

## ДОСЛІДЖЕННЯ ТРАНСПОРТУ ГЛУТАМАТУ В НЕРВОВИХ ЗАКІНЧЕННЯХ ВЕЛИКИХ ПІВКУЛЬ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ ЗА УМОВ ПОМІРНОЇ ТА ГЛИБОКОЇ ГІПОТЕРМІЇ

*А. О. Пастухов, Н. В. Крисанова, Т. О. Борисова*  
tborisov@biochem.kiev.ua

Інститут біохімії імені О. В. Палладіна НАН України,  
вул. Леонтовича, 9, м. Київ, 01601, Україна

*Помірна та глибока гіпотермія сьогодні успішно використовується для запобігання ускладненням ішемічного інсульту та під час кардіохірургічних операцій на дузі аорти зі зменшенням церебрального кровотоку. Досліджували вплив помірної та глибокої гіпотермії (27 °C та 17 °C відповідно) на пресинаптичний транспорт глутамату в нормі і в умовах, характерних для розвитку ішемічного інсульту. Експерименти проводились з використанням синапсом — ізольованих нервових закінчень кори великих півкуль головного мозку щурів. Транспорт глутамату в синапсоматах визначали з використанням радіоактивно міченого L-[<sup>14</sup>C]глутамату.*

*Транспортер-опосередковане накопичення та тонічне вивільнення L-[<sup>14</sup>C]глутамату з синапсом — різнонаправлені процеси, динамічний баланс яких визначає фізіологічний позаклітинний рівень нейромедіатора, знижуються різною мірою при помірній/глибокій гіпотермії. Перехід до помірної та глибокої гіпотермії призводить до поступового зменшення транспортер-опосередкованого вивільнення L-[<sup>14</sup>C]глутамату, стимульованого деполаризацією плазматичної мембрани та процесами дисипації протонного градієнта синаптичних везикул протонофором FCCP.*

*Встановлено, що у ділянках мозку, де відбулось зменшення кровообігу під час кардіооперації, напрямок змін рівня позаклітинного глутамату у нервових терміналях внаслідок гіпотермії обумовлюється чутливістю процесів накопичення та тонічного вивільнення до гіпотермії. Тож для оцінки наслідків гіпотермії слід визначити тестові параметри та клінічні критерії нейромоніторингу для впровадження в кардіохірургічну практику. Спричинене гіпотермією поступове зменшення транспортер-опосередкованого вивільнення глутамату, характерне для розвитку патологій, може зумовлювати нейропротекторні властивості гіпотермії у разі інсульту.*

**Ключові слова:** ГЛУТАМАТ, РЕВЕРС ГЛУТАМАТНИХ ТРАНСПОРТЕРІВ, ПОМІРНА І ГЛИБОКА ГІПОТЕРМІЯ, ТЕРМІНАЛІ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

## GLUTAMATE TRANSPORT IN RAT CEREBRAL HEMISPHERE NERVE TERMINALS UNDER CONDITIONS OF DEEP AND PROFOUND HYPOTHERMIA

*A. Pastukhov, N. Krisanova, T. Borisova*  
tborisov@biochem.kiev.ua

Institute of Biochemistry named after O. V. Palladin NAS of Ukraine,  
9 Leontovycha str., Kyiv 01601, Ukraine

*Hypothermia (deep and profound) is successfully used in medical practice for the prevention of consequences of ischemic stroke and in aortic arch cardiac surgery that involved reduction of cerebral circulation in order to facilitate operations. Discernment of the influence of deep/profound hypothermia (27 °C/17 °C, respectively) at the neurochemical level on normal and ischemia-associated mechanisms of glutamate transport was accomplished in the presynapse. The experiments were conducted with isolated rat cerebral hemisphere nerve terminals (synaptosomes). Synaptosomal glutamate transport characteristics were examined with radiolabelled L-[<sup>14</sup>C] glutamate.*

*Transporter-mediated uptake by the nerve terminals and tonic release of L-[<sup>14</sup>C]glutamate (dynamic balance of these oppositely directed processes determines the definite ambient levels of the neurotransmitter) reduced with different ranges under conditions of deep/profound hypothermia. Transporter-mediated release of L-[<sup>14</sup>C] glutamate stimulated by depolarization of the plasma membrane and by protonophore FCCP (that induced dissipation of the synaptic vesicle proton gradient) were gradually reduced from deep to profound hypothermia.*

*It has been established that in brain regions suffering from a reduction of blood circulation during cardiooperations, the direction of hypothermia-induced changes in the extracellular glutamate level in the nerve terminals*

*depended on sensitivity of uptake and tonic release to hypothermia. Therefore, test parameters and clinical criteria for neuromonitoring aiming the evaluation of hypothermia-induced effects should be developed and provided in cardiac surgery medical practice. Also, the consequent decrease in the pathological transporter-mediated glutamate release determined the neuroprotective effect of hypothermia in stroke therapy.*

**Keywords:** GLUTAMATE, GLUTAMATE TRANSPORTER REVERSAL, DEEP AND PROFOUND HYPOTHERMIA, BRAIN NERVE TERMINALS

## ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСПОРТА ГЛУТАМАТА В НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЯХ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ УМЕРЕННОЙ И ГЛУБОКОЙ ГИПОТЕРМИИ

