

ВИВІЛЬНЕННЯ ГЛУТАМАТУ ІЗ СИНАПТОСОМ ПІД ДІЄЮ ЕЛЕКТРИЧНОГО СТРУМУ

Козяр В.В., доц., к.м.н.
kozyarvasiliy@gmail.com

Олійник О.В., магістр
lena.petrikey96@gmail.com

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Реферат – Визначення глутамату займає важливе місце в клінічній біохімії при діагностиці захворювань, що пов'язані з різкими змінами його рівня в організмі, зокрема, неврологічних хвороб. Для стимуляції вивільнення даного нейромедіатора проводився дозований вплив постійним струмом на препарат синапсом мозкової тканини лабораторних тварин. Джерелом постійного стабілізованого струму був прилад власної розробки. За результатами експериментів встановлено, що електростимуляція струмом 800 мкА на протязі 15 хв. викликає суттєве підвищення вивільнення глутамату із синапсом.

Ключові слова – Глутамат, електростимуляція, постійний струм, синапсоми, сцинтиляція.

I. ВСТУП

Глутамат – важливий нейромедіатор, який завжди присутній в синапсах нервової системи людини, викликає нервове збудження і подальшу передачу сигналу. За допомогою вивільнення глутамату в головному і спинному мозку людини передаються основні інформаційні потоки: все, що пов'язане із сенсорикою, пам'ятю, рухом. Глутамат виступає як складова частина білків та збуджуючий нейромедіатор в ЦНС. Зниження активності глутамату призводить до млявості і апатії. Надлишок - до «перенапруження» нервових клітин і навіть їх загибелі. «Перегорання» нейронів - ексайтотоксичність - спостерігається після нападів епілепсії і при нейродегенеративних захворюваннях. З цих причин нейромедіатор глутамат повинен бути регульований в певних межах.

II. СИНАПТИЧНА ПЕРЕДАЧА

Глутамат є натрієвою сіллю найпоширенішої у головного мозку амінокислоти, його вміст становить 5 - 15 мМоль/кг тканини мозку, а рецептори глутамату знаходять в 40% нейронів головного мозку [1]. Глутамат утворюється в клітинах людини з α -кетоглутарата шляхом трансамінування [2]. Він не має власного «значенневого навантаження», а тільки прискорює передачу сигналу іншими рецепторами – дофаміновими,

норадреналіновими, серотоніновими і т.д. Завдяки цьому глутамат формує синаптичну пластичність - здатність синапсів змінювати свою активність в залежності від реакції постсинаптичних рецепторів. Цей механізм лежить в основі процесу навчання і роботи пам'яті [1].

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. У глутамату є два типи рецепторів - іонотропні (які відкривають мембранну пору для іонів у відповідь на приєднання ліганду) і метаботропні (які при приєднанні ліганду викликають метаболічні перебудови в клітині, рис.1). Молекули медіаторів, реагуючи із специфічними рецепторними білками клітинної мембрани, ініціюють ланцюг біохімічних реакцій і призводять до зміни міжмембранного струму іонів, який викликає деполаризацію постсинаптичної мембрани та виникнення її потенціалу дії. Постсинаптична мембрана – це оболонка нейрона, яка має здатність сприймати нервовий імпульс завдяки наявності в своєму складі особливого білка – рецептора медіатора [4].

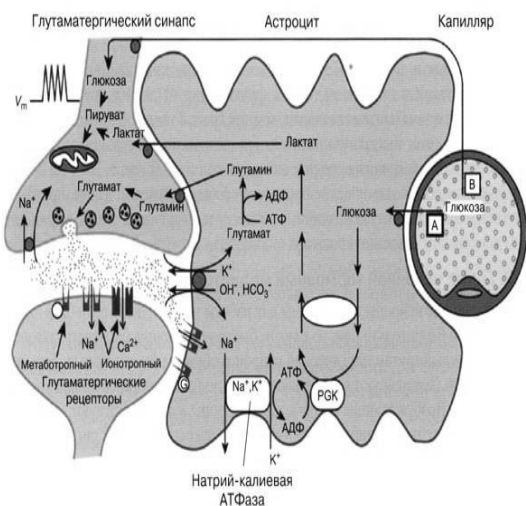


Рис.1 – Механізм передачі збудження в синапсі [3]

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. Після злиття відбувається ендоцитоз везикул, які у подальшому готуються до наступного циклу екзоцитозу. 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. В середньому одна везикула містить приблизно 5000 молекул глутамату. Це призводить до збільшення концентрації позаклітинного глутамату у синаптичній щілині до 0,5 – 1,0 мкМоль [5].

