

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О.В. ПАЛЛАДИНА**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ПАСТУХОВ АРТЕМ ОЛЕГОВИЧ

УДК 612.822:612.59:577.31

ДИСЕРТАЦІЯ

**Na⁺-залежний транспорт глутамату та екзоцитоз в нервових терміналях
головного мозку за умов гіпотермії**

03.00.04 – біохімія

Подається на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ А.О.Пастухов

Науковий керівник:
доктор біологічних наук, професор
Борисова Тетяна Олександрівна

Київ-2019

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 (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.04 – біохімія, Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2019.

Незважаючи на значну кількість праць, присвячених вивченню впливу гіпотермії, лише у останній час продемонстровано, що навіть незначне зменшення температури тіла може попередити загибель нервових клітин за патологічних умов. Терапевтична гіпотермія успішно застосовується в медицині, зокрема, в процедурах «призупиненої анімації» – свого роду уповільненні або зупинці певних метаболічних процесів без летальних наслідків, в кардіохірургії, як нейропротектора в умовах гіпоксичних/ішемічних уражень мозку, гіпоксичної/ішемічної енцефалопатії новонароджених, у випадках інсульту, травм головного та спинного мозку.

Глутамат, або глутамінова кислота, – один з основних збуджуючих нейромедіаторів центральної нервової системи хребетних тварин. Цей нейромедіатор, зокрема, бере участь у процесах розпізнавання, пам'яті, навчання тощо. Порушення транспорту глутамату є характерною рисою патогенезу майже всіх нейрологічних захворювань. Відомо, що 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. То ж аналіз впливу низьких температур на динаміку накопичення та вивільнення глутамату в нервових терміналях головного мозку є актуальним завданням сучасної нейрохімії та медицини, вирішення якого створить біохімічне підґрунтя та відкриє шляхи до подолання нейрологічних розладів.

У дисертаційній роботі досліджувалась модуляція Na^+ -залежного накопичення та вивільнення глутамату, позаклітинного рівня останнього та екзоцитозу в нервових терміналях головного мозку (синаптосомах) в умовах помірної та глибокої гіпотермії.

Отримані дані засвідчили, що гіпотермія викликає зниження початкової швидкості накопичення глутамату, загальної кількості накопиченого глутамату та його вивільнення шляхом екзоцитозу.

Вперше показано, що помірна та глибока гіпотермія ефективно знижує транспортер-опосередковане вивільнення глутамату з нервових терміналей, стимульоване деполяризацією плазматичної мембрани та дисипацією протонного градієнта синаптичних везикул, – механізму, що викликає розвиток нейротоксичності за умов гіпоксії/ішемії.

Про ефективну нейропротекторну дію помірної та глибокої гіпотермії свідчить суттєве зниження вивільнення глутамату з нервових терміналей головного мозку, стимульоване активацією пресинаптичних іонотропних NMDA, AMPA та кайнатних глутаматних рецепторів, та пригнічення гомообміну глутамату.

Проте показано, що помірна та глибока гіпотермія не змінює позаклітинний рівень глутамату у нервових терміналях, однак виявлений індивідуальний характер змін у цьому рівні, що вказує на необхідність проведення нейромоніторингу під час її терапевтичного застосування.

Вперше доведено, що протисудомний препарат леветирацетам призводить до збільшення NMDA-стимульованого, але водночас не змінює AMPA- та кайнат-стимульоване вивільнення глутамату з нервових терміналей.

Вперше продемонстрована можливість коригування (пом'якшення) леветирацетамом гіпотермія-індукованого зниження NMDA-стимульованого вивільнення глутамату з нервових терміналей, тобто проведена корекція відповіді NMDA-рецепторів для зменшення побічних ефектів помірної та глибокої гіпотермії, що може бути використано у медицині.

Вперше вивчено можливість та ефективність комбінованого нейропротекторного підходу зменшення рівня мембранного холестеролу нервових терміналей за допомогою метилциклодестрина (MCD) та гіпотермії. Отримані результати свідчать, що MCD впливає на позаклітинний рівень глутамату, збільшуючи його. Разом з тим відбувається зменшення швидкості екзоцитозу та накопичення глутамату. Збільшення позаклітинного рівня глутамату після обробки MCD є результатом значного підвищення нестимульованого вивільнення глутамату та зменшення його початкової швидкості накопичення.

Рівень транспортер-опосередкованого вивільнення глутамату при обробці MCD в умовах гіпотермії значно знижується. Тобто, 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 гіпотермії.

Таким чином, у дисертаційній роботі вивчено вплив помірної та глибокої гіпотермії на Na^+ -залежний транспорт глутамату та екзоцитоз у нервових терміналях головного мозку щурів. Отримані результати доводять значний нейропротекторний ефект гіпотермії та визначають механізми її дії на рівні пресинаптичної нервової терміналі. Індивідуальний для кожного організму характер змін у позаклітинному рівні глутамату в нервових терміналях за умов гіпоксії вказує на необхідність проведення детального нейромоніторингу під час її застосування у терапії нейро- та кардіопатологій. Визначена нейрохімічна платформа диверсифікації використання терапевтичної помірної та глибокої гіпотермії для попередження неврологічних наслідків інсульту. Продемонстрована можливість застосування комбінованої гіпотермії у комплексі з протисудомним препаратом леветирацетам та акцептором холестеролу MCD для посилення нейропротекторної дії.

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

ABSTRACT

Pastukhov A.O. Na⁺-dependent transport of glutamate and exocytosis in the brain nerve terminals under conditions of hypothermia. Qualification scientific work on the rights of manuscripts

Thesis for a candidate degree in biological sciences (doctor of philosophy) in specialty 03.00.04 – biochemistry, Institute of Biochemistry them. O.V. Palladin NAS of Ukraine, Kyiv, 2018.

Despite a large number of studies devoted to the study of hypothermia effects, only recently it has been demonstrated that even a slight decrease in body temperature can prevent the death of nerve cells under pathological conditions. Therapeutic hypothermia is successfully used in medicine, in particular, in procedures of "paused animation" - a kind of slowing down or stopping certain metabolic processes without lethal consequences, in cardiac surgery, as a neuroprotector in conditions of hypoxic / ischemic brain damage, hypoxic / ischemic encephalopathy of newborns, in cases of stroke, injuries of the brain and spinal cord.

Glutamate, or glutamic acid, is one of the major excitatory neurotransmitters of the central nerve system of vertebrate animals. This neurotransmitter, in particular, participates in the processes of recognition, memory, training, etc. Disturbance of glutamate transport is a characteristic feature of almost all neurological diseases pathogenesis. It is known that uncontrolled increase in transporter-mediated and tonic release of glutamate from nerve cells and increase of its extracellular level is one of the main factors that leads to the development of neurotoxicity due to the stroke. Low temperatures influence on the dynamics of glutamate accumulation and release in brain nerve terminals is an urgent task of

modern neurochemistry and medicine, the solution of which will create a biochemical basis and will open the way to overcoming neurological disorders.

In the dissertation the modulation of Na⁺-dependent accumulation and glutamate release, its extracellular level and exocytosis in brain nerve terminals (synaptosomes) under conditions of moderate and deep hypothermia was studied.

The obtained data showed that hypothermia caused a decrease in the initial rate of glutamate accumulation, the total amount of accumulated glutamate and its release through exocytosis.

It has been shown for the first time that moderate and deep hypothermia effectively reduces transporter-mediated release of glutamate from nerve terminals, stimulated by plasma membrane depolarization and dissipation of synaptic vesicles proton gradient, a mechanism that causes the development of neurotoxicity under hypoxia / ischemia.

An effective neuroprotective effect of moderate and deep hypothermia is demonstrated by a significant reduction in the release of glutamate from brain nerve terminals stimulated by the activation of presynaptic ionotropic NMDA, AMPA and kainate glutamate receptors, and the suppression of glutamate homoexchange.

However, it has been shown that moderate and deep hypothermia does not alter the glutamate extracellular level in nerve terminals, an individual character of changes at this level has been identified, indicating the need for neuromonitoring during its therapeutic use.

It has been shown for the first time that an anticonvulsant drug levetiracetam leads to an increase in NMDA-stimulated, but at the same time does not alter AMPA- and kainate-stimulated release of glutamate from nerve terminals.

For the first time, the possibility of correction (mitigation) by levetiracetam of hypothermia-induced reduction of NMDA-stimulated release of glutamate from nerve terminals has been demonstrated, that is, an adjustment of the NMDA receptor response to reduce side effects of moderate and deep hypothermia that can be used in medicine.

For the first time, the possibility and effectiveness of a combined neuroprotective approach to the cholesterol decreasing from the plasma membrane of nerve terminals with the help of methylcyclodextrin (MCD) and hypothermia was studied. The obtained results indicate that MCD affects the extracellular level of glutamate by increasing it. However, there is a decrease in the rate of exocytosis and accumulation of glutamate. An increase in the extracellular level of glutamate after treatment with MCD is due to a significant increase in unstimulated glutamate release and a decrease in its initial rate of accumulation.

The level of transporter-mediated glutamate release during treatment of MCD under hypothermia is significantly reduced. That is, the decreasing of cholesterol from nerve terminals in moderate and deep hypothermia leads to a further decrease in glutamate transporter-mediated release, indicating an increase in neuroprotective effect of hypothermia.

Thus, the effect of moderate and deep hypothermia on Na⁺-dependent transport of glutamate and exocytosis in brain nerve terminals was studied in the dissertation. The obtained results prove significant neuroprotective effect of hypothermia and determine the mechanisms of its action at the level of the presynaptic nerve terminal. Individual character of changes to each organism in the extracellular level of glutamate in the nerve terminals in hypothermia indicates the need of detailed neuromonitoring during its use in the treatment of excitotoxicity and cardiopathology. The neurochemical platform for diversification of therapeutic application of moderate and deep hypothermia for the prevention of stroke excitotoxic outcomes was determined. The possibility of application of hypothermia in combination with an antiepileptic drug levetiracetam and an acceptor of cholesterol MCD for strengthening the neuroprotective action/

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

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЙНОЇ РОБОТИ

Статті:

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-[¹⁴C]glutamate and D-[³H]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*).

Тези:

1. **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.

2. 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.
3. **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.
4. **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.
5. 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.

Зміст

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	15
Вступ.....	17
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	24
Глутамат, його роль у процесі нейропередачі	24
1.1. Глутамат – основний збуджуючий нейромедіатор центральної нервової системи ссавців	24
1.2. Потрапляння глутамату з крові до нервових клітин.....	25
1.3. Глутамат-цистеїновий обмінник.....	27
1.4. Синапс	28
1.5. Глутаматні транспортери	31
1.6. Везикулярні транспортери.....	34
1.7. Глутаматні рецептори	36
1.8. Синаптична пластичність.....	40
1.9. Терапевтична гіпотермія	42
1.10. Інсульт та моделі його вивчення	44
1.11. Комбіноване застосування ліків та гіпотермії	47
1.12. Холестерол, його роль в процесі нейротрансмісії та наслідки його видалення	50
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	55
2.1. Об'єкти дослідження.....	55
2.2. Реактиви, застосовані у дослідженнях	55
2.3. Виділення препарату нервових терміналей	56
2.4. Зниження вмісту холестеролу у синаптосомах	56

2.5. Визначення розміру синапсом методом фотонної кореляційної спектроскопії.....	57
2.6. Визначення накопичення глутамату синапсами	58
2.7. Визначення вивільнення глутамату синапсами	59
2.8. Визначення потенціалу плазматичної мембрани синапсом	60
2.9. Експерименти з використанням MCD-кон'югованих наночастинок	61
2.10. Обробка експериментальних результатів з використанням методів математичної статистики	62
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	63
3.1. Експериментальні підходи для аналізу ключових характеристик нейропередачі за умов норми та гіпоксії	63
3.1.1. Визначення розміру синапсом за умов гіпотермії методом фотонної кореляційної спектроскопії	66
3.1.2. Нестимульоване (тонічне) вивільнення глутамату з синапсом за умов гіпотермії	68
3.1.3. Транспорт-опосередковане накопичення глутамату нервовими терміналами за умов гіпотермії.....	69
3.1.4. Рівень позаклітинного L-[¹⁴ C]глутамату у препаратах нервових терміналей за умов гіпотермії.....	71
3.2. Вивільнення глутамату з нервових терміналей за умов нейропатологій	75
3.2.1. Транспорт-опосередковане вивільнення глутамату з нервових терміналей за умов гіпотермії.....	75
3.2.2. Протонофор-стимульоване вивільнення глутамату з нервових терміналей за умов гіпотермії	77
3.3. Гомо- та гетерообмін глутамату.....	82

3.3.1. Глутамат-індуковане вивільнення L-[¹⁴ C]глутамату з нервових терміналей за умов гіпотермії	83
3.3.2. Аспартат-індуковане вивільнення L-[¹⁴ C]глутамату з нервових терміналей за умов гіпотермії	85
3.3.3. DL-ТНА-індуковане вивільнення L-[¹⁴ C]глутамату з нервових терміналей за умов гіпотермії	86
3.4. Комбіноване застосування гіпотермії та протисудомного препарату леветирацетаму	90
3.4.1. Позаклітинний рівень L-[¹⁴ C]глутамату у препараті нервових терміналей у присутності леветирацетаму.....	90
3.4.2. Транспорт-опосередковане накопичення L-[¹⁴ C]глутамату нервовими терміналями у присутності леветирацетаму	95
3.4.3. Вплив леветирацетаму на NMDA-, АМРА- та кайнат-стимульоване вивільнення L-[¹⁴ C]глутамату з нервових терміналей	96
3.4.4. Позаклітинний рівень L-[¹⁴ C]глутамату у середовищі інкубації синапсом за присутності леветирацетаму за умов гіпотермії.....	99
3.4.5. Вивільнення L-[¹⁴ C]глутамату з нервових терміналей шляхом активації іонотропних глутаматних рецепторів за умов гіпотермії.	100
3.4.6. NMDA-стимульоване вивільнення L-[¹⁴ C]глутамату з нервових терміналей за умов комбінованої дії гіпотермії та леветирацетаму	104
3.5. Комбінована нейропротекція шляхом зменшення рівня мембранного холестеролу та гіпотермії.....	111
3.5.1. Вплив МСД на позаклітинний рівень L-[¹⁴ C]глутамату у середовищі інкубації синапсом за умов гіпотермії.....	111

3.5.2. Накопичення L-[¹⁴C]глутамату синаптосомами за присутності MCD та за умов гіпотермії	113
3.5.3. Транспортер-опосередковане вивільнення L-[¹⁴C]глутамату у середовищі інкубації синаптосом за присутності MCD та за умов гіпотермії	115
3.6. Застосування наночастинок для зниження вмісту холестеролу у мембрані	119
3.6.1. Накопичення L-[¹⁴C]глутамату у середовищі інкубації синаптосом за присутності наночастинок, кон'югованих з MCD ...	119
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	125
ВИСНОВКИ	131
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	133
Додаток	161

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- AMPA** (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) – α -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонова кислота;
- АТФ** (adenosine triphosphate) – аденозинтрифосфорна кислота;
- DL-ТВОА** (DL-threo- β -benzyloxyaspartate) – DL-трео- β -бензилоксіаспартат;
- DL-ТНА** (DL-threo- β -hydroxyaspartate) – DL-трео- β -гідроксіаспартат;
- ЕААС** (excitatory amino acid carrier) – переносник збуджуючих амінокислот;
- ЕААТ** (excitatory amino acid transporter) – транспортер збуджуючих амінокислот;
- EDTA** (ethylenediaminetetraacetic acid) – етилендіамінтетраоцтова кислота;
- EGTA** (ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) – етиленглікольтетраоцтова кислота;
- ФССР** (carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone) – карбоніл ціанід-4- (трифторметокси) фенілгідрозон;
- GABA_A** – іонотропні ГАМК_A-рецептори
- GLAST** (L-glutamate/L-aspartate transporter) – тривіальна назва ЕААТ1;
- GLT** (glutamate transporter) – тривіальна назва ЕААТ2;
- HEPES** (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) – 4-(2-гідроксіетил) -1-піперазинетансульфонова кислота;
- HMGR** – 3-гідрокси-3-метилглутарил-коензим А-редуктаза;
- LVTC** – леветирацетам (2S-(2-оксо-пірролідін-1)-бутанамід)
- MCD** (methyl- β -cyclodextrin) – МЦД (метил- β -циклодекстрин);
- NMDA** (N-methyl-D-aspartic acid) – N-метил-D-аспартат;
- SNARE** (SNAP RECEPTOR) (soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein) – білок, що приймає участь в останньому етапі екзоцитоза – злитті мембран;
- Tris** (tris(hydroxymethyl)methylamine) – тріс(гідроксиметил)метиламін;

VGLUT-везикулярні транспортери глутамату

АО – акридиновий оранжевий;

ГАМК – γ -аміномасляна кислота.

Вступ

Актуальність теми. Глутамат, або глутамінова кислота, – один з основних збуджуючих нейромедіаторів центральної нервової системи хребетних тварин. Цей нейромедіатор, зокрема, бере участь у процесах розпізнавання, пам'яті, навчання тощо [1]. Порушення транспорту глутамату є характерною рисою патогенезу майже всіх нейрологічних захворювань [2, 3]. Тривале підвищення концентрації глутамату в синаптичній щілині призводить до надмірної стимуляції глутаматних рецепторів і, як наслідок, зумовлює розвиток нейротоксичності та загибель нейронів. Відомо, що неконтрольоване збільшення транспортерзалежного та тонічного вивільнення глутамату з нервових клітин та підвищення його позаклітинного рівня є одним з основних факторів, який призводить до розвитку нейротоксичності внаслідок інсульту [4, 5]. Для попередження наслідків останнього у хірургії широко використовується гіпотермія [6–10]. 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.

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 нейрхімії та медицини, вирішення яких створить біохімічне підґрунтя та відкриє шляхи до подолання наслідків нейрологічних розладів.

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 є надзвичайно чутливою до змін концентрації мембранного холестеролу. Останній призводить до переміщення/інтерналізації рецепторів нейромедіаторів, перерозподілу білкових молекул, залучених до екзоцитозу, модуляції активності потенціалзалежних кальцієвих і калієвих каналів та специфічних транспортерів нейромедіаторів плазматичної мембрани. В умовах нейропатологій, таких як ішемічні/гіпоксичні ураження головного мозку, що супроводжуються збільшенням транспортер-опосередкованого вивільнення глутамату з нервових терміналей, зниження рівня холестеролу має нейропротекторний ефект [11–13]. Транспортер-опосередковане вивільнення глутамату зменшується в синаптосомах зі зниженням рівня холестеролу в мембрані. Одночасна температурозалежна модуляція та модуляція ліпідного складу мембрани з метою регуляції глутаматергічної нейротрансмісії становить істотний інтерес з точки зору сучасної медицини як і комбіноване застосування лікарських засобів та гіпотермії [14]. Серед таких препаратів – леветирацетам, 2*S*-(2-оксо-пірролідін-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, зменшення її побічних ефектів і подовження часу застосування [15].

Вирішення питання, яким чином гіпотермія впливає на ключові характеристики глутаматергічної нейропередачі та можливість комбінованого застосування неспецифічних факторів модулювання транспорту глутамату в нервових терміналях, – актуальна фундаментальна та практична задача сучасної нейрохімії.

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 наноконструкції залізних та кальцій карбонатних наночастинок з наночастинами 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 дослідити модуляцію Na^+ -залежного накопичення та вивільнення, а також позаклітинного рівня глутамату та екзоцитозу в нервових терміналях головного мозку за умов помірної та глибокої гіпотермії.

Відповідно до вказаної мети були поставлені такі 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 -циклодесктрину (МЦД) та гіпотермії на нервові терміналі.
6. З'ясувати можливість використання магнетитових 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. Для вирішення поставлених задач було використано методи препаративної біохімії; метод лазерної кореляційної спектроскопії для порівняльної характеристики розміру нервових закінчень за умов зміни 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 синапсом 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.

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 зі 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 найменувань. Дисертацію викладено на 163 сторінках машинописного тексту. Фактичний матеріал дисертації подано у вигляді 37 рисунків.

Дисертант висловлює щире подяку науковому керівнику, професору, доктору біологічних наук Тетяні Олександрівні Борисовій за наукове керівництво, цінні методичні рекомендації під час проведення дослідів, допомогу і підтримку в написанні статей і дисертаційної роботи; старшому науковому співробітнику лабораторії оптичних методів дослідження О.Ю. Чуніхіну за допомогу у проведенні вимірів, Крисановій Н.В., Сівко Р.В., Касаткіна Л.О., Крупко О.О., Дударенко М.В., Палієнко К.О. за наукові поради, всім співробітникам відділу нейрохімії за допомогу у роботі.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Глутамат, його роль у процесі нейропередачі

1.1. Глутамат – основний збуджуючий нейромедіатор центральної нервової системи ссавців

Глутамінова кислота (глутамат) – це основний збуджуючий нейромедіатор в центральній нервовій системі ссавців [16]. Цей факт був встановлений лише у середині 80-х років минулого століття, оскільки глутамат, сам по собі, залучений у численних метаболічних процесах [17, 18]. Крім того, глутамат є найпоширенішою амінокислотою у нервовій тканині головного мозку, де його концентрація коливається від 5 до 15 мМоль/кг нервової тканини мозку [19]. Концентрація позаклітинного глутамату у нервовій тканині мозку коливається у межах 0,2 – 7 мкМоль [20, 21]. Треба відзначити, що концентрація глутамату всередині та ззовні нервової клітини знаходиться у динамічній рівновазі, оскільки нейромедіатор постійно вивільняється та захоплюється.

Глутамат відіграє головну роль у основних інформаційних потоках людини. З ним пов'язані сенсорні процеси (зір та слух), процеси навчання, запам'ятовування та розумового розвитку [2, 22]. Цей нейромедіатор надзвичайно важливий для регуляції розвитку нервової системи [2], модуляції нейрональної міграції [22], синаптичної пластичності [23], активності ГАМК-ергічної системи [24], формування функціональних синапсів і довгострокової потенціації. Значний масив даних свідчить про різнобічну роль глутамату у периферичних органах і тканинах [2]. Глутамат відіграє важливу сигнальну роль у активації рецепторів смаку, рецепторів уамі, формуючих смак збагаченої протеїнами їжі [25]. Іонотропні та метаботропні глутаматні рецептори знайдені на внутрішній поверхні шлунку [26]. Тромбоцити експресують нейрональні та гліальні глутаматні

транспортери плазматичної мембрани та везикулярні транспортери мембрани секреторних гранул [27].

1.2. Потрапляння глутамату з крові до нервових клітин

Основна маса глутамату потрапляє у нервові клітини не за рахунок його проходження через гематоенцефалічний бар'єр, а іншими шляхами. На модельних тваринних об'єктах було продемонстровано, що при середній концентрації глутамату 95 мкМоль/літр у плазмі крові його проникність складає лише 0,67 нМоль глутамату/(хвилина×грам) [28]. Цей показник у 5–10 разів нижчий порівняно з іншими амінокислотами. Наприклад, для тирозину при концентрації 63 мкМоль/літр, проникність дорівнює 4,1 нМоль/(хвилина×грам) [29].

Субстратом для синтезу глутамату виступає глюкоза плазми крові, яка потрапляє до клітин мозку через родину глюкозних транспортерів (GLUTs), локалізованих на астроцитах, нейронах, ендотеліальних клітинах [30]. Транспортована кров'ю глюкоза з кровотоку через гематоенцефалічний бар'єр надходить до астроцитів для початкового обміну речовин, де перетворюється на глікоген або піруват (рис.1.1.). У подальшому піруват або залучається до процесів циклу трикарбонових кислот (САС) як ацетил-коензим А, або перетворюється на лактат, який надходить до нейронів за допомогою монокарбоксилатних транспортуючих молекул (MCTs) [31]. Вважають, що саме лактат є основним метаболічним субстратом для нейронів, у той час як глюкоза, здебільшого, використовується астроцитами [32]. Лактат у нейронах перетворюється у піруват, піруват у циклі Кребса перетворюється на α -кетоглутарат, а останній за допомогою глутаматдегідрогенази перетворюється на глутамат. Глутамін астроцитів є важливим субстратом для глутамату в нейронах. Внутрішньоклітинний глутамат накопичується у везикулах завдяки везикулярним глутаматним транспортерам (VGLUTs) [33]. Частина глутамату в астроцитах може

перетворюватися у глутамін. Перетворення глутамату в глутамін каталізується АТФ-залежним ферментом глутамінсинтетазою [34]. Глутамін вивільнюється у позаклітинний простір завдяки натрій-нейтральним глутаматним транспортерам SN1 (SNAT3) [35] та SN2 (SNAT5) [36], а з позаклітинного простору глутамін транспортується до нервових клітин через мембрану за допомогою транспортерів родини А (SAT1 та SAT2) [37].

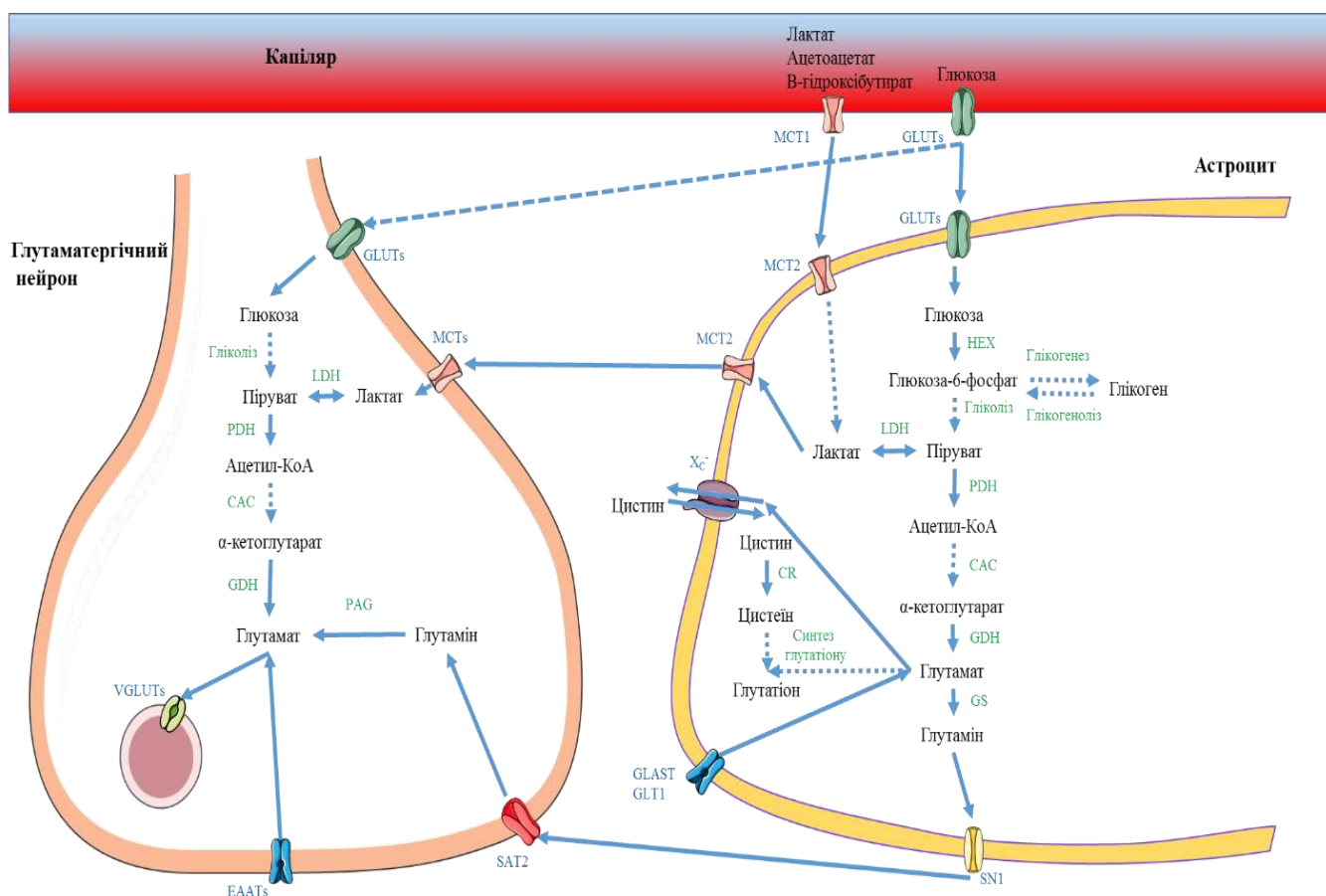


Рис. 1.1. Схема потрапляння глутамату до клітин нервової тканини мозку, де: GLUT – транспортери глюкози; MCT1/2 – підтипи транспортера монокарбоксилату 1/2; SN1 – система N транспортера підтипу 1; VGLUTs – везикулярні транспортери глутамату; EAATs – транспортери збуджуючих амінокислот; GLAST – транспортери збуджуючих амінокислот 1 типу; GLT1 – транспортери збуджуючих амінокислот 2 типу; X_c⁻ – система глутамат-цистеїнового обмінника; SAT1/2 – система А транспортера підтипів 1/2; PDH – піруватдегідрогеназа; CAC – цикл трикарбонових кислот; GDH – глутаматдегідрогеназа; PAG –

фосфатактивована глутаміназа; LDH – лактатдегідрогеназа; PDH – піруватдегідрогеназний комплекс; GS – глутамінсинтетаза; HEX – гексокіназа; CR – цистинредуктаза.

1.3. Глутамат-цистеїновий обмінник

Понад 30 років тому система глутамат-цистеїнового обмінника (X_C^-) була описана як натрій-незалежний глутаматний транспортер [38]. Нині доведено, що ця система відповідає за захоплення однієї молекули цистину та вивільнення однієї молекули глутамату [39]. Система X_C^- складається з двох субодиниць: субодиниці 4F2hc, необхідної для експресії на поверхні клітини, та субодиниці xCT, необхідної для функціональної активності. Окрім основної участі у процесах обміну глутамату, обмінник задіяний у підтримці рівня внутрішньоклітинного глутатіону (GSH) [5]. Після захоплення X_C^- цистин перетворюється на цистеїн, виступаючий як основний лімітуючий фактор синтезу глутатіону – потужного клітинного антиоксиданту [40].

Система глутамат-цистеїнового обмінника відіграє важливу роль у захисті клітини [41]. Вивільнення невезикулярного глутамату за рахунок глутамат-цистеїнового обмінника з астроцитів регулює синаптичну активність шляхом стимуляції позасинаптичних рецепторів [42]. Експериментально доведено, що глутамат-цистеїновий обмінник вносить значущий внесок у функціонування та пластичність нейронів, оскільки посилений обмін призводить до кращого функціонування деяких клітин при довгостроковому збудженні [43]. Система глутамат-цистеїнового обмінника є хлорид-залежною, натрій-незалежною та електронейтральною на відміну від високоафінних глутаматних транспортерів [44].

1.4. Синапс

Синапс – місце контакту між нейроном та ефекторною клітиною, складається з пресинаптичної терміналі, яка містить наповнені нейромедіаторами везикули (від кількох сотень до декількох тисяч), синаптичної щілини та постсинаптичної клітини, у мембрані якої локалізуються рецептори до нейромедіатору (рис.1.2.).

Процес передачі нервового імпульсу відбувається поетапно: після надходження потенціалу дії до нервової терміналі, термінальна плазматична мембрана деполяризується, а потенціал-керовані Ca^{2+} -канали активуються, сприяючи надходженню іонів Ca^{2+} у нервову терміналь [45]. Надалі іони кальцію зв'язуються з певними синаптичними протеїнами, кожен з яких відповідає за різні етапи: злиття, переробку та транслокацію везикул.

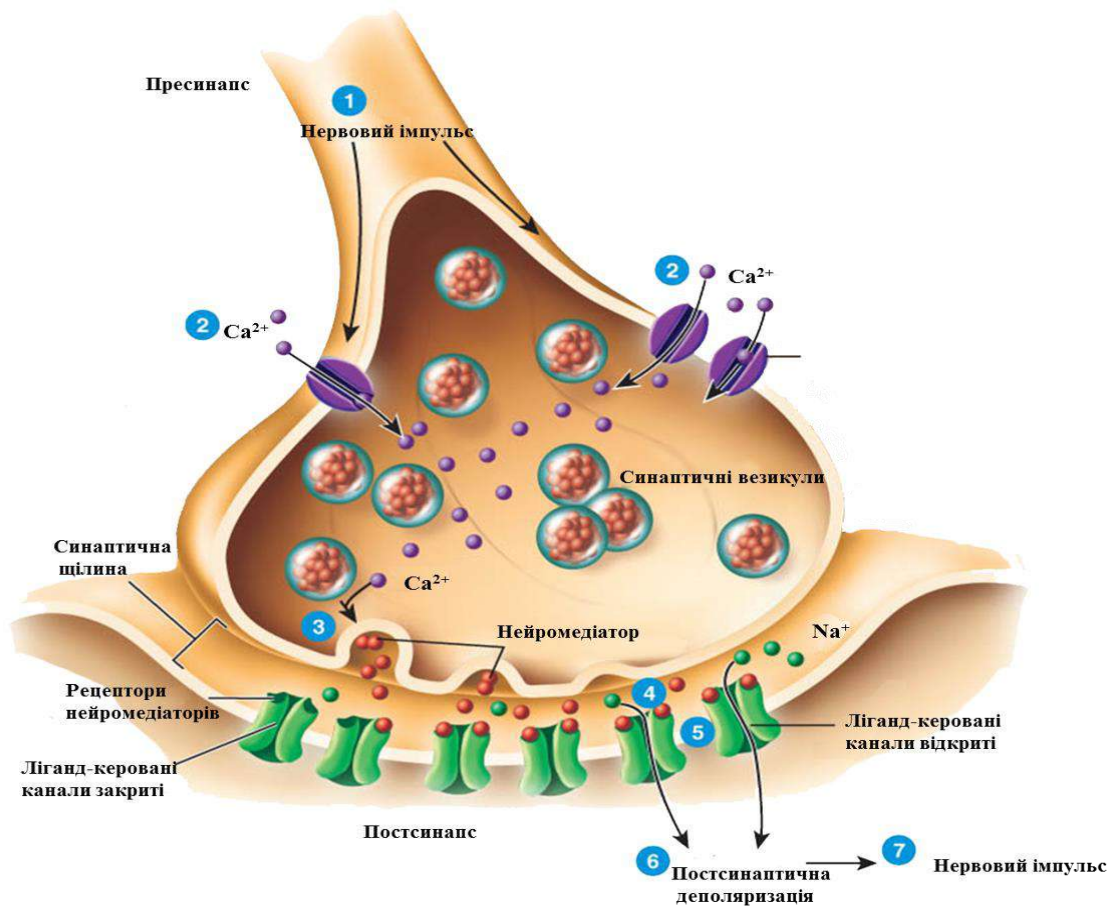


Рис. 1.2. Схема передачі сигналу у хімічному синапсі [48]:

- 1 – надходження нервового імпульсу до нервового закінчення (пресинапсу);
- 2 – відкриття деполяризацією потенціал-керованих Ca^{2+} -каналів, через які іони Ca^{2+} проникають всередину терміналі;
- 3 – злиття мембран везикул з плазматичною мембраною та вивільнення нейромедіатора у синаптичну щілину;
- 4 – зв'язування молекул нейромедіатора з нейромедіаторними рецепторами на постсинапсі;
- 5 – відкриття ліганд-керованих каналів і проникнення іонів крізь постсинаптичну мембрану;
- 6 – зміна мембранного (постсинаптичного) потенціалу. Залежно від природи іонів відбувається або деполяризація (збудження), або гіперполяризація (гальмування);
- 7 – ініціація потенціалу дії при досягненні порогу деполяризуючого постсинаптичного потенціалу [46].

Синаптичні везикули переміщуються і «стикуються» у місцях вивільнення, де проходять «праймінг» і стають готовими для злиття. Везикули, які щойно пройшли «праймінг», відносяться до легко вивільнюваного пулу синаптичних везикул. Під впливом потенціалу дії та збільшенні концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} останні можуть зливатися з синаптичною мембраною та вивільняти глутамат у синаптичну щілину [47]. Після злиття відбувається ендоцитоз везикул, які у подальшому накопичують нейромедіатор та готуються до наступного циклу екзоцитозу.

В залежності від локалізації розрізняють три групи синаптичних везикул у пресинапсі [48]:

1. *Пул готовий до вивільнення.* Утворюється з везикул, приєднаних до синаптичної мембрани та готових до негайного вивільнення. Везикули цього пулу складають 0,5 – 5 % усіх везикул і можуть бути швидко вивільнені за 5 – 15 імпульсів високочастотної електричної стимуляції або кілька мілісекундної деполяризації [49].

2. *Пул обміну*. Об'єднує везикули, які виділяються під час помірної (фізіологічної) стимуляції. Їх частка – близько 5 – 20 % усіх везикул [50]. Везикули цього пулу багаторазово використовуються у циклі екзо- та ендоцитозів під час високочастотних фізіологічних умов протягом тривалої активності [51].
3. *Резервний пул*. Везикули цього пулу представляють близько 75 – 95 % усіх везикул на пресинапсі [52]. Вважають, що ці везикули дуже рідко, якщо коли-небудь, вивільняються лише шляхом інтенсивної стимуляції або за умови вичерпання резервного пулу [53].

Процес передачі імпульсу у синапсі полягає у злитті везикул із пресинаптичною мембраною. За одну секунду в середньому зливається дві синаптичні везикули, вивільнюючи у позаклітинний простір від 3000 до 10000 молекул глутамату [54, 55]. В середньому одна везикула містить приблизно 5000 молекул глутамату [56]. Це призводить до збільшення концентрації позаклітинного глутамату у синаптичній щілині до 0,5 – 1,0 мМоль [57].

На постсинаптичній мембрані, яка знаходиться на відстані 20 нм, знаходяться метаботропні та іонотропні глутаматні рецептори [58], кількість яких в середньому не перевищує 100 одиниць [59]. Положення глутаматних рецепторів на постсинаптичній мембрані детермінується в залежності від їхньої афінності до глутамату. Низькоафінні, порівняно з NMDA, АМРА-рецептори знаходяться ближче до місця вивільнення глутамату, інші (іонотропні та метаботропні рецептори) локалізовані на більшій відстані [60]. Таке розташування пов'язане з тим, що від 50 % до 90 % вивільненого у синаптичну щілину глутамату виводиться з неї в межах 10 – 70 мс [61].

Рівень позаклітинного глутамату залежить від:

- везикулярного вивільнення з астроцитів [62];
- вивільнення за рахунок глутамат-цистеїнового обмінника [42];
- вивільнення через астроцитні іонні канали [63] та об'єм-чутливі органічні аніонні канали [64].

Також концентрація позаклітинного глутамату може збільшуватися за рахунок гідролізу Н-ацетиласпартилглутамату [65] або глутаміну [66]. Рівень позаклітинного глутамату є важливим показником, оскільки впливає на активацію, кластерізацію (збірку), трафікінг (пересування у цитозолі до мембрани), десинтизацію рецепторів та нейророзвиток [22, 42, 54, 67, 68].

Виведення глутамату з синаптичної щілини відбувається за рахунок високо-афінних глутаматних транспортерів.

1.5. Глутаматні транспортери

На сьогоднішній день не виявлено ферментів, здатних метаболізувати глутамат у позаклітинному просторі, тобто впливати на його позаклітинний рівень. Функцію що до забезпечення певного позаклітинного рівня глутамату виконують транспортери, що здатні впливати на цей показник. За захоплення глутамату з позаклітинного простору відповідають глутаматні транспортери, локалізовані і на мембрані нейронів, і на мембрані астроцитів [2, 69]. Оскільки глутаматні рецептори локалізуються на мембрані клітини таким чином, що можуть бути активовані лише з позаклітинного простору, контроль за активацією рецепторів полягає у вивільненні глутамату у синаптичну щілину та захопленні з неї позаклітинного глутамату.

Незважаючи, що відомо декілька протеїнів, здатних виконувати функцію транспорту глутамату, термін «глутаматні транспортери» використовується саме для «високоафінних глутаматних транспортерів» або «транспортерів збудливих амінокислот» (EAATs) [1]. У даний час схарактеризовано 5 типів транспортерів: EAAT1 [70], EAAT2 (GLT-1; GLT) [71], EAAT3 (EAAC1) [72], EAAT4 [73] та EAAT5 [74]. Їхня афінність варіює в залежності від типу та методу визначення, а показник K_m коливається від 1 до 100 мкМоль [2]. Транспортери EAAT 1 – 3 зустрічаються у клітинах нервової тканини всіх відділів центральної нервової системи, в той час як EAAT4 та EAAT5 локалізовані переважно у клітинах

мозочку (церебеллумі) та сітківки ока відповідно [75]. Найбільш розповсюдженим транспортером є EAAT2, завдяки якому захоплюється понад 90 % глутамату [76].

Щільність розташування глутаматних транспортерів на мембрані клітини складає близько 10000 транспортерів/мкм² [77]. Тобто, число транспортерів пропорційне до кількості молекул глутамату, які вивільнюються за один цикл потенціалу дії.

На транспорт глутамату впливає ефективність роботи EAAT. Повний цикл транспортування здійснюється за умови, що молекула глутамату зв'язується з транспортером і виділяється в цитозоль. Проте можливі й винятки. Глутамат може від'єднуватися від транспортера перед транспортуванням або після може не від'єднуватися чи заміщуватись іншою молекулою глутамату, повертаючись таким чином знову до позаклітинного простору.

Ефективність транспорту залежить від внутрішньоклітинних і позаклітинних концентрацій іонів і субстрату. За ідеальних умов (0 Моль Na⁺, 0 Моль глутамату всередині) ефективність транспорту EAAT2 складає 65 % [78], тоді як ефективність EAAT4 сягає 75 % [79]. Проте в нативних умовах організму, ефективність EAAT4 не перевищує 50 % через високу концентрацію внутрішньоклітинного глутамату в нейронах. Тож швидкість циклу цих транспортерів сповільнюється, коли змінюються градієнти іонів Na⁺ та K⁺. Збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонів Na⁺ і підвищення позаклітинної концентрації іонів K⁺ призводить до роботи EAATs у зворотньому напрямку, що саме і спостерігається при ішемічно/гіпоксичних ураженнях нервової тканини [4].