*A. O. Pastukhov, H. V. Krivanova, T. A. Borisova*  
tborisov@biochem.kiev.ua

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины,  
ул. Леонтовича, 9, г. Киев, 01601, Украина

*Умеренная и глубокая гипотермия сегодня успешно применяется для предупреждения осложнений при ишемическом инсульте и в кардиохирургии при операциях на дуге аорты, где используется уменьшение церебрального кровотока. Исследовано влияние умеренной и глубокой гипотермии (27 °С и 17 °С, соответственно) на пресинаптический транспорт глутамата в норме и в условиях, характерных для развития ишемического инсульта. Эксперименты проводились с использованием синапсом — изолированных нервных окончаний коры больших полушарий головного мозга крыс. Транспорт глутамата в синапсом определяли с использованием радиоактивно меченого L-[<sup>14</sup>C] глутамата.*

*Транспортер-опосредованное накопление и тоническое освобождение L-[<sup>14</sup>C] глутамата из синапсом — разнонаправленные процессы, динамический баланс которых определяет физиологический внеклеточный уровень нейромедиатора, снижаются в разной степени при умеренной/глубокой гипотермии. Переход к умеренной и глубокой гипотермии приводит к последовательному уменьшению транспортер-опосредованного освобождения L-[<sup>14</sup>C] глутамата, стимулированного деполяризацией плазматической мембраны и при диссипации протонного градиента синаптических везикул протонофором FCCP.*

*Установлено, что в участках мозга, которые испытывают уменьшение кровообращения при кардиооперациях, направление изменения уровня внеклеточного глутамата в нервных терминалах при гипотермии обуславливается чувствительностью процессов накопления и тонического высвобождения к гипотермии. Следовательно, для оценки последствий гипотермии следует определить тестовые параметры и клинические критерии нейромониторинга для введения в кардиохирургическую практику. Вызванное гипотермией последовательное уменьшение транспортер-опосредованного освобождения глутамата, характерного для развития патологий, может обуславливать нейропротекторные свойства гипотермии при инсульте.*

**Ключевые слова:** ГЛУТАМАТ, РЕВЕРС ГЛУТАМАТНЫХ ТРАНСПОРТЕРОВ, УМЕРЕННАЯ И ГЛУБОКАЯ ГИПОТЕРМИЯ, ТЕРМИНАЛЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Список скорочень та аббревіатур: карбоніл ціанід-р-трифторметоксифенілгідрозон (FCCP); DL-трео-β-бензилоксипартат (DL-TBOA); водний лічильний сцинтилят (ACS); γ-аміномасляна кислота (GABA); підтипи транспортера γ-аміномасляної кислоти (GAT1 та GAT3); етиленгліколь тетраоцтової кислоти (EGTA); етилендіамінтетраоцтової кислоти (EDTA); 4-(2-гідроксиетил)-1-піперазинетансульфонова кислота (HEPES).

L-глутамат — один з основних збуджувальних нейромедіаторів центральної нервової системи, який відіграє значну роль у реалізації більшості функцій мозку [11]. Порушення гомеостазу глутамату призводить до розвитку неврологічних змін та є характерною ознакою

патогенезу низки неврологічних захворювань. За фізіологічних умов між епізодами екзоцитозу позаклітинна концентрація глутамату підтримується на низькому рівні. Позаклітинна концентрація встановлюється як динамічна рівновага між надходженням глутамату, зокрема

шляхом тонічного вивільнення з нервових терміналей, та його видаленням з позаклітинного простору [3]. Видалення нейромедіатора з позаклітинної рідини здійснюється шляхом вторинного активного транспорту за участю високоафінних Na-залежних глутаматних транспортерів (EAAT тип 1–3), що використовують  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -електрохімічний градієнт як рушійну силу для транспорту глутамату всередину клітини. Нейромедіатор накопичується та зберігається в синаптичних везикулах, закислених компартментах нервових терміналей, які у разі стимуляції вивільнюють свій вміст шляхом екзоцитозу. У випадку церебральної гіпоксії, ішемії, інсульту чи травматичних пошкоджень мозку розвиток нейротоксичності спричиняється надлишком позаклітинного глутамату в синаптичній щілині, який вивільнюється за рахунок реверсної роботи глутаматних транспортерів [13].

Ішемічний інсульт призводить до руйнування тканин мозку, погіршення його діяльності та залишається одним з основних чинників інвалідності серед дорослого населення. Серед найпоширеніших симптомів — порушення мови, рухових та сенсорних функцій. У ділянці ядра інсульту нейрональні клітини гинуть протягом хвилин, в зоні пенумбри (область тканин «з підвищеним ризиком» поряд з ішемічною тканиною) виживання нервових клітин можна поліпшити за рахунок зниження церебрального метаболізму. Точний контроль за температурою мозку після інсульту, травматичних пошкоджень мозку та субарахноїдальних крововиливів надзвичайно важливий через особливу сприйнятливості та вразливості клітин мозку до найменших змін температури [17, 22, 34]. Терапевтична гіпотермія давно відома як неспецифічний та потужний нейропротекторний фактор. На тваринних моделях було показано, що гіпотермія вдвічі зменшує розмір ділянки ураження церебральним інфарктом, і цей факт став основою для подальших клінічних випробувань терапевтичної гіпотермії у пацієнтів з ішемічним інсультом [22, 33]. Клінічні застосування терапевтичної гіпотермії продемонстрували зменшення смертності у перший тиждень після інсульту та відновлення неврологічних функцій, а також зменшення ушкоджень мозку, що виявляються комп'ютерною томографією [15].

