НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О. В. ПАЛЛАДІНА

ПАСТУХОВ АРТЕМ ОЛЕГОВИЧ

УДК 612.822:612.59:577.31

Na^+-ЗАЛЕЖНИЙ ТРАНСПОРТ ГЛУТАМАТУ ТА ЕКЗОЦИТОЗ В НЕРВОВИХ ТЕРМІНАЛЯХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЗА УМОВ ГІПОТЕРМІЇ

03.00.04 – біохімія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі нейрохімії Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Борисова Тетяна Олександрівна,
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
завідувач відділу нейрохімії

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, доцент
Калачнюк Лілія Григорівна,
Національний університет біоресурсів і природокористування України,
професор кафедри біохімії і фізіології тварин ім. акад. М.Ф. Гулого

доктор біологічних наук, доцент
Толстанова Ганна Миколаївна,
Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
начальник науково-дослідної частини

Захист відбудеться « 27 » травня 2019 року о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України за адресою: 01030, Київ, вул. Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (01030, Київ, вул. Леонтовича, 9).

Автореферат розісланий «____» _____ 2019 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук Н. П. Карлова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Глутамат (глутамінова кислота) – один з основних збуджуючих нейромедіаторів центральної нервової системи хребетних тварин, який, зокрема, бере участь у процесах розпізнавання, пам'яті, навчання тощо (Zhou and Danbolt, 2014). Порушення транспорту глутамату є характерною рисою патогенезу майже усіх нейрологічних захворювань (Ribeiro et al., 2017). Тривале підвищення концентрації глутамату в синаптичній щілині призводить до надмірної стимуляції глутаматних рецепторів і, як наслідок, зумовлює розвиток нейротоксичності та загибель нейронів. Неконтрольоване збільшення транспортер-опосередкованого та тонічного вивільнення глутамату з нервових клітин та підвищення його позаклітинного рівня є одним з основних факторів, який призводить до розвитку нейротоксичності внаслідок інсульту (Krzyżanowska et al., 2014). Для попередження наслідків останнього у хірургії широко використовується гіпотермія (Englum et al., 2013; Kurisu and Yenari, 2018; Sato et al., 2018). Хірургічні операції досить часто вимагають зупинки кровообігу в умовах глибокої гіпотермії (температури нижче 20°C), тому рівномірне охолодження органів та тканин, які мають інтенсивне кровопостачання (мозок, нирки, печінка, серце), забезпечується досить тривалим часом перфузії за низької температури.

Температура в значній мірі визначає і властивості біологічних мембран, а саме: впорядкованість, фазові переходи, проникність та товщину. Холестерол є важливим ліпідним компонентом біологічних мембран і необхідною складовою ліпідних мікродоменів (рафтів) – своєрідних платформ, на яких перетинаються різноманітні сигнальні шляхи. Синаптична передача надзвичайно чутлива до змін концентрації мембранного холестеролу, який є необхідним для переміщення/інтерналізації рецепторів нейромедіаторів, перерозподілу низки протеїнів, залучених до екзоцитозу, модуляції активності потенціал-залежних кальцієвих і калієвих каналів та специфічних транспортерів нейромедіаторів плазматичної мембрани. За умов нейропатологій, таких як ішемічні/гіпоксичні ураження головного мозку, що супроводжуються збільшенням транспортер-опосередкованого вивільнення глутамату з нервових терміналей, зниження рівню холестеролу має нейропротекторний ефект (Borisova et al., 2010; Krisanova et al., 2012). Транспортер-опосередковане вивільнення глутамату зменшується в синаптосомах зі зниженням рівня холестеролу в мембрані. Одночасна температурозалежна модуляція та модифікація ліпідного складу мембрани з метою регуляції глутаматергічної нейротрансмісії становить істотний інтерес з точки зору сучасної медицини, як і комбіноване застосування лікарських засобів та гіпотермії (Goossens and Hachimi-Idrissi, 2014). Серед таких препаратів – леветирацетам, 2*S*-(2-оксо-піролідін-1)-бутанамід, протисудомний препарат з широким спектром протисудомної активності і багатьма ймовірними мішенями у нервових закінченнях. Застосування цього лікарського засобу під час терапевтичної гіпотермії є вельми перспективним комплексним підходом для збільшення позитивних ефектів гіпотермії і подовження часу її застосування (Donovan et al., 2016).

Аналіз впливу гіпотермії на ключові характеристики глутаматергічної нейропередачі, динаміку накопичення глутамату, Ca^{2+}-залежне та Ca^{2+}-незалежне вивільнення глутамату з нервових терміналей головного мозку, а також вивчення можливості її комбінованого застосування з медичними препаратами є актуальними та практичними завданнями сучасної нейрохімії та медицини, вирішення яких створить біохімічне підґрунтя та відкриє шляхи до подолання наслідків нейрологічних розладів.

Роботу присвячено аналізу Na^{+}-залежного транспорту глутамату та екзоцитозу в нервових терміналях головного мозку за умов гіпотермії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в рамках бюджетних тем відділу нейрохімії Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України: «Екзоцитоз та активний транспорт нейромедіаторів у пресинапсі в нормі та за умов розвитку нейропатологій: регуляція, рецептор-опосередкована модуляція та пошук шляхів нейропротекції» (2014-2018 рр., № д.р. 0114U003214); експерименти з використанням магнітних наночастинок та акцептору холестеролу проходили за часткової підтримки гранту «Створення і аналіз біомодулюючих властивостей складного нанокомплексу залізних та кальцій карбонатних наночастинок з наночастинками агрегатів циклодекстринів; оцінка нейротоксичного ризику його використання у нанонейротехнології» у рамках Державної цільової науково–технічної програми «Нанотехнології та наноматеріали» (2010–2014 рр., № д.р. 0110U005957), гранту «Відокремлення специфічних та побічних ефектів алостеричних модуляторів пресинаптичних ГАМК-Б рецепторів – сучасних мішеней регуляції нейросекреції, та нових антиепілептичних сполук на ключові характеристики ГАМК- та глутаматергічної нейропередачі» у рамках Цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства» (2010–2014 рр., № д.р. 0115U003641), гранту «Розроблення підходів нейропротекції при довготривалих космічних місіях» у рамках Цільової комплексної програми НАН України з наукових космічних досліджень (2018-2022 рр., № д.р. 0118U000376).

Мета і завдання роботи. Метою роботи було дослідження модуляції Na^{+}-залежного накопичення та вивільнення, а також позаклітинного рівня глутамату та екзоцитозу в нервових терміналях головного мозку щурів за умов помірної та глибокої гіпотермії.

Відповідно до вказаної мети були поставлені завдання:

1. Визначити динаміку змін накопичення, транспортер-опосередкованого та Ca^{2+}-залежного вивільнення глутамату з нервових терміналей за умов помірної та глибокої гіпотермії.
2. Дослідити гомо- та гетерообмін глутамату у нервових терміналях за умов помірної та глибокої гіпотермії.
3. З'ясувати вплив помірної та глибокої гіпотермії на вивільнення глутамату, стимульоване активацією пресинаптичних іонотропних глутаматних рецепторів.

4. Дослідити комбінований вплив медичного препарату леветирацетаму та гіпотермії на вивільнення глутамату, стимульоване активацією пресинаптичних іонотропних глутаматних рецепторів.
5. Оцінити сумісну дію акцептора холестеролу метил-β-циклодекстрину (МЦД) та гіпотермії на нервові терміналі.
6. З'ясувати можливість використання маґгемітових наночастинок, кон'югованих з МЦД, для модуляції транспортер-опосередкованого накопичення та вивільнення глутамату в нервових терміналях.

Об'єкт дослідження – особливості систем транспорту глутамату в нервових терміналях головного мозку щурів.

Предмет дослідження – регуляція процесів високоафінного Na^+-залежного накопичення глутамату, тонічного та стимульованого деполяризацією плазматичної мембрани вивільнення глутамату за умов гіпотермії.

Методи дослідження: методи препаративної біохімії; метод лазерної кореляційної спектроскопії для характеристики розміру нервових закінчень за різної температури; спектрофлуориметричні методи для визначення мембранного потенціалу та закислення синаптичних везикул; радіоізотопні методи для аналізу накопичення та вивільнення глутамату; методи спектрофотометрії для визначення кількості протеїну; статистичні методи.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше були досліджені особливості процесу транспорту основного збуджуючого нейромедіатора глутамату в препаратах нервових терміналей за умов помірної та глибокої гіпотермії. Отримано нові дані стосовно змін процесів накопичення та вивільнення глутамату нервовими терміналями за умов помірної та глибокої гіпотермії. Застосування різних методичних підходів продемонструвало, що в умовах зниження температури:

- знижується тонічне вивільнення та екзоцитоз глутамату у нервових терміналях, однак не змінюється його позаклітинний рівень;
- пригнічується транспортер-опосередковане вивільнення глутамату з нервових терміналей та його вивільнення через дисипацію протонного градієнта синаптичних везикул;
- знижується гомо- та гетерообмін глутамату;
- розрізняється динаміка вивільнення глутамату з нервових терміналей при активації різних типів пресинаптичних іонотропних глутаматних рецепторів;
- збільшується рівень N-метил-D-аспартат (NMDA)-стимульованого вивільнення глутамату за присутності леветирацетаму.

Вперше показано, що зниження рівня холестеролу в нервових терміналях за умов зниження температури призводить до майже повного пригнічення патологічного транспортер-опосередкованого вивільнення глутамату.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані експериментальні дані можуть бути використані, зокрема, у медицині, оскільки розширюють знання щодо нейропротекторного впливу гіпотермії як складової терапії, спрямованої на запобігання наслідків інсультів/ішемічних станів. Дані щодо комбінованого застосування МЦД та гіпотермії дозволяють практично вирішувати одну з актуальних

проблем сучасної медицини та біотехнології – комбінованого застосування кількох нейропротекторів. Результати щодо комбінованого впливу гіпотермії та протисудомного препарату є перспективним комплексним підходом для збільшення позитивних ефектів гіпотермії і подовження часу її застосування, що є доцільним для використання у медицині та фармакології.

Результати роботи можуть бути використані при розробці методичних рекомендацій із застосування гіпотермії для попередження та зменшення наслідків гіпоксичних/ішемічних уражень нервової системи.