Доведено, що майже 90 % глюкози, яку споживає мозок, використовується для підтримки електрохімічних градієнтів, необхідних для роботи глутаматних транспортерів та деполяризації нейронів [80]. Всі транспортери здійснюють транспорт одного іону H⁺, трьох іонів Na⁺ та одного іону K⁺ на одну молекулу субстрату [81, 82] (рис.1.3.). Саме тому цей

транспорт є Na-залежним, на відміну від везикулярних глутаматних транспортерів, які використовують електрохімічний протонний градієнт для транспорту глутамату.

Глутамат - ●
 Na^+ - ●
 H^+ - ●
 K^+ - ●

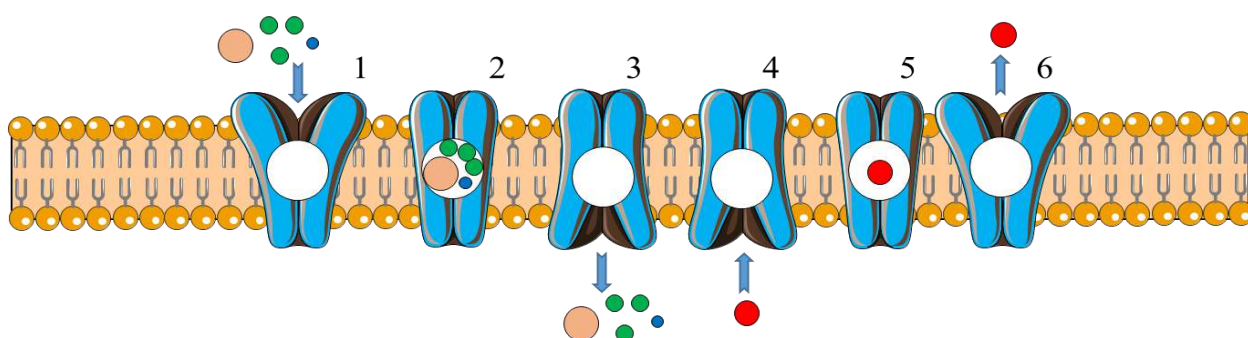


Рис. 1.3. Схема роботи глутаматного транспортера:

- 1 – завантаження транспортером глутамату, іону H^+ і трьох іонів Na^+ із позаклітинного простору;
- 2 – завантажений транспортер;
- 3 – вивільнення транспортером субстратів у внутрішньоклітинний простір;
- 4 – зв'язування іону K^+ з розвантаженим транспортером;
- 5 – K^+ -завантажений транспортер;
- 6 – вивільнення іону K^+ у позаклітинний простір.

Спільний транспорт катіонів з глутаматом є значним, бо зміна концентрації катіонів виступає сигнальним механізмом в астроцитах, впливає на процеси гліколізу в астроглії та змінює поверхневу експресію глутаматних транспортерів [83–85].

Транспортери можуть виконувати функцію хлоридних каналів [86, 87]. Найбільшу провідність серед них мають EAAT4 та EAAT5. Вважається, що ці транспортери у більшій мірі можуть функціонувати як інгібітори глутаматних рецепторів, а ніж як транспортери [88–90]. Є свідчення про їхню

роль у компенсації заряду іонів, що надходять через плазматичну мембрану у процесі транспорту глутамату [91].

1.6. Везикулярні транспортери

Потрапивши до клітини, глутамат може локалізуватись у мітохондріях або у синаптичних везикулах [34]. Переміщення глутамату з цитозолу здійснюють відповідні транспортери. За переміщення до мітохондрій відповідає родина мітохондрійних транспортерів SLC25 [92], а до везикул – везикулярні глутаматні транспортери (VGLUT) [93]. Існує три ізоформи везикулярних транспортерів: VGLUT1, VGLUT2 та VGLUT3 [94]. Везикулярні транспортери незалежні від натрієвого та калієвого градієнта і мають нижчу афінність (K_m складає приблизно 1 мМ) до глутамату порівняно з високоафінними глутаматними транспортерами [95].

Найбільша кількість VGLUT1 та VGLUT2 знаходиться у нервовій тканині головного мозку: VGLUT1 переважає у тканинах кінцевого мозку, включаючи церебральний кортекс та гіпокамп, тоді як VGLUT2 – у нервовій тканині нижньої стовбурової області мозку [96]. Однак у деяких глутаматергічних нервових терміналях та у частині ендокринних залоз VGLUT1 та VGLUT2 локалізовані разом [97, 98]. Обидва типи транспортерів мають певні типи везикул [98].

На відміну від VGLUT1 та VGLUT2, транспортери VGLUT3 розповсюджені менше [99, 100]. VGLUT3 локалізуються у нервових терміналях, дендритах та астроцитах [99, 101]. Їх експресія вкрай важлива для нормального нервового розвитку. Так у VGLUT1-нокаутних мишей спостерігали прогресуючі нейрологічні захворювання, які супроводжувалися сліпотою та втратою просторової координації [102]. VGLUT2 транспортери у більшості випадків експресуються у період ембріогенезу та раннього постнатального розвитку, тому генетична інактивація VGLUT2 призводить

до перинатальної загибелі [103]. VGLUT3 транспортери відповідають за нормальне функціонування слуху та механічну гіперчутливість [104].

Протонний електрохімічний градієнт на везикулярній мембрані є ведучим фактором для захоплення глутамату (рис. 1.4.). Цей потенціал формується за допомогою АТФ-ази вакуолярного типу [94].

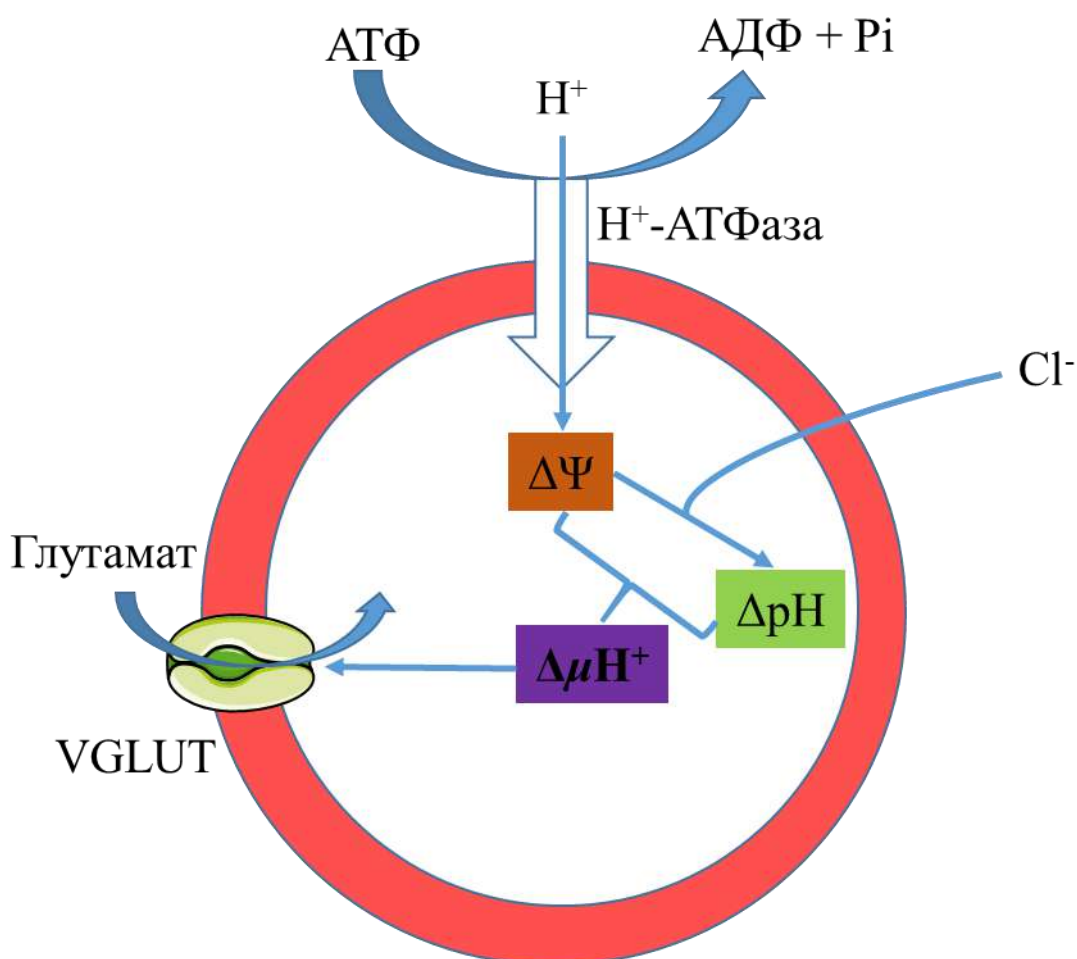


Рис. 1.4. Модель везикулярної системи захоплення глутамату: VGLUT-*v*-тип протонної помпи АТФ-ази та везикулярних глутаматних транспортерів; $\Delta\Psi$ – мембранний потенціал; $\Delta\rho\text{H}$ – рН градієнт; $\Delta\mu\text{H}^+$ – електрохімічний протонний градієнт.

Доказом того, що везикулярна система транспорту глутамату складається з *v*-типу протонної помпи АТФ-ази та VGLUT-транспортерів, слугує факт, що захоплення глутамату інгібується дисипаторами

електрохімічного протонного градієнта FCCP або CCCP як інгібітором v-типу протонної помпи АТФ-ази – бафіломіцином, але не зазнає впливу інгібіторів мітохондрійної протонної помпи АТФ-ази [105]. У присутності іонів K^+ ця система інгібується H^+/K^+ обмінником нігеріцином [106]. При АТФ гідролізі протонна помпа АТФ-ази транспортує іони H^+ через мембрану везикули, формуючи позитивний мембранний потенціал всередині. Завдяки цьому аніони, які знаходяться ззовні (наприклад, іони хлору), проникають усередину везикули. Так формуються сполуки, наприклад HCl , які знижують рН всередині везикули та зменшують різницю потенціалів. Тобто, відбувається збільшення градієнта ΔpH та зменшення мембранного потенціалу $\Delta\Psi$. Робота VGLUT транспортерів у значній мірі залежить від наявності градієнта потенціалу на мембрані везикули, ніж від градієнта ΔpH . Електрохімічний протонний градієнт $\Delta\mu_{H^+}$, який є комбінацією електричного компонента $\Delta\Psi$ та хімічного компонента ΔpH , слугує рушійною силою захоплення глутамату у везикулах [107]. Низькі концентрації іонів хлору можуть стимулювати везикулярне захоплення глутамату за рахунок зв'язування з алостеричним сайтом і за рахунок формування рН градієнта. Високі концентрації іонів Cl^- , навпроти, інгібують захоплення глутамату за рахунок конкуренції хлору і глутамату за сайт зв'язування [108].

1.7. Глутаматні рецептори

Глутаматні рецептори реалізують ефекти глутамату і після зв'язування з нейромедіатором ініціюють відповідні процеси. Методом молекулярного клонування досліджено кілька груп глутаматних рецепторів. Їх поділяють на іонотропні [109] та метаботропні [110].

Родина метаботропних глутаматних рецепторів об'єднує три групи:

I – mGluR1 та mGluR5;

II – mGluR2 та mGluR3;

III – mGluR4, mGluR6, mGluR7 та mGluR8.

Наведена класифікація базується на схожості послідовності ланки амінокислот, типу трансльованого сигналу, розташуванню та фармакології конкретної групи [111]. I-а група mGluRs зв'язується з фосфорилазою C через $G_{q/11}$ протеїн. Ця група локалізується пресинаптично поряд з іонотропними рецепторами [112]. mGluRs локалізація індукує потенціал дії іонотропних глутаматних рецепторів через mGluR1/5 [113]. Групи II та III негативно зв'язуються з аденілатциклазою та розташовані пре- та постсинаптично. Пресинаптичні рецептори інгібують вивільнення глутамату, в той час як постсинаптичні рецептори впливають на модуляцію іонних каналів та вивільнення інших нейромедіаторів [114].

В залежності від чутливості до агоніста іонотропні рецептори розділяють на:

- NMDA-рецептори (N-methyl-D-aspartate) [115];
- АМРА-рецептори (a-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid) [116];
- каїнатні рецептори [117];
- дельта-рецептори [118].

Щонайменше один тип глутаматних рецепторів міститься у нервових клітинах [119–121].

Іонотропні рецептори класифікують і в залежності від субодиниць, які входять до їхнього складу. Наприклад, NMDA-рецептори можуть містити дві субодиниці GluN1 (NMDAR1 та NR1), одну субодиницю GluN2 (типу А, В, С або D) та одну субодиницю GluN3 (типу А або В) [109].

АМРА складаються з чотирьох типів субодиниць: GluA1 (GluR1, GluRA), GluA2 (GluR2, GluRB), GluA3 (GluR3, GluRC) та GluA4 (GluR4, GluRD) [109].

Каїнатні рецептори складаються з субодиниць GluK1 (GluR5), GluK2 (GluR6), GluK3 (GluR7), GluK4 (KA1) та GluK5 (KA2) [109].

Усі субодиниці АМРА-рецепторів можуть утворювати як гомо- так і гетеромери. Субодиниці каїнатного рецептору GluK1–GluK3 можуть

утворювати гомо- та гетеромери, але GluK4 та GluK5 утворюють функціональні рецептори лише тоді, коли ко-експресуються (тобто синтезуються сумісно) з GluK1, GluK2 або GluK3 [109]. Формування певних видів рецепторів залежить від локалізації та функції нейрона [122].

Іонотропні глутаматні рецептори – це інтегральні мембранні протеїни, що складаються з чотирьох великих субодиниць, які формують центральний іонний канал [109]. Ці субодиниці є дискретними, напівавтономними доменами: позаклітинний аміно-кінцевий домен (ATD), позаклітинний ліганд-зв'язуючий домен (LBD), трансмембранний домен (TMD) та внутрішньоклітинний карбоксил-кінцевий домен (CTD) (рис. 1.5.).

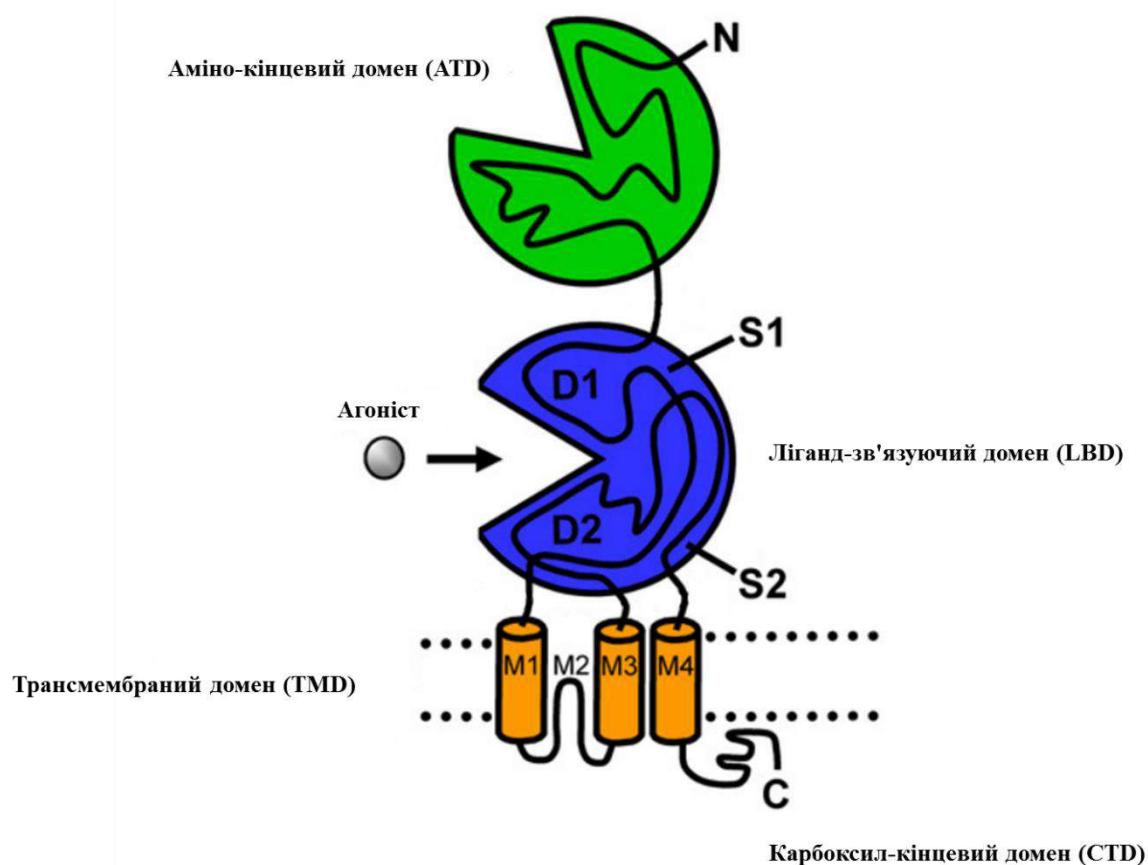


Рис. 1.5. Структура глутаматного рецептора [109], у складі якого два великих позаклітинних домени [аміно-кінцевий домен – ATD та ліганд-зв'язуючий домен – LBD]; трансмембранний – TMD, утворює

частину пори іонного каналу; внутрішньоклітинний карбоксил-кінцевий домен – CTD.

Позаклітинний аміно-кінцевий домен грає ключову роль, бо відповідає за формування та транспорт рецептора з ендоплазматичного ретикулу до мембрани клітини [123, 124]. Ліганд-зв'язуючий домен контролює активацію рецептора за рахунок зв'язування з агоністом. Активація глутаматного рецептора призводить до конформаційних змін ліганд-зв'язуючого домену [125], що, в свою чергу, призводить до переходу домену іонного каналу у відкриту форму. Трансмембранний домен з'єднуються з ліганд-зв'язуючим доменом через три короткі лінкери. Трансмембранний домен складається з трансмембранних хеліксів M1, M3, M4 та мембранної ретрансляторної петлі M2. Хелікси M1, M2 та M3 формують структуру, яка приймає участь у формуванні ядра іонного каналу, а M4 створює контакти з TMD [109]. Карбоксил-кінцевий домен відповідає за таргетінг мембрани, стабілізацію, посттрансляційну модифікацію та таргетінг для деградації [126].

AMPA-рецептори і каїнат-рецептори – катіон-проникні іонні канали, які використовують іонний трансмембранний градієнт іонів Na^+ для створення деполяризації в синапсі. Каїнатні рецептори, зокрема, і рецептори AMPA, демонструють сильну модуляцію шляхом зміни концентрації моновалентних іонів [127, 128]. Останні роботи засвідчили, що іони Cl^- – невід'ємні компоненти каїнатних рецепторів в їхній активній конформації [129]. Аніонний сайт зв'язування характеризується значною селективністю до іонів Cl^- і Br^- порівняно з іонами F^- та I^- . Великі аніони, такі як нітрат, метансульфонат та сульфат, не замінюють іони Cl^- у складі каїнатних рецепторів.

Найсуттєвішу роль у синаптичній передачі збудження виконують два типи глутаматних рецепторів AMPA та NMDA, яким притаманні різні ролі у зазначеному процесі [122]. AMPA-рецептори характеризуються швидкою генерацією потенціала дії та низькою афінністю до глутамату. Афінність до

глутамату різняться в залежності від групи рецептора та субодиниць, які входять до його складу. EC_{50} (напівмаксимальна ефективна концентрація) для NMDA-рецепторів складає приблизно 1 мкМоль/л, а EC_{50} для AMPA-рецепторів – понад 400 мкМоль /л [109]. Короткий час зв'язування глутамату з AMPA-рецепторами викликає швидко передачу за короткий проміжок часу та короткостроковий тік іонів Ca^{2+} . NMDA-рецептори, навпаки, мають високу афінність до глутамату, що є вирішальним чинником для індукції специфічних форм синаптичної пластичності. Вони довгостроково зв'язується з глутаматом та відповідають за довготривалі передачу і тік іонів [5], забезпечуючи такі пластичні властивості як довготривале потенціювання (LTP) та довготривалу депресію (LTD) [130].

Щойно після народження більшість збудливих синапсів мозку людини містить тільки NMDA-рецептори, тоді як частка AMPA-рецепторів збільшується поступово з віком [131–133]. У дійсності переміщення AMPA-рецепторів ззовні клітини на поверхню мембрани синапса – регульований процес, який залежить від активації NMDA-рецепторів і лежить в основі деяких форм синаптичної пластичності [78].

1.8. Синаптична пластичність

Перші згадування про синаптичну пластичність у працях канадського фізіолога Дональда Гебба датуються 1949 роком, у подальшому були узагальнені та сформульовані у теорію Гебба [134]. Теорія пояснює пристосування нейронів у процесі навчання через механізм синаптичної пластичності.

Синаптична пластичність – це здатність синапсів з часом збільшувати або зменшувати відповідь на сигнал в залежності від їхньої активності. Синаптична пластичність є однією з важливих нейрохімічних основ навчання та пам'яті. Під синаптичною пластичністю мозку розуміється сукупність структурних змін, які можуть варіювати залежно від росту аксонів, зміни

положення дендритних шипів до кількості нейротрансмітерів, що виділяються в синапатичну щілину, та зміну ефективності реакції клітин на ці нейротрансмітери за рахунок динаміки кількості синаптичних рецепторів [135]. Вважається, що синаптична пластичність лежить в основі вищих когнітивних функцій, таких як навчання та пам'ять [136–138]. Порушення синаптичної пластичності спостерігається при нейрологічних розладах, зокрема, при хворобі Альцгеймера [139], синдромі Дауна [140], шизофренії [141], різних формах деменції [142].

Синаптичну пластичність в залежності від терміну тривалості поділяють на короткочасну та довготривалу. Короткочасна синаптична пластичність триває від кількох мілісекунд до кількох хвилин, тоді як довготривала – від кількох хвилин до годин. У короткочасній синаптичній пластичності основна роль належить двом процесам: посиленню (збільшенню вірогідності вивільнення нейромедіаторів на відповідь потенціала дії) та виснаженню (зменшенню вивільнення через брак готових до злиття везикул або через зворотній зв'язок пресинаптичних рецепторів) [143].

Довготривала синаптична пластичність може бути розділена на довгострокову депресію (LTD), при якій “сила” синаптичної передачі зменшується, і довгострокове потенціювання (LTP), при якому “сила” синаптичної передачі збільшується. В обох процесах значну роль відіграють NMDA-рецептори.

Однією з унікальних характеристик NMDA-рецепторів є блокування їхнього каналу позаклітинними іонами Mg^{2+} , перешкоджаючими надходженню іонів Ca^{2+} та одновалентних катіонів. Якщо мембранний потенціал достатньо сильний для зменшення потенціал-залежної блокади каналу Mg^{2+} , NMDA-рецептори зв'язують глутамат, відкривають канал і дозволяють транспорт іонів Ca^{2+} . Довгострокове потенціювання пов'язане з повним відкриттям постсинаптичних каналів NMDA, що при деполяризації призводить до збільшення концентрації іонів Ca^{2+} у постсинапсі і, як результат, до активації протеїнкіназ CaMKII і PKAII [144, 145]. Ці активовані

протеїнкінази відповідають за фосфорилування постсинаптичних збуджувальних рецепторів, зокрема, AMPA-рецепторів, що покращує катіонну провідність і збільшує їхню кількість на плазматичній мембрані [146].

За умови лише часткового відкриття каналів відбувається зменшений вхід іонів Ca^{2+} у постсинапс. Зменшена внутрішньоклітинна концентрація іонів Ca^{2+} активує протеїнові фосфатази, які призводять до дефосфорилування AMPA-катіонних каналів, знижуючи катіону провідність. Зазначені процеси характеризують довгострокову депресію [147].

1.9. Терапевтична гіпотермія

Перша історична згадка про застосування гіпотермії датується третім тисячоліттям до н.е. [8], втім широке використання гіпотермії у медицині почалося лише з середини XX століття [148]. У 2002 були оприлюднені результати клінічних випробувань [149], які продемонстрували ефект застосування низьких температур для покращення стану пацієнтів після ішемічного інсульту [150]. На сьогодні гіпотермія займає вагомe місце у різноманітні медичних практик [151].

Результат терапевтичної гіпотермії залежить від часу її впливу на процеси, які характерні для інсульт/ішемічного стану. Виділяють 3 фази останнього: гостру, підгостру та хронічну [152].

Під час *гострої фази* (від кількох хвилин до декількох годин) відбувається зупинка кровообігу, що спричинює зменшення ресурсів окислювального фосфорилування (АТФ, кисню, глюкози) [153]. Нестача енергетичних субстратів призводить до порушення іонної концентрації внаслідок реверсу АТФ-залежної іонної помпи. Зміни іонного градієнта стають чинниками порушень функцій мітохондрій, деполіаризації мембрани нервових клітин, вивільнення значної кількості глутамату у позаклітинний простір, розвитку ексайтотоксичності [154]. Надмірна кількість глутамату

спричиняє ацидоз і надмірну стимуляцію NMDA-рецепторів, викликаючи подальший внутрішньоклітинний тік іонів Ca^{2+} , активуючого різноманітні внутрішньоклітинні процеси, які надалі призводять до розвитку ексайтотоксичності, пошкодження клітин та їх загибелі. Серед основних – порушення функціонування синтази оксиду нітрогену (NOS), каталізуючої синтез оксидів нітрогену; збільшення продукції активних форм кисню (ROS) і, як наслідок, пряме пошкодження мітохондрій або активація про-апоптичного протеїну Вах. Це стає причиною появи мітохондрійної транзитної пори та наступного вивільнення цитохрома C у цитозоль [155]. Цитозольний цитохром C може активувати апоптосому (pro-caspase-9 та Араф-1) з наступною активацією каспази та апоптозною загибеллю клітини. Апоптоз може розвинутиись незалежно від активації каспази за рахунок мітохондрійного вивільнення фактору апоптозу АІF, який транслокується у ядро та викликає конденсацію хроматина та фрагментів ДНК [152].

Застосування гіпотермії на зазначеній стадії знижує вихід збуджуючих нейромедіаторів [156], зменшує потребу у енергетичних субстратах [157], знижує синтез NO-продуктів [153] та інгібує фосфорилування NMDA-рецепторів [158].

Під час *підгострої фази* (від кількох годин до декількох днів) відбуваються вторинні процеси пошкодження: реперфузія з генерацією ROS, запалення та клітинний апоптоз, які вражають гематоенцефалічний бар'єр та сприяють формуванню набряку [152]. Застосування гіпотермії на цій стадії знижує оксидативний та нітрозативний стреси [7]. Окрім того, гіпотермія знижує активність астроцитів та мікроглії, зменшує експресію запальних цитокінів, ендотеліальних молекул, нейтрофілів та моноцитарну інфільтрацію [153, 159].

Гіпотермія впливає на апоптичні медіатори (В-клітинна лімфома 2 [Bcl-2] пов'язана з X-протеїном, Fas, каспазою 3, цитохромом C), знижуючи їхню кількість, та активує антиапоптозні шляхи, посилюючи експресію p53 протеїну, який сприяє відновленню клітини [160, 161]. Захисний вплив

гіпотермії на гематоенцефалічний бар'єр відбувається за рахунок попередження активації металопротеїназ, пошкоджуючих позаклітинний матрикс, та посилення експресії ендogenous інгібіторів металопротеїназ [152].

У *хронічну фазу* (від кількох днів до декількох місяців) застосування гіпотермії не призводить до значного ефекту. Вплив гіпотермії на ангіо-, нейро-, синапто- та гліогенез є, але ступінь її дії допоки у процесі дослідження. Деякі автори акцентують увагу, що застосування гіпотермії на гострій стадії знижує вищезазначені процеси [162, 163], інші свідчать, що гіпотермія, навпаки, посилює їх [164–167]. Загалом, вплив гіпотермії на хронічній стадії відбувається за рахунок її попередньої протекторної дії у процесах гострої і підгострої фаз: під час гострої – зниження церебрального метаболізму, запобігання пошкодженню мітохондрій, порушенню іонної помпи та розвитку ексайтотоксичності; під час підгострої – зниження ступеню ураження через реперфузійне пошкодження, продукцію ROS, зменшення запалення, апоптозу та формування набряку [152].

В залежності від використання цільової температури, гіпотермію поділяють на:

- м'яку (32 °C – 34 °C);
- середню (28 °C – 32 °C);
- помірну (20 °C – 28 °C);
- глибоку (5 °C – 20 °C);
- надглибоку (< 5 °C) [168, 169].

1.10. Інсульт та моделі його вивчення

Інсульт – клінічний стан, при якому відбувається зниження кровообігу мозку внаслідок порушення кровотоку. В залежності від чинників, інсульт поділяють на *глобальний*, викликаний зупинкою серця, та *локальний*, який

може бути або геморагічним, тобто наслідком крововиливу у мозок, або ішемічним, внаслідок емболії (закупорки) кровоносних судин.

Складний та взаємопов'язаний каскад молекулярних подій відбувається за ішемії. Ішемія визначається як зменшення кровотоку, достатнє для виклику змін нормального функціонування клітин; гіпоксія спричиняє зменшення вмісту кисню у тканині до недостатнього для підтримки гомеостазу рівня [170]. На початку ішемії відбувається некроз серцевини інфарктованої тканини зі зниженням кровотоку, погіршення обміну речовин та порушення функцій навколо зони ураження. Після зупинки синтезу АТФ та порушення роботи Na^+/K^+ -помпи відбувається деполяризація мембрани клітин, що призводить до надлишкового току в клітину іонів Ca^{2+} . Як наслідок – активація внутрішніх механізмів апоптозу та загибель клітин [170]. Збільшення кількості глутамату у позаклітинному просторі призводить до активації іонотропних глутаматних рецепторів, які інтенсифікують вхід іонів Ca^{2+} до клітини [152].

Підвищення ступеню токсичності окисного стресу відбувається у процесі утворення вільних радикалів за участі супероксиду (O_2^-), гідроксил радикалу ($-\text{OH}$), оксиду нітрогену (NO), пероксинітриду (ONOO^-) зі зниженням активності енергозалежних ензимів-скавенжерів [171]. Появі вільних радикалів сприяє метаболізм арахідонової кислоти, проникнення перефіричних лейкоцитів та порушення регуляції NO -синтази у мікроглії та моноцитах [152]. Вільні радикали і значна кількість іонів Ca^{2+} індукують синтез запальних цитокінів (зокрема, інтерлейкінів IL-1 , IL-6 , фактору некрозу пухлини- α), хемокінів (зокрема, IL-8 , MCP-1), молекул адгезії ендотеліальних клітин (зокрема, селектинів, ICAM-1 , VCAM-1) і генів прозапальних протеїнів [170]. Вільні радикали також призводять до перекисного окислення ліпідів, індукції апоптозу та вироблення 4-гідроксинонену, який ковалентно модифікує Na^+/K^+ АТФ-азу, глюкозу і глутаматні транспортери, погіршуючи їх функціонування [170].

Значний внесок у ішемічні порушення мають певні клітинні популяції. Суттєва роль у процесі запалення належить мікроглії усередині ішемічної зони, яка синтезує прозапальні цитокіни, токсичні метаболіти і ферменти [170]. Астроцити також синтезують прозапальні цитокіни та нейропротекторні чинники, зокрема, еритропоєтин, трансформуючий фактор росту- β , металотіонін-2 [172, 173]. Ендотеліальні зміни також можуть сприяти порушенню функціонування гематоенцефалічного бар'єру та посиленню запальної відповіді [170]. Проникнення циркулюючих лейкоцитів, у т.ч. поліморфноядерних лейкоцитів та Т-клітин, ускладнює відновлення тканин після ішемічного інсульту [170]. Збільшення набряку мозку після ішемічного інсульту відіграє свою роль у негативному довгостроковому прогнозі виживання пацієнтів [170].

Геморагічний інсульт відрізняється від ішемічного вивільненням цитотоксичного гемоглобіну, порушенням регуляції протеїнів гаптоглобіну і гемопексину та підвищенням рівня окислювального стресу [174].

З огляду на зазначені відмінності, для вивчення інсульту використовується кілька експериментальних моделей. В залежності від задач дослідження можуть використовуватись різні методи індукування ішемії, різні види піддослідних тварин, різні області мозку для вивчення, різні методи для визначення області/об'єму інфаркту та функціональних ефектів [175].

Найбільш поширеною моделлю для вивчення моделі інсульту *in vivo* є оклюзія судин. Деякі дослідники використовують модель зупинки серця, у процесі використання якої серце зупиняється завдяки KCl-ін'єкції на певний час, а потім реанімується [176].

Для вивчення ішемії *in vitro* використовують первинні культури кортикальних клітин або клітин гіпокампа [177]. Більшість досліджень зосереджуються на вивченні впливу ішемії на нейрональні клітинні популяції, проте системи *in vitro* можуть бути використані і для вивчення відповіді астроцитів і олігодендроцитів [178, 179].

Ішемічні стани імітують низкою процедур. Гіпоксія може викликатись шляхом розміщення клітин у безкисневому розчині або у гіпобаричній камері [180]. Гіпоглікемія моделюється видаленням глюкози або її заміною неметаболічним варіантом (2-дезоксиглюкозою) [181]. Мітохондрійні інгібітори, наприклад, ціанід калію (KCN) або 3-нітропропіонова кислота ($O_2N-C_2H_4-COOH$), використовуються для моделювання інгібування метаболізму [181, 182]. Оскільки ішемія викликає вивільнення глутамату, що призводить до розвитку ексайтотоксичності через надмірну стимуляцію NMDA-рецепторів, то частка досліджень зосереджена на аналізі впливу високих концентрацій глутамату або застосуванні селективних антагоністів NMDA-рецепторів.

На сьогодні показано кілька механізмів зменшення позаклітинного рівня глутамату, який є основним чинником ексайтотоксичного ураження нервових клітин. Смерть нейронів через ішемічне ураження зменшувалася при блокуванні вивільнення глутамату із синапсу токсином правця [183]. Крім того, антагоністи рецепторів глутамату послаблювали ішемічно-індуковане ураження нервових клітин у багатьох видів експериментальних тварин (щурів, мишей, кішок, приматів) та ішемічних моделях (глобальній, локальній та *in vitro*) [184].

1.11. Комбіноване застосування ліків та гіпотермії

Інсульт – одна з основних причин, що призводить до інвалідності у дорослому віці. Наприклад, у США інсульт щороку вражає близько 800 тисяч осіб та призводить до економічних втрат у розмірі 34 млрд доларів [185]. Незважаючи на значний прогрес у медичній галузі за останній час, нейропротекторних засобів для запобігання вторинної травми мозку і мінімізації інвалідність доволі мало. У доклінічних та клінічних дослідженнях лише невеличка кількість препаратів змогла проявити позитивний ефект. У період з 1995 по 2015 роки випробувано 430

потенційних препаратів від ішемії. З них приблизно 4 % змогли вийти на ринок, 70 % було відхилено, 17 % проходили доклінічну оцінку, 9 % ще знаходяться на різних етапах випробувань [186].

Перспективним напрямком зменшення наслідків інсульту є комбіноване застосування нейропротекторних факторів [187]. Комплексний підхід може бути ефективнішим, аналогічно терапії ракових захворювань, де для ефекту синергічної дії комбінуються кілька цитотоксичних компонентів.

За літературними даними серед сполук які були застосовані, можна виділити п'ять класів речовин які мають цілеспрямовану дію:

- Антагоністи NMDA рецепторів, тобто речовини які можуть впливати на відповідь цих рецепторів, зменшуючи тік іонів Ca^{2+} через NMDA керовані Ca^{2+} канали.

- Скавенджери вільних радикалів. За нормальних умов ендogenous антиоксиданти поглинають активні форми кисню, які утворюються за нормальних умов в організмі, але за ішемічних умов, знешкодження не відбувається, через збільшення продукції активних форм кисню та інактивації антиоксидантних ензимів [188]. Наприклад було показано, що поєднання терапевтичної гіпотермії та антиоксиданта едаравона зменшувало розмір набряку та зону інфаркту у більшій мірі, ніж застосування кожного з факторів по одинці [189].

- Антикоагулянти, або тромболітичні засоби. Тромболітична терапія спрямована на усунення появи тромбу та об'єднує ліки, які діють як активатори плазміногену, антитромботичні агенти та інгібітори агрегації тромбоцитів [186]. Дія нейропротекторних засобів спрямована на гальмування ішемічного каскаду та запобігання вторинних травм. Вони можуть мати антиоксидантні властивості, впливати на стимуляцію нейронів та бути антагоністами кальцієвих каналів [186].

- Статини, тобто речовин які можуть впливати на рівень мембранного холестеролу. Наприклад, Lee та інш. показали що застосування

аторвастатину за десять днів до ішемії посилює ефективність гіпотермії, значно зменшивши зону інфаркту [190].

- Протизапальні агенти. Було показано, що застосування речовини такролімус, яка пригнічує синтез запальних цитокінів та знижує синтез NO, у поєднанні з гіпотермією, більш знижує зону інфаркту та рівень набряку ніж застосування поодиночі [191].

Перші дослідження комбінованого застосування антагоністів NMDA рецепторів з гіпотермією проведені на початку 90-х років XX ст.: на моделі двосторонньої оклюзії сонних артерій неконкуруючий антагоніст NMDA декстрометорфан виявив нейропротекторну дію у поєднанні з помірною гіпотермією (30 °C) [14]. Окрім антагоністів NMDA-рецепторів, досліджено вплив речовин, які підвищували позаклітинну концентрацію іонів Mg^{2+} , бо останній виступає ендogenous антагоністом NMDA-рецепторів. Іони магнію, окрім функцій збереження мембранної цілісності, регуляції синтезу білків, енергетичного обміну, підтримки іонних градієнтів, регуляції тонуусу гладеньких м'язів [192], має анти ексайтотоксичну властивість. Іони магнію виступають антагоністами іонам кальцію у процесі проникнення завдяки NMDA-рецепторам [193]. Campbell зі співавторами продемонстрували, що іони магнію не мають нейропротекторної дії, якщо процес не відбувається в умовах гіпотермії (35 °C) [194]. Song зі співавторами дійшли висновку, що поєднання локальної гіпотермії та іонів магнію більш ефективно знижує гострі ішемічні ушкодження, ніж застосування виключно однієї гіпотермії [195].

Проте маються й протилежні докази. Наприклад, на моделі локальної ішемії щурів комбіноване застосування МК-801, введеного за 30 хвилин до оклюзії сонної артерії, та м'якої гіпотермії (33 °C) створювало такий же нейропротекторний ефект, як і індивідуальне застосування кожного із факторів [196].

Незважаючи, що пройшло понад тридцять років з часу перших експериментів [197], які довели позитивний вплив блокування рецепторів для

зменшення пошкодження мозку через ішемічний/гіпоксичний стан, жодна сполука досі офіційно не затверджена для загального клінічного застосування. Цей парадокс можна пояснити наступними фактами:

часовим інтервалом ефективності застосування антагоністу (для модельного об'єкту (гризунів) термін складав до однієї години після ішемічного стану) [198];

pH модуляцією іонного каналу (зміна pH, яка відбувається через порушення іонного градієнта при ішемії, може зменшувати функціонування каналу);

гострою токсичністю сполук та побічними ефектами. Наприклад, кетамін може призводити до розвитку психозів, інший блокатор NMDA-рецепторів МК801(дизоцилін) – до вакуолізації головного мозку [199].

Одним з ускладнень при роботі з антагоністами NMDA-рецепторів є «Інь/Янь» ефект [200]. З одного боку, активація NMDA-рецепторів викликає посилення факторів, які відповідають за виживання клітини, наприклад активацію CREB транскрипційного фактору та експресію нейротропічного фактору мозку BDNF, а з іншого боку, посилена активація призводить до нейродегенерації та загибелі клітини [201, 202].

Окремою проблемою виступає час блокування NMDA-рецепторів. Veignon із співавторами показали, що довготривала блокада є шкідливою, тому застосування NMDA для стимуляції NMDA-рецепторів через 24 та 48 годин після ішемічного стану, який супроводжувався блокуванням NMDA-рецепторів антагоністом МК801, сприяло зменшенню нейрологічних ускладнень та відновленню когнітивних функцій через 14 днів [203].

1.12. Холестерол, його роль в процесі нейротрансмісії та наслідки його видалення

Холестерол – один із основних компонентів біологічної мембрани. Функціонування більшості трансмембранних білків, у тому числі рецепторів,

іонних каналів, транспортних білків, залежить від вмісту холестеролу у мембрані. Мозок являється найбільш холестерол-збагаченим органом, він містить близько 20 % від загальної кількості холестеролу тіла [204]. Основна частина холестеролу мозку (близько 70 – 80 %) міститься в утвореній олігодендроцитами мієліновій оболонці. Решта розподілена поміж астроцитів та нейронів і слугує для підтримки синаптичної трансмісії [205]. Холестерол не тільки важливий структурний компонент клітинної мембрани та мієлінової оболонки, але й необхідна речовина для формування синапсів та дендритів [206].

Холестерол необхідний для фізіологічного розвитку нейронів у пренатальному і у дорослому віці. Холестерол необхідний для розвитку ЦНС, процесу синаптогенезу, підтримки синаптичної організації, рециклінгу синаптичних везикул [207]. Значне зниження вмісту холестеролу у мембрані нейронів призводить до погіршення їхньої активності, екзоцитозу синаптичних везикул та нейротрансмісії [208, 209]. Численні літературні дані свідчать, що зниження рівня холестеролу призводить до змін у розподілі іонних каналів та білків, беручих участь у екзоцитозі [210], багатьох рецепторів [211] та транспортерів нейромедіаторів у плазматичній мембрані [212]. Активність кальцієвих, натрієвих та калієвих каналів також залежить від рівня холестеролу в мембрані. Порушення метаболізму холестеролу призводять до структурних та функціональних нервових захворювань, таких як хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона, хвороба Німана-Піка типу С, хвороба Гантінгтона [213].