Експериментальні дослідження та клінічний досвід свідчать про перспективність застосування терапевтичної гіпотермії навіть через декілька годин після гострого ішемічного ураження мозку. Знижена температура тіла має підтримуватися упродовж тривалого періоду після інсульту для досягнення довготривалого нейропротекторного ефекту [1, 14, 15, 21]. Проте обґрунтовані стандартні параметри терапевтичної гіпотермії на сьогодні відсутні [20]. Тож виявлення гіпотермічно-чутливих патологічних процесів може сприяти ширшому застосуванню цього перспективного підходу.

Відомо, що температура впливає на роботу певних кальцієвих та потенціал-чутливих натрієвих каналів, на властивості нейрональної мембрани, постпотенціальні синаптичні відгуки та вивільнення нейромедіаторів [22, 27, 28, 31, 32]. Методом мікродіалізу Berger показав, що незначна гіпотермія (33 °C) спричиняє зниження концентрації позаклітинного глутамату, пірувату, лактату та гліцеролу в ділянці пенумбри, проте не впливає на ділянку ядра інфаркту [1].

Гіпотермія широко використовується в кардіохірургії під час операцій на дузі аорти зі зменшенням церебрального кровообігу. Однак, незважаючи на відновлення нейрокогнітивних функцій після зупинки кровообігу у разі застосування гіпотермії [24], фіксуються випадки, коли зниження температури може спричинити неврологічні ускладнення унаслідок гіпотермічного ураження нервової тканини [12, 16]. Вивчення механізмів нейропротекторної дії низьких температур у кардіохірургії є актуальним питанням і для лікарів-практиків.

На сьогодні залишається низка нез'ясованих питань щодо застосування терапевтичної гіпотермії, найбільш важливим з яких є обґрунтування оптимальних температурних режимів.

Метою проведеного дослідження було вивчення впливу гіпотермії на різні механізми пресинаптичного транспорту глутамату у нервових закінченнях головного мозку щурів (синаптосомах): порівняння динаміки обміну глутамату між епізодами екзоцитозу у процесі його тонічного вивільнення та накопичення в умовах помірної та глибокої гіпотермії; оцінка індукованих гіпотермією змін, пов'язаних із роз-

витком патологій вивільнення глутамату за рахунок реверсної роботи глутаматних транспортерів унаслідок деполяризації мембрани і при застосуванні протонофору карбонілціанід-р-трифлуорометоксифеніл-гідразону (FCCP) за тих самих умов.

### Матеріали та методи

Експерименти проведено на щурах самцях лінії Вістар 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 19.09.2012). Тварин декапітували та виділяли великі півкулі головного мозку, з яких одержували препарат синапсом. Великі півкулі головного мозку гомогенізували у розчині 0,32 М сахарози, 5 мМ HEPES-NaOH, рН 7,4 та 0,2 мМ ЕДТА. Усі процедури проводили при температурі +4 °С. Препарат синапсом одержували шляхом диференціального центрифугування та центрифугування в градієнті густини Ficoll-400 за методом Котмана [10] з незначними модифікаціями [5, 6, 8]. З однієї тварини одержували один препарат синапсом. Препарати синапсом використовували для експериментів протягом 2–4 годин після виділення. Оксигенований стандартний сольовий розчин містив 126 мМ NaCl; 5 мМ KCl; 1,4 мМ MgCl<sub>2</sub>; 1,0 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 20 мМ HEPES (рН 7,4) та 10 мМ d-глюкозу. Концентрацію протеїну визначали за методом Ларсона [18].

Класифікацію гіпотермії проводили відповідно до [19] (помірна від 20 до 28 °С, а глибока  $\frac{3}{4}$  від 5 до 20 °С).

Накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату синапсомами визначали за алгоритмом: зразки суспензії синапсом об'ємом 125 мкл з концентрацією білка 250 мкг/мл преінкубували у стандартному сольовому розчині протягом 8 хв при 37 °С для відновлення іонних градієнтів на мембрані. Для створення гіпотермічних умов суспензію синапсом охолоджували до 27 °С

або 17 °С. Крім того проводили дослідження без попереднього нагрівання синапсом до 37 °С, при цьому холодні синапсоми (4 °С) відразу нагрівали до 17, 27 або 37 °С. В обох випадках реакції ініціювали додаванням суміші L-глутамату та L-[<sup>14</sup>C]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-[<sup>14</sup>C]глутамату синапсомами 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) [9, 25, 29]. Дані одержували незалежними експериментами, що повторювалися тричі з різними препаратами синапсом.