При гомогенізації нервової тканини в ізотонічних умовах синаптичні закінчення відокремлюються від нейронних відростків і утворюють так звані синаптосоми, які можливо виділити центрифугуванням у шарі з 0,8 М концентрацією сахарози [6]. Синаптосоми, ізольовані синаптичні терміналі нейронів, містять численні дрібні синаптичні везикули, іноді крупніші везикули з щільним ядром та часто одну або кілька малих мітохондрій. Вони мають морфологічні особливості та більшість хімічних властивостей висхідного нервового терміналу

[7]. Синаптосоми зазвичай використовуються для дослідження синаптичної передачі *in vitro*, оскільки в них функціонують молекулярні механізми, необхідні для поглинання, зберігання та вивільнення нейротрансмітерів. Вони підтримують нормальний мембранний потенціал, містять пресинаптичні рецептори, переміщують метаболіти та іони, а при деполяризації виділяють кілька нейромедіаторів (включаючи ацетилхолін, амінокислоти, катехоламіни та пептиди), які залежать від Ca^{2+} [8]. Визначення глутамату займає важливе місце в клінічній біохімії при діагностиці захворювань, що пов'язані з різкими змінами рівня глутамату в організмі, зокрема, неврологічних захворювань. Тому пропонується застосовувати дозований вплив постійним струмом на препарат синаптосом для дослідження ефективності вивільнення даного медіатора в межах нормального функціонування організму.

III. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження було проведене створеним пристроєм для електростимуляції, структурна схема якого представлена на рис. 2. Джерело живлення 9 В складалося з батареїки «Крона» та DC/DC перетворювача. В програмному забезпеченні DipTrace [10] була проведена розробка друкованої плати. Схема, трасована за допомогою DipTrace, стала основою для виготовлення приладу. Також для проведення дослідів були виготовлені електроди (рис. 3).

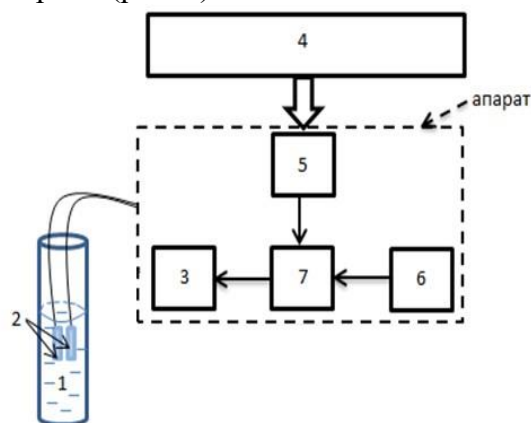


Рис. 2 – Структурна схема пристрою [9]
1 – досліджуваний об'єкт, 2 – електроди, 3 – джерело струму, 4 – джерело живлення, 5 – фільтр, 6 – опорне джерело напруги, 7 – регулятор струму



Рис. 3 – Електроди для стимуляції

Електроди у формі кільця діаметром 5 – 6 мм через ізолюючий корок вводилися в пробірку, де відбувався вплив. Матеріал електродів – нержавіюча біосумісна сталь Alloy 303 фірми Ethicon (Велика Британія). Експерименти проводили на препаратах нервових синапсом, 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 синапсом [6]. Накопичення L-[14C] глутамату синапсоматами визначали за алгоритмом: зразки суспензії синапсом об'ємом 125 мкл з концентрацією білка 250 мкг/мл на водяній бані 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. Потім відбирали 4 проби суспензії по 125 мкл – як контроль, центрифугували їх на протязі 15 с із швидкістю 13 400 об./хв центрифугузі Eppendorf MiniSpin для відділення синапсоматами від надзалишкового розчину. Надзалишок об'ємом 100 мкл переносили у спеціальні флакони, куди додавали сцинтиляційну речовину об'ємом 1 мл,

необхідну для детекції радіоактивно міченого глутамату. Її хімічний склад: метанол, параксилен, Тритон X-100 та 1,4-(ди-2-(фенилоксазоліл))-бензен. Далі дані флакони розміщували в лічильнику Delta 300 (Tracor Analytic, США) для отримання результату. Для досліду ці всі дії повторювались, але спочатку в пробірці на водяній бані при температурі 37 °С відбувалася стимуляція суспензії синапсом постійним стабільним струмом.