Молекули холестеролу розподілені у мембрані нерівномірно, вони сконцентровані у мікродоменах ліпідних рафтів. Ліпідні рафти – це високодинамічні мікродомени (розміром від 10 до 200 нм) мембран, збагачені холестеролом і сфінголіпідами. Холестерол відіграє важливу роль у формуванні біологічної мембрани як складовий компонент ліпідних рафтів, які виступають платформами для організації та взаємодії протеїнів, залучених до виконання багатьох клітинних функцій [214, 215]. У нейронах

ліпідні рафти залучені до підтримки функцій синапсу: перенесення нейротрансмітерів до терміналі аксону, регуляція екзоцитозу, організація нейротрансмітерних рецепторів [216–218]. Зокрема, було встановлено, що NMDA-, AMPA-, GABA- та ацетилхолінові рецептори пов'язані з ліпідними рафтами [219, 220].

Ліпідні рафти контролюють організацію та взаємодію білків, які приймають участь у транспортуванні везикул, сигнальних механізмах та формуванні цитоскелету [216, 221]. Ліпідні рафти містять ряд білків, які тимчасово асоціюють з іонотропними рецепторами, модифікуючи їх властивості: аффіність до ліганду, активність або ефективність агоністів [222]. Є дані, що ліпідні рафти критично важливі для збудливої нейропередачі, оскільки впливають на регуляцію функцій іонотропних глутаматних рецепторів [223]. Велика кількість білкових молекул, що беруть участь у процесі нейротрансмісії, локалізовані у ліпідних рафтах. Білки SNAP-25, VAMP2 та синтаксин, які задіяні у процесі екзоцитозу, асоційовані з ліпідними рафтами [224].

Порушення рівня холестеролу призводить до поступової втрати інгібіторних і збудливих властивостей синапсу [219], що свідчить про значимість ліпідних рафтів у морфології та функціонуванні нейронів [225, 226]. Руйнування ліпідних рафтів може відбуватись шляхом видалення холестеролу індукованими сполуками циклодекстринами, родиною циклічних олігосахаридів у формі усічених конусів із зовнішньою гідрофільною поверхнею та ліпофільною внутрішньої порожниною [227, 228]. Пряма дія циклодекстринів на клітину призводить до видалення з клітинної мембрани холестеролу та фосфоліпідів, а також деяких білків, модифікуючи, таким чином, молекулярний склад мембрани і, як наслідок, її властивості [227].

Для маніпуляцій з холестеролом використовується метил- β -циклодекстрин (M β CD), метильований циклічний олігосахарид, у складі якого сім молекул β (1-4)-глюкопіранози [229]. Зовнішня поверхня молекули

М β CD гідрофільна, а метильні групи, розташовані усередині, утворюють гідрофобну порожнину, тому він добре розчиняється у воді і може утворювати водорозчинні комплекси з холестеролом та іншими гідрофобними речовинами. Молекула М β CD проявляє гідрофобні та гідрофільні властивості. М β CD легко інкапсулює холестерол у гідрофобну порожнину, тоді як гідрофільний зовнішній шар робить увесь комплекс М β CD-холестерол водорозчинним [229]. Афінність М β CD до холестеролу значно більша у порівнянні з іншими ліпідами. Оскільки М β CD планують застосовувати у медицині, то мають бути розроблені шляхи його перенесення та легкого видалення із тканин, у цьому сенсі застосування наночастинок є найбільш перспективним напрямком.

Магнітні наночастинок стають дедалі популярнішими у багатьох сферах як магнітні сенсори, каталізатори, імуноаналізатори, високочутливі індикатори діагностики патогенних мікроорганізмів, цілеспрямовані транспортери ліків та транспортери клітин при лікуванні, регенерації тканин при ішемічній хворобі серця, інсульту, раку та ін. [230, 231]. Синтетичні засоби отримання таких частинок, в основному, включають осадження, термічний розпад металоорганічних сполук, гідротермічну обробку та бактеріальний синтез [232]. Нещодавно магнітні наночастинок за допомогою іммобілізаційних методів були модифіковані циклодекстринами [233]. Нині відбувається інтенсивна розробка та впровадження методів використання МCD та їхніх похідних у нанотехнології, фармакологію та медицину. Поєднання речовин доречно для отримання водорозчинних форм гідрофобних препаратів, які мають більшу біодоступність та хімічну стабільність [234, 235]. Важливо зазначити той факт, що циклодекстрини, за умов їх використання як переносників лікарських препаратів, значно полегшують потрапляння ліків до клітин мозку [234]. Зокрема, екстракція холестеролу з плазматичної мембрани та його подальше видалення з нервових клітин з використанням зовнішнього магнітного поля, видається перспективним методом лікування нейрологічних розладів та нейропротекції

при ішемії та інсульті головного мозку. Ці необхідні умови можна отримати, використовуючи магнітні наночастинки, покриті холестеролвидаляючими матеріалами. Таким чином, використання MCD у якості акцептору для маніпуляції рівнем холестеролу у мембрані нервових терміналей є адекватним та загальноприйнятим методичним підходом.

Резюмуючи дані впливу на основні нейрохімічні показники гіпотермії, нейромодуляторних речовин та їх синергетичної дії, розуміння механізму та обґрунтування можливих перспективних шляхів застосування у медицині для подолання наслідків порушення при гіпоксичних/ішемічних станах є вкрай важливим та цікавим напрямком сучасної нейрохімії.

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкти дослідження

Експерименти проводили на препаратах нервових терміналей, отриманих 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). Тварин декапітували та виділяли великі півкулі головного мозку, з яких одержували препарат синаптосом.

2.2. Реактиви, застосовані у дослідженнях

В експериментах були використані реактиви:

1. EGTA, EDTA, HEPES, Tris, D-глюкоза, АТФ, D-аспарат, L-глутамат, MCD, олігоміцин, ротенон («Sigma-Aldrich», США).
2. L-[¹⁴C]глутамат, сцинтиляційні рідини ACS і OCS («Amersham Bioscience», Великобританія).
3. SDS («Fluka», США).
4. C₁₂H₂₂O₁₁, NaCl, KCl, MgCl₂, NaH₂PO₄, CaCl₂, NaOH («Завод химических реактивов», Україна).
5. Родамін 6G («Molecular Probes», США).

Ступінь чистоти реактивів був класифікований як ч.д.а. та о.с.ч.

2.3. Виділення препарату нервових терміналей

Щурів декапітували, великі півкулі мозку швидко переносили у льодяний розчин 0,32 М сахарози, 5 мМ Hepes-NaOH, рН 7,4, та 0,2 мМ ЕДТА. Усі маніпуляції проводили при 4 °С. Препарат нервових терміналей, синаптосом, виділяли з гомогенату мозку диференційним центрифугуванням і центрифугуванням у градієнті фіколла за методом Котмана [236] з незначними модифікаціями [237]: розчин сахарози для приготування градієнта фіколла містив 5 мМ Hepes-NaOH і 0,2 мМ ЕДТА, рН 7,4. Отриману синаптосомальну фракцію розводили 10-ма об'ємами 0,32 М сахарози, 5 мМ Hepes-NaOH, рН 7,4, та центрифугували при 20 000 g протягом 20 хв. Отриманий осад повільно ресуспендували в 5 мл оксигенованого холодного сольового розчину, у складі якого 126 мМ NaCl; 5 мМ KCl; 1,4 мМ MgCl₂, 1,0 мМ NaH₂PO₄; 20 мМ HEPES (рН 7,4); 10 мМ D-глюкози. Отриманий препарат використовували в експериментах протягом 2 – 4 годин після виділення. У Ca²⁺-вмісному середовищі містилось 2 мМ CaCl₂, у безкальцієвому – 1 мМ ЕГТА без іонів Ca²⁺. Концентрацію білка визначали за методом Ларсона [238].

2.4. Зниження вмісту холестеролу у синаптосомах

Холестерол видалявся шляхом інкубації синаптосом у розчині 15 мМ MCD упродовж 10-ти хвилин відповідно до методики [11], після цього оброблені синаптосоми розводили 10-ма об'ємами льодяного оксигенованого безкальцієвого стандартного сольового розчину та центрифугували 5 хв при 2500 g. Супернатант ретельно видаляли, а осад ресуспендували в стандартному сольовому розчині до кінцевої концентрації 1 мг протеїну/мл та відразу використовували в експериментах.

2.5. Визначення розміру синапсом методом фотонної кореляційної спектроскопії

Розмір синапсом досліджували методом фотонної кореляційної спектроскопії на лазерному кореляційному спектрометрі «ZetaSizer-3» (Malvern Instrument, Великобританія), обладнаного He-Ne лазером ЛГН-111 (P=25 мВт, $\lambda=633$ нм). Лазерний кореляційний спектрометр обладнаний багато обчислювальним корелятором типу 7032 CE. Діапазон вимірювання приладу становить від 1 нм до 50 мкм. Робота даного спектрометру дозволяє аналізувати кореляційні характеристики флуктуації інтенсивності динамічно розсіяного світла при проходженні лазерного променя через середовище. Вимірювання кореляційної функції флуктуацій інтенсивності розсіяного світла та інтегральної інтенсивності розсіювання дозволяє визначити коефіцієнт трансляційної дифузії дисперсних часток у рідинах. За рівнянням Стокса-Ейнштейна визначали розподілення часток у рідинах за розміром. Коефіцієнт трансляційної дифузії D частинок пов'язаний з тривалістю кореляції τ_c співвідношенням:

$$Dq^2 = 1/\tau_c, \quad (2.1)$$

Хвильовий вектор флуктуації концентрації q визначається співвідношенням:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right), \quad (2.2)$$

де: n – показник заломлення середовища (рідини);

λ_0 – довжина хвилі випромінювання;

θ – кут розсіювання.

Використовуючи формулу Стокса-Ейнштейна, яка пов'язує розмір частинок з їхнім коефіцієнтом трансляційної дифузії і в'язкістю рідини, розрахували розмір сферичних частинок:

$$d(H) = \frac{k_B \cdot T}{3\pi\eta D}, \quad (2.3)$$

де: k_B – стала Больцмана;

T – абсолютна температура, К;

η – динамічна в'язкість середовища, в якому суспендовані частинки;

D – коефіцієнт трансляційної дифузії.

Досліджувану суспензію в об'ємі 1 мл вміщували в циліндричну оптичну кювету з кварцу діаметром 10 мм, яку вводили в лунку лазерного кореляційного спектрометру з підтриманням сталої температури. Реєстрацію та статистичну обробку лазерного випромінювання, розсіяного від водної ($n = 1,33$) суспензії наночастинок, проводили багаторазово протягом 120 с при температурі 22 °С під кутом розсіювання 90°.

Отримані результати вимірювань обробляли за допомогою сервісної комп'ютерної програми PCS-Size mode v1.61.

2.6. Визначення накопичення глутамату синаптосомами

Накопичення L-[¹⁴C]глутамату синаптосомами визначали за алгоритмом: зразки суспензії синаптосом об'ємом 125 мкл з концентрацією білка 250 мкг/мл преінкубували у сольовому розчині Кребса-Рінгера, який містив: 126 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ NaH₂PO₄, 1,4 мМ MgCl₂, HEPES 20 мМ, 10 мМ глюкози, протягом 8 хв при 37 °С для відновлення іонних градієнтів на мембрані. Для створення гіпотермічних умов суспензію синаптосом охолоджували до 27 °С або 17 °С. Крім того, проводили виміри без

попереднього нагрівання синаптосом до 37 °С. В таких експериментах холодні синаптосоми (4 °С) відразу нагрівали до 17 °С, 27 °С або 37 °С. В випадках помірної і глибокої гіпотермії процес накопичення ініціювали додаванням суміші L-глутамату та L-[¹⁴C]глутамату (0,1 мкКі / мл 420 нМ) з подальшим інкубуванням протягом 1 хв, після чого швидко осаджували в мікроцентрифузі «Eppendorf» (20 с при 10000 g). Накопичення L-[¹⁴C]глутамату синаптосомами визначали вимірюванням радіоактивності в аліквотах надосаду (100 мкл) 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) (1,5 мл) [13, 239, 240].

Дані одержували незалежними експериментами, що повторювалися тричі з різними препаратами синаптосом.

2.7. Визначення вивільнення глутамату синаптосомами

Для визначення вивільнення L-[¹⁴C]глутамату препарат синаптосом розводили у стандартному сольовому розчині до концентрації 2 мг білка/мл та після преінкубації протягом 10 хв при 37 °С навантажували L-[¹⁴C]глутаматом (1 нмол/мг білка, 238 мКі/мМоль) в кальцієвому оксигенованому середовищі протягом 10 хв. Після навантаження суспензію синаптосом розводили 10 об'ємами льодяного оксигенованого безкальцієвого стандартного сольового розчину та центрифугували 5 хв при 4000 g. Осад ресуспендували у стандартному сольовому розчині до кінцевої концентрації 1мг протеїну/мл та одразу використовували в експериментах визначення вивільнення глутамату.

Зразки (125 мкл суспензії синаптосом, 0,5 мг протеїну/мл) інкубували в безкальцієвому стандартному сольовому розчині 8 хв при 37 °С для відновлення іонних градієнтів, після чого синаптосоми охолоджували до 27 °С або 17 °С. У експериментах без попереднього нагрівання синаптосом до 37

°C холодні синаптосоми відразу нагрівали до 17 °C, 27 °C або 37 °C. Після створення гіпотермічних умов синаптосоми інкубували протягом 6 хв (KCl та FCCP додавали на початку інкубування) та швидко осаджували в мікроцентрифугі «Eppendorf» 20 с при 10000 g. Вивільнення визначали в аліквотах надосаду (100 мкл) та розчиненого в SDS осаду (100 мкл) на сцинтиляційному лічильнику Tracor Analytic Delta 300 (США) зі сцинтиляційною сумішшю ACS (aqueous counting scintillate – сцинтиляційна рідина для водних зразків) (1,5 мл). Загальна кількість L-[¹⁴C]глутамату в синаптосомах становила 200000±15000 cpm/мг протеїну. Рівень вивільнення нейромедіатора визначали як відсоток від загального вмісту міченого нейромедіатора.

Підвищення позаклітинного рівня L-[¹⁴C]глутамата в суспензії синапсом, що інкубувалися без будь-яких стимулюючих агентів, визначали як базальне вивільнення. Стимульоване вивільнення нейромедіатора визначали як різницю між загальним вивільненням після додавання стимулюючого агента та базальним вивільненням. Застосування високих концентрацій KCl (35 мМоль) призводить до реверсного функціонування транспортерів глутамату та вивільнення глутамату з цитозольного пулу. Так чином робилося транспортер-опосередковане вивільнення глутамату з нервових терміналей. Визначення проводилось у безкальцієвому середовищі за рахунок додавання у середовище інкубації EGTA. Вивільнення глутамату шляхом екзоцитозу визначали як різницю між транспортер-опосередкованим вивільненням у Ca²⁺-вмісному середовищі при концентрації 2 мМоль та транспортер-опосередкованим вивільненням у безкальцієвому середовищі. Таким чином визначалось вивільнення з везикулярного пулу.

2.8. Визначення потенціалу плазматичної мембрани синапсом

Визначення потенціалу плазматичної мембрани синапсом проводили з використанням потенціалчутливого флуоресцентного зонда родаміна 6G,

який зв'язується з плазматичною мембраною синапсом та мембраною мітохондрій в залежності від їх мембранних потенціалів. Щоб виключити внесок мітохондрій у зміну загального рівня флуоресценції синапсом, частину досліджень проводили у присутності блокатора дихального ланцюга мітохондрій ротенону (4 мкМ) та інгібітора мітохондріальної АТР-синтетази олігоміцину (4 мг/мл) у середовищі інкубації. Суспензію синапсом (кінцева концентрація білка складала 0,2 мг/мл) преінкубували у безкальцієвому середовищі, що містило (в мМ): NaCl – 126, KCl – 5, MgCl₂ – 1,4, NaH₂PO₄ – 1,0, NERES – 20, EGTA – 2, D-глюкозу – 10 (рН 7,4) 10 хвилин при 37 °С. Після інкубації суспензію вносили у кварцову кювету для визначення флуоресценції, яка містила родамін 6G (0,5 мкМ). Інтенсивність флуоресценції родаміну 6G визначали за допомогою спектрофлуориметра Hitachi MPF-4 (Японія). Довжина хвилі збудження становила 528 нм, а довжина хвилі емісії – 551 нм (спектральна ширина щілин – 5 нм). Флуоресценцію реєстрували при постійному перемішуванні суспензії синапсом при 30 °С.

Потенціал плазматичної мембрани синапсом оцінювали за інтенсивністю флуоресценції родаміну 6G за формулою:

$$F = F_t/F_0, \quad (2.4)$$

де: F_0 – інтенсивність флуоресценції родаміну 6G за відсутності синапсом у кюветі;

F_t – інтенсивність флуоресценції родаміну 6G за присутності синапсом у кюветі.

2.9. Експерименти з використанням MCD-кон'югованих наночастинок

Наночастинки γ -Fe₂O₃ або MCD- γ -Fe₂O₃, синтезовані відповідно [241], у концентрації 0,75 мг/мл додавали до препарату нервових терміналей, суміш

інкубували при 37 °С упродовж 10 хв. У подальшому після різних часових інтервалів в залежності від методу, синаптосоми швидко відокремлювалися центрифугуванням в мікроцентрифузі (10000 g, 20 с) та визначали показники в аліквотах надосаду (100 мкл). Наночастинки, кон'юговані з МСД, були отримані відповідно до [241].

2.10. Обробка експериментальних результатів з використанням методів математичної статистики

Статистичну обробку проводили, обчислюючи середнє арифметичне вибірки $\langle x \rangle$. Далі обчислювали значення середнього квадратичного відхилення (S_n) за формулою, вказаною нижче [242]. Для визначення достовірності відмінностей між одержаними величинами двох вибірок використовували t-критерій Стюдента [242]. Вірогідними вважали відмінності при $p < 0,05$. Опрацювання і статистичну обробку результатів проводили з використанням програмами Microsoft Excel.

$$S_n = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\langle x \rangle - x_i)^2}{n(n-1)}} , \quad (2.1)$$

де: $\langle x \rangle$ - середнє арифметичне вибірки;

x_i - значення показника у точці;

n – об'єм вибірки.

$$\Delta x = S_n \cdot t , \quad (2.2)$$

де: S_n - середнє квадратичне відхилення;

t - коефіцієнт Стюдента (для довірчої ймовірності $\alpha = 0,95$).

РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Експериментальні підходи для аналізу ключових характеристик нейропередачі за умов норми та гіпоксії

Нейропротекторний механізм, пов'язаний з впливом гіпотермії на позаклітинний рівень та транспорт глутамату, є вкрай актуальним питанням, незважаючи на велику кількість експериментальних даних [243–245]. Нейрозахисний ефект зниженої температури тіла у стані гострого інсульту не має однозначної оцінки і продовжує дискутуватись [246]. Однак, більшість досліджень свідчать про зниження рівня нейродегенеративних процесів при гіпотермії [245, 247, 248]. Проблематичним моментом є відсутність чітких стандартних параметрів терапевтичної гіпотермії [169], а оптимальна температура під час хірургічних операцій залишається до кінця нез'ясованою [6].

Більшість експериментальних методів, які зазвичай застосовуються для аналізу ключових характеристик глутаматергічної нейротрансмісії, не можуть бути використані в дослідженнях, пов'язаних з гіпотермією, оскільки є чутливими до температури. Наприклад, вимірювання мембранного потенціалу та синаптичної ацидифікації везикул [249] з використанням потенціал та рН-чутливих барвників відповідно залежить не лише від температурних змін вищевказаних характеристик, але й від здатності барвника проникати у/через плазматичну мембрану за умов гіпотермії. Такі експериментальні дані можуть бути недостовірними або потребують додаткового контролю. Одним з адекватних методичних підходів, дозволяючих безпосередньо вимірювати температурозалежні зміни пресинаптичного транспорту нейромедіаторів, є використання радіоактивно-мічених нейромедіаторів.

Традиційні методи визначення концентрації глутамату у біологічних зразках включають високоефективну рідинну хроматографію, газову

хроматографію, мас-спектрометрію та спектрофотометрію. Ці методи є чутливими та потужними, але вони потребують дуже дорогого і складного обладнання, яке обмежує їх застосування в експериментальних дослідженнях [250]. Електрохімічні біосенсиори для визначення глутамату швидше, зручніше і дешевше традиційних методів [251]. Крім того, біосенсиори можуть бути мініатюрні для виявлення глутамату в живих тканинах, які не можуть бути досягнуті іншими методами [252]. Таким чином, розробка та застосування глутамат-чутливих біосенсорів - це нова перспектива спрощення процедури аналізу та зниження її ціни, що може призвести до їх більш широкого залучення до нейрохімічних досліджень. Біосенсор не вимагає попереднього навантаження радіоактивним L-[¹⁴C]глутаматом або інших додаткових процедур, і, отже, синаптосомні зразки можна аналізувати без попередньої обробки. Біосенсор безпосередньо вимірює зміни абсолютних значень концентрації ендogenous глутамату у нервових терміналях у відповідь на різну стимуляцію. Крім експериментальної лабораторної роботи, підхід з використанням глутаматного біосенсора може застосовуватися в клініках для нейромоніторингу параметрів, пов'язаних з глутаматом, та концентрації позаклітинного глутамату у зразках мозку, рідині та плазмі крові. У медичній практиці під час проведення нейромоніторингу також є перевага транспортабельності та переносимості біосенсора.

У наших попередніх дослідженнях було оптимізовано біосенсорний метод, оснований на процесі окиснення глутамату до кетоглутарату за рахунок ензиму глутаматоксидази, для моніторингу швидкості накопичення глутамату, який враховує позаклітинний рівень ендogenous глутамату в препаратах нервових терміналей [239]. Цей біосенсор дуже селективний для глутамату, оскільки фермент глутаматоксидаза специфічно каталізує окиснення лише глутамату, а робочий електрод покритий напівпроникною мембраною, що запобігає окисненню інших сполук.

Нами було оптимізовано та верифіціровано біосенсор для дослідження процесів вивільнення глутамату за рахунок екзоцитозу і реверсу глутаматних транспортерів в синапсосомах за умов гіпотермії. Експериментальні дані, отримані за допомогою вимірювання концентрації L-[¹⁴C]глутамату на сцинтиляційному лічильнику Tracor Analytic Delta 300, були підтвержені глутаматним біосенсором [253].

Експерименти щодо аналізу ефектів, викликаних гіпотермією, були поділені на дві серії. Перша – пов'язана з непатологічними процесами в нормальних нервових терміналях, тобто оцінкою накопичення, тонічного вивільнення та рівнем позаклітинного глутамату [254]. Друга серія – пов'язана з патологічним гіпоксія/ішемія-індукованим транспортер-опосередкованим вивільненням глутамату, викликаним деполяризацією плазматичної мембрани нервових терміналей. Цей механізм суттєво сприяє розвитку ексайтотоксичності за умов гіпоксії/ішемії.

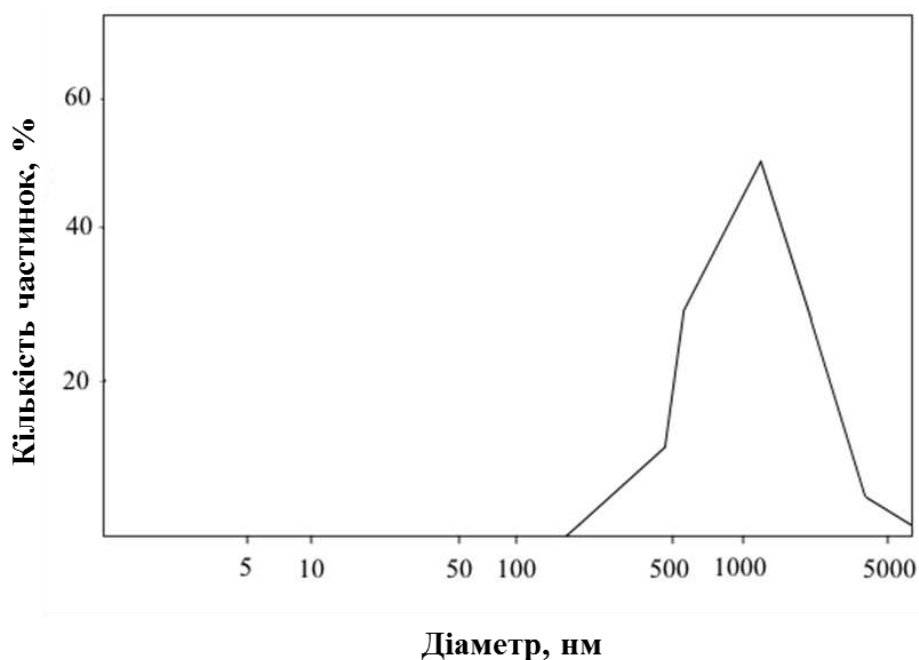
Синапсосоми, виділені із півкуль головного мозку щурів, зберігають основні характеристики інтактних нервових терміналей: здатність підтримувати мембранний потенціал і протонний градієнт синаптичних везикул, здійснювати накопичення та транспортер-опосередковане вивільнення глутамату, екзоцитоз та ін. Синапсосоми вважаються однією з найкращих систем для дослідження пресинаптичних процесів [48]. Умови гіпотермії створювали відповідно Liu та Yenari [169]: помірна (28 – 20°C) та глибока (20 – 5 °C) гіпотермія. Ці температурні режими були вибрані, оскільки даних по ним дуже мало представлено у літературі. А навіть ті дані що є у літературі, що до використання м'якої гіпотермії, мають протилежний характер [255].

3.1.1. Визначення розміру синапсом за умов гіпотермії методом фотонної кореляційної спектроскопії

З метою перевірки впливу температури на розмір синапсом було проведено визначення середнього діаметру ізольованих нервових терміналей методом фотонної кореляційної спектроскопії. Визначення проводили за допомогою лазерного кореляційного спектрометра «ZetaSizer-3» (Malvern Instrument, Великобританія). Вимірювання проводили з використанням трьох препаратів синапсом у трьох повторюваностях.

Результати дослідження засвідчили, що препарати синапсом містять частинки, розмір яких коливався від 0,2 до 20 мкм. Середній діаметр синапсом складав $2,30 \pm 0,30$ мкм у контролі при $+37$ °C. В умовах зниженої температури розміри значуще не відрізнялись і дорівнювали $2,40 \pm 0,10$ мкм при $+27$ °C та $2,30 \pm 0,30$ мкм при $+17$ °C (рис. 3.1.).

А



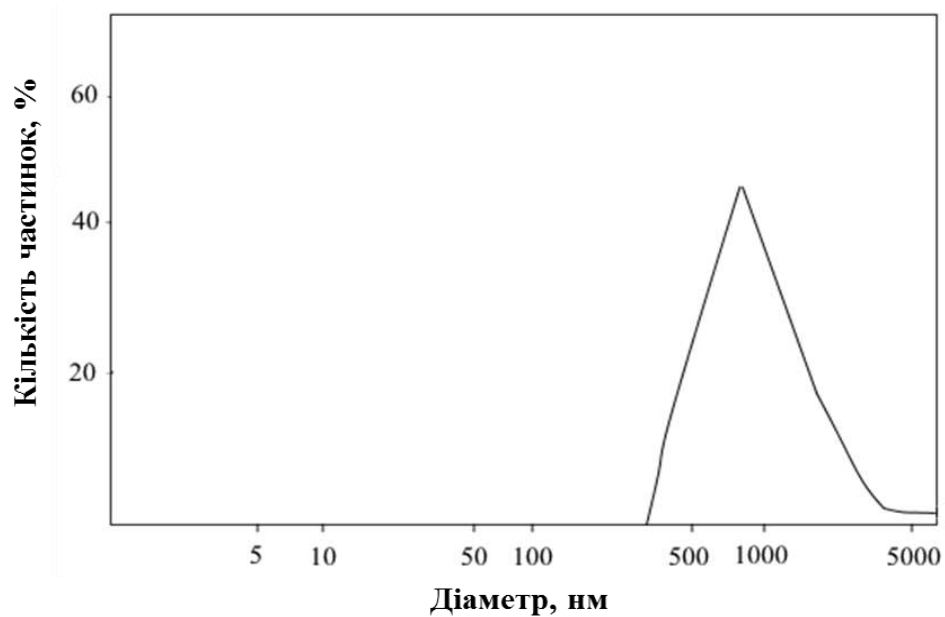
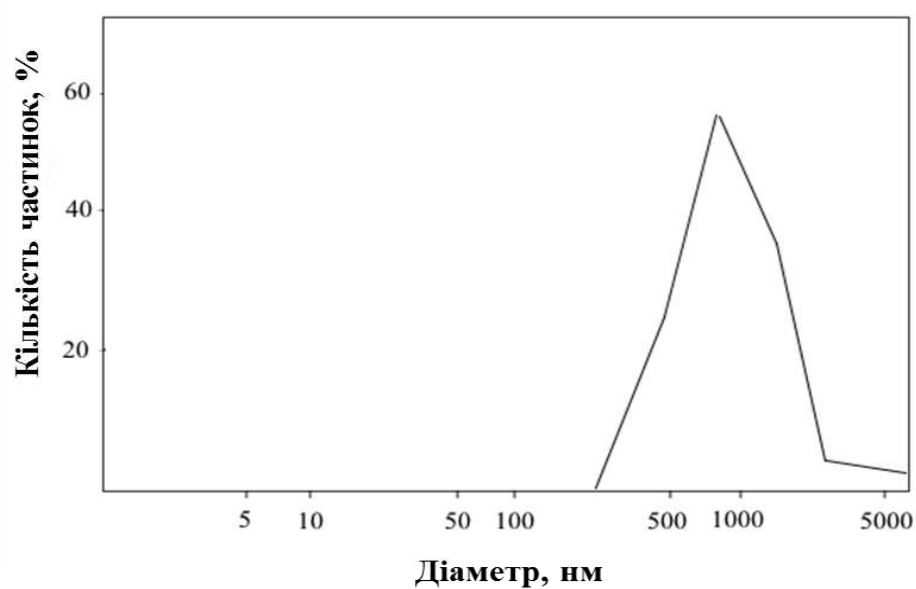
Б**В**

Рис. 3.1. Графік розподілу ізолюваних нервових терміналей за розміром, отриманий методом динамічного розсіювання світла ($n = 5$): **А** – контроль, +37 °C; **Б** – +27 °C; **В** – +17 °C.

Тобто, температура не впливала на розмір синапсом, їх середній діаметр за умов зниження температури не змінювався. Можна зробити висновок, що зміна температури не призводила до агрегації синапсом.

3.1.2. Нестимульоване (тонічне) вивільнення глутамату з синапсом за умов гіпотермії

Рівень позаклітинного глутамату – важливий показник нормального функціонування синапсу і його унікальна індивідуальна характеристика [256]. Зрозуміло, що зміни у рівні позаклітинного L-[¹⁴C]глутамату в різних температурних умовах залежать від динамічного балансу протилежно направлених процесів накопичення та вивільнення глутамату.

Нами оцінювалось тонічне вивільнення глутамату з нервових терміналей – однієї з вищезазначених складових, що визначає рівень позаклітинного глутамату. Тонічне вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з препаратів синапсом фіксували за шість хвилин, починаючи від 8-ї хвилини інкубації до 14-тої хвилини. У випадку підвищення температури дослідження проводили, починаючи з нагрівання синапсом від +4 °C до +17 °C, +27 °C і +37 °C, а в дослідах з охолодженням синапсом – від +37 °C до +27 °C і +17 °C.

Аналіз тонічного вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з синапсом проводили з використанням 6 препаратів синапсом, кожен експеримент був проведений в трьох повторюваностях (рис.3.2.) та засвідчив зменшення цього процесу за умови зниження температур. Дані варіювали від 3,90 до 0,08 відсотків від загального вмісту міченого глутамату і складали:

3,90 ± 0,30 % від загального вмісту міченого глутамату при +37 °C;

0,10 ± 0,08 % від загального вмісту міченого глутамату при +27 °C;

0,74 ± 0,08 % від загального вмісту міченого глутамату при +17 °C ($P < 0.05$, t-тесту Стьюдента, $n = 6$).

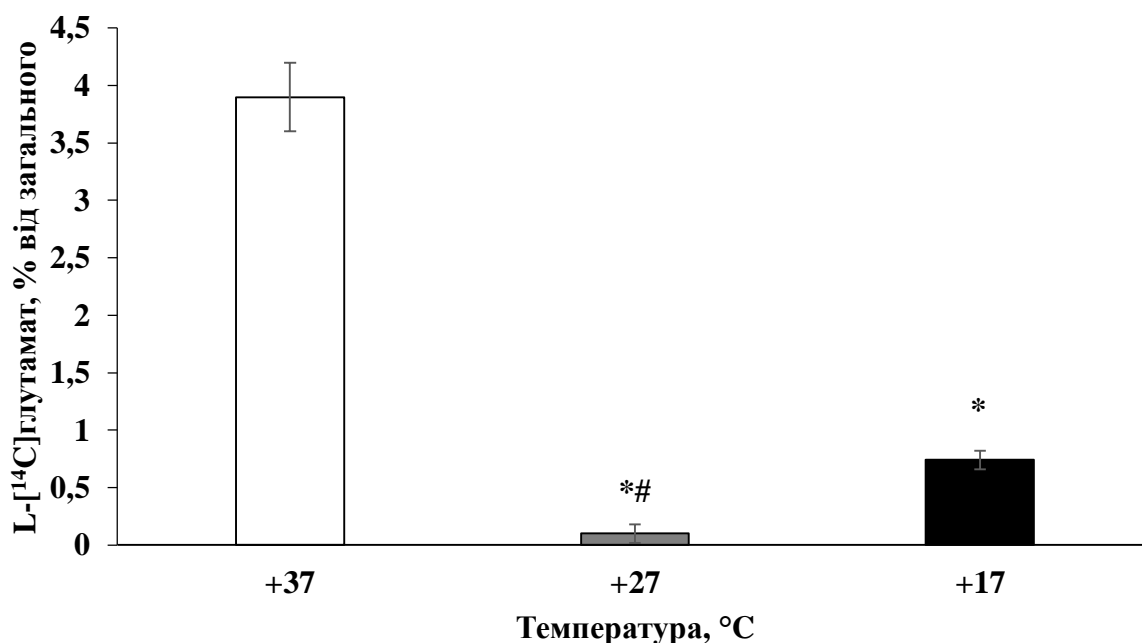


Рис. 3.2. Рівень тонічного вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з синапсом за умов гіпотермії. Вивільнення вимірювалося за 6-ть хвилин. *– $P < 0,05$ у порівнянні з контролем (+37 °C), # – у порівнянні з синапсами при +17 °C.

Таким чином, рівень тонічного вивільнення L-[¹⁴C]глутамату значно знижувався в умовах гіпотермії, і, неочікувано, це зниження було значнішим при помірній (+27 °C), ніж при глибокій (+17 °C) гіпотермії. Оскільки позаклітиний рівень є динамічним балансом між глутаматом, який накопичується, та глутаматом, який точніше вивільнюється, то можна зробити припущення, що на обидві ці характеристики впливає зміна температури.

3.1.3. Транспортер-опосередковане накопичення глутамату нервовими терміналами за умов гіпотермії

Помірна та глибока гіпотермії викликають суттєві зміни початкової швидкості накопичення L-[¹⁴C]глутамату синапсами (рис. 3.3.).

Досліджували 6 препаратів синапсом, кожен експеримент проводився у трьох повторюваностях.

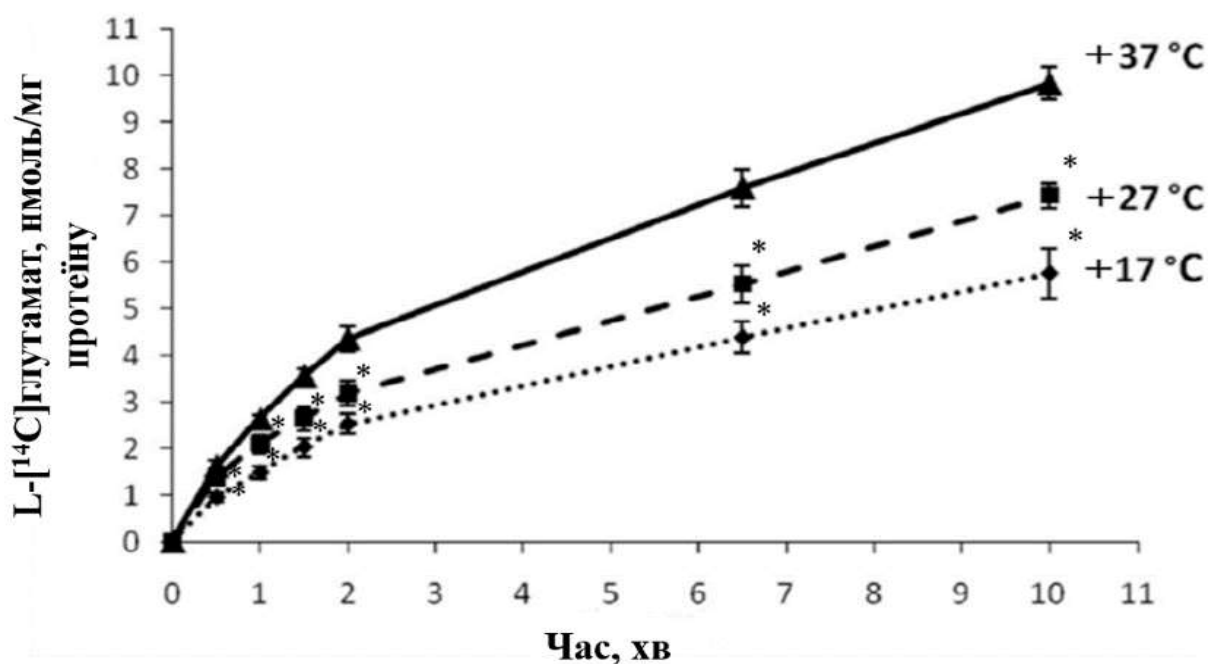


Рис. 3.3. Накопичення L-[¹⁴C]глутамату синапсом, за умов гіпотермії, $M \pm m$ ($n = 6$). * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем (+37 °C)

Початкова швидкість накопичення синапсом L-[¹⁴C]глутамату складала $2,63 \pm 0,08$ нмоль/(хв×мг) протеїну при +37 °C. Зменшення температури до +27 °C спричиняло зниження швидкості накопичення до $2,09 \pm 0,2$ нмоль/(хв×мг) протеїну, а в умовах +17 °C – подальше зниження до $1,48 \pm 0,12$ нмоль/(хв×мг) ($P < 0,05$, t-тесту Стьюдента, $n = 6$).

Накопичення L-[¹⁴C]глутамату синапсом на десятій хвилині складало $9,83 \pm 0,35$ нмоль/мг протеїну (+37 °C), $7,42 \pm 0,27$ нмоль/мг протеїну при +27 °C та $5,75 \pm 0,52$ нмоль/мг протеїну при +17 °C ($P < 0,05$, t-тесту Стьюдента, $n = 6$).

Зміни динаміки накопичення синапсом L-[¹⁴C]глутамату слугують доказом, що помірна та глибока гіпотермія суттєво гальмують зазначений процес.

3.1.4. Рівень позаклітинного L-[¹⁴C]глутамату у препаратах нервових терміналей за умов гіпотермії

Як зазначалося раніше, певна концентрація позаклітинного глутамату в нервових терміналях підтримується протилежно спрямованими процесами накопичення та вивільнення. Рівень позаклітинного L-[¹⁴C]глутамату в препараті синапсом вимірювали на 14-тій хвилині після нагрівання або охолодження синапсом (рис. 3.4.).

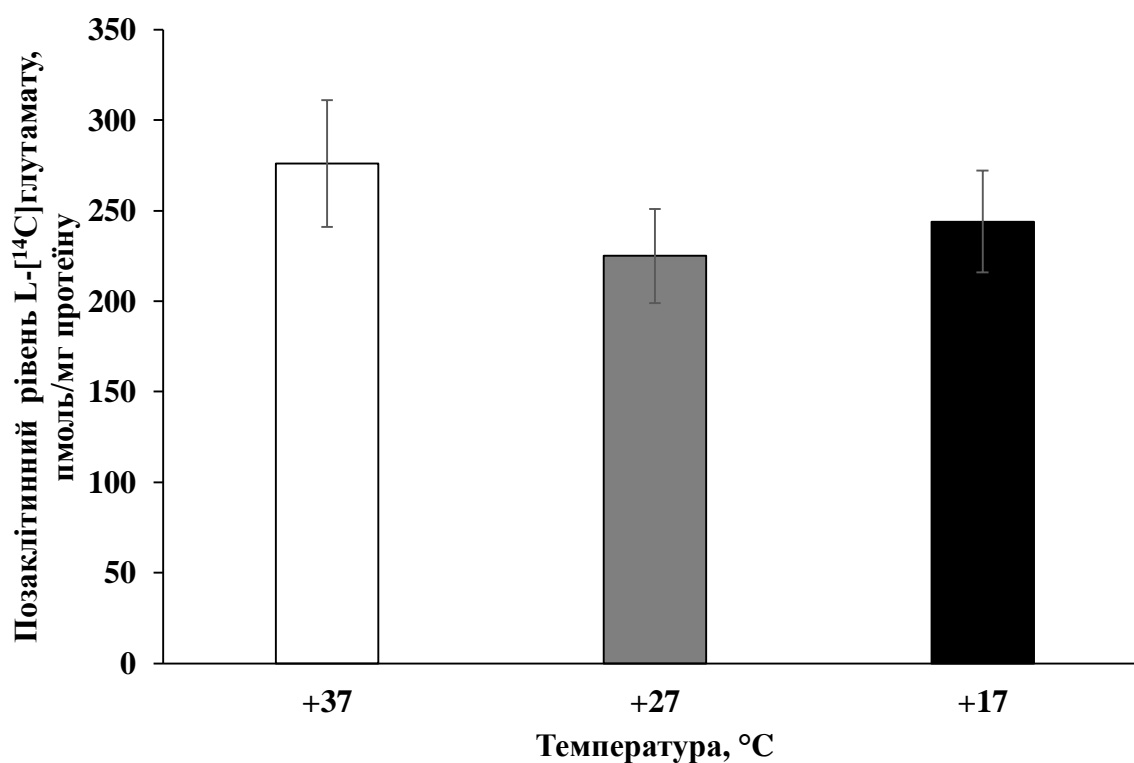


Рис. 3.4. Рівень позаклітинного L-[¹⁴C]глутамату у середовищі інкубації синапсом за умов гіпотермії. Вимірювання проводилось на 14-тій хвилині.