Для визначення вивільнення L-[<sup>14</sup>C]глутамату препарат синапсом розводили у стандартному сольовому розчині до концентрації 2 мг білка/мл та після преінкубації протягом 10 хв при 37 °С навантажували L-[<sup>14</sup>C]глутаматом (1 нмол/мг білка, 238 мКі/ммоль) в кальцієвому оксигенованому середовищі протягом 10 хв. Після навантаження суспензію синапсом 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 1 мг білка/мл та одразу використовували в експериментах визначення вивільнення глутамату. Зразки (125 мкл суспензії синапсом, 0,5 мг білка/мл) інкубували в безкальцієвому стандартному сольовому розчині 8 хв при 37 °С для відновлення іонних градієнтів, після чого синапсоми охолоджували до 27 або 17 °С. У експериментах без попереднього нагрівання синапсом до 37 °С холодні синапсоми відразу нагрівали до 17 °С, 27 °С або 37 °С. Після створення гіпотермічних умов синапсоми інкубували протягом 6 хв (KCl та FCCP додавали в 0 хв) та швидко осаджували в мікроцентрифузі «Eppendorf» 20 с при 10000 g. Вивільнення визначали в аліквотах надосаду (100 мкл) та розчиненого в SDS осаду (100 мкл) на сцинтиляційному лічильни-

ку «Tracor Analytic Delta 300» (США) зі сцинтиляційною сумішшю ACS (1,5 мл). Загальна кількість L-[<sup>14</sup>C]глутамату в синаптосомах становила  $200000 \pm 15000$  cpm/мг білка.

У дослідженні використовували HEPES, EGTA, EDTA, DL-ТВОА, FCCP, Ficoll 400 та солі о.с.ч. фірми «Sigma» (USA); сцинтиляційну рідину (ACS) фірми «Amersham» (UK); L-[<sup>14</sup>C]глутамат фірми «Amersham» (UK) та «PerkinElmer» (USA).

Статистичний аналіз даних проводили з використанням комп'ютерної програми *Microsoft Excel*. Різницю між двома групами оцінювали з використанням *t*-тесту Стьюдента. Результати наведено як середнє значення  $\pm$   $\pm$  квадратична похибка середнього значення, отриманих за результатами *n* незалежних експериментів. Різниця вважалася статистично значимою при  $P \leq 0,05$ .

### Результати й обговорення

Більшість експериментальних методів, які зазвичай застосовуються для аналізу ключових характеристик глутаматергічної нейротрансмісії, не можуть використовуватись для вивчення впливу гіпотермії, бо є термочутливими *per se*. Так мембранний потенціал та ацидифікація синаптичних везикул [4] визначаються з використанням відповідних потенціал- та рН-чутливих зондів, здатність яких проникати у мембрану безпосередньо залежить від температури. Отримані таким чином експериментальні дані можуть бути некоректними. Водночас використання радіоактивних нейромедіаторів дозволяє безпосередньо та адекватно вимірювати температурозалежні зміни пресинаптичного транспорту. Синаптосоми зберігають основні характеристики інтактних нервових закінчень (здатність підтримувати мембранний потенціал та протонний градієнт синаптичних везикул, накопичувати та вивільнювати нейромедіатори, екзоцитоз тощо) і вважаються однією з кращих систем для дослідження пресинаптичних процесів [30]. Відповідний фізіологічний рівень позаклітинного глутамату є важливою умовою для нормальної синаптичної передачі та, ймовірно, унікальною індивідуальною характеристикою кожного синапса [7].

Очевидно, зміни позаклітинного рівня глутамату під час зниження температури залежать від динамічної рівноваги протилежно спрямованих процесів — захвату та вивільнення.

Для визначення впливу гіпотермічних умов проведено дві серії експериментів. Перша група — дослідження накопичення та тонічного вивільнення глутамату під час патологічних процесів у нормальних нервових закінченнях. Друга — дослідження вивільнення глутамату через реверсну діяльність глутаматних транспортерів, яке обумовлює значний внесок у розвиток ексайтотоксичності за умов гіпоксії/ішемії та стимулюється деполяризацією плазматичної мембрани і дисипацією протонного градієнта синаптичних везикул.

Було проаналізовано накопичення нейромедіатора нервовими закінченнями, що відбувається за рахунок вторинноактивного транспорту за участю високоафінних Na-залежних глутаматних транспортерів. Для оцінки впливу зниження температури на цей процес визначались зміни початкової швидкості накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату синаптосомами при помірній та глибокій гіпотермії.

Експериментальні дослідження засвідчили, що зміни початкової швидкості накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату синаптосомами пропорційні зниженню температури (рис. 1А). Початкова швидкість накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату синаптосомами при 27 °С зменшується на  $21 \pm 4,4$  % порівняно з контролем (37 °С), а при 17 °С — на  $44 \pm 3,7$  % ( $P \leq 0,05$ ,  $n=6$ ).

Оскільки акумуляція нейромедіатора синаптичними везикулами відіграє значну роль у накопиченні глутамату, визначали накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату синаптосомами після 10 хв. Як показано на рис. 1В, при 27 °С рівень L-[<sup>14</sup>C]глутамату становив  $75,4 \pm 3,1$  %, а при 17 °С —  $58,4 \pm 3,6$  % порівняно з контролем ( $P \leq 0,05$ ,  $n=6$ ). Таким чином, помірна та глибока гіпотермія значною мірою пригнічує накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату синаптосомами.

Іншим чинником, який визначає зміни рівня позаклітинного глутамату, є тонічне вивільнення глутамату, яке відбувається шляхами спонтанного екзоцитозу, дифузії, цистин-глутаматного обміну та витікання через аніонні канали [3].