Особистий внесок здобувача. У процесі виконання дисертаційної роботи автором проаналізовано наукову літературу за темою дослідження. Дисертантом спільно із науковим керівником розроблена програма проведення експериментів та підібрані адекватні методи вирішення поставлених завдань. Дисертантом особисто проводились експериментальні дослідження з піддослідними тваринами. Основний обсяг експериментальної роботи здійснено дисертантом власноруч або за його безпосередньої участі. Визначення розміру синаптосом методом фотонної кореляційної спектроскопії було проведено за участі к.т.н., старшого наукового співробітника лабораторії оптичних методів дослідження О.Ю. Чуніхіна. Обробка отриманих результатів та написання тексту дисертаційної роботи виконані безпосередньо здобувачем. Аналіз та обговорення результатів проведені спільно з науковим керівником. Друковані праці підготовлені за безпосередньої участі автора. Викладені у дисертаційній роботі ідеї, наукові висновки і положення сформульовані автором самостійно або у співавторстві з науковим керівником.

Апробація результатів дисертації. Основні матеріали роботи представлені на п’ятьох вітчизняних та міжнародних конференціях: Міжнародна конференція «Bridges in Life sciences 10th Annual Scientific Conference» (Вроцлав, Польща, 16–19 квітня 2015); 10-та Парнасівська конференція (Вроцлав, Польща, 10–12 липня 2016); 17-та Українська конференція з космічних досліджень (Одеса, Україна, 21–25 серпня 2017); Міжнародна конференція «RECOOP 12th Bridges Annual Scientific Conference» (Будапешт, Угорщина, 7-8 квітня 2017); Міжнародна конференція «RECOOP 9th Annual Project Review Meeting» (Братислава, Словацька Республіка, 11-14 квітня 2018).

Публікації. За матеріалами досліджень опубліковано 12 наукових праць, з них 7 статей у фахових міжнародних (6 статей) та вітчизняних (1 стаття) виданнях та 5 тез доповідей у збірках матеріалів вітчизняних та зарубіжних конференцій.

Структура та обсяг роботи. Дисертаційна робота складається із анотації, списку опублікованих робіт за темою дисертації, вступу, огляду літератури, експериментальної частини, яка включає опис матеріалів і методів, отримані результати, аналіз і узагальнення результатів досліджень, висновки та список використаних літературних джерел, що охоплює 302 найменування. Дисертацію викладено на 163 сторінках машинописного тексту. Фактичний матеріал дисертації подано у вигляді 37 рисунків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. У розділі представлено сучасні дані щодо ролі глутамату як нейромедіатора у ЦНС людини. Описано механізми потрапляння глутамату з плазми крові до нервових клітин, його вивільнення за рахунок екзоцитозу синаптичних везикул та обміну. Проаналізовано особливості передачі нервового імпульсу у синапсі, структура та функціонування високоафінних Na^+-залежних транспортерів глутамату плазматичної мембрани, везикулярних глутаматних транспортерів, глутаматних рецепторів та синаптична пластичність. Розглянуто можливості використання моделей стану інсульту. Охарактеризовано нейропротекторні засоби (гіпотермія, лікарські препарати) та доречність їх комбінованого застосування. Висвітлена роль холестеролу у процесі передачі нервового імпульсу та наслідки його зниження.

Матеріали та методи досліджень. Експерименти на тваринах проведено згідно європейського та українського законодавства та правил з біоетики. Препарати нервових терміналей отримано зі щурів-самців лінії Wistar, масою тіла 250–300 г, віком 2 місяці, які утримувалися у стандартних умовах віварію, за температури 22–23 °С, доступу до їжі та води *ad libitum*. Усі експерименти виконано згідно з «Правилами проведення робіт з використанням експериментальних тварин», затвердженими Комісією з догляду, утримання й використання експериментальних тварин Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України (Протокол № 1 від 06.11.2018).

Препарат нервових терміналей (синаптосом) виділяли з гомогенату мозку диференційним центрифугуванням і центрифугуванням у градієнті фіколла за методом Котмана (Cotman, 1974) з незначними модифікаціями (Borisova and Krisanova, 2008). Концентрацію білка визначали за методом Ларсона (Larson et al., 1986).

Холестерол видаляли шляхом інкубації синаптосом у розчині 15 мМ МЦД, відповідно до методики (Borisova et al., 2010), після цього оброблені синаптосоми розводили 10-ма об'ємами льодяного оксигенованого безкальцієвого стандартного сольового розчину та центрифугували. Супернатант ретельно видаляли, а осад ресуспендували у стандартному сольовому розчині до кінцевої концентрації 1 мг протеїну/мл та відразу використовували в експериментах.

Розмір синаптосом досліджували методом фотонної кореляційної спектроскопії на лазерному кореляційному спектрометрі «ZetaSizer–3» (Malvern Instrument, Великобританія), обладнаному He-Ne лазером ЛГН-111 (P=25 мВт, λ=633 нм). Діапазон вимірювання приладу становить від 1 нм до 50 мкм. Отримані результати вимірювань обробляли за допомогою сервісної комп'ютерної програми PCS-Size mode v1.61.

Накопичення L-[^{14}C]глутамату синаптосомами визначали за алгоритмом: до зразків суспензії синаптосом додавали суміші L-глутамату та L-[^{14}C]глутамату (0,1 мкКі/мл 420 нМ) з подальшим інкубуванням протягом певного часу, після чого швидко осаджували в мікроцентрифузі «Eppendorf» (20 с при 10000 g). Накопичення L-[^{14}C]глутамату синаптосомами визначали вимірюванням радіоактивності в

аліквотах надосаду та в аліквотах солюбілізованого в SDS осаду. Радіоактивність визначали на сцинтиляційному лічильнику Tracor Analytic Delta 300 (США) зі сцинтиляційною сумішшю ACS (aqueous counting scintillate) –сцинтиляційна рідина для водних зразків (Pozdnyakova et al., 2014; Soldatkin et al., 2015).

Для визначення вивільнення L-[^{14}C]глутамату препарат синаптосом розводили у стандартному сольовому розчині та навантажували L-[^{14}C]глутаматом (1 нМ/мг білка, 238 мКі/мМ) в Ca^{2+}-вмісному оксигенованому середовищі протягом 10 хв. Після навантаження суспензію синаптосом розводили, центрифугували та ресуспендували у стандартному сольовому розчині до кінцевої концентрації 1мг протеїну/мл та одразу використовували в експериментах щодо визначення вивільнення глутамату. Зразки інкубували у безкальцієвому стандартному сольовому розчині 8 хв при 37 ºС для відновлення іонних градієнтів, після чого синаптосоми охолоджували до відповідної температури. У експериментах без попереднього нагрівання синаптосом до 37 °С холодні синаптосоми відразу доводили до відповідної температури. Після створення гіпотермічних умов синаптосоми інкубували протягом 6 хв та швидко осаджували в мікроцентрифузі «Eppendorf». Вивільнення L-[^{14}C]глутамату визначали в аліквотах надосаду та розчиненого в SDS осаду на сцинтиляційному лічильнику, а також перевіряли за допомогою глутаматного біосенсора (Borisova et al., 2018). Рівень вивільнення нейромедіатора визначали як відсоток від загального вмісту міченого нейромедіатора.

Базальне вивільнення визначалось як підвищення позаклітинного рівня L-[^{14}C] глутамату в суспензії синаптосом, що інкубувалися без будь-яких стимулюючих агентів. Стимульоване вивільнення нейромедіатору визначали як різницю між загальним вивільненням після додавання стимулюючого агенту та базальним вивільненням. Транспортер-опосередковане вивільнення стимулювали 35мМ KCl. Карбоніл ціанід-4-(трифторметокси)фенілгідразон (FCCP) - стимульоване вивільнення визначали як різницю між базальним вивільненням та вивільненням після додавання 1 мкМ FCCP. Вивільнення глутамату шляхом екзоцитозу визначали як різницю між транспортер-опосередкованим вивільненням у 2 мМ Ca^{2+}-вмісному середовищі та транспортер-опосередкованим вивільненням у безкальцієвому середовищі.

Визначення потенціалу плазматичної мембрани синаптосом проводили з використанням потенціал-чутливого флуоресцентного зонду родаміна 6G, який зв’язується з плазматичною мембраною синаптосом та мембраною мітохондрій в залежності від їх мембранних потенціалів (Zoccarato et al., 1999).

Маґгемітові наночастинки γ-Fe_2O_3 або МЦД-γ-Fe_2O_3, синтезовані відповідно (Horák et al., 2017), у концентрації 0,75 мг/мл додавали до препарату нервових терміналей, суміш інкубували при 37 ºС упродовж 10 хв. У подальшому після різних часових інтервалів в залежності від методу синаптосоми швидко відокремлювали центрифугуванням в мікроцентрифузі та визначали показники в аліквотах надосаду.

Умови помірної (27 °С) та глибокої (17 °С) гіпотермії створювали відповідно Liu та Yenari (Liu and Yenari, 2009). Температура 37 °С була використана як контрольна.

Усі вимірювання проводили з використанням як мінімум чотирьох препаратів синаптосом у трьох повторюваностях.

Обробку даних проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики з вирахуванням середнього значення (M) й стандартної похибки середнього (±m). Для визначення достовірності відмінностей між одержаними величинами двох вибірок використовували t-критерій Стьюдента. Вірогідними вважали відмінності при $P < 0,05$. Опрацювання і статистичну обробку результатів проводили з використанням програми Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для аналізу ефектів, викликаних гіпотермією, було проведено дві серії експериментів. Перша – пов'язана з дослідженням непатологічних процесів в нормальних нервових терміналях, тобто було охарактеризовано накопичення, тонічне вивільнення та позаклітинний рівень глутамату. Друга – пов'язана з патологічним ішеміє-індукованим транспортер-опосередкованим вивільненням глутамату, викликаним деполяризацією плазматичної мембрани нервових терміналей та FCCP.

З метою перевірки впливу температури на розмір синаптосом методом фотонної кореляційної спектроскопії було визначено середній діаметр ізольованих нервових терміналей.

Результати дослідження засвідчили, що препарати синаптосом містили частинки, розмір яких коливався від 0,2 до 20 мкм. Середній діаметр синаптосом складав 2,3 ± 0,3 мкм у контролі при +37 °C. В умовах зниження температури розміри значуще не відрізнялись і дорівнювали 2,4 ± 0,1 мкм при +27 °C та 2,3 ± 0,3 мкм при +17 °C (n = 5) (рис. 1). Можна зробити висновок, що зміна температури не впливала на розмір синаптосом та не призводила до їх агрегації.