Для отримання репрезентативних експериментальних даних провели понад 30 експериментів (кожен експеримент проводився в трьох повторюваностях) з синапсомними препаратами ізольованими із різних

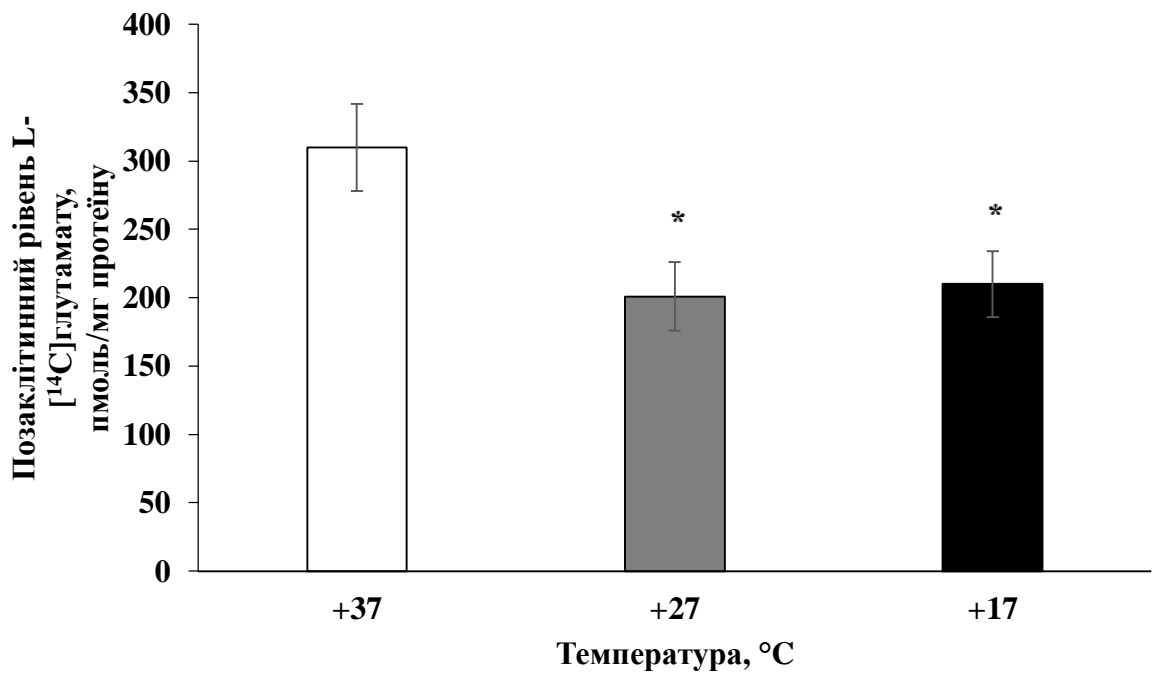
щурів. Така кількісна вибірка є на порядок вище, ніж для звичайних вимірювань за іншими параметрами.

Як свідчать результати (рис. 3.4.), середній рівень позаклітинного L-[¹⁴C]глутамату змінювався у незначній мірі в умовах зниження температури. У чотирнадцятихвилинний термін після нагрівання або охолодження відповідно холодних або теплих синапсом рівень позаклітинного L-[¹⁴C]глутамату сягав $276,0 \pm 32,0$ пмоль/мг протеїну (+37 °C), $225,0 \pm 27,0$ пмоль/мг протеїну – при +27 °C та $244,0 \pm 29,0$ пмоль/мг протеїну – при +17 °C ($n = 30$).

Отримані результати дозволяють зробити висновок, що в порівнянні з суттєвим інгібуванням накопичення та тонічного вивільнення L-[¹⁴C]глутамату, рівень позаклітинного L-[¹⁴C]глутамату змінювався незначно за умов помірної/глибокої гіпотермії. Єдине можливе пояснення цього факту полягає в тому, що тонічне вивільнення зменшувалося з тією ж ефективністю як і накопичення L-[¹⁴C]глутамату в синапсосомах.

В частині дослідів рівень позаклітинного L-[¹⁴C]глутамату знижувався за умов гіпотермії (рис. 3.5., А), в частині – збільшувався (рис. 3.5., Б). Статистичний аналіз експериментальних даних обох груп підтвердив відсутність значимої різниці між контрольними синапсосомами та синапсосомами за умов гіпотермії. Цей факт можна пояснити унікальністю балансу вивільнення/накопичення в кожному синапсі, що визначається індивідуальними синаптичними характеристиками, такими як кількість і розподіл глутаматних транспортерів, ліпідний склад плазматичної мембрани та енергетичний статус нервових терміналей. Як наслідок, у одних тварин зниження накопичення переважає над зниженням тонічного вивільнення L-[¹⁴C]глутамату у нервових терміналях, а у інших – навпаки.

А



Б

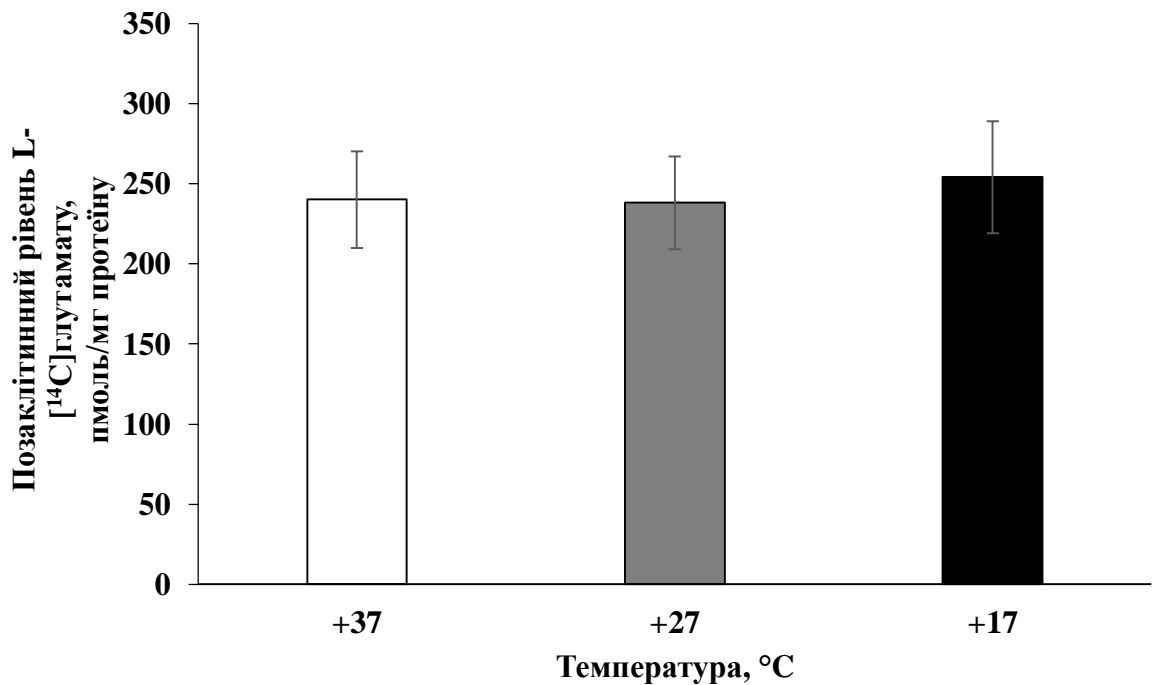


Рис. 3.5. Рівень позаклітинного L-[¹⁴C]глутамату у середовищі інкубації синапсом за умов гіпотермії з тенденцією до зниження (А) і до

зростання (Б). Вимірювання проводилось на 14-тій хвилині. *– $P < 0,05$ у порівнянні з контролем ($+37\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Для оцінки індукованих гіпотермією змін позаклітинного рівня L-[^{14}C]глутамату в препараті нервових терміналей була проведена серія дослідів з блокадою глутаматних транспортерів конкурентним нетранспортабельним інгібітором DL-ТВОА у концентрації 200 мМоль. Зазвичай DL-ТВОА використовується для оцінки внеску глутаматних транспортерів у рівень позаклітинного глутамату, оскільки ця сполука є потужним блокатором транспортерів, який не впливає на метаболічні глутаматні рецептори та має слабкий вплив на іонотропні рецептори [257, 258]. Рівень позаклітинного L-[^{14}C]глутамату в препараті синапсом значно підвищувався за умов гальмування накопичення глутамату. Не було виявлено суттєвої різниці позаклітинного рівня L-[^{14}C]глутамату в препаратах синапсом у присутності блокатора глутаматних транспортерів в умовах помірної та глибокої гіпотермії.

Отже, зміна температури знижує швидкість накопичення позаклітинного глутамату, але не впливає на рівень позаклітинного глутамату, з чого можна зробити висновок, що підтримка певного позаклітинного рівня глутамату відбувається за рахунок внеску іншої компоненти, результати дослідження якої представлено нижче.

Результати проведених досліджень, описані у підрозділі 3.1, було опубліковано у статтях

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;

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

3.2. Вивільнення глутамату з нервових терміналей за умов нейропатологій

3.2.1. Транспортер-опосередковане вивільнення глутамату з нервових терміналей за умов гіпотермії

В умовах гіпоксії, ішемії, інсульту, при травмах мозку, гіпоглікемії тощо, збільшення позаклітинного рівня глутамату викликає нейротоксичність і загибель нейронів. Головним механізмом, який приводить до збільшення концентрації позаклітинного глутамату в зазначених патологічних умовах, слугує транспортер-опосередковане вивільнення [152]. Деполяризація плазматичної мембрани нервових терміналей високою концентрацією KCl у Ca²⁺-вільному середовищі зумовлює реверсну роботу транспортерів глутамату таким чином призводячи до транспортер-опосередкованого вивільнення глутамату з цитозолу. Зниження транспортер-опосередкованого вивільнення є однією з основних стратегій нейропротекції. В цьому сенсі, терапевтична гіпотермія – сильний неспецифічний нейропротектант, який може модулювати активність глутаматних транспортерів та значно знижувати патологічне транспортер-опосередковане вивільнення глутамату з нервових терміналей. Глибока гіпотермія використовується у кардіохірургії при операціях на зупиненому серці для збільшення безпечного часу операції та для нейропротекції мозку за умов штучного кровообігу; терапевтична м'яка та помірна гіпотермії можуть використовуватися в умовах локальної та глобальної ішемії [169].

Нами було показано, що 35мМ KCl-стимульоване вивільнення L-[¹⁴C]глутамату у безкальцієвому середовищі знижується за умов помірної та

глибокої гіпотермії. Аналізувались чотири препарати синапсом, кожен експеримент проводився у трьох повторюваностях. Вивільнення L-[¹⁴C]глутамату, виміряне за 6-ть хвилин (рис. 3.6.), складало $12,0 \pm 1,0$ % від загального вмісту міченого глутамату при +37 °C, $10,0 \pm 0,5$ % від загального вмісту міченого глутамату при +27 °C та $6,0 \pm 0,5$ % від загального вмісту міченого глутамату при +17 °C ($P < 0,05$, t-тесту Стьюдента, $n = 4$).

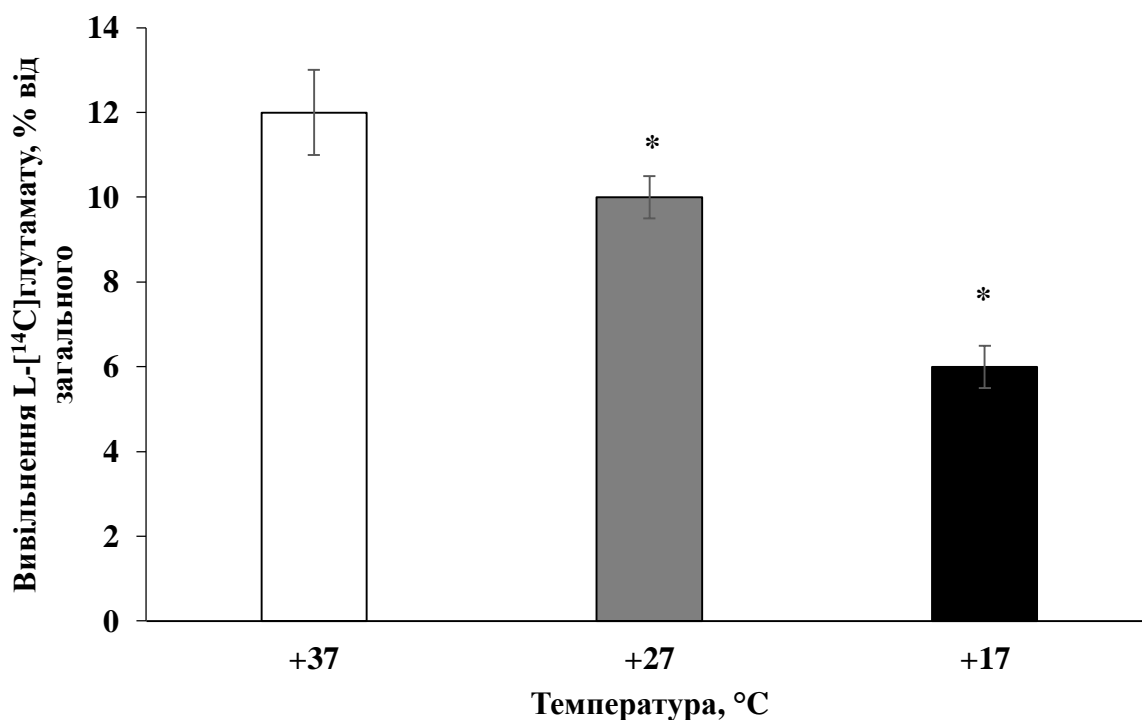


Рис. 3.6. Транспорт-опосередковане вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з нервових терміналей, стимульованих 35 мМ КСІ, за умов гіпотермії. Вивільнення вимірювалося за 6-ть хвилин. * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем (+37 °C).

Гіпотермія-опосередковане зниження спостерігалась і в процесі вивільнення глутамату з нервових терміналей шляхом екзоцитозу (рис. 3.7.). Показники цього вивільнення, виміряного за 6-ть хвилин, склали у контролі $7,0 \pm 1,0$ % від загального вмісту міченого глутамату (+37 °C), при +27 °C – $6,0 \pm 0,6$ % від загального вмісту міченого глутамату, при +17 °C – $4,0 \pm 0,4$ % від загального вмісту міченого глутамату ($P < 0,05$, t-тест Стьюдента, $n = 4$). При побудові графіків використано дані, одержані при

аналізі чотирьох препаратів синаптосом, кожен експеримент проведений у трьох повторюваностях (рис. 3.7.).

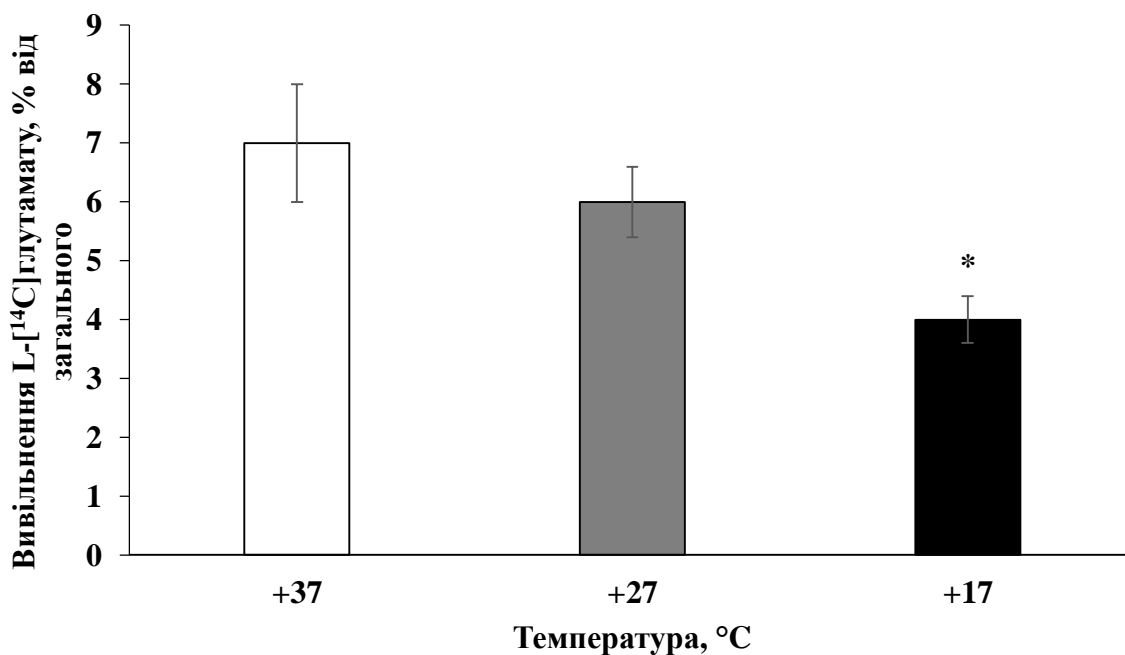


Рис. 3.7. Ca^{2+} -залежне вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з нервових терміналей шляхом екзоцитозу, стимульованого 35 мМ КСІ за умов гіпотермії. Вимірювання проводилось за 6-ть хвилин. *– $P < 0,05$ у порівнянні з контролем (+37 °C).

Таким чином, вивільнення L-[¹⁴C]глутамату як з везикулярного пулу шляхом екзоцитозу, так і з цитозольного пулу синаптосом поступово зменшується за умов помірної та глибокої гіпотермії. Аналогічні дані були отримані з використанням амперометричного біосенсору.

3.2.2. Протонофор-стимульоване вивільнення глутамату з нервових терміналей за умов гіпотермії

Використання протонофору FCCP в експериментах пов'язане з його здатністю розсіювати протонний градієнт синаптичних везикул і пригнічувати накопичення глутамату [237]. Такі умови сприяють збільшенню транспортер-опосередкованого вивільнення L-[¹⁴C]глутамату із синаптосом.

FCCP-стимульоване вивільнення L-[¹⁴C]глутамату із синапсом суттєво пригнічується інгібітором транспортерів DL-TBOA, тому це вивільнення опосередковане транспортерами глутамату.

У серії експериментів (4 препарати синапсом, кожен експеримент проводився у трьох повторюваностях) нами проаналізовано вплив помірної та глибокої гіпотермії на вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з синапсом при застосуванні FCCP. FCCP-стимульоване вивільнення L-[¹⁴C]глутамату за 6-ть хвилин (рис. 3.8.) складало $15,50 \pm 1,0$ % від загального вмісту міченого глутамату (+37 °C), $9,50 \pm 1,0$ % від загального вмісту міченого глутамату при +27 °C та $6,30 \pm 0,50$ % від загального вмісту міченого глутамату при +17 °C ($P < 0,05$, t-тест Стюдента, $n = 4$).

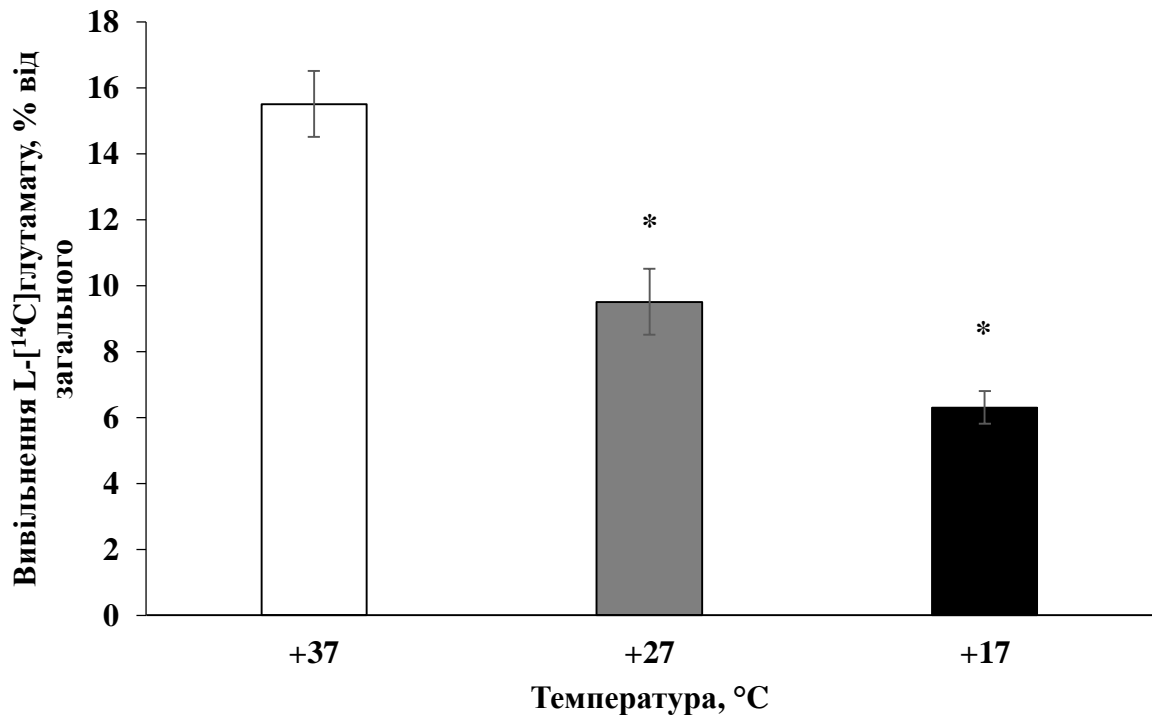


Рис.3.8. 1μМ FCCP-стимульоване транспортер-опосередковане вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з нервових терміналей за умов гіпотермії. Вивільнення вимірювалося за 6-ть хвилин. *– $P < 0,05$ у порівнянні з контролем (+37 °C).

За теоретичними розрахунками, якщо на рівень транспортер-опосередкованого накопичення L-[¹⁴C]глутамату впливають помірні та

глибока гіпотермії і він більший, ніж сума непатологічного транспортеропосередкованого та тонічного вивільнення, не пов'язаного з транспортерами L-[¹⁴C]глутамату, то рівень позаклітинного L-[¹⁴C]глутамату повинен збільшуватися у препараті нервових терміналей і, навпаки, якщо вивільнення є більш чутливим, цей рівень повинен знижуватися.

У серії експериментів було показано, що здатність підтримувати рівновагу $\text{глутамат}_{\text{всередині}}/\text{глутамат}_{\text{ззовні}}$ в умовах гіпотермії, а отже і позаклітинний рівень L-[¹⁴C]глутамату, була індивідуальною характеристикою для кожної тварини. У 50 % експериментів рівень позаклітинного L-[¹⁴C]глутамату знижувався в умовах гіпотермії, а у 50 % – збільшувався. Статистична обробка засвідчила відсутність різниці гіпотермієзалежного зниження у рівні позаклітинного L-[¹⁴C]глутамату у препараті нервових терміналей.

Відсутність достовірної різниці позаклітинного рівня L-[¹⁴C]глутамату в препараті нервових терміналей, незважаючи на зниження накопичення L-[¹⁴C]глутамату в умовах гіпотермії, – важливий факт. За даними експериментів зрозуміло, що компоненти вивільнення (тонічний та непатологічний реверс транспортерів) зумовлюють істотний внесок у створення та підтримку певної концентрації позаклітинного глутамату. Данні щодо змін позаклітинного рівня L-[¹⁴C]глутамату, викликаного гіпотермією, доводять правильність наших припущень щодо індивідуальності та унікальності позаклітинного рівня нейротрансмітеру для кожного синапса [256].

Отже, дію терапевтичної гіпотермії на позаклітинний рівень глутамату в нервових терміналях за нормальних умов, а не в стані гіпоксії/ішемії, передбачити апіорі неможливо. З огляду на вищезазначене, зрозуміло, що зміни позаклітинного рівня глутамату за умов гіпотермії є унікальними для кожного пацієнта, тому слід застосовувати індивідуальний підхід для кожного випадка, тобто проводити нейромоніторинг і на основі його призначати лікування.

Отримані нами дані узгоджуються з результатами Boris-Möller F., Wieloch T. [259], виявившими зниження рівня глутамату тільки в стріатумі, тоді як у кортикальній зоні, де він хоч і був меншим від базового, проте не знижувався в умовах гіпотермії. Втім, експериментальні дані не узгоджуються з вимірами мікродіалізу, де концентрація глутамату у діалізаті тканин головного мозку не уражених інфарктом в умовах легкої гіпотермії зменшувалась від 3,6 до 2,6 моль/л [244]. В наших експериментах була виявлена лише тенденція до зниження позаклітинного рівня L-[¹⁴C]глутамату у препаратах нервових терміналей.

У частині досліджень вивчалось транспортер-опосередковане вивільнення L-[¹⁴C]глутамату, індуковане деполяризацією мембрани та FCCP. Розвиток нейротоксичності при інсульті, церебральній гіпоксії та ішемії, кардіохірургії з зупинкою циркуляції крові та травм головного мозку, зумовлені надлишковим позаклітинним глутаматом. Це виникає головним чином як результат реверсного функціонування глутаматних транспортерів [152]. У проведених дослідках було продемонстровано поступове зниження від помірної до глибокої гіпотермії транспортер-опосередкованого вивільнення L-[¹⁴C]глутамату стимульованого деполяризацією плазматичної мембрани 35 мМ KCl та дисипацією протонного градієнта синаптичних везикул протонофором FCCP.

Цей факт свідчить про поступовий нейропротекторний ефект, який збільшується від помірної до глибокої гіпотермії в ураженій зоні після гіпоксії/ішемії. Результати експериментальних даних співпадають з результатами Nakashima K., Todd M. [260], які, аналізуючи концентрацію глутамату у діалізаті, показали, що індуковане ішемією збільшення концентрації глутамату інгібується низькою температурою і змінюється від $58,4 \pm 31,8$ мкмоль/л при 38 °C до $15,9 \pm 8,4$ мкмоль/л при +25 °C. Також наші результати підтверджуються іншими дослідженнями [244], де автори продемонстрували, що у діалізаті концентрація глутамату в тканинах, де

відбувся інфаркт, суттєво змінюється за умов гіпотермії (рівень позаклітинного глутамату 4,8 моль/л порівняно з 12,6 моль/л).

Ми частково погоджуємося з припущенням, що гіпотермія надає нейрозахисну дію за рахунок зниження позаклітинного рівня глутамату в області ураження. Нейропротекторний ефект гіпотермії можемо спостерігати, коли нервові клітини все ще в змозі вивільняти глутамат за рахунок реверсу транспортерів. У значно пошкоджених нервових клітинах вищезгаданий механізм не працює через зниження градієнта глутамата через плазматичну мембрану, а саме $\text{глутамат}_{\text{всередині}}/\text{глутамат}_{\text{зовні}}$. У цьому контексті важливим є вибір оптимального індивідуального температурного режиму хворого залежно від розміру незворотно пошкодженої зони мозку.

Беручи до уваги вищезазначені факти, нами робиться припущення, що стратегія успішної терапевтичної гіпотермії, з одного боку, полягає у зменшенні її можливого шкідливого впливу на нервові клітини, вражені гіпоксією/ішемією, шляхом стабілізації концентрації позаклітинного глутамату через компоненти, що приводять до рівноваги процесу вивільнення/накопичення, а з іншого – у посиленні її прямого нейропротекторного ефекту за рахунок значного зниження реверсу глутаматних транспортерів. Ці стратегії можуть бути реалізовані шляхом комбінованого поєднання неспецифічних ефектів гіпотермії з іншими неспецифічними та специфічними нейропротекторами.

Результати проведених досліджень, описані в підрозділі 3.2., було опубліковано у статтях:

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;
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

3.3. Гомо- та гетерообмін глутамату

За умов гіпотермії аналізували гомо- та гетерообмін глутамату. Сутність механізмів, які визначають гомо- та гетерообмін глутамату, дотепер залишається неясною, незважаючи на принципове значення цих процесів для підтримки позаклітинного рівня глутамату і значну кількість теоретичних і експериментальних даних щодо функціонування транспортерів глутамату. Теоретичні розрахунки вказують, що гомо- та гетерообмін мають спільну швидкість-лімітуючу стадію з транспортер-опосередкованим вивільненням глутамату [261, 262]. Реверсна робота глутаматних транспортерів визнана основним механізмом, який спричиняє ексайтотоксичність в умовах зниження концентрації енергетичних субстратів. Питання стосовно транспортер-опосередкованого вивільнення глутамату у нормальних фізіологічних умовах залишається відкритим.

На сьогодні відсутні вичерпні експериментальні докази фізіологічної значущості реверсу глутаматних транспортерів [263]. Глутамат може бути вивільнений через транспортери в умовах фізіологічної деполяризації плазматичної мембрани, тим самим приймаючи участь у регуляції нейропередачі [263]. Деполяризація мембрани призводить до тимчасового значного збільшення позаклітинної концентрації глутамату, вивільненого екзоцитозом, і транспортери таким чином можуть працювати за механізмом гомообміну. На думку авторів [262], кінетика Міхаеліса-Ментена (загальноприйнятий показник при дослідженні транспортерів) не включає у себе реверс транспортерів і повністю ігнорує можливість рівноваги між концентраціями субстрату з обох сторін мембрани. Зазначений факт привів до розробки комплексної двосубстратної кінетичної моделі, яка включала реверс транспортерів. Один субстрат може призвести до вивільнення іншого,

локалізованого всередині клітини [262], і, коли обидва субстрати знаходяться у рівновазі, додавання будь-якого з них призводить до зміни рівноваги і вивільнення іншого субстрату.

Нами доведена важливість та ефективність постійного позаклітинного / внутрішньоклітинного обміну глутамату в нервових терміналях: внутрішньоклітинний синаптосомальний L-[¹⁴C]глутамат заміщувався 100 мкМ глутаматом, доданим до середовища інкубації синаптосом (аналізували гомообмін), та 100 мкМ D-аспартатом або DL-ТНА (аналізували гетеробмін) в нормальних умовах та в умовах гіпотермії [264]. Швидкий транспортер-опосередкований обмін позаклітинного/внутрішньоклітинного глутамату в нервових закінченнях був зафіксований у даному дослідженні.

Для аналізу температурної чутливості гомо- та гетеро-обміну глутамата у нервових терміналях застосовували гіпотермію. Нами була проаналізована динаміка викликаних гіпотермією змін гомообміну (глутамат-індуковане вивільнення L-[¹⁴C]глутамату) та гетерообміну (D-аспартат- та DL-трео-β-гідроксі-аспартат (DL-ТНА)-індуковане вивільнення L-[¹⁴C]глутамату) у нервових терміналях і тонічне вивільнення L-[¹⁴C]глутамату у присутності DL-трео-β-бензилоксіаспартату (DL-ТВОА).

3.3.1. Глутамат-індуковане вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з нервових терміналей за умов гіпотермії

Конкуруючий нетранспортабельний інгібітор глутаматних транспортерів DL-ТВОА у концентрації 200 мкМ пригнічував початкову швидкість накопичення L-[¹⁴C]глутамату приблизно на $80,0 \pm 2,7$ %. Глутамат у концентрації 100 мкМ, доданий до середовища інкубації синаптосом, стимулював вивільнення навантаженого L-[¹⁴C]глутамату за рахунок гомообміну. Зазначений параметр розраховувався як різниця між значеннями позаклітинного рівня L-[¹⁴C]глутамату перед додаванням 100

мкМ глутамату та після інкубації з ним на 6-тій хвилині, починаючи з восьмої до чотирнадцятої хвилини.

DL-TBOA протягом однієї хвилини інкубації знижував глутамат-індуковане вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з нервових терміналей, таким чином віддзеркалюючи внесок глутаматних транспортерів у процесі гомообміну (рис. 3.9.).

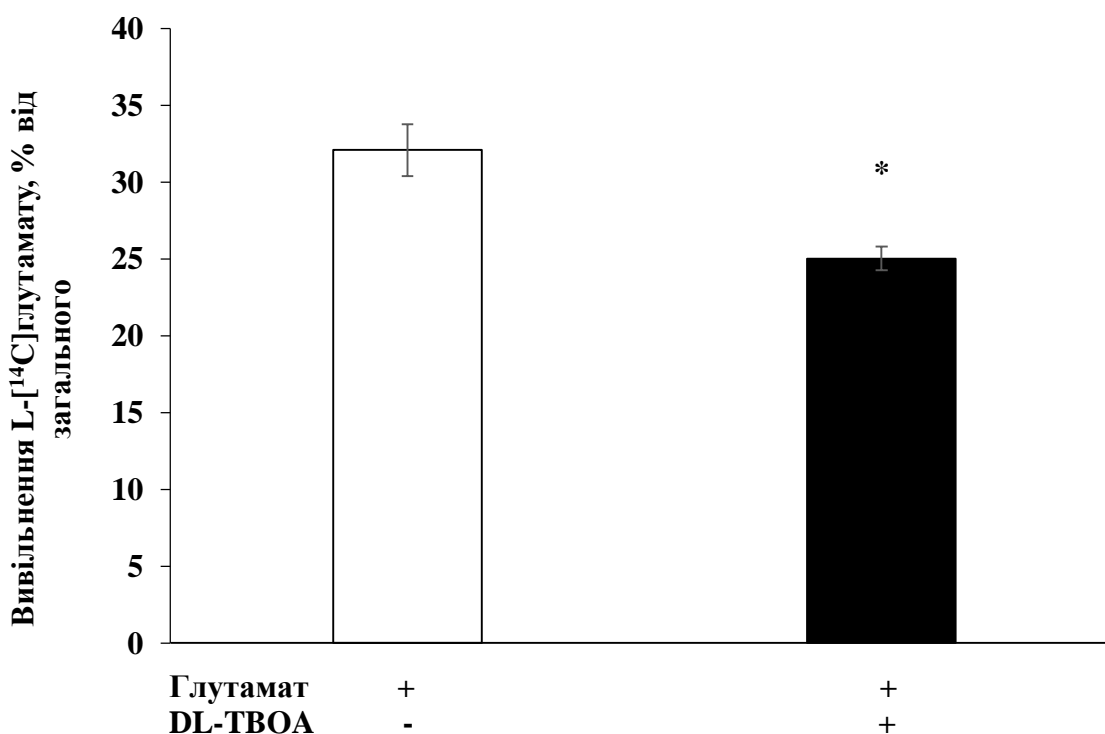


Рис. 3.9. 100 мкМ глутамат-індуковане вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з нервових терміналей. Вивільнення вимірювалося за 6-ть хвилин. .*– $P < 0,05$ у порівнянні з контролем (+37 °C).

100 мкМ глутамат-індуковане вивільнення L-[¹⁴C]глутамату (рис. 3.10.) значно знижувалось за умов гіпотермії та складало $31,7 \pm 2,3$ % від загального вмісту міченого глутамату при +37 °C, $22,9 \pm 1,8$ % від загального вмісту міченого глутамату при +27 °C та $12,9 \pm 2,1$ % від загального вмісту міченого глутамату при +17 °C ($P < 0,05$, t-тесту Стьюдента, $n = 4$).

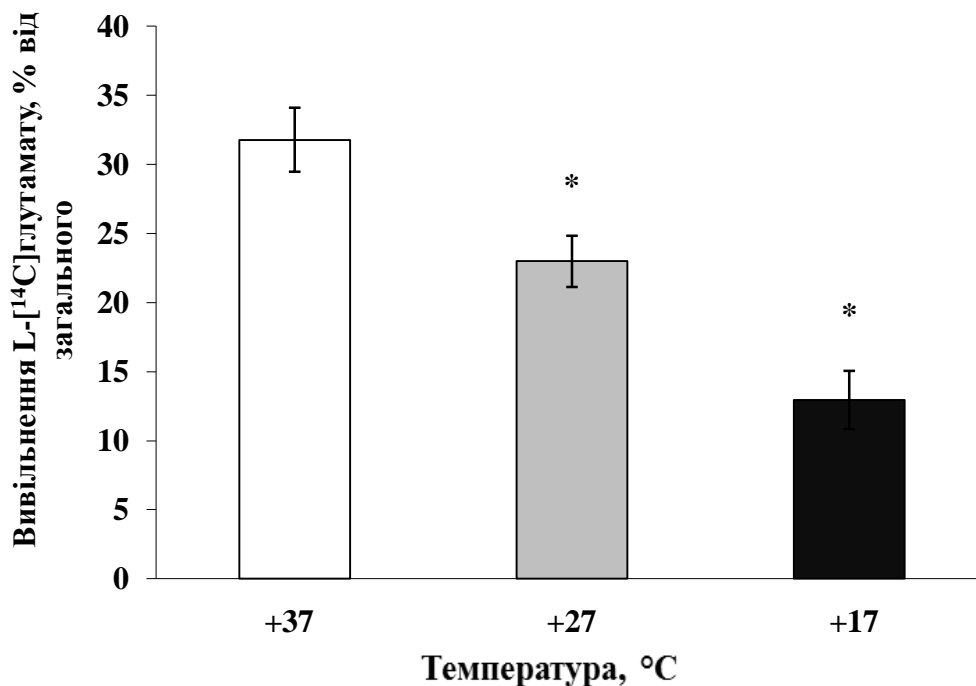


Рис. 3.10. Глутамат-індуковане вивільнення L-[¹⁴C]глутамату за умов гіпотермії. Вивільнення вимірювалося за 6-ть хвилин. *- P < 0,05 у порівнянні з контролем (+37 °C).

Таким чином, DL-TBOA частково блокує процес гомообміну глутамату за рахунок інгібування функціонування глутаматних транспортерів. Також відбувається зниження глутамат-індукованого вивільнення L-[¹⁴C]глутамату при помірній та глибокій гіпотермії.

3.3.2. Аспартат-індуковане вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з нервових терміналей за умов гіпотермії

Для стимуляції гетерообміну був використаний D-аспартат - аналог глутамату, що не метаболізується. Додавання D-аспартату у концентрації 100 мкМ до L-[¹⁴C]глутамат-навантажених синапсом призводить до значного вивільнення L-[¹⁴C]глутамату, величина якого складала $25,9 \pm 2,2$ % від загального вмісту міченого глутамату при +37 °C за 6-ть хвилин, починаючи з восьмої до чотирнадцятої хвилини (рис. 3.11.). Гетерообмін L-

[¹⁴C]глутамату значно знижувався від помірної до глибокої гіпотермії і складав $20,4 \pm 2,0$ % від загального вмісту міченого глутамату при $+27$ °C та $11,2 \pm 1,2$ % від загального вмісту міченого глутамату при $+17$ °C. Експериментальні дані отримували, аналізуючи чотири препарати синапсом. Кожен експеримент проводився у трьох повторюваностях.

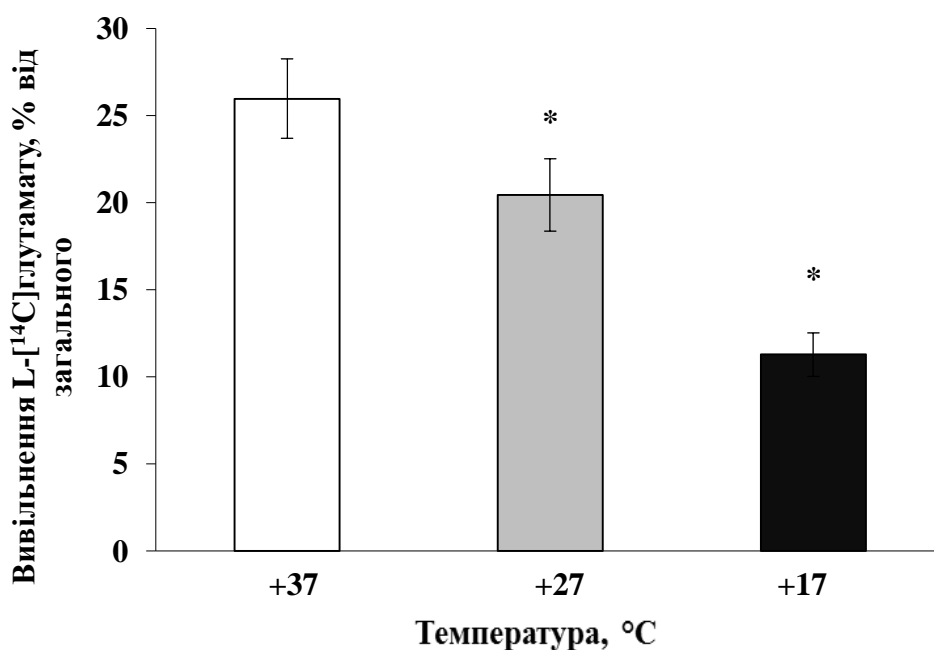


Рис. 3.11. Аспартат-індуковане вивільнення L-[¹⁴C]глутамату за умов гіпотермії. Вивільнення вимірювалося за 6-ть хвилин. *- P < 0,05 у порівнянні з контролем (+37 °C).

Таким чином, аспартат-індуковане вивільнення L-[¹⁴C]глутамату значно зменшується при помірній та глибокій гіпотермії.