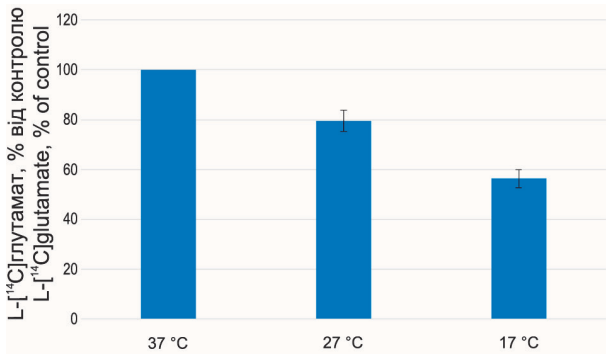


Рис. 1А. Початкова швидкість накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату нервовими терміналами при помірній (27 °C) та глибокій (17 °C) гіпотермії

Fig. 1A. Initial velocity of L-[<sup>14</sup>C]glutamate uptake by nerve terminals under conditions of deep (27 °C) and profound (17 °C) hypothermia

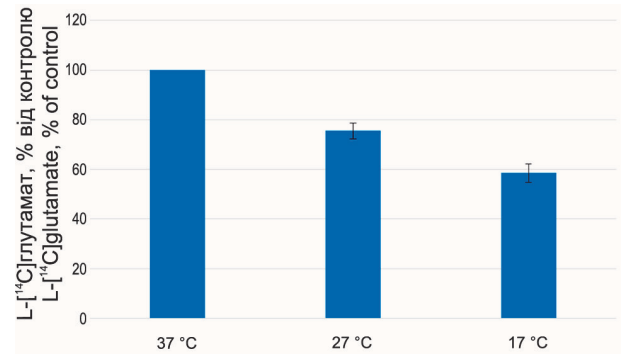


Рис. 1В. Накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату нервовими терміналами через 10 хвилин при помірній (27 °C) та глибокій (17 °C) гіпотермії

Fig. 1B. Accumulation of L-[<sup>14</sup>C]glutamate for 10 min by nerve terminals under conditions of deep (27 °C) and profound (17 °C) hypothermia

Оцінку впливу зниження температури на тонічне вивільнення L-глутамату проводили, визначаючи вивільнення L-[<sup>14</sup>C]глутамату у суспензії синапсом, які інкубували без жодних стимулювальних агентів. Аналіз впливу гіпотермії на тонічне вивільнення L-[<sup>14</sup>C]глутамату з синапсом продемонстрував, що рівень вивільнення значно зменшується: при зниженні температури до 27 °C він становив  $2,51 \pm 2,01$  % від контролю ( $P \leq 0,001$ ,  $n=20$ ), а при 17 °C —  $18,64 \pm 2,01$  % від контролю ( $P \leq 0,001$ ,  $n=20$ ) (рис. 2). Слід зазначити, що виявлені зміни тонічного вивільнення L-[<sup>14</sup>C]глутамату при помірній та глибокій гіпотермії не є поступовими і тонічне вивільнення L-[<sup>14</sup>C]глутамату через 6 хв зменшується набагато більше (практично повністю) за умов помірної гіпотермії 27 °C порівняно з глибокою гіпотермією 17 °C (рис. 2).

Відповідно до теоретичних розрахунків, позаклітинний рівень L-[<sup>14</sup>C]глутамату буде зростати, якщо транспортер-опосередковане накопичення L-глутамату буде чутливішим до зниження температури, ніж тонічне вивільнення L-глутамату. Накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату зменшувалось поступово (рис. 1), тоді як тонічне вивільнення значно зменшується вже при помірній гіпотермії (рис. 2). Відсоток зменшення більший при помірній гіпотермії (на 97 %), ніж при глибокій (на 81 %).

Можемо припустити, що при незначному зниженні температури переважатиме транспортер-опосередковане накопичення L-глутамату і рівень позаклітинного глутамату

не змінюватиметься або зменшуватиметься. Це припущення узгоджується з літературними даними, які свідчать про зменшення концентрації глутамату в діалізаті неінфарктних тканин мозку [1] та відсутність зміни рівня позаклітинного глутамату [2] при м'якій гіпотермії. Водночас у разі подальшого зниження температури відбувається зниження транспортер-опосередкованого накопичення L-глутамату, а тонічне вивільнення не змінюється або навіть зростає, що може призвести до збільшення позаклітинного рівня L-глутамату.

Розвиток нейротоксичності при інсульті, церебральній гіпоксії та ішемії внаслідок травматичних уражень мозку спричиняється надлишковим позаклітинним глутаматом, що

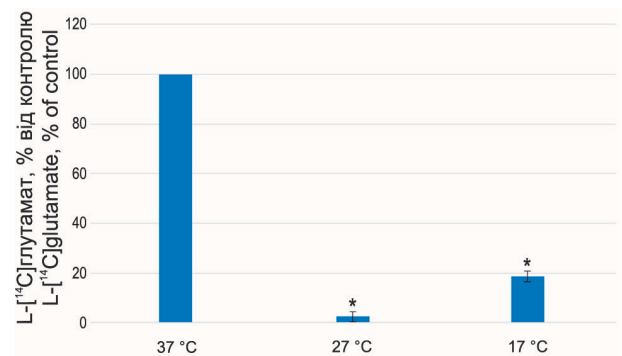


Рис. 2. Тонічне вивільнення L-[<sup>14</sup>C]глутамату нервовими терміналами за умов помірної (27 °C) та глибокої (17 °C) гіпотермії.

