Борисов Арсеній Андрійович, провідний інженер відділу нейрохімії Інституту біохімії імені О. В. Палладіна НАН Укра&shy;їни: &laquo;Акумуляція та вивільнення глутамату нервовими терміналями головного мозку щурів за дії феритину та важких металів&raquo; (03.00.04 - біохімія). Спецрада Д 26.001.24 у Київ&shy;ському національному університеті імені Тараса Шевченка

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ і НАУКИ УКРАЇНИ

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

На правах рукопису

БОРИСОВ АРСЕНІЙ АНДРІЙОВИЧ

УДК 577.352.56: 577.112.384.4: 612.397.81

АКУМУЛЯЦІЯ ТА ВИВІЛЬНЕННЯ ГЛУТАМАТУ НЕРВОВИМИ

ТЕРМІНАЛЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ ЗА ДІЇ ФЕРИТИНУ ТА

ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

03.00.04. – біохімія

Дисертація

на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Науковий керівник:

Остапченко Людмила Іванівна

доктор біологічних наук,

професор

Київ–2017

1

Зміст

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ……………………………………………5

ВСТУП ..................................................................................................................... 6

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ....................................................................... 18

1.1. Процес нейротрансмісії у центральній нервовій системі як каскад

скоординованих реакцій………………………………………………………..18

1.2 Глутамат – основний збуджувальний нейромедіатор у центральній

нервовій системі………………………………………………………………..22

1.3. Високоафінні натрійзалежні транспортери глутамату в пресинаптичних

нервових терміналях…………………………………………………………...23

1.4 Стимульований екзоцитоз – один з основних механізмів вивільнення

глутамату з пресинаптичних нервових терміналей …………………………26

1.5. Роль холестеролу в синаптичній трансмісії………………………….29

1.6 Забруднення важкими металами – один із тригерних факторів, що

призводить до розвитку нейрологічних захворювань ………………………33

1.7 Глобулярний протеїновий комплекс феритин та його роль у депонуванні

заліза…………………………………………………………………..…………38

1.8 Використання магнітних наночастинок у нанонейротехнології……..44

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА ………………………………..47

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ………………………..47

2.1. Матеріали………………………………………………………………47

2.2. Виділення синаптосом…………………………………………………47

2.3. Одержання препарату ізольованих синаптичних везикул…………. 48

2.4. Видалення холестеролу та визначення рівня холестеролу в

синаптосомах …………………………………………………………………..48

2.5 Дослідження препарату синаптосом з використанням проточного

цитометра……………………………………………………………………….49

2.6. Визначення розміру синаптосом методом фотонної кореляційної

спектроскопії……………………………………………………………………49

2

2.7. Визначення накопичення глутамату синаптосомами…………. …..51

2.8. Визначення вивільнення глутамату синаптосомами……………….52

2.9. Визначення потенціалу плазматичної мембрани синаптосом………53

2.10. Визначення рівня ацидифікації синаптичних везикул……………..54

2.11. Аналіз внутрішньоклітинного рівня ендогенного глутамату в

препараті синаптосом з використанням амінокислотного аналізатора…… ..55

2.12. Статистичний аналіз даних …………………………………………..57

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ…………………………………….56

3.1. Визначення алгоритму аналізу змін у транспорті глутамату в

пресинаптичній нервовій терміналі …………………………………………..56

3.1.1. Розробка нового методу вимірювання динаміки накопичення L-

[

14C]глутамату нервовими терміналями за аналізом радіоактивності в

супернатанті …………………………………………………………………….56

3.1.2. Динамічний гомообмін глутамату через плазматичну мембрану

нервових терміналей як важлива характеристика їхнього функціонального

стану……………………………………………………………………………...57

3.1.3. Теоретичне визначення подвійності пресинаптичних процесів… 62

3.2. Вплив важких металів на ключові характеристики глутаматергічної

нейропередачі в нервових терміналях головного мозку з нормальним та

зниженим рівнем холестеролу………………………………………………….70

3.2.1. Характеристика препаратів синаптосом методом лазерної

кореляційної спектроскопії…………………………………………………….70

3.2.2. Аналіз препаратів синаптосом методом проточної цитометрії…..71

3.2.3. Вплив кадмію, свинцю, марганцю та заліза на накопичення L–

[

14С]глутамату синаптосомами…………………………………………………73

3.2.4. Вплив кадмію, свинцю, марганцю та заліза на позаклітинний рівень

L

–

[

14С]глутамату в дигітонінпермеабілізованих синаптосомах…………..…74

