гальмівного імпульсу в нервових клітинах.

Оскільки активація сіigma-рецепторів має протилежні ефекти на потенціал-залежні іонні канали, необхідними є подальші дослідження щодо впливу його лігандів на функціонування окремих іонних каналів. Крім того, існує ряд додаткових перешкод у визначенні ролі сіigma-рецепторів у процесі збудження нейронів та, загалом, функціонування нервової системи [1]:

1. Іонні канали, що беруть участь у нейрональній збудливості, характеризуються різноманітністю підтипів.
2. Кількість S1R є відмінною у різних відділах нервової системи.
3. Na^+ , Ca^{2+} і K^+ -іонні канали неоднорідно і непропорційно розподілені по всій нервовій системі.
4. Протеїнкінази є ефективними модуляторами потенціал-залежних іонних каналів. Їх кількість і типи, що безпосередньо пов'язано з рівнем нейрональної активності, можуть призвести до диференціальних ефектів активації сіigma-1 рецепторів на збудливість нейронів.
5. Нарешті, чинник, який часто недооцінюють, – вік. Дослідження щодо зміни рівня експресії S1R з віком дають неоднозначні результати [1].

ВИСНОВКИ

1. Антагоністи сігма-1 рецепторів – NE-100 та BD-1047, дозо-залежно, за кінцевих концентрацій від 50,0 мкМ, деполяризують плазматичну мембрану, забезпечуючи стимульоване вивільнення нейромедіатора з синаптичних везикул шляхом їх злиття з плазматичною мембраною – Ca^{2+} -залежний екзоцитоз.

2. Разом з тим антагоністи сігма-1 рецепторів – NE-100 та BD-1047, дозо-залежно, за кінцевих концентрацій від 50,0 мкМ, знижують ступінь ацидифікації синаптичних везикул. Такий ефект призводить до пригнічення транспортер-опосередкованого накопичення нейромедіатору після його вивільнення до синаптичної щілини. Це є однією з причин подальшого зниження вивільнення нейромедіатору шляхом Ca^{2+} -залежного екзоцитозу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Colin G. Rousseaux and Stephanie F. Greene. Sigma receptors [pRs]: biology in normal and diseased states. *J Recept Signal Transduct.* 2016; 36(4): 327–388.
Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4906365/>
2. Cheng-Wei Lu, Tzu-Yu Lin, Chia-Chuan Wang, and Su-Jane Wang. σ -1 Receptor Agonist SKF10047 Inhibits Glutamate Release in Rat Cerebral Cortex Nerve Endings. *JPET.* 2012; 341:532–542.
Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22357973/>
3. Saïd Kourrich¹, Tsung-Ping Su, Michiko Fujimoto, and Antonello Bonci. The sigma-1 receptor: roles in neuronal plasticity and disease. *Trends Neurosci.* 2012 December; 35(12): 762–771.
Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23102998/>
4. Tangui Maurice, Tsung-Ping Su. The pharmacology of sigma-1 receptors. *PharmacolTher.* 2009; 124(2): 195-206.
Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19619582/>
5. Kai Yang, Changcai Wang and Taolei Sun. The Roles of Intracellular Chaperone Proteins, Sigma Receptors, in Parkinson's Disease (PD) and Major Depressive Disorder (MDD). *Front. Pharmacol.* 21 May 2019; 10: 528.
Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6537631/>
6. Hayashi T., T.-P. Su. An update on the development of drugs for neuropsychiatric disorders: focusing on the σ 1 receptor ligand. *Expert Opin. Ther. Targets.* 2008; V. 12. N. 1, P. 45–58.
Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18076369/>
7. Maurice T. Su T.-P. The pharmacology of sigma-1 receptors. *Pharmacol. Ther.* 2009; V. 124. N. 2, P. 195–206.
Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19619582/>