\* —  $P \leq 0,001$  порівняно з синапсами при 37 °C

Fig. 2. Tonic release of L-[<sup>14</sup>C]glutamate from nerve terminals under conditions of deep (27 °C) and profound (17 °C) hypothermia.

\* —  $P \leq 0.001$  compared to synaptosomes at 37 °C

вивільняється переважно за рахунок реверсної роботи транспортерів глутамату. Наші дослідження фокусуються на аналізі впливу зниження температури на транспортер-опосередковане вивільнення глутамату, що віддзеркалює викликані гіпотермією зміни в уражених ішемією нервових терміналях. Такі зміни роботи транспортерів стимулювали деполяризацією плазматичної мембрани 35 мМ КСІ. Для оцінки впливу зниження температури на реверсну роботу транспортерів глутамату проводили визначення стимульованого 35 мМ КСІ вивільнення L-[<sup>14</sup>C] глутамату з синапсом при переході від помірної до глибокої гіпотермії. Отримані дані засвідчили, що стимульоване високими концентраціями КСІ вивільнення L-[<sup>14</sup>C] глутамату через 6 хв при 27 °С становило 17±2,8 % від контролю та при 17 °С — 50±2,8 % від контролю (P≤0,05, n=5) (рис. 3). Таким чином, транспортер-опосередковане вивільнення L-[<sup>14</sup>C] глутамату з синапсом поступово зменшується при зниженні температури.

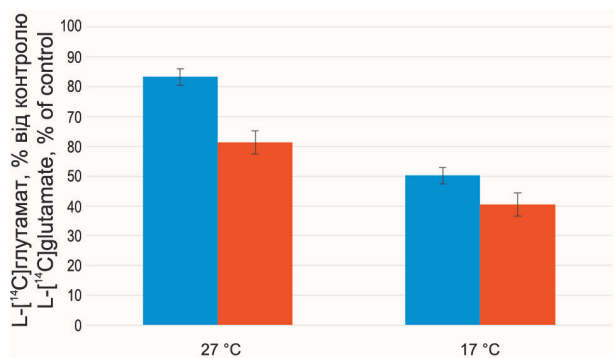


Рис. 3. Транспортер-опосередковане вивільнення L-[<sup>14</sup>C]глутамату нервовими терміналями при помірній (27 °С) та глибокій (17 °С) гіпотермії

Fig. 3. Transporter-mediated release of L-[<sup>14</sup>C]glutamate from nerve terminals under conditions of deep (27 °C) and (17 °C) profound hypothermia

Іншим методичним підходом, що застосовується для оцінки реверсної роботи транспортерів глутамату, є використання протонифору для дисипації протонного градієнта на мембрані синаптичних везикул, що призводить до зростання концентрації глутамату в цитозолі з подальшою зміною роботи транспортерів глутамату. У наступній серії експериментів провели оцінку спричинених гіпотермією змін FCCP-стимульованого вивільнення L-[<sup>14</sup>C]глутамату

з нервових терміналей. Цей показник при 27 °С через 6 хв становив 39±3,9 % від контролю, а при 17 °С — 60±3,9 % від контролю (P≤0,05, n=5) (рис. 3). Експериментально підтверджено поступове зменшення FCCP-стимульованого вивільнення L-[<sup>14</sup>C]глутамату внаслідок зниження температури від помірної до глибокої гіпотермії.

Наведені факти вказують на прогресивний нейропротекторний ефект, який збільшується від помірної до глибокої гіпотермії у зонах, уражених гіпоксією/ішемією, тобто в зоні пенумбри інсульту. Ці експериментальні дані узгоджуються з результатами Nakashima et al. [23], де автори, аналізуючи діалізатні проби, фіксували, що спричинене ішемією збільшення концентрації глутамату пригнічувалося при зниженні температури до 25 °С. Отримані результати узгоджуються і з даними Berger et al. [1], де автори, використовуючи мікродіаліз, спостерігали значні зміни концентрації глутамату в діалізатах перинфарктних тканин у випадку м'якої гіпотермії.

Беручи до уваги вищенаведені факти, можна припустити, що стратегія успішної терапевтичної гіпотермії, з одного боку, ¾ це зменшення можливих негативних наслідків для неуразених гіпоксією/ішемією нервових клітин за рахунок стабілізації позаклітинної концентрації глутамату шляхом збалансування складових накопичення/вивільнення, з іншого — посилення спричиненого гіпотермією зменшення реверсної роботи транспортерів глутамату, що підвищує прямий нейропротекторний ефект. Зазначені рекомендації можуть реалізуватися шляхом комбінації неспецифічних ефектів гіпотермії з іншими неспецифічними та специфічними нейропротекторами.