3.2.5. Кадмій та свинець суттєво знижують ацидифікацію синаптичних

везикул у нервових закінченнях ……………………………………………….76

3

3.2.6. Вплив свинцю і кадмію на протонний градієнт ізольованих

синаптичних везикул ……………………………………………………………77

3.2.7. Вплив марганцю та заліза на протонний градієнт ізольованих

синаптичних везикул……………………………………………………………79

3.2.8. Дія важких металів на ключові характеристики нейропередачі за

умов дефіциту холестеролу в нервових терміналях ………………………….80

3.3. Транспорт глутамату в нервових терміналях головного мозку за дії

феритину…………………………………………………………………………83

3.3.1. Характеристика природного білкового комплексу –

феритину…………………………………………………………………………83

3.3.2. Накопичення L-[14C]глутамату нервовими терміналями за умов

присутності феритину…………………………………………………………..84

3.3.3. Нестимульований гомообмін глутамату через плазматичну мембрану

нервових терміналей за дії феритину та аналіз молекулярних механізмів

нейромодулювальної дії природного білкового комплексу феритину;

відокремлення специфічних ефектів білкової та неорганічної складових

молекули

феритину………………………………………………………………..………87

3.3.4. Ефект одночасного застосування феритину і конкурентних інгібіторів

глутаматних транспортерів DL–TBOA або DHK на накопичення L-

[14C]глутамату синаптосомами ………………………………………….…92

3.3.5. Ефект феритину та апоферитину на ацидифікацію синаптичних

везикул у синаптосомах……………………………………….……………….93

3.4. Порівняльний аналіз нейроактивних властивостей феритину та

синтезованих магнітних наночастинок, укритих полісахаридами …..….…96

3.4.1. Оцінювання мембранного потенціалу та закислення синаптичних

везикул за умов присутності наночастинок магнетиту з різними типами

покриття………………………………………………………………………..96

3.4.2. Аналіз активного накопичення глутамату синаптосомами за

присутності наночастинок магнетиту з різними типами покриття……..…100

4

3.4.3. Вплив наночастинок магнетиту, укритих полімерами, на рівень

позаклітинного L-[

14C]глутамату в синаптосомах ………………………….98

3.4.4. Маніпуляція популяцією нервових терміналей синтезованими

наночастинками магнетиту, вкритими певними полімерами, під дією

зовнішнього магнітного поля…………………………………………………100

3.4.5. Маніпуляція нервовими терміналями головного мозку зовнішнім

магнітним полем з використанням вкритих D-манозою наночастинок -Fe2O3 та

їх ефект на транспорт глутамату…………………..………………………104

3.4.6. Порівняння нейротоксичного потенціалу синтезованих наночастинок

магнетиту, вкритих певним полісахаридом, і природних магнітних

наночастинок з білковою оболонкою феритину….…………….110

РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ……………..114

ВИСНОВКИ…………………………………………………………………….125

СПИСОК ЦИТОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ………………………………………127

5

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

МЦД– метил--циклодекстрин

ЕДТА – етилендиамінтетраоцтова кислота

ЕГТА – етиленглікольтетраоцтова кислота

ЦНС – центральна нервова система

ATP (adenosine triphosphate) – аденозинтрифосфорна кислота;

DL–TBOA (DL-threo-β-benzyloxyaspartate)–DL-трео-β-бензилоксіаспартат

DL-TНА (DL–threo–β–hydroxyaspartate) – DL–трео-β-гідроксіаспартат

EAAT (excitatory amino acid transporter ) – транспортер збуджувальних

амінокислот

GLAST – L-glutamate/L-aspartate transporter, тривіальна назва EAAT1

GLT – glutamate transporter, тривіальна назва EAAT2

GDH – глутаматдегідрогеназа

HEPES – (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) – 4-(2-

гідроксіетил)-1–піперазинетансульфонова кислота

NMDA – N-methyl-D-aspartic acid, N-метил-D-аспартат

АМРА – α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid, α-аміно-3-

гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонова кислота

NMDG – N-methyl-D-glucamine, N-метил-D-глюкамін

SDS (sodium dodecyl sulfate) –додецилсульфат натрію

Tris – tris(hydroxymethyl)methylamine), трис (гідроксиметил)метиламін;

ГАМК – -аміномасляна кислота

ГТР – гуанозинтрифосфат

глутамат – L- глутамінова кислота

SNAP (soluble NSF attachment protein) – розчинні NSF зв'язуючі білки

VAMP (vesicle–associated membrane protein) – білок, асоційований з

мембранами везикул.

6

ВСТУП

Актуальність теми. Нейрологічні та нейродегенеративні захворювання

становлять значну проблему сучасного суспільства в усьому світі, а їх

лікування потребує витрати значних державних коштів. Етіологію цих хвороб

остаточно не з'ясовано, незважаючи на значні зусилля експериментаторів.