8. Su T. P. The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends Pharmacol. Sci.* 2010; V. 31. N. 12, P. 557-566.
Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20869780/>
9. Felipe Ossa, Jason R. Schnell, and José Luis Ortega-Roldan. A Review of the Human Sigma-1 Receptor Structure. *Adv Exp Med Biol.* 2017; 964:15-29.
Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28315262/>
10. Sara L. Morales-Lázaro, Ricardo González-Ramírez and Tamara Rosenbaum. Molecular Interplay Between the Sigma-1 Receptor, Steroids, and Ion Channels. *Front. Pharmacol.* 24 April 2019.
Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6491805/>
11. Cobos E., Entrena J., Nieto F., Cendan C., Pozo E. Pharmacology and therapeutic potential of sigma1 receptor ligands. *Curr. Neuropharmacol.* 2008; V. 6.- N. 4, P. 344–366.
Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19587856/>
12. Monnet F. P., Debonnel G., Junien J. L., De Montigny C. N-methyl-D-aspartate-induced neuronal activation is selectively modulated by sigma receptors. // *Eur. J. Pharmacol.* 1990; V. 179. N. 3, P. 441–445.
Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2163857/>
13. J. S. De Belleruche and H. F. Bradford. *Progress in Neurobiology*. First edition. Department of Biochemistry, Imperial College, London SW7, England; 1973. Chapter 9. The synaptosome: an isolated, working, neuronal compartment; p. 275-298.
14. Evans GJ. The synaptosome as a model system for studying synaptic physiology. *Cold Spring HarbProtoc.*; 2015(5):421-4.
Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25934942/>
15. Cotman C. W. Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions. // *Methods Enzymol.* - 1974. - V. 31, P. 445–452.
Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4278474/>
16. Krisanova N., Pozdnyakova N., Pastukhov A., Dudarenko M.,

Maksymchuk O., Parkhomets P., Sivko R., Borisova T. Vitamin D3 deficiency in puberty rats causes presynaptic malfunctioning through alterations in exocytotic release and uptake of glutamate/GABA and expression of EAAC-1/GAT-3 transporters. // *Food Chem. Toxicol.* - 2019. - V. 123, P. 142–150.

17. Larson E., Howlett B., Jagendorf A. Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination. // *Anal. Biochem.* - 1986. - V. 155. - N. 2, P. 243–248.

Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3728976/>

18. Zoccarato, F., Cavallini, L., Alexandre A. The pH-sensitive dye acridine orange as a tool to monitor exocytosis/endocytosis in synaptosomes. // *J. Neurochem.* – 1999. – V. 72. – P. 625-633.

19. Pozdnyakova N., Dudarenko M., Borisova T. New effects of GABA_B receptor allosteric modulator rac-BHFF on ambient GABA, uptake/release, Em and synaptic vesicle acidification in nerve terminals. // *Neuroscience.* – 2015. – V. 304. – P. 60–70.

20. Toshihiro Aiuchi, Takashi Daimatsu, Kazuyasu Nakaya, and Yasuharu Nakamura. Fluorescence changes of rhodamine 6G associated with changes in membrane potential in synaptosomes. *Biochimica et Biophysica Acta*. July 14, 1981;685 (1982) 289-296. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0005273682900700>

21. Prince, M., et al. The Global Impact of Dementia. *Alzheimer's Disease International*; 2015. *World Alzheimer Report 2015*. Available from: <http://www.worldalzreport2015.org/>

22. Urani A, et al. Enhanced antidepressant effect of sigma (1) (sigma (1)) receptor agonists in beta (25–35)-amyloid peptide-treated mice. *Behav Brain Res.* 2002; 134(1–2):239–247.

Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12191810/>

23. Schetz JA, et al. A prototypical sigma-1 receptor antagonist protects against brain ischemia. *Brain Res.* 2007; 1181:1–9.

Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17919467/>

24. Diaz JL, et al. Selective sigma-1 (sig1) receptor antagonists: emerging target for the treatment of neuropathic pain. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* (Formerly *Current Medicinal Chemistry/Central Nervous System Agents*). 2009; 9(3):172–183.

Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20021351/>

25. Zündorf G, Reiser G. Calcium dysregulation and homeostasis of neural calcium in the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases provide multiple targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 14(7):1275–1288.

Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20615073/>

26. Mattson MP. Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell*. 2007; 6(3):337–350.

Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17328689/>

27. Sheldon AL, Robinson MB. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int*. 2007; 51(6–7):333–355.

Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17517448/>

28. Perry VH, Nicoll JA, Holmes C. Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*. 2010; 6(4):193–201.

Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20234358/>

29. Szydlowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium*. 2010; 47(2):122–129.

Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20167368/>

30. Farber NB, et al. Receptor mechanisms and circuitry underlying NMDA antagonist neurotoxicity. *Mol Psychiatry*. 2002; 7(1):32–43.

Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11803444/>

31. DeCoster MA, et al. Sigma receptor-mediated neuroprotection against glutamate toxicity in primary rat neuronal cultures. *Brain Res*. 1995; 671(1):45–53.

Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7728532/>

32. Lu CW, et al. Sigma-1 receptor agonist SKF10047 inhibits glutamate

release in rat cerebral cortex nerve endings. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012; 341(2): 532–542. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22357973/>

33. Martina M, et al. The sigma-1 receptor modulates NMDA receptor synaptic transmission and plasticity via SK channels in rat hippocampus. *J Physiol.* 2007; 578(Pt 1):143–157.

Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17068104/>

34. Xu Q, et al. Sigma 1 receptor activation regulates brain-derived neurotrophic factor through NR2ACaMKIV-TORC1 pathway to rescue the impairment of learning and memory induced by brain ischaemia/reperfusion. *Psychopharmacology.* 2015; 232(10):1779–1791.

Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25420607/>

35. Hayashi T, Su TP. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca^{2+} signaling and cell survival. *Cell.* 2007; 131(3):596–610.

Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17981125/>

36. Herrera Y, et al. Sigma-1 receptor modulation of acid-sensing ion channel a (ASIC1a) and ASIC1a-induced Ca^{2+} influx in rat cortical neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008; 327(2):491–502.

Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18723775/>

37. Mitsuda T, et al. Sigma-1Rs are upregulated via PERK/eIF2 α /ATF4 pathway and execute protective function in ER stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 415(3):519–525.

Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22079628/>

38. Robson MJ, et al. SN79, a sigma receptor ligand, blocks methamphetamine-induced microglial activation and cytokine upregulation. *Exp Neurol.* 2013; 247:134–142.

Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23631864/>

39. Francardo V, et al. Pharmacological stimulation of sigma-1 receptors has neurorestorative effects in experimental parkinsonism. *Brain.* 2014; 137:1998.

Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3742718/>

40. Koyama Y. Signaling molecules regulating phenotypic conversions of

astrocytes and glial scar formation in damaged nerve tissues. *Neurochem Int.* 2014; 78:35–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25180676/>

41. Budni J, et al. The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. *Aging Dis.* 2015; 6(5):331–341. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26425388/>

42. Takebayashi M, Hayashi T, Su TP. σ -1 Receptors potentiate epidermal growth factor signaling towards neuritogenesis in PC12 cells: potential relation to lipid raft reconstitution. *Synapse.* 2004; 53(2):90–103. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15170821/>

43. Kimura Y, et al. Sigma-1 receptor enhances neurite elongation of cerebellar granule neurons via TrkB signaling. *PLoS One.* 2013; 8(10): e75760. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3793001/>

44. Van Battum EY, Brignani S, Pasterkamp RJ. Axon guidance proteins in neurological disorders. *Lancet Neurol.* 2015; 14(5):532–546. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25769423/>

45. Tsai S-Y, et al. Sigma-1 receptors regulate hippocampal dendritic spine formation via a free radical-sensitive mechanism involving Rac1· GTP pathway. *Proc Natl Acad Sci.* 2009; 106(52): 22468–22473. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20018732/>