IV. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для визначення оптимальних параметрів стимуляції постійним струмом було проведено ряд дослідів:

1) Вплив струмом 100 мкА протягом 1 - 15 хв. (рис. 4).

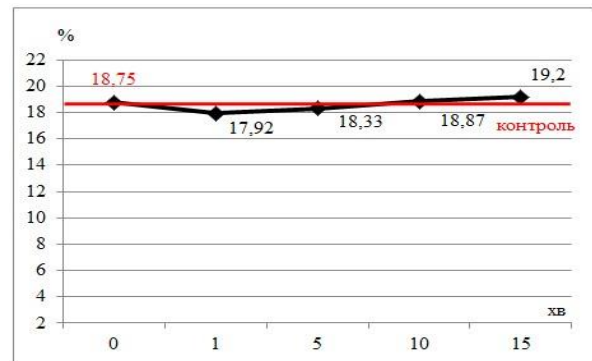


Рис. 4 – Вплив струмом 100 мкА

З графіку рис. 4 видно, що струм 100 мкА суттєво не впливав на виділення глутамату із синапсоматами. Після стимуляції струмом 400 мкА (рис. 5) виділення глутамату після 15 хв. впливу зростало тільки на 4%.

2) Вплив струмом 400 мкА на протязі до 15,5 хв. (рис. 5).

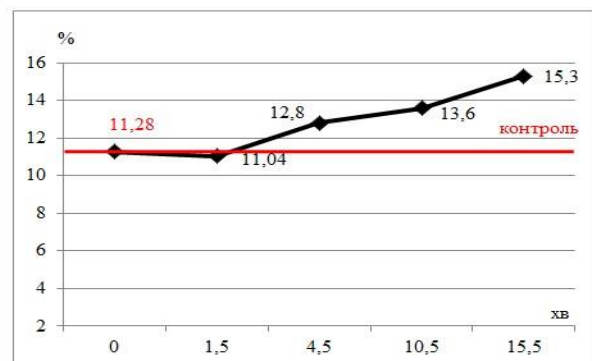


Рис. 5 – Вплив струмом 400 мкА

Додатково оцінювалися результати стимуляції струмом 1 мА та перевірялася

чистота досліджу: реакція на занурення в суспензію синапсом самих електродів, без вмикання струму (рис. 6).

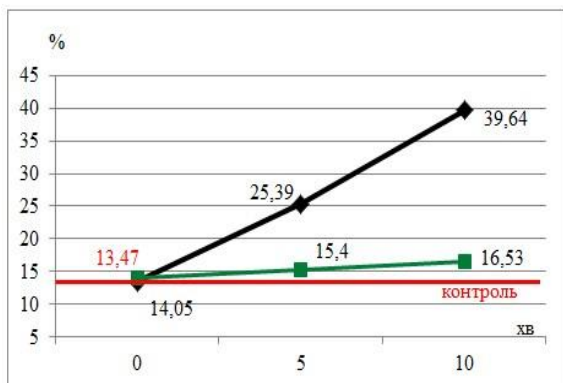


Рис. 6 – Вплив струмом 1 мА: чорна крива - стимуляція; зелена крива – без стимуляції, але занурені електроди

З рис. 6 бачимо, що вже через 10 хв. Стимуляції струмом виділення глутамату збільшувалося на 23,1% від контролю (чорна крива). Різкий підйом графіку та помутніння в цей час культурального середовища може свідчити про загибель біологічних об'єктів внаслідок дії занадто високого струму. При цьому встановлено, що самі електроди не чинять суттєвого впливу (зелена крива).