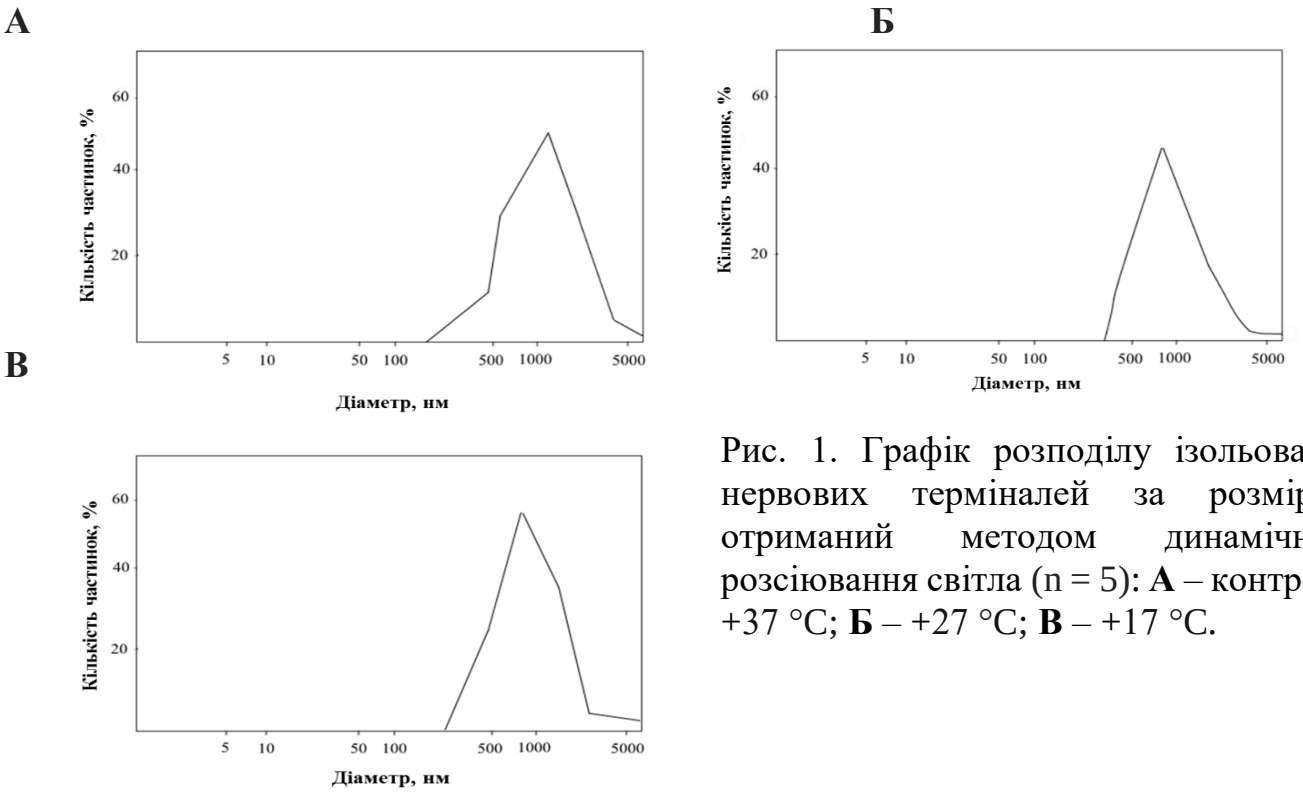


Рис. 1. Графік розподілу ізольованих нервових терміналей за розміром, отриманий методом динамічного розсіювання світла (n = 5): **А** – контроль, +37 °C; **Б** – +27 °C; **В** – +17 °C.

Вплив гіпотермії на транспорт глутамату в нервових терміналях за нормальних умов. Аналіз тонічного вивільнення L-[^{14}C]глутамату (рис. 2) з синаптосом засвідчив зменшення швидкості цього процесу в умовах зниження температури. Цей параметр становив 3,90 ± 0,30 % від загального вмісту міченого глутамату при +37 °С, 0,10 ± 0,08 % – при +27 °С та 0,74 ± 0,08 % – при +17 °С. Рівень тонічного вивільнення L-[^{14}C]глутамату значно знижувався в умовах гіпотермії і це зниження було більш суттєвим при помірній (+27 °С), ніж при глибокій (+17 °С) гіпотермії.

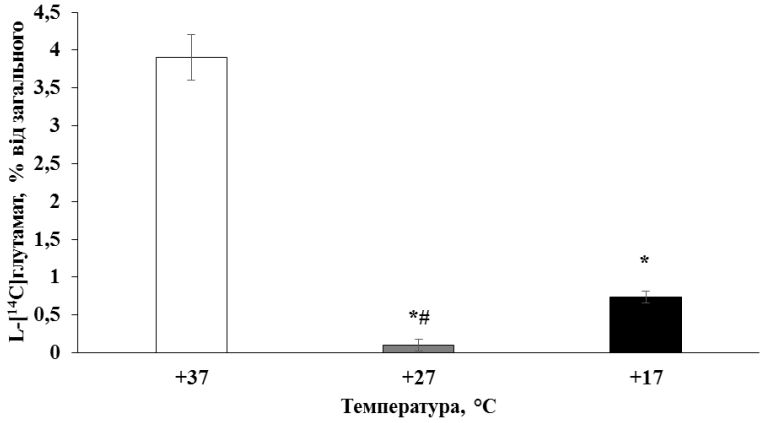


Рис. 2. Рівень тонічного вивільнення L-[^{14}C]глутамату з синаптосом за умов гіпотермії. Вивільнення вимірювалося за 6-ть хвилин, M ± m (n = 6). *– P < 0,05 у порівнянні з контролем (+37 °С), # – у порівнянні з синаптосомами при +17 °С.

Помірна та глибока гіпотермія викликають значні зміни початкової швидкості накопичення L-[^{14}C]глутамату синаптосомами (рис. 3). Було продемонстровано, що помірна та глибока гіпотермія суттєво гальмують зазначений процес. Початкова швидкість накопичення синаптосомами L-[^{14}C]глутамату складала 2,63 ± 0,08 нмоль/(хв×мг протеїну) при +37 °С, 2,09 ± 0,20 нмоль/(хв×мг протеїну) – при +27 °С та 1,48 ± 0,12 нмоль/(хв×мг протеїну) – при +17 °С. Накопичення L-[^{14}C]глутамату синаптосомами на десятій хвилині складало 9,83 ± 0,35 нмоль/мг протеїну (+37 °С), 7,42 ± 0,27 нмоль/мг протеїну – при +27 °С та 5,75 ± 0,52 нмоль/мг протеїну – при +17 °С.

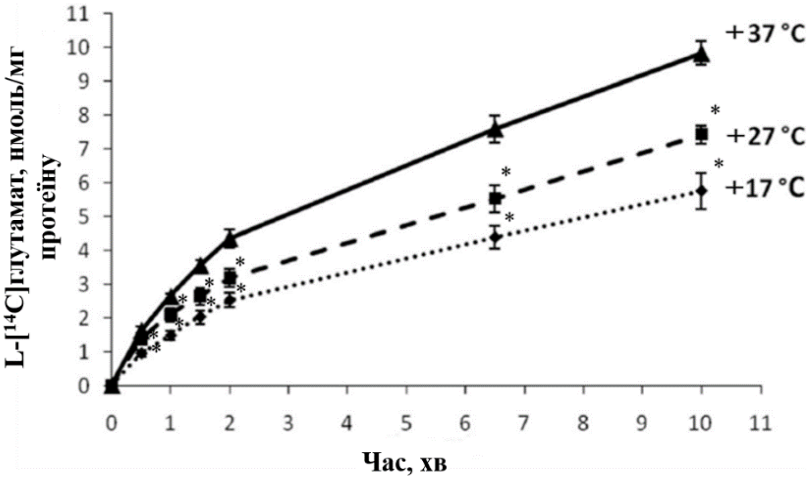


Рис. 3. Накопичення L-[^{14}C]глутамату синаптосомами, за умов гіпотермії, M ± m (n = 6). *– P < 0,05 у порівнянні з контролем (+37 °С)

Певний позаклітинний рівень глутамату у препараті нервових терміналей підтримується протилежно спрямованими процесами накопичення та вивільнення. Як свідчать результати, представлені на рис. 4, позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату у препараті синаптосом змінювався у незначній мірі за умови зниження температури. Позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату сягав 276,0 ± 32,0 пмоль/мг протеїну (+37 °C), 225,0 ± 27,0 пмоль/мг протеїну – при +27 °C та 244,0 ± 29,0 пмоль/мг протеїну – при +17 °C. Отримані результати дозволяють зробити висновок, що в порівнянні з суттєвим інгібуванням накопичення та тонічного вивільнення L-[^{14}C]глутамату, позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату не змінювався за умов помірної/глибокої гіпотермії. Єдине можливе пояснення цього факту полягає в тому, що за умов гіпотермії тонічне вивільнення зменшувалося з тією ж ефективністю, що й накопичення L-[^{14}C]глутамату нервовими терміналями.

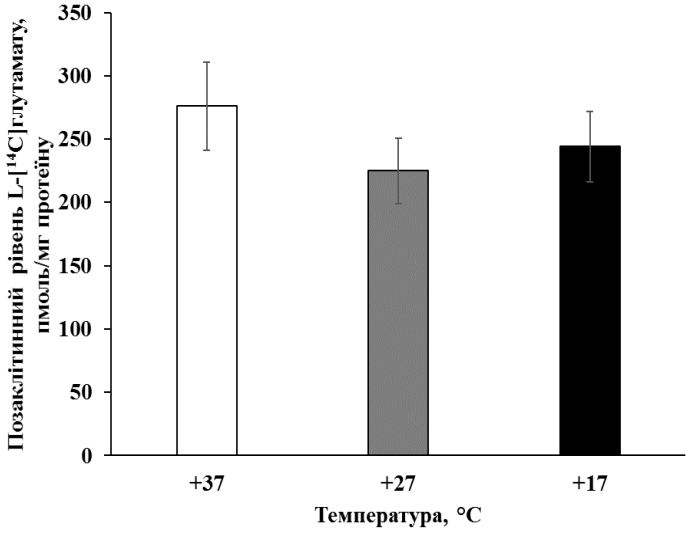


Рис. 4. Позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату у середовищі інкубації синаптосом за умов гіпотермії, M ± m (n = 30). Вимірювання проводилось на 14-тій хвилині.