Дослідження молекулярних механізмів розвитку нейропатологій створює

підґрунтя та відкриває шляхи для розроблення новітнього фармакологічного

інструментарію.

Важкі метали вважають одним із тригерних факторів, що призводять до

розвитку нейрологічних та нейродегенеративних захворювань. Показано, що

кадмій і свинець здатні накопичуватись у головному мозку, що зумовлює

морфологічні та біохімічні зміни в центральній нервовій системі, а також

поведінкові розлади, зниження пам'яті та інтелекту, причиною яких можуть

бути порушення транспорту нейромедіаторів у нервових терміналях головного

мозку [1,2]. Оксидативний стрес вважають однією з причин загибелі нейронів

за нейродегенеративних захворюваннь. Феритин – природний протеїновий

комплекс, що виконує роль основного внутрішньоклітинного депо заліза,

перетворює залізо у його редокс-неактивну форму, що захищає клітину від

ураження вільними радикалами. Феритин – це глобулярний комплекс, який

складається з білкової глобули, всередині якої розташована неорганічна

залізовмісна магнітна наночастинка, розмір якої становить 7–12 нм [3]. При

інсульті, травмі мозку, хворобі Альцгеймера та нейробластомі спостерігається

збільшення концентрації феритину у плазмі та цереброспінальній рідині.

Позаклітинному феритину притаманна дедалі зростаюча кількість функцій,

включаючи нещодавно описану участь у доставленні заліза у мозок,

ангіогенезі, запаленні, імунній відповіді та канцерогенезі [4,5].

L-глутамат забезпечує передачу збуджувальних сигналів у центральній

нервовій системі тварин. Цей нейромедіатор відіграє значну роль у

функціонуванні мозку та бере участь у здійсненні його найважливіших

7

функцій, а саме навчанні та запам’ятовуванні. Порушення транспорту

глутамату спостерігається за більшості нейрологічних захворювань. Оскільки

надмірна активація глутаматних рецепторів та масивний вхід кальцію

всередину нейронів може призвести до їх загибелі, надлишковий

позаклітинний глутамат у нервовій системі має токсичні властивості.

Термінація глутаматергічної нейропередачі відбувається шляхом поглинання

нейромедіатору із синаптичної щілини всередину нервової клітини. Оскільки у

синаптичній щілині відсутні ферменти, що здатні розщеплювати глутамат, на

сьогодні це – єдиний шлях «нейтралізації» глутамату. Високоафінні

натрійзалежні глутаматні транспортери, що локалізовані в ліпідних рафтах

плазматичної мембрани нейронів і гліальних клітинах, забезпечують

накопичення глутамату нервовими клітинами [6]. Na+

/K+

- градієнт на

плазматичній мембрані є рушійною силою цього процесу. Транспорт глутамату

із цитоплазми в синаптичні везикули відбувається через везикулярні глутаматні

транспортери за рахунок енергії протонного електрохімічного градієнта, що

генерується везикулярною H+

–ATPазою,.

Роботу присвячено аналізу транспорту глутамату в нервових терміналях

головного мозку за умов дії важких металів і феритину. Зусилля зосереджено

на відокремленні специфічних ефектів протеїнової та неорганічної складових

молекули феритину, що було досягнуто порівняльним аналізом ефектів

феритину, апоферитину (білкової капсули, позбавленої магнітної

наночастинки) та синтезованих наночастинок магнетиту і магеміту без

покриття та покритих різними полімерами. Проведення порівняльного аналізу

дії феритину та синтезованих наночастинок дало змогу з’ясувати, чи варто

розглядати феритин у нейротоксикологічних дослідженнях як модель

магнітних наночастинок, покритих полімерами, що вважають за доречне деякі

автори [7].

Актуальним фундаментальним завданням сучасної нейрохімії та вкрай

перспективним у галузі нанонейротехнології є вирішення питання, чи можуть

важкі метали, феритин, апоферитин і синтезовані наночастинки з різним типом

8

покриття впливати на ключові характеристики глутаматергічної нейропередачі,

та визначити молекулярні механізми цього модуляторного впливу. Слід

відзначити, що дотепер немає сполук, здатних впливати на активність

глутаматних транспортерів, які можуть використовуватись у медицині.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційну роботу виконано на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології та

медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у

рамках науково-дослідних тем: «Механізми реалізації адаптаційно –

компенсаторних реакцій організму за умови розвитку різних патологій» (№ д/р

0111U004648, 2011–2015 рр.) та «Механізми регуляції метаболічних процесів в

організмі за умов розвитку патологічних станів» (№ д/р 0116 U 002527, 2016–

2018 рр.).