46. Tsai S-YA, et al. Sigma-1 receptor regulates Tau phosphorylation and axon extension by shaping p35 turnover via myristic acid. *Proc Natl Acad Sci.* 2015; 112(21):6742–6747. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25964330/>

47. Linda Nguyen, Brandon P. Lucke-Wolds, Shona Mookerjee, Nidhi Kaushal, and Rae R. Matsumoto. Sigma-1 Receptors and Neurodegenerative Diseases: Towards a Hypothesis of Sigma-1 Receptors as Amplifiers of Neurodegeneration and Neuroprotection. *Adv Exp Med Biol.* 2017; 964: 133–152. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5500918/>

48. Daniel A. Ryskamp, Svetlana Korban, Vladimir Zhemkov, Nina Kraskovskaya and Ilya Bezprozvanny. Neuronal Sigma-1 Receptors: Signaling

Functions and Protective Roles in Neurodegenerative Diseases. *Front. Neurosci.*, 28 August 2019; 13:862.

Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31551669/>

49. Kai Yang, Changcai Wang, and Taolei Sun. The Roles of Intracellular Chaperone Proteins, Sigma Receptors, in Parkinson's Disease (PD) and Major Depressive Disorder (MDD). *Front Pharmacol.* 2019; 10: 528.

Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6537631/>

50. Botond Penke, Livia Fülöp, Mária Szűcs, and Ede Frecska. The Role of Sigma-1 Receptor, an Intracellular Chaperone in Neurodegenerative Diseases *Curr Neuroparmacol.* 2018 Jan; 16(1): 97–116.

Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5771390/>

51. Чайченко Г.М., Цибенко В.О., Сокур В.Д. Фізіологія людини і тварин. Підручник. — К.: Вища школа, 2003. — 464 с.

52. Xinying Liu, Yingmei Fu, Huan Yang, Timur Mavlyutov, Jun Li, Christopher R. McCurdy, Lian-Wang Guo, and Bikash R. Pattnaik. Potential independent action of sigma receptor ligands through inhibition of the Kv2.1 channel. *Oncotarget.* 2017 Aug 29; 8(35): 59345–59358.

Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5601737/>

53. Kolomiytseva I. K., Perepelkina N. I., Zharikova A. D., Popov V. I. Membrane lipids and morphology of brain cortex synaptosomes isolated from hibernating Yakutian ground squirrel. *Comp Biochem Physiol B, Biochem Mol Biol.* 2008; 151(4):386-91.

Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18760375/>

54. Практикум з біохімії та методичні матеріали для студентів II курсу. Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, кафедра загальної та біологічної хімії; 2019.

55. Л. І. Остапченко, І. В. Компанець, О. В. Скопенко, Т. Б., Синельник, О. М. Савчук, С. М. Береговий. Біоорганічні хімія. Практикум; 2014.

56. The Human Protein Atlas. KTH, UU, SciLifeLab, Sweden; January 2. Available from: <https://www.proteinatlas.org/>

ДОДАТОК А

Ліганди сігма-1 рецепторів [1,50].

<i>Агоністи</i>	<i>Антагоністи</i>
(+)-SKF-10047	AP-7
(+)-пентазоцин	BD-1047
4-IBP	BD-1008
BD737	BD-1063
DHEA-S	E-5842
MDMA	NE-100
MDMA	NMDA
PRE-084	N-фенетіл-4-піперидин
Амітриптилін	Верапаміл
Героїн	Галоперидол
Диметилтриптамін	Декстрометорфан (DXM)
Донепезіл	Еліпроділ
Ібогаїн	Опіпрамол
Ігмезин	Панамізин
Інтерлейкін-10	Прегналон
Кокаїн	Римказол
Мемантін	Сабелузол
Метамфетамін	Сертралін
Сирамезін	Тестостерон
Фенциклідин	Тіопірон
Флувоксамін	Фенпропіморф