Таким чином, дослідження впливу різних температурних режимів, помірної та глибокої гіпотермії, на основні нейрохімічні показники синаптичної передачі (швидкість накопичення, загальну кількість накопичення, позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату) засвідчили наступне: гіпотермія викликає зниження початкової швидкості накопичення L-[^{14}C]глутамату нервовими терміналями та загальної кількості накопиченого L-[^{14}C]глутамату; обидва режими гіпотермії не змінюють позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату; тонічне вивільнення L-[^{14}C]глутамату знижується найбільше за умов помірної гіпотермії, ніж глибокої гіпотермії.

Вплив гіпотермії на транспорт глутамату в нервових терміналях за умов моделювання патологічних станів. В умовах гіпоксії, ішемії, інсульту, при травмах мозку, гіпоглікемії тощо, збільшення позаклітинного рівня глутамату викликає нейротоксичність і загибель нейронів. Головним механізмом, який призводить до збільшення концентрації позаклітинного глутамату в зазначених патологічних умовах, є його транспортер-опосередковане вивільнення з нервових терміналей.

Було показано, що стимульоване деполяризацією плазматичної мембрани транспортер-опосередковане вивільнення L-[^{14}C]глутамату з синаптосом знижується прогресивно в умовах помірної та глибокої гіпотермії (рис. 5, А). Вивільнення L-[^{14}C]глутамату, виміряне за 6-ть хвилин складало 12,0 ± 1,0 % від загального вмісту

міченого глутамату при +37 °С, 10,0 ± 0,5 % від загального вмісту міченого глутамату при +27 °С та 6,0 ± 0,5 % від загального вмісту міченого глутамату при +17 °С (P < 0,05, t-тесту Стьюдента, n = 4). Таким чином, рівень вивільнення L-[^{14}C]глутамату з цитозольного пулу синаптосом зменшувався в умовах помірної та глибокої гіпотермії.

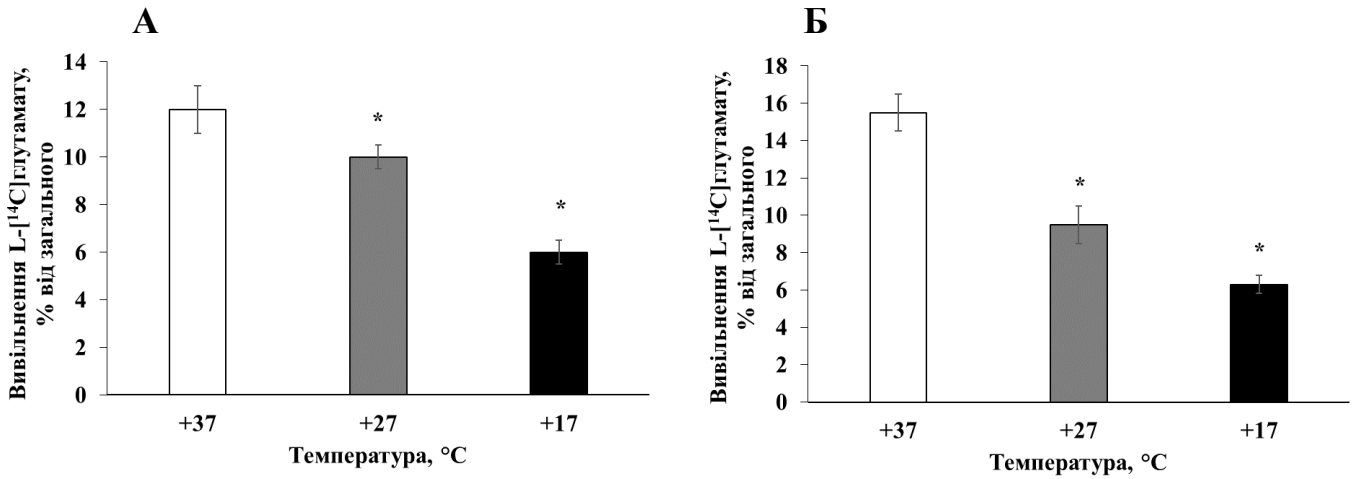


Рис. 5. Рівень транспортер-опосередкованого вивільнення (**А**) та FCCP-стимульованого вивільнення (**Б**) L-[^{14}C]глутамату з нервових терміналей за умов гіпотермії, M ± m (n = 4). Вивільнення вимірювалося за 6-ть хвилин. * – P < 0,05 у порівнянні з контролем (+37 °С).

Використання FCCP в експериментах пов’язане з його здатністю розсіювати протонний градієнт синаптичних везикул і пригнічувати накопичення глутамату (Borisova and Krisanova, 2008). Такі умови сприяють збільшенню транспортер-опосередкованого вивільнення L-[^{14}C]глутамату із синаптосом. У серії експериментів проаналізовано вплив помірної та глибокої гіпотермії на вивільнення L-[^{14}C]глутамату з синаптосом при застосуванні FCCP (рис. 5, Б). Рівень FCCP-стимульованого вивільнення L-[^{14}C]глутамату за 6-ть хвилин складав 15,5 ± 1,0 % від загального вмісту міченого глутамату при +37 °С, 9,5 ± 1,0 % від загального вмісту міченого глутамату при +27 °С та 6,3 ± 0,5 % від загального вмісту міченого глутамату при +17 °С (P < 0,05, n = 4).

Цей факт свідчить про поступовий нейропротекторний ефект, який збільшується від помірної до глибокої гіпотермії в ураженій гіпоксією/ішемією зоні мозку. Отримані експериментальні дані узгоджуються з результатами Nakashima K., Todd M. (Nakashima and Todd, 1996), які продемонстрували, що індуковане ішемією збільшення позаклітинної концентрації глутамату інгібується низькою температурою. Також наші результати корелюють з іншими дослідженнями (Berger et al., 2002), де автори засвідчили, що концентрація глутамату в тканинах, де відбувся інфаркт, суттєво змінюється при гіпотермії.

Таким чином, помірна та глибока гіпотермія ефективно знижує реверсну роботу глутаматних транспортерів, а саме патологічне транспортер-опосередковане вивільнення L-[^{14}C]глутамату з нервових терміналей, стимульоване деполяризацією

плазматичної мембрани або протонофором FCCP, який спричиняє дисипацію протонного градієнту синаптичних везикул, що свідчить про нейропротекторний ефект зниження температури.

Вплив гіпотермії на гомо- та гетерообмін глутамату у нервових терміналях. Сутність механізмів, які визначають гомо- та гетерообмін глутамату, дотепер залишається нез'ясованою, не зважаючи на принципове значення цих процесів для підтримки позаклітинного рівня глутамату і значну кількість теоретичних і експериментальних даних про функціонування транспортерів глутамату. Транспортер-опосередковане вивільнення глутамату може бути непатологічним і відбуватися за фізіологічних умов як частина механізму гомо- і гетерообміну (Makarov et al., 2013). Була проаналізована динаміка викликаних гіпотермією змін гомообміну (глутамат-індуковане вивільнення L-[^{14}C]глутамату) (рис. 6, А) і гетерообміну (у присутності D-аспартату (рис. 6, Б) та DL-трео-β-гідрокси-аспартату (DL-THA) (рис. 6, В)) у нервових терміналях.

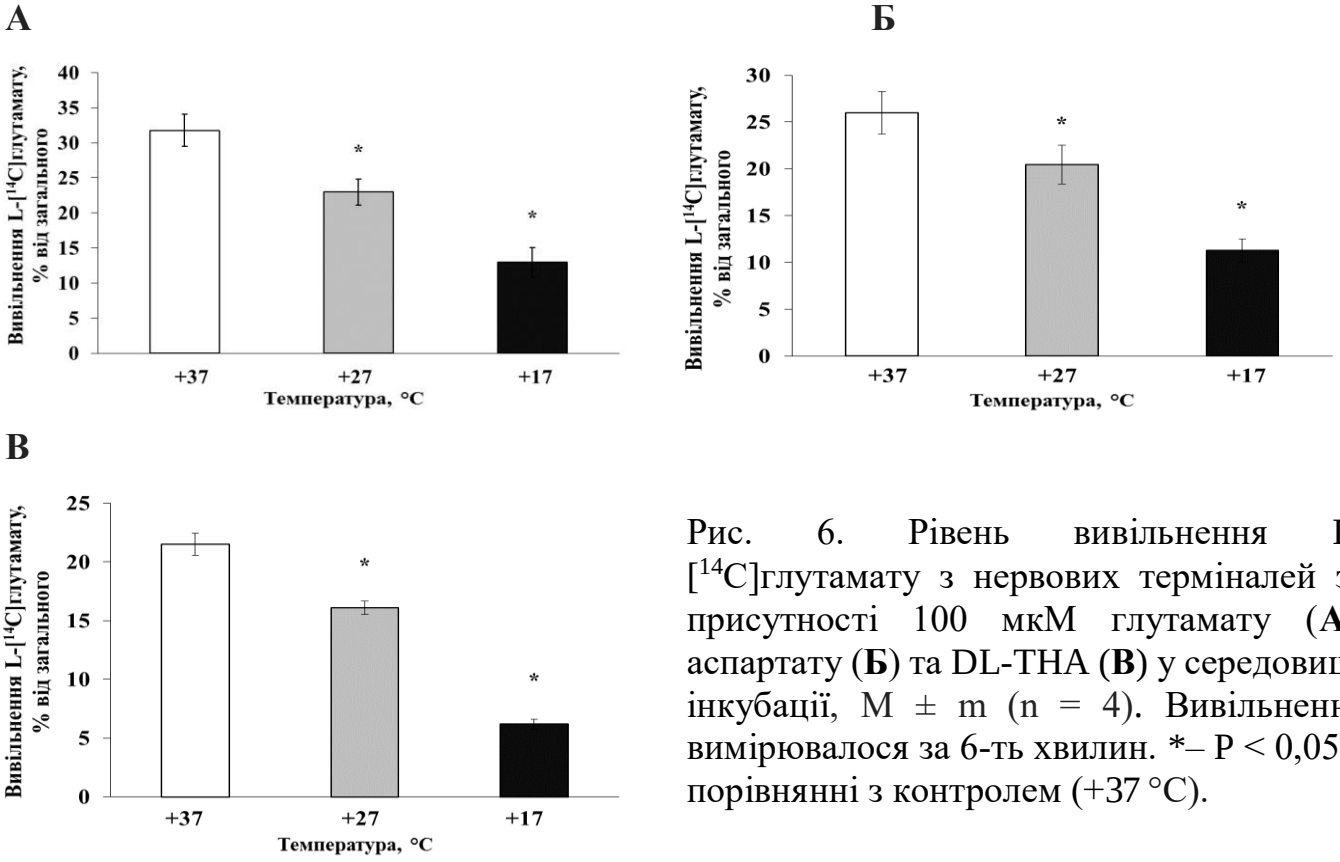


Рис. 6. Рівень вивільнення L-[^{14}C]глутамату з нервових терміналей за присутності 100 мкМ глутамату (**А**), аспартату (**Б**) та DL-THA (**В**) у середовищі інкубації, M ± m (n = 4). Вивільнення вимірювалося за 6-ть хвилин. *– P < 0,05 у порівнянні з контролем (+37 °C).