Мета і завдання роботи. Метою роботи було дослідити транспорт

глутамату в нервових терміналях головного мозку за дії важких металів,

феритину, апоферитину і синтезованих наночастинок магнетиту та магеміту з

різними типами покриття. Відповідно до зазначеної мети було поставлено такі

завдання:

1) Визначити, чи є ефективним, постійним та динамічним гомообмін глутамату

крізь плазматичну мембрану нервових терміналей; провести диференціацію

пресинаптичних процесів і з’ясувати, зміни яких характеристик транспорту

глутамату є найбільш вразливими для глутаматергічної нейропередачі.

2) Дослідити вплив важких металів на накопичення глутамату нервовими

терміналями та синаптичними везикулами у дигітонінпермеабілізованих

нервових терміналях, а також їх вплив на протонний градієнт ізольованих

синаптичних везикул.

3) Проаналізувати дію протеїнового комплексу феритину на позаклітинний

рівень та транспортерзалежне накопичення глутамату в нервових

терміналях. З використанням інгібіторів глутаматних транспортерів

9

з’ясувати, чи заважають вони феритину змінювати швидкість накопичення

глутамату нервовими терміналями.

4) Дослідити дію феритину на ацидифікацію синаптичних везикул і тонічне

вивільнення глутамату із нервових терміналей.

5) З використанням апоферитину (білкової капсули, позбавленої магнітної

наночастинки) встановити вплив білкової складової молекули феритину на

позаклітинний рівень глутамату і транспортеропосередковане накопичення

глутамату нервовими терміналями.

6) З використанням наночастинок магнетиту та магеміту з різним типом

покриття проаналізувати можливу дію неорганічної складової молекули

феритину на мембранний потенціал, протонний градієнт синаптичних

везикул, початкову швидкість накопичення глутамату та позаклітинний

рівень глутамату в нервових терміналях.

7) З’ясувати можливість маніпуляції нервовими терміналями за допомогою

магнітних наночастинок, застосовуючи зовнішнє магнітне поле.

Об’єкт дослідження: екзоцитоз та активний транспорт глутамату в

нервових терміналях головного мозку щурів.

Предмет дослідження: регуляція процесів високоафінного

натрійзалежного накопичення глутамату, тонічного та стимульованого

деполяризацією плазматичної мембрани вивільнення глутамату в нервових те

Методи дослідження: препаративна біохімія, лазерна кореляційна

спектроскопія, проточна цитометрія для порівняльної характеристики розміру і

гранулярності нервових терміналей, спектрофлуориметричні методи для

визначення закислення синаптичних везикул, радіоізотопні методи для аналізу

накопичення та вивільнення глутамату, методи спектрофотометрії для

визначення кількості білка та статистичні методи.

10

Наукова новизна одержаних результатів. Дисертаційна робота становить

комплексне дослідження системи активного транспорту глутамату в нервових

терміналях головного мозку за дії феритину та важких металів. Уперше

показано існування динамічного гомообміну глутамату крізь плазматичну

мембрану, проведено диференціацію пресинаптичних процесів та виявлено їх

уявну подвійність. Встановлено нові нейромодулювальні властивості важких

металів та протеїнового комплексу феритину. Вперше доведено, що кадмій та

свинець знижують, проте марганець не змінює, протонний градієнт ізольованих

синаптичних везикул і накопичення глутамату нервовими терміналями та

синаптичними везикулами у дигітонінпермеабілізованих нервових закінченнях.

Уперше з’ясовано, що протеїновий комплекс феритин збільшує позаклітинний

рівень глутамату в нервових терміналях, що зумовлено зниженням

транспортеропосередкованого накопичення нейромедіатору. Застосування

інгібіторів глутаматних транспортерів не перешкоджає здатності феритину

гальмувати накопичення глутамату нервовими терміналями. Уперше доведено,

що феритин знижує ацидифікацію синаптичних везикул і тонічне вивільнення

L-[

14C]глутамату із нервових терміналей. З використанням апоферитину

вперше встановлено специфічні ефекти білкової складової молекули феритину,

а саме: апоферитин, подібно до феритину, здатен збільшувати позаклітинний

рівень L-[

14C]глутамату і зменшувати транспортерзалежне накопичення L-

[

14C]глутамату нервовими терміналями. Уперше здійснено відокремлення

специфічних ефектів білкової та неорганічної складових молекули феритину на

транспорт глутамату в нервових терміналях. З’ясовано механізми, за яких

вищезазначені зміни можуть бути залучені до розвитку патологічних процесів у

нервовій системі, і навпаки, у нейропротекції. Доведено, що в центральній

нервовій системі екзогенний феритин може модулювати гомеостаз глутамату

залізозалежним та залізонезалежним шляхом.