3.3.3. DL-ТНА-індуковане вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з нервових терміналей за умов гіпотермії

Також для стимуляції гетерообміну був використаний DL-ТНА - аналог глутамату, який не накопичується у синаптичних везикулах. Вивільнення L-[¹⁴C]глутамат за рахунок гетерообміну з конкуруючим транспортабельним

інгібітором глутаматних транспортерів DL-ТНА (100 мкМ) знижувалося від $21,5 \pm 0,9$ % від загального вмісту міченого глутамату при $+37$ °С до $16,1 \pm 0,5$ % від загального вмісту міченого глутамату при $+27$ °С та $6,1 \pm 0,5$ % від загального вмісту міченого глутамату при $+17$ °С (рис. 3.12.). Аналізували чотири препарати синапсом, кожен експеримент проводився у трьох повторюваностях. Динаміка зниження DL-ТНА-індукованого гетерообміну за умов гіпотермії співпадає з динамікою глутамат- та аспартат-стимульованого вивільнення L-[^{14}C]глутамату.

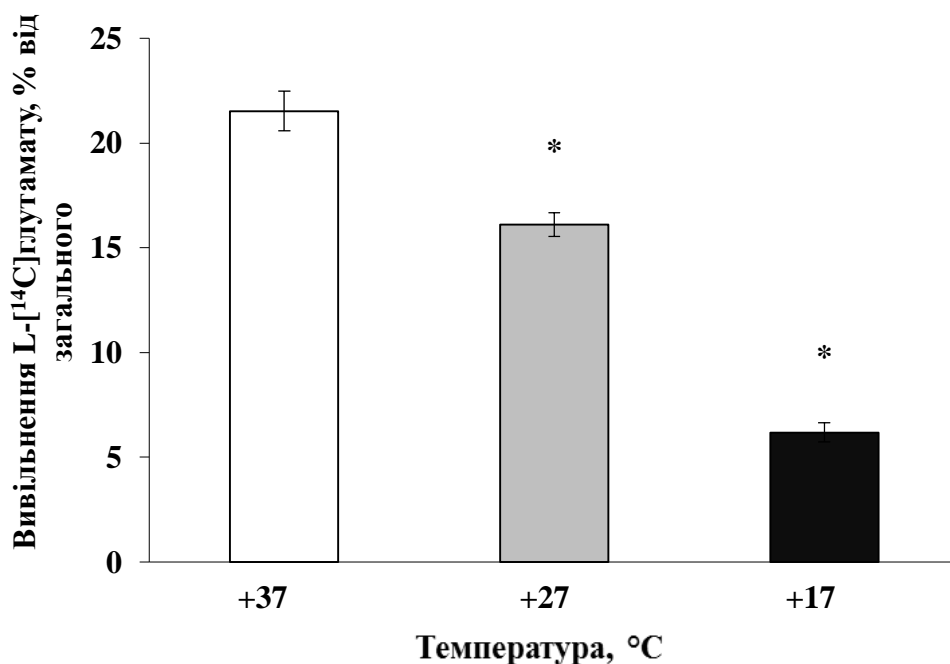


Рис. 3.12. DL-ТНА-індуковане вивільнення L-[^{14}C] за умов гіпотермії.

Вивільнення вимірювалося за 6-ть хвилин. *- $P < 0,05$ у порівнянні з контролем ($+37$ °С).

З огляду на наведені результати досліджень та літературні дані, можемо стверджувати, що процеси гомо- та гетерообміну глутамату чутливі до гіпотермії. Цей факт не очевидний *a priori*, бо компоненти, які беруть участь в гомо- та гетерообміні, є протилежно спрямованими процесами транспорту, котрі зменшуються при гіпотермії. Зокрема, в умовах зниженої температури поступово послаблюється як транспортер-опосередковане накопичення

глутамату (транспорт глутамату усередину), так і транспортер-опосередковане і тонічне вивільнення глутамату (транспорт глутамату назовні) [249]. У нервових терміналях вивільнений нейромедіатор негайно видаляється з позаклітинного простору за рахунок роботи глутаматних транспортерів. У цьому контексті, повне інгібування накопичення L-[¹⁴C]глутамату такими речовинами як D-аспартат, DL-ТНА та глутамат демонструє безпосередню роль транспортер-опосередкованого і тонічного вивільнення L-[¹⁴C]глутамату.

Ми прогнозували у серії експериментів вивчення процесу гомообміну за рахунок додавання 100 мМ глутамату, що величина тонічного вивільнення L-[¹⁴C]глутамату мала бути дуже низькою через малий градієнт концентрації між [глутаматом]_{внутрішньоклітинним} та [глутаматом]_{позаклітинним}. Позаклітинний глутамат ініціював процес гомообміну і, водночас, активував пресинаптичні глутаматні рецептори [264], викликаючи додаткове вивільнення L-[¹⁴C]глутамату. Таким чином вивільнення L-[¹⁴C]глутамату за рахунок гомообміну було вищим порівняно з вивільненням за рахунок гетерообміну.

Важливо відзначити, що динаміка змін гомо- та гетерообміну глутамату, викликаних гіпотермією, нагадує динаміку змін індукованого деполяризацією транспортер-опосередкованого вивільнення глутамату з нервових терміналей. За аналогією з гомо- та гетерообміном, рівень останнього поступово зменшувався зі зниженням температури. Цей факт можна розглядати як експериментальне підтвердження припущення, що головним механізмом, приймаючим участь в гомо- та гетерообміні глутамату, є реверс транспортерів.

Таким чином, гіпотермію можливо розглядати в якості методологічного підходу для розпізнання різних складових гомо- та гетерообміну глутамату. Реверс глутаматних транспортерів відбувається у нормальних фізіологічних умовах як частина механізму гомо- та гетерообміну, і тому не вважається патологічним. Окрім цього, була підтверджена центральна роль глутаматних транспортерів у постійному

обміні глутамату через плазматичну мембрану нервових терміналей. Введення DL-ТВОА пригнічує функціонування глутаматних транспортерів і гомообмін глутамату. Важливо відзначити, що як у нормі, так і за умов гіпотермії, рівень позаклітинного L-[¹⁴C]глутамату в нервових терміналях залежить від концентрації екзогенно-доданого глутамату або D-аспартату, або DL-ТНА.

Гіпотермія може бути випадковою, внаслідок впливу температури навколишнього середовища, або цілеспрямованою, як результат застосування спеціальних терапевтичних підходів для модуляції температури. Терапевтична гіпотермія може запобігти розвитку нейрологічних наслідків і значно поліпшити довгострокові нейрологічні показники після раптової зупинки серця [265], при хірургічних операціях на дузі аорти, полегшуючи хід операції за рахунок зниження мозкового кровообігу, в терапії ішемічного інсульту та черепномозкових травм [266]. Гострою залишається потреба в дослідженні сумісного ефекту медичних препаратів та нейропротекторів в умовах гіпотермії у новонароджених з метою фармакотерапії неонатальних судом [15]. Таким чином, виявлення механізмів нейропротекторних ефектів гіпотермії і патологічних процесів, чутливих до останньої, а також обґрунтування оптимального температурного режиму є основним завданням щодо подальшого практичного впровадження цього перспективного підходу.

Отримані нами дані щодо гіпотермія-індукованих змін у гомо- та гетерообміні глутамату важливі для терапевтичного прогнозу, оскільки відображають як «здорові» нервові терміналі реагують на надлишок позаклітинного глутамату при зниженні температури. *In vivo*, надлишок глутамату може з'являтися за рахунок екзоцитозу синаптичних везикул та патологічного, викликаного гіпоксією транспортер-опосередкованого вивільнення глутамату з сусідніх нервових терміналей.

Підсумовуючи вищезазначене, можна стверджувати, що реакція нервових терміналей на надлишок позаклітинного глутамату (гомообмін) та аспартату (гетерообмін) поступово зменшується від помірної до глибокої

гіпотермії, тим самим запобігаючи подальшому зростанню позаклітинного рівня глутамату, і, таким чином, гіпотермія демонструє нейропротекторну дію. Подібність у поступовому характері динаміки, викликаних гіпотермією змін в гомо- та гетерообміні глутамату, до транспортер-опосередкованого вивільнення глутамату з нервових терміналей, підтвердила значний вклад реверсу транспортерів у гомо- та гетерообмін глутамату. Транспортер-опосередковане вивільнення глутамату може бути не патологічним і відбуватися за фізіологічних умов як частина механізму гомо- і гетерообміну.

Результати проведених досліджень, описані в підрозділі 3.3., було опубліковано у статтях:

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](https://doi.org/10.1089/ther.2017.0047);

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-[¹⁴C]glutamate and D-[³H]aspartate in Rat Brain Nerve Terminals // **Cell Mol. Neurobiol.** – 2016. – Vol. 36. – P. 1229–1240. DOI: [10.1007/s10571-015-0321-4](https://doi.org/10.1007/s10571-015-0321-4)

3.4. Комбіноване застосування гіпотермії та протисудомного препарату леветирацетаму

3.4.1. Позаклітинний рівень L-[¹⁴C]глутамату у препараті нервових терміналей у присутності леветирацетаму

Перинатальна гіпоксія виступає найпоширенішим чинником смерті новонароджених та довгострокової інвалідності. Вона трапляється у 20 із

1000 новонароджених [267]. Гіпоксія призводить до пошкодження нейрональних клітин і порушення формування мієлінової оболонки [178, 268]. Постраждали на перинатальну гіпоксію діти потерпають від вторинних неврологічних розладів таких як: мозковий параліч (15%), затримка розвитку (11%), судомний синдром (8%), втрата слуху (3%), візуальні порушення (3%) [267]. На модельних тваринах було показано, що терапевтична гіпотермія у перші шість годин постнатального періоду покращує довгострокове виживання та зменшує наслідки гострого пошкодження мозку. Втім, навіть після застосування терапії, від 40 до 50 % новонароджених страждають від неврологічних наслідків [269, 270].

Симптоми, пов'язані з перинатальною гіпоксією, наприклад м'язова гіпотонія, кардіореспіраторна недостатність, судоми, можуть з'явитися у перші часи, тому застосування ліків є вкрай важливим [271]. До 60 відсотків пацієнтів, які страждають на гіпоксично-ішемічну енцефалопатію і у процесі лікування яких застосовують гіпотермію, потребують протисудомних ліків через клінічні або електрографічні судоми [272]. За даними літератури, звичайні протисудомні препарати, такі як фенобарбітал або фенітоїн, неефективні для 50 % пацієнтів і можуть спричинити порушення розвитку дитини [273, 274].

Леветирацетам, 2S-(2-оксо-1-піролідініл) бутанамід, має широкий спектр протисудомної активності, декілька ймовірних мішеней у нервових терміналях та надзвичайно високу безпечність, ефективний при лікуванні пацієнтів з локальними та загальними нападами судом [275–277]. На відміну від більшості антиепілептичних препаратів, клінічні ефекти леветирацетаму не відносяться до жодного з загальних механізмів дії протисудомних препаратів [278–280]. Вважається, що леветирацетам зв'язується з мембранним протеїном – протеїном синаптичних везикул 2A (SV2A) [281]. Функціонування P/Q-типу потенціалкерованих кальцієвих каналів у пресинапсі модулюється цим препаратом [282]. Леветирацетам може впливати на активність нейронів через модуляцію сигналювання GABA_A-

рецепторів, оскільки знімає Zn-індуковану блокаду пресинаптичного інгібування, опосередкованого GABA_A-рецепторами [278, 283]. Раніше отримані дані у нашому відділі нейрохімії Інституту біохімії імені О.В. Палладіна свідчать, що леветирацетам знижує вивільнення L-[¹⁴C]глутамату шляхом екзоцитозу з нервових терміналей [284]. Перфузія леветирацетамом суттєво пригнічує KCl-стимульоване вивільнення глутамату у неепілептичних щурів та щурів з епілептогенезом, індукованим введенням FeCl₃ у мигдалеподібне тіло [285]. Леветирацетам значно підвищував вироблення NO у концентраційно-залежній манері в ядрах мозочка у щурів [286].

Нейропротекторні властивості леветирацетаму описані у літературі, присвяченій дослідженню інсульту, субарахноїдального крововиливу, епілептичних станів та гіпоксично-ішемічних пошкоджень [287–289]. Специфічне введення препарату під час терапевтичної гіпотермії є перспективним комплексним підходом для посилення захисних ефектів гіпотермії, зменшення побічних ефектів та подовження максимального часу її застосування.

Були проаналізовані ефекти леветирацетаму, помірної та глибокої гіпотермії та комбінованого застосування леветирацетаму та гіпотермії на позаклітинний рівень L-[¹⁴C]глутамату та вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з пресинаптичних нервових терміналей, стимульованого активацією пресинаптичних іонотропних глутаматних рецепторів (вивільнення L-[¹⁴C]глутамату, індукованого NMDA/AMPA/каїнатом). У експериментах використовували леветирацетам у концентрації 100 мкМ. Звичайний протисудомний діапазон концентрації леветирацетаму в плазмі коливається від 35 до 100 мкМ, до пікових значень 250 мкМ [283, 290].

Позаклітинний рівень глутамату визначався після інкубації з 100 мкМ леветирацетамом на 15-тій хвилині (рис. 3.13.). Було проведено 30 експериментів, кожен з яких – у трьох повторюваностях.

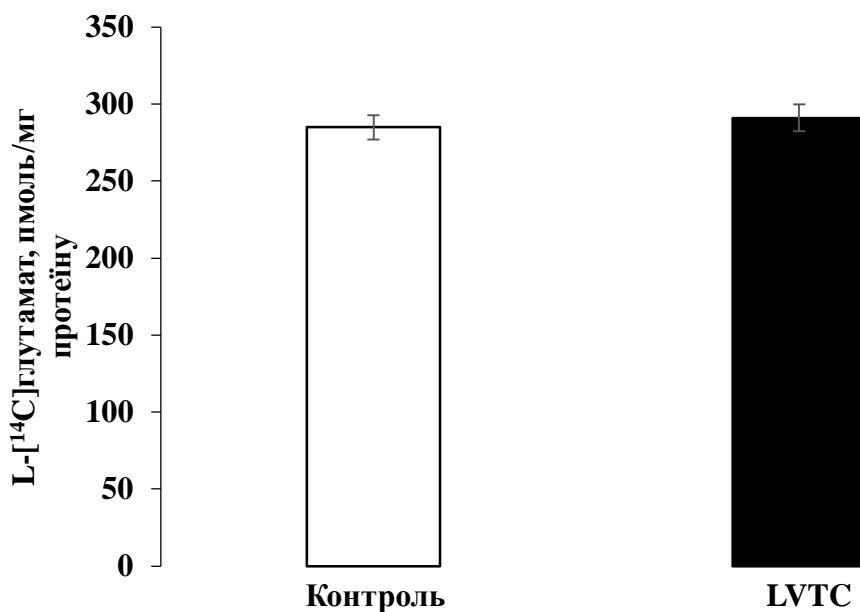


Рис. 3.13. Узагальнені дані 30 експериментів щодо позаклітинного рівню L-[¹⁴C]глутамату у середовищі інкубації синапсом у контролі та за присутності 100 мкМ леветирацетаму. Рівень L-[¹⁴C]глутамату визначався на 15-тій хвилині.

Позаклітинний рівень L-[¹⁴C]глутамату після преінкубації нервових терміналей з леветирацетамом збільшувався статистично недостовірно у сімнадцятьох експериментах (рис. 3.14.) та зменшувався статистично достовірно у тринадцятьох (рис. 3.15.). Неоднорідність даних можна пояснити індивідуальною чутливістю тварин до леветирацетаму [277, 291], великою кількістю мішеней до дії леветирацетаму у нервових терміналях [278, 281], унікальністю балансу накопичення/вивільнення та позаклітинного рівня глутамату для кожного синапсу [256]. Статистичний аналіз експериментальних даних обох груп тварин виявив, що середнє значення концентрації позаклітинного L-[¹⁴C]глутамату у препараті нервових терміналей значно не змінювалось при інкубації з 100 мкМ леветирацетамом. Показник коливався від $285,0 \pm 8,0$ пікомоль/мг протеїну у контролі до $291,1 \pm 8,8$ пікомоль/мг протеїну за присутності леветирацетаму (рис. 3.13.).

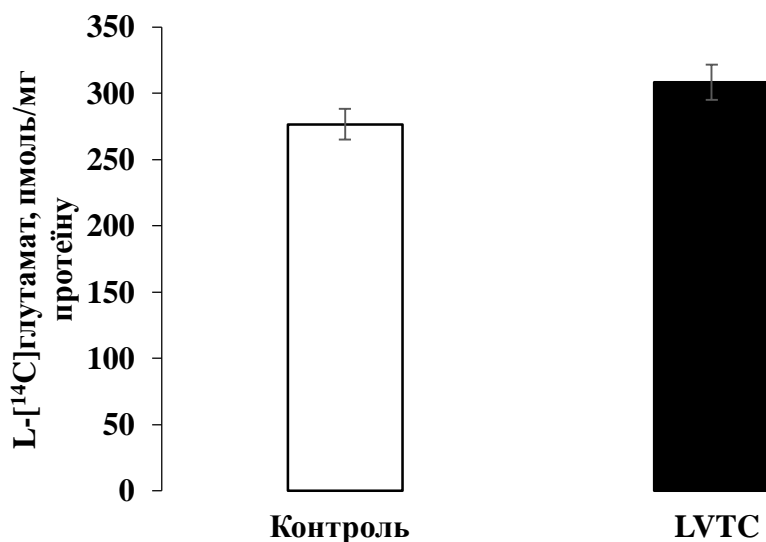


Рис. 3.14. Тенденція до збільшення позаклітинного рівню L-[¹⁴C]глутамату у середовищі інкубації синапсом по даним 17 експериментів у контролі та за присутності 100 мкМ леветирацетаму. Рівень визначався на 15-тій хвилині.

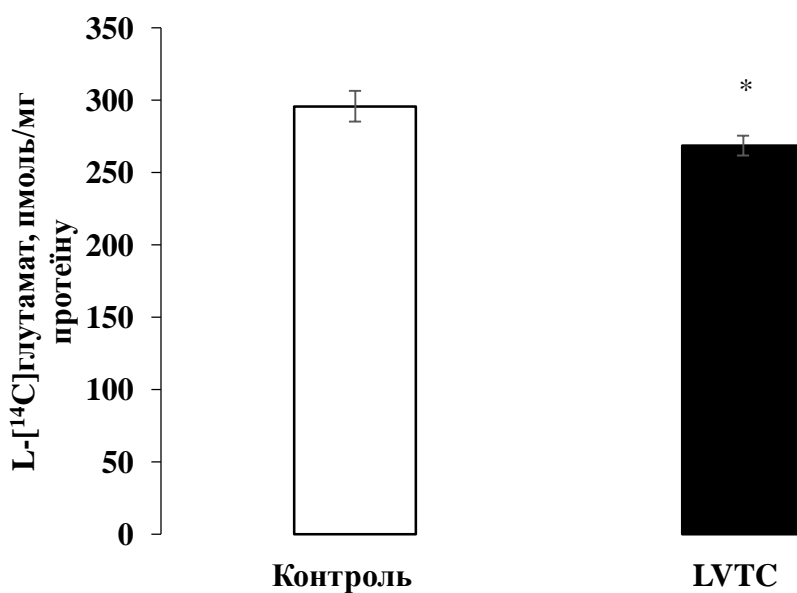


Рис. 3.15. Зменшення позаклітинного рівню L-[¹⁴C]глутамату у середовищі інкубації синапсом по даним 13 експериментів у контролі та за присутності 100 мкМ леветирацетаму. Рівень визначався на 15-тій хвилині * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем (+37 °C).

Таким чином, леветирацетам суттєво не впливає на позаклітинний рівень глутамату.

3.4.2. Транспортер-опосередковане накопичення L-[¹⁴C]глутамату нервовими терміналами у присутності леветирацетаму

Певний рівень позаклітинного глутамату підтримується двома протилежно направленими процесами – накопиченням та вивільненням. Початкова швидкість високоафінного транспортер-опосередкованого накопичення L-[¹⁴C]глутамату нервовими терміналами складала $2,80 \pm 0,29$ нмоль \times хв⁻¹ \times мг⁻¹ протеїну у контролі та $2,86 \pm 0,29$ нмоль \times хв⁻¹ \times мг⁻¹ протеїну після інкубації з 100 мкМ леветирацетамом. Рівень накопичення L-[¹⁴C]глутамату синаптосомами на 10-тій хвилині сягав $9,73 \pm 0,49$ нмоль \times мг⁻¹ протеїну у контролі та $9,91 \pm 0,49$ нмоль \times мг⁻¹ протеїну після інкубації з 100 мкМ леветирацетамом. Експериментальні дані про відсутність впливу леветирацетаму на позаклітинний рівень глутамату узгоджуються з результатами вимірів мембранного потенціалу синаптосом за присутності цього препарату з використанням флуоресцентного зонду родамін 6 G (рис. 3.16.).

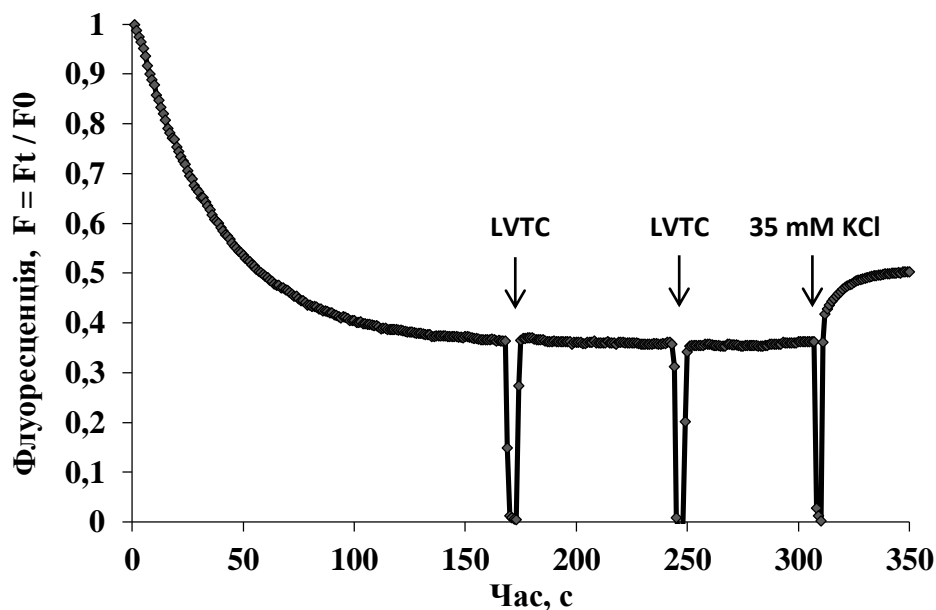


Рис. 3.16. Рівень мембранного потенціалу синапсом при додаванні 100 мкМ леветирацетаму (кожна стрілка), визначений за допомогою потенціометричного флуоресцентного зонду родамін 6 G.

Таким чином, леветирацетам суттєво не впливав на загальну швидкість накопичення L-[¹⁴C]глутамату синапсами та на їх мембранний потенціал.

3.4.3. Вплив леветирацетаму на NMDA-, AMPA- та кайнат-стимульоване вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з нервових терміналей

Оскільки, як було зазначено вище, леветирацетам має багато мішеней у нервових терміналях для реалізації протисудомної дії, нами було проаналізовано його вплив на NMDA-, AMPA- та кайнат-стимульоване вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з нервових терміналей. Це робилося для того, щоб визначити можливість леветирацетаму впливати на позаклітинний рівень глутамату за умов активації іонотропних глутаматних рецепторів.

Аналізувались 4 препарати синапсом, кожен експеримент був проведений в трьох повторюваностях.

NMDA у концентрації 250 мкМ викликав вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з нервових терміналей на рівні $7,14 \pm 0,90$ % від загального вмісту міченого глутамату після попередньої інкубації з 100 мкМ леветирацетамом. Вимір проводили на 15-тій хвилині (рис. 3.17.). Показники контролю склали $4,57 \pm 0,25$ % від загального вмісту міченого глутамату за 6-ть хвилин.

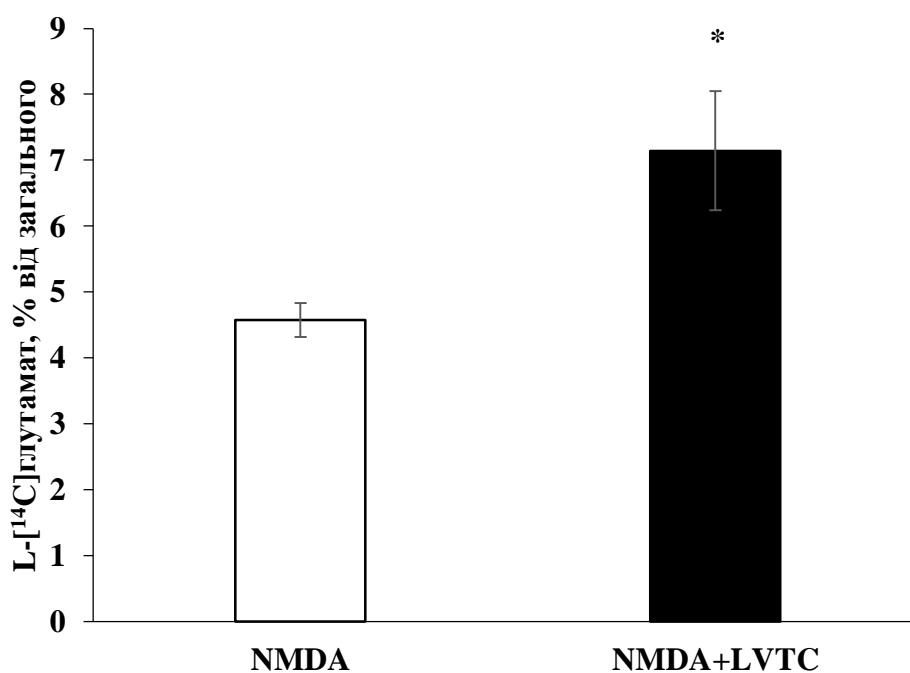


Рис. 3.17. Рівень NMDA-стимульованого (у концентрації 250 мкМ) вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з нервових терміналей за 6-ть хвилин у контролі (NMDA) та за присутності 100 мкМ леветирацетаму (NMDA+LVTC). *– P < 0,05 у порівнянні з контролем (+37 °C).

Таким чином, леветирацетам збільшує NMDA-стимульоване вивільнення L-[¹⁴C]глутамату.

Леветирацетам у концентрації 100 мкМ не викликав змін у AMPA- та кайнат-стимульованому вивільненні L-[¹⁴C]глутамату. Рівень останнього незначно змінювався за умов 250 мкМ AMPA-стимульованого вивільнення у

присутності 100 мкМ леветирацетаму та складав $6,69 \pm 0,83$ % від загального вмісту міченого глутамату після попередньої інкубації на 15-тій хвилині порівняно з контрольними показниками $6,46 \pm 0,37$ % від загального вмісту міченого глутамату за 6-ть хвилин (рис. 3.18.). При побудові графіків використано дані, одержані при аналізі 4 препаратів синапсом, кожен експеримент був проведений в трьох повторюваностях.

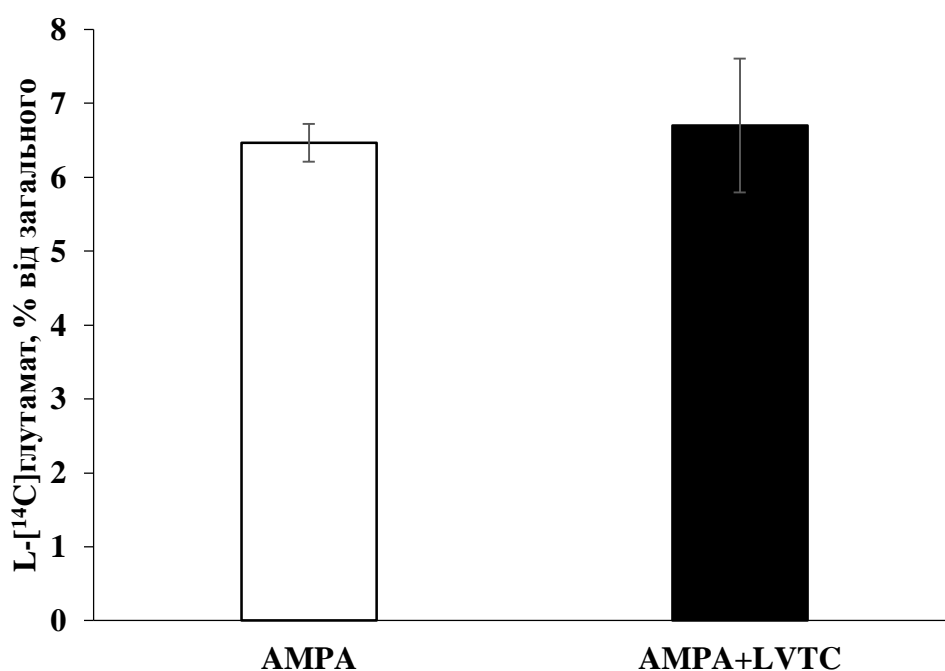


Рис. 3.18. Рівень AMPA-стимульованого (у концентрації 250 мкМ) вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з нервових терміналей за 6-ть хвилин у контролі (AMPA) та за присутності 100 мкМ леветирацетаму (AMPA+LVTC).

За умов 250 мкМ кайнат-стимульованого вивільнення рівень L-[¹⁴C]глутамату на 15-тій хвилині складав $6,79 \pm 1,18$ % від загального вмісту міченого глутамату після попередньої інкубації з 100 мкМ леветирацетаму, в той час як за 6-ть хвилин у контролі – $5,46 \pm 0,52$ % від загального вмісту міченого глутамату (рис. 3.19.).

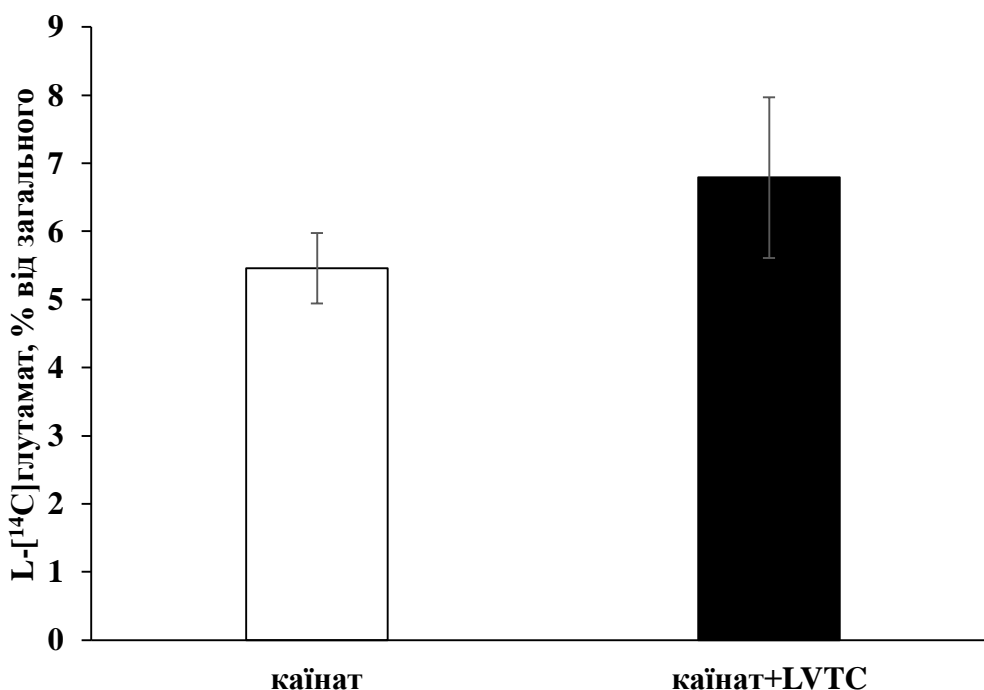


Рис. 3.19. Рівень Каїнат-стимульованого (у концентрації 250 мкМ) вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з нервових терміналей за 6-ть хвилин у контролі (каїнат) та за присутності 100 мкМ леветирацетаму (каїнат + LVTC).

Таким чином, додавання леветирацетаму у концентрації 100 мкМ збільшує вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з нервових терміналей, індукованого активацією пресинаптичних NMDA-рецепторів, та значно не впливає на вивільнення L-[¹⁴C]глутамату, викликаного активацією пресинаптичних AMPA- та каїнат-рецепторів.

3.4.4. Позаклітинний рівень L-[¹⁴C]глутамату у середовищі інкубації синапсом за присутності леветирацетаму за умов гіпотермії

Насамперед, ми проаналізували вплив комбінованого застосування гіпотермії та леветирацетаму на позаклітинний рівень L-[¹⁴C]глутамату у середовищі інкубації синапсом. Аналізували 4 препарати синапсом, кожен експеримент проводився в трьох повторюваностях. Показники

позаклітинної концентрації L-[¹⁴C]глутамату значно не змінювались та складали $285,81 \pm 12,94$ пмоль/мг протеїну при +37 °С, $279,28 \pm 9,73$ пмоль/мг протеїну при +27 °С та $257,55 \pm 17,78$ пмоль/мг протеїну при +17 °С (рис.3.20.).

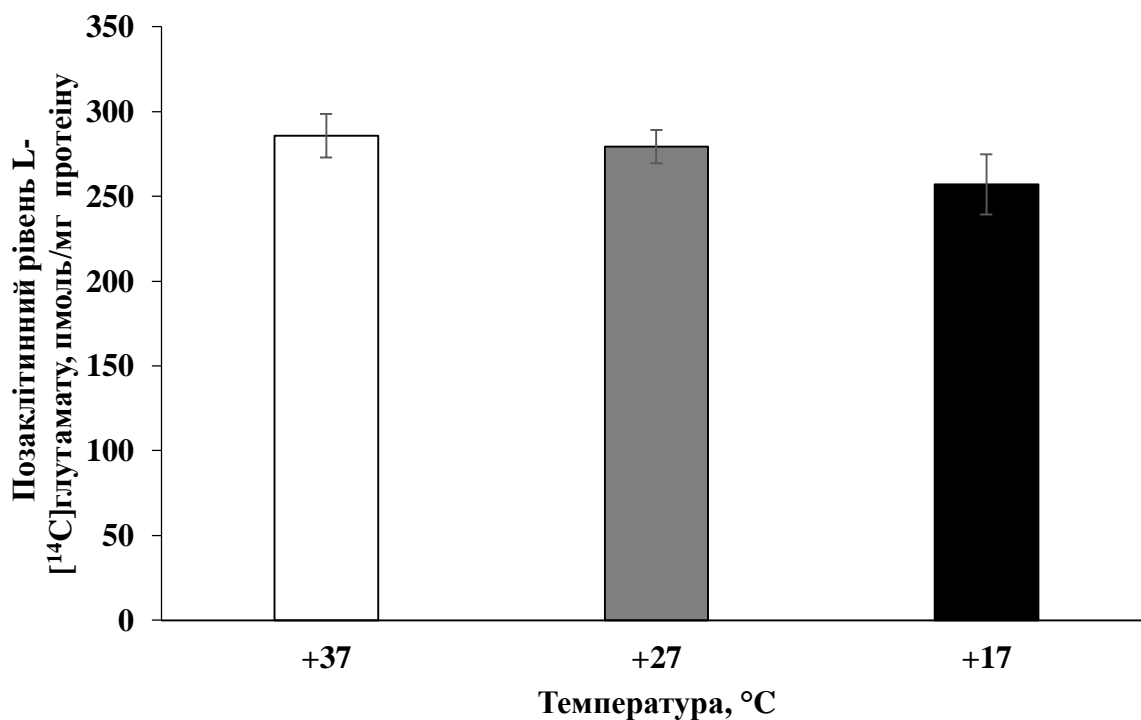


Рис. 3.20. Позаклітинний рівень L-[¹⁴C]глутамату у середовищі інкубації синапсом за умов гіпотермії та за присутності 100 мкМ леветирацетаму. Вивільнення вимірювалося на 14-тій хвилині.

3.4.5. Вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з нервових терміналей шляхом активації іонотропних глутаматних рецепторів за умов гіпотермії

Важливо відзначити, що стабільний рівень глутамату в синаптичних щілинах за умов гіпотермії здатний підтримувати активні синаптичні контакти. З іншого боку, при гіпотермії значно знижується швидкість функціонування рецепторів, що може порушити синаптичну передачу і спричинити побічні ефекти гіпотермії.

У цьому контексті важливим показником є динаміка гіпотермія-опосередкованого функціонування пресинаптичних NMDA-, AMPA- та кайнатних рецепторів. Вона оцінювалась шляхом вимірювання рівня вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з нервових терміналей, індукованих активацією цих рецепторів їх специфічними агоністами в умовах помірної та глибокої гіпотермії.

NMDA-стимульоване вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з нервових терміналей за умов гіпотермії. 250 мкМ NMDA-стимульоване вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з синапсом складало $4,57 \pm 0,25$ % від загального вмісту міченого глутамату за 6-ть хвилин у контролі (+37 °C) та суттєво знижувалося за умов гіпотермії (рис. 3.21.). Його рівень складав $3,75 \pm 0,22$ % від загального вмісту міченого глутамату при +27 °C та $3,09 \pm 0,23$ % від загального вмісту міченого глутамату при +17 °C. Вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з синапсом за 10-ть хвилин після додавання 250 мкМ NMDA дорівнювало $3,64 \pm 0,19$ % від загального вмісту міченого глутамату у контролі при +37 °C, $3,10 \pm 0,23$ % від загального вмісту міченого глутамату при +27 °C та $2,38 \pm 0,22$ % від загального вмісту міченого глутамату при +17 °C. Дані одержані при аналізі чотирьох препаратів синапсом, кожен експеримент був проведений в трьох повторюваностях.

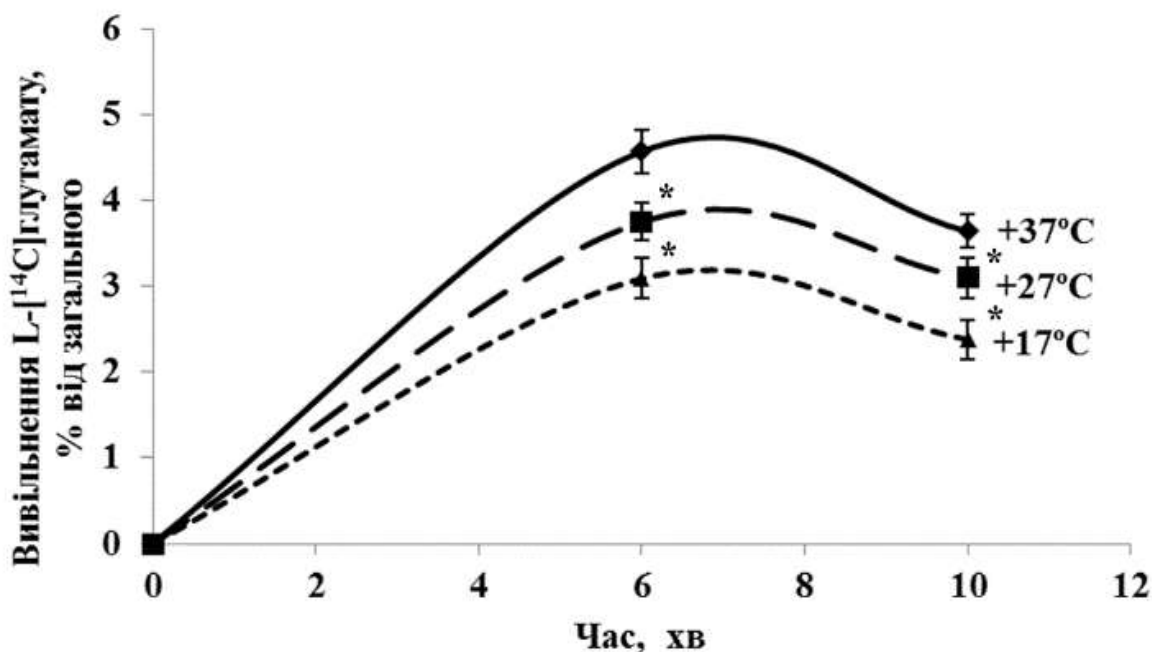


Рис. 3.21. NMDA-стимульоване вивільнення L-[^{14}C]глутамату з нервових терміналей за умов гіпотермії. Вивільнення вимірювалося за 6-ть та 10-ть хвилин при +37 °C, +27 °C та +17 °C.

Таким чином, NMDA-стимульоване вивільнення L-[^{14}C]глутамату з нервових терміналей знижувалось на 15 % зі зміною температурного режиму.

AMPA-стимульоване вивільнення L-[^{14}C]глутамату з нервових терміналей за умов гіпотермії. 250 мкМ AMPA-стимульоване вивільнення L-[^{14}C]глутамату з нервових терміналей у контролі (рис 3.22.) складало $6,46 \pm 0,37$ % від загального вмісту міченого глутамату за 6-ть хвилин при температурі +37 °C. За умов гіпотермії рівень AMPA-стимульованого вивільнення L-[^{14}C]глутамату значно знижувався і його значення складало $4,96 \pm 0,65$ % та $3,72 \pm 0,45$ % від загального вмісту міченого глутамату відповідно при +27 °C та +17 °C. За 10-ть хвилин AMPA-стимульоване вивільнення L-[^{14}C]глутамату у контролі (+37 °C) дорівнювало $10,59 \pm 0,58$ % від загального вмісту міченого глутамату і також значно знижувалось при гіпотермії: $8,13 \pm 0,64$ % та $5,08 \pm 0,57$ % від загального вмісту міченого глутамату відповідно при +27 °C та +17 °C.