Можна стверджувати, що реакція нервових терміналей на надлишок позаклітинного глутамату (гомообмін), аспартату та DL-THA (гетерообмін) поступово зменшується від помірної до глибокої гіпотермії, тим самим запобігаючи подальшому зростанню позаклітинного рівня глутамату, і демонструючи нейропротекторну дію.

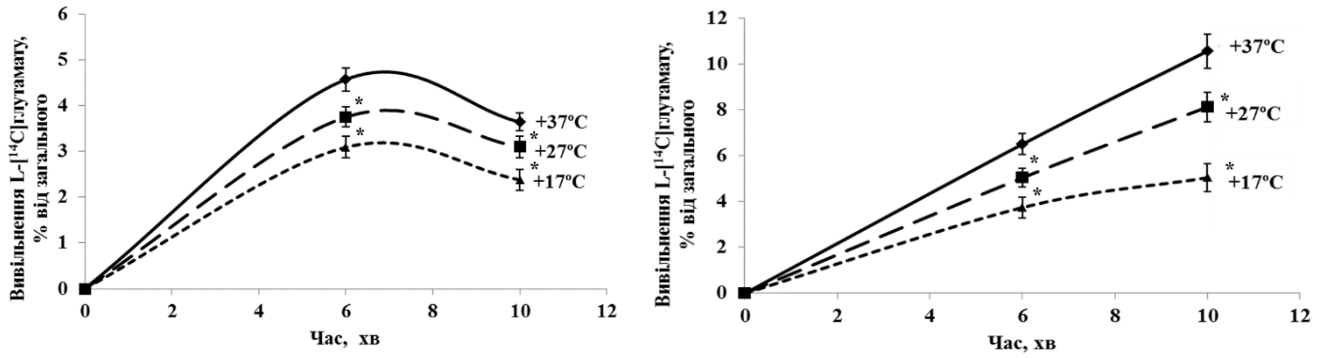
Отримані дані важливі для застосування у клінічній практиці для терапевтичного прогнозу, оскільки відображають як «здорові» нервові терміналі реагують на надлишок позаклітинного глутамату при зниженні температури. Якщо транслювати зазначені дані *in vivo*, надлишок глутамату може з'являтися за рахунок екзоцитозу

синаптичних везикул та патологічного викликаного гіпоксією транспортер-опосередкованого вивільнення з «уражених» нервових терміналей. Подібність у поступовому характері динаміки, спричинених гіпотермією змін гомо- та гетерообміну глутамату, до динаміки транспортер-опосередкованого вивільнення нейромедіатору з нервових терміналей підтверджує основний внесок компоненти реверсу транспортерів у гомо- та гетерообмін глутамату.

Вплив гіпотермії на функціонування пресинаптичних NMDA-, AMPA- та каїнатних рецепторів в нервових терміналях. Глутамат, концентрація якого не змінюється в синаптичній щілині за умов гіпотермії, здатний підтримувати активні синаптичні контакти. Водночас, при гіпотермії значно знижується швидкість функціонування рецепторів, що може порушити синаптичну передачу і спричинити побічні ефекти. У цьому контексті важливим показником є гіпотерміє-опосередковані зміни функціонування пресинаптичних NMDA-, AMPA-(α-аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонова кислота) та каїнатних рецепторів. Вони оцінювались шляхом вимірювання рівня вивільнення L-[^{14}C]глутамату з нервових терміналей, індукованого активацією цих рецепторів їхніми специфічними агоністами за умов помірної та глибокої гіпотермії.

NMDA-стимульоване (рис. 7, А) вивільнення L-[^{14}C]глутамату з синаптосом складало 4,57 ± 0,25 % від загального вмісту міченого глутамату за 6-ть хвилин у контролі (+37 ºС) та суттєво знижувалося за умов гіпотермії. Його рівень складав 3,75 ± 0,22 % від загального вмісту міченого глутамату при +27 ºС та 3,09 ± 0,23 % від загального вмісту міченого глутамату при +17 ºС.

А **Б**



В

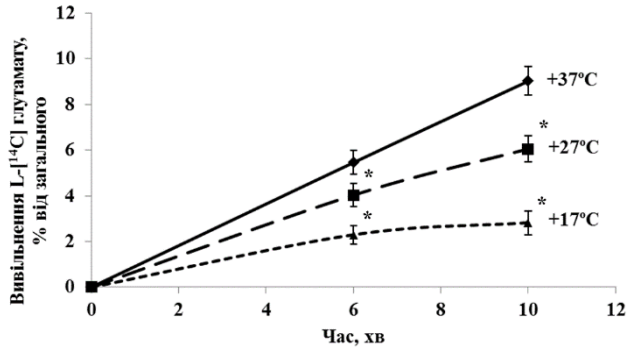


Рис. 7. Вивільнення L-[^{14}C]глутамату з нервових терміналей за умов гіпотермії, стимульоване 250 мкМ NMDA (**А**), AMPA (**Б**) та каїнатом (**В**) , M ± m (n = 4). Вивільнення вимірювалося за 6-ть та 10-ть хвилин при +37 °С, +27 °С та +17 °С. *– P < 0,05 у порівнянні з контролем (+37 °С).

AMPA-стимульоване (рис. 7, Б) вивільнення L-[^{14}C]глутамату з нервових терміналей у контролі складало 6,46 ± 0,37 % від загального вмісту міченого глутамату за 6-ть хвилин при температурі +37 ºС. За умов гіпотермії рівень AMPA-стимульованого вивільнення L-[^{14}C]глутамату значно знижувався і коливався від 4,96 ± 0,65 % до 3,72 ± 0,45 % від загального вмісту міченого глутамату відповідно при +27 ºС та +17 ºС.

Каїнат викликав вивільнення L-[^{14}C]глутамату із синаптосом, рівень якого у контролі (+37 ºС) за 6-ть хвилин складав 5,46 ± 0,52 % від загального вмісту міченого глутамату (рис. 7, В). Як і в ситуації з NMDA та AMPA, каїнат-стимульоване вивільнення L-[^{14}C]глутамату з синаптосом значно зменшувалось зі зниженням температури. Його рівень складав 4,02 ± 0,49 % та 2,28 ± 0,41 % від загального вмісту міченого глутамату відповідно при +27 ºС та +17 ºС.

Таким чином, рівень NMDA-стимульованого вивільнення L-[^{14}C]глутамату з нервових терміналей знижувався на 15 %, рівень AMPA-стимульованого вивільнення L-[^{14}C]глутамату – на 20 %, рівень каїнат-стимульованого вивільнення L-[^{14}C]глутамату – приблизно на 30 % при зниженні температури до +17 ºС.

Комбіноване застосування гіпотермії та леветирацетаму. Була проаналізована можливість комбінованого застосування гіпотермії та медичних препаратів, а саме: ефекти протисудомного препарату леветирацетаму та комбінованого застосування леветирацетаму і помірної та глибокої гіпотермії на позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату та вивільнення L-[^{14}C]глутамату з нервових терміналей, стимульоване активацією пресинаптичних іонотропних глутаматних рецепторів (вивільнення L-[^{14}C]глутамату, індуковане NMDA/AMPA/каїнатом). У експериментах використовували леветирацетам у концентрації 100 мкМ. Позаклітинний рівень глутамату визначався після інкубації з 100 мкМ леветирацетамом на 21-тій хвилині (15 хвилин преінкубації).

Позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату після преінкубації нервових терміналей складав 285,0 ± 8,0 пмоль/мг протеїну у контролі та 291,1 ± 8,8 пмоль/мг протеїну за присутності леветирацетаму. Таким чином, леветирацетам не впливав на позаклітинний рівень глутамату. Ці дані узгоджуються з результатами вимірів мембранного потенціалу синаптосом з використанням флуоресцентного зонду родаміну 6 G (рис. 8).

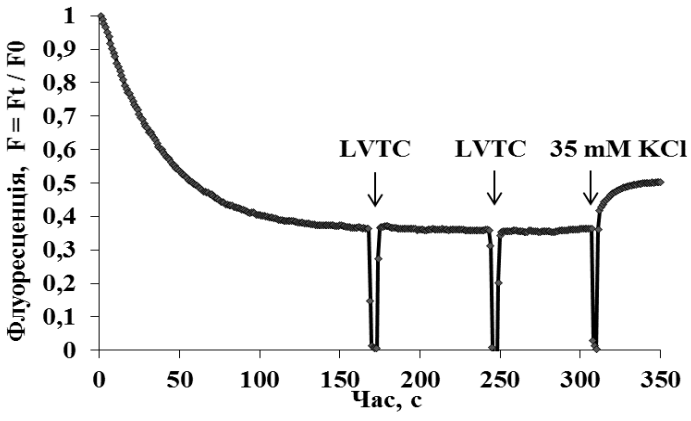


Рис. 8. Рівень мембранного потенціалу синаптосом при додаванні 100 мкМ леветирацетаму (кожна стрілка LVTC), визначений за допомогою потенціометричного флуоресцентного зонду родаміну 6 G.