У медичній практиці дотепер не існує специфічних модуляторів активності транспортерів глутамату, на відміну від селективних інгібіторів GAT1 та GAT3 транспортерів ГАМК, тіагабіну та β-аланіну відповідно. В цьому контексті неспецифічна модуляція активності транспортерів глутамату є єдиним наявним підходом значного зниження патологічного транспортер-опосередкованого вивільнення глутамату з нервових закінчень. Неспецифічна нейропротекція може здійснюватися шляхом

тимчасового зменшення рівня холестеролу. Нами було показано, що зменшення рівня мембранного холестеролу в нервових терміналях зменшує патологічне транспортер-опосередковане вивільнення глутамату [4]. Ці дані можуть пояснити нейропротекторний ефект після застосування статинів у разі ексайтотоксичності, інсульту, церебральної гіпоксії та ішемії, судом, окисного пошкодження та травматичного ураження мозку. Однак наголошуємо, що, за винятком згаданих патологій, нормальний рівень мембранного холестеролу є надзвичайно важливим для нормальної синаптичної передачі, а зменшення вмісту мембранного холестеролу у нервових терміналях може призвести до нейротоксичних наслідків через ослаблення накопичення глутамату та збільшення позаклітинної концентрації глутамату [4]. Як перспективні агенти для модуляції транспорту глутамату та візуалізації ключових процесів у нервових терміналях можна розглядати наночастинки [26].

## Висновки

Проведено аналіз ефектів помірної та глибокої гіпотермії на різні механізми пресинаптичного транспорту глутамату на нервових терміналях головного мозку щурів. Спричинені гіпотермією зміни позаклітинного L-[<sup>14</sup>C]глутамату в неуражених ішемією нервових закінченнях були неявними. Ймовірно, це пов'язано з різною направленістю складових, які визначають фізіологічний позаклітинний рівень: накопичення глутамату та його тонічне вивільнення разом зменшуються внаслідок помірної та глибокої гіпотермії.

У неуражених нервових терміналях зміни позаклітинного рівня глутамату при помірній та глибокій гіпотермії є індивідуальними та залежать від чутливості синапсу до зміни температури.

В уражених нервових терміналях (у ділянках мозку, де зменшується кровообіг при кардіоопераціях, в зоні ядра та пенумбри інсульту) транспортер-опосередковане вивільнення глутамату поступово та істотно зменшується в умовах помірної до глибокої гіпотермії. Ці процеси можна розглядати як неспецифічний потужний нейропротекторний ефект нервової

тканини з наслідками інсульту, гіпоксії та ішемії, кардіооперацій зі зменшенням церебрального кровообігу та травматичних уражень мозку, де розвиток ексайтотоксичності пов'язаний зі зростанням реверсної роботи транспортерів глутамату. Отримані дані свідчать про необхідність розвитку та вдосконалення спеціальних параметрів для нейромоніторингу у разі застосування гіпотермії.

## Перспективи подальших досліджень.

Беручи до уваги отримані дані щодо змін основних характеристик пресинаптичного транспорту глутамату при гіпотермії, наступним етапом роботи буде здійснення всебічного нейромоніторингу параметрів, пов'язаних з глутаматом у плазмі крові та цереброспинальній рідині, що допоможе обрати оптимальний індивідуальний температурний режим для пацієнтів, яким призначена терапевтична гіпотермія. У перспективі планується розробити панель пов'язаних з глутаматом біомаркерів для нейромоніторингу пацієнтів, що відображатиме індивідуальні, спричинені гіпотермією, ефекти в нервових терміналях.

1. Berger C., Schäbitz W.-R., Georgiadis D., Steiner T., Aschoff A., Schwab S. Effects of hypothermia on excitatory amino acids and metabolism in stroke patients: a microdialysis study. *Stroke*, 2002, vol. 33, pp. 519–524.

2. Borisov M., Möller F., Wieloch T. Changes in the extracellular levels of glutamate and aspartate during ischemia and hypoglycemia. Effects of hypothermia. *Exp. brain Res.*, 1998, vol. 121, pp. 277–284.

3. Borisova T. Permanent dynamic transporter-mediated turnover of glutamate across the plasma membrane of presynaptic nerve terminals: arguments in favor and against. *Rev. Neurosci.*, 2016, vol. 27, pp. 71–81.

4. Borisova T. *Cholesterol and Presynaptic Glutamate Transport in the Brain*. New York, Springer Science & Business Media, 2013. 75 p.

5. Borisova T. A., Himmelreich N. H. Centrifuge-induced hypergravity: [<sup>3</sup>H]GABA and L-[<sup>14</sup>C]glutamate uptake, exocytosis and efflux mediated by high-affinity, sodium-dependent transporters. *Adv. Sp. Res.*, 2005, vol. 36, pp. 1340–1345.

6. Borisova T. A., Krisanova N. V. Presynaptic transporter-mediated release of glutamate evoked by the protonophore FCCP increases under altered gravity conditions. *Adv. Sp. Res.*, 2008, vol. 42, pp. 1971–1979.

7. Borisova T., Borysov A. Putative duality of presynaptic events. *Rev. Neurosci.*, 2016, vol. 27, pp. 377–383.

8. Borisova T., Krisanova N., Himmelreich N. Exposure of animals to artificial gravity conditions



leads to the alteration of the glutamate release from rat cerebral hemispheres nerve terminals. *Adv. Sp. Res.*, 2004, vol. 33, pp. 1362–1367.

9. Borisova T., Sivko R., Borysov A., Krisanova N. Diverse Presynaptic Mechanisms Underlying Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin-Mediated Changes in Glutamate Transport. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 2010, vol. 30, pp. 1013–1023.

10. Cotman C.W. Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions. *Methods Enzymol.*, 1974, vol. 31, pp. 445–452.

11. Danbolt N.C. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.*, 2001, vol. 65, pp. 1–105.

12. Englum B. R., Andersen N. D., Husain A. M., Mathew J. P., Hughes G. C. 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, vol. 2, pp. 184–193.