Практичне значення одержаних результатів. Окрім фундаментального

значення результати роботи становлять суттєвий прикладний інтерес, оскільки

11

показана можливість маніпуляції нервовими терміналями, міченими -Fe2O3

наночастинками, покритими D-манозою, і Fe3O4 наночастинками, покритими 3-

амінопропіл(діетокси)метилсиланом, зовнішнім магнітним полем. Доведено

відсутність впливу наночастинок Fe3O4 та -Fe2O3 без покриття, та покритих

певними полімерами, на протонний градієнт синаптичних везикул, мембранний

потенціал, початкову швидкість накопичення L-[

14C]глутамату та

позаклітинний рівень глутамату в нервових терміналях. Запатентовано нові

нейромодулювальні ефекти екзогенного позаклітинного феритину щодо

збільшення позаклітинного рівня глутамату та дисипації протонного градієнта

синаптичних везикул у нервових терміналях (патент № 93636 та № 93637

України, 2014 р). Крім того, вперше доведено, що феритин не може бути

використаний як модель магнітних наночастинок, покритих полімерами.

Вищезазначені нові властивості феритину та магнітних наночастинок

слугуватимуть основою подальших біотехнологічних розробок та в галузі

нейротераностики.

Особистий внесок здобувача. У процесі виконання дисертаційної роботи

автором проаналізовано наукову літературу за темою дослідження.

Дисертантом разом із науковим керівником розроблено ідеологію дослідження,

програму проведення експериментів, підібрано адекватні методи вирішення

поставлених завдань та проведено обговорення результатів. Дисертант особисто

проводив роботу з експериментальними тваринами, основний обсяг

експериментальної роботи здійснено дисертантом власноруч або за

безпосередньою його участю. Через складність експериментальної роботи з

використанням радіоактивно міченого глутамату та неможливість проведення

експерименту одним співробітником більшість таких досліджень виконано

спільно з науковим співробітником відділу нейрохімії к.б.н. Н. В. Крисановою,

молодшим науковим співробітником к.б.н. Р. В. Сівко та науковим

співробітником к.б.н. Л. О. Касаткіною. Визначення розміру синаптосом

методом фотонної кореляційної спектроскопії було проведено за участю

12

старшого наукового співробітника лабораторії оптичних методів дослідження

к.х.н. О. Ю. Чуніхіна. Обробку отриманих результатів та написання тексту

дисертаційної роботи виконано безпосередньо здобувачем. Друковані праці

підготовані за безпосередньою участю автора.

Апробація результатів дисертації. Основні результати роботи

доповідалися і були представлені на 11 вітчизняних та міжнародних

конференціях, конгресах і з’їздах: 7-,8-,9-й та 10-й Щорічних конференціях

наукового Консорціуму «Bridges in Life Science», RECOOP HST, Будапешт,

Угорщина (2012), Спліт, Хорватія ( 2014), Вроцлав, Польща (2015), Прага, Чехія

(2015); конференції Федерації європейських біохімічних товариств, 3th FEBS

Congress Прага, Чехія (2009); FEBS ‒ EMBO 2014 Conference, Париж, Франція

(2014); 6-й міжнародній науковій та технічній конференції «Cенсорна

електроніка і мікросистемні технології», 10-у Українському біохімічному з’їзді,

Одеса, Україна (2010); 7-й Парнасівській конференції, Ялта, Україна (2009); 14-

й Українській конференції з космічних досліджень, Ужгород, Україна (2014),

конференції «Адаптаційні стратегії живих систем», Новий Світ, Україна (2012).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 1 статтю у вітчизняному та 9

статей у міжнародних наукових фахових виданнях, 2 патенти та 11 тез

доповідей у збірниках матеріалів наукових конференцій та з’їздів.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ

1. Borisova T. Cholesterol depletion attenuates tonic release but increases the

ambient level of glutamate in rat brain synaptosomes / T. Borisova, N. Krisanova,

R. Sivko, A. Borysov // Neurochemistry International. – 2010. – V.56. – Р.466–

478. (Особистий внесок дисертанта: аналіз сучасних літературних даних,

статистична обробка даних, узагальнення результатів дослідження).

2. Borisova T. Presynaptic malfunction: The neurotoxic effects of cadmium and lead

on the proton gradient of synaptic vesicles and glutamate transport / T. Borisova,

13

N. Krisanova, R. Sivko, L. Kasatkina, A. Borysov, S. Griffin, M. Wireman //

Neurochemistry International. – 2011. – V.59. – Р.272–279. (Особистий внесок

дисертанта: проведення експериментальних досліджень, статистична

обробка даних, узагальнення результатів).

3. Krisanova N. Neurotoxic potential of Lunar and Martian dust: influence on

em, proton gradient, active transport, and binding of glutamate in rat brain

nerve terminals / N. Krisanova, L. Kasatkina, R. Sivko, A. Borysov, A.