Досліджували вплив леветирацетаму на вивільнення L-[^{14}C]глутамату з синаптосом за умов активації пресинаптичних іонотропних глутаматних рецепторів. Леветирацетам у концентрації 100 мкМ не впливав на AMPA- та каїнат-стимульоване вивільнення, але індукував збільшення вивільнення L-[^{14}C]глутамату з нервових терміналей, викликане активацією пресинаптичних NMDA-рецепторів. Цей ефект зберігався в умовах гіпотермії (рис. 9). NMDA у концентрації 250 мкМ викликав вивільнення L-[^{14}C]глутамату з нервових терміналей, яке складало 4,57 ± 0,25 % при +37 ºС у контролі та 7,14 ± 0,90 % від загального вмісту міченого глутамату після попередньої інкубації з 100 мкМ леветирацетамом. Рівень NMDA-стимульованого вивільнення L-[^{14}C]глутамату з нервових терміналей при +27 ºС складав 3,75 ± 0,22 % у контролі та 5,1 ± 0,5 % від загального вмісту міченого глутамату після попередньої інкубації з 100 мкМ леветирацетамом. При +17 ºС у контролі він дорівнював 3,09 ± 0,23 % від загального вмісту міченого глутамату та 4,32 ± 0,51 % від загального вмісту міченого глутамату після попередньої інкубації з 100 мкМ леветирацетамом. Леветирацетам у концентрації 100мкМ мав незначний вплив на AMPA- та каїнат-стимульоване вивільнення L-[^{14}C]глутамату з синаптосом при зниженій температурі.

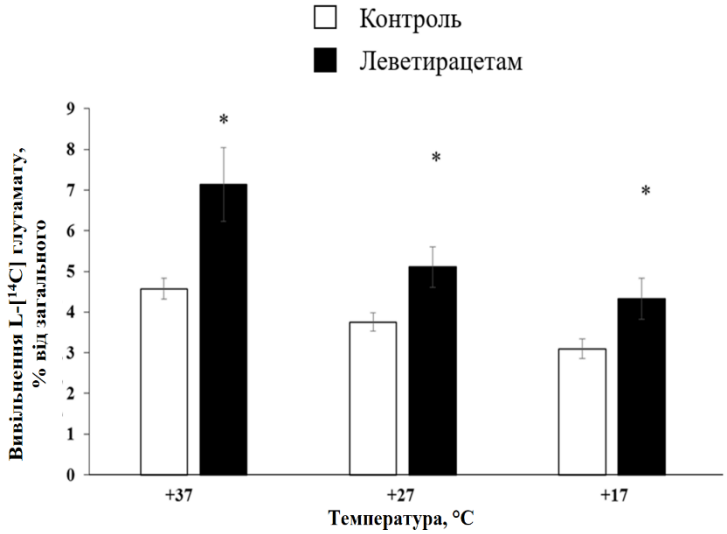


Рис. 9. Рівень NMDA-стимульованого вивільнення L-[^{14}C]глутамату після попередньої інкубації з 100 мкМ леветирацетамом у контролі (біла колонка, +37 ºС) та за присутності леветирацетаму (темна колонка) за умов гіпотермії (+27 ºС, +17 ºС) , M ± m (n = 4). *– P < 0,05 у порівнянні з контролем при відповідній температурі.

Комбіноване застосування гіпотермії та леветирацетаму наближає до норми NMDA-стимульоване вивільнення L-[^{14}C]глутамату з нервових терміналей. Коригування відповіді NMDA-рецепторів може стати у нагоді для забезпечення належного функціонування NMDA-рецепторів у сфері кардіохірургії та реабілітації після терапевтичної гіпотермії. Запропонований підхід є актуальним у випадках, коли гіпотермія застосовується не для запобігання ексайтотоксичності глутамату, як це трапляється під час інсульту, травм головного мозку та перинатальної гіпоксії.

Комбіноване застосування гіпотермії та метил-бета-циклодекстрина (МЦД). Спираючись на результати досліджень впливу МЦД (Borisova et al., 2010; Krisanova et al., 2012), було вивчено вплив комбінованого застосування гіпотермії та зниження рівня мембранного холестеролу на ключові характеристики нервової передачі.

На першому етапі оцінювався позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату у середовищі інкубації синаптосом після обробки МЦД за умов гіпотермії. При +37 °С на 14-тій хвилині після охолодження синаптосом він складав 267,0 ± 15,0 пмоль/мг протеїну у контрольних та 401,0 ± 23,0 пмоль/мг протеїну у МЦД-оброблених синаптосомах. При +27 °С – 224,0 ± 22,0 пмоль/мг протеїну у контрольних та 387,0 ± 27,0 пмоль/мг протеїну у МЦД-оброблених синаптосомах, а при +17 °С – 237,0 ± 29,0 пмоль/мг протеїну у контрольних та 376,0 ± 25,0 пмоль/мг протеїну у МЦД-оброблених синаптосомах (n = 4). Таким чином, позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату у препараті синаптосом значно підвищувався після обробки МЦД в умовах гіпотермії.

Комбіноване застосування МЦД та гіпотермії викликає значні зміни початкової швидкості накопичення L-[^{14}C]глутамату синаптосомами. Початкова швидкість накопичення L-[^{14}C]глутамату синаптосомами дорівнювала 2,50 ± 0,12 нмоль/(хв×мг протеїну) у контролі та 1,69 ± 0,15 нмоль/(хв×мг протеїну) у МЦД-оброблених синаптосомах при +37 °С, 2,04 ± 0,18 нмоль/(хв×мг протеїну) у контролі та 1,15 ± 0,20 нмоль/(хв×мг протеїну) у МЦД-оброблених синаптосомах при +27 °С, 1,44 ± 0,13 нмоль/(хв×мг протеїну) у контролі та 0,72 ± 0,14 нмоль/(хв×мг протеїну) у МЦД-оброблених синаптосомах при +17 °С ($P < 0,05$, $n = 4$).

Комбіноване застосування МЦД та гіпотермії викликає зміни не тільки початкової, а й загальної кількості накопиченого L-[^{14}C]глутамату синаптосомами. Загальне накопичення L-[^{14}C]глутамату синаптосомами у контрольних зразках за 10-ть хвилин складало 5,43 ± 0,31 нмоль/мг протеїну та 3,66 ± 0,21 нмоль/мг протеїну – у МЦД-оброблених при +37 °С, 4,11 ± 0,26 нмоль/мг протеїну у контролі та 2,33 ± 0,24 нмоль/мг протеїну у МЦД-оброблених синаптосомах при +27 °С, 3,19 ± 0,18 нмоль/мг протеїну у контролі та 1,58 ± 0,15 нмоль/мг протеїну у МЦД-оброблених синаптосомах при +17 °С ($P < 0,05$, $n = 4$).

Було досліджено вивільнення L-[^{14}C]глутамату з цитозольного пулу синаптосом за рахунок реверсного функціонування глутаматних транспортерів (транспортер-опосередковане вивільнення) та з везикулярного пулу шляхом екзоцитозу. Зниження рівня холестеролу у мембрані за рахунок преінкубації з 15 мМ МЦД призводило до зниження транспортер-опосередкованого вивільнення L-[^{14}C]глутамату (рис. 10, А). Рівень зазначеного вивільнення, виміряного за 6-ть хвилин, складав у контролі 12,0 ± 1,0 % від загального вмісту міченого глутамату при +37 °С та у МЦД-оброблених синаптосомах 7,0 ± 0,8 % від загального вмісту міченого глутамату; відповідно при +27 °С – 10,0 ± 0,5 % та 6,0 ± 0,7 % від загального вмісту міченого глутамату, а при +17 °С – 6,0 ± 0,5 % та 4,0 ± 0,5 % від загального вмісту міченого глутамату ($P < 0,05$, $n = 4$).

Подібна динаміка зниження спостерігалась і у процесі вивільнення L-[^{14}C]глутамату з синаптосом шляхом екзоцитозу (рис. 10, Б). Показники цього вивільнення, виміряні за 6-ть хвилин, складали при +37 °С у контролі 7,0 ± 1,0 % від загального вмісту міченого глутамату та 3,0 ± 0,4 % від загального вмісту міченого глутамату у МЦД-оброблених синаптосомах; при +27 °С – 6,0 ± 0,6 % від загального вмісту міченого глутамату та 2,0 ± 0,3 % від загального вмісту міченого глутамату у МЦД-оброблених синаптосомах; при +17 °С – 4,0 ± 0,4% від загального вмісту

міченого глутамату та 2,0 ± 0,3 % від загального вмісту міченого глутамату у МЦД-оброблених синаптосомах ($P < 0,05$, $n = 4$).

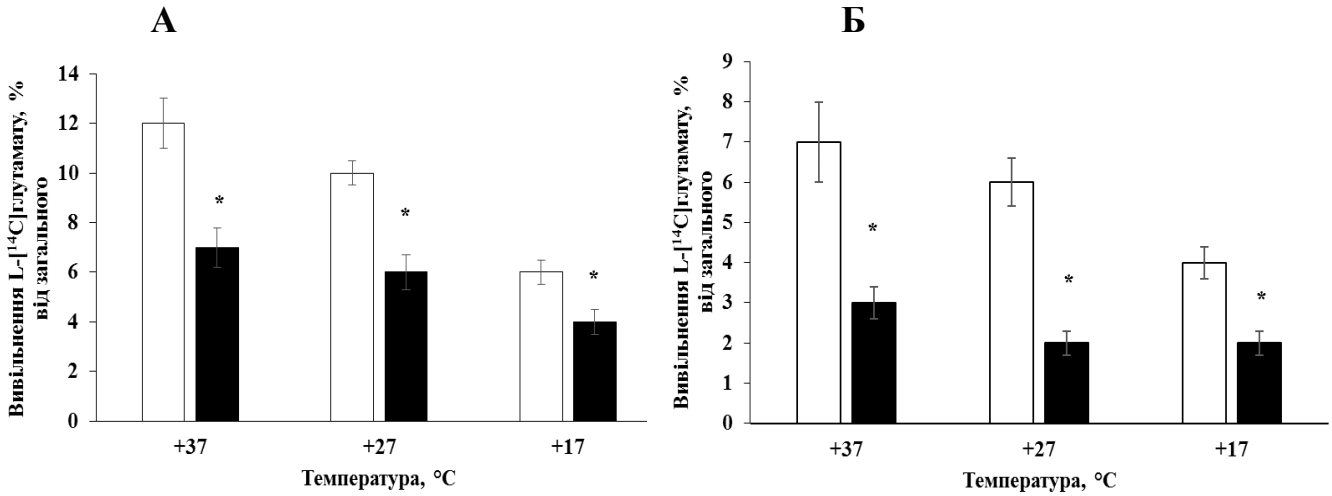


Рис. 10. Рівень транспортер-опосередкованого вивільнення (**А**) та стимульованого деполяризацією Ca^{2+}-залежного вивільнення (**Б**) L-[^{14}C]глутамату з нервових терміналей після попередньої інкубації з 15 мМ МЦД за умов гіпотермії. Синаптосоми без обробки МЦД (білий стовпчик) та синаптосоми, проінкубовані з 15 мМ МЦД (чорний стовпчик) , M ± m (n = 4).
* – P < 0,05 відносно контролю при відповідній температурі.