13. Grewer C., Gameiro A., Zhang Z., Tao Z., Braams S., Rauen T. Glutamate forward and reverse transport: From molecular mechanism to transporter-mediated release after ischemia. *IUBMB Life*, 2008, vol. 60, pp. 609–619.

14. Hertog H. M., van der Worp H. B., van Gemert H. M. A., Algra A., Kappelle L. J., van Gijn J., Koudstaal P. J., Dippel D. W. J. An early rise in body temperature is related to unfavorable outcome after stroke: data from the PAIS study. *J. Neurol.*, 2011, vol. 258, pp. 302–307.

15. Kammersgaard L. P., Jørgensen H. S., Rungby J. A., Reith J., Nakayama H., Weber U. J., Houth J., Olsen T. S. Admission body temperature predicts long-term mortality after acute stroke: the Copenhagen Stroke Study. *Stroke*, 2002, vol. 33, pp. 1759–1762.

16. Kumral E., Yüksel M., Büket S., Yagdi T., Atay Y., Güzelant A. Neurologic complications after deep hypothermic circulatory arrest: types, predictors, and timing. *Texas Hear. Inst. J.*, 2001, vol. 28, pp. 83–88.

17. Lakhan S. E., Pamplona F. Application of mild therapeutic hypothermia on stroke: a systematic review and meta-analysis. *Stroke Res. Treat.*, 2012, vol. 2012, pp. 295906.

18. Larson E., Howlett B., Jagendorf A. Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination. *Anal. Biochem.*, 1986, vol. 155, pp. 243–248.

19. Liu L., Yenari M. A. Therapeutic hypothermia: neuroprotective mechanisms. *Front. Biosci.*, 2007, vol. 12, pp. 816–825.

20. Liu L., Yenari M. A. Clinical application of therapeutic hypothermia in stroke. *Neurol. Res.*, 2009, vol. 31, pp. 331–335.

21. Millán M., Grau L., Castellanos M., Rodríguez-Yáñez M., Arenillas J. F., Nombela F., Pérez de la Ossa N., López-Manzanares L., Serena J., Castillo J., Dávalos A. Body temperature and response to thrombo-

lytic therapy in acute ischaemic stroke. *Eur. J. Neurol.*, 2008, vol. 15, pp. 1384–1389.

22. Mrozek S., Vardon F., Geeraerts T. Brain temperature: Physiology and pathophysiology after brain injury. *Anesthesiol. Res. Pract.*, 2012, vol. 2012, pp. 989487.

23. Nakashima K., Todd M. M. Effects of hypothermia, pentobarbital, and isoflurane on postdepolarization amino acid release during complete global cerebral ischemia. *Anesthesiology*, 1996, vol. 85, pp. 161–168.

24. Percy A., Widman S., Rizzo J. A., Tranquilli M., Eleftheriades J. A. Deep hypothermic circulatory arrest in patients with high cognitive needs: full preservation of cognitive abilities. *Ann. Thorac. Surg.*, 2009, vol. 87, pp. 117–123.

25. Pozdnyakova N., Dudarenko M., Yatsenko L., Himmelreich N., Krupko O., Borisova T. Perinatal hypoxia: different effects of the inhibitors of GABA transporters GAT1 and GAT3 on the initial velocity of [ $^3$ H]GABA uptake by cortical, hippocampal, and thalamic nerve terminals. *Croat. Med. J.*, 2014, vol. 55, pp. 250–258.

26. Pozdnyakova N., Pastukhov A., Dudarenko M., Galkin M., Borysov A., Borisova T. 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, vol. 14, pp. 25.

27. Rosen A. D. Temperature modulation of calcium channel function in GH3 cells. *Am. J. Physiol.*, 1996, vol. 271, pp. C863–868.

28. Rosen A. D. Nonlinear temperature modulation of sodium channel kinetics in GH(3) cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, vol. 1511, pp. 391–396.

29. Soldatkin O., Nazarova A., Krisanova N., Borysov A., Kucherenko D., Kucherenko I., Pozdnyakova N., Soldatkin A., Borisova T. Monitoring of the velocity of high-affinity glutamate uptake by isolated brain nerve terminals using amperometric glutamate biosensor. *Talanta*, 2015, vol. 135, pp. 67–74.

30. Sudhof T. C. The synaptic vesicle cycle. *Annu. Rev. Neurosci.*, 2004, vol. 27, pp. 509–547.

31. Volgushev M., Kudryashov I., Chistiakova M., Mukovski M., Niesmann J., Eysel U. T. Probability of transmitter release at neocortical synapses at different temperatures. *J. Neurophysiol.*, 2004, vol. 92, pp. 212–220.

32. Volgushev M., Vidyasagar T. R., Chistiakova M., Eysel U. T. Synaptic transmission in the neocortex during reversible cooling. *Neuroscience*, 2000, vol. 98, pp. 9–22.

33. Worp H. B., Sena E. S., Donnan G. A., Howells D. W., Macleod M. R. Hypothermia in animal models of acute ischaemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Brain*, 2007, vol. 130, pp. 3063–3074.

34. Xing C., Arai K., Lo E. H., Hommel M. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. *Int. J. Stroke*, 2012, vol. 7, pp. 378–385.