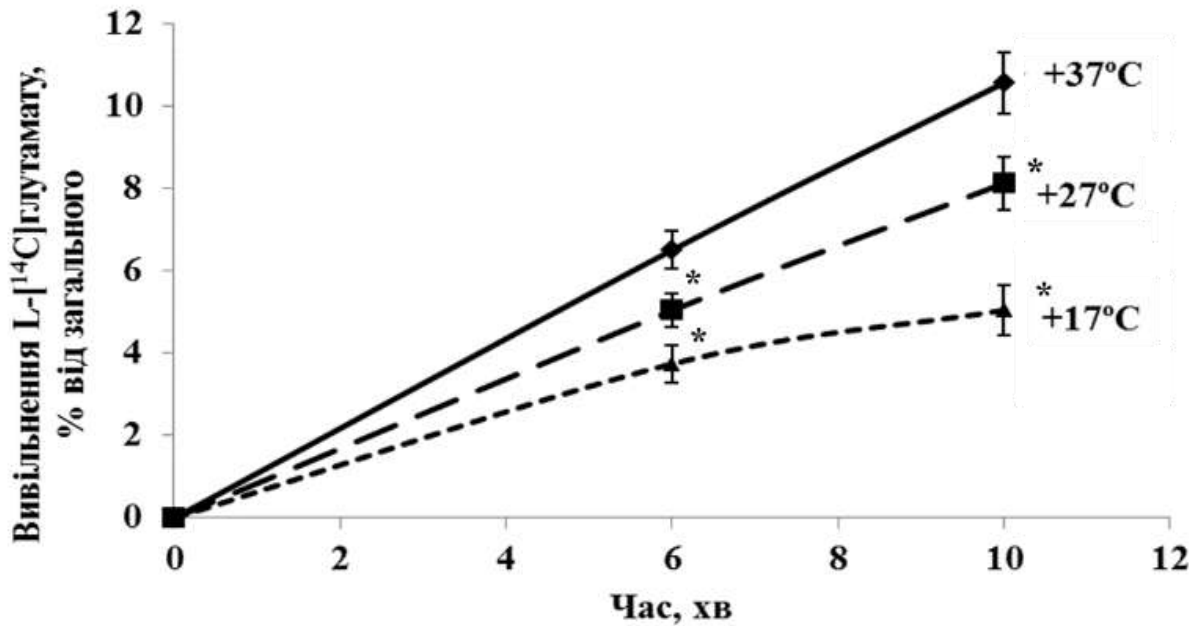


Рис. 3.22. АМРА-стимульоване вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з нервових терміналей за умов гіпотермії. Вивільнення вимірювалося за 6-ть та 10-ть хвилин при +37 °С, при +27 °С та +17° С.

Таким чином, АМРА-стимульоване вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з нервових терміналей знижувалось майже на 20 % при зниженні температурного режиму.

Каїнат-стимульоване вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з нервових терміналей за умов гіпотермії. Каїнат у концентрації 250 мкМ викликав вивільнення L-[¹⁴C]глутамату із синапсом, рівень якого у контролі (+37 °С) за 6-ть хвилин складав $5,46 \pm 0,52$ % від загального вмісту міченого глутамату (рис. 3.23.). Як і в ситуації з NMDA та АМРА, каїнат-стимульоване вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з синапсом значно зменшувалось зі зниженням температури. Його рівень складав $4,02 \pm 0,49$ % та $2,28 \pm 0,41$ % від загального вмісту міченого глутамату відповідно при +27 °С та +17 °С. У контролі (+37 °С) рівень каїнат-стимульованого вивільнення L-[¹⁴C]глутамату за 10-ть хвилин складав $9,03 \pm 0,61$ % від загального вмісту міченого глутамату і зменшувався зі зниженням температури: фіксували

рівні $6,05 \pm 0,58$ % та $2,80 \pm 0,50$ % від загального вмісту міченого глутамату при $+27$ °C та $+17$ °C відповідно. Дані одержані при аналізі 4 препаратів синапсом, кожен експеримент був проведений в трьох повторюваностях.

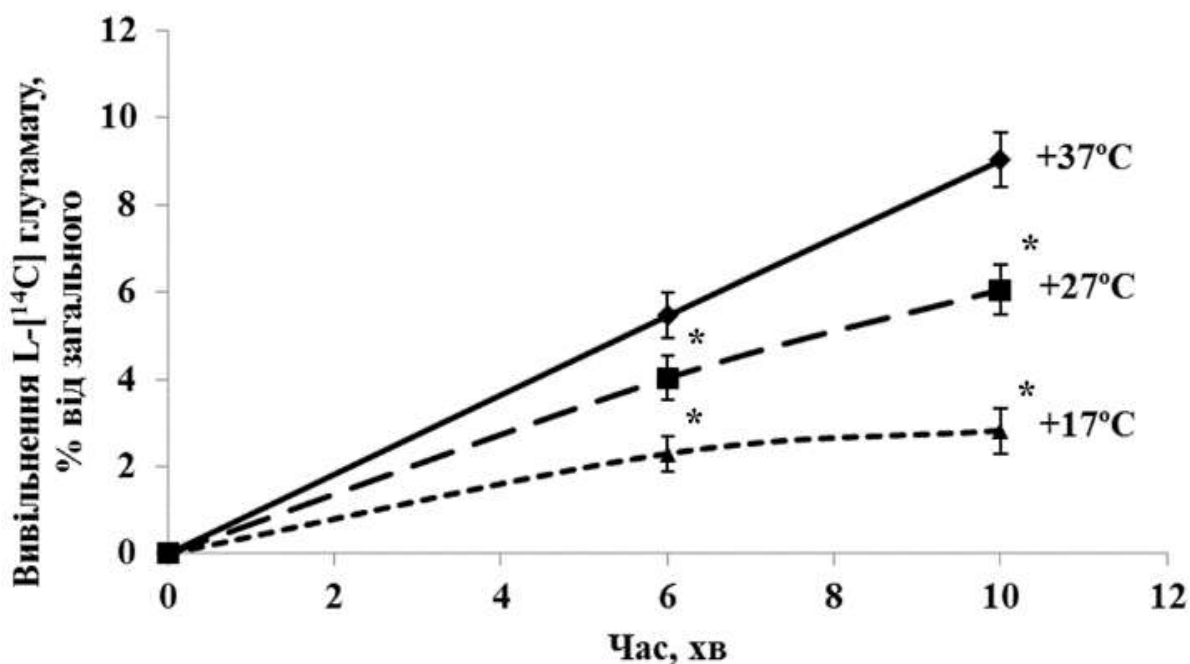


Рис. 3.23. Каїнат-стимульоване вивільнення L-[^{14}C]глутамату з нервових терміналей за умов гіпотермії. Вивільнення вимірювалося за 6-ть та 10-ть хвилин при $+37$ °C, при $+27$ °C та $+17$ °C.

Таким чином, каїнат-стимульоване вивільнення L-[^{14}C]глутамату з нервових терміналей зменшувалось приблизно на 30 % в умовах зниження температури.

3.4.6. NMDA-стимульоване вивільнення L-[^{14}C]глутамату з нервових терміналей за умов комбінованої дії гіпотермії та леветирацетаму

Нами була проаналізована можливість комбінованого застосування гіпотермії та препарату леветирацетам. Досліджували можливість впливу

леветирацетаму на NMDA-стимульоване вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з нервових терміналей за умов гіпотермії. Леветирацетам у концентрації 100 мкМ індукував збільшення вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з нервових терміналей, викликаних активацією пресинаптичних NMDA-рецепторів. Цей ефект зберігався і в умовах гіпотермії (рис. 3.24.). Рівень NMDA-стимульованого вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з нервових терміналей при +27 °С за 6-ть хвилин складав $3,75 \pm 0,22$ % у контролі та $5,1 \pm 0,5$ % від загального вмісту міченого глутамату на 15-тій хвилині після попередньої інкубації з 100 мкМ леветирацетамом. При +17 °С за 6-ть хвилин у контролі він дорівнював $3,09 \pm 0,23$ % від загального вмісту міченого глутамату та $4,32 \pm 0,51$ % від загального вмісту міченого глутамату на 15-тій хвилині після попередньої інкубації з 100 мкМ леветирацетамом. Леветирацетам у концентрації 100 мкМ мав незначний вплив на AMPA- та кайнат-стимульоване вивільнення L-[¹⁴C]глутамату за нормальних умов та за умов гіпотермії. Аналізували чотири препарати синапсом, кожен експеримент був проведений в трьох повторюваностях.

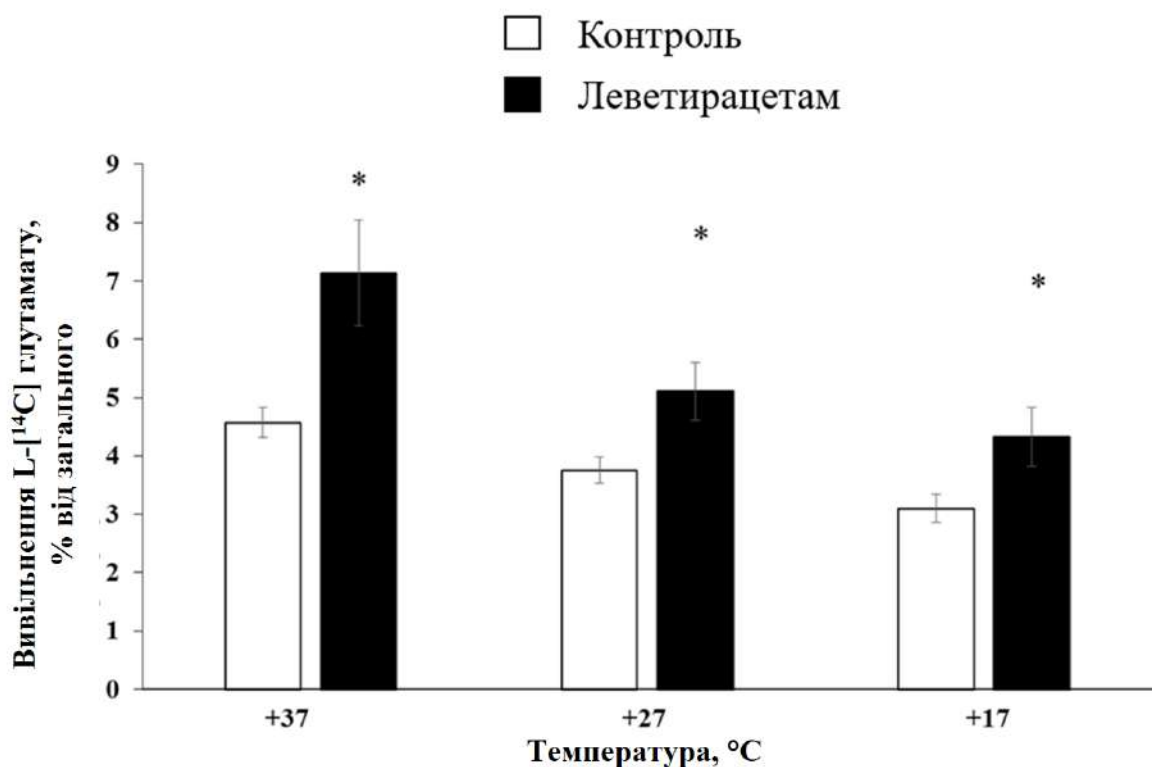


Рис. 3.24. NMDA-стимульоване вивільнення L-[¹⁴C]глутамату після попередньої інкубації з 100 мкМ леветирацетамом у контролі (біла колонка, +37 °С) та за присутності леветирацетаму (темна колонка) за умов гіпотермії (+27 °С, +17 °С). Результати фіксувались за 6-ть хвилин. *– P < 0,05 у порівнянні з контролем при відповідній температурі.

Як було зазначено вище, позаклітинний рівень глутамату є індивідуальною характеристикою кожного синапсу, оскільки в його підтримці беруть участь протилежні та високо регульовані процеси [256]. Експериментальні дані стосовно позаклітинного рівня L-[¹⁴C]глутамату в препаратах нервових терміналей свідчать, що цей параметр майже не чутливий до гіпотермії, що узгоджується і з нашими результатами [249, 292]. Вважаємо, що єдиним поясненням цього може бути факт, що тонічне вивільнення (визначене під час блокади транспортерів глутамату за допомогою DL-ТВОА) знижується з такою ж ефективністю, як і ефективність накопичення L-[¹⁴C]глутамату.

Таким чином, позаклітинний рівень L-[¹⁴C]глутамату залишається незмінним під час дії гіпотермії (принаймні протягом аналізованого короткотермінового періоду) внаслідок того, що знижена температура викликає однакове зменшення активності протилежно спрямованих процесів. Нейропротекторні ефекти гіпотермії при терапії ішемічного інсульту та травматичних ушкоджень головного мозку пов'язані з суттєвим і поступовим зниженням патологічного вивільнення глутамату нервовими терміналями [249].

Активація пресинаптичних глутаматних рецепторів у наших експериментах викликала вивільнення L-[¹⁴C]глутамату, рівень якого поступово знижувався від помірної до глибокої гіпотермії. Цей механізм значущий для регуляції глутаматергічної нейротрансмісії та транспорту нейромедіаторів через сигнали гомо- та гетерорецепторів. Ми розглядаємо

цей механізм як можливу пресинаптичну складову, задіяну в довгостроковому потенціюванні.

Вивчення гіпотермія-опосередкованого зниження NMDA-, AMPA- та кайнат-індукованого вивільнення L-[¹⁴C]глутамату – частка дослідження постпотенціальних синаптичних реакцій, збудливих постсинаптичних потенціалів та вивільнення нейромедіаторів, де зазначені параметри визначено як температурочутливі і пов'язані з впливом на нейрональні іонні канали. Деякі кальцієві та потенціалкеровані натрієві канали теж регулюються температурою [243, 247].

Також, нами були зроблені експерименти, щоб зрозуміти можливий механізм дії леветирацетаму на NMDA-рецептори. Як було сказано вище, мішенями дії леветирацетаму можуть бути SV2 протеїни, протеїнкінази А та С, потенціалкеровані кальцієві канали P/Q-типу та GABA_A рецептори [278, 282, 283]. Умовно можна відокремити потенційні мішені на такі, що потребують безпосередньої участі Ca²⁺ у реалізації ефекту леветирацетаму, наприклад, SV2 протеїни та потенціалкеровані кальцієві канали P/Q-типу. Ми проводили експерименти щодо NMDA-стимульованого вивільнення L-[¹⁴C]глутамату у номінально безкальцієвому середовищі та у середовищі, де був доданий хелатуючий агент іонів кальцію EGTA. В обох експериментальних серіях дані щодо вивільнення глутамату були однакові. Екзоцитоз-опосередкований Ca²⁺-залежний компонент NMDA-індукованого вивільнення глутамату, показаний у Тарасенко [293], був відсутній у наших експериментах у Ca²⁺-вільному середовищі, тому ми зробили припущення, що леветирацетам діяв через Ca²⁺-незалежний механізм.

Леветирацетам може діяти через протеїнкіназа А та С-залежні механізми, оскільки він впливає на відповідь $\alpha 7$ ацетилхолінових рецепторів, які взаємодіють з протеїнкіназами А і С та впливають на синаптичну передачу у гіпокампі [294]. У цьому контексті, ми припустили, що леветирацетам може порушувати протеїнкіназа С-залежну регуляцію поверхневої експресії транспортерів глутамату в плазматичній мембрані

нервових терміналей. Були проведені відповідні експерименти, однак, ми не виявили змін при сумісному використанні інгібітору протеїнкінази С - GF 109203X та леветирацетаму у порівнянні з дією власно леветирацетаму (рис. 3.25.).

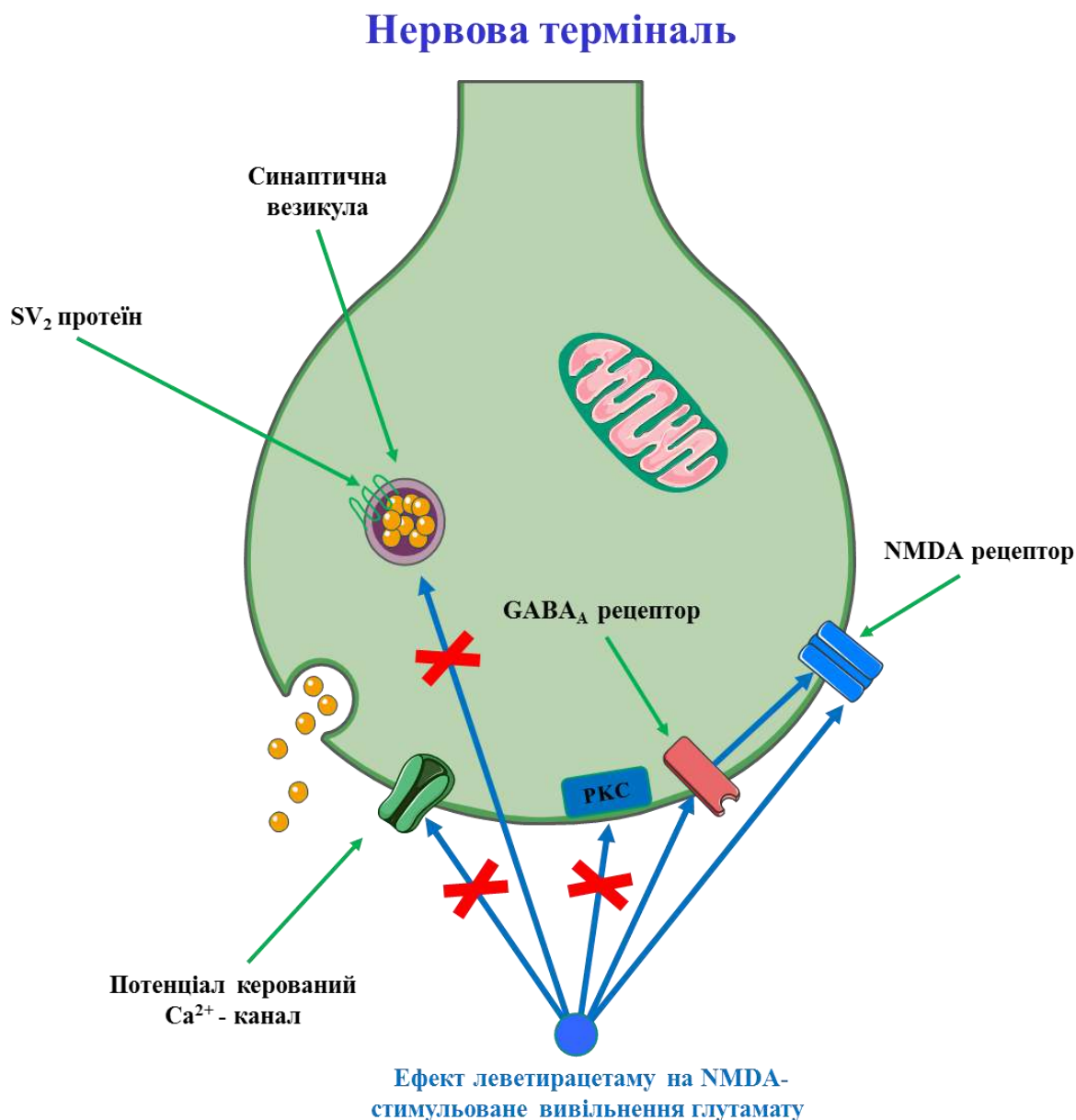


Рис. 3.25. Схема можливих мішеней леветирацетаму.

Здатність леветирацетаму змінювати інгібуючий ефект цинку та інших негативних алостеричних модуляторів GABA_A рецепторів, може пояснити його протисудомну дію в моделі хронічної епілепсії [283]. Щоб далі зрозуміти, як діє леветирацетам у нервових терміналях, ми застосували селективний антагоніст бензодіазепінових рецепторів (GABA_A рецепторів) -

флумазеніл. У експериментах було продемонстровано, що флумазеніл у концентрації 100 мкМоль моделював NMDA-стимульоване вивільнення L-[¹⁴C] глутамату з нервових терміналей, зменшуючи його. Леветирацетам у наших експериментах знімав інгібуючий ефект флумазенілу на NMDA-стимульоване вивільнення L-[¹⁴C]глутамату. Отже, нами зроблено припущення, що індуковане леветирацетамом збільшення NMDA-стимульованого вивільнення L-[¹⁴C]глутамату може здійснюватися через леветирацетам-опосередковану модуляцію функціонування GABA_A рецепторів, або напряду через модулюючу дію леветирацетаму на NMDA рецептори (рис. 3.25.).

Нами доведено, що леветирацетам змінює відповідь при активації пресинаптичних NMDA-рецепторів. Примітно, що цей препарат у концентрації 100 мкМ збільшує NMDA-стимульоване вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з нервових терміналей та істотно не змінює AMPA- та кайнат-стимульоване вивільнення. Наші дані про незмінність позаклітинного рівня L-[¹⁴C]глутамату в присутності леветирацета (100 мкМ) співпадають з даними Capurchio із співавторами [295], де леветирацетам (5-200 мкМ) не викликав внутрішніх чи зовнішніх струмів на нейронах під час перфузії (0,5-2 хв).

Особливо важливим фактом, доведеним нашими експериментами, є можливість коригування (пом'якшення) леветирацетамом зниження NMDA-індукованого вивільнення L-[¹⁴C]глутамату в умовах гіпотермії. Корекція відповіді NMDA-рецепторів може зменшити побічні ефекти терапевтичної гіпотермії та може стати у нагоді для забезпечення належного функціонування NMDA-рецепторів у сфері кардіохірургії, відновлення після терапевтичної гіпотермії. Запропонований підхід є актуальним у випадках, коли гіпотермія застосовується не для запобігання гострій ексайтотоксичності глутамату, як це трапляється під час інсульту, травм головного мозку та перинатальної гіпоксії. Це відбувається тому, що

підвищення NMDA-відповіді за цих патологій може ускладнити ексайтотоксичні наслідки.

Леветирацетам за концентрації 100 мкМ суттєво не впливав на рівень позаклітинного L-[¹⁴C]глутамату в препаратах нервових терміналей і по-різному впливав на вивільнення L-[¹⁴C]глутамату, індукованого активацією пресинаптичних NMDA-, AMPA- та кайнат-рецепторів. Леветирацетам (100 мкМ) збільшував вивільнення NMDA-стимульованого L-[¹⁴C]глутамату з нервових терміналей, але істотно не змінював вивільнення L-[¹⁴C]глутамату, викликаного кайнатом і AMPA. Динаміка зниження за умов гіпотермії синаптосомального вивільнення L-[¹⁴C]глутамату під впливом агоністів рецепторів, показана у наших експериментах, може бути корисною для обґрунтування оптимальних режимів терапевтичної гіпотермії. Леветирацетам значно пом'якшує гіпотермія-стимульоване зниження позаклітинного глутамату через NMDA-рецептори на пресинаптичному рівні, і, отже, комбіноване застосування гіпотермії та леветирацетаму коригує та наближає до норми NMDA-стимульоване вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з нервових терміналей.

Результати проведених досліджень, описані в підрозділі 3.4, було опубліковано у статті:

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

3.5. Комбінована нейропротекція шляхом зменшення рівня мембранного холестеролу та гіпотермії

3.5.1. Вплив MCD на позаклітинний рівень L-[¹⁴C]глутамату у середовищі інкубації синапсом за умов гіпотермії

У медичній практиці відсутні специфічні агенти для модуляції активності глутаматних транспортерів на відміну від селективних інгібіторів GABA транспортерів GAT1 та GAT3 підтипів – тіагабіну та β-аланіну, відповідно. У цьому контексті неспецифічна модуляція активності транспортерів є єдиним доступним підходом до зниження транспортер-опосередкованого вивільнення глутамату з боку нервових терміналей. Неспецифічна нейропротекція може проводитись за допомогою гіпотермії, а також зниження рівня мембранного холестеролу.

Як було відмічено раніше у літературному огляді, у зоні ліпідних рафтів локалізується більша частина протеїнів, які приймають участь у процесі нервової передачі: іонні канали, рецептори, транспортери нейромедіаторів. Зміна рівня мембранного холестеролу нервових терміналей у значній мірі впливає на їхню активність, тобто може модулювати транспорт нейромедіаторів.

Основним методичним підходом для вивчення ролі холестеролу у процесі нервової передачі є зниження його рівня у мембрані нервових терміналей за рахунок застосування ефективного акцептора холестеролу MCD [229]. Як було показано у наших роботах [11–13], ключові процеси, які лежать в основі синаптичної передачі, зазнають змін за умови зміни рівня холестеролу у мембрані. Спираючись на результати досліджень щодо впливу MCD [12, 13], нами було вирішено вивчити комбіновану дію гіпотермії та зниження вмісту холестеролу на ключові характеристики нервової передачі.

На першому етапі оцінювався позаклітинний рівень L-[¹⁴C]глутамату у середовищі інкубації синапсом після предінкубації з MCD у концентрації

15 мМоль за умов гіпотермії. При +37 °С на 14-тій хвилині після охолодження синапсом він складав $267,0 \pm 15,0$ пмоль/мг протеїну для контрольних та $401,0 \pm 23,0$ пмоль/мг протеїну для МСD-оброблених синапсом. При +27 °С – $224,0 \pm 22,0$ пмоль/мг протеїну для контрольних та $387,0 \pm 27,0$ пмоль/мг протеїну для МСD-оброблених, а при +17 °С – $237,0 \pm 29,0$ пмоль/мг протеїну для контрольних та $376,0 \pm 25,0$ пмоль/мг протеїну для МСD-оброблених (n = 4) (рис. 3.26.).

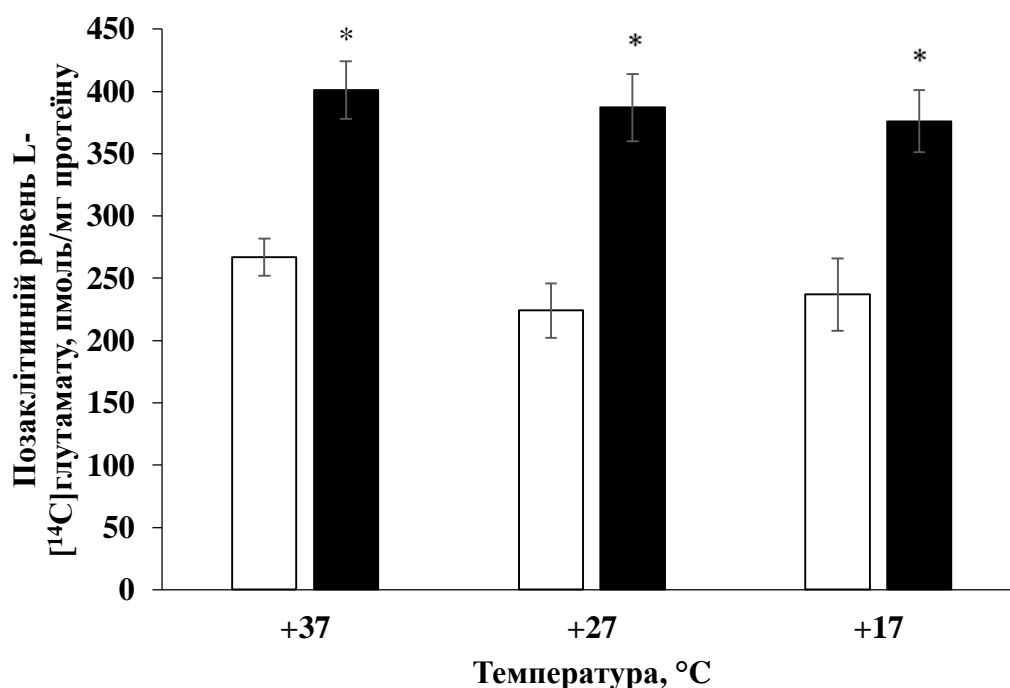


Рис. 3.26. Позаклітинний рівень L-[¹⁴C]глутамату у середовищі інкубації синапсом після попередньої інкубації з 15 мМ МСD за умов гіпотермії. Синапсоми без МСD (білий стовпчик) та проінкубовані з 15 мМ МСD (чорний стовпчик). * – P < 0,05 відносно контролю при відповідній температурі.

Таким чином, рівень позаклітинного L-[¹⁴C]глутамату значно підвищується після обробки МСD в контролі та за умов гіпотермії.

3.5.2. Накопичення L-[¹⁴C]глутамату синапсосомами за присутності MCD та за умов гіпотермії

Комбінований вплив MCD та гіпотермії викликає значні зміни початкової швидкості накопичення L-[¹⁴C]глутамату синапсосомами (рис. 3.27.). Початкова швидкість накопичення L-[¹⁴C]глутамату синапсосомами дорівнювала $2,50 \pm 0,12$ нмоль/(хв×мг) протеїну для контролю та $1,69 \pm 0,15$ нмоль/(хв×мг) для MCD-оброблених синапсосом при +37 °С, $2,04 \pm 0,18$ нмоль/(хв×мг) протеїну для контролю та $1,15 \pm 0,20$ нмоль/(хв×мг) для MCD-оброблених при +27 °С, $1,44 \pm 0,13$ нмоль/(хв×мг) протеїну для контролю та $0,72 \pm 0,14$ нмоль/(хв×мг) для MCD-оброблених при +17 °С ($P < 0,05$, t-тесту Стьюдента, $n = 4$).

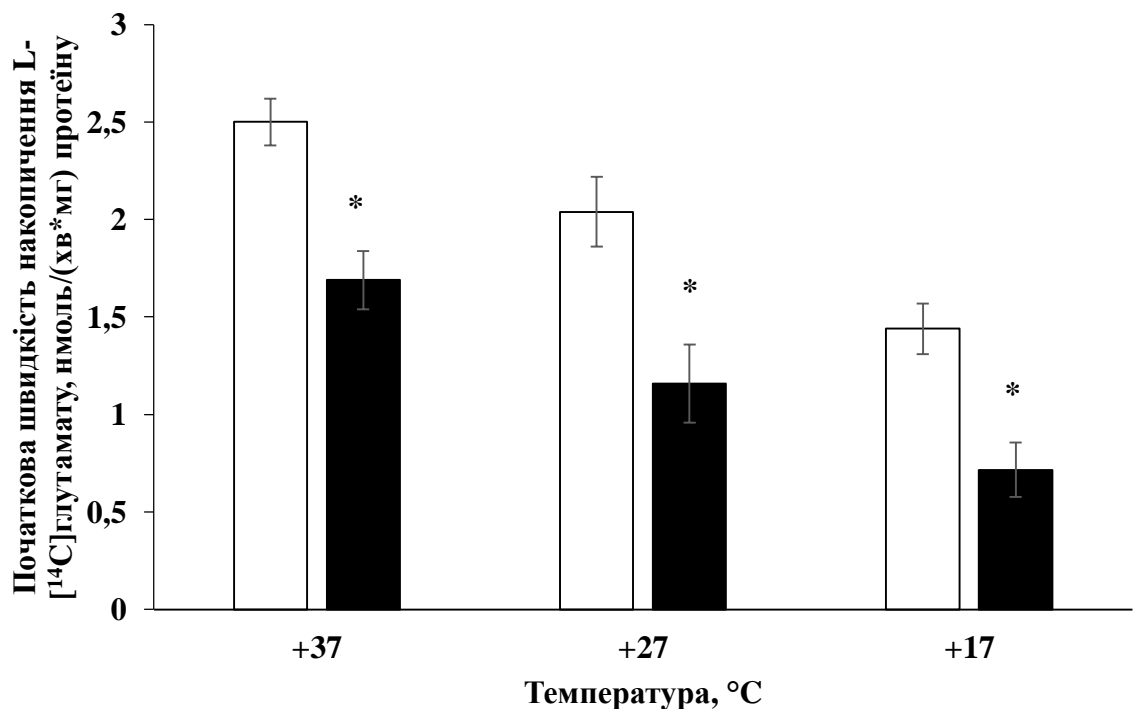


Рис. 3.27. Початкова швидкість накопичення L-[¹⁴C]глутамату синапсосомами після попередньої інкубації з 15 мМ MCD за умов гіпотермії. Синапсосоми без MCD (білий стовпчик) та синапсосоми,

проінкубовані з 15 мМ MCD (чорний стовпчик). * – $P < 0,05$ відносно контролю при відповідній температурі.

Комбіноване застосування MCD та гіпотермії суттєво знижує початкову швидкість накопичення L-[^{14}C]глутамату синаптосомами.

Комбінований вплив MCD та гіпотермії викликає зміни не тільки початкової, а й загальної кількості накопиченого L-[^{14}C]глутамату синаптосомами (рис. 3.28.). Загальне накопичення L-[^{14}C]глутамату синаптосомами у контрольних зразках за 10 хвилин складало $5,43 \pm 0,31$ нмоль/мг протеїну у контролі та $3,66 \pm 0,21$ нмоль/мг – у MCD-оброблених при $+37\text{ }^\circ\text{C}$, $4,11 \pm 0,26$ нмоль/мг протеїну для контролю та $2,33 \pm 0,24$ нмоль/мг у MCD-оброблених при $+27\text{ }^\circ\text{C}$, $3,19 \pm 0,18$ нмоль/мг протеїну для контролю та $1,58 \pm 0,15$ нмоль/мг у MCD-оброблених при $+17\text{ }^\circ\text{C}$ ($P < 0,05$, t-тесту Стьюдента, $n = 4$).

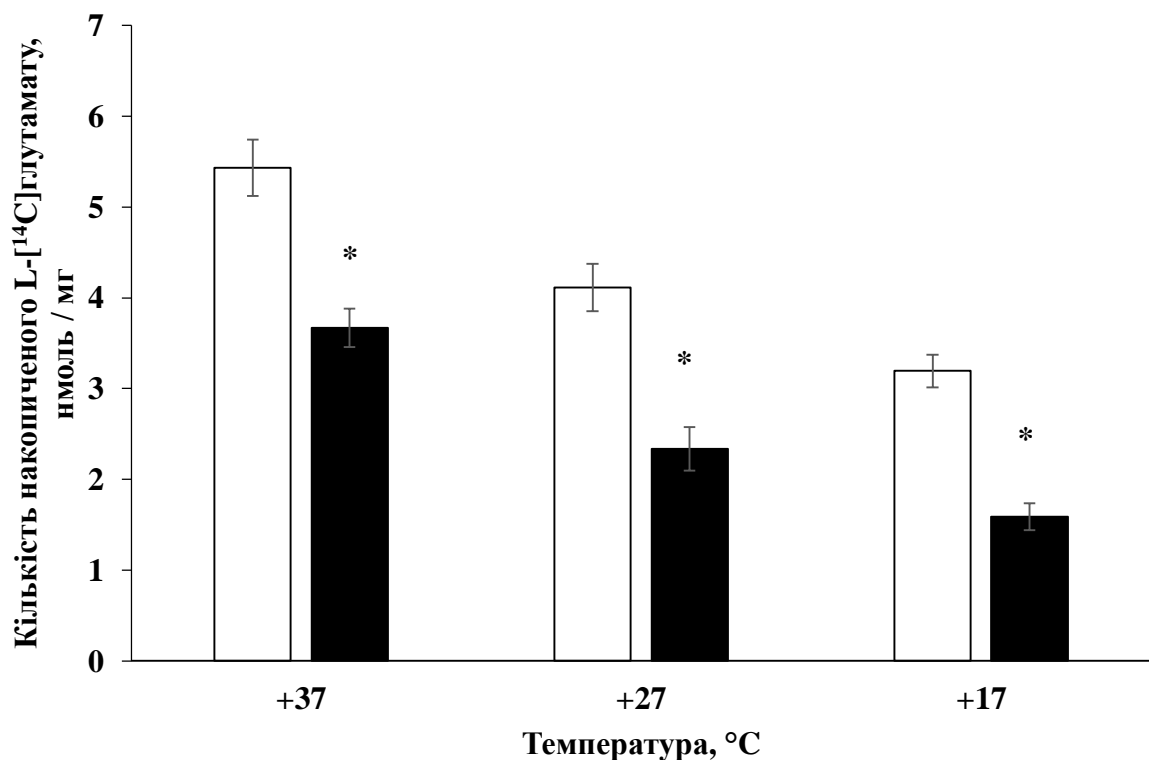


Рис. 3.28. Накопичення L-[^{14}C]глутамату синаптосомами з 15 мМ MCD за умов гіпотермії. Синаптосоми без MCD (білий стовпчик) та

синаптосоми, проінкубовані з 15 мМ МСД (чорний стовпчик). Виміри проводили за 10-хвилин після попередньої інкубації. * – $P < 0,05$ відносно контролю при відповідній температурі.

Отримані результати дозволяють стверджувати, що комбіноване застосування МСД та гіпотермії суттєво знижує рівень накопичення L-[^{14}C]глутамату синаптосомами.

3.5.3. Транспортер-опосередковане вивільнення L-[^{14}C]глутамату у середовищі інкубації синапсом за присутності МСД та за умов гіпотермії

Нами було досліджено вивільнення L-[^{14}C]глутамату з цитозольного пулу синапсом за рахунок реверсного функціонування глутаматних транспортерів (транспортер-опосередковане вивільнення) та з везикулярного пулу шляхом екзоцитозу. Зниження вмісту холестеролу у мембрані за рахунок преінкубації з 15 мМ МСД призводило до зниження транспортер-опосередкованого вивільнення L-[^{14}C]глутамату (рис. 3.29.). Транспортер-опосередковане вивільнення L-[^{14}C]глутамату, стимульоване 35 мМ КСІ, значно знижувалось в умовах комбінованого застосування гіпотермії та МСД у концентрації 15 мМ. Рівень зазначеного вивільнення, виміряного за 6-ть хвилин, складав у контролі $12,0 \pm 1,0$ % від загального вмісту міченого глутамату при $+37$ °С та у МСД-оброблених синаптосомах $7,0 \pm 0,8$ % від загального вмісту міченого глутамату; відповідно при $+27$ °С – $10,0 \pm 0,5$ % та $6,0 \pm 0,7$ % від загального вмісту міченого глутамату, а при $+17$ °С – $6,0 \pm 0,5$ % та $4,0 \pm 0,5$ % від загального вмісту міченого глутамату ($P < 0,05$, t-тесту Стьюдента, $n = 4$).

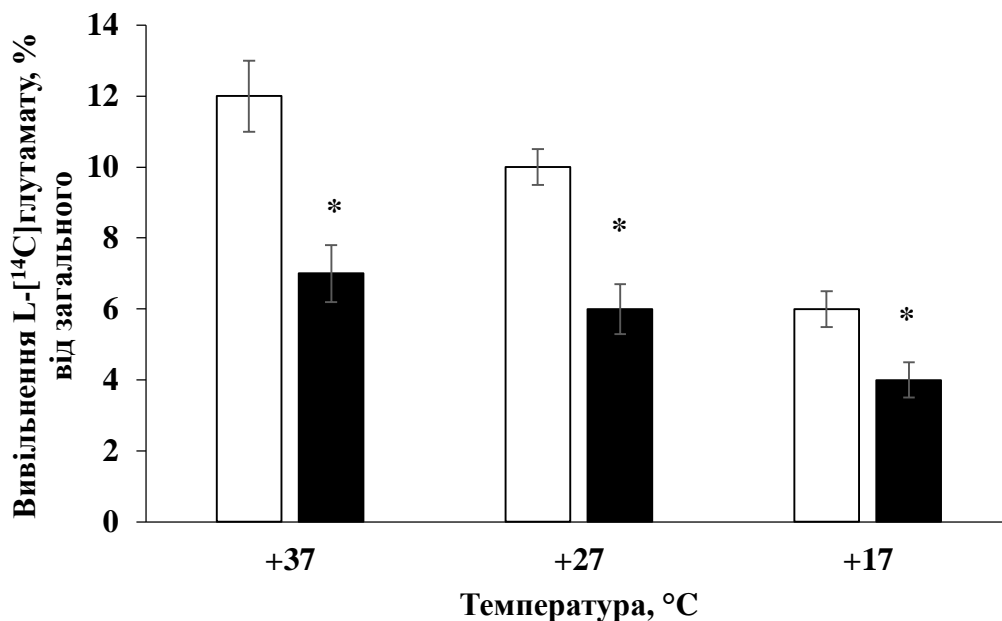


Рис. 3.29. Транспортно-опосередковане вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з нервових терміналей, стимульоване 35 мМ КСl, після попередньої інкубації з 15 мМ МСD за умов гіпотермії. Синаптосоми без обробки МСD (білий стовпчик) та синаптосоми, проінкубовані з 15 мМ МСD (чорний стовпчик). Вивільнення вимірювалося за 6-ть хвилин. * – $P < 0,05$ відносно контролю при відповідній температурі.

Таким чином, швидкість транспортно-опосередкованого вивільнення L-[¹⁴C]глутамату синаптосомами поступово зменшується за умов комбінованого застосування гіпотермії та МСD.

Подібна динаміка зниження спостерігалась і у процесі вивільнення глутамату шляхом екзоцитозу (рис. 3.30.). Показники цього вивільнення, виміряного за 6-ть хвилин, склали при +37 °C у контролі $7,0 \pm 1,0$ % від загального вмісту міченого глутамату та $3,0 \pm 0,4$ % від загального вмісту міченого глутамату у МСD-оброблених синаптосом; при +27 °C – $6,0 \pm 0,6$ % від загального вмісту міченого глутамату та $2,0 \pm 0,3$ % від загального вмісту міченого глутамату у МСD-оброблених синаптосом; при +17 °C – $4,0 \pm 0,4$ % від загального вмісту міченого глутамату та $2,0 \pm 0,3$ % від загального вмісту

міченого глутамату у MCD-оброблених синапсом ($P < 0,05$, t-тесту Стьюдента, $n = 4$).