Таким чином, вивільнення L-[^{14}C]глутамату з везикулярного та цитозольного пулу синаптосом поступово зменшувалось за умови комбінованого застосування гіпотермії та МЦД. МЦД впливав на позаклітинний рівень глутамату, збільшуючи його. Одночасно відбувалось зменшення початкової швидкості накопичення та загальної кількості L-[^{14}C]глутамату у синаптосомах. Це свідчить, що збільшення позаклітинного рівня глутамату у препараті нервових терміналей після обробки МЦД є результатом зменшення початкової швидкості його накопичення.

Рівень транспортер-опосередкованого вивільнення глутамату з синаптосом при обробці МЦД за умов гіпотермії значно знижується, що підтверджується даними (Krisanova et al., 2012). Оскільки транспортер-опосередковане вивільнення глутамату з нервових терміналей призводить до розвитку нейротоксичності при церебральній гіпоксії/ішемії, інсульті, черепно-мозкових травмах, ми вважаємо, що комбіноване застосування зниження вмісту мембранного холестеролу та зниження температури може мати суттєвий нейропротекторний ефект при зазначених патологіях. Однак, ми наголошуємо, що, крім вищезгаданих патологічних станів, рівень мембранного холестеролу у клітинах без уражень повинен залишатися у нормі, оскільки кластеризація глутаматних транспортерів та їх транспорт на плазматичну мембрану залежить від рівня мембранного холестеролу, присутність якого надзвичайно важлива для нормальної синаптичної передачі. Зниження вмісту мембранного холестеролу у нервових терміналях може спричинити нейротоксичні наслідки через

зниження накопичення глутамату та, в свою чергу, збільшення концентрації позаклітинного глутамату.

Наступним етапом роботи було дослідження ефекту синтезованих маґгемітових наночастинок, кон'югованих з МЦД, та оцінка їхніх нейромодуляторних властивостей на накопичення та позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату у синаптосомах. Маґгеміт – це оксид заліза (γ-Fe_2O_3), який має феромагнітні властивості. Розмір цих наночастинок складав для γ-Fe_2O_3 8,8 нм, для МЦД-γ-Fe_2O_3 - 12 нм. Ці частинки здатні видаляти від 20 до 50 відсотків холестеролу у препараті синаптосом.

Дослідження продемонстрували, що наночастинки викликають значні зміни початкової швидкості накопичення L-[^{14}C]глутамату синаптосомами. Початкова швидкість накопичення L-[^{14}C]глутамату синаптосомами у контролі дорівнювала 2,50 ± 0,12 нмоль/(хв×мг протеїну), для МЦД-γ-Fe_2O_3 наночастинок показник складав 2,00 ± 0,12 нмоль/(хв×мг протеїну), а для γ-Fe_2O_3 наночастинок – 1,9 ± 0,1 нмоль/(хв×мг протеїну) при +37 °С (P < 0,05, n = 4).

Наночастинки викликали значні зміни загальної кількості накопиченого L-[^{14}C]глутамату синаптосомами. Загальне накопичення L-[^{14}C]глутамату синаптосомами при +37 °С за 10-ть хвилин складало у контролі 5,3 ± 0,3 нмоль/мг протеїну, для γ-Fe_2O_3 наночастинок – 4,0 ± 0,2 нмоль/мг, для МЦД-γ-Fe_2O_3 наночастинок – 4,5 ± 0,3 нмоль/мг (P < 0,05, n = 4).

Наночастинки γ-Fe_2O_3, як покриті, так і непокриті, значно впливали на початкову швидкість та загальну кількість накопичення L-[^{14}C]глутамату.

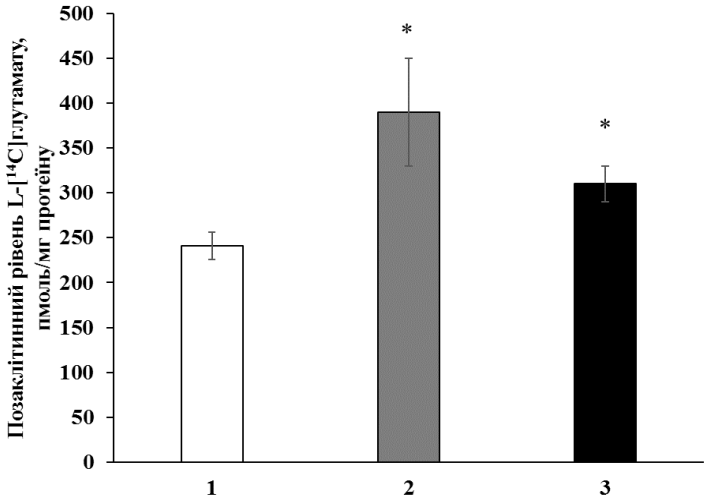


Рис. 11. Позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату у середовищі інкубації синаптосом за присутності МЦД-γ-Fe_2O_3 та γ-Fe_2O_3 наночастинок: 1 – контроль, 2 – МЦД-γ-Fe_2O_3, 3 – γ-Fe_2O_3, M ± m (n = 4). *– P < 0,05 у порівнянні з контролем.

Низька швидкість накопичення L-[^{14}C]глутамату часто супроводжується зростанням його позаклітинного рівня у препараті синаптосом, тому аналізували вплив наночастинок на зазначений показник. МЦД-γ-Fe_2O_3 наночастинки у концентрації 0,75 мг/мл викликали значні зміни позаклітинного рівня L-[^{14}C]глутамату в синаптосомах (рис. 11). Позаклітинний рівень глутамату складав 241,0 ± 15,0 пмоль/мг протеїну у контролі та 390,0 ± 60,0 пмоль/мг протеїну за присутності у середовищі інкубації МЦД-γ-Fe_2O_3 (P < 0,05, n = 4). МЦД-γ-Fe_2O_3 наночастинки значно підвищували позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату у середовищі інкубації синаптосом. Непокриті наночастинки такої ж концентрації

викликали збільшення позаклітинного рівня L-[^{14}C]глутамату, який складав 310,0 ± 20,0 пмоль/мг протеїну.

Таким чином, наночастинки γ-Fe_2O_3, як покриті, так і непокриті, значно впливали на позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату.

МЦД-γ-Fe_2O_3 наночастинки зменшували початкову швидкість накопичення L-[^{14}C]глутамату, загальну кількість накопичення та збільшували його позаклітинний рівень. Але, оскільки самі наночастинки без покриття мали аналогічний ефект, то у експериментах не було чітко доведено, що ці параметри змінюються лише за рахунок видалення холестеролу. Вочевидь, функція нервових терміналей була частково погіршена за рахунок збільшення позаклітинного рівня глутамату. В присутності наночастинок, нервові терміналі були неспроможні утримувати глутамат всередині та попередити витік внутрішньоклітинного глутамату у середовище інкубації. Наночастинки γ-Fe_2O_3 можуть впливати на плазматичну мембрану або навіть заповнювати синаптичні везикули, тим самим змінюючи функціональні властивості нервових терміналей. Це може бути пов'язано з фактом, що γ-Fe_2O_3 наночастинки менші за розміром порівняно з МЦД-γ-Fe_2O_3. Нашими дослідженнями було показано, що γ-Fe_2O_3 наночастинки без покриття можуть мати нейромодуляторні властивості, впливаючи на накопичення та позаклітинний рівень глутамату, тому ці властивості необхідно брати до уваги при подальшому застосуванні наночастинок у медицині.

Результати проведених досліджень свідчать, що гіпотермія є потужним неспецифічним нейропротекторним засобом. Її застосування для зниження транспортер-опосередкованого вивільнення глутамату з нервових терміналей, а також комбіноване застосування разом з медикаментозною корекцією дозволять зменшити наслідки гіпоксичних/ішемічних уражень мозку та забезпечити позитивний прогноз нормального функціонування нервової тканини.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вивчено вплив гіпотермії на Na^+-залежний транспорт глутамату та екзоцитоз у нервових терміналях головного мозку щурів. Отримані результати доводять механізми нейропротекторної дії гіпотермії у випадках інсульту, при гіпоксичних/ішемічних ураженнях головного мозку та можливість комбінованого застосування гіпотермії з протисудомним препаратом леветирацетамом та акцептором холестеролу МЦД для посилення нейропротекторного ефекту.

1. Помірна та глибока гіпотермія впливає на динаміку накопичення, тонічного вивільнення глутамату та екзоцитоз у нервових терміналях, однак не змінює його позаклітинний рівень.

2. Помірна та глибока гіпотермія ефективно знижує транспортер-опосередковане вивільнення глутамату з нервових терміналей та вивільнення через дисипацію протонного градієнту синаптичних везикул, які викликають розвиток нейротоксичності за умов гіпоксії/ішемії.

3. Зниження вивільнення глутамату з нервових терміналей, стимульоване активацією пресинаптичних іонотропних NMDA, AMPA та каїнатних рецепторів, та

пригнічення гомообміну і гетерообміну глутамату свідчить про ефективну нейропротекторну дію помірної та глибокої гіпотермії.

4. Протисудомний препарат леветирацетам призводить до збільшення NMDA-стимульованого, але не змінює AMPA- та каїнат-стимульоване вивільнення глутамату з нервових терміналей. Продемонстрована можливість коригування (пом'якшення) леветирацетамом індукованого гіпотермією зниження NMDA-стимульованого вивільнення глутамату з нервових терміналей, тобто проведена корекція відповіді NMDA-рецепторів за умов помірної та глибокої гіпотермії.

5. Зниження рівня холестеролу у нервових терміналях за умов помірної та глибокої гіпотермії призводить до подальшого зниження транспортер-опосередкованого вивільнення глутамату, що свідчить про посилення нейропротекторного ефекту.