Nazarova, K. Slenzka, T. Borisova // Astrobiology. – 2013. – V.13, № 8. – P.

679–692. (Особистий внесок дисертанта: аналіз сучасних літературних

даних, проведення експериментальних досліджень з наночастинками

магнетиту, статистична обробка даних, узагальнення результатів).

4. Krisanova N. Excitotoxic potential of exogenous ferritin and apoferritin: Changes

in ambient level of glutamate and synaptic vesicle acidification in brain nerve

terminals / N. Krisanova, R. Sivko, L. Kasatkina, A. Borуsov, T. Borisova //

Cell.Mol. Neuroscience. – 2014. – V.58.– P.95–104. (Особистий внесок

дисертанта: аналіз літературних даних, проведення експериментальних

досліджень, статистична обробка даних, узагальнення результатів).

5. Borisova T. Manipulation of brain nerve terminals by an external magnetic field

using D–mannose–coated –Fe2O3 nano–sized particles and their effects on

glutamate transport / T. Borisova, N. Krisanova, A. Borуsov, R. Sivko, L.

Ostapchenko, M. Babic, D. Horak // Beilstein J. Nanotechnol. – 2014. – V.5.–

P.778–788. (Особистий внесок дисертанта: аналіз літературних даних,

проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних,

узагальнення результатів).

6. Borysov A. A comparative study of neurotoxic potential of synthesized

polysaccharide–coated and native ferritin–based magnetic nanoparticles / A.

Borysov, N. Krisanova, O. Chunihin, L. Ostapchenko, N. Pozdnyakova, T.

Borisova // Croat.Med.J. – 2014. – V.55.– P.195–205. (Особистий внесок

дисертанта: аналіз літературних даних, проведення експериментальних

досліджень, статистична обробка даних, узагальнення результатів).

14

7. Soldatkin O. Monitoring of the velocity of high–affinity glutamate uptake by

isolated brain nerve terminals using amperometric glutamate biosensor / O.

Soldatkin, A. Nazarova, N. Krisanova, A. Borуsov, D. Kucherenko, I.

Kucherenko, N. Pozdnyakova, A. Soldatkin, T. Borisova // Talanta.− 2015.−

V.135. – P.67–74. (Особистий внесок дисертанта: аналіз літературних

даних, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка

даних, узагальнення результатів).

8. Borisova T. Putative duality of presynaptic events / T. Borisova, A. Borysov //

Rev. Neurosci. – 2016. – V.27, N.4. – P.377-384. (Особистий внесок

дисертанта: аналіз сучасних літературних даних, статистична обробка

даних, узагальнення результатів, підготовка рисунків та статті до друку).

9. Borisova T. 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 /T. Borisova A. Borysov, A.

Pastukhov, N. Krisanova // Cell Mol Neurobiol. – 2016. –V.36. – P.1229-1240.

(Особистий внесок дисертанта: аналіз літературних даних, проведення

експериментальних робіт, статистична обробка даних, узагальнення

результатів дослідження підготовка рисунків та статті до друку).

10. Кучеренко Д. Ю. Оптимізація амперометричного біосенсора для оцінки

швидкості накопичення глутамату ізольованими нервовими терміналями мозку /

Д. Ю. Кучеренко, І. С. Кучеренко, Д. В. Седюко, Д. В. Книжникова, О. О.

Солдаткін, А. А. Борисов, А. Г. Назарова, Н. В. Крисанова, Т. О. Борисова, О. П.

Солдаткін // Sensor Electronics and Мicrosystem Technologies. –2016 – T. 13, № 1.

– С.98-113. (Особистий внесок дисертанта: проведення експериментальних робіт,

статистична обробка даних).

11.Борисова Т.О. Білковий комплекс феритин, до складу якого входять залізні

наночастинки, збільшує позаклітинний рівень глутамату у нервових

терміналях головного мозку / Т.О.Борисова, O.В.Романенко,

Н.В.Крисанова, А.А.Борисов, Л.І. Остапченко // Патент України № 93636,

МПК(2014.01)C07D 277/00; заявник та патентовласник Нац. мед.

15

університет, Інст. біохімії. № u 201404638; заявл. 30.04.14. (Особистий

внесок дисертанта: аналіз літератури, проведення експериментальних

робіт, статистична обробка даних, узагальнення результатів дослідження,

підготовка рисунків та патенту до друку).