Досліджувався також вплив на виділення глутамату струму 800 мкА протягом 5 - 15 хв. і додавання Ca^{2+} , з огляду на його здатність змінювати властивості мембранних структур (рис. 7).

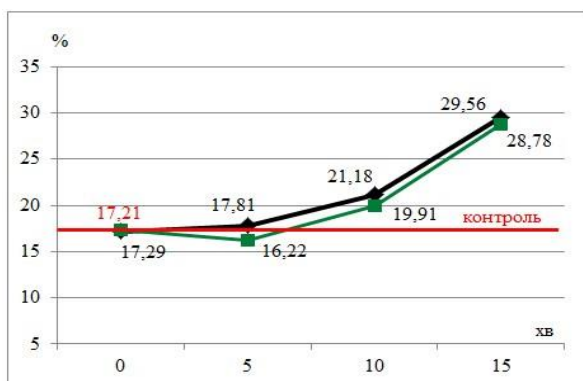


Рис. 7 – Вплив струмом 800 мкА: чорна крива-стимуляція; зелена крива - стимуляція з додаванням Ca^{2+} .

Графіки рис. 7 вказують на суттєве збільшення виділення глутамату з часом (чорна і зелена криві) та на відсутність значного впливу Ca^{2+} на цей процес. Таким чином встановлено, що виділення глутамату із синапсом збільшується саме внаслідок дії постійного електричного струму, а

враховуючи те, що реакційне середовище (суспензія) при цьому лишалося прозорим, оптимальною для стимуляції слід вважати силу струму 800 мкА, а час стимуляції – 15 хв. Подальші дослідження виконувались із дотриманням встановленого оптимального режиму електростимуляції. Сумарні результати показані на рис. 8.

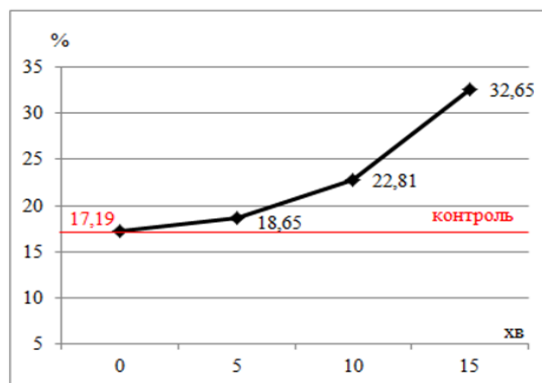


Рис. 8 – Вихід глутамату із синапсом при впливі струмом 800 мкА

Для статистичного аналізу результатів експериментів використовувалося програмне забезпечення IBM SPSS Statistics [11]. До початку аналізу виконано визначення розподілу отриманих даних за допомогою одновибіркового критерію Колмогорова - Смірнова [12], який свідчив про нормальний розподіл даних. Це дало підставу використовувати параметричний t-критерій Стьюдента для парних (залежних) вибірок даних [13].

V. ВИСНОВКИ

1. Створений прилад забезпечує стимуляцію синапсом стабільним постійним струмом. Стимуляцію доцільно проводити протягом 15 хвилин струмом 800 мкА.

2. Під впливом постійного струму вихід глутамату із синапсом збільшується відносно контролю на 8,4%, 32,6% та на

3. Обробка отриманих даних в середовищі IBM SPSS Statistics виявила високу вірогідність збільшення вивільнення глутамату після 10 та 15 хвилин електростимуляції ($P < 0,001$).

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

[1] Нейромедиаторы, часть вторая: аденозин, ацетилхолин, глутамат и гамма-аминомасляная кислота [Електронний ресурс]. – 2016. – Режим доступу до ресурсу: <https://habr.com/ru/company/atlasbiomed/blog/398085/>.