6. Наночастинки маггеміту, покриті акцептором холестеролу МЦД, видаляючи холестерол з мембрани нервових терміналей, зменшують початкову швидкість накопичення і загальну кількість накопиченого глутамату та збільшують позаклітинний рівень нейромедіатору.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. ***Pastukhov A.***, *Borisova T.* Levetiracetam-mediated improvement of decreased NMDA-induced glutamate release from nerve terminals during hypothermia // **Brain Research.** – 2018. – Vol. 1699. – P. 69–78. *DOI*: 10.1016/j.brainres.2018.06.032 (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробці схеми досліджень, постановка експериментів, аналіз і обробка результатів, написання статті).*

2. ***Pastukhov A.***, *Borisova T.* Combined Application of Glutamate Transporter Inhibitors and Hypothermia Discriminates Principal Constituent Processes Involved in Glutamate Homo- and Heteroexchange in Brain Nerve Terminals // **Therapeutic hypothermia and temperature management**. – 2018. – Vol. 8. – P. 143–149. DOI: *10.1089/ther.2017.0047 (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробці схеми досліджень, постановка експериментів, аналіз і обробка результатів, написання статті).*

3. *Borisova T., Kucherenko D., Soldatkin O., Kucherenko I.,* ***Pastukhov A.****, Nazarova A., Galkin M., Borysov A., Krisanova N., Soldatkin A., El'skaya A.* An amperometric glutamate biosensor for monitoring glutamate release from brain nerve terminals and in blood plasma // **Analytica Chimica Acta**. – 2018. – Vol. 1022. – P. 113–123. *DOI: 10.1016/j.aca.2018.03.015 (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробці схеми досліджень, постановка експериментів, аналіз і обробка результатів).*

4. *Horák D., Beneš M., Procházková Z., Trchová M., Borysov A.,* ***Pastukhov A.****, Paliienko K., Borisova T.* Effect of O-methyl-β-cyclodextrin-modified magnetic nanoparticles on the uptake and extracellular level of l-glutamate in brain nerve terminals // **Colloids Surfaces B Biointerfaces**. – 2017. – Vol. 149. – P. 64–71. DOI:10.1016/j.colsurfb.2016.10.007 *(Особистий внесок здобувача: аналіз*

літературних джерел, участь у розробці схеми досліджень, постановка експериментів, аналіз і обробка результатів).

5. ***Пастухов А.О****., Крисанова Н.В., Борисова Т.О*. Дослідження транспорту глутамату в нервових закінченнях великих півкуль головного мозку щурів за умов помірної та глибокої гіпотермії // **Біологія тварин**. – 2017. **–** Т. 19. **–** № 4**. –** С. 50–58. DOI:10.15407/animbiol19.04.050 *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробці схеми досліджень, постановка експериментів, проведення аналізу вивільнення глутамату, обробка результатів, написання статті).*

6. ***Pastukhov A****., Krisanova N., Maksymenko V., Borisova T.* Personalized approach in brain protection by hypothermia: individual changes in non- pathological and ischemia-related glutamate transport in brain nerve terminals // ***EPMA J.*** – 2016. – Vol. 7. – P.1–26. DOI: 10.1186/s13167-016-0075-1 (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробці схеми досліджень, постановка експериментів, аналіз і обробка результатів).*

7. *Borisova T., Borysov A.,* ***Pastukhov A.****, Krisanova N.* Dynamic Gradient of Glutamate Across the Membrane: Glutamate/Aspartate-Induced Changes in the Ambient Level of L-[^{14}C]glutamate and D-[^{3}H]aspartate in Rat Brain Nerve Terminals **// Cell Mol. Neurobiol**. – 2016. – Vol. 36. – P. 1229–1240. *DOI: 10.1007/s10571-015-0321-4 (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробці схеми досліджень, постановка експериментів, аналіз і обробка результатів).*

8. ***Pastukhov A****., Borysov A., Galkin M., Paliienko K., Pozdnyakova N., Krisanova N., Dudarenko M., Babic M., Horak D., Lesiak A., Podhorodecki A., Borisova T.* Modulation of neuroactive properties of nanoparticles by protein biocorona // **«RECOOP 9th Annual Project Review Meeting»** Bratislava, Slovak Republic, April, 11-14, 2018. – P. 29.

9. *Horak D., Benes M., Prochazkova Z., Trchova M., Borysov A.,* ***Pastukhov A.****, Paliienko K., Galkin M., Borisova T.* Glutamate transport in presynaptic rat brain nerve terminals in the presence of O-methyl-β-cyclodextrin-modified magnetic nanoparticles // **«RECOOP 12th Bridges Annual Scientific Conference»** Budapest, Hungary, April, 7-8, 2017. – P. 49.

10. ***Pastukhov A****., Paliienko K., Borisova T.* Hypothermia as novel neuroprotective approach during long-term interplanetary space missions // «**17th Ukrainian Conference on Space Research»,** Odesa, Ukraine, August, 21–25, 2017. – P. 55.

11. ***Pastukhov A****., Krisanova N., Borisova T.* Deep vs. profound hypothermia: Discrimination of changes in non-pathological and pathological mechanisms of glutamate transport in brain nerve terminals // Materials of X Parnas Conference: Young scientists forum «**Molecules in living cells and innovative medicine»**, Wroclav, Poland, 10–12 July, 2016; published in Acta Biochimica Polonica. – 2016. – Vol. 63. – P. 21.

12. *Borysov A., Benes M., Prochazkova Z., Sivko R.,* ***Pastuhov A****., Borisova T., Horak D.* Modulation of cholesterol content of brain nerve terminals by cyclodextrin-coated maghemite nanoparticles // «**Bridges in Life sciences 10th Annual Scientific Conference»,** Wroclaw, Poland, April 16-19, 2015. – P. 28.

АНОТАЦІЯ

Пастухов А.О. Na^+-залежний транспорт глутамату та екзоцитоз в нервових терміналях головного мозку за умов гіпотермії. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2019.

Дисертація присвячена дослідженню модуляції Na^+-залежного накопичення та вивільнення глутамату, позаклітинного рівня останнього та екзоцитозу в нервових терміналях головного мозку щурів (синаптосомах) за умов помірної та глибокої гіпотермії.

Отримані дані засвідчили, що гіпотермія викликає зниження швидкості накопичення і загальну кількість накопиченого нейромедіатору та екзоцитозу у нервових терміналях, однак не змінює його позаклітинний рівень. В умовах моделювання патологічного стану помірна та глибока гіпотермія ефективно знижує вивільнення L-[^{14}C]глутамату з нервових терміналей через реверсну роботу глутаматних транспортерів. Зниження вивільнення глутамату з нервових терміналей, стимульоване активацією пресинаптичних іонотропних NMDA, AMPA та каїнатних рецепторів, та пригнічення гомообміну і гетерообміну глутамату свідчить про ефективну нейропротекторну дію помірної та глибокої гіпотермії.

Результати доводять механізми нейропротекторного ефекту гіпотермії у випадках інсульту, при гіпоксичних/ішемічних ураженнях головного мозку та можливість комбінованого застосування гіпотермії з протисудомним препаратом леветирацетам та акцептором холестеролу МЦД для посилення нейропротекторної дії.

Ключові слова: гіпотермія, іонотропні глутаматні рецептори, вивільнення глутамату, леветирацетам, метил-β-циклодекстрин, пресинаптичні нервові терміналі, синаптосоми.

SUMMARY

Pastukhov A.O. Na^+-dependent transport of glutamate and exocytosis in the brain nerve terminals under conditions of hypothermia. - Manuscript.

Thesis for a candidate degree in biological sciences in specialty 03.00.04 – Biochemistry. – Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine, Kyiv, 2019.

In the dissertation, the modulation of Na^+-dependent accumulation and release of glutamate, its extracellular level and exocytosis were studied using rat brain nerve terminals (synaptosomes) under conditions of moderate and deep hypothermia. The data showed that hypothermia decreased the initial rate of L-[^{14}C]glutamate uptake and accumulation and exocytotic release of L-[^{14}C]glutamate from nerve terminals.

Moderate and deep hypothermia effectively reduced pathological glutamate transporter reversal and release of L-[^{14}C]glutamate through dissipation of synaptic vesicle proton gradient in presence of FCCP.

Gradual dynamics of hypothermia-mediated decrease in synaptosomal L-[^{14}C]glutamate release evoked by the receptor agonists NMDA-, AMPA-, and kainate has been demonstrated that can be of value for the justification of optimal temperature regimes in therapeutic hypothermia. NMDA-induced L-[^{14}C]glutamate release from nerve terminals was higher in the presence of levetiracetam as compared to that without the drug. Despite levetiracetam effects decreased in hypothermia, combined application of hypothermia and levetiracetam resulted in higher NMDA-induced L-[^{14}C]glutamate release from nerve terminals as compared to that without the drug. These effects were not revealed for synaptosomal AMPA- and kainate-induced L-[^{14}C]glutamate release in the presence of levetiracetam at the similar concentration. Therefore, we first revealed that levetiracetam administration significantly mitigated a hypothermia-induced decrease in NMDA responses at the presynaptic level and can be used for the targeted neurocorrection to reduce side effects of therapeutic hypothermia in cardiac surgery. However, levetiracetam-mediated improvement of NMDA responses is not applicable in stroke, brain trauma and neonatal asphyxia therapies, where the main neuroprotective action of hypothermia is associated with prevention of damaging consequence of pre-existing acute glutamate exitotoxicity.

In addition, we have studied neuroprotective feature of combined approach of cholesterol depletion of the plasma membrane of nerve terminals using methyl-beta-cyclodextrin (MCD) and hypothermia. It was shown that pathological transporter-mediated release of glutamate after treatment of nerve terminals with MCD was significantly reduced under hypothermia conditions. So, combined approach of cholesterol depletion of the plasma membrane and hypothermia demonstrated additive neuroprotective effect.

The effect of MCD-conjugated γ-Fe_2O_3 nanoparticles on the release of L-[^{14}C]glutamate from nerve terminals under hypothermia has been investigated. It has been demonstrated that MCD-conjugated nanoparticles reduced the initial rate of uptake and accumulation of L-[^{14}C]glutamate by nerve terminals, and increased the extracellular level of L-[^{14}C]glutamate. However, uncoated γ-Fe_2O_3 nanoparticles also have neuromodulatory effects in nerve terminals influencing uptake and the extracellular level of L-[^{14}C]glutamate, so it was not confirmed that these parameters were changed through cholesterol removal only.

Thus, in the dissertation work the influence of hypothermia on Na^+-dependent transport of glutamate and exocytosis in the nerve terminals was studied. The obtained results proved mechanisms of neuroprotective effects of hypothermia in stroke, hypoxic/ischemic brain lesions and it was demonstrated that combined application of hypothermia and levetiracetam, and MCD in medicine can enhance neuroprotective effects.

Key words: hypothermia, ionotropic glutamate receptors, glutamate release, levetiracetam, methyl-β-cyclodextrin, presynaptic nerve terminals, synaptosomes.