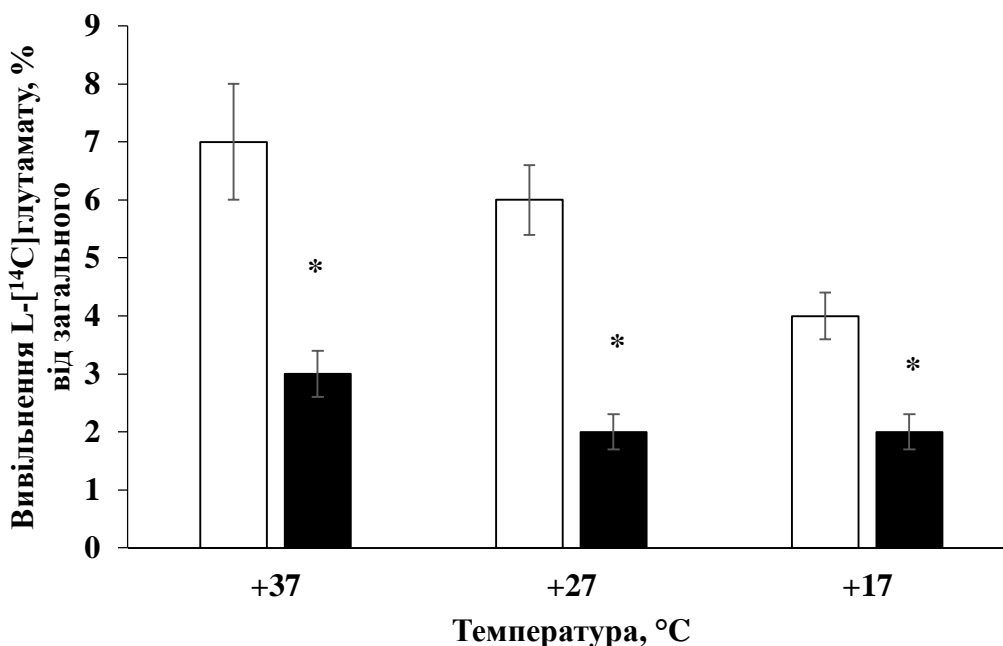


Рис. 3.30. Ca^{2+} -стимульоване вивільнення L-[^{14}C]глутамату шляхом екзоцитозу, стимульованого 35 мМ KCl, з нервових терміналей після попередньої інкубації з 15 мМ MCD за умов гіпотермії. Синапсами без обробки MCD (білий стовпчик) та проінкубовані з 15 мМ MCD (чорний стовпчик). Вивільнення вимірювалося за 6-ть хвилин. * – $P < 0,05$ відносно контролю при відповідній температурі.

Таким чином, вивільнення L-[^{14}C]глутамату з везикулярного пулу синапсом шляхом екзоцитозу та з цитозольного пулу поступово зменшується за умов комбінованого застосування гіпотермії та MCD.

Обробка синапсом MCD за умов гіпотермії значно підвищує рівень позаклітинного глутамату, і це значення не залежить від температури: воно було в півтори рази більшим порівняно з контролем тієї ж температури. Як зазначалось вище, рівень позаклітинного глутамату є балансом між нестимульованим вивільненням та транспортерзалежним накопиченням нейромедіатора. Підвищення позаклітинного рівня глутамату після обробки

MCD є результатом значного підвищення нестимульованого вивільнення глутамату та зменшення початкової швидкості накопичення останнього.

Глутамат вивільнюється у позаклітинне середовище не тільки шляхом екзоцитозу, а й залучаючи інші механізми: вивільнення через аніонні канали, глутамат-цистеїновий обмінник, трансмембранну дифузію, а також реверсну роботу транспортерів. Більша частина цих процесів, залежить від градієнта глутамату на плазматичній мембрані. Проведені дослідження дозволяють зробити висновок, що при обробці синапсом MCD за умов гіпотермії, збільшення позаклітинного рівня глутамату є результатом інгібування активності глутаматних транспортерів, оскільки знижується швидкість накопичення глутамату.

Рівень транспортер-опосередкованого вивільнення глутамату при обробці MCD за умов гіпотермії значно знижується. Це підтверджується даними [12], оскільки організація кластерів глутаматних транспортерів та їх транспорт на плазматичну мембрану змінюються у збіднених на холестерол нервових терміналях після обробки MCD.

Оскільки транспортер-опосередковане вивільнення глутамату з нервових терміналей призводить до розвитку нейротоксичності за умов церебральної гіпоксії/ішемії, інсульту, черепно-мозкової травми, ми вважаємо, що комбіноване застосування зниженого вмісту мембранного холестеролу та гіпотермії може мати сукупний нейропротекторний ефект при зазначених патологіях.

Однак, ми наголошуємо, що, крім вищезгаданих патологічних станів, нормальний рівень мембранного холестеролу надзвичайно важливий для правильної синаптичної передачі, а зниження вмісту холестеролу мембран у нервових терміналях може спричинити нейротоксичні наслідки через слабе захоплення глутамату та збільшення концентрації позаклітинного глутамату [296]. За зазначених умов використання наночастинок може бути перспективним для модуляції транспорту глутамату та візуалізації основних процесів у нервових терміналях, тому наступним нашим кроком було

визначити як наночастинки, кон'юговані з MCD, впливають на транспорт глутамату у нервових терміналях [297].

Результати досліджень, описані в підрозділі 3.5, було опубліковано у статтях:

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

3.6. Застосування наночастинок для зниження вмісту холестеролу у мембрані

3.6.1. Накопичення L-[¹⁴C]глутамату у середовищі інкубації синапсом за присутності наночастинок, кон'югованих з MCD

На сьогодні у медицині є лише невелика кількість специфічних модуляторів транспорту глутамату та глутаматергічної трансмісії у центральній нервовій системі. То ж модуляція вмісту холестеролу у мембрані нервової клітини для регуляції транспорту глутамату є перспективним підходом для рішення проблеми [13]. Зниження рівня мембранного холестеролу впливає на рівень транспортер-опосередкованого вивільнення глутамату з нервових терміналей. Одночасна екстракція та видалення холестеролу з мембрани клітини може використовуватись не лише для модуляції транспорту глутамату у нервових терміналях при нейрологічних та нейродегенеративних захворюваннях, таких як хвороба Альцгеймера та Ніймана-Піка, та й для локальної корекції патологічних процесів, у т.ч. хвороб серця і кровоносної системи, наприклад, атеросклерозу. Холестерол, який захоплюється магнітними наночастинами, у подальшому може бути

видаленим із організму за допомогою зовнішнього магнітного поля [241]. Наночастинки для видалення холестеролу можуть бути використані для нейропротекції за умов церебральної ішемії, інсульту та травматичного пошкодження мозку – захворювань, які асоційовані зі збільшенням транспортер-опосередкованого вивільнення глутамату.

Таким чином, наночастинки можуть бути застосовані при патологічних умовах як статини, що є селективними інгібіторами 3-гідрокси-3-метилглутарил-коензим А-редуктази (HMGCR), яка відповідає за активність мевалонового шляху синтезу холестеролу. Обробка статинами, наприклад, симвастатином, аторвастатином чи правастатином, знижує рівень холестеролу у мозку та може застосовуватись після ішемічних уражень [298]. Експерименти на модельних тваринах підтверджують нейропротекторні властивості статинів за умов церебральної ішемії, травматичних уражень мозку та ексайтотоксичного вивільнення нейромедіаторів [299–301]. Застосування правастатинів покращує нейрологічні показники після інсульту [299] та зменшує пошкодження мозку у щурів [302].

Тому нашим наступним завданням була перевірка новосинтезованих магнетитових наночастинок, кон'югованих з MCD, та оцінка їх нейромодуляторних властивостей на накопичення та позаклітинний рівень глутамату в синаптосомах. В Інституті макромолекулярної хімії Академії Наук Чеської Республіки Проф. Данієлом Хораком було синтезовані наночастинки магнетиту, покриті β -циклодекстрином [241]. Магнетит – це оксид заліза (γ -Fe₂O₃), який має феромагнітні властивості. Розмір цих наночастинок складав для γ -Fe₂O₃ 8,8 нм, для MCD- γ -Fe₂O₃ він складав 12 нм [241]. Було показано, що ці частинки можуть видаляти від 20 до 50 відсотків холестеролу у препараті [241].

Дослідження продемонстрували, що наночастинки викликають значні зміни початкової швидкості накопичення L-[¹⁴C]глутамату синаптосомами (рис. 3.31.). Початкова швидкість накопичення L-[¹⁴C]глутамату синаптосомами у контролі дорівнювала $2,50 \pm 0,12$ нмоль/(хв×мг) протеїну,

для MCD- γ -Fe₂O₃ наночастинок складала $2,00 \pm 0,12$ нмоль/(хв×мг) та для γ -Fe₂O₃ наночастинок $1,90 \pm 0,10$ нмоль/(хв×мг) при 37 °С ($P < 0,05$, t-тесту Стьюдента, $n = 4$).

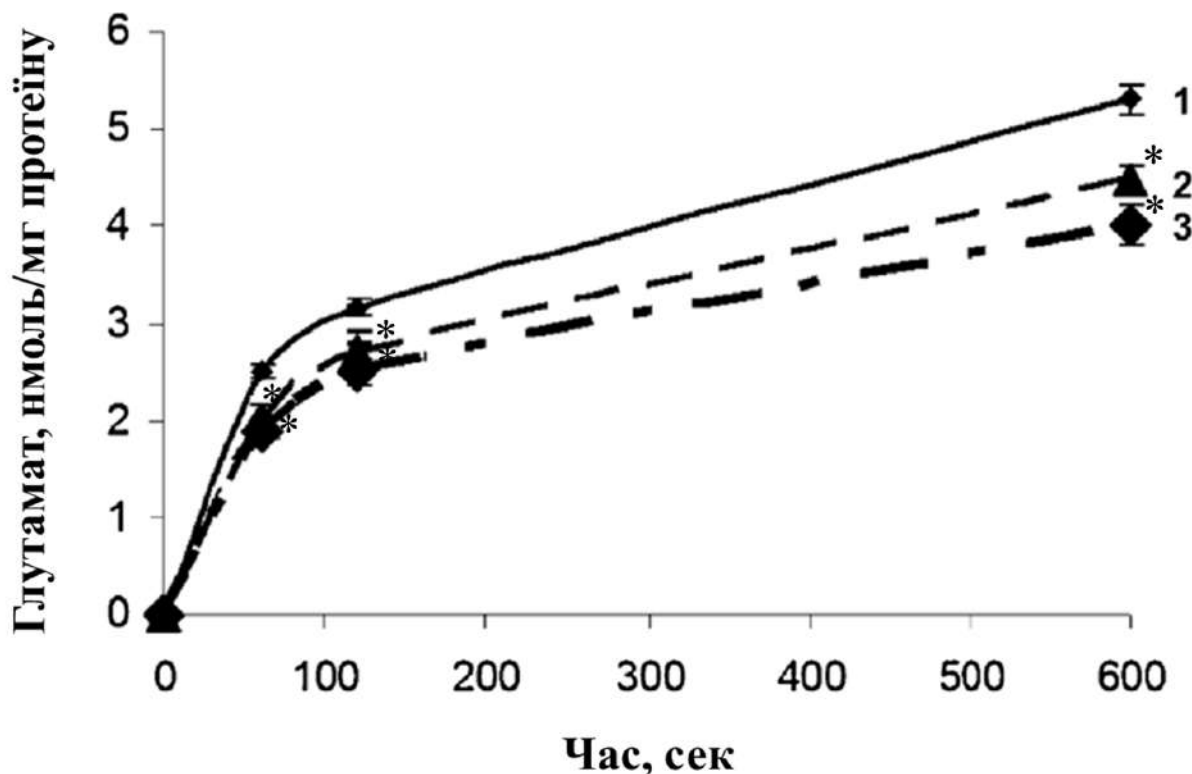


Рис. 3.31. Залежність кількості поглинутого синапсосомами L-[¹⁴C]глутамату від часу інкубації у середовищі синапсосом: 1 – контроль, 2 – за присутності γ -Fe₂O₃ наночастинок, 3 – за присутності MCD- γ -Fe₂O₃ наночастинок.

Наночастинок викликають значні зміни загальної кількості накопиченого L-[¹⁴C]глутамату синапсосомами (рис. 3.31.). Загальне накопичення L-[¹⁴C]глутамату синапсосомами при 37 °С на 10-тій хвилині складало у контролі $5,30 \pm 0,30$ нмоль/(хв×мг) протеїну, для γ -Fe₂O₃ наночастинок – $4,00 \pm 0,20$ нмоль/(хв×мг), для MCD- γ -Fe₂O₃ наночастинок – $4,50 \pm 0,30$ нмоль/(хв×мг) ($P < 0,05$, t-тесту Стьюдента, $n = 4$).

З вищезазначеного можна зробити висновок про те, що наночастинки γ - Fe_2O_3 , як покриті, так і непокриті MCD, впливають на початкову швидкість та загальну кількість накопичення L-[^{14}C]глутамату.

3.6.2. Позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату у середовищі інкубації синапсом за присутності наночастинок, кон'югованих з MCD

Низький рівень загального накопичення L-[^{14}C]глутамату завжди супроводжується зростанням його позаклітинного рівня, тому проаналізували вплив наночастинок на зазначений показник. MCD- γ - Fe_2O_3 наночастинки у концентрації 0,75 мг/мл викликали значні зміни позаклітинного рівня L-[^{14}C]глутамату в синапсомах (рис. 3.32.). Позаклітинний рівень глутамату складав $241,0 \pm 15,0$ пмоль/мг у контролі на 14-тій хвилині та $390,0 \pm 60,0$ пмоль/мг протеїну за присутності у середовищі інкубації MCD- γ - Fe_2O_3 ($P < 0,05$, t-тесту Стьюдента, $n = 4$). MCD- γ - Fe_2O_3 наночастинки значно підвищували позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату у середовищі інкубації синапсом. Непокриті наночастинки такої ж концентрації викликали збільшення позаклітинного рівня L-[^{14}C]глутамату, який складав $310,0 \pm 20,0$ пмоль/мг нмоль/мг протеїну.

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

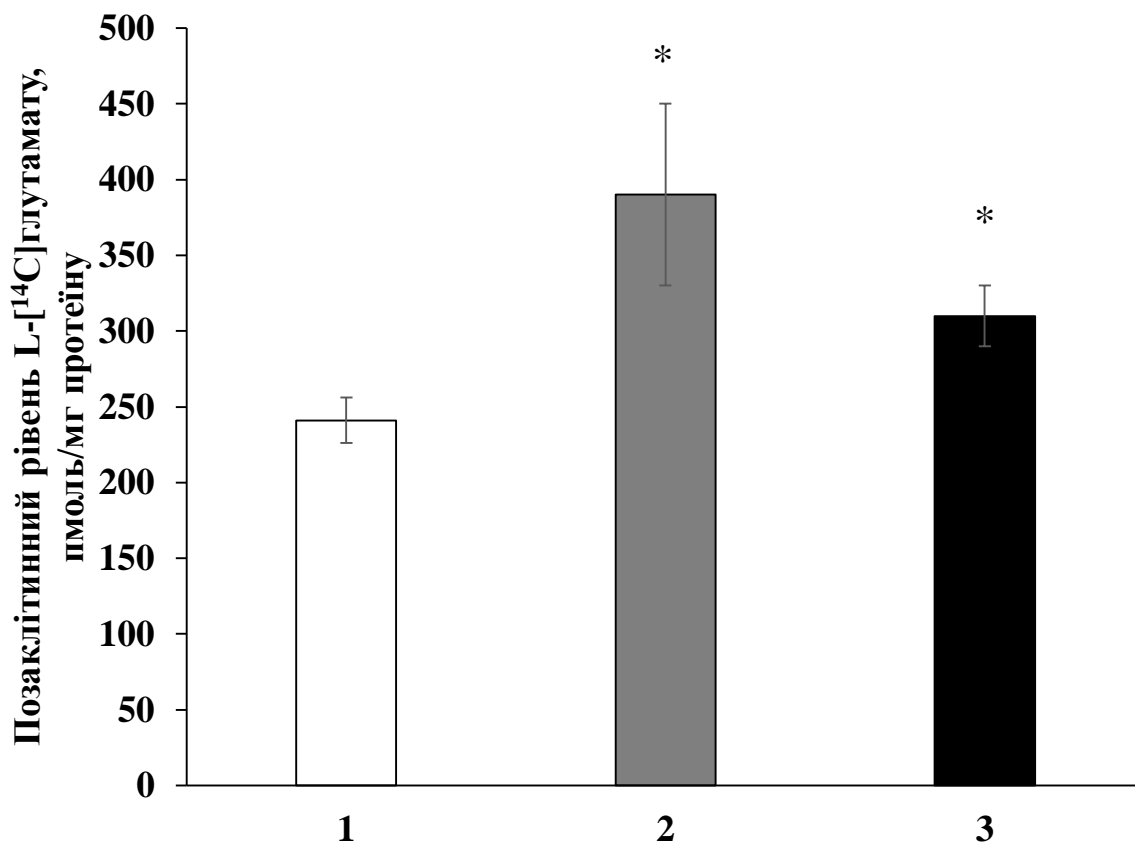


Рис. 3.32. Позаклітинний рівень L-[¹⁴C]глутамату у середовищі інкубації синапсом за присутності MCD- γ -Fe₂O₃ та γ -Fe₂O₃ наночастинок. 1 - контроль, 2 - MCD- γ -Fe₂O₃, 3 - γ -Fe₂O₃. *– P < 0,05 у порівнянні з контролем. Рівень L-[¹⁴C]глутамату визначався на 14-тій хвилині.

Наночастинки MCD- γ -Fe₂O₃ зменшували початкову швидкість накопичення L-[¹⁴C]глутамату, загальну кількість накопичення та збільшували його позаклітинний рівень. Але, оскільки самі наночастинки без покриття мають аналогічний ефект, то у експериментах не було показано, що ці параметри змінюються лише за рахунок зниження вмісту холестеролу. Вочевидь, функція нервових терміналей була частково погіршена за рахунок збільшення позаклітинного рівня глутамату. За присутності наночастинок, нервові терміналі були неспроможні утримувати глутамат всередині та попередити витік внутрішньоклітинного глутамату у середовище інкубації. γ -Fe₂O₃ можуть впливати на плазматичну мембрану або навіть можуть заповнювати синаптичні везикули, тим самим змінюючи функціональні

властивості нервових терміналей. Це може бути пов'язано з фактом, що $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ наночастинки значно менші за розміром порівняно з MCD- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Нашими дослідженнями було показано, що $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ наночастинки без обробки можуть мати нейромодулярні властивості, тобто впливати на накопичення та позаклітинний рівень глутамату, тому ці властивості треба брати до уваги при подальшому застосування наночастинок у медицині.

Результати проведених досліджень, описані в підрозділі 3.6, було опубліковано у статті:

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

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Дотепер, гіпотермія є відомим нейропротекторним засобом у лікуванні неврологічних патологій. Застосування гіпотермії демонструє позитивний ефект як безпосередньо під час порушення, так і через певний проміжок часу. Зниження температури застосовують при лікуванні гіпоксично/ішемічного стану мозку, коли є потреба зменшення негативних наслідків інсульту та операцій, які потребують зниження або зупинки кровообігу. Нейрональні відхилення, які виникають при цих патологічних станах, відбуваються за рахунок порушень регуляції глутаматергічної трансмісії. Стан нестачі енергетичних субстратів, таких як АТФ, глюкоза та кисень, призводить до порушення роботи клітинних систем, відповідальних за підтримку іонного градієнта. Порушення іонного градієнта призводить до деполяризації мембрани нейрональних клітин та реверсної роботи глутаматних транспортерів, що призводить до вивільнення нейромедіаторів, зокрема, глутамату, в синаптичну щілину [154]. Довге знаходження глутамату у синаптичній щілині стає чинником перманентного стану нейрональної гіперзбудливості, що спричиняє загибель нервової клітини. Тобто, постійний вплив глутамату на іонотропні глутаматні рецептори призводить до довгострокового відкриття іонних каналів, через які у клітину поступають іони Na^+ , K^+ та Ca^{2+} , що порушує внутрішньоклітинний іонний баланс, активує процеси апоптозу та загибелі нервової клітини [154]. Питання температурних режимів, терміну впливу та методик застосування гіпотермії на сьогодні залишаються вкрай суперечливими [14, 154, 266, 270]. У медицині розглядаються інші підходи для зниження наслідків ішемічних/гіпоксичних уражень, такі як комбіноване застосування декількох чинників [14, 15].

Отже, була визначена низка завдань, необхідна для опрацювання. Наприклад, проаналізувати вплив різних температурних режимів, а саме, помірної (+27 °C) та глибокої (+17 °C) гіпотермії, на основні нейрохімічні

показники синаптичної передачі. Нами було проаналізовано вплив гіпотермії на швидкість накопичення, загальну кількість накопичення, позаклітинний рівень L-[¹⁴C]глутамату та екзоцитоз L-[¹⁴C]глутамату. Отримані результати засвідчили, що гіпотермія викликає зниження швидкості накопичення L-[¹⁴C]глутамату, знижує загальну кількість накопичення та екзоцитоз L-[¹⁴C]глутамату. Обидва режими гіпотермії не викликають зміни позаклітинного рівня L-[¹⁴C]глутамату. Тонічне вивільнення L-[¹⁴C]глутамату знижується найбільше за умов помірної гіпотермії (+27 °C), а за умов глибокої гіпотермії (+17 °C) навіть збільшується відносно помірної.

За умов моделювання патологічних процесів було вивчено вивільнення L-[¹⁴C]глутамату за рахунок реверсної роботи глутаматних транспортерів. Було доведено, що помірна (+27 °C) та глибока (+17 °C) гіпотермія ефективно знижують реверсну роботу глутаматних транспортерів та вивільнення L-[¹⁴C]глутамату через дисипацію протонного градієнта синаптичних везикул за присутності у середовищі інкубації FCCP.

Було вивчено гомообмін за присутності 100 мкМ глутамату та гетерообмін за присутності 100 мкМ аспартату та DL-ТНА. Досліди показали, що обидва види обміну (гомо- та гетеро-) знижуються за умов гіпотермії. Причому, гомообмін знижувався більше, ніж гетерообмін. Ці дані важливі для терапевтичного прогнозу, оскільки відображають як «здорові» нервові терміналі реагують на надлишок позаклітинного глутамату при зниженні температури. *In vivo*, надлишок глутамату може з'являтися за рахунок екзоцитозу синаптичних везикул та патологічного, викликаного гіпоксією, транспортер-опосередкованого вивільнення глутамату з сусідніх нервових терміналей. Подібність у спричинених гіпотермією поступовому характері динаміки змін гомо- та гетерообміну глутамату, до транспортер-опосередкованого вивільнення глутамату з нервових терміналей підтверджують значний вклад компоненти реверсу транспортерів у гомо- та гетерообмін глутамату. Тобто, транспортер-опосередковане вивільнення

глутамату може бути непатологічним і відбуватися за фізіологічних умов як частина механізму гомо- і гетерообміну.

Також нами було вивчено вплив помірної та глибокої гіпотермії на вивільнення L-[¹⁴C]глутамату за умов активації пресинаптичних іонотропних глутаматних рецепторів. Було продемонстровано, що вплив гіпотермії на різні види рецепторів має різну динаміку та характер. Для NMDA-стимульованого вивільнення глутамату його зниження за умов гіпотермії складало 15 % та мало характер поступового зниження з проміжком часу. Для AMPA- та кайнат-стимульованого вивільнення зниження вивільнення становило 20 % та 30 %, відповідно, та мало динаміку поступового зростання з проміжком часу.

На основі вищезазначеного було зроблено припущення щодо клінічного застосування гіпотермії. Нейропротекторний ефект гіпотермії може виявлятися тоді, коли нервові клітини все ще в змозі вивільнювати глутамат за рахунок реверсу транспортерів та інших механізмів, не пов'язаних з ним. У цьому контексті важливим є вибір оптимального індивідуального температурного режиму хворого залежно від розміру незворотньо пошкодженої зони мозку. Стратегія успішної терапевтичної гіпотермії, полягає як і у зменшенні її можливого шкідливого впливу на нервові клітини, так і у посиленні її прямого нейропротекторного. Ці умови можуть бути реалізовані шляхом комбінованого поєднання неспецифічних ефектів гіпотермії з іншими неспецифічними та специфічними нейропротекторами.

Тому наступним завданням було вивчення комбінованого підходу, а саме поєднання гіпотермії з іншими неспецифічними нейропротекторами та специфічними нейромодуляторами. Було проаналізовано вплив неспецифічного нейропротектора гіпотермії та широко відомого протисудомного препарату леветирацетаму на основні нейрохімічні показники. Було продемонстровано, що леветирацетам не впливає на позаклітинний рівень глутамату та мембранний потенціал синапсом. При вивченні дії леветирацетаму за умов активації пресинаптичних іонотропних

глутаматних рецепторів показано, що препарат впливає на NMDA-стимульоване вивільнення глутамату з нервових терміналей, збільшуючи його, та не впливає на AMPA- та кайнат-стимульоване вивільнення. Наші експерименти демонструють можливість коригування (пом'якшення) леветирацетамом зниження NMDA-індукованого вивільнення L-[¹⁴C]глутамату в умовах гіпотермії. Корекція відповіді NMDA-рецепторів може зменшити побічні ефекти терапевтичної гіпотермії та стати у нагоді для забезпечення належного функціонування NMDA-рецепторів у кардіохірургії та відновлення після терапевтичної гіпотермії. Гіпотермію в зазначених випадках застосовують не для запобігання розвитку ексайтотоксичності.

Ми вважаємо, що запропонований підхід комбінованого застосування гіпотермії та леветирацетаму недоречно використовувати у випадках, коли терапевтична гіпотермія застосовується для пом'якшення наявної глутаматної ексайтотоксичності, як це трапляється під час інсульту, травм головного мозку та лікуванні асфіксії новонароджених. Слід зазначити, що нейропротекторні ефекти гіпотермії при терапії цих патологій пов'язані зі значним і поступовим зниженням патологічного вивільнення глутамату з нервових терміналей. Звичайно, підвищення рівня NMDA-відповіді, викликане леветирацетамом, може лише посилити ексайтотоксичні наслідки при даних патологіях.

Наші експериментальні дані та вищезгадані пропозиції узгоджуються з дослідженнями *in vivo* на тваринах Strasser із співавторами (2016 р.), які з'ясували, що застосування низьких доз леветирацетаму не спричиняло побічних ефектів після гіпотермії при гіпоксичних станах у новонароджених, тоді як застосування високих доз леветирацетаму само по собі або у поєднанні з гіпотермією збільшує апоптоз нейронів після гіпоксичної травми головного мозку [271]. Автори застерігають щодо застосування високих доз леветирацетаму новонародженим з уже існуючими ураженнями мозку через нейротоксичний ефект препарату, а також виявили, що леветирацетам у низьких дозах не дає додаткового нейрозахисту [271]. Спираючись на

отримані нами експериментальні дані, можна припустити, що нейротоксичний ефект препарату у модельних тварин *in vivo* був пов'язаний з підвищенням відповіді рецепторів глутамату.

Леветирацетам значно пом'якшує дію гіпотермії, яка викликає зниження відповіді NMDA-рецепторів на пресинаптичному рівні, отже, комбіноване застосування гіпотермії та леветирацетаму, корегує та наближує до норми NMDA-стимульоване вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з нервових терміналей. Цей комплексний підхід може зменшити побічні ефекти терапевтичної гіпотермії при серцевій хірургії, де головна мета застосування гіпотермії не пов'язана з уникненням наслідків наявної гострої ексайтотоксичності глутамату (на відміну від інсульту, травм мозку та лікування асфіксії у новонароджених).

Іншим аспектом роботи було вивчення комбінаторного впливу гіпотермії та MCD на основні нейрохімічні показники. Було продемонстровано, що MCD впливає на позаклітинний рівень глутамату, збільшуючи його. Одночасно відбувається зменшення швидкості, екзоцитозу та загальної кількості накопичення L-[¹⁴C]глутамату. Це свідчить, що збільшення позаклітинного рівня глутамату після обробки MCD є результатом значного підвищення нестимульованого вивільнення глутамату та зменшення початкової швидкості накопичення останнього.

Рівень транспортер-опосередкованого вивільнення глутамату при обробці MCD за умов гіпотермії значно знижується, що підтверджується даними [12]. Оскільки транспортер-опосередковане вивільнення глутамату з нервових терміналей призводить до розвитку нейротоксичності за умов церебральної гіпоксії/ішемії, інсульту, черепно-мозкових травм, ми вважаємо, що комбіноване застосування зниження вмісту мембранного холестеролу та зниження температури може мати нейропротекторний ефект при зазначених патологіях. Однак, ми наголошуємо, що, крім вищезгаданих патологічних станів, рівень мембранного холестеролу у клітин без уражень повинен залишатися у нормі, оскільки кластеризація глутаматних

транспортів та їх транспорт на плазматичну мембрану залежить від рівня мембранного холестеролу, надзвичайно важливого для правильної синаптичної передачі. Зниження вмісту холестеролу мембран у нервових терміналях може спричинити нейротоксичні наслідки через зниження накопичення глутамату та, в свою чергу, збільшення концентрації позаклітинного глутамату [296].

Ще одним, вельми новаторським підходом, було застосування MCD-кон'югованих наночастинок та вивчення їх впливу на вивільнення L-[¹⁴C]глутамату за умов гіпотермії. Було продемонстровано, що наночастинок, покриті MCD, зменшують початкову швидкість накопичення L-[¹⁴C]глутамату, загальну кількість накопичення та збільшують його позаклітинний рівень. Але, оскільки наночастинок без покриття теж мають нейромодуляторний ефект, то це потрібно враховувати при подальшому вивченні застосування наночастинок у медицині.

Результати проведених досліджень дозволяють вважати, що гіпотермія є досить сильним неспецифічним нейропротекторним засобом. Її застосування для зниження транспортер-опосередкованого вивільнення, а також комбінована дія разом з медикаментозною підтримкою дозволяють зменшити наслідки гіпоксичних/ішемічних уражень мозку та забезпечити позитивний прогноз нормального функціонування нервової тканини.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вивчено вплив помірної та глибокої гіпотермії на Na^+ -залежний транспорт глутамату та екзоцитоз у нервових терміналях головного мозку. Отримані результати доводять значний нейропротекторний ефект гіпотермії та визначають механізми її дії на рівні пресинаптичної нервової терміналі. Індивідуальний до кожного організму характер змін у позаклітинному рівні глутамату в нервових терміналях за умов гіпоксії вказує на необхідність проведення детального нейромоніторингу під час її застосування у терапії нейро- та кардіопатологій. Визначена нейрохімічна платформа диверсифікації використання терапевтичної помірної та глибокої гіпотермії для попередження неврологічних наслідків інсульту. Продемонстрована можливість застосування комбінованої гіпотермії у комплексі з протисудомним препаратом леветирацетам та акцептором холестеролу MCD для посилення нейропротекторної дії, зменшення негативних наслідків та покращення довгострокового прогнозу.

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 кайнатних 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 кайнат-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 магнетиту, 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- [1] Zhou Y, Danbolt NC. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J Neural Transm* 2014; 121: 799–817.
- [2] Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 2001; 65: 1–105.
- [3] Ribeiro FM, Vieira LB, Pires RGW, et al. Metabotropic glutamate receptors and neurodegenerative diseases. *Pharmacol Res* 2017; 115: 179–191.
- [4] Rossi DJ, Oshima T, Attwell D. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 2000; 403: 316–321.
- [5] Krzyżanowska W, Pomierny B, Filip MM, et al. Glutamate transporters in brain ischemia: to modulate or not? *Acta Pharmacol Sin* 2014; 35: 444–462.
- [6] Englum BR, Andersen ND, Husain AM, et al. Degree of hypothermia in aortic arch surgery - optimal temperature for cerebral and spinal protection: deep hypothermia remains the gold standard in the absence of randomized data. *Ann Cardiothorac Surg* 2013; 2: 184–93.
- [7] Kuffler D. Maximizing neuroprotection: where do we stand? *Ther Clin Risk Manag* 2012; 8: 185.
- [8] Wang H, Olivero W, Wang D, et al. Cold as a therapeutic agent. *Acta Neurochir (Wien)* 2006; 148: 565-70; discussion 569-70.
- [9] Kurisu K, Yenari MA. Therapeutic hypothermia for ischemic stroke; pathophysiology and future promise. *Neuropharmacology* 2018; 134: 302–309.
- [10] Sato S, Takeda Y, Mizoue R, et al. Determination of the Target Temperature Required to Block Increases in Extracellular Glutamate Levels During Intraischemic Hypothermia. *Ther Hypothermia Temp Manag* 2018; 8: 83–89.
- [11] Borisova T, Krisanova N, Sivko R, et al. Cholesterol depletion attenuates tonic release but increases the ambient level of glutamate in rat brain synaptosomes. *Neurochem Int* 2010; 56: 466–478.
- [12] Krisanova N, Sivko R, Kasatkina L, et al. Neuroprotection by lowering cholesterol: A decrease in membrane cholesterol content reduces transporter-

- mediated glutamate release from brain nerve terminals. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2012; 1822: 1553–1561.
- [13] Borisova T, Sivko R, Borysov A, et al. Diverse Presynaptic Mechanisms Underlying Methyl- β -Cyclodextrin-Mediated Changes in Glutamate Transport. *Cell Mol Neurobiol* 2010; 30: 1013–1023.
- [14] Goossens J, Hachimi-Idrissi S. Combination of therapeutic hypothermia and other neuroprotective strategies after an ischemic cerebral insult. *Curr Neuropharmacol* 2014; 12: 399–412.
- [15] Donovan MD, Griffin BT, Kharoshankaya L, et al. Pharmacotherapy for Neonatal Seizures: Current Knowledge and Future Perspectives. *Drugs* 2016; 76: 647–661.
- [16] Fonnum F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* 1984; 42: 1–11.
- [17] Krebs HA. Metabolism of amino-acids: The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. *Biochem J* 1935; 29: 1951–69.
- [18] Berl S, Lajtha A, Waelsch H. AMINO ACID AND PROTEIN METABOLISM-VI CEREBRAL COMPARTMENTS OF GLUTAMIC ACID METABOLISM. *J Neurochem* 1961; 7: 186–197.
- [19] Schousboe A. Transport and metabolism of glutamate and GABA in neurons and glial cells. *Int Rev Neurobiol* 1981; 22: 1–45.
- [20] Ronne-Engström E, Carlson H, Liu Y, et al. Influence of perfusate glucose concentration on dialysate lactate, pyruvate, aspartate, and glutamate levels under basal and hypoxic conditions: a microdialysis study in rat brain. *J Neurochem* 1995; 65: 257–62.
- [21] Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, et al. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 1984; 43: 1369–74.
- [22] Manent J-B. A Noncanonical Release of GABA and Glutamate Modulates

- Neuronal Migration. *J Neurosci* 2005; 25: 4755–4765.
- [23] Park H, Han K-S, Seo J, et al. Channel-mediated astrocytic glutamate modulates hippocampal synaptic plasticity by activating postsynaptic NMDA receptors. *Mol Brain* 2015; 8: 7.
- [24] Noh J, Seal RP, Garver JA, et al. Glutamate co-release at GABA/glycinergic synapses is crucial for the refinement of an inhibitory map. *Nat Neurosci* 2010; 13: 232–8.
- [25] Brosnan JT, Brosnan ME. Glutamate: a truly functional amino acid. *Amino Acids* 2013; 45: 413–418.
- [26] Burrin DG, Stoll B. Metabolic fate and function of dietary glutamate in the gut. *Am J Clin Nutr* 2009; 90: 850S–856S.
- [27] Kasatkina LA, Borisova TA. Glutamate release from platelets: Exocytosis versus glutamate transporter reversal. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; 45: 2585–2595.
- [28] Hawkins RA, DeJoseph MR, Hawkins PA. Regional brain glutamate transport in rats at normal and raised concentrations of circulating glutamate. *Cell Tissue Res* 1995; 281: 207–214.
- [29] Smith QR. Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier. *J Nutr* 2000; 130: 1016S–22S.
- [30] Qutub AA, Hunt CA. Glucose transport to the brain: a systems model. *Brain Res Brain Res Rev* 2005; 49: 595–617.
- [31] Pellerin L, Halestrap AP, Pierre K, et al. Cellular and subcellular distribution of monocarboxylate transporters in cultured brain cells and in the adult brain. *J Neurosci Res* 2005; 79: 55–64.
- [32] Pellerin L, Pellegrini G, Bittar PG, et al. Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Dev Neurosci* 1998; 20: 291–9.
- [33] Takamori S, Malherbe P, Broger C, et al. Molecular cloning and functional characterization of human vesicular glutamate transporter 3. *EMBO Rep* 2002; 3: 798–803.

- [34] Erecińska M, Silver IA. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog Neurobiol* 1990; 35: 245–96.
- [35] Boulland J-L, Osen KK, Levy LM, et al. Cell-specific expression of the glutamine transporter SN1 suggests differences in dependence on the glutamine cycle. *Eur J Neurosci* 2002; 15: 1615–31.
- [36] Hamdani EH, Gudbrandsen M, Bjørkmo M, et al. The system N transporter SN2 doubles as a transmitter precursor furnisher and a potential regulator of NMDA receptors. *Glia* 2012; 60: 1671–1683.
- [37] Blot A, Billups D, Bjørkmo M, et al. Functional expression of two system A glutamine transporter isoforms in rat auditory brainstem neurons. *Neuroscience* 2009; 164: 998–1008.
- [38] Bannai S, Kitamura E. Transport interaction of L-cystine and L-glutamate in human diploid fibroblasts in culture. *J Biol Chem* 1980; 255: 2372–6.
- [39] Bridges RJ, Natale NR, Patel SA. System xc- cystine/glutamate antiporter: an update on molecular pharmacology and roles within the CNS. *Br J Pharmacol* 2012; 165: 20–34.
- [40] Dringen R, Hirrlinger J. Glutathione Pathways in the Brain. *Biol Chem* 2003; 384: 505–16.
- [41] Tan S, Schubert D, Maher P. Oxytosis: A novel form of programmed cell death. *Curr Top Med Chem* 2001; 1: 497–506.
- [42] Moran MM, McFarland K, Melendez RI, et al. Cystine/Glutamate Exchange Regulates Metabotropic Glutamate Receptor Presynaptic Inhibition of Excitatory Transmission and Vulnerability to Cocaine Seeking. *J Neurosci* 2005; 25: 6389–6393.
- [43] Moussawi K, Pacchioni A, Moran M, et al. N-Acetylcysteine reverses cocaine-induced metaplasticity. *Nat Neurosci* 2009; 12: 182–189.
- [44] Waniewski RA, Martin DL. Characterization of L-glutamic acid transport by glioma cells in culture: evidence for sodium-independent, chloride-dependent high affinity influx. *J Neurosci* 1984; 4: 2237–46.
- [45] Catterall WA. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect*

- Biol* 2011; 3: a003947.
- [46] Tortora GJ, Derrickson B. *Principles of anatomy & physiology*. Wiley Global Education,
<https://books.google.co.uk/books?id=boNbAgAAQBAJ&dq=principles+of+a+anatomy+and+physiology&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwjE-ej-0NnWAhUkLMAKHazvDkMQ6AEIJjAA> (accessed 30 October 2017).
- [47] Verhage M, Sørensen JB. Vesicle Docking in Regulated Exocytosis. *Traffic* 2008; 9: 1414–1424.
- [48] Sudhof TC. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 2004; 27: 509–47.
- [49] Schneggenburger R, Meyer AC, Neher E. Released fraction and total size of a pool of immediately available transmitter quanta at a calyx synapse. *Neuron* 1999; 23: 399–409.
- [50] Richards DA, Guatimosim C, Rizzoli SO, et al. Synaptic vesicle pools at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 2003; 39: 529–41.
- [51] de Lange RPJ, de Roos ADG, Borst JGG. Two modes of vesicle recycling in the rat calyx of Held. *J Neurosci* 2003; 23: 10164–73.
- [52] Delgado R, Maureira C, Oliva C, et al. Size of vesicle pools, rates of mobilization, and recycling at neuromuscular synapses of a *Drosophila* mutant, shibire. *Neuron* 2000; 28: 941–53.
- [53] Ikeda K, Bekkers JM. Counting the number of releasable synaptic vesicles in a presynaptic terminal. *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106: 2945–2950.
- [54] Pendyam S, Mohan A, Kalivas PW, et al. Computational model of extracellular glutamate in the nucleus accumbens incorporates neuroadaptations by chronic cocaine. *Neuroscience* 2009; 158: 1266–1276.
- [55] Barbour B, Häusser M. Intersynaptic diffusion of neurotransmitter. *Trends Neurosci* 1997; 20: 377–84.
- [56] Clements JD. Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function. *Trends Neurosci* 1996; 19: 163–71.
- [57] Rusakov DA. The role of perisynaptic glial sheaths in glutamate spillover

- and extracellular Ca(2+) depletion. *Biophys J* 2001; 81: 1947–59.
- [58] Franks KM, Stevens CF, Sejnowski TJ. Independent sources of quantal variability at single glutamatergic synapses. *J Neurosci* 2003; 23: 3186–95.
- [59] Ottersen OP, Takumi Y, Ramírez-León V, et al. Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. *Nat Neurosci* 1999; 2: 618–624.
- [60] Nusser Z, Lujan R, Laube G, et al. Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron* 1998; 21: 545–59.
- [61] Savtchenko LP, Rusakov DA. Glutamate escape from a tortuous synaptic cleft of the hippocampal mossy fibre synapse. *Neurochem Int* 2004; 45: 479–84.
- [62] Zhang Q, Pangršič T, Kreft M, et al. Fusion-related Release of Glutamate from Astrocytes. *J Biol Chem* 2004; 279: 12724–12733.
- [63] Ye Z-C, Wyeth MS, Baltan-Tekkok S, et al. Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J Neurosci* 2003; 23: 3588–96.
- [64] Basarsky TA, Feighan D, MacVicar BA. Glutamate release through volume-activated channels during spreading depression. *J Neurosci* 1999; 19: 6439–45.
- [65] Blakely RD, Robinson MB, Thompson RC, et al. Hydrolysis of the brain dipeptide N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate: subcellular and regional distribution, ontogeny, and the effect of lesions on N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase activity. *J Neurochem* 1988; 50: 1200–9.
- [66] Mena F V., Baab PJ, Zielke CL, et al. Formation of extracellular glutamate from glutamine: Exclusion of pyroglutamate as an intermediate. *Brain Res* 2005; 1052: 88–96.
- [67] Augustin H, Grosjean Y, Chen K, et al. Nonvesicular Release of Glutamate by Glial xCT Transporters Suppresses Glutamate Receptor Clustering In Vivo. *J Neurosci* 2007; 27: 111–123.