12. Борисова Т.О. Білковий комплекс феритин, до складу якого входять залізні

наночастинки, викликає дисипацію протонного градієнту синаптичних

везикул у нервових терміналях головного мозку / Т.О.Борисова,

O.В.Романенко, Н.В.Крисанова, А.А.Борисов, Л.І. Остапченко // Патент

Україна №93637, МПК(2014.01)C07D 277/00; заявник та патентовласник

Нац. мед. університет, Інст. біохімії. − № u 2014; заявл. 30.04.14. (Особистий

внесок дисертанта: аналіз літератури, проведення експериментальних

робіт, обробка даних, узагальнення результатів дослідження, підготовка

рисунків та патенту до друку).

13. Krisanova N. Membrane cholesterol as endogenous modulator of glutamatergic

neurotransmission in the CNS / N. Krisanova, R. Sivko, A. Borisov, T. Borisova

(2009) // Bridges in Life Science Annual Scientific Review, RECOOP HST

Consortium : Abstract book. − 2009. −V.4, N 1, − P. 44. (Особистий внесок

дисертанта: аналіз сучасних літературних даних, статистична обробка

даних, узагальнення результатів дослідження).

14. Sivko R. Cholesterol deficiency increases the extracellular level of glutamate in

presynaptic nerve terminals, thereby mediating cellular pathogenic mechanisms

underlying neurodegeneration / R. Sivko, N. Krisanova, A. Borisov, T. Borisova

// 7

th Parnas Conference, 3–7 October, Yalta, Crimea : The Ukrainian Biochemical

Journal. − 2009.− V.81, N 4, −P. 60. (Особистий внесок дисертанта:

проведення експериментальних робіт, узагальнення результатів

дослідження).

15. Borisov A. Cadmium influences glutamatergic neurotransmission increasing the

extracellular level and decreasing transporter–mediated release of glutamate / A.

Borisov, N. Krisanova, R. Sivko, T. Borisova // 34th FEBS Congress, The FEBS

Journal. Suppl 1, Late Abstract Book. − 2009.−V. 276, − P.61. (Особистий

16

внесок дисертанта: проведення експериментальних робіт, узагальнення їх

результатів).

16. Borisov A. Presynaptic pathology: the neurotoxic effect of cadmium and lead on

the proton gradient of synaptic vesicles and glutamate transport / A. Borisov // 10

Український біохімічний з"їзд, Одеса, Україна, 13–17 вересня, 2010: Укр.

біохім. журн. − 2010.− Т. 82, № 4.– С. 160. (Особистий внесок дисертанта:

проведення експериментальних робіт, узагальнення результатів

дослідження).

17. Крисанова Н. Вплив природного глобулярного білкового комплексу

феритину на транспорт глутамату в нервових терміналях головного мозку /

Н. Крисанова, Р. Сівко, А. Борисов, Т. Борисова // Адаптационные стратегии

живых систем, Новый Свет, Крым, 11–16 июня 2012 : Збірник тез. С– 277–

278. (Особистий внесок дисертанта: аналіз літературних даних,

проведення експериментальних робіт, узагальнення результатів

дослідження, статистична обробка даних).

18. Borisova Т. A comparative study of neurotoxic potential of native Lunar/Martian

dust simulants and synthetic nanoparticles of magnetite / Т. Borisova, A.

Nazarova, R. Sivko, A. Borysov, N. Krisanova // 14 Українська конференція з

космічних досліджень, Ужгород, Україна, 2014: Тези, C.39. (Особистий

внесок дисертанта: проведення експериментальних робіт, узагальнення

результатів дослідження).

19. Borisova Т. Method of lipid sample to analyze glutamate transport in isolated

brain nerve terminals using glutamate biosensor / Т. Borisova, N. Krisanova, A.

Borysov, A. Nazarova, І.Kucherenko, N.Pozdnyakova, O.Soldatkin, A.Soldatkin

// 6

th International Scientific and Technical Conference “Sensors Electronics and

Microsystems Technologies” Odessa, Україна, September 29-October 3, 2014:

Book of Abstracts, P.75. (Особистий внесок дисертанта: проведення

експериментальних робіт, узагальнення результатів дослідження).

20. Borisova Т. External magnetic field–mediated movement of brain nerve

terminals labeled by D–mannose–coated gamma–Fe2O3 nano–sized particles / Т.

17

Borisova, N. Krisanova, R. Sivko, А. Borуsov, M. Babic, D. Horak // FEBS

EMBO 2014 Conference, Paris, France, 2014 : Abstracts. (Особистий внесок

дисертанта: аналіз сучасних даних, статистична обробка даних,

узагальнення результатів).

21. Borysov A. A comparative study of neurotoxic potential of synthesized

polysaccharide–coated and native ferritin–based magnetic nanoparticles / A.