- [2] Лебедев В. Очень нервное возбуждение [Электронный ресурс] / Виктор Лебедев. – 2015. – Режим доступа до ресурсу: <https://biomolecula.ru/articles/ochen-nervnoe-vozbuzhdenie>.
- [3] Глутамат, Разгон Мозга! [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа до ресурсу: <https://clevermind.ru/glutamat-razgon-mozga/>.
- [4] Синаптична передача збудження [Электронный ресурс] // Навчальні матеріали онлайн. – 2017. – Режим доступа до ресурсу: http://pidruchniki.com/80602/meditsina/sinaptichna_peredacha_z_budzhennya.
- [5] Пастухов А. О. Na⁺-залежный транспорт глутамату та екзоцитоз в нервних терміналях головного мозку за умов гіпотермії : дис. канд. біол. наук : 03.00.04 – біох. / Пастухов Артем Олегович – Київ, 2019. – 163 с.
- [6] Коржова В. В полном объеме: синаптические везикулы в трехмерной модели синапса [Электронный ресурс] / Виктория Коржова. – 2014. – Режим доступа до ресурсу: <https://biomolecula.ru/articles/v-polnom-obeme-sinapticheskie-vezikuly-v-trekhmernoi-modeli-sinapsa>.
- [7] Synaptosome [Электронный ресурс]. – 2019. – Режим доступа до ресурсу: <https://en.wikipedia.org/wiki/Synaptosome>.
- [8] Нейромедиаторы, часть вторая: аденозин, ацетилхолин, глутамат и гамма-аминомасляная кислота [Электронный ресурс]. – 2016. – Режим доступа до ресурсу: <https://habr.com/ru/company/atlasbiomed/blog/398085/>.
- [9] Петрикей О. В. Моделювання впливу електростимуляції на тканини нервової системи / Петрикей О. В. – Київ : Дипломна робота на отримання ступеня бакалавра, 2018. – 63 с.
- [10] DipTrace [Электронный ресурс] // Novarm Limited. – 2018. – Режим доступа до ресурсу: <https://diptrace.com/rus/diptrace-software/>.
- [11] IBM SPSS Statistics [Электронный ресурс]. – 2019. – Режим доступа до ресурсу: <http://www.predictivesolutions.ru/software/statistics.htm>.
- [12] Тест Колмогорова-Смирнова (Kolmogorov-Smirnov Test) [Электронный ресурс]. – 2018. – Режим доступа до ресурсу: http://www.datuapstrade.lv/rus/spss/section_14/13/.
- [13] Марапов Д. Парный t-критерий Стьюдента - метод оценки значимости различий повторных измерений [Электронный ресурс] / Д. Марапов. – 2013. – Режим доступа до ресурсу: <http://medstatistic.ru/theory/tpars.html>

УДК 616.8-008.6

ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ГЛУТАМАТА ИЗ СИНАПТОСОМ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ТОКА

Козяр В.В., доц., к.м.н.
kozyarvasiliy@gmail.com

Олейник Е.В., магистр
lena.petrikey96@gmail.com

Национальный технический университет Украины
«Киевский политехнический институт имени Игоря Сикорского»

Реферат – Определение глутамата занимает важное место в клинической биохимии при диагностике заболеваний, связанных с резкими изменениями его уровня в организме, в частности, неврологических болезней. Для стимуляции высвобождения данного нейромедиатора проводилось дозированное воздействие постоянным током на препарат синаптосом мозговой ткани лабораторных животных. Стабилизированным источником постоянного тока был прибор собственной разработки. В результате экспериментов установлено, что электростимуляция током 800 мкА в течение 15 мин. вызывает существенное увеличение выхода глутамата из синаптосом.

Ключевые слова – Глутамат, электростимуляция, постоянный ток, синаптосомы, сцинтиляция.

UDC 616.8-008.6

RELEASE OF GLUTAMATE FROM SINAPTOSOMS UNDER ACTION OF ELECTRICAL CURRENT

Koziar V.V., Assoc. Prof., Ph.D. med.
kozyarvasiliy@gmail.com

Oleinyk O.V., magister
lena.petrikey96@gmail.com

Abstract – Estimation of glutamate have important place in clinical biochemistry during diagnostic of diseases, which are associated with abrupt changes of glutamate level in organism, especially, neurological diseases. For stimulation to release this neuromediator, dosed action of direct current on sinaptosom's preparation from laboratory animal's brain tissue was maded. Source of stabilized direct current was of own construction device. Results of experiments showed that electrostimulation with current 800 mcA during 15 min. produced reliable rising release of glutamate from sinaptosoms.

Key words – Glutamate, electrostimulation, direct current, sinaptosoms, scintilation.