- [68] Featherstone DE, Rushton E, Broadie K. Developmental regulation of glutamate receptor field size by nonvesicular glutamate release. *Nat Neurosci* 2002; 5: 141–146.
- [69] Vandenberg RJ, Ryan RM. Mechanisms of Glutamate Transport. *Physiol Rev* 2013; 93: 1621–1657.
- [70] Storck T, Schulte S, Hofmann K, et al. Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 10955–9.
- [71] Pines G, Danbolt NC, Bjørås M, et al. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* 1992; 360: 464–467.
- [72] Kanai Y, Hediger MA. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* 1992; 360: 467–471.
- [73] Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, et al. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 1995; 375: 599–603.
- [74] Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, et al. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 4155–60.
- [75] Kim K, Lee S-G, Kegelman TP, et al. Role of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: opportunities for developing novel therapeutics. *J Cell Physiol* 2011; 226: 2484–93.
- [76] Maragakis NJ, Dietrich J, Wong V, et al. Glutamate transporter expression and function in human glial progenitors. *Glia* 2004; 45: 133–143.
- [77] Lehre KP, Danbolt NC. The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J Neurosci* 1998; 18: 8751–7.
- [78] Bergles DE, Tzingounis A V, Jahr CE. Comparison of coupled and uncoupled currents during glutamate uptake by GLT-1 transporters. *J Neurosci* 2002; 22: 10153–62.
- [79] Otis TS, Jahr CE. Anion currents and predicted glutamate flux through a

- neuronal glutamate transporter. *J Neurosci* 1998; 18: 7099–110.
- [80] Magistretti PJ, Pellerin L, Rothman DL, et al. Energy on demand. *Science* 1999; 283: 496–7.
- [81] Owe SG, Marcaggi P, Attwell D. The ionic stoichiometry of the GLAST glutamate transporter in salamander retinal glia. *J Physiol* 2006; 577: 591–9.
- [82] Levy LM, Warr O, Attwell D. Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na⁺-dependent glutamate uptake. *J Neurosci* 1998; 18: 9620–8.
- [83] Langer J, Rose CR. Synaptically induced sodium signals in hippocampal astrocytes in situ. *J Physiol* 2009; 587: 5859–77.
- [84] Takahashi S, Driscoll BF, Law MJ, et al. Role of sodium and potassium ions in regulation of glucose metabolism in cultured astroglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 4616–20.
- [85] Nakagawa T, Otsubo Y, Yatani Y, et al. Mechanisms of substrate transport-induced clustering of a glial glutamate transporter GLT-1 in astroglial-neuronal cultures. *Eur J Neurosci* 2008; 28: 1719–1730.
- [86] Takayasu Y, Iino M, Takatsuru Y, et al. Functions of glutamate transporters in cerebellar Purkinje cell synapses. *Acta Physiol* 2009; 197: 1–12.
- [87] Ryan RM, Mindell JA. The uncoupled chloride conductance of a bacterial glutamate transporter homolog. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14: 365–371.
- [88] Dehnes Y, Chaudhry FA, Ullensvang K, et al. The glutamate transporter EAAT4 in rat cerebellar Purkinje cells: a glutamate-gated chloride channel concentrated near the synapse in parts of the dendritic membrane facing astroglia. *J Neurosci* 1998; 18: 3606–19.
- [89] Veruki ML, Mørkve SH, Hartveit E. Activation of a presynaptic glutamate transporter regulates synaptic transmission through electrical signaling. *Nat Neurosci* 2006; 9: 1388–1396.
- [90] Gameiro A, Braams S, Rauen T, et al. The Discovery of Slowness: Low-Capacity Transport and Slow Anion Channel Gating by the Glutamate

- Transporter EAAT5. *Biophys J* 2011; 100: 2623–2632.
- [91] Sonders MS, Amara SG. Channels in transporters. *Curr Opin Neurobiol* 1996; 6: 294–302.
- [92] Palmieri F. The mitochondrial transporter family SLC25: Identification, properties and physiopathology. *Mol Aspects Med* 2013; 34: 465–484.
- [93] El Mestikawy S, Wallén-Mackenzie Å, Fortin GM, et al. From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nat Rev Neurosci* 2011; 12: 204–216.
- [94] Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, et al. Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature*; 407. Epub ahead of print 14 September 2000. DOI: 10.1038/35025070.
- [95] Omote H, Miyaji T, Juge N, et al. Vesicular Neurotransmitter Transporter: Bioenergetics and Regulation of Glutamate Transport. *Biochemistry* 2011; 50: 5558–5565.
- [96] Kaneko T, Fujiyama F. Complementary distribution of vesicular glutamate transporters in the central nervous system. *Neurosci Res* 2002; 42: 243–50.
- [97] Persson S, Boulland J-L, Aspling M, et al. Distribution of vesicular glutamate transporters 1 and 2 in the rat spinal cord, with a note on the spinocervical tract. *J Comp Neurol* 2006; 497: 683–701.
- [98] Herzog E, Takamori S, Jahn R, et al. Synaptic and vesicular co-localization of the glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in the mouse hippocampus. *J Neurochem* 2006; 99: 1011–1018.
- [99] Gras C, Herzog E, Bellenchi GC, et al. A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci* 2002; 22: 5442–51.
- [100] Schäfer MK-H, Varoqui H, Defamie N, et al. Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *J Biol Chem* 2002; 277: 50734–48.

- [101] Ormel L, Stensrud MJ, Chaudhry FA, et al. A distinct set of synaptic-like microvesicles in astroglial cells contain VGLUT3. *Glia* 2012; 60: 1289–300.
- [102] Tordera RM, Totterdell S, Wojcik SM, et al. Enhanced anxiety, depressive-like behaviour and impaired recognition memory in mice with reduced expression of the vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1). *Eur J Neurosci* 2007; 25: 281–290.
- [103] Moechars D, Weston MC, Leo S, et al. Vesicular Glutamate Transporter VGLUT2 Expression Levels Control Quantal Size and Neuropathic Pain. *J Neurosci* 2006; 26: 12055–12066.
- [104] Seal RP, Akil O, Yi E, et al. Sensorineural Deafness and Seizures in Mice Lacking Vesicular Glutamate Transporter 3. *Neuron* 2008; 57: 263–275.
- [105] Tabb JS, Kish PE, Van Dyke R, et al. Glutamate transport into synaptic vesicles. Roles of membrane potential, pH gradient, and intravesicular pH. *J Biol Chem* 1992; 267: 15412–8.
- [106] Ozkan ED, Ueda T. Glutamate transport and storage in synaptic vesicles. *Jpn J Pharmacol* 1998; 77: 1–10.
- [107] Ueda T. Vesicular Glutamate Uptake. pp. 173–221.
- [108] Wolosker H, de Souza DO, de Meis L. Regulation of glutamate transport into synaptic vesicles by chloride and proton gradient. *J Biol Chem* 1996; 271: 11726–31.
- [109] Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, et al. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacol Rev* 2010; 62: 405–496.
- [110] Niswender CM, Conn PJ. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010; 50: 295–322.
- [111] Ferraguti F, Shigemoto R. Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res* 2006; 326: 483–504.
- [112] Pinheiro PS, Mulle C. Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9: 423–436.

- [113] Anwyl R. Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res Brain Res Rev* 1999; 29: 83–120.
- [114] Wierońska JM, Pilc A. Metabotropic glutamate receptors in the tripartite synapse as a target for new psychotropic drugs. *Neurochem Int* 2009; 55: 85–97.
- [115] Gonda X. Basic pharmacology of NMDA receptors. *Curr Pharm Des* 2012; 18: 1558–67.
- [116] Rogawski MA. AMPA receptors as a molecular target in epilepsy therapy. *Acta Neurol Scand Suppl* 2013; 9–18.
- [117] Lerma J, Marques JM. Kainate Receptors in Health and Disease. *Neuron* 2013; 80: 292–311.
- [118] Suryavanshi PS, Gupta SC, Yadav R, et al. Glutamate Delta-1 Receptor Regulates Metabotropic Glutamate Receptor 5 Signaling in the Hippocampus. *Mol Pharmacol* 2016; 90: 96–105.
- [119] Bergles DE, Roberts JD, Somogyi P, et al. Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature* 2000; 405: 187–91.
- [120] Shelton MK, McCarthy KD. Mature hippocampal astrocytes exhibit functional metabotropic and ionotropic glutamate receptors in situ. *Glia* 1999; 26: 1–11.
- [121] Petralia RS, Rubio ME, Wenthold RJ. Cellular and Subcellular Distribution of Glutamate Receptors. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 143–171.
- [122] Dingledine R, Borges K, Bowie D, et al. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 1999; 51: 7–61.
- [123] Ayalon G, Segev E, Elgavish S, et al. Two Regions in the N-terminal Domain of Ionotropic Glutamate Receptor 3 Form the Subunit Oligomerization Interfaces That Control Subtype-specific Receptor Assembly. *J Biol Chem* 2005; 280: 15053–15060.
- [124] Ayalon G, Stern-Bach Y. Functional assembly of AMPA and kainate receptors is mediated by several discrete protein-protein interactions. *Neuron*

- 2001; 31: 103–13.
- [125] Armstrong N, Gouaux E. Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. *Neuron* 2000; 28: 165–81.
- [126] Sager C, Terhag J, Kott S, et al. C-terminal Domains of Transmembrane α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole Propionate (AMPA) Receptor Regulatory Proteins Not Only Facilitate Trafficking but Are Major Modulators of AMPA Receptor Function. *J Biol Chem* 2009; 284: 32413–32424.
- [127] Bowie D. External anions and cations distinguish between AMPA and kainate receptor gating mechanisms. *J Physiol* 2002; 539: 725–33.
- [128] Paternain A V, Cohen A, Stern-Bach Y, et al. A role for extracellular Na⁺ in the channel gating of native and recombinant kainate receptors. *J Neurosci* 2003; 23: 8641–8.
- [129] Plested AJR, Mayer ML. Structure and Mechanism of Kainate Receptor Modulation by Anions. *Neuron* 2007; 53: 829–841.
- [130] Bear MF, Malenka RC. Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol* 1994; 4: 389–99.
- [131] Durand GM, Kovalchuk Y, Konnerth A. Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature* 1996; 381: 71–75.
- [132] Hsia AY, Malenka RC, Nicoll RA. Development of Excitatory Circuitry in the Hippocampus. *J Neurophysiol* 1998; 79: 2013–2024.
- [133] Petralia RS, Esteban JA, Wang Y –X., et al. Selective acquisition of AMPA receptors over postnatal development suggests a molecular basis for silent synapses. *Nat Neurosci* 1999; 2: 31–36.
- [134] Morris RG. D.O. Hebb: The Organization of Behavior, Wiley: New York; 1949. *Brain Res Bull*; 50: 437.
- [135] Holtmaat A, Randall J, Cane M. Optical imaging of structural and functional synaptic plasticity in vivo. *Eur J Pharmacol* 2013; 719: 128–136.

- [136] Bliss TVP, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993; 361: 31–39.
- [137] Pastalkova E, Serrano P, Pinkhasova D, et al. Storage of Spatial Information by the Maintenance Mechanism of LTP. *Science (80-)* 2006; 313: 1141–1144.
- [138] Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, et al. Learning Induces Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *Science (80-)* 2006; 313: 1093–1097.
- [139] Rowan MJ, Klyubin I, Cullen WK, et al. Synaptic plasticity in animal models of early Alzheimer’s disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003; 358: 821–8.
- [140] Galdzicki Z, Siarey RJ. Understanding mental retardation in Down’s syndrome using trisomy 16 mouse models. *Genes Brain Behav* 2003; 2: 167–78.
- [141] Stephan KE, Baldeweg T, Friston KJ. Synaptic Plasticity and Dysconnection in Schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2006; 59: 929–939.
- [142] Newey SE, Velamoor V, Govek E-E, et al. Rho GTPases, dendritic structure, and mental retardation. *J Neurobiol* 2005; 64: 58–74.
- [143] Stevens CF, Wesseling JF. Augmentation is a potentiation of the exocytotic process. *Neuron* 1999; 22: 139–46.
- [144] Lee S-JR, Escobedo-Lozoya Y, Szatmari EM, et al. Activation of CaMKII in single dendritic spines during long-term potentiation. *Nature* 2009; 458: 299–304.
- [145] Zhong H, Sia G-M, Sato TR, et al. Subcellular dynamics of type II PKA in neurons. *Neuron* 2009; 62: 363–74.
- [146] Shi SH, Hayashi Y, Petralia RS, et al. Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science* 1999; 284: 1811–6.
- [147] Soderling TR, Derkach VA. Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. *Trends Neurosci* 2000; 23: 75–80.
- [148] BIGELOW WG, MCBIRNIE JE. Further experiences with hypothermia for

- intracardiac surgery in monkeys and groundhogs. *Ann Surg* 1953; 137: 361–5.
- [149] Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group. Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *N Engl J Med* 2002; 346: 549–56.
- [150] Bernard SA, Gray TW, Buist MD, et al. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *N Engl J Med* 2002; 346: 557–63.
- [151] Peberdy MA, Callaway CW, Neumar RW, et al. Part 9: post-cardiac arrest care: 2010 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation* 2010; 122: S768-86.
- [152] Yenari MA, Han HS. Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. *Nat Rev Neurosci* 2012; 13: 267.
- [153] Polderman KH. Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Crit Care Med* 2009; 37: S186–S202.
- [154] Karnatovskaia L V, Wartenberg KE, Freeman WD. Therapeutic hypothermia for neuroprotection: history, mechanisms, risks, and clinical applications. *The Neurohospitalist* 2014; 4: 153–63.
- [155] Tohyama Y, Sako K, Yonemasu Y. Hypothermia attenuates the activation of protein kinase C in focal ischemic rat brain: dual autoradiographic study of [3H]phorbol 12,13-dibutyrate and iodo[14C]antipyrine. *Brain Res* 1998; 782: 348–51.
- [156] Nakashima K, Todd MM. Effects of hypothermia on the rate of excitatory amino acid release after ischemic depolarization. *Stroke* 1996; 27: 913–8.
- [157] Wang D, Zhao Y, Zhang Y, et al. Hypothermia protects against oxygen-glucose deprivation-induced neuronal injury by down-regulating the reverse transport of glutamate by astrocytes as mediated by neurons. *Neuroscience* 2013; 237: 130–8.
- [158] Mueller-Burke D, Koehler RC, Martin LJ. Rapid NMDA receptor

- phosphorylation and oxidative stress precede striatal neurodegeneration after hypoxic ischemia in newborn piglets and are attenuated with hypothermia. *Int J Dev Neurosci* 2008; 26: 67–76.
- [159] Xiong M, Yang Y, Chen G-Q, et al. Post-ischemic hypothermia for 24h in P7 rats rescues hippocampal neuron: association with decreased astrocyte activation and inflammatory cytokine expression. *Brain Res Bull* 2009; 79: 351–7.
- [160] Nunnally ME, Jaeschke R, Bellingan GJ, et al. Targeted temperature management in critical care: a report and recommendations from five professional societies. *Crit Care Med* 2011; 39: 1113–25.
- [161] Pastuszko P, Pirzadeh A, Reade E, et al. The effect of hypothermia on neuronal viability following cardiopulmonary bypass and circulatory arrest in newborn piglets. *Eur J Cardiothorac Surg* 2009; 35: 577–81; discussion 581.
- [162] Kanagawa T, Fukuda H, Tsubouchi H, et al. A decrease of cell proliferation by hypothermia in the hippocampus of the neonatal rat. *Brain Res* 2006; 1111: 36–40.
- [163] Bennet L, Roelfsema V, George S, et al. The effect of cerebral hypothermia on white and grey matter injury induced by severe hypoxia in preterm fetal sheep. *J Physiol* 2007; 578: 491–506.
- [164] Gopurappilly R, Pal R, Krishna Mamidi M, et al. Stem Cells in Stroke Repair: Current Success & Future Prospects. *CNS Neurol Disord - Drug Targets* 2011; 10: 741–756.
- [165] Imada S, Yamamoto M, Tanaka K, et al. Hypothermia-induced increase of oligodendrocyte precursor cells: Possible involvement of plasmalemmal voltage-dependent anion channel 1. *J Neurosci Res* 2010; 88: 3457–3466.
- [166] Silasi G, Colbourne F. Therapeutic hypothermia influences cell genesis and survival in the rat hippocampus following global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011; 31: 1725–35.
- [167] Saito K, Fukuda N, Matsumoto T, et al. Moderate low temperature preserves the stemness of neural stem cells and suppresses apoptosis of the cells via

- activation of the cold-inducible RNA binding protein. *Brain Res* 2010; 1358: 20–29.
- [168] Liu L, Yenari MA. Therapeutic hypothermia: neuroprotective mechanisms. *Front Biosci* 2007; 12: 816–25.
- [169] Liu L, Yenari MA. Clinical application of therapeutic hypothermia in stroke. *Neurol Res* 2009; 31: 331–335.
- [170] Karsy M, Brock A, Guan J, et al. Neuroprotective strategies and the underlying molecular basis of cerebrovascular stroke. *Neurosurg Focus* 2017; 42: E3.
- [171] Love S. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol* 1999; 9: 119–31.
- [172] Mergenthaler P, Dirnagl U, Meisel A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis* 2004; 19: 151–67.
- [173] Kato S, Aoyama M, Kakita H, et al. Endogenous erythropoietin from astrocyte protects the oligodendrocyte precursor cell against hypoxic and reoxygenation injury. *J Neurosci Res* 2011; 89: 1566–1574.
- [174] Aronowski J, Zhao X. Molecular Pathophysiology of Cerebral Hemorrhage: Secondary Brain Injury. *Stroke* 2011; 42: 1781–1786.
- [175] Meller R, Simon RP. Stroke – A Synaptic Perspective. In: *Structural And Functional Organization Of The Synapse*. Boston, MA: Springer US, pp. 731–758.
- [176] Traystman RJ. Animal Models of Focal and Global Cerebral Ischemia. *ILAR J* 2003; 44: 85–95.
- [177] Choi DW. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 1988; 11: 465–9.
- [178] Back SA, Han BH, Luo NL, et al. Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia-ischemia. *J Neurosci* 2002; 22: 455–63.
- [179] Giffard RG, Swanson RA. Ischemia-induced programmed cell death in astrocytes. *Glia* 2005; 50: 299–306.
- [180] Meller R, Minami M, Cameron JA, et al. CREB-Mediated Bcl-2 Protein

- Expression after Ischemic Preconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25: 234–246.
- [181] Vornov JJ, Tasker RC, Coyle JT. Delayed protection by MK-801 and tetrodotoxin in a rat organotypic hippocampal culture model of ischemia. *Stroke* 1994; 25: 457-64; discussion 464–5.
- [182] Weih M, Bergk A, Isaev NK, et al. Induction of ischemic tolerance in rat cortical neurons by 3-nitropropionic acid: chemical preconditioning. *Neurosci Lett* 1999; 272: 207–10.
- [183] Monyer H, Giffard RG, Hartley DM, et al. Oxygen or glucose deprivation-induced neuronal injury in cortical cell cultures is reduced by tetanus toxin. *Neuron* 1992; 8: 967–73.
- [184] Meldrum BS, Evans MC, Swan JH, et al. Protection against hypoxic/ischaemic brain damage with excitatory amino acid antagonists. *Med Biol* 1987; 65: 153–7.
- [185] Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update. *Circulation* 2016; 133: e38–e360.
- [186] Chen X, Wang K. The fate of medications evaluated for ischemic stroke pharmacotherapy over the period 1995–2015. *Acta Pharm Sin B* 2016; 6: 522–530.
- [187] Mitani A, Kataoka K. Critical levels of extracellular glutamate mediating gerbil hippocampal delayed neuronal death during hypothermia: brain microdialysis study. *Neuroscience* 1991; 42: 661–70.
- [188] Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 1996; 27: 1124–9.
- [189] Nito C, Kamiya T, Amemiya S, et al. The neuroprotective effect of a free radical scavenger and mild hypothermia following transient focal ischemia in rats. *Acta Neurochir Suppl* 2003; 86: 199–203.
- [190] Lee S-H, Kim Y-H, Kim Y-J, et al. Atorvastatin enhances hypothermia-induced neuroprotection after stroke. *J Neurol Sci* 2008; 275: 64–68.
- [191] Furuichi Y, Katsuta K, Maeda M, et al. Neuroprotective action of tacrolimus

- (FK506) in focal and global cerebral ischemia in rodents: dose dependency, therapeutic time window and long-term efficacy. *Brain Res* 2003; 965: 137–45.
- [192] Meloni BP, Zhu H, Knuckey NW. Is magnesium neuroprotective following global and focal cerebral ischaemia? A review of published studies. *Magn Res* 2006; 19: 123–37.
- [193] Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, et al. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 1984; 307: 462–465.
- [194] Campbell K, Meloni BP, Knuckey NW. Combined magnesium and mild hypothermia (35 °C) treatment reduces infarct volumes after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat at 2 and 4, but not 6 h. *Brain Res* 2008; 1230: 258–264.
- [195] Song W, Wu Y-M, Ji Z, et al. Intra-carotid cold magnesium sulfate infusion induces selective cerebral hypothermia and neuroprotection in rats with transient middle cerebral artery occlusion. *Neurol Sci* 2013; 34: 479–486.
- [196] Frazzini VI, Winfree CJ, Choudhri HF, et al. Mild hypothermia and MK-801 have similar but not additive degrees of cerebroprotection in the rat permanent focal ischemia model. *Neurosurgery* 1994; 34: 1040-5; discussion 1045-6.
- [197] Olney JW. Neurotoxicity of NMDA receptor antagonists: an overview. *Psychopharmacol Bull* 1994; 30: 533–40.
- [198] Rod MR, Auer RN. Pre- and post-ischemic administration of dizocilpine (MK-801) reduces cerebral necrosis in the rat. *Can J Neurol Sci* 1989; 16: 340–4.
- [199] Hargreaves RJ, Hill RG, Iversen LL. Neuroprotective NMDA antagonists: the controversy over their potential for adverse effects on cortical neuronal morphology. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1994; 60: 15–9.
- [200] Hardingham GE, Bading H. The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci* 2003; 26: 81–89.
- [201] Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H. Extrasynaptic NMDARs oppose

- synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 2002; 5: 405–414.
- [202] Walton M, Woodgate AM, Muravlev A, et al. CREB phosphorylation promotes nerve cell survival. *J Neurochem* 1999; 73: 1836–42.
- [203] Biegon A, Fry PA, Paden CM, et al. Dynamic changes in N-methyl-D-aspartate receptors after closed head injury in mice: Implications for treatment of neurological and cognitive deficits. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 5117–5122.
- [204] Bjorkhem I, Meaney S. Brain Cholesterol: Long Secret Life Behind a Barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 806–815.
- [205] Dietschy JM, Turley SD. Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res* 2004; 45: 1375–97.
- [206] Fester L, Zhou L, Bütow A, et al. Cholesterol-promoted synaptogenesis requires the conversion of cholesterol to estradiol in the hippocampus. *Hippocampus* 2009; 19: 692–705.
- [207] Rohrbough J, Broadie K. Lipid regulation of the synaptic vesicle cycle. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 139–150.
- [208] Linetti A, Fratangeli A, Taverna E, et al. Cholesterol reduction impairs exocytosis of synaptic vesicles. *J Cell Sci* 2010; 123: 595–605.
- [209] Liu Q, Trotter J, Zhang J, et al. Neuronal LRP1 Knockout in Adult Mice Leads to Impaired Brain Lipid Metabolism and Progressive, Age-Dependent Synapse Loss and Neurodegeneration. *J Neurosci* 2010; 30: 17068–17078.
- [210] Xia F, Leung YM, Gaisano G, et al. Targeting of Voltage-Gated K⁺ and Ca²⁺ Channels and Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Protein Receptor Proteins to Cholesterol-Rich Lipid Rafts in Pancreatic α -Cells: Effects on Glucagon Stimulus-Secretion Coupling. *Endocrinology* 2007; 148: 2157–2167.
- [211] Eroglu C, Brugger B, Wieland F, et al. Glutamate-binding affinity of *Drosophila* metabotropic glutamate receptor is modulated by association with

- lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 10219–24.
- [212] Butchbach MER, Tian G, Guo H, et al. Association of Excitatory Amino Acid Transporters, Especially EAAT2, with Cholesterol-rich Lipid Raft Microdomains. *J Biol Chem* 2004; 279: 34388–34396.
- [213] Zhang J, Liu Q. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein Cell* 2015; 6: 254–64.
- [214] Head BP, Patel HH, Insel PA. Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: Impact on signaling and function. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2014; 1838: 532–545.
- [215] Sonnino S, Prinetti A. Membrane domains and the ‘lipid raft’ concept. *Curr Med Chem* 2013; 20: 4–21.
- [216] Sonnino S, Aureli M, Grassi S, et al. Lipid Rafts in Neurodegeneration and Neuroprotection. *Mol Neurobiol* 2014; 50: 130–148.
- [217] Colin J, Gregory-Pauron L, Lanhers M-C, et al. Membrane raft domains and remodeling in aging brain. *Biochimie* 2016; 130: 178–187.
- [218] Zhai J, Ström A-L, Kilty R, et al. Proteomic characterization of lipid raft proteins in amyotrophic lateral sclerosis mouse spinal cord. *FEBS J* 2009; 276: 3308–3323.
- [219] Hering H, Lin C-C, Sheng M. Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J Neurosci* 2003; 23: 3262–71.
- [220] Besshoh S, Bawa D, Teves L, et al. Increased phosphorylation and redistribution of NMDA receptors between synaptic lipid rafts and post-synaptic densities following transient global ischemia in the rat brain. *J Neurochem* 2005; 93: 186–194.
- [221] Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997; 387: 569–572.
- [222] Li L, Hu J, Shi X, et al. Lipid rafts enhance the binding constant of membrane-anchored receptors and ligands. *Soft Matter* 2017; 13: 4294–4304.
- [223] Frank C, Rufini S, Tancredi V, et al. Cholesterol depletion inhibits synaptic

- transmission and synaptic plasticity in rat hippocampus. *Exp Neurol* 2008; 212: 407–414.
- [224] Gil C, Soler-Jover A, Blasi J, et al. Synaptic proteins and SNARE complexes are localized in lipid rafts from rat brain synaptosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 329: 117–124.
- [225] Korade Z, Kenworthy AK. Lipid rafts, cholesterol, and the brain. *Neuropharmacology* 2008; 55: 1265–1273.
- [226] Kao H-T, Ryoo K, Lin A, et al. Synapsins regulate brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic potentiation and axon elongation by acting on membrane rafts. *Eur J Neurosci* 2017; 45: 1085–1101.
- [227] Coisne C, Tilloy S, Monflier E, et al. Cyclodextrins as Emerging Therapeutic Tools in the Treatment of Cholesterol-Associated Vascular and Neurodegenerative Diseases. *Molecules* 2016; 21: 1748.
- [228] LOFTSSON T, DUCHENE D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm* 2007; 329: 1–11.
- [229] Zidovetzki R, Levitan I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2007; 1768: 1311–1324.
- [230] Bruce IJ, Sen T. Surface Modification of Magnetic Nanoparticles with Alkoxysilanes and Their Application in Magnetic Bioseparations. *Langmuir* 2005; 21: 7029–7035.
- [231] Ling Y, Wei K, Luo Y, et al. Dual docetaxel/superparamagnetic iron oxide loaded nanoparticles for both targeting magnetic resonance imaging and cancer therapy. *Biomaterials* 2011; 32: 7139–7150.
- [232] Horák D, Babič M, Macková H, et al. Preparation and properties of magnetic nano- and micro-sized particles for biological and environmental separations. *J Sep Sci* 2007; 30: 1751–1772.
- [233] Badruddoza AZM, Rahman MT, Ghosh S, et al. β -Cyclodextrin conjugated magnetic, fluorescent silica core–shell nanoparticles for biomedical applications. *Carbohydr Polym* 2013; 95: 449–457.

- [234] Irie T, Uekama K. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. III. Toxicological Issues and Safety Evaluation. *J Pharm Sci* 1997; 86: 147–162.
- [235] Choisnard L, Géze A, Bigan M, et al. Efficient size control of amphiphilic cyclodextrin nanoparticles through a statistical mixture design methodology. *J Pharm Pharm Sci* 2005; 8: 593–601.
- [236] Cotman CW. Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions. *Methods Enzymol* 1974; 31: 445–452.
- [237] Borisova TA, Krisanova N V. Presynaptic transporter-mediated release of glutamate evoked by the protonophore FCCP increases under altered gravity conditions. *Adv Sp Res* 2008; 42: 1971–1979.
- [238] Larson E, Howlett B, Jagendorf A. Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination. *Anal Biochem* 1986; 155: 243–248.
- [239] Soldatkin O, Nazarova A, Krisanova N, et al. Monitoring of the velocity of high-affinity glutamate uptake by isolated brain nerve terminals using amperometric glutamate biosensor. *Talanta* 2015; 135: 67–74.
- [240] Pozdnyakova N, Dudarenko M, Yatsenko L, et al. Perinatal hypoxia: different effects of the inhibitors of GABA transporters GAT1 and GAT3 on the initial velocity of [3H]GABA uptake by cortical, hippocampal, and thalamic nerve terminals. *Croat Med J* 2014; 55: 250–8.
- [241] Horák D, Beneš M, Procházková Z, et al. 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; 149: 64–71.
- [242] Shortliffe EH, Cimino JJ. *Biomedical informatics : computer applications in health care and biomedicine*.
- [243] Mrozek S, Vardon F, Geeraerts T. Brain temperature: Physiology and pathophysiology after brain injury. *Anesthesiol Res Pract* 2012; 2012: 989487.
- [244] Berger C, Schäbitz W-R, Georgiadis D, et al. Effects of hypothermia on excitatory amino acids and metabolism in stroke patients: a microdialysis

- study. *Stroke* 2002; 33: 519–24.
- [245] Volgushev M, Vidyasagar TR, Chistiakova M, et al. Synaptic transmission in the neocortex during reversible cooling. *Neuroscience* 2000; 98: 9–22.
- [246] Kammersgaard LP, Jørgensen HS, Rungby JA, et al. Admission body temperature predicts long-term mortality after acute stroke: the Copenhagen Stroke Study. *Stroke* 2002; 33: 1759–62.
- [247] Volgushev M, Kudryashov I, Chistiakova M, et al. Probability of transmitter release at neocortical synapses at different temperatures. *J Neurophysiol* 2004; 92: 212–20.
- [248] Suehiro E, Fujisawa H, Ito H, et al. Brain temperature modifies glutamate neurotoxicity in vivo. *J Neurotrauma* 1999; 16: 285–97.
- [249] Pastukhov A, Krisanova N, Maksymenko V, et al. Personalized approach in brain protection by hypothermia: individual changes in non-pathological and ischemia-related glutamate transport in brain nerve terminals. *EPMA J* 2016; 7: 26.
- [250] McLamore ES, Mohanty S, Shi J, et al. A self-referencing glutamate biosensor for measuring real time neuronal glutamate flux. *J Neurosci Methods* 2010; 189: 14–22.
- [251] Hughes G, Pemberton RM, Fielden PR, et al. The design, development and application of electrochemical glutamate biosensors. *TrAC Trends Anal Chem* 2016; 79: 106–113.
- [252] Farina D, Alvau MD, Puggioni G, et al. Implantable (Bio)sensors as new tools for wireless monitoring of brain neurochemistry in real time. *World J Pharmacol* 2014; 3: 1.
- [253] Borisova T, Kucherenko D, Soldatkin O, et al. An amperometric glutamate biosensor for monitoring glutamate release from brain nerve terminals and in blood plasma. *Anal Chim Acta* 2018; 1022: 113–123.
- [254] Jabaudon D, Shimamoto K, Yasuda-Kamatani Y, et al. Inhibition of uptake unmasks rapid extracellular turnover of glutamate of nonvesicular origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 8733–8.

- [255] Zhao H, Steinberg GK, Sapolsky RM. General versus Specific Actions of Mild-Moderate Hypothermia in Attenuating Cerebral Ischemic Damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; 27: 1879–1894.
- [256] Borisova T, Borysov A. Putative duality of presynaptic events. *Rev Neurosci* 2016; 27: 377–83.
- [257] Shimamoto K, Lebrun B, Yasuda-Kamatani Y, et al. DL-threo-beta-benzyloxyaspartate, a potent blocker of excitatory amino acid transporters. *Mol Pharmacol* 1998; 53: 195–201.
- [258] Piccirillo S, Castaldo P, Macrì ML, et al. Glutamate as a potential “survival factor” in an in vitro model of neuronal hypoxia/reoxygenation injury: leading role of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Cell Death Dis* 2018; 9: 731.
- [259] Boris-Möller F, Wieloch T. Changes in the extracellular levels of glutamate and aspartate during ischemia and hypoglycemia. Effects of hypothermia. *Exp brain Res* 1998; 121: 277–84.
- [260] Nakashima K, Todd MM. Effects of hypothermia, pentobarbital, and isoflurane on postdepolarization amino acid release during complete global cerebral ischemia. *Anesthesiology* 1996; 85: 161–8.
- [261] Jabaudon D, Scanziani M, Gähwiler BH, et al. Acute decrease in net glutamate uptake during energy deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 5610–5.
- [262] Makarov V, Kucheryavykh L, Kucheryavykh Y, et al. Transport Reversal during Heteroexchange: A Kinetic Study. *J Biophys* 2013; 2013: 1–14.
- [263] Grewer C, Gameiro A, Zhang Z, et al. Glutamate forward and reverse transport: From molecular mechanism to transporter-mediated release after ischemia. *IUBMB Life* 2008; 60: 609–619.
- [264] Borisova T, Borysov A, Pastukhov A, et al. 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; 36: 1229–1240.
- [265] Chiota NA, Freeman WD, Barrett KM. Hypoxic-ischemic brain injury and

- prognosis after cardiac arrest. *Continuum (Minneapolis Minn)* 2011; 17: 1094–118.
- [266] Urbano LA, Oddo M. Therapeutic Hypothermia for Traumatic Brain Injury. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2012; 12: 580–591.
- [267] Lee AC, Kozuki N, Blencowe H, et al. Intrapartum-related neonatal encephalopathy incidence and impairment at regional and global levels for 2010 with trends from 1990. *Pediatr Res* 2013; 74: 50–72.
- [268] Back SA, Luo NL, Borenstein NS, et al. Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury. *J Neurosci* 2001; 21: 1302–12.
- [269] Edwards AD, Brocklehurst P, Gunn AJ, et al. Neurological outcomes at 18 months of age after moderate hypothermia for perinatal hypoxic ischaemic encephalopathy: synthesis and meta-analysis of trial data. *BMJ* 2010; 340: c363.
- [270] Jacobs SE, Berg M, Hunt R, et al. Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; CD003311.
- [271] Strasser K, Lueckemann L, Kluever V, et al. Dose-dependent effects of levetiracetam after hypoxia and hypothermia in the neonatal mouse brain. *Brain Res* 2016; 1646: 116–124.
- [272] Shah DK, Wusthoff CJ, Clarke P, et al. Electrographic seizures are associated with brain injury in newborns undergoing therapeutic hypothermia. *Arch Dis Child - Fetal Neonatal Ed* 2014; 99: F219–F224.
- [273] Booth D, Evans DJ. Anticonvulsants for neonates with seizures. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; CD004218.
- [274] Holmes LB, Harvey EA, Coull BA, et al. The Teratogenicity of Anticonvulsant Drugs. *N Engl J Med* 2001; 344: 1132–1138.
- [275] Ben-Menachem E, Falter U. Efficacy and tolerability of levetiracetam 3000 mg/d in patients with refractory partial seizures: a multicenter, double-blind, responder-selected study evaluating monotherapy. European Levetiracetam Study Group. *Epilepsia* 2000; 41: 1276–83.

- [276] Berkovic SF, Knowlton RC, Leroy RF, et al. Placebo-controlled study of levetiracetam in idiopathic generalized epilepsy. *Neurology* 2007; 69: 1751–1760.
- [277] De Smedt T, Raedt R, Vonck K, et al. Levetiracetam: the profile of a novel anticonvulsant drug-part I: preclinical data. *CNS Drug Rev* 2007; 13: 43–56.
- [278] Wakita M, Kotani N, Kogure K, et al. Inhibition of Excitatory Synaptic Transmission in Hippocampal Neurons by Levetiracetam Involves Zn²⁺-Dependent GABA Type A Receptor-Mediated Presynaptic Modulation. *J Pharmacol Exp Ther* 2014; 348: 246–259.
- [279] Klitgaard H. Levetiracetam: The Preclinical Profile of a New Class of Antiepileptic Drugs? *Epilepsia* 2008; 42: 13–18.
- [280] Birnstiel S, Wülfert E, Beck SG. Levetiracetam (ucb LO59) affects in vitro models of epilepsy in CA3 pyramidal neurons without altering normal synaptic transmission. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1997; 356: 611–8.
- [281] Dibbens LM, Hodgson BL, Helbig KL, et al. Rare protein sequence variation in SV2A gene does not affect response to levetiracetam. *Epilepsy Res* 2012; 101: 277–279.
- [282] Lee C-Y, Chen C-C, Liou H-H. Levetiracetam inhibits glutamate transmission through presynaptic P/Q-type calcium channels on the granule cells of the dentate gyrus. *Br J Pharmacol* 2009; 158: 1753–62.
- [283] Rigo J-M, Hans G, Nguyen L, et al. The anti-epileptic drug levetiracetam reverses the inhibition by negative allosteric modulators of neuronal GABA- and glycine-gated currents. *Br J Pharmacol* 2002; 136: 659–672.
- [284] Gumenyuk VP, Triakash IO. Effects of Levetiracetam on Aggregation and Fusion of Membranes of Synaptic Vesicles in a Cell-Free Exocytosis Model. *Neurophysiology* 2014; 46: 115–119.
- [285] Ueda Y, Doi T, Nagatomo K, et al. Effect of levetiracetam on molecular regulation of hippocampal glutamate and GABA transporters in rats with chronic seizures induced by amygdalar FeCl₃ injection. *Brain Res* 2007;

- 1151: 55–61.
- [286] Dagonnier M, Laute M-A, Pandolfo M, et al. Effects of levetiracetam on the production of nitric oxide--an in vivo study. *J Neurol* 2005; 252: 727–30.
- [287] Hanon E, Klitgaard H. Neuroprotective properties of the novel antiepileptic drug levetiracetam in the rat middle cerebral artery occlusion model of focal cerebral ischemia. *Seizure* 2001; 10: 287–293.
- [288] Wang H, Gao J, Lassiter TF, et al. Levetiracetam is Neuroprotective in Murine Models of Closed Head Injury and Subarachnoid Hemorrhage. *Neurocrit Care* 2006; 5: 71–78.
- [289] Komur M, Okuyaz C, Celik Y, et al. Neuroprotective effect of levetiracetam on hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. *Child's Nerv Syst* 2014; 30: 1001–1009.
- [290] Johannessen SI, Helde G, Brodtkorb E. Levetiracetam Concentrations in Serum and in Breast Milk at Birth and during Lactation. *Epilepsia* 2005; 46: 775–777.
- [291] Glien M, Brandt C, Potschka H, et al. Effects of the novel antiepileptic drug levetiracetam on spontaneous recurrent seizures in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2002; 43: 350–7.
- [292] 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. *Ther Hypothermia Temp Manag* 2018; 00: ther.2017.0047.
- [293] Tarasenko A, Krupko O, Himmelreich N. Presynaptic kainate and NMDA receptors are implicated in the modulation of GABA release from cortical and hippocampal nerve terminals. *Neurochem Int* 2011; 59: 81–89.
- [294] Tsudaka S, Kanno T, Nishizaki T. LEVETIRACETAM ENHANCES α 7 ACH RECEPTOR RESPONSES BY INDIRECTLY INTERACTING PROTEIN KINASE A AND PROTEIN KINASE C. *Int J Biol Pharm Res* 2015; 6: 558–562.
- [295] Carunchio I, Pieri M, Ciotti MT, et al. Modulation of AMPA receptors in

- cultured cortical neurons induced by the antiepileptic drug levetiracetam. *Epilepsia* 2007; 48: 654–62.
- [296] Borisova T. *Cholesterol and Presynaptic Glutamate Transport in the Brain*. New York, NY: Springer Science & Business Media. Epub ahead of print 2013. DOI: 10.1007/978-1-4614-7759-4.
- [297] Pozdnyakova N, Pastukhov A, Dudarenko M, et al. Neuroactivity of detonation nanodiamonds: dose-dependent changes in transporter-mediated uptake and ambient level of excitatory/inhibitory neurotransmitters in brain nerve terminals. *J Nanobiotechnology* 2016; 14: 25.
- [298] Kirsch C, Eckert GP, Mueller WE. Statin effects on cholesterol microdomains in brain plasma membranes. *Biochem Pharmacol* 2003; 65: 843–56.
- [299] Berger C, Xia F, Maurer MH, et al. Neuroprotection by pravastatin in acute ischemic stroke in rats. *Brain Res Rev* 2008; 58: 48–56.
- [300] Chen J, Zhang C, Jiang H, et al. Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25: 281–90.
- [301] Zhang L, Zhang ZG, Ding GL, et al. Multitargeted Effects of Statin-Enhanced Thrombolytic Therapy for Stroke With Recombinant Human Tissue-Type Plasminogen Activator in the Rat. *Circulation* 2005; 112: 3486–3494.
- [302] Sironi L, Cimino M, Guerrini U, et al. Treatment with statins after induction of focal ischemia in rats reduces the extent of brain damage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 322–7.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ

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-[¹⁴C]glutamate and D-[³H]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*).

Відомості про апробації матеріалів дисертації

1. **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.

2. *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.

3. *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.

4. *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.

5. *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.