Borysov, N. Krisanova, O. Chunihin, L. Ostapchenko, Т. Borisova // RECOOP

Association “Bridges in Life Sciences”, 9th Annual Scientific Conference Split,

Croatia, 2014 : Abstracts − P.79. (Особистий внесок дисертанта: проведення

експериментальних робіт, статистична обробка даних, узагальнення

результатів дослідження).

22. Borysov A. Modulation of cholesterol content of brain nerve terminals by

cyclodextrin–coated maghemite nanoparticles / A. Borysov, M. Benes, Z.

Prochazkova, R.Sivko, A. Pastuhov, T. Borisova, D. Horak // RECOOP

Association “Bridges in Life Sciences”, 10th Annual Scientific Conference,

Wroclaw, Poland, 2015: Abstracts, P.28. (Особистий внесок дисертанта:

проведення експериментальних робіт, аналіз літератури, статистична

обробка та узагальнення результатів).

23. Borysov A. Cholesterol depletion of nerve terminals aggravates toxic effect of

cadmium on glutamate uptake / A. Borysov // RECOOP Association “6th TriNet

Meeting”, October 15-18, Prague, Czech Republic, 2015: Abstracts, P.38.

(Особистий внесок дисертанта: проведення експериментальних робіт, обробка

результатів).

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з таких

розділів: «Вступ», «Огляд літератури» (8 підрозділів), «Матеріали і методи

дослідження» (12 підрозділів), «Результати досліджень» (4 підрозділи),

«Узагальнення одежаних результатів», «Висновки», «Список використаних

джерел» (168 посиланнь). Дисертацію викладено на 144 сторінках

машинописного тексту та проілюстровано 35 рисунками

ВИСНОВКИ

Удисертаційнійроботівстановленоновінейромодулювальнівластивості

важкихметалівтапротеїновогокомплексуферитинудоскладуякоговходять

неорганічнізалізовміснімагнітнінаночастинкиНаізольованихнервових

терміналяхголовногомозкущурівсинаптосомахпроаналізованозміни

високоафінногонатрійзалежногонакопиченнятастимульованого

деполяризацієюплазматичноїмембранививільненняглутаматуйого

позаклітинногорівняфункціональногостанусинаптичнихвезикулі

потенціалуплазматичноїмембранизадіїважкихметалівферитинута

магнітнихнаночастинокЗ’ясованомеханізмизаякихвищезазначенізмінита

процесиможутьбутизалученідорозвиткупатологічнихпроцесівунервовій

системіінавпакинейропротекції

Доведеноіснуваннядинамічногогомообмінуглутаматучерезплазматичну

мембранунервовихтерміналейпроведенодиференціаціюпресинаптичних

процесівтавиявленоїхподвійність

Кадмійтасвинецьзнижуютьпротемарганецьневпливаєнанакопичення

глутаматунервовимитерміналямитасинаптичнимивезикуламиу

дигітонінермеабілізованихнервовихтерміналяхатакожнапротоннийградієнт

ізольованихсинаптичнихвезикул

Протеїновийкомплексферитинзбільшуєпозаклітиннийрівень



глутаматувнервовихтерміналяхщозумовленозниженням

транспортерзалежногонакопиченнянейромедіаторуЗастосуванняінгібіторів

глутаматнихтранспортерів–інеперешкоджаєздатності

феритинугальмуватинакопиченняглутаматунервовимитерміналями

Феритинзнижуєацидифікаціюсинаптичнихвезикулітонічневивільнення



глутаматуізнервовихтерміналей

Звикористаннямапоферитинубілковоїкапсулипозбавленоїмагнітної

наночастинкивстановленоспецифічніефектибілковоїскладовоїмолекули



феритинуасамеапоферитинподібнодоферитинуздатензбільшувати

позаклітиннийрівень

глутаматуізменшуватитранспортерзалежне

накопичення

глутаматунервовимитерміналями

Доведеновідсутністьвпливунаночастинокбезпокриттятапокритих

певнимиполімераминамембраннийпотенціалпротоннийградієнт

синаптичнихвезикулпочатковушвидкістьнакопичення

глутаматуі

позаклітиннийрівеньглутаматувнервовихтерміналяхПоказанаможливість

маніпуляціїнервовимитерміналямимічениминаночастинками

покритимиманозоюінаночастинкамипокритимиамінопропіл

діетоксиметилсиланомзовнішніммагнітнимполем

Відокремленіспецифічніефектибілковоїтанеорганічноїскладових

молекулиферитинунатранспортглутаматувнервовихтерміналяхсвідчатьщо

уцентральнійнервовійсистеміекзогеннийферитинможемодулювати

гомеостазглутаматузалізозалежнимтазалізонезалежнимшляхомОрімтого

феритиннеможебутивикористанийякмодельмагнітнихнаночастинок

покритихполімерами